

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Modulation du rejet de greffe par des peptides antagonistes

Par
Suzie Larocque

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Examineur interne et Présidente du Jury	Pascale Duplay, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Réjean Lapointe, Université de Montréal
Directeur de recherche	Claude Daniel, INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Notre laboratoire a mis au point un modèle d'étude du rejet de greffe basé sur l'utilisation de souris transgéniques pour un récepteur de cellule T dérivé d'un clone CD4⁺ (2.102). Le clone de cellule T 2.102 est spécifique pour l'épitope de la chaîne β de l'hémoglobine de souris, Hb(64-76), présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^k, et est également alloréactif contre la molécule du CMH II I-E^P. Une étude antérieure a démontré que des peptides antagonistes pour le clone de cellules T 2.102 pouvaient inhiber l'alloréactivité de celui-ci. Plus important encore, ces peptides antagonistes pouvaient inhiber l'alloréactivité de lignées Th1 et Th2, de même que celle de cellules T 2.102 naïves dérivées de souris transgéniques. Nous désirons maintenant étudier le potentiel de ces peptides antagonistes à moduler *in vivo* le rejet de greffe dans le modèle de souris transgéniques 2.102. Cependant, avant d'effectuer les tests *in vivo*, différents tests antagonismes devaient être effectués *in vitro*. Plus spécifiquement, l'approche qui a été choisie est d'utiliser comme agent thérapeutique des cellules dendritiques immatures exprimant de façon constitutive les complexes CMH/peptides antagonistes. Les objectifs étaient de générer et cloner les séquences nucléotidiques des différents peptides antagonistes et témoins dans un vecteur d'expression adénovirus, de mettre en culture les cellules dendritiques, d'effectuer des essais d'antagonismes avec les peptides antagonistes synthétiques et de procéder aux transfections des cellules dendritiques avec les adénovirus recombinants afin de réaliser des essais d'antagonismes *in vitro*.

Ainsi, les cellules dendritiques ont été générées en présence de GM-CSF et d'IL-4 à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris et des tests d'antagonismes ont été effectués avec ces cellules dendritiques. La diminution de l'activation de l'hybridome T 2.102 et également des cellules T 2.102Tg naïves dans les tests d'antagonismes ont démontré la capacité des cellules dendritiques présentant des peptides antagonistes à moduler l'activation de cellules T.

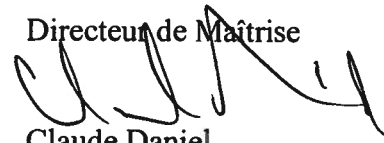
L'efficacité de notre système d'expression des peptides antagonistes en fusion avec la chaîne invariante a été démontré par des transfections transitoires dans les cellules

COS-7. Des adénovirus recombinants exprimant ces peptides en fusion avec la chaîne invariante ont donc été générés. Nous avons démontré en infectant des cellules CHO-E^k, que ces adénovirus recombinants étaient fonctionnels et permettaient l'expression des peptides. Des essais préliminaires d'infections de cellules dendritiques avec les adénovirus recombinants ont également été effectués. Malgré la faible proportion de cellules dendritiques infectées, nous avons démontré la stimulation de cellules T 2.102 par l'agoniste Hb(64-76). L'antagonisme de cellules T 2.102 par les cellules dendritiques infectées avec les adénovirus recombinants n'a pu être démontré et des tests supplémentaires devraient être effectués avant de réaliser les tests *in vivo*.

Étudiante


Suzie Larocque

Directeur de Maîtrise


Claude Daniel

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de maîtrise, le Dr. Claude Daniel, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis de découvrir et d'apprécier le monde de la recherche. Merci également à toutes les filles du laboratoire qui ont permis de rendre ma maîtrise agréable, tant pour les discussions scientifiques que les autres discussions, en particulier les cours de chant. Un merci spécial à Myriam-qui-sait-tout qui répondait sans cesse à toutes mes questions. Merci également au « gars » du laboratoire, Yvon, pour tous les précieux conseils et les bons moments passés dans le laboratoire.

Je voudrais également remercier tous les gens de l'Institut qui ont permis de rendre mon séjour plaisant, soit pour les parties de hockey, de frisbee ou les autres activités sociales quelconques.

Finalement, je tiens à remercier ma famille qui m'a encouragé tout au long de mes études, spécialement mes parents pour tout l'aide que vous m'avez apporté et ma « jumelle » Sylvie.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
1. TRANSPLANTATION	3
2. EFFECTEURS IMPLIQUÉS DANS LE REJET DE GREFFE :CPA ET CELLULES T	4
2.1 Les molécules du CMH de classe I.....	4
2.2 Les molécules du CMH de classe II	5
2.3 Les cellules T	6
3. ALLORÉACTIVITÉ	6
3.1 Alloréactivité directe.....	7
3.2 Alloréactivité indirecte.....	8
4. CELLULES DENDRITIQUES	9
4.1 Cellules dendritiques immatures.....	11
4.2 Cellules dendritiques matures	12
4.3 Cellules dendritiques et transplantation	13
4.4 Culture des cellules dendritiques	17
4.5 Transfection de cellules dendritiques.....	18
5. LIGAND PEPTIDIQUE MODIFIÉ (APL)	19
5.1 Peptides Antagonistes	21
5.2 APLs naturels.....	22
5.3 Utilisation thérapeutique des APLs pour les maladies auto-immunes.....	23
5.4 Peptides antagonistes et transplantation.....	24
6. MODÈLE 2.102	24
APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	28
1. SOURIS	29
2. PEPTIDES	29
3. CELLULES	29
3.1 Lignées cellulaires	29
3.2 Maintien des lignées cellulaires	30
4. CULTURE DES CELLULES DENDRITIQUES	30
4.1 Analyse par cytométrie en flux des cellules dendritiques.....	31
5. GÉNÉRATION DES APLS EN FUSION AVEC LA CHAÎNE INVARIANTE	31
5.1 Mutation par PCR de Hb(64-76)-li pour obtenir les différentes constructions APLs-li.....	31
5.2 Sous-clonage dans le vecteur pcDNA 3.1	33
5.3 Mutations des résidus d’ancrage P1, P4, P6 et P9 de Hb(64-76).....	33
6. TRANSFECTION TRANSITOIRE DANS LES CELLULES COS-7	34
7. PURIFICATION DES CELLULES T NAÏVES 2.102Tg	34

8. TESTS AGONISTES ET ANTAGONISTES	35
8.1 Cellules COS-7 transfectées comme CPA	35
8.2 Cellules dendritiques utilisées comme CPA	35
9. ADÉNOVIRUS	36
9.1 Sous-clonage des constructions APLs-Ii dans le vecteur de transfert	36
9.2 Infections/Transfections des cellules 293ACYMR pour générer les adénovirus recombinants	38
9.3 Plage de lyse	38
9.4 Amplification des adénovirus recombinants.....	39
9.5 Infection des cellules avec les adénovirus recombinants.....	39
RÉSULTATS	42
1. CELLULES DENDRITIQUES	41
1.1 Caractérisation des cellules dendritiques	41
1.2 Inhibition de la réactivité restreinte au soi	43
1.2.1 Inhibition de l'activation de l'hybridome T 2.102.....	43
1.2.2 Inhibition de l'activation des cellules T naïves 2.102.....	50
1.3 Inhibition de l'alloréactivité.....	55
2. EXPRESSION DES APLS EN FUSION AVEC LA CHAÎNE INVARIANTE	58
2.1 Mutation des résidus d'ancrage P1, P4, P6 et P9 de Hb(64-76).....	60
3. GÉNÉRATION DES ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS	64
3.1 Inhibition de l'activation de cellules T 2.102 par des cellules CHO-E ^k infectées avec des adénovirus recombinants.....	67
3.2 Activation de cellules T 2.102 par des cellules dendritiques infectées avec l'adénovirus recombinant Hb(64-76).....	70
DISCUSSION	76
1. CELLULES DENDRITIQUES	75
1.1 Tests antagonistes	76
2. EXPRESSION DES PEPTIDES EN FUSION AVEC LA CHAÎNE INVARIANTE	79
3. ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS	80
3.1 Infection des cellules CHO-E ^k	81
3.2 Infection des cellules dendritiques.....	82
4. TESTS <i>IN VIVO</i>	83
CONCLUSION	86
BIBLIOGRAPHIE	87

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Différentes approches pour générer des cellules dendritiques tolérogéniques.
- Figure 2 :** Double spécificité du clone de cellule T 2.102.
- Figure 3 :** Différents APLs du modèle 2.102.
- Figure 4 :** Carte du vecteur de transfert adénovirus pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp.
- Figure 5 :** Analyse des cellules dendritiques par cytométrie en flux.
- Figure 6 :** Stimulation de la réactivité restreinte au soi de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques.
- Figure 7 :** Stimulation de la réactivité restreinte au soi des cellules T 2.102 naïves par les cellules dendritiques.
- Figure 8 :** Stimulation de l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 et de cellules T 2.102 naïves.
- Figure 9 :** Inhibition de la réactivité restreinte au soi de l'hybridome T 2.102 par des cellules dendritiques.
- Figure 10 :** Antagonisme de la réactivité restreinte au soi de cellules T naïves par des cellules dendritiques.
- Figure 11 :** Inhibition de l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 par des cellules dendritiques.

- Figure 12 :** Analyse par cytométrie en flux de l'expression de I-E^k à la surface des cellules COS-7.
- Figure 13 :** Stimulation et inhibition de l'hybridome T 2.102 par des cellules COS-7 transfectées avec les APLs ou le peptide Hb(64-76).
- Figure 14 :** Analyse par cytométrie en flux de l'expression de I-E^k à la surface des cellules COS-7 transfectées avec Hb(64-76) muté P1, P4, P6 et P9.
- Figure 15 :** Stimulation de l'hybridome T 2.102 par le peptide Hb(64-76) muté aux résidus P1, P4, P6 et P9.
- Figure 16 :** Mécanisme de recombinaison homologue *in vivo* pour générer les adénovirus recombinants.
- Figure 17 :** Stimulation de l'hybridome T 2.102 par les cellules CHO-E^k infectées avec les adénovirus recombinants.
- Figure 18 :** Inhibition de l'hybridome T 2.102 par les cellules CHO-E^k infectées avec les adénovirus recombinants.
- Figure 19 :** Stimulation de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques infectées avec les adénovirus recombinants.
- Figure 20 :** Inhibition de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques infectées avec les adénovirus recombinants.
- Figure 21 :** Modèle de greffe *in vivo*.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C :	degré celsius
2-Me :	2-mercaptoéthanol
ADN :	acide déoxyribonucléique
APL :	<i>altered peptide ligand</i>
BSA :	albumine sérique bovine
CCL :	ligand d'une chemokine C-C
CCR :	récepteur d'une chemokine C-C
CD :	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L :	CD40 ligand
Ci :	Curie
cm :	centimètre
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
CPM :	compte par minutes
EAE :	encéphalite autoimmune expérimentale
EDTA:	éthylène diamine tétraacétate
FcR :	récepteur Fc
FITC:	fluorescéine isothiocyanate
g:	force gravitationnelle
g:	gramme
GFP:	<i>green fluorescence protein</i>
GM-CSF:	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HEL:	lysozyme du poulet
HEPES :	hydroxyethylpiperazine-N-2'-ethane-sulfonic acide
HLA :	<i>human leucocyte antigens</i>
IFN :	interféron
Ii :	chaîne invariante
IL :	interleukine
l :	litre
LB :	Luria-Bertani
LPS:	lipopolysaccharides
M:	molaire
MBP :	protéine basique de la myéline
Min:	minutes
m:	milli
NF-κB :	facteur nucléaire κB
NTP:	nucléotides triphosphate
p/v :	poids/volume
PBS :	tampon phosphate salin
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
PE :	phyco-erythrine
PEI:	polyéthylèneimine
PFU:	<i>plaque forming units</i>

pmol:	picomoles
rpm:	révolution par minutes
s:	seconde
SA:	streptavidine
SBV :	sérum bovin de veau
SVF :	sérum de veau foetal
TCR :	récepteur des cellules T
TGF-β:	<i>transforming growth factor</i>
TNF-α :	<i>tumor necrosis factor</i>
TNF-R :	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
V :	volume

INTRODUCTION

Un objectif important en immunologie de la transplantation est d'arriver à inhiber spécifiquement les cellules T autoréactives sans inhiber complètement tout le système immunitaire, et ceci afin d'éviter tous les effets néfastes des agents immunosuppresseurs. Nous avons développé un modèle murin d'étude du rejet de greffe. Ce modèle est basé sur une cellule T CD4⁺, nommé 2.102, spécifique pour les acides aminés 64 à 76 de l'hémoglobine présenté par la molécule du CMH II I-E^k. De plus, cette cellule T est alloréactive contre la molécule du CMH II I-E^p. Nous avons voulu vérifier la capacité des peptides antagonistes à moduler le rejet de greffes *in vivo* dans le modèle murin de greffe de peau 2.102. Nous avons décidé d'utiliser des cellules dendritiques exprimant constitutivement des peptides antagonistes pour inhiber la réponse des cellules T.

