

**Expression différentielle des chimiokines et de leurs récepteurs
lors des réponses allergiques directe et indirecte**

**Mémoire de maîtrise écrit par
Charles-David Dubé**

**Sous la direction de
Dr Claude Daniel**



INRS - INSTITUT ARMAND - FRAPPIER

7 mai 2008

Table des matières

Liste des abréviations.....	III
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	V
Sommaire.....	VI
Introduction.....	1
Lymphocytes T : principaux responsables.....	3
Voies directe et indirecte.....	4
Mécanismes effecteurs du rejet.....	7
Clone 2.102 : Un lymphocyte T pas ordinaire!.....	11
Importance des organes lymphoïdes secondaires.....	13
Chimiokines.....	17
Chimiokines en transplantation.....	20
Chimiokines et cellules dendritiques.....	21
Chimiokines et lymphocytes.....	24
Article.....	28
Abbreviations.....	29
Abstract.....	30
Introduction.....	31
Materials and Methods.....	32
Results.....	35
Discussion.....	37
Acknowledgment.....	40
Table 1: Expression profiles of chemokines and chemokine receptors in allografts rejected by direct and indirect pathways.....	44
Figure 1. Early infiltration of 2.102 Tg T cells during direct alloreactivity.....	45
Figure 2: qRT-PCR for IFN γ , chemokines and chemokine receptors expression.....	46
Figure 3: Confocal microscopy on grafts at day 7.....	47
Conclusion générale.....	48
Remerciements.....	54
Bibliographie.....	55
Annexes.....	63

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc/ARNc	ADN/ARN complémentaire
Aly	Alymphoblastique
ANOVA	Analysis of variance
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DC	Dendritic cell
DTH	Delayed type hypersensitivity
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
Hb	Hémoglobine
HLA	Human leucocyte antigen
IFN γ	Interféron γ
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
Lt α	Lymphotoxine α
Lt β r	Lymphotoxin β receptor
mHEL	Membrane hen egg lysozyme
NK	Natural killer
NO	Nitrogen oxyde
OLS	Organe lymphoïde secondaire

PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
Plt	Paucity of lymph node T cells
RAG	Recombination activating gene
RPA	RNase protection assay
RT	Reverse transcriptase
TCR	T cell receptor
Tg	Transgénique
Th1/Th2/Th17	T helper 1, 2 and 17
Thy	Thymus cell antigen
TLT	Tissu lymphoïde tertiaire
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Lymphocyte T régulateur
UA	Unité arbitraire

Liste des figures

Figure 1. Schéma des voies directe et indirecte d'alloréactivité (Rogers et Lechler, 2001)	5
Figure 2. Les multiples voies du rejet d'allogreffe (Goldman <i>et al.</i> , 2001)	8
Figure 3. Représentation schématique de la spécificité du LT transgénique 2.102 et modèle de transplantation (Sauve <i>et al.</i> , 2004)	12
Figure 4. Détection précoce des cellules effectrices activées dans la greffe au cours du rejet par la voie directe (Baratin, Bonin et Daniel, 2004)	15
Figure 5. Les LT effecteurs activés sont principalement détectés dans les ganglions drainants de la souris rejetant sa greffe par la voie indirecte (Baratin, Bonin et Daniel, 2004)	16
Figure 6. Les quatre principaux groupes de chimiokines et leurs récepteurs (Hancock <i>et al.</i> , 2000a)	18
Figure 7. La maturation et la différenciation des lymphocytes T sont caractérisées par des changements séquentiels de leurs propriétés de migration (Moser <i>et al.</i> , 2004)	25
Figure 8. RT-PCR quantitatif pour l'expression du transgène 2.102 dans les ganglions drainants	64
Figure 9. RT-PCR quantitatif pour l'expression de la chimiokine CCL19 dans les greffons	65
Figure 10. RT-PCR quantitatif illustrant l'expression de l'IFN γ et du transgène 2.102 dans des modèles de transplantation avec ou sans lymphocytes T et/ou cellules NK	66
Figure 11. Échange entre les cellules NK et les cellules dendritiques (Hamerman, Ogasawara et Lanier, 2005)	67

Liste des tableaux

Tableau 1. Cinétique de l'expression des chimiokines lors de la maturation des cellules dendritiques (Sallusto et Lanzavecchia, 2000)	23
Tableau 2. Nomenclature des chimiokines; passé et futur (Rosenkilde et Schwartz, 2004)	63

Sommaire

L'activation des lymphocytes T CD4⁺ alloréactifs peut se faire par une reconnaissance directe ou indirecte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité allogéniques et la migration de ces cellules au greffon ou aux organes lymphoïdes secondaires est hautement dépendante du système des chimiokines et de leurs récepteurs. En utilisant un modèle murin unique établi sur la base d'un seul clone de lymphocyte T (2.102) dans lequel les voies d'alloréactivité directe et indirecte peuvent être étudiées séparément, nous avons démontré que les lymphocytes T effecteurs sont d'abord détectés dans l'allogreffe lors de la voie directe contrairement à la voie indirecte où les lymphocytes T effecteurs sont d'abord détectés dans les ganglions drainants avant leur migration au greffon. L'hypothèse que la sensibilisation des lymphocytes T naïfs au cours de la voie directe peut prendre place à l'extérieur des organes lymphoïdes secondaires a donc été émise. La présente recherche a été effectuée en caractérisant l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs pendant les premières phases du rejet d'allogreffes. Des analyses d'expression de l'ARN messenger ainsi que des analyses d'immunohistochimie ont été réalisées sur des allogreffes de peau prélevées à différents temps suivant la transplantation. Les résultats démontrent que trois jours suivant la transplantation, plusieurs chimiokines et récepteurs de chimiokines sont exprimés différemment selon les deux voies d'alloréactivité. Plus précisément, les chimiokines induites par l'IFN γ et les récepteurs CCR1 et CCR7 sont régulés à la hausse de façon précoce dans la voie directe. En plus, nous démontrons que les lymphocytes T infiltrant le greffon au cours de la réponse directe expriment CCR7 à leur surface. En conclusion, les lymphocytes T naïfs sont recrutés de façon précoce au greffon dans la voie directe, au même moment où les mécanismes effecteurs menant au rejet s'enclenchent. Ce recrutement pourrait être provoqué par la production de CCL19 par les cellules dendritiques activées au greffon. Ces observations supportent l'hypothèse de l'activation des lymphocytes T naïfs alloréactifs à l'intérieur de la greffe lors du rejet par la voie directe.

Introduction

L'activation des lymphocytes T (LT) CD4⁺ alloréactifs peut se faire par une reconnaissance directe ou indirecte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ensuite, l'expansion et la migration de ces cellules mèneront à la phase effectrice du rejet de la greffe, avant qu'elle soit complètement rejetée. La migration des cellules effectrices vers l'allogreffe ou les organes lymphoïdes secondaires (OLS) est hautement dépendante du système des chimiokines et de leurs récepteurs. Notre laboratoire a développé un modèle murin unique basé sur un clone de LT (2.102) où les voies indirecte et directe peuvent être étudiées séparément. Dans ce modèle, la cinétique de rejet de greffe par les deux voies est similaire. Par contre, l'initiation des réponses alloréactives est clairement différente. Les LT alloréactifs sont premièrement détectés dans l'allogreffe dans la voie directe, contrairement à la voie indirecte où les LT effecteurs sont premièrement détectés dans les ganglions drainants avant leur migration au greffon. Ces résultats suggèrent que la sensibilisation des LT naïfs de manière directe pourrait prendre place à l'extérieur des OLS. Le but de cette étude est de mieux comprendre la migration des cellules dans le greffon en étudiant l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs dans les deux voies d'alloréactivité pendant l'activation des LT, soit l'initiation du rejet de greffe.

Revue de littérature

« La destruction des tissus étrangers est menée à terme par un mécanisme immunitaire »

Sir Peter Medawar

Prix Nobel de physiologie/médecine, 1960

Il fallut attendre la fin des années 1940 avant de pouvoir affirmer que le système immunitaire était la cause du rejet de tissus étrangers. À partir de ce moment, il devint clair qu'il était possible de déjouer les mécanismes naturels du rejet à l'aide d'immunosuppresseurs. C'est en 1954 qu'eut lieu la première greffe de rein réussie entre des jumeaux identiques. Cinq ans plus tard, avec l'aide d'immunosuppresseurs, eut lieu la première greffe de rein entre deux individus ne possédant aucun lien entre eux, qui demeura fonctionnelle pendant 20 ans (Rossini, Greiner et Mordes, 1999). Par contre, les médecins et scientifiques surent plus tard qu'il s'agissait alors d'une exception plutôt que d'une généralité. En effet, si aujourd'hui 90% des greffes de rein effectuées sont fonctionnelles après un an, seulement 20% de celles-ci le sont après 10 ans, et ce, malgré le raffinement des techniques de chirurgie et le développement de nouveaux immunosuppresseurs plus sûrs et plus performants. À l'heure actuelle, au Québec, il s'effectue en moyenne plus d'une transplantation par jour (rein, foie, poumon, cœur). Selon le site internet américain du *United Network for Organ Sharing*, environ 100 000 patients sont en attente d'un organe aux États-Unis, et 6 500 d'entre eux meurent chaque année faute d'organe.

L'alloréactivité est la réponse adaptative de notre système immunitaire dirigée contre un organe ou un tissu provenant d'un autre individu de la même espèce, nommé allogreffe. Les allogreffes sont rejetées de façon très rapide. Par exemple, une allogreffe de peau chez la souris est habituellement rejetée en moins de 13 jours. La cause principale du rejet est la reconnaissance par les LT du polymorphisme élevé entre les gènes du CMH chez les différents individus. Ce groupe de gènes est appelé « human leucocyte antigen » (HLA) chez l'homme et H-2 chez la souris. À cet effet, si l'haplotype d'une souris est H-2^k, H-2^p ou H-2^b, cela signifie que toutes ses molécules du CMH sont d'allèle k, p ou b

respectivement. Chez l'humain, il existe plus d'une vingtaine de gènes différents, et pour certains de ces gènes, il peut exister jusqu'à 600 allèles différents. Ce qui constitue en fait une des plus grandes forces de notre système immunitaire, le polymorphisme, devient le plus grand obstacle en transplantation. La greffe isogénique, ou syngénique, est une greffe entre deux individus génétiquement identiques. Ce type de greffe ne subit aucun rejet, d'où le fait qu'une greffe entre des jumeaux identiques ne sera jamais rejetée.

Les xéno greffes sont des greffes entre deux espèces différentes, par exemple, un cœur de porc greffé chez l'humain. Elles sont intéressantes du point de vue où elles régleraient le problème de manque d'organes. Les xéno greffes sont par contre rejetées aussi rapidement que les allo greffes. L'utilisation d'animaux génétiquement modifiés pourrait s'avérer prometteuse, comme par exemple la réalisation de porcs déficients pour la α 1,3-galactosyltransférase. Cette enzyme produit le sucre α 1,3-Gal, qui se retrouve de façon ubiquitaire sur l'endothélium vasculaire porcin, contre lequel l'humain possède des anticorps naturels spécifiques. Cette avancée récente, additionnée d'une meilleure compréhension du rejet des xéno greffes et des zoonoses révèlent un meilleur avenir et laissent même entrevoir des essais cliniques pour ce type de greffe (Yang et Sykes, 2007).

Lymphocytes T : principaux responsables

Comme mentionné ci-haut, les LT jouent un rôle essentiel lors du rejet des allo greffes. Ce sont eux qui vont détecter le « non-soi ». Les molécules du CMH du donneur deviennent des antigènes (alloantigènes) qui seront reconnus par les LT. Les premières évidences de l'importance des LT dans le rejet ont été établies grâce à la souris *nude* (souris sans thymus). À l'âge adulte, cette souris ne possède pas, ou presque pas de LT et est incapable de rejeter les allo greffes (Corley et Kindred, 1977). Sans l'aide des LT, le système immunitaire de la souris est donc incapable de générer une réponse immunitaire suffisante pour rejeter l'organe transplanté. Par la suite, il fut démontré que la reconstitution de souris lymphopéniques (irradiées de façon létale) avec des LT restaurait la capacité de rejet des allo greffes (Dorsch et Roser, 1974, Hall, Dorsch et Roser, 1978).

Plusieurs études ont mis l'emphase sur deux sous-types particuliers de LT: les LT CD4⁺ et CD8⁺. Le rôle des LT CD4⁺ n'est plus à prouver; il a été démontré que le rejet était restauré suite à la reconstitution de la souris *nude* avec des LT CD4⁺ (Dalloul *et al.*, 1996). De plus, la souris BALB/c CD4^{-/-} était incapable de rejeter les allogreffes (Krieger, Yin et Fathman, 1996). Par contre, ceci indiquait du même coup que les LT CD8⁺ étaient incapables de générer à eux seuls une réponse alloréactive menant au rejet. Ceci ne s'est avéré véridique que pour la lignée de souris BALB/c, puisque plus récemment, en 2004, une autre équipe a obtenu des résultats contraires avec les souris C57BL/6 CD4^{-/-} (Vu *et al.*, 2004). Cette lignée est capable de rejeter aisément les allogreffes, démontrant bien l'importance des LT CD8⁺ dans l'initiation du rejet. Aujourd'hui, il est bien accepté que les LT CD4⁺, autant que les LT CD8⁺, peuvent causer le rejet d'allogreffes indépendamment, occupant donc un rôle primordial dans ce mécanisme.

Voies directe et indirecte

En 1982, Lechler et Batchelor démontrèrent que les LT impliqués dans l'alloréactivité pouvaient être sensibilisés contre les alloantigènes selon deux voies distinctes et indépendantes: les voies directe et indirecte (Lechler et Batchelor, 1982). Comme illustré à la figure 1, la voie directe implique que les LT reconnaissent la molécule intacte du CMH allogénique avec son peptide sur une cellule présentatrice d'antigènes (CPA) du donneur, par exemple, une cellule dendritique (DC). La voie indirecte requiert plutôt qu'une CPA du receveur capte les alloantigènes, en occurrence les molécules du CMH, les dégrade et en présente les fragments peptidiques via ses propres molécules du CMH du soi (Rogers et Lechler, 2001). Le LT alloréactif reconnaîtra alors les peptides allogéniques présentés par les CPA du soi. Il s'agit de la présentation classique des antigènes, tel que connu dans la littérature. Lors du rejet, les deux voies s'exécutent simultanément et indépendamment l'une de l'autre. Le répertoire des LT impliqués dans les deux voies est entièrement différent et ne se chevauche pas (Le Moine, Goldman et Abramowicz, 2002).

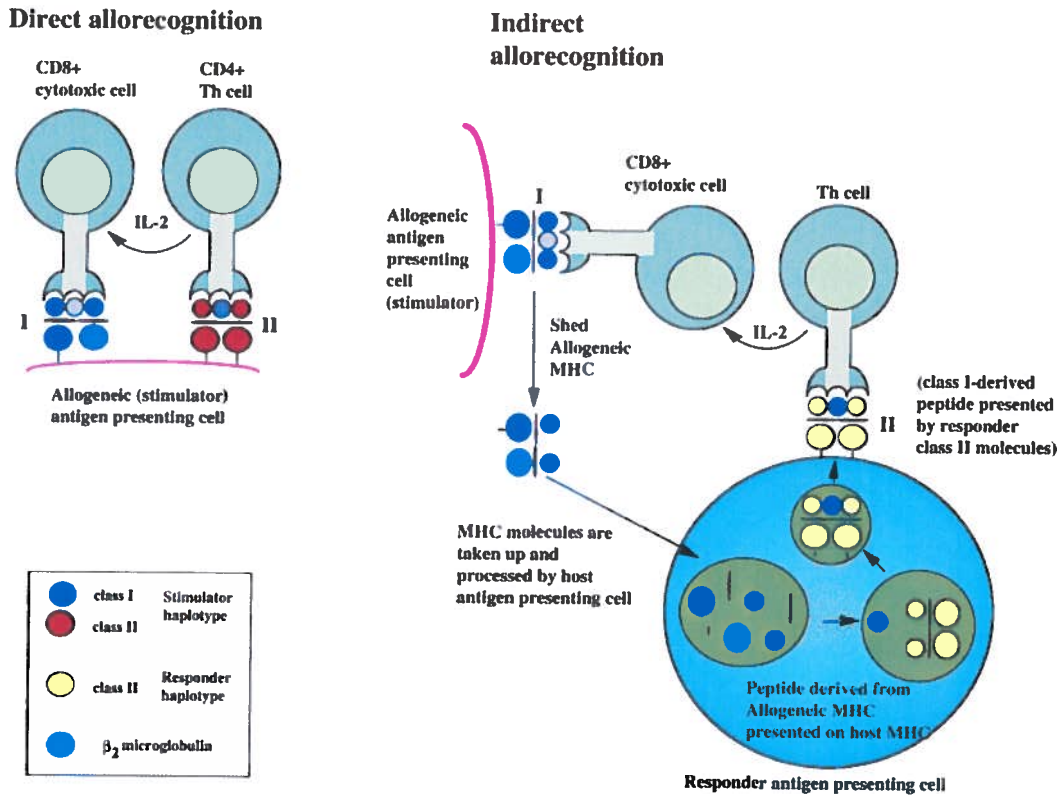


Figure 1. Schéma des voies directe et indirecte d'alloréactivité (Rogers et Lechler, 2001)

Dans l'alloréactivité directe, le TCR reconnaît directement la molécule de conformation native du CMH allogénique exprimée sur les cellules du donneur. Dans l'alloréactivité indirecte, les molécules du CMH du donneur sont internalisées et traitées par les CPA du receveur avant que les peptides dérivés de ces molécules soient présentés sur les molécules du CMH du receveur aux LT alloréactifs.

Depuis la découverte de ces deux voies d'activation, plusieurs approches ont été développées pour tenter d'évaluer l'implication des deux voies d'alloréactivité lors du rejet de greffe. Avec le développement des souris transgéniques, il devint possible d'étudier la voie directe et indirecte de façon séparée et il fut démontré que chacune des voies pouvaient mener indépendamment au rejet d'allogreffes (Baratin, Bonin et Daniel, 2004). Les réponses allogéniques rapides et fortes sont souvent associées à une activation des LT par la voie directe, où plus de 10% du répertoire des LT peut être impliqué. Habituellement, ces réponses sont bien contrôlées par les immunosuppresseurs couramment utilisés, comme les inhibiteurs de la calcineurine, tels que la cyclosporine, et les corticostéroïdes (Agarwal et Pescovitz, 2006). La voie indirecte est plutôt associée au rejet chronique, un type de rejet plus lent, qui provoque une détérioration à long terme de l'organe transplanté. Le répertoire des LT qui peut être impliqué lors de cette réponse est de l'ordre de 0,1 à 1% (Benichou, Valujskikh et Heeger, 1999). Les immunosuppresseurs ont peu d'effets sur ce type d'activation et il constitue aujourd'hui la principale cause d'échec à la transplantation.