Le but du projet était de vérifier la capacité des cellules dendritiques à présenter des peptides antagonistes *in vitro* et à inhiber la stimulation des cellules T. Les cellules dendritiques utilisées ont été différenciées à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris. Comme ces cellules dendritiques devaient exprimer constitutivement les peptides antagonistes, elles ont été infectées avec des adénovirus recombinants exprimant les peptides antagonistes. Les peptides antagonistes ont été exprimés en fusion avec la chaîne invariante dans le but de maximiser l'expression à la surface des peptides.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. TRANSPLANTATION

Pour plusieurs personnes, le recours à une greffe constitue le seul traitement efficace pour traiter diverses pathologies rénales, cardiaques, pulmonaires et hépatiques. En 2003, au Québec, 488 patients ont été greffés et 860 patients étaient inscrits sur les listes d'attentes. Les premières greffes d'organes vascularisés ont eu lieu dans les années 1950 et, à ce moment, le taux de survie des greffes était très court. Cependant, depuis l'arrivée de la cyclosporine A, dans les années 1980, le taux de survie du greffon à court terme a considérablement augmenté, mais à long terme, la survie de la greffe n'a pas beaucoup augmenté, même avec la prise d'immunosuppresseurs (Opelz, 1992; Pascual *et al.*, 1998). Pour prolonger la survie de la greffe, plusieurs catégories d'immunosuppresseurs ont été développées (Denton *et al.*, 1999). Ces immunosuppresseurs vont inhiber différentes voies du système immunitaire et certains plus spécifiquement que d'autres. Ainsi, il existe des anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-lymphocytes qui empêchent les cellules T d'exercer leurs fonctions. Selon les anticorps utilisés, certains inhibent tous les lymphocytes, par exemple un anti-CD3, ou seulement les lymphocytes T activés, tel un anti-récepteur de l'IL-2 (CD25). Les corticostéroïdes sont des anti-inflammatoires non spécifiques qui sont également utilisés. Les inhibiteurs de la calcineurine, dont la cyclosporine, empêchent la transcription du gène de l'IL-2, donc la production de cette cytokine qui est très importante dans l'induction d'une réponse immunitaire. D'autres immunosuppresseurs, beaucoup moins spécifiques, sont des agents qui vont empêcher la prolifération des cellules, mais de toutes les cellules et non seulement des cellules T. Il existe également plusieurs nouveaux immunosuppresseurs, dont plusieurs sont rendus aux essais cliniques, qui tentent d'inhiber de nouvelles voies dans la réponse immunitaire. Parmi ces immunosuppresseurs, certains empêchent la liaison TCR-CMH (CD4), la costimulation par les cellules T (CTLA4-Ig, CD154), l'adhésion des cellules T (LFA1, ICAM-1) ou l'interaction des molécules accessoires (CD2, CD45, LFA3). Tous ces médicaments tentent d'inhiber la réponse immunitaire dirigée contre le greffon. Cependant, le problème majeur avec tous ces immunosuppresseurs demeure la diminution générale non spécifique du système immunitaire. Les patients prenant des immunosuppresseurs sur une longue

période sont plus vulnérables aux infections virales opportunistes et au développement de tumeurs (Hojo *et al.*, 1999). De plus, beaucoup d'immunosuppresseurs entraînent une toxicité pour certains tissus dont les reins, le foie, le pancréas et le système nerveux (Dantal *et al.*, 1998; Sayegh *et al.*, 1998). Ainsi, l'étude des mécanismes entraînant le rejet de greffe et le développement de médicaments qui ciblent spécifiquement les cellules T alloréactives sont très importants.

2. EFFECTEURS IMPLIQUÉS DANS LE REJET DE GREFFE :CPA ET CELLULES T

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), surtout les cellules dendritiques, jouent un rôle crucial dans le rejet de greffe. Les CPA sont des cellules spécialisées dans la capture d'antigènes, la dégradation et la présentation de ces peptides en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les CPA, grâce à leur grande expression de molécules de costimulation et de molécules du CMH activent les cellules T pour induire une réponse immunitaire. Les CPA du receveur et surtout du donneur contribuent à initier le rejet de greffe. Suite à la greffe, les CPA du donneur migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles activent les cellules T alloréactives et initient le rejet de greffe. Les CPA du receveur captent des alloantigènes du greffon, les dégradent et les présentent aux cellules T en association avec les molécules du CMH. L'état d'activation de la CPA, soit la présence ou non de molécules de costimulation, semble être un facteur important pour certains types de greffes. Ainsi, le blocage des molécules de costimulation CD80 et CD86 induit une survie prolongée d'une greffe de cœur, mais pas d'une greffe de peau (Pearson *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1998; Szot *et al.*, 2000). Les CPA sont donc des cellules spécialisées dans l'activation des cellules T par la présentation de peptides en association avec des molécules du CMH à leur surface et l'expression de molécules de costimulation.

2.1 Les molécules du CMH de classe I

Les molécules du CMH sont hautement polymorphiques et sont divisés en 2 grandes classes, les molécules du CMH de classe I et de classe II. Les molécules du CMH

sont responsables de la présentation des peptides endogènes et exogènes de la cellule. Ils jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire puisqu'ils permettent l'activation spécifique des cellules T. Les molécules du CMH de classe I sont codées par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C chez l'humain et H-2K, H-2D et H-2L chez la souris. Les molécules de CMH de classe I sont des hétérodimères composés de deux chaînes, soit une chaîne lourde, α , et une chaîne légère, la β_2 -microglobuline. Les molécules du CMH I sont exprimés à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme et présentent des peptides endogènes dégradés par la cellule aux cellules T CD8⁺. Ces peptides proviennent de protéines du soi dégradées par la cellule ou de protéines bactériennes ou virales si la cellule est infectée. Ainsi, la reconnaissance des complexes CMH I/peptides par les cellules T CD8⁺ est importante pour la surveillance immunitaire contre les infections virales, bactériennes et contre le développement de tumeurs.

2.2 Les molécules du CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II sont codées par les gènes HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ chez l'humain et I-E et I-A chez la souris. Ils sont également des hétérodimères composés de deux chaînes, une chaîne α et une chaîne β . Contrairement aux molécules du CMH de classe I, les molécules du CMH de classe II sont exprimées seulement sur les CPA professionnelles, c'est-à-dire les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les monocytes-macrophages. Cependant, les cellules épithéliales et endothéliales peuvent également exprimer des molécules du CMH II en présence de cytokines inflammatoires (Nickoloff *et al.*, 1994; Lohse *et al.*, 1996). Les molécules du CMH II présentent des peptides exogènes captés et dégradés par la cellule. Les peptides présentés peuvent provenir de pathogènes ou de produits de pathogènes qui lorsque reconnu par les cellules T CD4⁺ déclenchent une réponse immunitaire spécifique contre cet antigène. Lors de situation inflammatoire où il y a sécrétions de cytokines, notamment l'interféron γ , il y a augmentation de l'expression des molécules du CMH II à la surface des cellules permettant ainsi une plus grande présentation de peptides.

2.3 Les cellules T

Même si beaucoup de cellules sont impliquées dans le rejet de greffes, les cellules T sont les seules cellules absolument requises et cela même si on retrouve des cellules NK, des macrophages, des cellules B, des neutrophiles et des éosinophiles infiltrés dans le greffon (Ascher *et al.*, 1984; Krensky *et al.*, 1990). Les lymphocytes T sont des cellules spécialisées dans la réponse immunitaire acquise qui possèdent un récepteur (TCR) spécifique pour quelques peptides. Le TCR doit absolument reconnaître un peptide présenté par une CPA en association avec une molécule du CMH. Il existe deux types de lymphocytes T selon les chaînes qui composent le TCR, soit $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ représentent la majorité des cellules T et sont divisés en 2 classes selon le corécepteur présent, les $CD4^+$ et les $CD8^+$. Les cellules T $CD4^+$ auxiliaires interagissent avec les molécules du CMH II et produisent des cytokines pour activer les cellules T $CD8^+$ cytotoxiques et les autres cellules du système immunitaire. Les cellules T $CD8^+$ exercent leurs effets cytotoxiques en sécrétant des perforines et des granzymes qui entraînent la lyse de la cellule. Les cellules T $CD8^+$ peuvent également entraîner l'apoptose de la cellule, car elles expriment CD95L (Fas Ligand) à leur surface (Zavazava *et al.*, 2000). Le rôle des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans le rejet de greffe semblent varier selon les tissus. Ainsi, les cellules T $CD4^+$ seules sont capables d'entraîner le rejet de greffes de peau et de cœur, mais les cellules T $CD8^+$ sont nécessaires pour entraîner le rejet d'îlots pancréatiques (Rosenberg *et al.*, 1987; Wolf *et al.*, 1995). Donc, les cellules T $CD4^+$ sont requises pour initier le rejet de greffes, quoique certaines études suggèrent que les cellules T $CD8^+$ peuvent également déclencher le rejet (Auchincloss *et al.*, 1993; Newell *et al.*, 1997).

3. ALLORÉACTIVITÉ

L'alloréactivité est défini par la reconnaissance par les cellules T de régions polymorphiques codées génétiquement entre individu membre de la même espèce

(Rogers *et al.*, 2001). Les principales cibles sont les molécules du CMH présents à la surface des cellules du donneur. Cependant, d'autres cibles nommées antigènes mineurs d'histocompatibilité peuvent entraîner un rejet de greffe. Ces antigènes sont dérivés de protéines du soi venant de régions polymorphiques autres que les molécules du CMH. Il existe deux voies d'alloréactivité, la voie directe et la voie indirecte (Lechler *et al.*, 1982). La voie directe implique une reconnaissance par les cellules T alloréactives du receveur des molécules du CMH intactes à la surface des CPA du donneur. Cette voie serait responsable de l'initiation du rejet de greffe et plus particulièrement, du rejet de greffe aigu (Wecker *et al.*, 1992; Bradley, 1996). La voie indirecte implique la reconnaissance par les cellules T du receveur des antigènes du non soi pris en charge par les CPA du receveur et présentés à la surface par les molécules du CMH. La voie indirecte serait plutôt responsable du rejet de greffe chronique (Vella *et al.*, 1997; Waaga *et al.*, 1998; Ardehali *et al.*, 2002). Le rejet de greffe aigu est une réaction inflammatoire contre l'organe et survient dans les semaines suivant la greffe. Ce type de rejet est caractérisé par une infiltration de cellules, notamment les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Quant au rejet de greffe chronique, il survient des mois et des années après la greffe et résulte en une détérioration progressive du greffon, surtout caractérisé par une artériosclérose et une fibrose, sans infiltration importante de cellules. Ainsi, le rejet de greffe chronique implique peu la réponse inflammatoire.