Étant donné que l'activation des LT dans la voie directe est menée par une reconnaissance intacte de molécules de CMH, la présence de CPA dans l'organe transplanté au moment de la transplantation serait impérative à cette voie. Par contre, certaines équipes s'intéressent aujourd'hui à la capacité des cellules endothéliales de pouvoir activer les LT dans un contexte de transplantation. En effet, des études démontrent qu'une reconnaissance cognitive des molécules du CMH de classe I et des molécules de costimulation entre les LT CD8⁺ et les cellules de l'endothélium vasculaire pourrait être impliquée dans le rejet des allogreffes de cœur vascularisées chez les rongeurs (Kreisel *et al.*, 2002). Contrairement à ces animaux, l'homme exprime en plus des molécules du CMH de classe I, les molécules du CMH de classe II à la surface des cellules endothéliales et celles-ci sont même surexprimées dans un contexte de transplantation. Les interactions entre les LT CD4⁺ et ces molécules sur l'endothélium pourraient donc être importantes dans l'initiation du rejet de greffe chez l'homme (Tay, McCormack et Rose, 2004).

Récemment, il fut démontré que les DC sont capables d'échanger des quantités importantes de molécules du CMH de classe I et II entre elles ou provenant de cellules endothéliales (Jiang, Herrera et Lechler, 2004). Une fois échangées, ces molécules demeurent intactes à la surface des cellules et sont aptes de mener à l'activation spécifique des lymphocytes T naïfs, tant CD4⁺ que CD8⁺ (Thery *et al.*, 2002, Andre *et al.*, 2004). Ces échanges se produisent aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et donneraient lieu à une troisième voie d'alloréactivité: la voie semi-directe (Jiang, Herrera et Lechler, 2004). Cette voie aurait surtout une importance pour les populations de LT CD8⁺ qui d'un côté ont besoin de l'aide des LT CD4⁺ auxiliaires pour proliférer, mais qui peuvent être aussi parfois réprimés par les LT régulateurs (Treg). Les interactions d'aide ou de répression entre les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ seraient favorisées lorsque ces deux types de cellules sont activés par la même DC. La voie semi-directe augmenterait donc le nombre de possibilités d'interactions cellulaires lors de la transplantation d'un organe en permettant à une même DC d'activer des LT selon les voies directe et indirecte au même moment. Par exemple, un LT CD4⁺ auxiliaire sensibilisé contre un alloantigène par la voie indirecte par une DC du soi pourrait apporter une aide, en sécrétant de l'IL-2 par exemple, à un LT CD8⁺ sensibilisé contre un alloantigène par la voie directe par la même DC simultanément.

Mécanismes effecteurs du rejet

Les LT CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que les macrophages sont les principaux sous-groupes de cellules qui infiltrent le greffon lors d'allogreffes non contrôlées par les immunosuppresseurs (Hall, 1991). En synergie avec les autres cellules du système immunitaire, ils entameront la phase de rejet, c'est-à-dire la détérioration du tissu transplanté. La figure 2 résume bien cette phase effectrice. Tout d'abord, les LT CD4⁺ auxiliaires de type 1 (LT Th1), de par leur production d'interleukine (IL)-2 et d'interféron- γ (IFN γ) vont aider à l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques, vont entamer une réponse d'hypersensibilité retardée (dépendante des macrophages) et vont provoquer

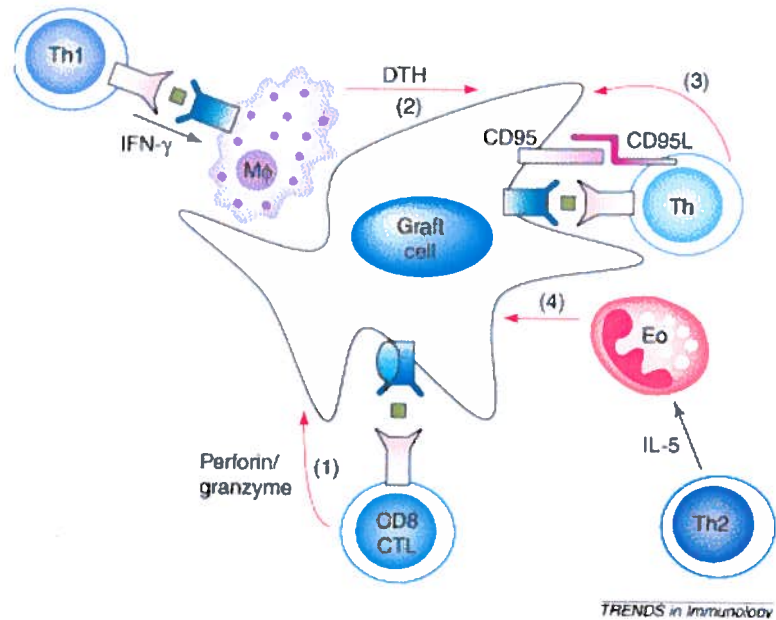


Figure 2. Les multiples voies du rejet d'allogreffe (Goldman *et al.*, 2001)

Les mécanismes classiques de rejet incluent: (1) Une cytotoxicité directe des LT cytotoxiques CD8⁺ (CTL) dépendante des perforines et/ou des granzymes et (2) une hypersensibilité retardée mise en place par les Th1 qui activent les macrophages via l'IFN γ . Les mécanismes alternatifs incluent: (3) La cytotoxicité dépendante de CD95L (FasL) des Th1 et (4) d'une inflammation provoquée par les éosinophiles activés par les Th2 via l'IL-5.

la synthèse d'immunoglobulines impliquées dans l'activation du complément par les lymphocytes B (LB). Les Th1 pourront éventuellement aussi participer directement au rejet de l'organe transplanté par l'expression du récepteur de mort FasL à leur surface.

Les LT CD4⁺ auxiliaires de type 2 (LT Th2), quant à eux, secréteront de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13 ce qui permettra surtout l'activation des éosinophiles (Goldman *et al.*, 2001). Le rôle des éosinophiles en transplantation est encore sujet à débat. En greffant des îlots de Langerhans porcins chez des souris déficientes pour l'IL-5, une cytokine qui joue un rôle central dans le développement et l'activation des éosinophiles, on observe une absence de leur présence dans le greffon sans toutefois modifier la cinétique de rejet. Il fut ainsi conclu que les éosinophiles n'avaient aucun rôle à jouer dans le rejet de ce type de greffe (Simeonovic *et al.*, 1997). Par la suite, il fut par contre démontré que les éosinophiles jouaient un rôle important dans le rejet d'allogreffes de cœur en l'absence des LT CD8⁺ (Braun *et al.*, 2000). Aujourd'hui, il est relativement bien accepté que les éosinophiles contribuent tant au rejet aigu autant que chronique dans un contexte de réponse alloréactives de type Th2 (Goldman *et al.*, 2001). Les LT Th2 peuvent aussi activer les LB alloréactifs ce qui mènera à leur division et à la production d'alloanticorps spécifiques dirigés contre les molécules du CMH du donneur. Ceci n'est observé que lors de l'activation indirecte des LT CD4⁺ (Pettigrew *et al.*, 1998, Sauve *et al.*, 2004).

Les Treg, qui sont un sous-type CD4⁺ CD25⁺ de LT étant capables d'inhiber la prolifération d'autres LT, attirent de plus en plus l'attention en transplantation puisqu'ils pourraient jouer un rôle important dans la tolérance des greffes (Waldmann *et al.*, 2006). Ces LT sont d'ailleurs impliqués dans plusieurs modèles de tolérance (Trenado *et al.*, 2003, Wood et Sakaguchi, 2003, Akl, Luo et Wood, 2005). Par contre, le ratio Treg/LT effecteurs doit être très élevé en transplantation pour réussir à établir une tolérance, contrairement aux modèles d'autoimmunité par exemple, et ce ratio augmente avec le nombre d'alloantigènes (Kang, Tang et Bluestone, 2007). Ceci explique pourquoi l'utilisation des Treg en essais clinique chez les primates pour établir une tolérance envers des allogreffes est si difficile contrairement aux expérimentations dans les modèles animaux plus simples où l'on retrouve parfois qu'un seul alloantigène. Malgré

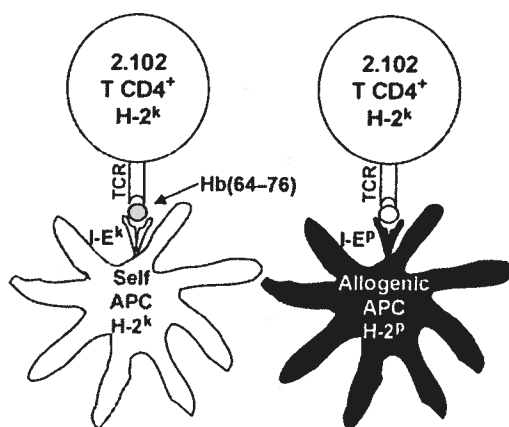
l'augmentation exponentielle des études portant sur les Treg ces dernières années, beaucoup d'éléments restent à comprendre et les extrapolations à la transplantation d'organe chez l'homme demeurent aventureuses, quoique prometteuses.

Récemment, avec la découverte de l'IL-23 et des LT auxiliaires de type Th17 (LT Th17), certaines équipes se sont penchées sur leur rôle dans le rejet de greffes. Une étude a démontré une surexpression de l'ARNm du gène de l'IL-17 et une élévation du niveau de cette protéine dans le greffon entre le deuxième et le neuvième jour suivant la transplantation d'une allogreffe de rein (Loong *et al.*, 2002). D'autres équipes ont même démontré que des inhibiteurs de l'IL-17 pouvaient prolonger et même parfois prévenir le rejet des allogreffes (Antonyamy *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 2001). Des travaux supplémentaires sont par contre requis pour établir le lien entre la production d'IL-17 et l'implication des LT Th17 en transplantation puisque d'autres types de cellules, comme les LT $\gamma\delta$, les cellules NK et NKT peuvent aussi produire cette cytokine (Weaver *et al.*, 2007). Les cellules NK (Natural Killer) furent longtemps considérées comme n'ayant aucune implication dans le rejet d'organes solides. Leur participation réelle au rejet reste toutefois controversée. Les cellules NK sont capables d'infiltrer de façon très précoce le greffon et de reconnaître les différences entre les molécules du CMH de classe I à la surface des cellules grâce aux récepteurs Ly49 (Kane, Lavender et Ma, 2004). Elles peuvent aussi attaquer les cellules recouvertes d'anticorps grâce à certains récepteurs Fc qu'elles expriment, dont le récepteur Fc γ RIII qui reconnaît la portion Fc des sous-classes d'IgG1 et d'IgG3. La cytotoxicité des cellules NK s'effectue avec la sécrétion de granules contenant la perforine et les granzymes ainsi qu'avec la production d'IFN γ . Récemment, de nouvelles découvertes en transplantation laissent envisager un nouveau rôle pour les cellules NK. Elles pourraient avoir un rôle important à jouer dans la synergie des mécanismes cellulaires menant au rejet de la greffe en modulant l'activité des cellules T (Kitchens *et al.*, 2006). Tel que décrit dans l'article *Natural-killer cells and dendritic cells* : « *l'union fait la force* », les cellules NK sont capables de réguler les fonctions des DC et indirectement, moduler l'activité des LT (Walzer *et al.*, 2005).

Clone 2.102 : Un lymphocyte T pas ordinaire!

Le clone de LT 2.102 s'est avéré particulièrement intéressant en transplantation puisque son activation peut s'effectuer selon les deux voies d'alloréactivité. Tel qu'illustré dans la partie supérieure de la figure 3, le TCR du clone 2.102 reconnaît la molécule intacte du CMH de classe II I-E^P (Daniel, Grakoui et Allen, 1998) ainsi qu'un peptide de l'hémoglobine (Hb; acides aminés 64 à 76) lorsque présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^k (Lorenz et Allen, 1988). Bien que l'affinité du TCR 2.102 pour les deux ligands n'ait pas été déterminée expérimentalement, certaines observations suggèrent qu'elle ne soit pas drastiquement différente pour ceux-ci. Entre autres, la délétion des thymocytes des souris transgéniques pour le TCR 2.102, croisées avec des souris exprimant de façon endogène chacun des ligands, s'effectue chez la même population (CD4⁺ simple positive) et dans des proportions similaires. En injectant des LT 2.102 CD4⁺ à la souris déficiente en LT $\alpha\beta$ (TCR α KOK) d'haplotype H-2^k utilisée comme receveuse, l'équipe du Dr Daniel créa un modèle de greffe unique chez la souris, schématisé au bas de la figure 3. Ce modèle permet d'étudier les deux voies d'alloréactivité de façon séparée (Sauve *et al.*, 2004). Dans le cas de la voie directe, la souris B10.P d'haplotype H-2^P est utilisée comme donneuse. Les CPA résidentes de l'organe greffé peuvent donc activer par la voie directe les LT transgéniques de la souris. Tel que démontré dans (Sauve *et al.*, 2004), les peptides provenant de la dégradation des molécules du CMH d'haplotype H-2^P (donneur B10.P), lorsque présentés par une molécule du CMH de classe II I-E^k (présente chez le receveur) ne peuvent pas activer les LT 2.102. La voie directe est alors exclusive. Pour ce qui est de la voie indirecte, la souris B6(mHEL-Hb) d'haplotype H-2^b est utilisée comme donneuse. Cette souris transgénique possède une protéine de fusion membranaire du lysozyme de poulet contenant le peptide alloréactif de l'hémoglobine (64-76) sous le contrôle du promoteur de la chaîne I-E α . Lorsque cette protéine est dégradée et apprêtée par les CPA du receveur, le peptide Hb se retrouve présenté par une molécule du CMH de classe II I-E^k. Ce complexe peut activer les LT 2.102. Les molécules de CMH d'haplotype H-2^b ne sont pas allogéniques pour les LT 2.102. La voie indirecte est alors exclusive. Malgré des mécanismes d'activation

(A) Dual specificity of the CD4⁺ T-cell clone 2.102



(B) Experimental system

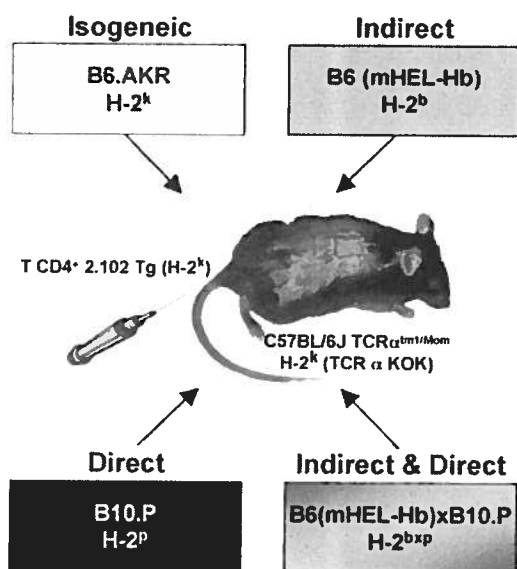


Figure 3. Représentation schématique de la spécificité du LT transgénique 2.102 et modèle de transplantation (Sauve *et al.*, 2004)

(A) Le LT 2.102 est alloréactif par la voie indirecte par la reconnaissance du peptide Hb(64-76) après traitement et présentation par une CPA du soi (receveur) sur une molécule I-E^k du CMH de classe II. Il est aussi réactif par la voie directe par la reconnaissance de la molécule de classe II I-E^p sur les CPA du donneur. (B) Des souris déficientes en LT αβ (TCRαKOK) sont reconstituées avec des LT 2.102 CD4⁺ purifiés et greffées avec de la peau de queue de souris qui fournit les alloantigènes nécessaires à l'activation directe ou indirecte du LT 2.102. Une souris isogénique (de même haplotype) est utilisée en tant que témoin négatif.

différents, la greffe de peau dans ce modèle est rejetée avec la même cinétique entre les voies d'alloréactivité directe et indirecte (Baratin, Bonin et Daniel). La souris B6.AKR (H-2^k) est utilisée comme donneuse pour le témoin négatif où les LT transgéniques ne peuvent être activés d'aucune façon, car les souris sont de même haplotype. Cette greffe est donc acceptée indéfiniment.

Importance des organes lymphoïdes secondaires

Il est bien connu que l'activation primaire des LT dans un contexte restreint au soi se produit dans les OLS (Olsson-Alheim *et al.*, 1999). Les CPA ayant capté les antigènes aux sites d'inflammation doivent migrer aux OLS où circulent les LT naïfs (Bono *et al.*, 2007). La reconnaissance des alloantigènes en transplantation, qui implique non seulement les CPA du receveur mais aussi ceux du donneur, s'avère plus complexe. Plusieurs études ont été réalisées pour tenter d'élucider l'importance des OLS en transplantation. Tout d'abord, l'équipe de Lakkis, en 2000, fit des expériences avec la souris alymphoblastique (*aly/aly*) splénectomisée, une souris qui ne possède pas d'OLS. Ils démontrèrent que cette souris était incapable de rejeter les allogreffes de peau et de cœur, suggérant ainsi que les OLS étaient essentiels à l'initiation de la réponse alloréactive (Lakkis *et al.*, 2000). Or en 2002, l'équipe du Dr Alegre contredit cette conclusion. En utilisant des souris splénectomisées déficientes pour les gènes de la lymphotoxine- α ($Lt\alpha$) ou pour le récepteur de la lymphotoxine- β ($Lt\beta r$), qui ne possèdent aussi aucun OLS, ils démontrèrent que ces souris non seulement rejetaient les allogreffes, mais qu'elles les rejetaient avec la même cinétique que les souris de type sauvage (Zhou *et al.*, 2003). Ils conclurent que les OLS n'étaient pas nécessaires au rejet d'allogreffe et que l'activation des LT alloréactifs pouvait s'effectuer en périphérie. Cependant, il est possible que des différences génétiques pouvant affecter le système immunitaire, autres que l'absence des OLS, puissent expliquer la discordance de ces résultats.

En 2004, l'équipe du Dr Daniel apporta des preuves supplémentaires en faveur de l'activation des LT en périphérie en tirant profit du TCR transgénique 2.102 (Baratin,

Bonin et Daniel, 2004). Les membres de l'équipe greffèrent des souris Tg2.102 déficientes pour le gène RAG (gène activateur de la recombinaison) selon les deux voies d'alloréactivité. Étant donné que la recombinaison somatique V-D-J ne peut avoir lieu dans les lymphocytes en développement de ces souris, le seul TCR exprimé est celui codé par le transgène. Ils analysèrent ensuite quantitativement par ELISPOT la présence des LT CD4⁺ spécifiques de l'alloantigène dans le greffon et les ganglions drainants à différents jours suivant la greffe. Ils démontrèrent que les LT effecteurs sont détectés dans le greffon 7 jours suivant la greffe lors de l'alloréactivité directe tandis qu'ils n'y sont pas détectés avant le jour 11 dans l'alloréactivité indirecte (voir figure 4). Dans les ganglions drainants, le phénomène inverse se produit. Les LT effecteurs sont détectés dans les ganglions drainants 7 jours suivant la greffe lors de l'alloréactivité indirecte et ne sont pas détectés avant le jour 15 dans le cas de l'alloréactivité directe (temps où les greffes sont presque totalement rejetées) (voir figure 5). Des analyses par cytométrie sur les cellules ayant infiltré le greffon dans la voie directe révèlent que le pourcentage de LT CD4⁺ augmente au fil des jours tandis que la fréquence des cellules CD4⁺ CD69⁺ décline. Aussi tôt qu'au jour 7, la proportion de LT CD4⁺ CD69⁺ atteint les 80% et descend graduellement jusqu'à 40% au jour 11. Le récepteur CD69 est un marqueur d'activation précoce qui est exprimé de façon transitoire sur les LT matures (Feng *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent l'activation en périphérie des LT de la réponse alloréactive directe. L'avantage de ces travaux est que dans les deux voies d'alloréactivité, la souris receveuse est la même, éloignant ainsi les variations de réponse dues au fond génétique des souris.

Tout récemment, certaines études ont démontré l'importance des tissus lymphoïdes tertiaires (TLT) dans le rejet chronique des allogreffes (Aloisi et Pujol-Borrell, 2006, Drayton *et al.*, 2006). Les TLT sont des accumulations ectopiques de cellules lymphoïdes formées dans des sites habituellement exempts d'organes lymphoïdes (Nasr *et al.*, 2007). Certaines preuves montrent que les LT naïfs pourraient être activés dans ces sites. Par exemple, la surproduction de la lymphotoxine α (L α) ou de LIGHT (TNFSF-14; un ligand du récepteur de la lymphotoxine β) par des cellules métastatiques injectées chez des souris C57BL/6 syngéniques permet la formation locale de structures similaires aux

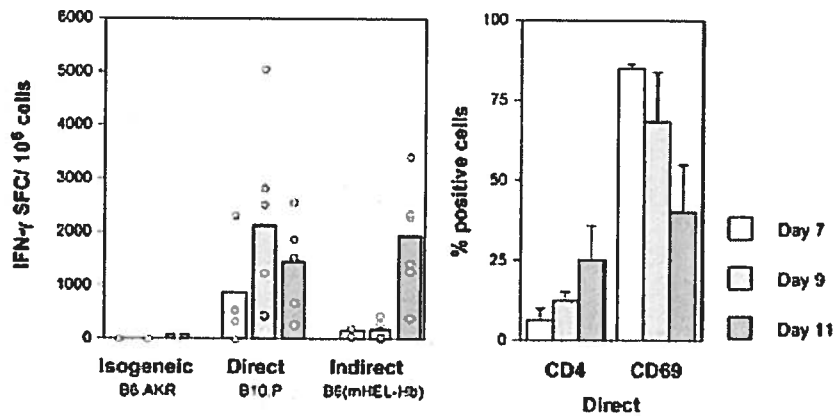


Figure 4. Détection précoce des cellules effectrices activées dans la greffe au cours du rejet par la voie directe (Baratin, Bonin et Daniel, 2004)

Des greffes de peau sur le dos de la souris 2.102Tg RAG^{-/-} furent effectuées avec de la peau de queue de souris B6.AKR (témoin négatif), B10.P (voie directe) ou B6(mHEL-Hb) (voie indirecte). Les cellules lymphoïdes ayant infiltré le greffon furent isolées aux jours 7, 9 et 11 suivant la transplantation. Comme le montre le tableau de gauche, le nombre de LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène fut déterminé *ex vivo* par ELISPOT anti-IFN γ . Chaque cercle représente la valeur obtenue pour une ou deux souris. Comme le montre le tableau de droite, les cellules ayant infiltré le greffon B10.P furent analysées par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de cellules CD4⁺CD3⁺ et le pourcentage de celles-ci étant CD69⁺. Quatre souris par groupe furent testées lors de cette expérience.

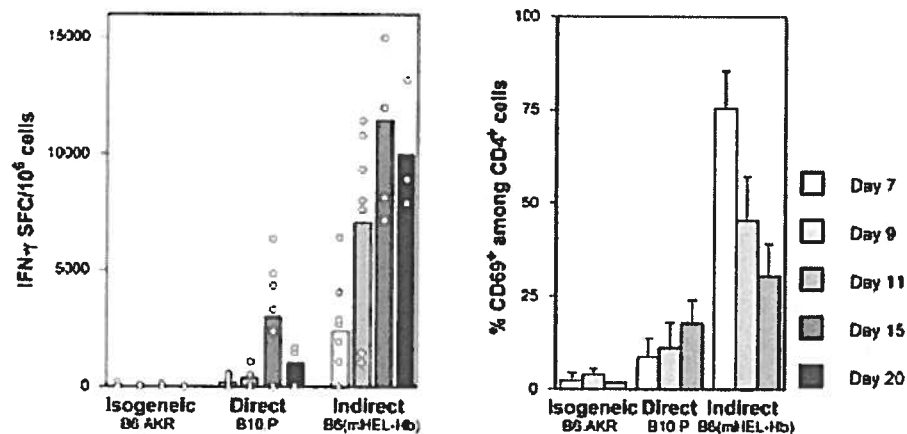


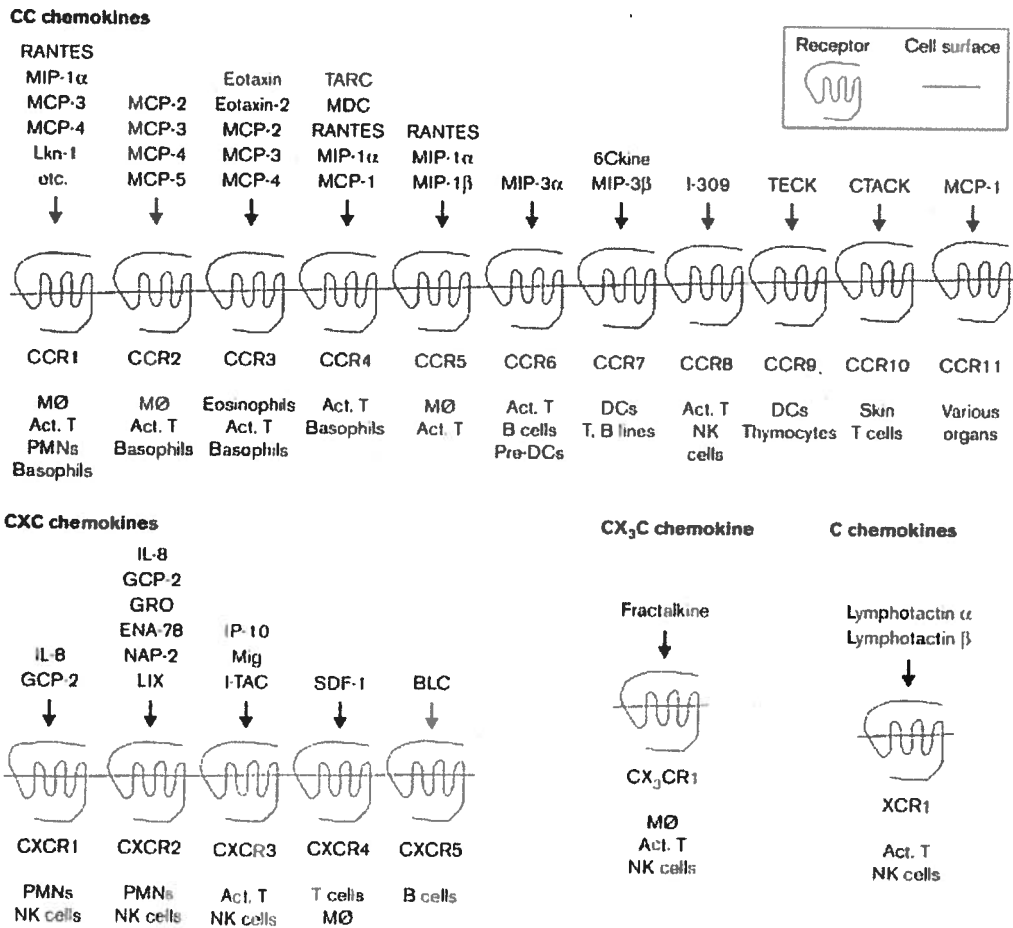
Figure 5. Les LT effecteurs activés sont principalement détectés dans les ganglions drainants de la souris rejetant sa greffe par la voie indirecte (Baratin, Bonin et Daniel, 2004)

Des greffes de peau sur le dos de la souris 2.102Tg RAG^{-/-} furent effectuées avec de la peau de queue de souris B6.AKR (témoin négatif), B10.P (voie directe) ou B6(mHEL-Hb) (voie indirecte). Les cellules des ganglions drainants furent isolées aux jours 7, 9, 11, 15 et 20 suivant la transplantation. Comme le montre le tableau de gauche, le nombre de LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène fut déterminé *ex vivo* par ELISPOT anti-IFN γ . Chaque cercle représente la valeur obtenue pour une ou deux souris. Comme le montre le tableau de droite, les cellules des ganglions drainants furent analysées par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de cellules CD69⁺ parmi les cellules CD3⁺CD4⁺. Quatre souris par groupe ont été analysées dans cette expérience.

ganglions et permet ainsi une meilleure réponse anti-tumorale (Schrama *et al.*, 2001, Yu *et al.*, 2004). Dernièrement, il a été montré qu'une greffe de peau contenant des TLT (dû à une surexpression transgénique du gène de la $Lt\alpha$) chez la souris *aly/aly* splénectomisée, générait des LT effecteurs et mémoires à même ces TLT. Ces cellules étaient suffisantes pour mener au rejet de l'allogreffe (Nasr *et al.*, 2007). Cette étude vient donc s'ajouter à la liste de plus en plus longue d'études qui démontrent une activation des LT en périphérie lors de rejet de greffe. Malgré tout, il reste que les mécanismes, les migrations et les interactions cellulaires permettant l'activation des lymphocytes en périphérie demeurent peu compris. Comme décrit plus haut, il est aussi probable que les cellules NK puissent jouer un rôle crucial dans l'aide apportée aux DC durant l'activation des LT dans le greffon, un environnement moins spécialisé que les OLS pour la sensibilisation des lymphocytes. Pour faire la lumière sur les mécanismes de migration et d'activation des LT $CD4^+$ en périphérie, l'étude de la famille des chimiokines, une famille de cytokines responsables du chimiotactisme des leucocytes et jusqu'à un certain point, de leur activation, s'avère essentielle.

Chimiokines

La mobilité des leucocytes est une de leurs plus grandes distinctions par rapport aux autres cellules de l'organisme. Cette caractéristique essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire est majoritairement dépendante des molécules d'adhésion et des chimiokines (Moser, 2003). Les chimiokines sont des cytokines capables de chimiotactisme. Elles forment une famille d'environ cinquante membres, illustrée à la figure 6. Elles sont classées en quatre groupes selon l'arrangement des deux cystéines conservées à leur extrémité amino-terminale. Dans le premier groupe, les deux cystéines sont une à la suite de l'autre (CC). Dans le deuxième et troisième groupe, elles sont interposées d'un (CXC) et de trois (CX₃C) acides aminés respectivement. Le dernier groupe ne possède qu'une seule des deux cystéines (C). Les chimiokines et leurs récepteurs sont identifiés respectivement avec les lettres L, pour ligand, et R, pour



Current Opinion in Immunology

Figure 6. Les quatre principaux groupes de chimiokines et leurs récepteurs (Hancock *et al.*, 2000a)

Les chimiokines sont classifiées selon l'arrangement des cystéines à l'extrémité amino-terminale de la protéine et forment quatre groupes (CC, CXC, CX₃C et C). Il est à noter que ces chimiokines ne sont qu'une partie de la famille, dont on découvre encore des membres aujourd'hui. Les récepteurs y sont aussi représentés. Le nom des récepteurs pour chaque groupe de chimiokines et l'expression cellulaire de chaque récepteur sont indiqués en dessous de chaque groupe. Act. T, LT activé; DC, cellule dendritique; MØ, monocyte/macrophage; PMN, neutrophile polymorphonucléaire; pre-DC. précurseur ou DC immature.

récepteur. Ces abréviations sont suivies d'un numéro, cependant il n'y a pas de correspondance entre les numéros des ligands et de leurs récepteurs. Une vingtaine de récepteurs sont connus à ce jour. Les récepteurs de chimiokines sont des récepteurs qui possèdent sept domaines transmembranaires et sont couplés à la protéine G (Sallusto, Mackay et Lanzavecchia, 2000). Plusieurs chimiokines peuvent se lier à un même récepteur et une même chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs.

Malgré l'instauration en 2000 d'une nouvelle nomenclature, jugée plus simple, les anciens noms des chimiokines continuent souvent d'être utilisés soit pour faire le lien avec les données publiées avant 2000 ou encore tout simplement parce qu'ils constituent souvent des abréviations révélant des informations importantes et pratiques (exemple : CXCL9 = *Mig* qui signifie Monokine Induced by IFN γ). La nouvelle nomenclature sera utilisée dans ce document. Se référer au tableau 2 (en annexe) pour connaître les anciens noms des chimiokines ainsi que leur définition.

Les chimiokines sont sécrétées par presque toutes les cellules somatiques. Certaines sont surtout associées au maintien de l'homéostasie et sont exprimées de façon constitutive. Par exemple, CXCL13 est sécrétée en permanence dans les zones B des OLS pour attirer les lymphocytes B (LB) naïfs qui expriment son récepteur (CXCR5). Cette chimiokine aide ainsi à conserver la compartimentalisation des OLS (Sallusto, Mackay et Lanzavecchia, 2000). D'autres chimiokines ont surtout un rôle à jouer dans le recrutement des cellules effectrices du système immunitaire inné ou acquis aux sites d'inflammation. C'est entre autres le cas de CCL5, qui est produite dans plusieurs types de maladies inflammatoires. CXCL9, CXCL10 et CXCL11 font aussi partie de cette catégorie, mais se distinguent du reste du groupe puisqu'elles sont induites par l'IFN γ , qui peut être sécrété aux sites d'hypersensibilité retardée (DTH) (Sallusto, Mackay et Lanzavecchia, 2000).

Les chimiokines sont chargées positivement et possèdent donc une affinité pour les glycoprotéines, à la surface des cellules ou de la matrice extracellulaire, qui elles sont chargées négativement. Cette caractéristique leur est essentielle puisqu'elle leur permet

de former des gradients stables de chimiokines qui attirent les leucocytes aux sites précis d'inflammation, où la concentration de chimiokines se trouve la plus élevée. Cette caractéristique est d'autant plus importante pour l'endothélium des vaisseaux sanguins, où les chimiokines fixées vont permettre le « roulement » des leucocytes précédant leur extravasation au travers de l'endothélium (Sallusto, Mackay et Lanzavecchia, 2000).

Chimiokines en transplantation

Les modèles animaux et les études cliniques ont démontré une corrélation spatiale et temporelle entre la production de chimiokines et l'infiltration leucocytaire des allogreffes, ce qui montre bien l'importance de ces molécules en transplantation. Le traumatisme chirurgical causé au tissu greffé et l'ischémie/reperfusion induisent à eux seuls l'expression de plusieurs cytokines, incluant des chimiokines. Ces chimiokines sécrétées de façon précoce vont attirer les leucocytes à l'intérieur de la greffe et ces cellules seront responsables de l'inflammation causée dans le réseau vasculaire du greffon. Par la suite, ces leucocytes, en synergie avec les cellules composantes du tissu greffé, produiront d'autres chimiokines qui attireront les lymphocytes, dont ceux sensibilisés contre les alloantigènes, menant à une amplification constante des mécanismes effecteurs du rejet (el-Sawy, Fahmy et Fairchild, 2002).

Presque toutes les chimiokines connues et leurs récepteurs sont exprimés à différents stades lors du rejet d'allogreffes. Expérimentalement, les inhiber peut prolonger ou même induire la survie permanente des allogreffes. Par exemple, bloquer les récepteurs CXCR3, CCR1, CCR2 ou CCR5 prolonge de façon significative la survie des allogreffes de cœur chez la souris (Hancock *et al.*, 2003). À ce sujet, des études précliniques chez les primates sont en cours (Schroder *et al.*, 2007). Par contre, étant donné les phénomènes de redondance et de pléiotropie présents dans la famille des chimiokines, cibler une seule chimiokine ou un seul récepteur important dans la réponse alloréactive peut parfois n'avoir aucun effet sur la prolongation de la survie de la greffe (Melter *et al.*, 1999). Ceci

représente un défi supplémentaire dans la recherche de cible thérapeutique dans cette famille de molécules.

Chimiokines et cellules dendritiques

Les DC jouent un rôle primordial dans l'initiation de la réponse alloréactive. Ce sont elles qui sont principalement responsables de la présentation des alloantigènes aux LT alloréactifs. En 1990, Larsen et *al.* démontrèrent que l'acte de la transplantation (chirurgie et ischémie/reperfusion) suffisait pour induire la maturation des DC à l'intérieur de l'organe transplanté (Larsen *et al.*, 1990). Pour ce qui est des DC immatures du receveur qui expriment plusieurs récepteurs liant des chimiokines inflammatoires, elles infiltrent le greffon en réponse aux chimiokines sécrétées rapidement par les cellules de l'organe greffé. Une fois à l'intérieur du greffon, elles aussi deviennent matures entre autres grâce aux cytokines inflammatoires sécrétées dans le greffon comme le TNF α et l'IL-1. La maturation des DC, endogènes ou exogènes, induit plusieurs changements cellulaires; elles changent d'apparence et de fonction. Elles forment des dendrites leur permettant une meilleure présentation des antigènes aux LT via leurs molécules du CMH de classe II. Il y a un changement des récepteurs de chimiokines exprimés à leur surface. Les récepteurs exprimés à la surface des DC immatures, par exemple CCR1, CCR2, CCR5, qui permettent à celles-ci de migrer aux sites d'inflammation, sont régulés à la baisse pour laisser place aux récepteurs exprimés à la surface des DC matures. Le plus important est le CCR7, qui guide les DC jusqu'aux OLS, lieu habituel où elles activent les lymphocytes (Lechler, Ng et Steinman, 2001). Les DC peuvent par contre être compétentes pour la sensibilisation des LT à l'extérieur des OLS. En effet en 2004, l'équipe du Dr Lipp démontra que certaines DC matures CCR7^{-/-} étaient fonctionnelles à l'extérieur du contexte des OLS puisque des DC allogéniques issues de souris CCR7^{-/-} causaient le rejet des allogreffes lors de la sensibilisation directe des LT (Hopken *et al.*, 2004). Cette compétence particulière pourrait avoir un rôle important à jouer dans la sensibilisation des LT lors des réponses alloréactives, spécialement lors de la sensibilisation par la voie directe.