3.1 Alloréactivité directe

La voie directe d'alloréactivité implique la reconnaissance par une cellule T d'un complexe peptide CMH du non soi. Cette voie est unique à la transplantation et il a été démontré que la voie directe était responsable de l'initiation du rejet de greffe. La fréquence de cellules T alloréactives dans la voie directe se situe entre 1 à 10% des cellules T totales. Cette fréquence est élevée en comparaison des fréquences de précurseurs impliqués dans des réponses spécifiques contre des pathogènes. Lors de leur maturation, les cellules T sont soumises à la sélection positive et négative afin d'obtenir un répertoire de cellules T interagissant spécifiquement avec les molécules du CMH du soi. Ainsi, deux hypothèses ont été émises pour expliquer la fréquence élevée de cellules

T alloréactives, c'est-à-dire des cellules T interagissant avec les molécules du CMH du non soi (Rogers *et al.*, 2001). La première, le modèle de la haute densité des déterminants, propose que les cellules T reconnaissent les régions polymorphiques des molécules du CMH peu importe le peptide lié à la molécule (Bevan, 1984). Ainsi, toutes les molécules du CMH sur une même CPA seraient des ligands potentiels. Cette très forte densité de ligands permettrait d'activer une variété de clones de cellules T ayant une affinité moindre. L'autre hypothèse, le modèle de complexes binaires, propose que le peptide joue un rôle important (Matzinger *et al.*, 1977). Comme les molécules du CMH peuvent présenter plusieurs peptides différents, une grande variété de cellules T pourraient être activées. Cependant, il ne semble pas y avoir d'exclusion mutuelle entre les deux modèles et les deux contribueraient à expliquer la grande proportion de cellules T alloréactives (Bradley, 1996).

Les cellules dendritiques interstitielles du greffon seraient le principal stimulus du rejet par la voie directe, étant donné la forte expression de molécules de costimulation et de molécules du CMH II (Setum *et al.*, 1990; Krasinskas *et al.*, 2000). Ainsi, il a été démontré que les cellules de Langerhans migrent rapidement du greffon vers les organes lymphoïdes secondaires lors de greffe de peau (Larsen *et al.*, 1990; Richters *et al.*, 1999). De plus, il a été démontré que la destruction des CPA de l'organe avant la greffe permettait d'augmenter la durée de survie du greffon. La voie d'alloréactivité directe a de l'importance dans les jours suivants la greffe étant donné la présence de CPA du donneur pouvant migrer dans les organes lymphoïdes secondaires. Ensuite, lorsque toutes les CPA du donneur ont été éliminées et remplacées par des CPA du receveur, cette voie aurait moins d'implication dans le rejet de greffe.

3.2 Alloréactivité indirecte

La voie d'alloréactivité directe a longtemps été considérée comme la seule voie responsable du rejet de greffe. Cependant, la voie indirecte joue également un rôle primordial puisqu'elle serait responsable du rejet de greffe chronique. Théoriquement, c'est la seule voie qui persisterait avec le temps, puisque les CPA du donneur sont

remplacées par les CPA du receveur dans le greffon, empêchant la reconnaissance par la voie directe. Cette voie représente la voie classique de présentation des antigènes, où une cellule T reconnaît un peptide lié à une molécule du CMH du soi qui a été capté et dégradé par la CPA. Les cellules T intervenant dans la voie indirecte vont réagir spécifiquement contre quelques déterminants immunodominants (Benichou *et al.*, 1994). Le nombre de cellules T intervenant dans cette voie serait 100 fois moindre que dans la voie directe (Liu *et al.*, 1993).

4. CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices par excellence de l'organisme. Elles sont distribuées dans tous les tissus de l'organisme et jouent un rôle primordial dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Il a été démontré que les cellules dendritiques s'accumulent rapidement aux sites inflammatoires en réponse aux cytokines sécrétées (Banchereau *et al.*, 2000). De plus, outre leur rôle dans le déclenchement d'une réponse immunitaire, les cellules dendritiques sont responsables de maintenir la tolérance périphérique aux antigènes du soi (Coates *et al.*, 2002; Morelli *et al.*, 2003). Chez la souris, comme chez l'humain, on retrouve plusieurs types de cellules dendritiques qui auraient tous un rôle différent à jouer dans l'induction de la réponse immunitaire ou le maintien de la tolérance périphérique (Banchereau *et al.*, 2000; Coates *et al.*, 2002; Shortman *et al.*, 2002; Ardavin, 2003; Morelli *et al.*, 2003). Cependant, les types de cellules dendritiques et leurs rôles exacts dans le système immunitaire demeure ambigu. Tout d'abord, on pourrait distinguer 2 grandes classes de cellules dendritiques selon leur origine myéloïde ou lymphoïde. En général, les cellules dendritiques myéloïdes expriment les marqueurs CD11b et CD11c et n'expriment pas le CD8. Quant aux cellules dendritiques lymphoïdes, elles expriment le CD11c et le CD8, mais n'expriment pas CD11b. Cependant, il a été démontré que des progéniteurs communs myéloïdes et lymphoïdes peuvent se différencier en cellules dendritiques CD8⁻ et CD8⁺ (Traver *et al.*, 2000). Ainsi, la classification des cellules dendritiques myéloïdes et lymphoïdes par le marqueur CD8 ne semble pas être adéquate et les cellules CD8⁺ et CD8⁻ pourraient provenir de deux voies de différenciation distinctes. Les cellules

dendritiques CD8⁻ peuvent également être séparées en 2 autres groupes, soit les CD8⁻CD4⁻ et les CD8⁻CD4⁺, quoique la classification selon l'expression du CD4 par les cellules dendritiques demeure controversée. Les cellules dendritiques CD8⁻CD4⁻ et CD8⁻CD4⁺ pourraient être des types de cellules différentes ou bien représenter les mêmes cellules dendritiques ayant un niveau de différenciation ou d'activation différent (Martin *et al.*, 2000; Kamath *et al.*, 2002). Il semblerait que chaque type de cellules dendritiques auraient des fonctions différentes, certaines seraient responsables de la tolérance et d'autres seraient de puissantes CPA immunostimulatrices. Ainsi, les cellules dendritiques CD8⁺ seraient de moins bonnes cellules stimulatrices des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ comparativement aux cellules CD8⁻ ce qui suggèrent un rôle dans la tolérance périphérique (Coates *et al.*, 2002). Les cellules CD8⁺CD11b⁻ entraîneraient la sécrétion de cytokines Th1 tandis que les cellules CD8⁻CD11b⁺ stimuleraient une réponse Th2 (Maldonado-Lopez *et al.*, 1999). Il a été démontré que les cellules dendritiques CD8⁺ étaient plus efficaces pour effectuer de la présentation croisée avec les molécules du CMH I tandis que les cellules dendritiques CD8⁻ étaient plus efficaces pour la présentation restreint aux molécules du CMH II (Den Haan *et al.*, 2000).

De plus, il existe des cellules dendritiques retrouvées spécifiquement dans la peau, les cellules de Langerhans (Romani *et al.*, 2003). Ces cellules expriment le CD11b et un haut niveau de Langerin. Puisqu'elles sont CD11b⁺CD8⁻, les cellules de Langerhans seraient d'origine myéloïde. Cependant, comme les cellules de Langerhans peuvent exprimer le CD8 suite à leur maturation, une origine lymphoïde a été proposée (Anjuere *et al.*, 2000). Cependant, il a été démontré que des souris n'exprimant pas le gène Ikaros, ne possèdent pas de cellules dendritiques lymphoïdes, mais possèdent des cellules de Langerhans (Wu *et al.*, 1997). Les données convergent donc vers une origine myéloïde des cellules de Langerhans. Les cellules de Langerhans seraient impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire par la capture d'antigènes, puis la migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Elles joueraient également un rôle tolérogénique en présentant des antigènes en absence d'inflammation.

Finalement, un type de cellules dendritiques exprimant le marqueur B220 a été caractérisé, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Nakano, H. *et al.*, 2001; Hochrein *et al.*, 2002). Ces cellules sont surtout caractérisées par leur potentiel à produire une grande quantité d'IFN- α suite à l'infection d'un virus. Ces cellules seraient également impliquées dans le maintien de la tolérance en induisant la différenciation de cellules T régulatrices (Martin *et al.*, 2002). Plusieurs autres types de cellules dendritiques sont également retrouvées chez la souris. Par exemple, certaines cellules dendritiques exprimant des niveaux intermédiaires de CD8 sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques (Ardavin, 2003). Cependant, ces cellules dendritiques ne représentent peut-être pas un type de cellules dendritiques spécifiques, mais des cellules dendritiques situées en périphérie ayant migrées dans les ganglions lymphatiques et ayant modulées l'expression de certains marqueurs. Donc, le rôle de chaque type de cellules n'est pas encore très bien défini et l'état, immature ou mature des cellules dendritiques, pourrait être responsable de la tolérance ou de la stimulation du système immunitaire plutôt que le type de cellules dendritiques. Beaucoup de recherches reste à faire pour bien distinguer les types de cellules dendritiques et leurs rôles exacts dans l'induction de la réponse immunitaire et le maintien de la tolérance périphérique.

4.1 Cellules dendritiques immatures

Les cellules dendritiques sont retrouvées sous deux états, immatures et matures. Les cellules dendritiques immatures sont localisées principalement dans les tissus périphériques et possèdent une grande capacité de phagocytose afin de capter tous les antigènes du milieu. Elles captent des antigènes par 3 voies différentes, soit par phagocytose, par macropinocytose ou par endocytose avec des récepteurs spécifiques (Banchereau *et al.*, 1998). Les cellules dendritiques immatures sont caractérisées par une faible expression de molécules du CMH II à leur surface, mais à un niveau plus élevé que les cellules B ou les macrophages, ainsi qu'une faible expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86. Elles possèdent une grande proportion de vésicule MIIC contenant des molécules du CMH II prêt à être exprimées à la surface de la cellule. Même si elles sont localisées principalement dans les tissus périphériques, il a été

démontré qu'il y avait continuellement un flux basal de migration des cellules dendritiques immatures vers les organes lymphoïdes secondaires (Hirao *et al.*, 2000). Les cellules dendritiques immatures ont un rôle important à jouer dans le maintien de la tolérance périphérique. Cette fonction s'exercerait par la phagocytose de corps apoptotiques dans les tissus sains. Ainsi, les cellules dendritiques immatures présentant des antigènes du soi provenant des corps apoptotiques aux cellules T dans les ganglions lymphatiques pourraient induire une tolérance au soi (Huang, F. P. *et al.*, 2000; Coates *et al.*, 2002).

4.2 Cellules dendritiques matures

Les cellules dendritiques immatures deviennent des cellules dendritiques matures suite au relargage de médiateur local dans leur environnement et la capture d'antigènes. Elles sont localisées surtout au niveau des zones riches en cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent des antigènes captés en périphérie. La fonction première des cellules dendritiques matures seraient de présenter les rares antigènes présents en périphérie aux cellules T naïves dans les organes lymphoïdes (Dieu-Nosjean *et al.*, 1999). Les cellules dendritiques immatures deviennent matures suite à la liaison de certaines molécules à des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules dendritiques. Parmi ces récepteurs qui entraînent la maturation des cellules dendritiques, notons les *Toll-like receptors* qui reconnaissent des molécules reliées aux pathogènes comme le LPS, les motifs CpG et l'ARN double brin; les récepteurs des cytokines comme le TNF- α , IL-1 β , IFN- α , GM-CSF et le PGE-2; les récepteurs de la famille des TNF-receptor (TNF-R); les récepteurs FcR et les récepteurs de mort cellulaire (Guermontprez *et al.*, 2002). Les cellules dendritiques matures régulent à la baisse certains récepteurs de chimiokines, dont CCR5 et CCR6 et régulent à la hausse d'autres récepteurs dont CCR7 (Dieu *et al.*, 1998; Yanagihara *et al.*, 1998; Dieu-Nosjean *et al.*, 1999). Cette modulation entraîne une insensibilité aux chimiokines présents aux sites inflammatoires, surtout CCL20, et une réponse aux chimiokines présents dans les organes lymphoïdes secondaires et les vaisseaux lymphatiques, tel CCL19 et CCL21, entraînant la migration des cellules dendritiques matures vers les organes lymphoïdes secondaires. Il a été

démontré que la migration des cellules dendritiques de la périphérie aux organes lymphoïdes secondaires est régulée par l'interaction CD40-CD40L. Ainsi, les cellules de Langerhans de souris déficientes pour CD40L ne peuvent pas migrer de la peau vers les organes lymphoïdes (Moodycliffe *et al.*, 2000). Les cellules dendritiques matures perdent leur grande capacité de phagocytose, réorganisent leurs cytosquelettes et acquièrent une grande motilité (Winzler *et al.*, 1997). Elles expriment fortement des molécules de costimulation CD40, CD80, CD86 et des molécules du CMH de classe II rendant les cellules dendritiques matures de très bonnes cellules activatrices des cellules T naïves CD4⁺ et CD8⁺. Une seule cellule dendritique peut activer entre 100 et 3000 cellules T. Par conséquent, les cellules dendritiques matures sont les déclencheurs de la réponse immunitaire (Banchereau *et al.*, 1998).

4.3 Cellules dendritiques et transplantation

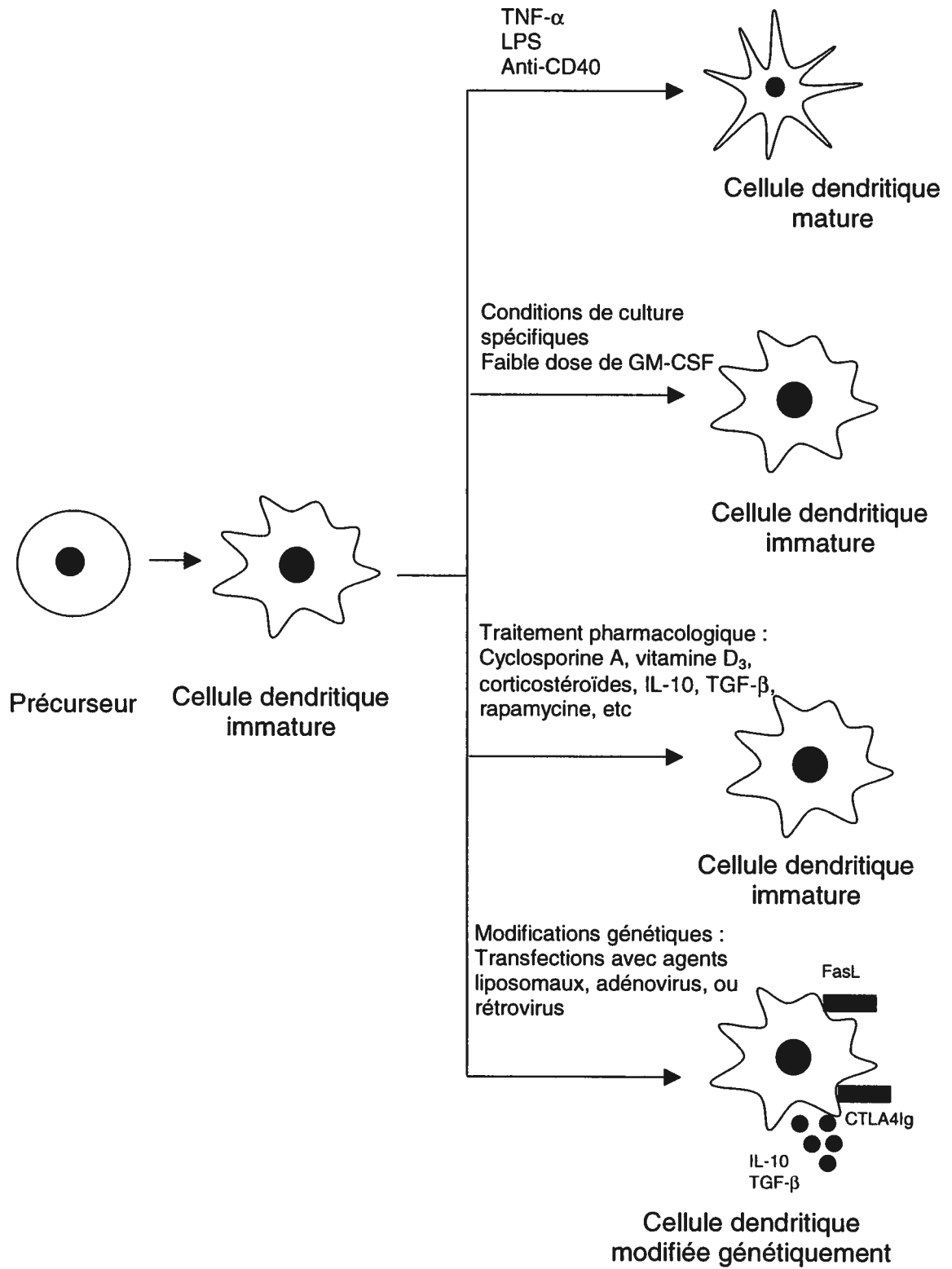
Les cellules dendritiques jouent un rôle important lors du rejet de greffe. Les cellules dendritiques du donneur sont responsables du rejet de greffe par la voie directe tandis que les cellules dendritiques du receveur sont impliquées dans la voie indirecte. Par conséquent, les cellules dendritiques sont des cibles de choix pour de nouvelles thérapies en transplantation. L'injection de cellules dendritiques tolérogéniques avant la greffe pourrait augmenter la survie du greffon en induisant l'apoptose ou l'anergie des cellules T spécifiques à l'antigène ou en générant des cellules T régulatrices (Jonuleit *et al.*, 2000). Pour obtenir des cellules dendritiques tolérogéniques, donc immatures, plusieurs méthodes peuvent être employées (figure 1). Tout d'abord, certaines méthodes de culture permettent de générer des cellules dendritiques immatures résistantes à la maturation par le TNF- α , le LPS ou un anti-CD40. L'injection de ces cellules dendritiques immatures du donneur avant la greffe pourraient promouvoir la survie de la greffe et induire la tolérance (Rastellini *et al.*, 1995; Fu *et al.*, 1996). Il a été démontré que des cellules dendritiques cultivées avec de faible quantité de GM-CSF étaient résistantes à la maturation et que ces cellules injectées à une souris 7 jours avant la greffe prolongent indéfiniment la greffe (Lutz *et al.*, 2000). De même, plusieurs équipes ont démontré que différents types de cellules dendritiques du donneur injectées avant la greffe étaient capables d'augmenter la

survie de la greffe. Ceci a été démontré avec des cellules dendritiques provenant de la rate et cultivées toute la nuit (Peugh *et al.*, 1987), avec des cellules dendritiques myéloïdes générées à partir de la moelle osseuse (Rastellini *et al.*, 1995; Fu *et al.*, 1996), avec des cellules dendritiques plasmacytoïdes B220⁺ générées à partir du foie (Lu *et al.*, 2001) et également avec des cellules dendritiques immatures et matures CD8⁺ isolées de la rate (O'connell *et al.*, 2002).

Ensuite, tous les composés pharmacologiques qui empêchent la maturation des cellules dendritiques peuvent être utilisés afin d'obtenir des cellules dendritiques immatures. Il a été démontré que la maturation des cellules dendritiques était dépendante de la translocation nucléaire de NF- κ B (Morelli *et al.*, 2000). Par conséquent, tous les composés agissant spécifiquement sur la translocation de NF- κ B pourraient augmenter les chances de survie du greffon. Il a été démontré que de courts oligodéoxynucléotides possédant des séquences consensus se liant à NF- κ B inhibait l'expression de molécules de costimulation à la surface des cellules dendritiques. L'injection 7 jours avant la greffe de cellules dendritiques du donneur traitées avec ces courts oligodéoxynucléotides prolonge la survie de greffe de cœur chez la souris (Giannoukakis *et al.*, 2000). Plusieurs autres immunosuppresseurs exercent leurs effets en empêchant la translocation nucléaire de membres de la famille des facteurs de transcription de NF- κ B, inhibant la maturation des cellules dendritiques (figure1).

Finalement, l'utilisation de cellules dendritiques génétiquement modifiées pour exprimer différentes molécules inhibitrices a aussi permis de prolonger certaines greffes (Takayama *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1999a; Lu *et al.*, 1999b; Matsue *et al.*, 2001). Parmi ces molécules inhibitrices ayant été utilisées, notons l'IL-10 qui module à la baisse l'expression des molécules du CMH II et des molécules de costimulation CD40, CD80, CD86 et inhibe la production de cytokine pro-inflammatoire comme IL-12; CTLA4Ig qui est un homologue du récepteur CD28, donc inhibe l'activation des cellules T en empêchant la liaison B7-CD28; FasL qui entraîne l'apoptose des cellules T spécifiques de cet antigène; TGF- β qui est une puissante cytokine immunosuppressive qui désactive les

Figure 1. Différentes approches pour générer des cellules dendritiques tolérogéniques.



Adaptée de Morelli et Thomsom, 2003

macrophages, inhibe la prolifération des cellules B et T et inhibe la présentation d'alloantigènes par les CPA, incluant les cellules dendritiques. Toutes ces stratégies pour obtenir des cellules dendritiques tolérogéniques n'ont qu'un but, augmenter la survie de la greffe.

4.4 Culture des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire. Cependant, comme elles sont peu nombreuses et dispersées dans tout l'organisme, plusieurs techniques ont été mises au point pour cultiver et isoler *in vitro* des cellules dendritiques afin de mieux comprendre le rôle de ces cellules *in vivo* et de développer des thérapies avec les cellules dendritiques. Il est possible d'obtenir de grandes quantités de cellules dendritiques à partir de la moelle osseuse de souris (Inaba *et al.*, 1992a; Yamaguchi *et al.*, 1997; Lutz *et al.*, 1999). Ainsi, en ajoutant du GM-CSF et de l'IL-4 aux cellules de la moelle osseuse pendant une période de 6-10 jours, il est possible de différencier les précurseurs en cellules dendritiques immatures. L'ajout de LPS, de TNF- α ou d'anticorps anti-CD40 dans les dernières heures permet d'obtenir une population de cellules dendritiques matures. Il est également possible d'isoler des cellules dendritiques de presque tous les tissus, mais en quantité moindre que la différenciation à partir de précurseur de la moelle osseuse (Inaba *et al.*, 1992 b; Lu *et al.*, 1994). De plus, l'injection de certains composés permet d'augmenter le nombre de cellules dendritiques dans l'organisme. Il a été démontré que Flt3 ligand (Flt3-L) et le GM-CSF augmentent la quantité de cellules dendritiques chez la souris. Plus spécifiquement, l'injection de Flt3-L augmente la quantité de cellules dendritiques lymphoïdes et myéloïdes tandis que le GM-CSF augmente plutôt la population de cellules dendritiques myéloïdes (Maraskovsky *et al.*, 1996; Pulendran *et al.*, 1997; Pulendran *et al.*, 1999). Toutes ces méthodes de culture et d'isolement permettent de mieux caractériser les populations de cellules dendritiques et de mieux comprendre peu à peu la fonction de chaque type de cellules dendritiques.

4.5 Transfection de cellules dendritiques

Étant donné leur grand potentiel stimulateur et leur propriété tolérogénique, les cellules dendritiques semblent être de bons outils thérapeutiques. Ainsi, différentes méthodes ont été mis au point pour modifier génétiquement des cellules dendritiques afin d'exprimer une protéine d'intérêt pour, entre autres, générer des cellules dendritiques tolérogéniques utiles en transplantation. Les différents agents liposomaux ne sont pas très efficaces pour transférer les cellules dendritiques puisque seulement 10-20 %, au plus 50% des cellules dendritiques vont acquérir le plasmide d'intérêt (Yang, S. *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2000; Rughetti *et al.*, 2000). Ainsi, plusieurs équipes ont eu recours à différents types de virus, plus spécifiquement les rétrovirus ou les adénovirus, pour transférer des cellules dendritiques. L'utilisation de rétrovirus, mais surtout d'adénovirus a donné de meilleurs résultats (Aicher *et al.*, 1997; Specht *et al.*, 1997). En infectant avec un adénovirus recombinant à une MOI entre 50 et 100, il est possible d'obtenir plus de 80% de cellules transfectées. Cependant, le problème majeur avec l'adénovirus semble être la maturation des cellules dendritiques suite à l'infection. Plusieurs équipes ont démontré que l'infection par l'adénovirus entraînait effectivement la maturation des cellules dendritiques tandis que d'autres équipes ont démontré que l'adénovirus était un moyen efficace et non perturbant de transférer des cellules dendritiques (Rea *et al.*, 1999; Tillman *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1999; Morelli *et al.*, 2000). Quoiqu'il en soit, certaines équipes ont démontré qu'il était possible d'infecter les cellules dendritiques avec un vecteur adénovirus exprimant le TGF- β afin d'empêcher la maturation des cellules dendritiques (Lee *et al.*, 1998). L'utilisation de cellules infectées avec l'adénovirus induit également une réponse cytotoxique chez l'hôte empêchant ainsi une 2^e réadministration de cellules infectées. Cette réponse est dirigée spécifiquement contre les antigènes de l'adénovirus qui sont exprimés par les cellules dendritiques infectées. Quant aux rétrovirus, le problème majeur consiste en l'insertion de l'ADN du virus dans le génome de la cellule pouvant ainsi altérer les fonctions de la cellule dendritique. De plus, le rétrovirus, contrairement à l'adénovirus, doit infecter des cellules en division, rendant les cellules dendritiques matures de mauvaises candidates pour ces virus. Le rendement

avec le rétrovirus est également plus faible que l'adénovirus, soit un maximum d'environ 60% de cellules transfectées (Takayama *et al.*, 2002).