Comme mentionné ci-haut, la maturation des DC est un processus complexe pendant lequel de nombreux changements se produisent dans ces cellules. Parmi ces changements, les DC matures commencent à sécréter plusieurs cytokines, dont des chimiokines. Tel que le démontre le tableau 1, les premières chimiokines qui sont sécrétées lors de la maturation des DC sont des chimiokines inflammatoires comme CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CCL8. Ces chimiokines possèdent une fonction autocrine, soit pour s'activer elles-mêmes davantage (effet boule de neige), ou encore pour induire la régulation à la baisse des récepteurs de chimiokines inflammatoires qui sont impliqués dans la migration aux sites d'inflammation (Sallusto, Mackay et Lanzavecchia, 2000). Ces chimiokines possèdent aussi une fonction exocrine pour amplifier le recrutement des monocytes et des DC immatures aux sites d'inflammation. La chimiokine homéostatique CCL19 est aussi sécrétée par les DC au cours de leur processus de maturation (Zlotnik et Yoshie, 2000, Lebre *et al.*, 2005, Breart et Bousso, 2006) surtout dans la phase tardive de leur maturation (10 à 30 heures après l'induction de la maturation) et facilite l'attraction et l'interaction de celle-ci avec les LT naïfs (Sallusto, Mackay et Lanzavecchia, 2000). Les DC matures résidentes au greffon pourraient donc être responsables du recrutement des LT naïfs qui expriment CCR7 à l'intérieur de la greffe par la sécrétion de CCL19. Cela se produirait évidemment sans distinction entre les deux voies d'alloréactivité. Il y aurait donc une sécrétion de CCL19 par les DC à l'intérieur des greffons quelque soit la voie d'alloréactivité, de même que dans le contrôle isogénique. La différence serait que dans le cas de la voie directe, les LT naïfs trouveraient des molécules du CMH de classe II immunogéniques et seraient activés tandis que dans le cas de la voie indirecte ou du témoin isogénique, les LT naïfs ne feraient que transiter par le greffon puisqu'ils ne trouveraient aucun complexe peptide/CMH immunogénique.

Chemokine ARNm	0h	3h	30h
CCL3	-	+++	++
CCL4	-	++++	++
CXCL1	-	++	+
CCL5	-	+++	+++
CXCL11	-	++	++
CXCL9	-	++	+
CXCL10	-	+++	+++
CCL2	-	++++	++
CCL8	-	++	++
CCL13	+++	++	+
CCL17	++	++	++++
CCL22	++	++	++++
CCL18	+	+	+++
CCL19	-	-	+++
CCL21	-	-	-

Tableau 1. Cinétique de l'expression des chimiokines lors de la maturation des cellules dendritiques (Sallusto et Lanzavecchia, 2000)

Le tableau est basé sur l'expression de l'ARNm lors d'analyses par RT-PCR, RPA (RNase protection assay) et analyse protéique par ELISA.

Chimiokines et lymphocytes

Les LT sont de loin les cellules qui parcourent la plus grande distance dans le corps au cours d'une vie animale (Sprent et Surh, 2002). Suite au processus de sélection dans les organes lymphoïdes primaires, les lymphocytes naïfs circulent continuellement entre le sang, la lymphe et les OLS. Les lymphocytes T et B résident respectivement dans les zones T et B à l'intérieur des OLS. Le principal récepteur responsable de la migration des LT aux OLS est le récepteur CCR7. Il y a sécrétion continue de ses deux ligands, CCL19 et CCL21, dans les OLS. D'autres ligands comme le CD62L et l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ sont exprimés à la surface des LT naïfs ce qui facilite leur migration/recirculation aux OLS où les molécules d'adhésion y sont exprimées en permanence (Butcher *et al.*, 1999, Sallusto et Lanzavecchia, 2000). L'activation du LT entraîne un changement des récepteurs de chimiokines à la surface du lymphocyte qui lui permettent premièrement d'interagir avec les LB dans les follicules (à l'aide du récepteur CXCR5, qui lie CXCL13 sécrétée dans les zones B) et ensuite de migrer aux sites d'inflammation en tant que cellule effectrice.

Deux types de LT sensibilisés à l'antigène sont produits durant la réponse immunitaire adaptative: les LT effecteurs et les LT mémoires. Les LT effecteurs ont une courte vie et participent directement à la réponse immunitaire aux sites d'inflammation tandis que les LT mémoires ont une longue vie (jusqu'à plusieurs années) et sont impliqués dans la réponse immunitaire très rapide suivant une deuxième agression (Sallusto et Lanzavecchia, 2000, Sprent et Tough, 2001, Kaech, Wherry et Ahmed, 2002). Les LT sensibilisés expriment une panoplie de récepteurs de chimiokines inflammatoires. Ces récepteurs sont même souvent utilisés aujourd'hui pour faciliter le classement des sous-populations de LT, tel que l'illustre la figure 7. Il existe deux sous-types majeurs dans la population des LT mémoires. Les LT de la mémoire centrale se distinguent des LT de la mémoire effectrice entre autres par l'expression du CCR7 et du CD62L. Ces deux récepteurs permettent la migration et la recirculation constante aux OLS (Sallusto *et al.*, 1999). Les LT effecteurs Th1 ou Th2 expriment plusieurs récepteurs de chimiokines qui ont pour ligands surtout les chimiokines inflammatoires, ce qui sert à la polarisation de la

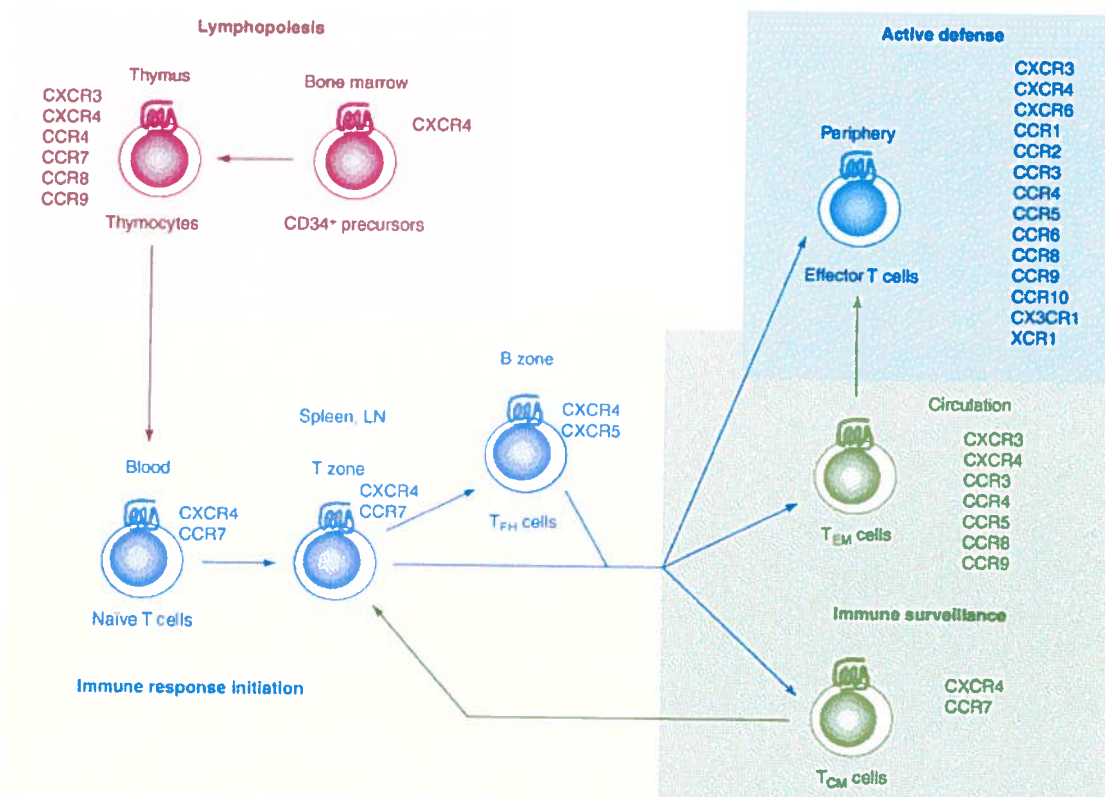


Figure 7. La maturation et la différenciation des lymphocytes T sont caractérisées par des changements séquentiels de leurs propriétés de migration (Moser *et al.*, 2004)

Les changements majeurs d'expression des récepteurs de chimiokines et des profils de réponse aux chimiokines ont lieu : pendant la lymphopoïèse dans la moelle osseuse et dans le thymus, pendant l'initiation de la réponse immunitaire dans les organes lymphoïdes secondaires, pendant la génération des lymphocytes T effecteurs pour leur participation lors de la défense active aux sites d'entrée des pathogènes et d'inflammation, et pendant l'établissement des lymphocytes mémoires pour la surveillance des tissus périphériques. LN, lymph nodes (ganglions); T_{cm} cells, central memory T cells (LT de la mémoire centrale); T_{em} cells, effector memory T cells (LT mémoires effecteurs); T_h cells, follicular B-helper T cells (LT auxiliaires dans les follicules B).

réponse immunitaire (Loetscher, Moser et Baggiolini, 2000, Kim *et al.*, 2001, Moser et Loetscher, 2001). Les LT Th1 expriment fréquemment CXCR3, CXCR6 et CCR5 (Moser *et al.*, 2004). À ce sujet, le récepteur CXCR3 lie les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, des chimiokines induites par l'IFN γ , et retient souvent l'attention en transplantation puisqu'il est souvent détecté à l'intérieur des allogreffes (Hancock *et al.*, 2000b, Hancock *et al.*, 2001, Melter *et al.*, 2001). Il a été démontré que le blocage de ce récepteur ou ses ligands entraînait une prolongation de la survie des allogreffes vascularisées et que cette prolongation était associée au fait que les LT activés ne pouvaient migrer directement à l'intérieur de l'organe transplanté. Par contre cette chimiokine ne serait pas nécessaire pour le rejet des greffes non-vascularisées puisque la cinétique de rejet des allogreffes de peau dans un modèle de souris CXCR3^{-/-} receveuses n'est pas altérée (Haskova *et al.*, 2007). Les LT Th2 expriment quant à eux fréquemment CCR3, CCR4 et CCR8 (Moser *et al.*, 2004).

Malgré que les LT naïfs ne puissent pas sécréter de chimiokines, les LT activés sont une grande source de chimiokines inflammatoires variées. Les cytokines inflammatoires produites par les LT activés peuvent recruter et activer plusieurs cellules effectrices impliquées dans le rejet de greffe comme les macrophages, les cellules NK et les éosinophiles. Cela suggère que les LT ayant infiltré les tissus infectés (ou bien le greffon) contribuent activement au recrutement de cellules effectrices (Moser *et al.*, 2004). Les LT sécréteurs de chimiokines en périphérie ont d'ailleurs un rôle important à jouer dans les maladies chroniques ou auto-immunes.

Le récepteur CCR7 joue un rôle primordial dans la migration des lymphocytes et par le fait même lors du rejet de greffe. Une légère prolongation de la survie des allogreffes est observée chez la souris receveuse CCR7^{-/-} (Beckmann *et al.*, 2004). Il fut donc conclu que la recirculation des lymphocytes aux OLS n'était pas essentielle à l'initiation du rejet. La suppression du récepteur CCR7 peut avoir une influence négative sur les deux voies d'alloréactivité qui prennent place simultanément dans ce modèle. Cibler de cette façon et en même temps ces deux voies d'alloréactivité pourrait expliquer le délai observé. Une analyse semblable peut être faite sur une étude récemment réalisée chez la souris

utilisant la protéine de fusion inhibitrice CCL19-IgG. En effet il a été montré que chez des souris auxquelles avait été injectées la protéine de fusion dans le but d'interférer avec la recirculation induite par CCR7, les allogreffes étaient acceptées de façon permanente (Ziegler *et al.*, 2006).

D'autres équipes s'intéressèrent plutôt à l'importance des deux ligands du CCR7, CCL19 et CCL21, dans le rejet de greffe. Ils utilisèrent la souris *Paucity of Lymph node T cells* (plt/plt) dans laquelle aucune expression de CCL19 et de CCL21-ser (expression réduite de CCL21-leu) n'est détectée. Il y a absence de zones T dans la rate et presque aucune DC et LT dans les ganglions (Nakano *et al.*, 1997, Nakano *et al.*, 1998, Gunn *et al.*, 1999, Vassileva *et al.*, 1999, Nakano et Gunn, 2001). Ces souris rejettent les greffes de peau avec la même rapidité que les souris de type sauvage (Colvin *et al.*, 2005). Dans cette étude, la seule source de CCL19 pouvait provenir des DC exogènes matures. Elles pourraient ainsi attirer les LT alloréactifs dans la greffe pour les activer. De cette façon, le récepteur CCR7 pourrait être requis sur les LT naïfs pour rejoindre les DC matures peu importe où elles se trouvent et pour interagir avec elles.

Article

L'article suivant fut écrit en entier par Charles-David Dubé, puis révisé et corrigé par Claude Daniel. Toutes les expériences furent réalisées par Charles-David Dubé. Caroline Leduc et Meriam Belghith furent d'une aide technique précieuse pour les expérimentations animales et Véronique Allard pour la biologie moléculaire.

Certaines données qui ne sont pas montrées dans l'article ont été ajoutées dans la section annexe du mémoire. Nous avons dans ces cas remplacé les expressions « data not shown » de l'article pour les remplacer par « voir figure X en annexe ».

Naïve CCR7-positive alloreactive T cells are recruited and activated in allografts in direct allorecognition

Charles-David Dubé, Caroline Leduc, Meriam Belghith, Véronique Allard, and Claude Daniel

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

Address for correspondence: Dr. Claude Daniel, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

E-mail: claudedaniel@iaf.inrs.ca

Keywords: Transplantation, T cell, Chemokine, Direct alloreactivity

Word count: 3242

Abbreviations

APC antigen-presenting cell

DC dendritic cell

DLN draining lymph node

Hb hemoglobin

IFN interferon

MHC major histocompatibility complex

mHEL transmembrane hen egg lysozyme

NK natural killer

Plt paucity of lymph node T cell

qRT-PCR quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction

Rag recombination activating gene

SLO secondary lymphoid organ

TCR T cell receptor

Tg transgene

TNF tumor necrosis factor

Abstract

BACKGROUND. Activation of alloreactive CD4⁺ T cells can be done by direct or indirect recognition of allo-MHC molecules and the migration of these T cells to allografts or draining lymph nodes is highly dependent on the chemokines/chemokine receptors system. Using a unique murine model based on a single T cell clonotype (2.102) where direct and indirect pathways can be independently studied, we showed that alloreactive effector T cells are first detected in the allograft in the direct pathway, in contrast to the indirect pathway where effector T cells are first detected in draining lymph nodes before their migration into the graft. **METHODS.** We investigated whether sensitization of naïve T cells through the direct pathway can take place outside secondary lymphoid organs by characterizing the expression of chemokines and their receptors during the initiation of allograft rejection. RNA expression and immunohistochemistry analyses were performed on skin allografts, at different time post-transplant. **RESULTS.** The results showed that early as day 3 post-transplant, several chemokines and chemokines receptors are differentially expressed between both pathways. More precisely, IFN γ -inducible chemokines, CCR1 and CCR7 are upregulated early in direct pathway. Furthermore, we showed that T cells infiltrating allografts during direct alloreactivity expressed CCR7. **CONCLUSIONS.** Naïve T cells are recruited early in grafts allogeneic by the direct pathway, concomitantly with acquisition of effector functions by these T cells. This recruitment could be mediated by CCL19 production by tissue-resident activated DCs. These observations further support that naïve alloreactive T cells can be activated in the allograft by the direct pathway.

Introduction

Rejection of solid organ remains the main obstacle in clinical transplantation. CD4⁺ T cells play a crucial role in the orchestration of the immune response leading to this outcome (1), as CD4 knockout recipients do not reject allografts (2). These CD4⁺ T cells can be primed by direct and indirect pathways. In direct priming, exclusive to transplantation, T cells recognize intact major histocompatibility complex (MHC) molecules on donor antigen-presenting cells (APCs), while in indirect priming, T cells recognize processed alloantigens presented as allopeptides by self APCs. Evidences show that direct pathway may play an essential role in acute rejection whereas the indirect pathway is strongly associated with chronic rejection (3-6). Nevertheless, the sites of sensitization of alloreactive T cells remain controversial. Some studies suggested that secondary lymphoid organs (SLOs) are absolutely required for graft rejection (7), while others have shown that mice without SLOs can reject their allografts, although with delayed kinetics (8). Our laboratory has previously reported, using a TCR-transgenic mouse model, that indirect priming of naïve alloreactive T cells occurs in draining lymph nodes whereas direct priming could take place in the allograft itself (9). However, the mechanisms responsible for peripheral priming had not been elucidated.

Chemokines and chemokine receptors are a large family of chemoattractant cytokines that mediate critical events in the recruitment and trafficking of leukocytes into allografts, like T-cells activation and cell mobility between lymph nodes and the graft (10-14). Based on the difference that we previously reported (9) on the sites of T cell activation between direct and indirect alloreactivity, one can speculate that expression of chemokines and their receptors would also be different. It is known that dendritic cells (DCs) are a rich source of numerous inflammatory chemokines, which can recruit various T cell subsets through their specific expression of chemokine receptors (15). Resting DCs in allografts play a critical role in the initiation of direct alloreactivity by their chemokine secretion and their cell-cell interactions. Moreover, activated effector T cells in inflamed tissues might also contribute to recruitment of secondary effector cells by secreting multiple chemokines (16-18).

The aim of this study was to understand the migration of CD4⁺ T cells by studying the differential expression of chemokines and their receptors during the early stage of direct and indirect alloreactivity. Using a T cell adoptive transfer model and skin allografts, we demonstrated that there were important differences between the two alloreactive pathways in the expression of intra-graft chemokines. Importantly, infiltration by CCR7⁺ T cells was observed only in the direct pathway. Hence, this study supports the hypothesis that T cell sensitization can take place outside secondary lymphoid organs.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6J Tcra^{tm1/Mom} (H-2^b) were purchased from The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and bred with B6.AKR (H-2^k) to introduce the mutation into H-2^k haplotype (referred to as TCR α KOK). These $\alpha\beta$ T-cell-deficient mice (19) were used as recipients of skin grafts. The 2.102 TCR-transgenic mice (2.102Tg) were maintained on a 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 (20). B10.P and B6.AKR, TCR and mHEL-Hb transgenic mouse lines were kindly provided by Dr Paul M. Allen (Washington University, St-Louis, MO, USA). All mice were maintained in our pathogen-free animal facilities.