5. LIGAND PEPTIDIQUE MODIFIÉ (APL)

Les cellules T reconnaissent via leurs TCR un peptide lié à une molécule du CMH à la surface d'une CPA. Les cellules T CD8⁺ reconnaissent les peptides liés aux molécules du CMH de classe I tandis que les cellules T CD4⁺ reconnaissent les peptides liés aux molécules du CMH de classe II. Étant donné la liaison du peptide au CMH, la reconnaissance spécifique du TCR va être conférée par seulement quelques résidus du peptide. Parmi ces résidus, certains sont nommés résidus primaires et d'autres résidus secondaires (Kersh, G. J. *et al.*, 1996a; Kersh, G. J. *et al.*, 1996b). Les résidus primaires sont les résidus que les cellules T reconnaissant le même antigène vont tous reconnaître et sont les résidus les plus importants. Une substitution de ces résidus empêche généralement toute signalisation par le TCR. Les résidus secondaires sont les autres résidus, unique pour chaque TCR, jouant un rôle moins important dans l'interaction TCR-peptide. Une substitution à ces résidus va affecter le signal de la cellule T. Lorsqu'une cellule T interagit avec un complexe CMH/peptide via son TCR, il faut absolument un 2^e signal provenant des molécules de costimulation pour que la cellule T soit activée. Ainsi, quand il y a présence des deux signaux, la cellule T va sécréter une cytokine très importante dans le déclenchement de la réponse immunitaire, l'IL-2. Cette cytokine va entraîner la prolifération des cellules T, l'expansion clonale des cellules et la production d'autres cytokines et de médiateurs chimiques.

En général, les APLs (altered peptide ligand) sont définis comme un analogue du peptide antigénique portant des substitutions aux résidus interagissant avec le TCR (Kersh, G. J. *et al.*, 1996a). Un APL va entraîner des réponses altérées de la cellule T au lieu d'induire une réponse maximale comme lors de stimulation par un agoniste. Ainsi, un APL peut être un agoniste partiel, un antagoniste ou un peptide nul. Tout d'abord, l'agoniste partiel va entraîner seulement quelques réponses biologiques de la cellule T. Ainsi, Evavold et collaborateurs ont démontré que la stimulation d'une cellule T par un agoniste partiel entraînait la sécrétion d'IL-4 sans prolifération de la cellule T (Evavold *et*

al., 1991). De plus, Pfeiffer et collaborateurs ont démontré qu'un agoniste partiel pouvait changer le profil de cytokines sécrétés par la cellule T. Ainsi, selon le peptide lié à la molécule du CMH II, la cellule T acquiert un profil Th1 ou Th2 (Pfeiffer *et al.*, 1995). Sloan-Lancaster et collaborateurs ont démontré que la stimulation d'une cellule T par certains agonistes partiels rendait la cellule T anergique (Sloan-Lancaster *et al.*, 1993). La cellule T devient incapable de répondre à une stimulation subséquente par l'agoniste. Les APLs peuvent également être des peptides antagonistes. L'antagonisme est défini comme une inhibition spécifique de la réponse de la cellule T induite par l'agoniste lorsque les deux peptides sont présentés simultanément. Cette inhibition est dépendante de la concentration du peptide antagoniste. Ainsi, Windhagen et collaborateurs ont démontré que la stimulation d'une cellule T par un antagoniste induisait la production de TGF- β au lieu des cytokines IL-2, IL-4, IL-10 et IFN γ (Windhagen *et al.*, 1995). Il a été démontré que les peptides antagonistes pouvaient inhiber la production d'IL-2 et la prolifération de cellule T CD4⁺ (De Magistris *et al.*, 1992; Evavold *et al.*, 1994) ou inhiber la cytolyse de cellules T CD8⁺ (Jameson *et al.*, 1993). Finalement, les peptides nuls vont se lier à la molécules du CMH, mais n'entraîneront aucune réponse de la cellule T.

Ainsi, la cellule T est capable de discriminer une différence d'un acide aminé dans le peptide lié à la molécule du CMH. Généralement, le TCR va reconnaître des peptides similaires, c'est-à-dire possédant plus ou moins les mêmes résidus interagissant spécifiquement avec le TCR. Néanmoins, ceci ne semble pas être valide pour tous les TCR, puisqu'il a été démontré que certains TCR peuvent reconnaître deux peptides totalement différents (Kersh, G. J. *et al.*, 1996a). Ainsi, la reconnaissance par le TCR peut être extrêmement spécifique, dans le cas où le TCR reconnaît quelques peptides bien définis ou bien dégénérée, dans le cas où le TCR reconnaît une grande variété de peptides. Cette particularité du TCR permettrait au système immunitaire de générer une réponse efficace contre tous les antigènes.

5.1 Peptides Antagonistes

Le mécanisme d'action des peptides antagonistes demeure encore aujourd'hui obscur. Deux théories ont été émises pour expliquer le fonctionnement des peptides antagonistes. La première, le modèle quantitatif ou passif, stipule que l'inhibition de l'activation de la cellule T se ferait par une compétition pour le TCR par le peptide agoniste et antagoniste. La deuxième, le modèle qualitatif ou actif, prétend que le peptide antagoniste entraîne un signal négatif à l'intérieur de la cellule T. Selon deux équipes, (Daniels *et al.*, 1999; Stotz *et al.*, 1999) avec une cellule T CD8⁺ possédant 2 TCR distincts, il est impossible d'inhiber la réponse d'un TCR en présence d'un antagoniste pour le 2^e TCR et d'un agoniste pour le 1^{er} TCR supportant la première théorie. Cependant, deux autres équipes (Dittel *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 1999) stipulent que pour une cellule CD4⁺ exprimant également 2 TCR distincts, la présence d'un antagoniste pour un TCR peut inhiber l'activation induite par l'agoniste présent pour l'autre TCR. Plus récemment, Yang et collaborateur ont démontré l'antagonisme d'une cellule T CD4⁺ et également d'une cellule T CD8⁺ possédant deux TCR distincts (Yang, W. *et al.*, 2003). Cependant, l'antagonisme de la cellule T CD8⁺ est observé uniquement lorsque le paramètre mesuré est la prolifération des cellules T et non l'activité cytotoxique. Ces résultats suggèrent un mode d'action beaucoup plus complexe des peptides antagonistes qui pourrait impliquer une combinaison de différents mécanismes. Pour appuyer la théorie du modèle qualitatif, les peptides antagonistes entraînent un patron de phosphorylation sur tyrosine des ITAMs de la chaîne ζ différents que lorsqu'un agoniste stimule les cellules T (Kersh, E. N. *et al.*, 1999). Ce patron de phosphorylation empêcherait le recrutement de Zap-70 et de la protéine LAT, donc la formation du complexe de signalisation par le TCR et, par le fait même, la cascade de signaux intracellulaires (Sloan-Lancaster *et al.*, 1996). Aussi, lorsque les TCR se lient à un peptide antagoniste, il y a recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1 empêchant ainsi l'activation de la cellule T supportant la théorie du signal négatif (Stefanova *et al.*, 2003). De plus, lors de la stimulation avec un peptide antagoniste, il y a activation et recrutement à la membrane de certaines protéines impliquées dans le réarrangement du cytosquelette,

dont Rac-1, appuyant la théorie d'un signal différent à l'intérieur de la cellule (Huang, J. *et al.*, 2000). Quoiqu'il en soit, le débat demeure toujours et les 2 hypothèses pourraient contribuer à expliquer le mode d'action des peptides antagonistes.

5.2 APLs naturels

Les APLs ne sont pas tous créés artificiellement et on retrouve, dans certaines situations physiologiques, des peptides agissant comme peptides agonistes faibles ou antagonistes pour la cellule T. Premièrement, certains pathogènes utilisent les APLs pour inhiber spécifiquement la réponse des cellules T induites contre eux. Ainsi, il existe différents variants mutants de la protéine Gag du VIH qui agissent comme peptides antagonistes et empêchent la réponse des cellules T contre cet protéine, donc augmentent la concentration du virus (Klenerman *et al.*, 1994). De même, durant l'infection par différents virus, comme EBV (Khanna *et al.*, 1996), VHB (Bertoletti *et al.*, 1994), VHC (Frasca *et al.*, 1999), il y a présence d'analogues d'épitopes immunodominants sécrétés. De plus, chez *Plasmodium falciparum* il est possible de détecter *in vitro* 2 variants de la protéine circumsporozoïte qui sont antagonistes l'un pour l'autre, et ce, même s'ils sont présentées sur des CPA différentes et à un ratio antagoniste/agoniste faible (Gilbert *et al.*, 1998). *In vivo*, le pourcentage d'enfants co-infectés par ces 2 variants est plus élevé que la normale signifiant que ce pathogène utiliserait ce moyen très efficace pour inhiber spécifiquement la réponse immunitaire de l'hôte.

Dans le thymus, lors du processus de maturation des cellules T, les peptides jouent un rôle très important puisqu'ils sont essentiels pour la sélection négative et positive. Cependant, la nature des peptides requis et leurs rôles exacts n'est pas encore bien définis. Les APLs pourraient ainsi jouer un rôle important puisqu'ils permettraient soit la sélection positive ou négative. Certaines études prétendent que l'engagement du TCR avec un peptide antagoniste serait un modèle de sélection positive puisque les peptides antagonistes engagent le TCR avec une faible avidité (Hogquist *et al.*, 1994; Williams, O. *et al.*, 1997). Ainsi, Santori et collaborateur ont identifié un peptide du soi qui induit la sélection positive des cellules T et agit comme antagoniste sur la prolifération de cellules

T matures (Santori *et al.*, 2001). Cependant, si un agoniste ou un antagoniste soluble est injecté intrapéritonéalement, seulement l'agoniste induit la sélection positive des cellules T CD4⁺ (Kraj *et al.*, 2001). Selon certaines autres études, la présence *in vivo* d'un antagoniste endogène permettrait d'inhiber les cellules T en périphérie sans qu'il y ait trop d'effets sur la sélection thymique. (Vidal *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 1998; Williams, C. B. *et al.*, 1998). Yamashiro et collaborateur démontrent en utilisant des souris exprimant des agonistes faibles que les cellules T réactives contre l'agoniste deviennent anergiques et sécrètent du TGF- β lorsque stimulé par l'agoniste (Yamashiro *et al.*, 2002). Ainsi, la sélection thymique serait affectée par des niveaux différents d'affinité des peptides suggérant que les agonistes, les antagonistes et les agonistes faibles pourraient jouer un rôle important et que ces peptides seraient également important en périphérie pour moduler la réponse des cellules T.

5.3 Utilisation thérapeutique des APLs pour les maladies auto-immunes

La découverte d'APLs naturels a encouragé l'utilisation des peptides antagonistes dans le but de traiter diverses pathologies. Ainsi, l'utilisation des peptides antagonistes pour le traitement de l'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE) a donné de bons résultats chez les rongeurs. Karin et collaborateur ont réussi à prévenir la maladie en injectant intrapéritonéalement un antagoniste de la MBP chez la souris (Karin *et al.*, 1994). Nicholson et collaborateur ont testé l'habileté du peptide L144/R147 qui est un antagoniste de PLP(139-151) à prévenir l'EAE induite *in vivo* par d'autres antigènes de la myéline, soit MOG(92-106) et la MBP (Nicholson *et al.*, 1997). Ils ont démontré que la maladie était retardée et moins grave dans les souris injectées avec le peptide antagoniste. Donc, L144/R147 n'agirait pas seulement comme antagoniste du TCR mais également par suppression «bystander», c'est-à-dire qu'il y aurait induction de cellules T effectrices suppressives qui lorsque activées par l'antigène supprimerait la réponse des cellules T induits par les autres antigènes. Alleva et collaborateur ont également démontré en injectant chez des souris NOD, par voie sous-cutanée avant ou après le début de la maladie, un APL (NBI-6024) qui induisait une réponse Th2 qui réagissait de façon croisée avec B(9-23) et diminuait l'incidence de la pathologie (Alleva *et al.*, 2002). B(9-

23) est l'antigène principal des cellules β des îlots du pancréas responsable du diabète. Cependant, jusqu'à maintenant, les études cliniques réalisées chez les humains avec des antagonistes de la MBP, qui pourrait être responsable de la sclérose en plaque, ont donné des résultats décevants. Les essais ont dû être arrêtés avant la fin, car les patients ont développé des réactions indésirables dont des réactions d'hypersensibilité (Bielekova *et al.*, 2000; Kappos *et al.*, 2000).

5.4 Peptides antagonistes et transplantation

Mis à part les maladies auto-immunes, les peptides antagonistes pourraient être utilisés pour moduler la réponse immunitaire lors de transplantation. La réponse des cellules T dans la voie indirecte est souvent dirigée contre des épitopes immunodominants des HLA, ce qui facilite la conception de peptides antagonistes. Cette stratégie permettrait d'inhiber spécifiquement les cellules T alloréactives au lieu d'inhiber tout le système immunitaire. Ainsi, l'inhibition par des peptides antagonistes de clone de cellules T CD8⁺ alloréactives contre des molécules du HLA a été démontré (Burrows *et al.*, 1999; Garcia-Peydro *et al.*, 2000). De même, l'antagonisme de l'alloréactivité indirecte de clones de cellules T CD4⁺ a été démontré (Colovai *et al.*, 1997; Suci-Foca *et al.*, 1998; Frasca *et al.*, 2000). Ceci confirme la faisabilité d'utiliser les peptides antagonistes pour moduler le rejet de greffe, surtout par la voie indirecte sur laquelle les immunosuppresseurs semblent avoir moins d'impact.

6. MODÈLE 2.102

Il y a peu de modèles expérimentaux qui permettent l'étude des voies d'alloréactivité directe et indirecte dans le rejet de greffe. Le clone de cellule T CD4⁺ nommé 2.102 est un bon modèle étant donné la double spécificité de ce clone (figure 2). Ainsi, la cellule T 2.102 reconnaît le peptide immunodominant Hb(64-76) lorsque présenté par la molécule du CMH II I-E^k (Evavold *et al.*, 1992). Cet épitope immunodominant correspond aux acides aminés 64 à 76 de l'allèle *d* mineur de la chaîne β l'hémoglobine de souris (Hb β^{dmineur}) (Lorenz *et al.*, 1988). Le clone 2.102 a été généré

suite à l'immunisation de souris H-2^k avec l'hémoglobine de souris. Ce clone de cellule T est également alloréactif contre la molécule du CMH II I-E^P (Daniel *et al.*, 1998a). De plus, une lignée de souris transgénique pour ce clone de cellule T 2.102 a été générée (2.102Tg) (Grakoui *et al.*, 1999).

Différents APLs ont déjà été caractérisés pour le clone de cellule T 2.102 (figure 3) (Evavold *et al.*, 1994). Ainsi, N73 et S69 sont définis comme étant des peptides antagonistes, E72 et Q72 comme étant des peptides nuls. Daniel et al. ont démontré que les peptides N73 et S69 pouvaient inhiber *in vitro* l'alloréactivité des cellules T naïves 2.102 et même de lignées cellulaires Th1 et Th2 (Daniel *et al.*, 1998a). Pour réaliser les essais d'antagonismes, des lymphomes B ont été utilisé comme CPA. Étant donné l'implication importante des cellules dendritiques dans le rejet de greffe, des essais d'antagonismes avec des cellules dendritiques générées à partir de la moelle osseuse de souris comme CPA permettraient d'envisager l'éventualité d'utiliser des peptides antagonistes pour moduler le rejet de greffe *in vivo*.

Alloréactivité directe

Alloréactivité indirecte

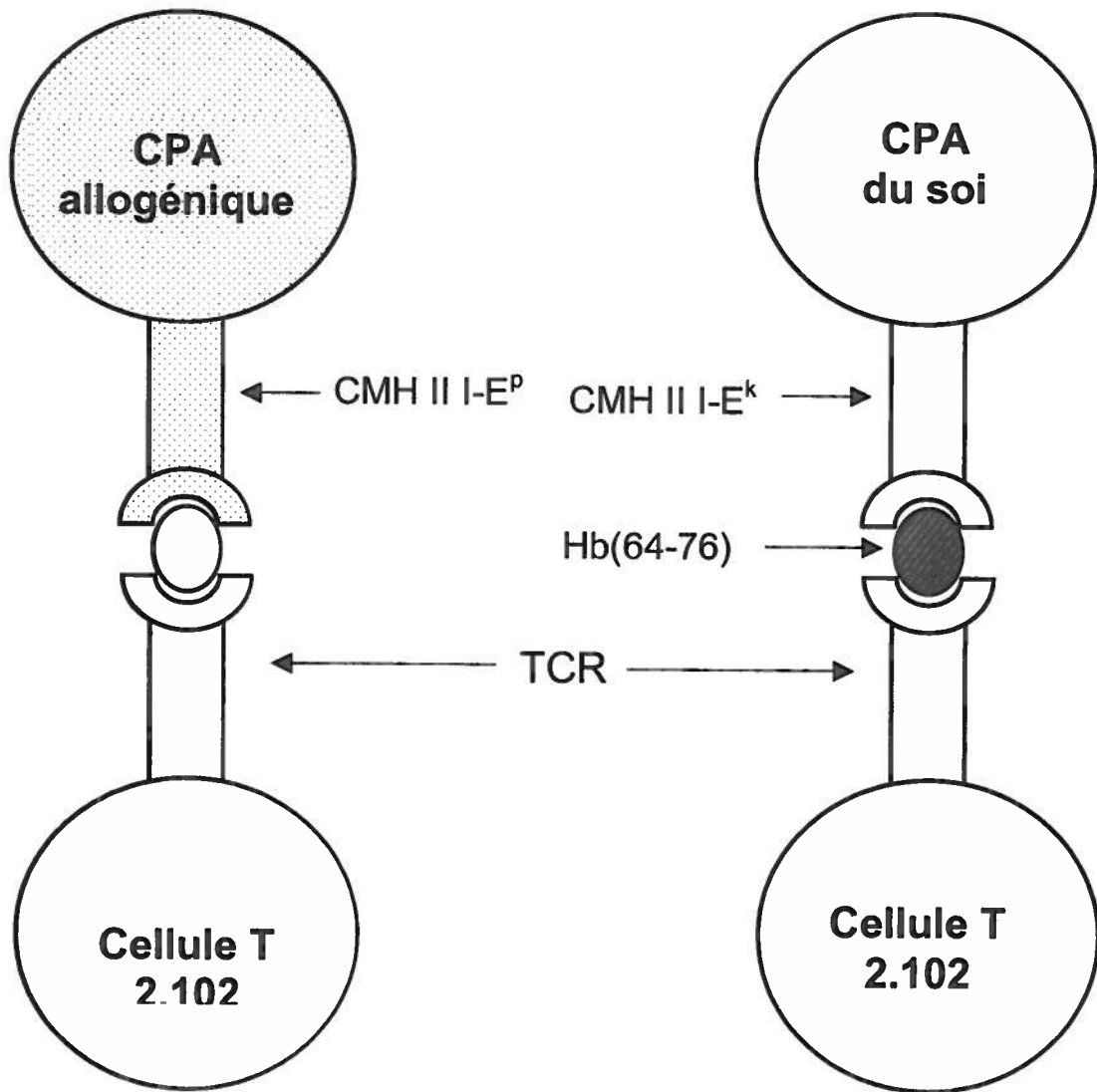


Figure 2 : Double spécificité du clone de cellule T 2.102.

<u>Peptides</u>	<u>Séquences</u>	<u>Activité</u>
Hb(64-76)	G K K V I T A F N E G L K	Agoniste
N73	G K K V I T A F N N G L K	Antagoniste
S69	G K K V I S A F N E G L K	Antagoniste
E72	G K K V I T A F E E G L K	Nulle
Q72	G K K V I T A F Q E G L K	Nulle

Figure 3 : Différents APLs du modèle 2.102

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1. SOURIS

Les souris transgéniques pour le TCR 2.102 (2.102Tg) ont été décrites auparavant (Grakoui *et al.*, 1999). Les souris B6.AKR, B10.P et 2.102Tg ont généreusement été fournies par le Dr. Paul Allen (Washington University, St-Louis), mais ont été croisées et maintenues au Centre de biologie expérimentale de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les lignées B6.AKR et B10.P ont été croisées pour obtenir la lignée de souris (B6.AKR x B10.P)F₁.

2. PEPTIDES

Les peptides ont été synthétisés et purifiés à l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB, Montréal, CA). Les peptides utilisés et leurs séquences sont Hb(64-76), GKKVITAFNEGLK : E72, GKKVITAFEEGLK : Q72, GKKVITAFQEGLK : N73, GKKVITAFNGLK : S69, GKKVISAFNEGLK.

3. CELLULES

3.1 Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées lors de cette étude. Tout d'abord, le lymphome B d'origine murine CH27 et la lignée épithéliale COS-7 ont été utilisées comme CPA dans des tests de présentation d'antigènes. L'hybridome T 2.102 (don du Dr. Paul Allen, Washington University, St-Louis) a été utilisé lors de tests d'agonistes et d'antagonistes. La lignée cellulaire CHO-E^k qui exprime des molécules du CMH II I-E^k a été utilisée pour des tests d'infections avec des adénovirus recombinants (Daniel *et al.*, 1998b). Le surnageant des P815-IL4 (don du Dr. Paul Allen), une lignée cellulaire transfectée avec le gène de l'IL-4 et qui sécrète cette cytokine, a été utilisé pour la génération des cellules dendritiques à partir de précurseur de la moelle osseuse de souris. La lignée cellulaire dépendante d'IL-2, CTLL-2 a été utilisée pour évaluer la quantité

d'IL-2 produite dans des tests de présentation d'antigènes et d'antagonismes. Finalement, les lignées cellulaires 293A et 293ACYMR (don du Dr. Bernard Massie, IRB, Montréal) ont été utilisées pour générer des adénovirus recombinants.

3.2 Maintien des lignées cellulaires

La lignée cellulaire P815-IL4 a été maintenue dans du RPMI-1640 (Invitrogen, Burlington, ON) contenant 10% (v/v) de SVF (Hyclone, Logan, UT), 2 mM de glutamax (Invitrogen), 0,5 μ M de 2-mercaptoéthanol (2-Me) et 0,05 mg/ml de gentamycine (Invitrogen). Les lignées cellulaires CH27 et l'hybridome T 2.102 ont été cultivées dans le même milieu, mais 10% (v/v) de SVB (Hyclone) a été utilisé au lieu de 10% (v/v) de SVF. La lignée cellulaire CTLL-2 a été cultivée dans ce même milieu, mais sans 2-Me. La lignée cellulaire COS-7 a été cultivée dans du DMEM (Invitrogen) contenant 10% (v/v) de SVF, 2 mM de glutamax, 0,5 μ M de 2-Me et 0,05 mg/ml de gentamycine. Les lignées cellulaires 293A et 293ACYMR ont été cultivées dans le même milieu, mais contenant seulement 5% (v/v) de SVF et additionnée de 0,2 mM d'HEPES (Invitrogen). Finalement, les CHO-E^k ont été cultivés dans du MEM- α (Invitrogen) contenant 5% (v/v) de SVF, 2 mM de glutamax, 0,5 μ M de 2-mercaptoéthanol et 0,05 mg/ml de gentamycine. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C, 5% CO₂ dans un incubateur humidifié.