Purification of CD4⁺ cells and skin grafting

Single-cell suspensions of freshly isolated spleen cells from 2.102Tg mice were incubated with CD4 (L3T4) MicroBeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) for 15 min at 4°C, washed, and purified by MACS on LS columns. The eluent gave a population of greater than 90% CD4⁺ T cells by flow cytometry analysis. Adoptive transfers of T cells into TCR α KOK recipients were performed by i.v. injection into tail vein the day before grafting. Tail skin (1 cm²) of male donors was engrafted onto the trunk of male recipients using standard techniques (21). Graft were placed on the trunk, secured with 6-0 silk sutures and hydrated with Vaseline[™].

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from skin grafts and draining lymph nodes with TriZol (Invitrogen, Carlsbad, ON, Canada) and chloroform, followed by purification with RNeasy kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). DNase treatments were used to eliminate DNA contamination. Quantity and integrity of RNA was determined by spectrometry on Genequant (Pharmacia Biotech, Cambridge, United Kingdom). For cDNA synthesis, 2 µg of RNA was primed with Hexanucleotides Mix (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and reverse transcribed with SuperscriptIII (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions.

cDNA Microarray

The relative mRNA expression of 114 chemokines and chemokines receptors was analyzed with a nonradioactive Oligo GEArray (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD, USA), according to the manufacturer's protocol. Two µg of starting RNA was used to produce biotin-labeled (UTP-biotin, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) cRNA probes that were hybridized to chemokine and chemokine receptor gene-specific oligo DNA fragments that were spotted on the GEArray membranes. Images were acquired using Chemi-Genius² (Syngene, Frederick, MD, USA) and analyzed using the GEArray Expression Analysis Suite software (SuperArray Bioscience).

Quantitative RT-PCR

Quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed on a RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, AU) by using the SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Espoo, Finland) as a double-strand DNA-specific binding dye and continuous real-time fluorescence monitoring as previously described (22). The PCR reactions were cycled 40 times after initial denaturation (95°C, 10 min) with the following parameters: denaturation 95°C for 10s, annealing 60°C for 15s and extension 72°C for 20s. The target genes were generated by connecting the following sequences of the specific primers: 2.102 TCRβ chain transgene: sense 5'-CAA CAT CTG GGA CAT

AAT GC-3', antisense 5'-CAG CTG AGT CTT CTG GAT CC-3'; IFN γ : sense 5'-ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC-3', antisense 5'-CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC-3'; CCR1: sense 5'-GGG TGA ACG GTT CTG GAA GTA C-3', antisense 5'-CAG CCA TTT TGC CAG TGG TA-3'; CCR7: sense 5'-CTG CTA CCT CAT TAT CAT CCG TAC CT-3', antisense 5'-TGA TCA CCT TGA TGG CCT TGT-3'; CXCL9: sense 5'-CTT CCT GGA GCA GTG TGG AG-3', antisense 5'-CGA CTT TGG GGT GTT TTG G-3'; CXCL10: sense 5'-CCA AGT GCT GCC GTC ATT TTC-3', antisense 5'-GGC TCG CAG GGA TGA TTT CAA-3'; CCL3: sense 5'-ACC ACT GCC CTT GCT GTT C-3', antisense 5'-TCT GCC GGT TTC TCT TAG TCA G-3'; CCL4: sense 5'-CTC TCC TCT TGC TCG TGG C-3', antisense 5'-GTA CTC AGT GAC CCA GGG CTC-3'; GAPDH: sense 5'-TCA CCA CCA TGG AGA AGG C-3', antisense 5'-GCT AAG CAG TTG GTG GTG CA-3'.

Confocal microscopy

Skin grafts were collected from the recipient mice and snap-frozen in OCT compound Tissue-Tek (Sakura, Torrance, CA, USA). Eight μm cryosections were cut and fixed in PBS buffer, containing 2% formaldehyde. Endogenous biotin activity was blocked according to the Dakocytomation biotin blocking system procedure (Dako North America, Carpinteria, CA, USA). Extra blocking was done with PBS containing 1% BSA and 10% of mouse serum. Biotinylated anti-mouse CD90.1 (Ebioscience, San Diego, CA, USA) with anti-CCR7 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) were incubated for 3h at room temperature. Streptavidine-Alexa-Fluor-658 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) with anti-rabbit or anti-goat IgG-Alexa-Fluor-647 (Molecular Probes) were then incubated in dark for 1h at room temperature. Cuts were finally incubated 5 minutes with buffer containing 100 mg/ml DAPI (Molecular Probes). Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) was used to assemble the blades. Images were took by LSM510META microscope with LSM510 (V.3.2 SP2) software (Zeiss, Jena, Germany).

Statistical analysis

Groups were compared using the one-way ANOVA test. Values are expressed as the mean \pm SEM. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Results

Early infiltration of alloreactive T cells in direct alloreactivity

The 2.102 T cell clonotype has a known dual specificity; it is reactive against the allogeneic mouse MHC class II molecule I-E^P and against the self-restricted ligand formed by I-E^k and Hb(64-76), which is the immunodominant epitope of the mouse hemoglobin β chain (23, 24). Furthermore, a TCR transgenic mouse line has been generated from this T cell clone (25). Using this transgenic mouse line, it is possible to study allograft rejection where direct and indirect pathways of alloreactivity are mediated by the same T cell clonotype (9, 26). In this study, we have used an adoptive transfer model of purified 2.102Tg CD4⁺ T cells injected into TCR α -chain deficient mice (TCR α KOK; H-2^k) as recipients. Direct alloreactivity pathway was studied by grafting recipients with skin from B10.P (H-2^P) congenic mice. For the indirect pathway, skin from transgenic mouse line B6(mHEL-Hb) (H-2^b) that expresses the Hb(64-76) epitope as part of a transmembrane hen-egg lysozyme (HEL) molecule under the control of the I-E α chain promoter was used (20, 27).

To first evaluate the infiltration of alloreactive T cells in graft in this adoptive transfer model, TCR α KOK mice were reconstituted with 3×10^6 CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice and grafted as described above to study direct and indirect pathway. Grafts from B6.AKR (H-2^k) mice were used as isogenic controls. Total RNA was obtained from grafts at day 3, 5, 7 and 11 post-transplant. Infiltration by 2.102Tg T cells, as determined by the expression of the transgenic TCR β chain mRNA, was then analyzed by qRT-PCR. As shown in Figure 1, alloantigen-specific infiltration of 2.102Tg T cells could be detected as early as 5 days post-transplant in the direct pathway, whereas it was delayed until day 11 post-transplant in the indirect pathway. No significant expression of 2.102Tg TCR β chain mRNA was detected at earlier time points (data not shown). Furthermore, no significant differences in the expression of the 2.102 TCR were detected in draining lymph nodes (DLN) between mice receiving allogeneic or isogenic grafts at all time points (voir figure 8 en annexe).

Chemokines and chemokine receptors are differently expressed in direct and indirect pathways

In order to characterize chemokines and chemokine receptors expression in both alloreactivity pathways, a cDNA array analysis for this group of genes was performed (Table 1). Major differences were shown between direct and indirect pathways. More specifically, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, and TNF α were upregulated at day 3 in direct pathway. The burst of the inflammatory response in the direct pathway is even more obvious at day 5 post-transplant, with the upregulation of MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, and MCP-1/CCL2. Interestingly, ELC/CCL19, a ligand for CCR7, is also upregulated in the direct pathway. The differences in gene expression were much more significant at day 7 post-transplant. Among others, upregulation of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CXCR4, is indicative of greater cell infiltration in the allograft. At day 11, several chemokine and chemokine receptor genes are upregulated in both pathways, correlating with full-blown allograft rejection.

IFN γ -inducible chemokines, CCR1 and CCR7 are upregulated early in direct pathway

In order to confirm and quantify differences in the expression of chemokines and their receptors between pathways, we performed qRT-PCR analyses on graft total RNA. A total of 13 chemokines and chemokine receptors genes were analyzed, in addition to IFN γ . At day 5 post-transplant, IFN γ , CXCL9 and CXCL10 were specifically upregulated in the direct pathway, the latter being two IFN γ -inducible chemokines (figure 2). CCR1 was also significantly over-expressed in direct pathway at day 5. Two days later, indirect pathway expressed comparative level of IFN γ , CXCL9, CXCL10 and CCR1. Importantly, the receptor CCR7 was over-expressed in direct pathway 7 days after transplantation. Interestingly, it was not until day 11 post-transplant that infiltration by the 2.102Tg T cells, and expression of IFN γ and CCR7 transcripts, were higher in the indirect pathway in comparison to the direct pathway. Thus, although infiltration and inflammatory responses occurred much earlier by the direct pathway, rejection was observed with similar kinetics by both pathways (day 15-18 post-transplant, (26) and data not shown).

Investigations are currently in progress in order to elucidate the regulatory mechanisms responsible for this delay in rejection in direct pathway.

T cells infiltrating allografts in direct alloreactivity express CCR7

In order to visualize T cells and chemokine receptors expression in grafts according to different pathways, confocal microscopy analyses were done on thin sections of skin allografts at day 7 post-transplant. At this time point, 2.102Tg T cells (CD90.1-positive) could be detected in graft in direct pathway, but not in indirect pathway and isogenic control (figure 3), consistent with the 2.102 TCR β chain expression analyses by qRT-PCR. No CD90.1-positive cells could be detected in any type of grafts at day 5 post-transplant. As shown in figure 3, CCR7 was also expressed in grafts activating the direct pathway but not in those activating the indirect pathway or the isogenic controls. Co-expression of CCR7 and CD90.1 was also confirmed at higher magnification, suggesting that T cells infiltrating grafts expressed CCR7.

Discussion

Immune responses to allografts are biologically unique circumstances in that sensitization of the host T cells can occur via interactions with donor-derived (direct pathway), as well as host-derived APCs (indirect pathway). In addition, recipient DCs can potentially acquire and present donor MHC molecules by the so-called semi-direct pathway (28). Numerous studies have suggested that activation of T cells could take place outside secondary lymphoid organs in direct pathway of alloreactivity, in contrast to classical immune responses. We have previously reported that following transplantation of naïve TCR-transgenic, Rag1-deficient mice with skin allografts, activation and maturation into effector T cells by direct alloreactivity was first detected into the allografts rather than in draining lymph nodes (DLNs), in contrast to the indirect pathway where responses in DLNs preceded identification of alloreactive T cells in the allografts (9). These results suggested that the allograft could provide the environment sufficient to promote activation of naïve T cells. The purpose of this study was to decipher and compare the

chemokines and chemokine receptors involved in early direct/indirect alloreactive responses. We have used an adoptive-transfer model of purified CD4⁺ T cells from TCR-transgenic mice into TCR $\alpha\beta$ T cell-deficient recipients (26). The unique particularity of this model is that direct and indirect alloreactivity pathways can be studied using the same T cell clonotype.

The early inflammatory response initiated by the surgical trauma was associated with upregulation of CCL3 and CCL4 chemokines, in allografts as well as in isogenic controls. Although similar results have been previously reported, none of these studies have addressed their relation to alloreactivity pathways (29, 30). Interestingly, the upregulation of both chemokines was significantly higher in direct alloreactivity at day 3 post-transplant, although infiltration by 2.102Tg T cells was low and comparable between allografts and isogenic controls (data not shown). Moreover, our study shows that allografts rejected by the direct pathway are infiltrated by alloreactive 2.102Tg T cells much earlier than following indirect allorecognition. This infiltration is associated with greater production of IFN γ , suggesting that maturation of naïve T cells into effector T cells had already occurred. This production of IFN γ is concomitant with the upregulation of CXCL9 and CXCL10 chemokines. At later time points, a wide array of chemokines is expressed in both allogeneic pathways, corresponding to infiltration by several innate and adaptive immune cell populations (31).

It is well known that the organ ischemia/reperfusion during surgery is sufficient to induce maturation of resident DCs. This is a complex process in which several changes occur in DCs, such as cell morphology, the up/down regulation of different surface molecules and the secretion of various cytokines, including chemokines. The first chemokines secreted during maturation of DCs are inflammatory chemokines like CCL3, CCL4, CCL5, CCL2 and CCL8. These chemokines possess autocrine functions, to potentially activate further the DCs, as well as paracrine functions, to boost the recruitment of monocytes and immature DCs in inflamed tissues. Homeostatic chemokine CCL19 is also secreted by maturing DCs (15, 32, 33) at later time point (10 to 30h after induction of maturation), which facilitate the attraction and the interaction with CCR7⁺ naïve T cells and DCs (12,

34, 35). Resident mature DCs could thus be responsible of the recruitment of naïve T cells in the graft. This would occur without any distinction between the two pathways of allorecognition, or even the isogeneic control. Interestingly, analyses by qRT-PCR indicated that CCL19 is two-fold more expressed in transplant than in normal skin, independently of the type of graft, including isogeneic controls (voir figure 9 en annexe). In the direct pathway, naïve T cells would be activated and retained in the graft after interactions with activated DCs expressing the allogeneic MHC class II molecule, whereas infiltrating naïve T cell would simply circulate out of the tissue in the indirect pathway or isogeneic controls, because no cognitive interactions with DCs would occur. Several studies have shown that naïve T cells can circulate through peripheral, non-lymphoid organs, either in normal or inflammatory conditions (36-38). Noticeably, expression of CCR7 mRNA in the allograft was concomitant with maximal T cell infiltration by the direct alloreactivity pathway. Moreover, activated T cells can produce large amount of inflammatory cytokines to recruit and activate several effector cells implicated in graft rejection, such as macrophages, NK cells, and eosinophils. This could explain the overexpression of CCR1, a receptor expressed on the majority of innate immunity cells, in the direct pathway allografts.

Three studies have examined the role of CCR7 in allograft rejection. Using CCR7-deficient mice as recipients, a significant though modest prolongation of allografts survival was observed (39, 40). In these studies, it was concluded that recirculation of leukocytes to SLOs has a significant but nonessential role on the alloreactive immune response. More importantly, graft survival was further prolonged when both donors and recipients lacked CCR7, suggesting that graft resident APCs play a more important role when responses in SLOs are also altered. Similar results were reported by Ziegler et al. using CCL19-Ig to interfere with CCR7-mediated cell migration (34). Nevertheless, mechanisms of direct and indirect pathways could not be elucidated in these models. Thus, one could speculate that T cells deficient for CCR7 could not migrate to lymph nodes, where indirect pathway alloreactivity would occur, but would also not be able to migrate into the allograft, where direct pathway alloreactivity occurs.

Others studies using paucity of lymph node T cells (plt/plt) mice revealed the importance of both ligands of CCR7, CCL19 and CCL21, in graft rejection. These mice are characterized by the absence of CCL19 and CCL21-ser expression, and reduced expression of CCL21-leu, an absence of T cells areas in the spleen and a near total lack of DCs and T cells in LNs (41-45). Skin transplant on plt/plt and wt mice were rejected with nearly equal kinetics (46). In this study, donor mice were not plt/plt and resident DCs in skin allografts were fully able to secrete CCL19. Furthermore, T cells normally expressed CCR7. Thus, mature DCs in grafts could attract alloreactive T cells in graft, activate them and initiate rejection mechanisms. This could explain the non-altered rejection in plt/plt recipient mice. CCR7 would be required on T cells for interactions with mature DCs, whether DCs are located in SLOs or in non-lymphoid organs.

In conclusions, our study shows that naïve T cells are recruited early after transplantation in grafts allogeneic by the direct pathway, which is concomitant with acquisition of effector functions by T cells. This recruitment could be in part mediated by CCL19 production by tissue-resident activated DCs. These observations support our hypothesis that naïve T cell activation could take place in the allograft. Further studies are currently in progress in order to establish the relevance of these *in situ* activated T cells in the process of graft rejection.

Acknowledgment

This work was supported by an operating grant from Canadian Institutes of Health Research to C.D. (MOP 68856) and by a studentship from Fondation Armand-Frappier to C.C.D. The authors are grateful to Paul M. Allen for providing most of the mouse strains used in this study. We would also like to thank Yvon Lamontagne for taking care of the mouse colonies.

References

1. Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 1991; 51 (6): 1141.
2. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection. *J Exp Med* 1996; 184 (5): 2013.
3. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol* 1999; 162 (1): 352.
4. Shirwan H. Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 1999; 68 (6): 715.
5. Sayegh MH, Carpenter CB. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol* 1996; 13 (3): 221.
6. Lee RS, Yamada K, Houser SL, et al. Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (6): 3276.
7. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 2000; 6 (6): 686.
8. Zhou P, Hwang KW, Palucki D, et al. Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses. *Am J Transplant* 2003; 3 (3): 259.
9. Baratin M, Bonin K, Daniel C. Frontline: Peripheral priming of alloreactive T cells by the direct pathway of allorecognition. *Eur J Immunol* 2004; 34 (12): 3305.
10. Hancock WW, Wang L, Ye Q, Han R, Lee I. Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr Opin Immunol* 2003; 15 (5): 479.
11. Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity* 2001; 14 (4): 377.
12. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000; 177: 134.
13. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73 (9): 1373.
14. Bono MR, Elgueta R, Sauma D, et al. The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18 (1-2): 33.
15. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12 (2): 121.
16. Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 2000; 74: 127.
17. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55: 97.
18. Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* 2002; 2 (9): 664.
19. 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 (6401): 225.

20. 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 (1): 128.
21. Rosenberg A. Skin allograft rejection. In: Coligan J, Kruisbeek A, Margulies D, Shevach E, eds. *Current protocols in immunology*, vol 1. Bethesda: John Wiley & Sons, Inc., 1991: 4.4.1.
22. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22 (1): 176.
23. Daniel C, Grakoui A, Allen PM. Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J Immunol* 1998; 160 (7): 3244.
24. Evavold BD, Williams SG, Hsu BL, Buus S, Allen PM. Complete dissection of the Hb(64-76) determinant using T helper 1, T helper 2 clones, and T cell hybridomas. *J Immunol* 1992; 148 (2): 347.
25. 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 (4): 1923.
26. 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 (8): 1237.
27. Nelson CA, Vidavsky I, Viner NJ, Gross ML, Unanue ER. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (2): 628.
28. Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004; 16 (5): 550.
29. Kondo T, Novick AC, Toma H, Fairchild RL. Induction of chemokine gene expression during allogeneic skin graft rejection. *Transplantation* 1996; 61 (12): 1750.
30. Kunstfeld R, Lechleitner S, Wolff K, Petzelbauer P. MCP-1 and MIP-1alpha are most efficient in recruiting T cells into the skin in vivo. *J Invest Dermatol* 1998; 111 (6): 1040.
31. Colvin BL, Thomson AW. Chemokines, their receptors, and transplant outcome. *Transplantation* 2002; 74 (2): 149.
32. Breart B, Bousso P. Cellular orchestration of T cell priming in lymph nodes. *Curr Opin Immunol* 2006; 18 (4): 483.
33. Lebre MC, Burwell T, Vieira PL, et al. Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol Cell Biol* 2005; 83 (5): 525.
34. Ziegler E, Gueler F, Rong S, et al. CCL19-IgG prevents allograft rejection by impairment of immune cell trafficking. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (9): 2521.
35. Kursar M, Hopken UE, Koch M, et al. Differential requirements for the chemokine receptor CCR7 in T cell activation during *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 2005; 201 (9): 1447.