4. CULTURE DES CELLULES DENDRITIQUES

Les tibias et fémurs de souris B6.AKR, B10.P et (B6.AKR x B10.P)_{F1} ont été prélevés et déposés dans du RPMI-1640. La moelle osseuse a été évacuée de l'os à l'aide d'une aiguille et d'une seringue contenant du RPMI-1640. Les globules rouges ont été lysés grâce à une solution de chlorure d'ammonium (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA dans du PBS pH 7.4) et la moelle osseuse a été lavée deux fois avec du RPMI-1640. Par la suite, les cellules ont été déposées dans un plateau 24 puits à une concentration de 2 x 10⁶ cellules par puits dans 2 ml de RPMI-1640 contenant 10% (v/v) de SVF, 2 mM de Glutamax, 0,5 μ M de 2-Me, 0,05 mg/ml de gentamycine, 4 ng/ml de

GM-CSF (R&D systems, Hornby, ON) et 5 ng/ml d'IL-4 (R&D systems) ou 1/10 du surnageant des P815-IL4. Aux jours 2 et 4, les cellules ont été divisées et du nouveau milieu contenant des cytokines a été ajouté. Au jour 5, 1 µg/ml de LPS (Sigma, Oakville, ON) a été ajouté dans les puits pour une période de 24 heures afin d'obtenir des cellules dendritiques matures. Au jour 6, les cellules dendritiques ont été incubées avec des billes magnétiques Microbeads Macs CD11c (N418)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA) pendant 15 minutes à 4°C, puis purifiées sur une colonne LS⁺. La fraction positive a été utilisée pour effectuer des essais d'agonistes et d'antagonistes.

4.1 Analyse par cytométrie en flux des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont été caractérisées par cytométrie en flux avec les anticorps suivants : CD11c-PE (clone 4L3, Pharmingen), CD11b biotinylé (clone M1/70, eBioscience, San Diego, CA), CD80 biotinylé (clone 1610A1, eBioscience), CD86 biotinylé (clone GL1, eBioscience), CD40 biotinylé (clone 3.23, Pharmingen) et un anti-I-E biotinylé (hybridome 14.4.4s). Tout d'abord, 0,1 à 1 x 10⁶ cellules dendritiques ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot a été resuspendu et les cellules ont été incubées à 4°C avec les différents anticorps pendant 30 minutes, puis lavées 2 fois avec un tampon PBS pH 7.4 contenant 1% BSA (Ficher scientific, Nepean, ON) et 0,02% de NaN₃ (Sigma). Puis, les cellules ont été incubées avec la SA-FITC (Pharmingen) pour une autre période de 30 minutes à 4°C. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois et resuspendues dans 400 µl de tampon PBS pH 7.4 contenant 1% BSA et 0,02% NaN₃ et analysées par cytométrie en flux (Coulter Epics XL, Hialeah).

5. GÉNÉRATION DES APLS EN FUSION AVEC LA CHAÎNE INVARIANTE

5.1 Mutation par PCR de Hb(64-76)-Ii pour obtenir les différentes constructions APLs-Ii

Les différents APLs en fusion avec la chaîne invariante ont été générés à partir de la construction Hb(64-76) en fusion avec la chaîne invariante inséré dans le vecteur

pBluescript®SK- (Stratagène) par une technique de PCR avec des amorces possédant les mutations à insérer. Ainsi, les oligonucléotides utilisés ont été 5'AACAACGGTCTTAAGGGATC3' et 5'GAATGCTGTTATTACTTTCT3' pour N73; 5'CAGGAGGGTCTTAAGGGATC3' et 5'GAATGCTGTTATTACTTTCT3' pour Q72; 5'GAGGAGGGTCTTAAGGGATC3' et 5'GAATGCTGTTATTACTTTCT3' pour E72; 5'ATATTACTTTCTTACCTGGA 3' et 5'CAGCATTCAACGAGGGTCTT 3' pour S69. Les amorces ont été synthétisées au laboratoire du Dr. François Shareck à l'INRS-Institut Armand-Frappier et ont été traitées avec la T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs, Mississauga, ON) pendant 30 min à 37°C pour ajouter un phosphate à chaque extrémité et la kinase a été inactivé 20 min à 65°C. Ainsi, 0,1 µg d'ADN du vecteur Hb(64-76)-li dans pSK- a été amplifié durant 30 cycles de dénaturation à 94°C pour 30 s, d'hybridation à 55°C pour 30 s et d'élongation à 68°C pour 3 min dans une solution comprenant la Pfx polymérase (Invitrogen), le tampon 1X du fabricant, 10 mM de dNTPs, 50 pmol des amorces appropriées et 1 mM de MgSO₄ dans un volume final de 50 µl. Le produit du PCR a été précipité avec 0.1 V de Na Acétate 3 M et 2.5 V d'éthanol à -20°C, suivis d'une congélation à -80°C de 15 minutes et d'une centrifugation de 15 minutes à 11000 rpm. Ensuite, le culot d'ADN a été resuspendu dans 8 µl d'eau. L'ADN a été digéré 3 fois avec l'enzyme de restriction *Dpn* I (Invitrogen) pendant 1 heure à 37°C permettant ainsi de digérer l'ADN de départ qui était méthylé. Puis, l'ADN a été purifié sur gel d'agarose 1% (p/v) avec l'ensemble commercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech) et ligué avec la T₄ DNA ligase pendant la nuit à 14°C. Le produit de ligation a ensuite été introduit par transformation dans 20 µl de bactéries compétentes DH10β grâce à l'appareil Cell-Porator® *E.coli* Pulser (Invitrogen). Les bactéries ont été incubées 30 minutes à 37°C sous agitation à 250 rpm dans 1 ml de milieu LB (1% (p/v) NaCl, 1% (p/v) Tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure), puis étalées sur une gélose LB contenant de l'ampicilline. Suite à une incubation de 16-20 heures, les colonies bactériennes obtenues ont étéensemencées dans 3 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline pour une période de 16-20 heures. Par la suite, l'ADN plasmidique des cultures bactériennes liquides a été extrait selon le protocole de mini-préparation de Maniatis. L'ADN plasmidique a été digéré avec les enzymes de restriction *Kpn* I

(Amersham Pharmacia Biotech) et *Not* I (Amersham Pharmacia Biotech) et les fragments obtenus ont été analysés sur un gel d'agarose 1% (p/v). Les colonies bactériennes possédant les APLs-Ii dans le plasmide pSK- ont été réensemencées de nouveau dans du milieu LB et l'ADN plasmidique a été extrait avec l'ensemble commercial QIAprep®Spin Miniprep (Qiagen). L'ADN a par la suite été séquencé dans le laboratoire du Dr. François Denis à l'INRS-Institut Armand-Frappier pour confirmer la présence des mutations et amplifié selon l'ensemble QIAGEN®plasmid Maxi kit (Qiagen).

5.2 Sous-clonage dans le vecteur pcDNA 3.1

Les différentes constructions APLs-Ii ont été sous-clonées dans le vecteur pcDNA 3.1 (Invitrogen) aux sites de restrictions *Kpn* I et *Not* I. Les constructions APLs-Ii insérées dans le vecteur pSK- et le vecteur pcDNA 3.1 ont été digérés avec les enzymes *Kpn* I et *Not* I, puis purifiées sur gel d'agarose 1% (p/v) avec l'ensemble GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification. Le vecteur pcDNA 3.1 digéré a ensuite été déphosphorylé pour empêcher que le vecteur ne se religue sans insert. Ainsi, le vecteur a été incubé avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau (Amersham Pharmacia Biotech) à 37°C pendant 30 minutes, puis l'enzyme a été inactivé pendant 15 minutes à 85°C. Le vecteur pcDNA 3.1 déphosphorylé et l'insert APLs-Ii ont été ligués par la T4DNA ligase pendant 1 heure à 22°C. Le produit de ligation a ensuite été transformé dans des bactéries électrocompétentes et les colonies obtenues ont été criblées comme décrit précédemment.

5.3 Mutations des résidus d'ancrage P1, P4, P6 et P9 de Hb(64-76)

Les résidus d'ancrage P1, P4, P6 et P9 de Hb(64-76) ont été mutés par une technique de PCR comme décrit auparavant à la section 5.1. Les amorces utilisés ont été 5'CAACGCGGGTCTTGCGGGATCCTGAATG'3 et 5'GCTGCTGTTGCTACTTTCTT'3.

6. TRANSFECTION TRANSITOIRE DANS LES CELLULES COS-7

Les cellules COS-7 ont étéensemencées à 3×10^5 cellules par puit dans un plateau 6 puits. Le lendemain, 1 μg de la construction APLs-Ii dans pCDNA 3.1 ainsi que 1 μg de la chaîne α de I-E^k dans pCDNA 3.1 Zéo(+) et 1 μg de la chaîne β de I-E^k dans pBSR α EN (Daniel *et al.*, 1998 b) ont été transfectées dans les cellules avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Un volume de 9 μl de Lipofectamine 2000 a été mélangé à 241 μl de DMEM et incubé 5 min à température ambiante. Ensuite, l'ADN a été mélangé dans 250 μl de DMEM, puis ajouté au mélange contenant la Lipofectamine 2000. Le mélange ADN/Lipofectamine 2000 a été mélangé au vortex, incubé 20 min à température ambiante et déposé délicatement dans les cellules COS-7. Le lendemain, les cellules ont été prélevées et marquées avec l'anticorps 14.4.4s et la SA-PE (Pharmingen, Mississauga, ON) selon le protocole de marquage des cellules (section 4.1). Les cellules transfectées ont été utilisées pour effectuer des tests agonistes et antagonistes.

7. PURIFICATION DES CELLULES T NAÏVES 2.102Tg

Des rates de souris 2.102Tg ont été prélevées et broyées. Les globules rouges ont été lysés à l'aide d'une solution de chlorure d'ammonium et la suspension cellulaire a été lavée 2 fois avec du RPMI-1640. Par la suite, la suspensions cellulaire a été incubée avec des billes magnétiques Microbeads Macs CD4 (L3T4) (Miltenyi Biotec) pendant 15 min à 4°C et purifiées sur colonne LS⁺. La fraction positive a été récoltée et la pureté a été évaluée par cytométrie en flux avec les anticorps CD4-PE (clone L3T4, eBioscience) et CD8-FITC (clone 53-6.7, eBioscience). La population de cellules T CD4⁺ a ensuite été utilisée pour effectuer des tests agonistes et antagonistes.