36. Cose S, Brammer C, Khanna KM, Masopust D, Lefrancois L. Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *Eur J Immunol* 2006; 36 (6): 1423.
37. Krakowski ML, Owens T. Naive T lymphocytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation. *Eur J Immunol* 2000; 30 (4): 1002.
38. Weninger W, Carlsen HS, Goodarzi M, et al. Naive T cell recruitment to nonlymphoid tissues: a role for endothelium-expressed CC chemokine ligand 21 in autoimmune disease and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 2003; 170 (9): 4638.
39. Beckmann JH, Yan S, Luhrs H, et al. Prolongation of allograft survival in *ccr7*-deficient mice. *Transplantation* 2004; 77 (12): 1809.
40. Hopken UE, Droese J, Li JP, et al. The chemokine receptor CCR7 controls lymph node-dependent cytotoxic T cell priming in alloimmune responses. *Eur J Immunol* 2004; 34 (2): 461.
41. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 1999; 189 (3): 451.
42. Nakano H, Tamura T, Yoshimoto T, et al. Genetic defect in T lymphocyte-specific homing into peripheral lymph nodes. *Eur J Immunol* 1997; 27 (1): 215.
43. Nakano H, Mori S, Yonekawa H, Nariuchi H, Matsuzawa A, Kakiuchi T. A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. *Blood* 1998; 91 (8): 2886.
44. Nakano H, Gunn MD. Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the *plt* mutation. *J Immunol* 2001; 166 (1): 361.
45. Vassileva G, Soto H, Zlotnik A, et al. The reduced expression of 6Ckine in the *plt* mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes. *J Exp Med* 1999; 190 (8): 1183.
46. Colvin BL, Wang Z, Nakano H, et al. CXCL9 antagonism further extends prolonged cardiac allograft survival in CCL19/CCL21-deficient mice. *Am J Transplant* 2005; 5 (9): 2104.

Table 1: Expression profiles of chemokines and chemokine receptors in allografts rejected by direct and indirect pathways

		Relative gene expression												
		Day 3			Day 5			Day 7			Day 11			
Gene	Others name	Direct	Indirect	Isogenic	Direct	Indirect	Isogenic	Direct	Indirect	Isogenic	Direct	Indirect	Isogenic	
CC	CCL2	MCP-1	-	-	-	64	42	30	47	31	9	14	39	6
	CCL3	MIP-1 α	16	9	7	-	-	-	17	8	5	-	-	-
	CCL4	MIP-1 β	191	119	94	-	-	-	-	-	-	66	26	3
	CCL6	C10	-	-	-	-	-	-	44	20	12	23	38	14
	CCL7	MCP-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	10	2
	CCL8	MCP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCL9	MIP-1 γ	-	-	-	-	-	-	125	76	52	79	135	55
	CCL11	Eotaxin	-	-	-	-	-	-	18	8	7	9	17	4
	CCL17	TARC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	35	13
	CCL19	ELC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	17	7
	CCL21a	SLC	-	-	-	19	8	8	15	10	5	17	40	16
	CCL24	Eotaxin-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	21	7
CCR	CCR1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	2
	CCR2		-	-	-	-	-	-	78	29	34	22	26	5
CXC	CXCL1	KC	-	-	-	-	-	-	41	19	10	20	28	9
	CXCL2	MIP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	1
	CXCL4	PF4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	208	114	26
	CXCL5	LIX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	79	95	46
	CXCL9	MIG	-	-	-	51	8	5	-	-	-	9	2	1
	CXCL10	IP-10	-	-	-	56	17	18	61	32	3	16	61	2
	CXCL11	I-TAC	-	-	-	-	-	-	45	27	8	22	64	4
	CXCL14	MIP-2 β	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	6	0
	CXCL16	SR-Psox	12	10	6	-	-	-	15	6	4	7	11	5
CXCR	CXCR4		-	-	-	-	-	-	14	7	3	6	9	3
	CXCR6		-	-	-	-	-	-	13	4	3	-	-	-
Others	TNF		31	25	14	-	-	-	33	17	15	3	6	2

¹Gene expression level was calculated in arbitrary units (AU). AU = (Chemokine signal – background signal) normalizes with housekeeping genes x 100. Only genes having at least a 2-fold difference signals between allograft and isogenic controls have their AU indicated.

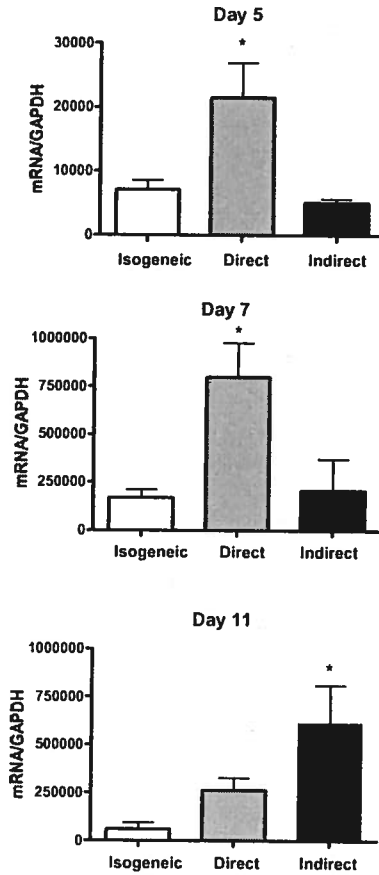


Figure 1. Early infiltration of 2.102 Tg T cells during direct alloreactivity

TCR α KOK mice were adoptively reconstituted with 3×10^6 CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice and grafted with tail skin from B6.AKR (isogenic control), B10.P (direct pathway) or B6(mHEL-Hb) (indirect pathway). At day 5, 7 and 11 post-transplant, grafts were retrieved (n = 3 or 4) and total RNA extracted. qRT-PCR using primers specific for 2.102 TCR β chain transgene was performed to determine gene expression. Fold changes in gene expression levels are relative to level observed in normal TCR α KOK skin, and calibrated with the housekeeping gene GAPDH.

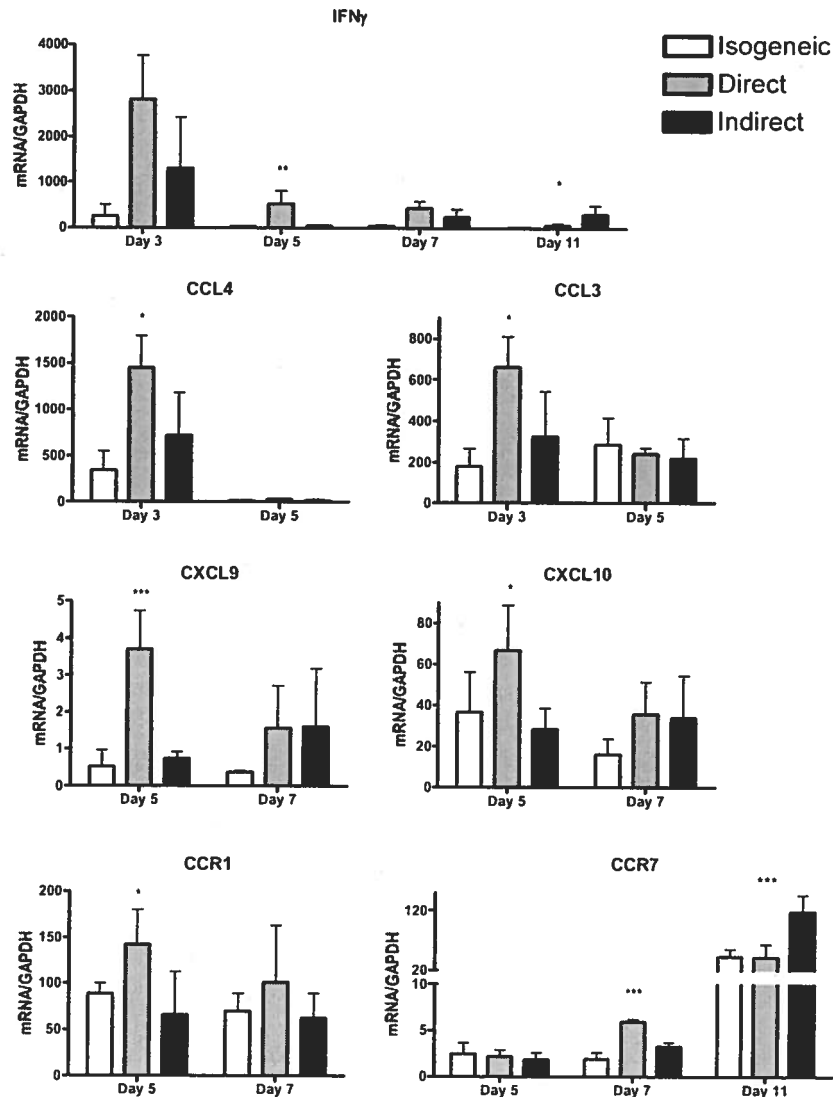


Figure 2: qRT-PCR for IFN γ , chemokines and chemokine receptors expression

TCR α KOK mice were adoptively reconstituted with 3×10^6 CD4 $^+$ T cells from 2.102Tg mice and grafted with tail skin from B6.AKR (isogenic control), B10.P (direct pathway) or B6(mHEL-Hb) (indirect pathway). At day 3, 5, 7 and 11 post-transplant, grafts were retrieved (n = 3 or 4) and harvested to proceed to a total RNA extraction followed by reverse transcription. qRT-PCR using primers specific for IFN γ , CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10, CCR1 and CCR7 was performed to determine gene expression. Fold changes in gene expression levels are relative to level observed in normal TCR α KOK skin, and calibrated with the housekeeping gene GAPDH.

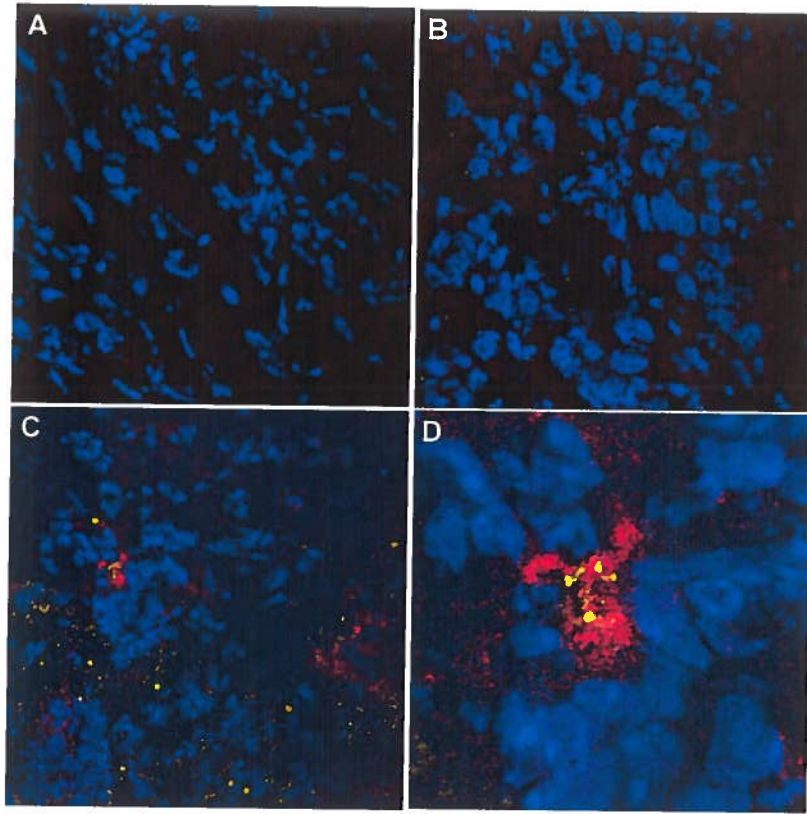


Figure 3: Confocal microscopy on grafts at day 7

Grafts provided from different pathways and from isogeneic controls were taken out and snap frozen at day 7 post-transplant. Cryosection of 8 μm of graft were hybridized with anti-CD90.1 (as marker of CD4^+ 2.102Tg T cells) in red, anti-CCR7 in yellow and with DAPI in blue to visualize DNA. A) Isogeneic control. B) Indirect pathway. C) Direct pathway. D) Focus on cells of direct pathway.

Conclusion générale

La transplantation d'organes se pratique depuis plus d'un demi-siècle et est malheureusement encore aujourd'hui la seule thérapie possible pour plusieurs dysfonctions d'organes causées par de nombreuses maladies. Au Canada, seulement une personne sur deux inscrites sur la liste d'attente recevra une transplantation d'organe (Association canadienne de transplantation). Outre le manque d'organes, le principal problème en transplantation est la réponse alloréactive du système immunitaire dirigée contre l'organe transplanté qui mènera au rejet. Les principaux alloantigènes responsables de cette réponse sont les molécules du CMH, qui sont très polymorphiques d'un individu à l'autre. Chez l'hôte, ce sont les LT CD4⁺ qui jouent le rôle clé d'initier et de participer activement au rejet du greffon, aidés des autres lymphocytes, granulocytes et monocytes. L'activation des LT CD4⁺ peut s'effectuer selon deux voies, la voie directe et indirecte, qui vont s'exécuter simultanément et indépendamment l'une de l'autre lors du rejet.

L'initiation des réponses alloréactives et l'endroit où la sensibilisation des LT à lieu sont encore matière à débat. De plus en plus de résultats suggèrent que l'activation des LT pourrait prendre place à l'extérieur des organes lymphoïdes secondaires dans la voie directe d'alloréactivité. Il a d'ailleurs été démontré que la présence de LT CD4⁺ activés était d'abord observée dans le greffon plutôt que dans les OLS lors de la voie directe (Baratin, Bonin et Daniel, 2004). Ceci laisse supposer que la sensibilisation des LT alloréactifs est possible à l'intérieur même de la greffe. Notre étude démontre aussi que, dans un modèle de greffe de peau avec transfert adoptif de LT, ceux-ci infiltrèrent en plus grand nombre et plus rapidement la greffe rejetée par la voie directe que celle rejetée par la voie indirecte d'allorecognition. Cette infiltration est accompagnée par une plus grande production d'IFN γ dans le greffon, ce qui laisse croire que ces LT, ou du moins une partie, sont activés.

D'autres cellules peuvent par contre produire de l'IFN γ . C'est le cas des cellules NK. Ces cellules furent longtemps considérées comme n'ayant aucune implication dans le rejet d'organes solides, mais récemment, de nouvelles découvertes concernant les cellules NK

en transplantation vinrent modifier ce dogme. Les cellules NK sont capables d'infiltrer de façon très précoce les greffons. Elles peuvent réagir et s'activer au contact de molécules du CMH de classe I allogéniques et ainsi infliger la mort aux cellules par divers mécanismes effecteurs directs ou indirects (Kitchens *et al.*, 2006). Dans les greffes de peau et de foie chez le rat, les cellules NK ayant infiltré le greffon vont produire rapidement plusieurs chimiokines pro-inflammatoires, telles que CCL4, CCL3 et CXCL10, qui feraient partie intégrante de la cascade du rejet aigu (Kondo *et al.*, 2000, Obara *et al.*, 2005). Elles peuvent aussi y produire de l'IFN γ , qui induira une sécrétion de CXCL9, CXCL10 et CXCL11. Ceci aura pour effet d'augmenter l'expression des molécules du CMH de classe II sur les cellules endothéliales du greffon et d'induire la maturation des DC (Watson *et al.*, 1995, McDouall *et al.*, 1997).

Il est possible qu'une activation des cellules NK ait lieu dans le modèle de souris utilisé dans notre laboratoire, d'autant plus que les greffes de la voie directe et indirecte proviennent de souris possédant des molécules du CMH différentes, ayant donc diverses possibilités de ligands pour les récepteurs Ly49 des cellules NK de la souris receveuse. De plus, les résultats montrent une différence précoce (5 jours suivant la greffe) entre la production d'IFN γ dans la greffe rejetée par la voie directe et indirecte (voir figure 2 de l'article).

Dans le modèle de notre étude, une peau de souris d'haplotype H-2^P ou H-2^b est greffée chez la souris B6.AKR d'haplotype H-2^k (voir figure 3). Basé sur leur séquence prédite en acides aminés, chez la lignée de souris B6, dont est issue la lignée de souris B6.AKR, seul les récepteurs Ly49 D, H, K, L, M, N et X ont un potentiel activateur (Anderson, Ortaldo et McVicar, 2001, Proteau, Rousselle et Makrigiannis, 2004). Ces récepteurs, s'ils s'associent à leurs ligands, pourraient activer les cellules NK, ce qui induirait une production d'IFN γ . Étant donné que les ligands de ces molécules ne sont connus que partiellement, une expérience supplémentaire fut réalisée pour élucider si des cellules NK ont un rôle à jouer dans la mise en place des réponses alloréactives observées dans la voie directe (voir figure 10 en annexe pour la description des expérimentations et les résultats). De façon résumée, l'expérience consiste à ne pas injecter de LT alloréactifs dans les

souris greffées selon les différentes voies ainsi qu'au témoin isogénique. Il a déjà été démontré que ceci n'entraînait pas de rejet, mais la question était de savoir s'il y avait une production d'IFN γ à des jours précoces dans l'une des voies plus que dans l'autre. Des analyses par RT-PCR quantitatif furent réalisées sur l'ARN extrait des greffons prélevés 5 jours suivant la transplantation. Les résultats (voir figure 10 en annexe) démontrent que sans LT alloréactifs, il n'y a aucune différence de production d'IFN γ entre les voies. Cette observation confirme qu'il n'y a pas d'activation des cellules NK dans une voie plus que dans l'autre. Cela confirme aussi que les LT alloréactifs sont impliqués directement ou indirectement dans la production d'IFN γ induit dans la voie directe à jour 5 du modèle classique.

Il est maintenant connu que les cellules NK sont capables de réguler les fonctions des DC, et de cette façon, de moduler l'activité des LT (Walzer *et al.*, 2005). Il est donc probable que les cellules NK puissent jouer un rôle crucial dans l'aide apportée aux DC durant l'activation des LT dans le greffon, un environnement moins spécialisé que les OLS. Une seconde expérience fut donc réalisée et consistait à injecter préalablement l'anticorps PK136 (anti-NK1.1) aux souris qui furent greffées une semaine plus tard. Ceci avait pour but d'éliminer les cellules NK des souris et par la même occasion d'évaluer leur rôle dans l'aide qu'elles pouvaient apporter aux DC. Des analyses par RT-PCR quantitatif furent réalisées à jour 7 pour déterminer si la différence d'infiltration des LT alloréactifs entre les voies directe et indirecte était toujours aussi marquée par rapport au modèle original et si les cellules NK avaient un rôle à jouer dans la réponse alloréactive par la voie directe. Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'infiltration massive de LT alloréactifs dans la voie directe au jour 7, contrairement à ce qui est observé dans le modèle classique (voir figure 10 en annexe). Ce résultat porte à croire que dans cette voie, les cellules NK fourniraient une aide importante, voir essentielle, aux DC exogènes dans le greffon pour l'activation des LT. À ce sujet, de plus en plus d'études confirment que les cellules NK peuvent apporter une aide aux DC et vice-versa (Hamerman, Ogasawara et Lanier, 2005, Walzer *et al.*, 2005). La figure 11 (en annexe) résume bien la boucle d'amplification que peuvent s'apporter mutuellement les cellules NK et les DC. Elles possèdent l'habileté de pouvoir s'activer de façon réciproque l'une l'autre, *in vitro* et *in vivo*. Cet échange inclus un

contact cellulaire impliquant des récepteurs-ligands inconnus et des médiateurs solubles produits par les deux cellules. Les cytokines TNF α , IL-2, IL-12, IL-18 et IFN γ sont toutes impliquées dans ce processus. La finalité de ces interactions est l'activation de la cytotoxicité, la production d'IFN γ et la prolifération des cellules NK, ainsi que la maturation des DC qui produiront des cytokines et seront plus aptes à l'activation des LT (Hamerman, Ogasawara et Lanier, 2005).

Malgré l'absence de LT alloréactifs dans le greffon, il y a une expression relativement importante d'IFN γ . Les macrophages pourraient être responsables de cette expression. Lors de l'injection de l'anticorps PK136, les macrophages pourraient être suractivés dans le processus d'élimination des cellules NK de la souris. Cette suractivation peut avoir des répercussions sur la réponse alloréactive ultérieure. Nous pouvons toutefois confirmer que les cellules NK dans le modèle ne peuvent pas être suffisamment activées par les cellules exogènes des différents donneurs pour mener seules à une cytotoxicité cellulaire.

Les chimiokines représentent l'une des plus grandes familles de cytokines et ont une importance cruciale pour la mobilité des leucocytes à l'intérieur de l'individu. Elles sont impliquées autant dans l'homéostasie du système immunitaire lors de sa réponse contre l'infection que dans les réponses alloréactives. Depuis quelques années, les chimiokines sont de plus en plus étudiées pour leur implication dans l'alloréactivité et plusieurs de ces études laissent entrevoir des possibilités de thérapies cliniques. De façon très précoce à l'intérieur du greffon, voir même quelques heures suivant la transplantation, plusieurs chimiokines sont induites. Ces chimiokines, et autres cytokines produites, attirent les monocytes et lymphocytes à l'intérieur du greffon. Dans la présente étude, d'importantes différences d'expression entre les chimiokines et leurs récepteurs furent démontrées entre les voies d'alloréactivité directe et indirecte. L'expression des chimiokines induite par l'IFN γ , CXCL9 et CXCL10, ainsi que celle du récepteur CCR1 fut observée 5 jours suivant la transplantation dans la voie directe contrairement à la voie indirecte (voir figure 2 de l'article). Cela démontre un plus grand état d'inflammation et d'infiltration cellulaire dans le greffon lors d'un rejet par la voie directe. Comme mentionné ci-haut, l'IFN γ produit à ce stade proviendrait des LT CD4⁺ qui sont déjà présents en plus grand nombre

à l'intérieur du greffon. Ces LT seraient donc responsables du maintien de l'inflammation dans le greffon et de l'enclenchement de la cascade de mécanismes menant au rejet par la voie directe. Les LT activés peuvent aussi produire une vaste gamme de cytokines inflammatoires pour recruter et activer plusieurs cellules effectrices impliquées dans le rejet de greffe comme les macrophages, les cellules NK et les éosinophiles. Ceci pourrait expliquer la surexpression dans ce type de greffe du récepteur CCR1, récepteur qui est exprimé sur la majorité de ces cellules de l'immunité innée.

En transplantation, l'ischémie/reperfusion de l'organe transplanté lors de la chirurgie est suffisant pour induire la maturation des DC qui y sont résidentes. Cette maturation induira entre autres un changement d'expression des récepteurs de chimiokines à la surface des DC, ce qui contribuera à leur migration vers les zones T des tissus lymphoïdes (Lechler, Ng et Steinman, 2001). CCR7 est le récepteur le plus important exprimé sur les DC matures et est responsable de leur migration vers les OLS. Par contre, il fut démontré que certaines DC matures CCR7^{-/-} sont fonctionnelles à l'extérieur du contexte des OLS (Hopken *et al.*, 2004). Les DC résidentes au greffon et qui y demeurent peuvent donc être compétentes pour la sensibilisation des LT.

Les premières chimiokines qui sont sécrétées lors de la maturation des DC sont des chimiokines inflammatoires comme CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CCL8. Ces chimiokines possèdent aussi bien une fonction autocrine, pour potentiellement stimuler de plus en plus la DC, qu'exocrine, pour amplifier le recrutement des monocytes et des DC immatures aux sites d'inflammation. La chimiokine homéostatique CCL19 est aussi sécrétée par les DC au cours de leur processus de maturation (Zlotnik et Yoshie, 2000, Lebre *et al.*, 2005, Breart et Bouso, 2006), surtout dans la phase tardive de leur maturation (10 à 30 heures après l'induction de la maturation). Elle faciliterait l'attraction et l'interaction de celles-ci avec les LT naïfs (Sallusto, Mackay et Lanzavecchia, 2000). Les DC matures résidentes au greffon pourraient donc être responsables du recrutement des LT naïfs à l'intérieur de la greffe. Cela se produit évidemment sans distinction entre les deux voies d'alloréactivité et probablement aussi dans le témoin isogénique. De plus, des analyses par RT-PCR quantitatif indiquent que CCL19 est deux fois plus exprimée

dans le greffon que dans la peau normale, indépendamment du type de greffe (incluant le témoin isogénique; voir figure 9 en annexe). Le CD90.1, utilisé comme marqueur des LT 2.102 CD4⁺, est détecté en microscopie sur les mêmes cellules que celles qui expriment CCR7, indiquant et confirmant que ces cellules sont des LT naïfs et qu'ils peuvent bel et bien infiltrer le greffon. Dans le cas de la voie directe, il s'agirait du début d'une spirale d'amplification de recrutement et d'activation des LT, tandis que dans la voie indirecte ou dans le témoin isogénique, il n'y aurait pas initiation de ce phénomène étant donné l'absence d'interactions spécifiques avec les DC présentes.

Suite à ces travaux, des études plus poussées sur les mécanismes responsables du recrutement des LT au greffon ainsi que sur leur rôle à jouer dans le rejet seront effectuées. Par exemple, un anticorps bloquant le récepteur CCR7 pourrait être utilisé dans le modèle de greffe pour déterminer de façon certaine que ce mécanisme est à l'origine du recrutement lymphocytaire au greffon. Des LT alloréactifs provenant de souris CCR7^{-/-} pourraient aussi être utilisés. Les mécanismes du rejet, différents d'une voie à l'autre, seront décortiqués et des études supplémentaires sur le rôle des cellules NK dans ces phénomènes seront aussi réalisées.

Remerciements

Ce mémoire a été produit suite au travail réalisé au cours de ma maîtrise en Immunologie/Virologie, de septembre 2004 à décembre 2006. Il n'aurait pu être réalisé sans l'aide précieuse de plusieurs personnes. Tout d'abord, je voudrais remercier chaleureusement mon directeur, Dr Claude Daniel, pour son soutien, son aide et sa générosité tout au long des mes études à l'Institut Armand-Frappier. Ensuite, je tiens à souligner l'importance de mes collègues de laboratoire; Caroline Leduc, qui fut entre autres d'une aide inestimable à l'animalerie; Yvon Lamontagne, pour avoir pris soin des souris; Pomme Boissier, pour avoir mis au point la technique du RT-PCR quantitatif; Dre Séverine Havoui, Caroline Hébert, Isabelle Leray, Dr Alban Gervais, Dre Meriam Belghith, Houda Ismail, Véronique Allard, Philippe Lamarche, pour leurs nombreux conseils et pour leur gentillesse. Je tiens aussi à remercier M. Christian Charbonneau pour son aide précieuse en microscopie confocale et Dre Suzanne Lemieux de nous avoir fourni gracieusement l'anticorps PK136. Cette étude n'aurait pu être réalisée sans l'aide financière de la Fondation Armand-Frappier et des Instituts de Recherche en Santé du Canada. Finalement, je tiens à remercier mes parents, mes amis et tout le personnel de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour leur soutien et leurs encouragements.

Bibliographie

Agarwal, A. et Pescovitz, M. D. (2006). "Immunosuppression in pediatric solid organ transplantation." Semin Pediatr Surg **15**(3): 142-52.

Akl, A., Luo, S. et Wood, K. J. (2005). "Induction of transplantation tolerance-the potential of regulatory T cells." Transpl Immunol **14**(3-4): 225-30.

Aloisi, F. et Pujol-Borrell, R. (2006). "Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases." Nat Rev Immunol **6**(3): 205-17.

Anderson, S. K., Ortaldo, J. R. et McVicar, D. W. (2001). "The ever-expanding Ly49 gene family: repertoire and signaling." Immunol Rev **181**: 79-89.

Andre, F., Chaput, N., Scharz, N. E., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D. H., Tursz, T., Amigorena, S., Angevin, E. et Zitvogel, L. (2004). "Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells." J Immunol **172**(4): 2126-36.

Antonyamy, M. A., Fanslow, W. C., Fu, F., Li, W., Qian, S., Troutt, A. B. et Thomson, A. W. (1999). "Evidence for a role of IL-17 in alloimmunity: a novel IL-17 antagonist promotes heart graft survival." Transplant Proc **31**(1-2): 93.

Baratin, M., Bonin, K. et Daniel, C. (2004). "Frontline: Peripheral priming of alloreactive T cells by the direct pathway of allorecognition." Eur J Immunol **34**(12): 3305-14.

Beckmann, J. H., Yan, S., Luhrs, H., Heid, B., Skubich, S., Forster, R. et Hoffmann, M. W. (2004). "Prolongation of allograft survival in ccr7-deficient mice." Transplantation **77**(12): 1809-14.

Benichou, G., Valujskikh, A. et Heeger, P. S. (1999). "Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice." J Immunol **162**(1): 352-8.

Bono, M. R., Elgueta, R., Sauma, D., Pino, K., Osorio, F., Michea, P., Fierro, A. et Roseblatt, M. (2007). "The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing." Cytokine Growth Factor Rev **18**(1-2): 33-43.

Braun, M. Y., Desalle, F., Le Moine, A., Pretolani, M., Matthys, P., Kiss, R. et Goldman, M. (2000). "IL-5 and eosinophils mediate the rejection of fully histoincompatible vascularized cardiac allografts: regulatory role of alloreactive CD8(+) T lymphocytes and IFN-gamma." Eur J Immunol **30**(5): 1290-6.

Breart, B. et Bousso, P. (2006). "Cellular orchestration of T cell priming in lymph nodes." Curr Opin Immunol **18**(4): 483-90.

- Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. et Briskin, M. (1999). "Lymphocyte trafficking and regional immunity." Adv Immunol **72**: 209-53.
- Colvin, B. L., Wang, Z., Nakano, H., Wu, W., Kakiuchi, T., Fairchild, R. L. et Thomson, A. W. (2005). "CXCL9 antagonism further extends prolonged cardiac allograft survival in CCL19/CCL21-deficient mice." Am J Transplant **5**(9): 2104-13.
- Corley, R. B. et Kindred, B. (1977). "In vivo responses of alloreactive lymphocytes stimulated in vitro. Helper-cell activity of MLR-primed lymphocytes." Scand J Immunol **6**(9): 923-932.
- Dalloul, A. H., Chmouzis, E., Ngo, K. et Fung-Leung, W. P. (1996). "Adoptively transferred CD4+ lymphocytes from CD8 -/- mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts." J Immunol **156**(11): 4114-9.
- Daniel, C., Grakoui, A. et Allen, P. M. (1998). "Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands." J Immunol **160**(7): 3244-50.
- Dorsch, S. et Roser, B. (1974). "The clonal nature of allo-antigen-sensitive small lymphocytes in the recirculating pool of normal rats." Aust J Exp Biol Med Sci **52**(1): 45-66.
- Drayton, D. L., Liao, S., Mounzer, R. H. et Ruddle, N. H. (2006). "Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis." Nat Immunol **7**(4): 344-53.
- el-Sawy, T., Fahmy, N. M. et Fairchild, R. L. (2002). "Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts." Curr Opin Immunol **14**(5): 562-8.
- Feng, C., Woodside, K. J., Vance, B. A., El-Khoury, D., Canelles, M., Lee, J., Gress, R., Fowlkes, B. J., Shores, E. W. et Love, P. E. (2002). "A potential role for CD69 in thymocyte emigration." Int Immunol **14**(6): 535-44.
- Goldman, M., Le Moine, A., Braun, M., Flamand, V. et Abramowicz, D. (2001). "A role for eosinophils in transplant rejection." Trends Immunol **22**(5): 247-51.
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T. et Nakano, H. (1999). "Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization." J Exp Med **189**(3): 451-60.
- Hall, B. M., Dorsch, S. et Roser, B. (1978). "The cellular basis of allograft rejection in vivo. I. The cellular requirements for first-set rejection of heart grafts." J Exp Med **148**(4): 878-89.
- Hall, B. M. (1991). "Cells mediating allograft rejection." Transplantation **51**(6): 1141-51.

- Hamerman, J. A., Ogasawara, K. et Lanier, L. L. (2005). "NK cells in innate immunity." Curr Opin Immunol **17**(1): 29-35.
- Hancock, W. W., Gao, W., Faia, K. L. et Csizmadia, V. (2000a). "Chemokines and their receptors in allograft rejection." Curr Opin Immunol **12**(5): 511-6.
- Hancock, W. W., Lu, B., Gao, W., Csizmadia, V., Faia, K., King, J. A., Smiley, S. T., Ling, M., Gerard, N. P. et Gerard, C. (2000b). "Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection." J Exp Med **192**(10): 1515-20.
- Hancock, W. W., Gao, W., Csizmadia, V., Faia, K. L., Shemmeri, N. et Luster, A. D. (2001). "Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection." J Exp Med **193**(8): 975-80.
- Hancock, W. W., Wang, L., Ye, Q., Han, R. et Lee, I. (2003). "Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression." Curr Opin Immunol **15**(5): 479-86.
- Haskova, Z., Izawa, A., Contreras, A. G., Flynn, E., Boulday, G. et Briscoe, D. M. (2007). "Organ-specific differences in the function of MCP-1 and CXCR3 during cardiac and skin allograft rejection." Transplantation **83**(12): 1595-601.
- Hopken, U. E., Droese, J., Li, J. P., Joergensen, J., Breitfeld, D., Zerwes, H. G. et Lipp, M. (2004). "The chemokine receptor CCR7 controls lymph node-dependent cytotoxic T cell priming in alloimmune responses." Eur J Immunol **34**(2): 461-70.
- Jiang, S., Herrera, O. et Lechler, R. I. (2004). "New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **16**(5): 550-7.
- Kaech, S. M., Wherry, E. J. et Ahmed, R. (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." Nat Rev Immunol **2**(4): 251-62.
- Kane, K. P., Lavender, K. J. et Ma, B. J. (2004). "Ly-49 receptors and their functions." Crit Rev Immunol **24**(5): 321-48.
- Kang, S. M., Tang, Q. et Bluestone, J. A. (2007). "CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects." Am J Transplant **7**(6): 1457-63.
- Kim, C. H., Rott, L., Kunkel, E. J., Genovese, M. C., Andrew, D. P., Wu, L. et Butcher, E. C. (2001). "Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo." J Clin Invest **108**(9): 1331-9.
- Kitchens, W. H., Uehara, S., Chase, C. M., Colvin, R. B., Russell, P. S. et Madsen, J. C. (2006). "The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance." Transplantation **81**(6): 811-7.

- Kondo, T., Morita, K., Watarai, Y., Auerbach, M. B., Taub, D. D., Novick, A. C., Toma, H. et Fairchild, R. L. (2000). "Early increased chemokine expression and production in murine allogeneic skin grafts is mediated by natural killer cells." Transplantation **69**(5): 969-77.
- Kreisel, D., Krupnick, A. S., Gelman, A. E., Engels, F. H., Popma, S. H., Krasinskas, A. M., Balsara, K. R., Szeto, W. Y., Turka, L. A. et Rosengard, B. R. (2002). "Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition." Nat Med **8**(3): 233-9.
- Krieger, N. R., Yin, D. P. et Fathman, C. G. (1996). "CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection." J Exp Med **184**(5): 2013-8.
- Lakkis, F. G., Arakelov, A., Konieczny, B. T. et Inoue, Y. (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." Nat Med **6**(6): 686-8.
- Larsen, C. P., Steinman, R. M., Witmer-Pack, M., Hankins, D. F., Morris, P. J. et Austyn, J. M. (1990). "Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants." J Exp Med **172**(5): 1483-93.
- Le Moine, A., Goldman, M. et Abramowicz, D. (2002). "Multiple pathways to allograft rejection." Transplantation **73**(9): 1373-81.
- Lebre, M. C., Burwell, T., Vieira, P. L., Lora, J., Coyle, A. J., Kapsenberg, M. L., Clausen, B. E. et De Jong, E. C. (2005). "Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation." Immunol Cell Biol **83**(5): 525-35.
- Lechler, R., Ng, W. F. et Steinman, R. M. (2001). "Dendritic cells in transplantation--friend or foe?" Immunity **14**(4): 357-68.
- Lechler, R. I. et Batchelor, J. R. (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.
- Loetscher, P., Moser, B. et Baggiolini, M. (2000). "Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection." Adv Immunol **74**: 127-80.
- Loong, C. C., Hsieh, H. G., Lui, W. Y., Chen, A. et Lin, C. Y. (2002). "Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection." J Pathol **197**(3): 322-32.
- Lorenz, R. G. et Allen, P. M. (1988). "Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5220-3.

- McDouall, R. M., Batten, P., McCormack, A., Yacoub, M. H. et Rose, M. L. (1997). "MHC class II expression on human heart microvascular endothelial cells: exquisite sensitivity to interferon-gamma and natural killer cells." Transplantation **64**(8): 1175-80.
- Melter, M., McMahon, G., Fang, J., Ganz, P. et Briscoe, D. M. (1999). "Current understanding of chemokine involvement in allograft transplantation." Pediatr Transplant **3**(1): 10-21.
- Melter, M., Exeni, A., Reinders, M. E., Fang, J. C., McMahon, G., Ganz, P., Hancock, W. W. et Briscoe, D. M. (2001). "Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection." Circulation **104**(21): 2558-64.
- Moser, B. et Loetscher, P. (2001). "Lymphocyte traffic control by chemokines." Nat Immunol **2**(2): 123-8.
- Moser, B. (2003). "Chemokines: role in immune cell traffic." Eur Cytokine Netw **14**(4): 204-10.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A. et Loetscher, P. (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." Trends Immunol **25**(2): 75-84.
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J. et Power, C. A. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-76.
- Nakano, H., Tamura, T., Yoshimoto, T., Yagita, H., Miyasaka, M., Butcher, E. C., Nariuchi, H., Kakiuchi, T. et Matsuzawa, A. (1997). "Genetic defect in T lymphocyte-specific homing into peripheral lymph nodes." Eur J Immunol **27**(1): 215-21.
- Nakano, H., Mori, S., Yonekawa, H., Nariuchi, H., Matsuzawa, A. et Kakiuchi, T. (1998). "A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4." Blood **91**(8): 2886-95.
- Nakano, H. et Gunn, M. D. (2001). "Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation." J Immunol **166**(1): 361-9.
- Nasr, I. W., Reel, M., Oberbarnscheidt, M. H., Mounzer, R. H., Baddoura, F. K., Ruddle, N. H. et Lakkis, F. G. (2007). "Tertiary lymphoid tissues generate effector and memory T cells that lead to allograft rejection." Am J Transplant **7**(5): 1071-9.
- Obara, H., Nagasaki, K., Hsieh, C. L., Ogura, Y., Esquivel, C. O., Martinez, O. M. et Krams, S. M. (2005). "IFN-gamma, produced by NK cells that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune responses." Am J Transplant **5**(9): 2094-103.

Olsson-Alheim, M. Y., Sundback, J., Karre, K. et Sentman, C. L. (1999). "The MHC class I molecule H-2Dp inhibits murine NK cells via the inhibitory receptor Ly49A." J Immunol **162**(12): 7010-4.

Pettigrew, G. J., Lovegrove, E., Bradley, J. A., Maclean, J. et Bolton, E. M. (1998). "Indirect T cell allorecognition and alloantibody-mediated rejection of MHC class I-disparate heart grafts." J Immunol **161**(3): 1292-8.

Proteau, M. F., Rousselle, E. et Makrigiannis, A. P. (2004). "Mapping of the BALB/c Ly49 cluster defines a minimal natural killer cell receptor gene repertoire." Genomics **84**(4): 669-77.

Rogers, N. J. et Lechler, R. I. (2001). "Allorecognition." Am J Transplant **1**(2): 97-102.

Rosenkilde, M. M. et Schwartz, T. W. (2004). "The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease." Apmis **112**(7-8): 481-95.

Rossini, A. A., Greiner, D. L. et Mordes, J. P. (1999). "Induction of immunologic tolerance for transplantation." Physiol Rev **79**(1): 99-141.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. et Lanzavecchia, A. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-12.

Sallusto, F. et Lanzavecchia, A. (2000). "Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression." Immunol Rev **177**: 134-40.

Sallusto, F., Mackay, C. R. et Lanzavecchia, A. (2000). "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses." Annu Rev Immunol **18**: 593-620.

Sauve, D., Baratin, M., Leduc, C., Bonin, K. et 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**(8): 1237-45.

Schrama, D., Straten, P., Fischer, W. H., McLellan, A. D., Brocker, E. B., Reisfeld, R. A. et Becker, J. C. (2001). "Targeting of lymphotoxin-alpha to the tumor elicits an efficient immune response associated with induction of peripheral lymphoid-like tissue." Immunity **14**(2): 111-21.

Schroder, C., Pierson, R. N., 3rd, Nguyen, B. N., Kawka, D. W., Peterson, L. B., Wu, G., Zhang, T., Springer, M. S., Siciliano, S. J., Iliff, S., Ayala, J. M., Lu, M., Mudgett, J. S., Lyons, K., Mills, S. G., Miller, G. G., Singer, II, Azimzadeh, A. M. et DeMartino, J. A. (2007). "CCR5 blockade modulates inflammation and alloimmunity in primates." J Immunol **179**(4): 2289-99.

Simeonovic, C. J., Townsend, M. J., Wilson, J. D., McKenzie, K. U., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., Mann, D. A. et Young, I. G. (1997). "Eosinophils are not required for the rejection of neovascularized fetal pig proislet xenografts in mice." J Immunol **158**(5): 2490-9.

Sprent, J. et Tough, D. F. (2001). "T cell death and memory." Science **293**(5528): 245-8.

Sprent, J. et Surh, C. D. (2002). "T cell memory." Annu Rev Immunol **20**: 551-79.

Tang, J. L., Subbotin, V. M., Antonysamy, M. A., Troutt, A. B., Rao, A. S. et Thomson, A. W. (2001). "Interleukin-17 antagonism inhibits acute but not chronic vascular rejection." Transplantation **72**(2): 348-50.

Tay, S. S., McCormack, A. et Rose, M. L. (2004). "Effect of cognate human CD4+ T cell and endothelial cell interactions upon chemokine production." Transplantation **78**(7): 987-94.

They, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O. et Amigorena, S. (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." Nat Immunol **3**(12): 1156-62.

Trenado, A., Charlotte, F., Fisson, S., Yagello, M., Klatzmann, D., Salomon, B. L. et Cohen, J. L. (2003). "Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia." J Clin Invest **112**(11): 1688-96.

Vassileva, G., Soto, H., Zlotnik, A., Nakano, H., Kakiuchi, T., Hedrick, J. A. et Lira, S. A. (1999). "The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes." J Exp Med **190**(8): 1183-8.

Vu, M. D., Amanullah, F., Li, Y., Demirci, G., Sayegh, M. H. et Li, X. C. (2004). "Different costimulatory and growth factor requirements for CD4+ and CD8+ T cell-mediated rejection." J Immunol **173**(1): 214-21.

Waldmann, H., Adams, E., Fairchild, P. et Cobbold, S. (2006). "Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue." Immunol Rev **212**: 301-13.

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. et Vivier, E. (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"." Blood **106**(7): 2252-8.

Watson, C. A., Petzelbauer, P., Zhou, J., Pardi, R. et Bender, J. R. (1995). "Contact-dependent endothelial class II HLA gene activation induced by NK cells is mediated by IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms." J Immunol **154**(7): 3222-33.

Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. et Harrington, L. E. (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." Annu Rev Immunol **25**: 821-52.

Wood, K. J. et Sakaguchi, S. (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." Nat Rev Immunol 3(3): 199-210.

Yang, Y. G. et Sykes, M. (2007). "Xenotransplantation: current status and a perspective on the future." Nat Rev Immunol 7(7): 519-31.

Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Chin, R. K., Wang, J., Wang, Y., Schietinger, A., Philip, M., Schreiber, H. et Fu, Y. X. (2004). "Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors." Nat Immunol 5(2): 141-9.

Zhou, P., Hwang, K. W., Palucki, D., Kim, O., Newell, K. A., Fu, Y. X. et Alegre, M. L. (2003). "Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses." Am J Transplant 3(3): 259-66.

Ziegler, E., Gueler, F., Rong, S., Mengel, M., Witzke, O., Kribben, A., Haller, H., Kunzendorf, U. et Krautwald, S. (2006). "CCL19-IgG prevents allograft rejection by impairment of immune cell trafficking." J Am Soc Nephrol 17(9): 2521-32.

Zlotnik, A. et Yoshie, O. (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity 12(2): 121-7.

Annexes

Tableau 2. Nomenclature des chimiokines; passé et futur (Rosenkilde et Schwartz, 2004)

	Nouveau nom	Ancien nom	Abbréviation
CXC	CXCL1	GRO α	Growth-related oncogene α
	CXCL2	GRO β	Growth-related oncogene β
	CXCL3	GRO γ	Growth-related oncogene γ
	CXCL4	PF-4	Platelet factor-4
	CXCL5	ENA-78	Epithelial cell-derived neutrophil-activating factor 78
	CXCL6	GCP-2	Granulocyte chemoattractant protein-2
	CXCL7	NAP-2	Neutrophil-activating protein-2
	CXCL8	IL-8	Interleukin-8
	CXCL9	Mig	Monokine induced by γ -interferon
	CXCL10	IP10	γ -Interferon -inducible protein-10
	CXCL11	ITAC	Interferon-inducible T-cell α -chemoattractant
	CXCL12	SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
	CXCL13	BCA	B-cell-activating chemokine 1
	CXCL14	BRAK	Breast and kidney chemokine
CC	CCL1	I-309	
	CCL2	MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
	CCL3	MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
	CCL4	MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein-1 β
	CCL5	RANTES	Regulated on activation normal T-cell-expressed and secreted
	CCL7	MCP-3	Monocyte chemoattractant protein-3
	CCL8	MCP-2	Monocyte chemoattractant protein-2
	CCL11	Eotaxin	
	CCL13	MCP-4	Monocyte chemoattractant protein-4
	CCL14	HCC-1	Hemofiltrate CC-chemokine-1
	CCL15	HCC-2	Hemofiltrate CC-chemokine-2
	CCL16	HCC-4	Hemofiltrate CC-chemokine-4
	CCL17	TARC	Thymus- and activation-related chemokine
	CCL18	PARC	Pulmonary- and activation-regulated chemokine
	CCL19	ELC	Epstein-Barr virus-induced receptor ligand chemokine
	CCL20	LARC	Liver- and activation-related chemokine
	CCL21	SLC	Secondary lymphoid tissue chemokine
	CCL22	MDC	Macrophage-derived chemokine
	CCL23	MPIF-1	Myeloid progenitor inhibitory factor-1
	CCL24	MPIF-2	Myeloid progenitor inhibitory factor-2
CCL25	TECK	Thymus-expressed chemokine	
CCL26	Eotaxin-3		
CCL27	ESkine	Skinkine	
CCL28	MEG	Mucosa-associated epithelial chemokine	
C	XCL1		Lymphotactin α
	XCL2		Lymphotactin- β
CX3C	CX3CL1		Fractalkine

En 2000, une nouvelle nomenclature fut introduite (Murphy *et al.*, 2000). À présent, l'ancienne et la nouvelle nomenclature sont utilisées dans les publications, ce qui apporte souvent plus de confusion que de clarté. Quelques chimiokines ont plusieurs noms compliqués en plus de leur numéro CC ou CXC. Seulement le nom le plus commun pour chaque chimiokine est donné dans ce tableau.

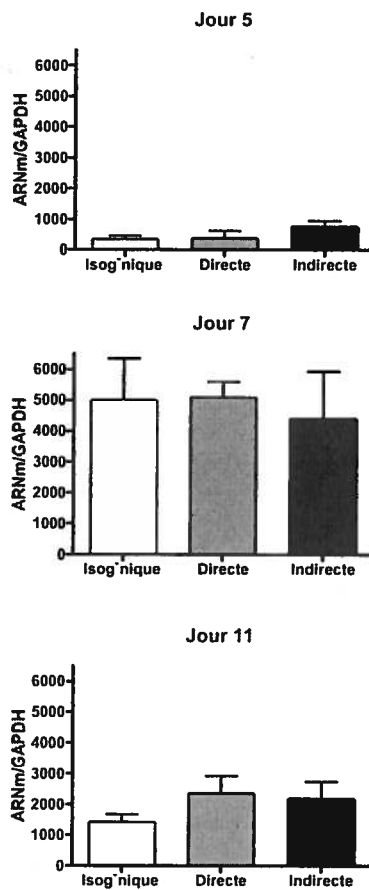


Figure 8. RT-PCR quantitatif pour l'expression du transgène 2.102 dans les ganglions drainants

Des souris TCR α KOK furent reconstituées par l'injection de 3×10^6 LT CD4⁺ de souris Tg2.102 et greffées avec de la peau de queue de souris B6.AKR (témoin isogénique), B10.P (voie directe) ou B6(mHEL-Hb) (voie indirecte). À jour 5, 7 et 11, les ganglions brachiaux et axillaires furent prélevés (n = 3 ou 4) et broyés pour procéder à l'extraction de l'ARN suivi d'une transcriptase inverse. Un RT-PCR quantitatif utilisant des amorces spécifiques pour la chaîne β du TCR transgénique fut réalisé pour en déterminer l'expression. La valeur des barres représente l'expression par rapport au niveau détecté dans la peau normale de souris TCR α KOK et est calibrée en fonction du gène rapporteur GAPDH.

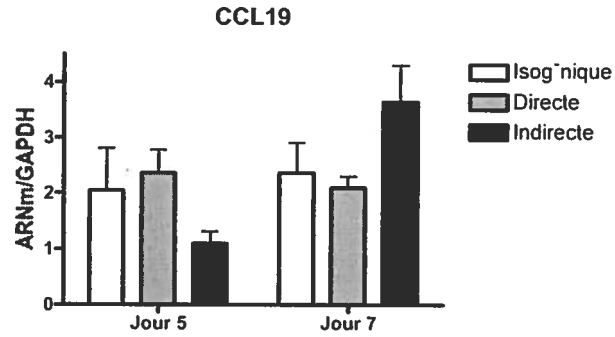


Figure 9. RT-PCR quantitatif pour l'expression de la chimiokine CCL19 dans les greffons

Des souris TCR α KOK furent reconstituées par l'injection de 3×10^6 LT CD4⁺ de souris Tg2.102 et greffées avec de la peau de queue de souris B6.AKR (témoin isogénique), B10.P (voie directe) ou B6(mHEL-Hb) (voie indirecte). À jour 5, 7 et 11, les greffons furent prélevés (n = 3 ou 4) et broyés pour procéder à l'extraction de l'ARN suivi d'une transcriptase inverse. Un RT-PCR quantitatif utilisant des amorces spécifiques pour le gène CCL19 fut réalisé pour en déterminer l'expression. La valeur des barres représente l'expression par rapport au niveau détecté dans la peau normale de souris TCR α KOK et est calibrée en fonction du gène rapporteur GAPDH.

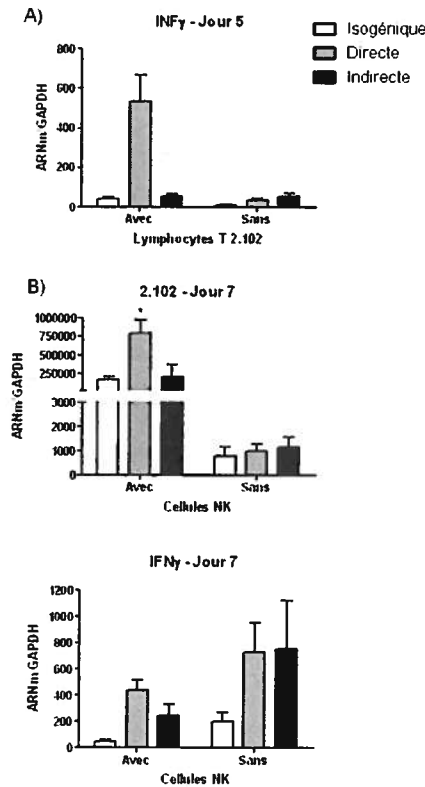


Figure 10. RT-PCR quantitatif illustrant l'expression de l'IFN γ et du transgène 2.102 dans des modèles de transplantation avec ou sans lymphocytes T et/ou cellules NK

A) Des souris TCR α KOK furent reconstituées ou non avec 3×10^6 de LT CD4⁺ de souris 2.102Tg et greffées avec de la peau de queue de souris B6.AKR (témoin isogénique), B10.P (voie directe) ou B6(mHEL-Hb) (voie indirecte). B) Des souris TCR α KOK subirent ou non une déplétion en cellules NK par l'injection intraveineuse de 1 mg de l'anticorps PK136 (anti-NK1.1). Au jour 7 suivant la déplétion, les souris furent reconstituées avec 3×10^6 de LT CD4⁺ de souris 2.102Tg et greffées avec de la peau de queue de souris B6.AKR (témoin isogénique), B10.P (voie directe) ou B6(mHEL-Hb) (voie indirecte). Aux jours 5 ou 7 suivant la transplantation, les greffons furent recueillis (n = 3 ou 4) et broyés pour procéder à une extraction d'ARN suivie d'une transcription inverse. Des RT-PCR quantitatifs utilisant des amorces spécifiques pour l'IFN γ et le transgène 2.102 furent réalisés pour déterminer l'expression des gènes. Le niveau d'expression des gènes est relatif au niveau d'expression normalement observé dans la peau des souris TCR α KOK et calibré avec le gène rapporteur GAPDH.

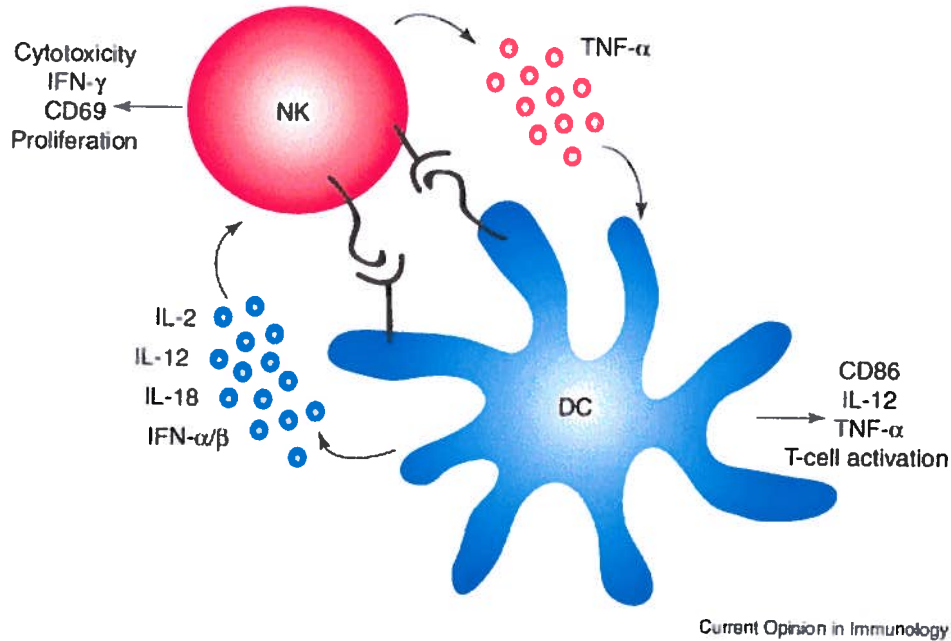


Figure 11. Échange entre les cellules NK et les cellules dendritiques (Hamerman, Ogasawara et Lanier, 2005)

Les cellules NK et les DC possèdent l'habileté de pouvoir s'activer de façon réciproque l'une l'autre, *in vitro* et *in vivo*. Cet échange inclus un contact cellulaire impliquant des récepteurs-ligands inconnus et des médiateurs solubles produits par les deux cellules. Les cytokines TNF α , IL-2, IL-12, IL-18 et IFNs sont toutes impliquées dans ce processus. La finalité de ces interactions est l'activation de la cytotoxicité, la production d'IFN γ et la prolifération des cellules NK, ainsi que la maturation des DC qui produisent des cytokines et sont plus aptes à l'activation des LT.