8. TESTS AGONISTES ET ANTAGONISTES

8.1 Cellules COS-7 transfectées comme CPA

Pour les essais agonistes, 3×10^4 cellules COS-7 transfectées avec les différentes constructions APLs-li ont été incubées avec 6×10^4 hybridomes T 2.102 dans des plateaux 96 puits dans un volume final de 200 μ l pour 24 heures. Pour les essais d'antagonistes, différentes concentrations du peptides Hb(64-76) ont été ajoutées dans les puits. Par la suite, 100 μ l du surnageant des plateaux 96 puits a été prélevé et congelé pour au moins 1 heure à -80°C . La quantité d'IL-2 produite par les hybridome T 2.102 a été évaluée à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2. Ainsi, 5×10^3 CTLL-2 lavées 3 fois avec du RPMI-1640 ont été incubées avec le 100 μ l de surnageant prélevé pour une période de 24 heures. Puis 0,4 μCi de [^3H]Thymidine (ICN, Irvine) a été ajoutée dans les puits pour une autre période de 18-24 heures. L'ADN des CTLL-2 a ensuite été déposé sur un filtre à l'aide d'un « Micro cell harvester » et la quantité de [^3H]Thymidine incorporée dans l'ADN a été évaluée à l'aide de l'appareil 1450 MicroBeta Trilux (Wallac, Boston, MA)

8.2 Cellules dendritiques utilisées comme CPA

Pour évaluer l'activité agoniste des peptides, l'hybridome T 2.102 ou les cellules T naïves 2.102 isolées de souris transgéniques ont été stimulés avec des cellules dendritiques immatures et matures d'haplotype H-2^k (1×10^4 cellules/puits) chargées avec les différents peptides ou avec des cellules dendritiques d'haplotype H-2^P/H-2^k seules. Pour les tests antagonistes, les cellules dendritiques d'haplotype H-2^k ont été chargées pendant 2 heures à 37°C avec 1 μM (cellules dendritiques immatures) ou 0,3 μM (cellules dendritiques matures) de peptide Hb(64-76). Ensuite, les cellules ont été lavées et incubées avec l'hybridome T 2.102 ou les cellules T 2.102 naïves ainsi que différentes concentrations d'APLs. Pour les tests antagonistes avec les cellules dendritiques d'haplotype H-2^P/H-2^k, les cellules ont directement été incubées avec différentes concentrations d'APLs. Pour évaluer l'activation des hybridomes T 2.102, la quantité

d'IL-2 sécrétée a été mesurée à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2 tel que décrit précédemment. Pour les essais avec les cellules T naïves, les cellules dendritiques ont préalablement été irradiées à 2000 RAD. L'activation des cellules T naïves a été mesurée selon l'incorporation de [³H]Thymidine dans les cellules T en prolifération. Ainsi, après une incubation de 72 heures, 0,4 µCi de [³H]Thymidine a été ajoutée dans les puits pour une période de 18-24 heures, puis la quantité d'ADN radioactif incorporée dans les cellules T a été mesurée. Tous les tests agonistes et antagonistes ont été effectués en triplicata.

9. ADÉNOVIRUS

9.1 Sous-clonage des constructions APLs-Ii dans le vecteur de transfert

Les différentes constructions APLs-Ii ont été sous-clonés dans le vecteur de transfert pAdPS-CMV5-P2-DC-GFPq/K7PSmlp (figure 4) au site de restriction *Bgl* II à l'aide d'une technique de PCR. Tout d'abord, les constructions APLs-Ii insérées dans le plasmide pcDNA 3.1 ont été amplifiées avec les amorces 5'TGATCATGATCACCATG-GATGACCAACGCGAC3' et 5'TGATCATGATCAGCTCTAGATCATTTCAG3' qui contiennent deux sites de restriction *Bcl* I à chaque extrémité. L'ADN a été amplifié dans une solution contenant la Vent polymérase (New England Biolabs), le tampon 1X du fabricant, 10 mM de dNTPs, 50 pmol d'oligonucléotides et 2 mM de MgSO₄ dans un volume final de 50 µl, pendant 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 s, d'hybridation à 58°C pendant 30 s et d'élongation à 75°C pendant 1 min. Les produits de PCR ont ensuite été précipités et digérés avec l'enzyme *Bcl* I (New England Biolabs) pendant 1 heure à 55°C. L'ADN digéré a été purifié sur gel d'agarose 1% (p/v) et ligué dans le vecteur de transfert pAdPS-CMV5-P2-DC-GFPq/K7PSmlp préalablement coupé *Bgl* II (Amersham Pharmacia Biotech) et déphosphorylé. Le produit de ligation a été introduit par transformation dans les bactéries électrocompétentes DH10β et l'ADN plasmidique des bactéries a été extrait, criblé avec l'enzyme de restriction *Hind* III (Amersham Pharmacia Biotech), séquencé et amplifié comme décrit précédemment (section 5.1).

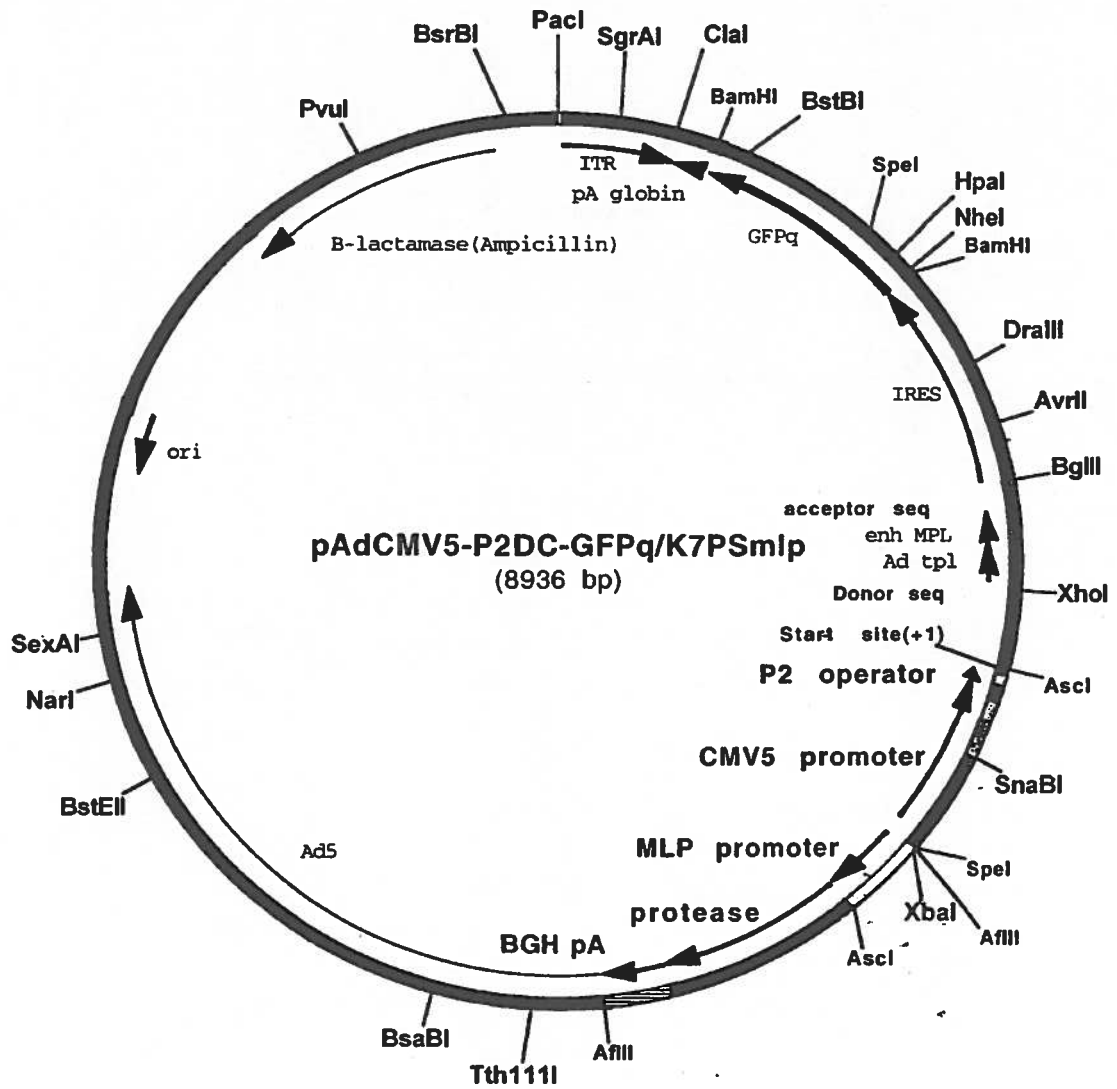


Figure 4. Carte du vecteur de transfert adénovirus pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp.

9.2 Infections/Transfections des cellules 293ACYMR pour générer les adénovirus recombinants

Les vecteurs de transfert ont été linéarisés avec l'enzyme de restriction *Pac I* (New England Biolabs) pendant 1 heure à 37°C et purifiés sur gel d'agarose 1% (p/v). Cet ADN a ensuite été transfecté dans des cellules 293ACYMR ensemencées 24 heures auparavant dans des plateaux 96 puits. Les meilleures conditions de transfections ont tout d'abord été déterminées en testant différents ratio ADN/PEI (Polysciences Inc.). Ainsi, 3 µg d'ADN dissous dans 50 µl de DMEM a été mélangé à 3 µg de PEI dissous dans 50 µl de DMEM pendant 10 minutes à la température ambiante. Puis, 20 µl de ce mélange a été déposé dans un puit de plateaux 96 puits contenant des cellules 293ACYMR confluentes ensemencées la veille. Les cellules transfectées ont été infectées 24 heures plus tard avec l'adénovirus Ad5-Δ[PS-E1-E3-E4(+ofr6)] à une MOI de 1. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ de 72 à 96 heures jusqu'à ce que l'effet cytopathique soit complet. Par la suite, le surnageant et les cellules ont été récupérés et ont subi 3 cycles de congélation/décongélation afin de libérer toutes les particules virales. Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé 15 minutes à 3000g et le surnageant a été prélevé et purifié par plage de lyse.

9.3 Plage de lyse

Différentes dilutions des adénovirus recombinants ont été effectuées et 1 ml de ces dilutions a été utilisé pour infecter un puit de cellules 293A confluentes dans un plateau 6 puits. L'infection a été effectuée en duplicata lors de la purification des adénovirus et en triplicata lors de la détermination du titre viral. Les cellules ont été infectées 6 heures à 37°C, 5% CO₂ sous agitation constante. Ensuite, le mélange infectieux a été enlevé et 2 à 3 ml de milieu pour cellules 293A contenant 1% de SeaPlaque®GTG Agarose (Mandel, Guelph, ON) a été ajouté dans tous les puits. Les cellules ont été incubées de deux à trois semaines en rajoutant 2 à 3 ml de milieu contenant 1% SeaPlaque®GTG Agarose à toutes les semaines. Ensuite, lors de la purification, quelques plages isolées ont été prélevées, déposées dans 1 ml de milieu complet et incubées 1 heure à 37°C pour libérer les

adénovirus de l'agarose. Ce nouveau stock d'adénovirus a ensuite été purifié de nouveau par plaque de lyse ou amplifié. Lors de la détermination du titre viral par plaque de lyse, après 3 semaines d'incubation, le nombre de plaque de lyse a été compté et le titre viral déterminé.

9.4 Amplification des adénovirus recombinants

Les cellules 293A à 90% confluentes d'un flacon de 25 cm² ont été infectées avec une faible quantité d'adénovirus recombinants provenant d'une plaque de lyse. Lorsque le taux de mortalité a atteint 90%, le surnageant et les cellules ont été prélevés et ont subi 3 cycles de congélation/décongélation. Puis, le lysat cellulaire a été centrifugé 15 minutes à 3000 g et le surnageant a été prélevé. Celui-ci a été utilisé pour infecter un nouveau flacon de 175 cm² de cellules 293A dont le surnageant final a été titré par plaque de lyse.

9.5 Infection des cellules avec les adénovirus recombinants

Les cellules CHO-E^k confluentes à 90% ont été infectées avec les adénovirus recombinants dans un flacon 25 cm² à une MOI de 100 dans un volume final de 5 ml. Les cellules ont été infectées pendant la nuit et le lendemain elles ont été utilisées pour effectuer des essais d'agoniste et d'antagoniste avec l'hybridome T 2.102 comme décrit précédemment (section 8.1). Les cellules dendritiques générées à partir de la moelle osseuse de souris ont été infectées dans des plateau 24 puits dans le plus petit volume possible pendant 2 heures. Ensuite, du milieu complet pour cellules dendritiques a été ajoutée pour obtenir volume total de 2.5 ml et les cellules ont été incubées durant toute la nuit. Par la suite, elles ont été utilisées pour effectuer des tests agonistes et antagonistes.

RÉSULTATS

1. CELLULES DENDRITIQUES

1.1 Caractérisation des cellules dendritiques

Dans le modèle 2.102, la capacité des APLs à inhiber la réponse des cellules T naïves et de lignée Th1 et Th2 a déjà été démontré en utilisant des lymphomes B comme CPA (Daniel *et al.*, 1998a). Nous voulions maintenant vérifier la capacité des cellules dendritiques à présenter des APLs et à moduler la réponse des cellules T. Les cellules dendritiques ont été caractérisées par des tests de cytométrie en flux et des tests de présentation d'antigènes. Les cellules dendritiques ont été différenciées en présence de GM-CSF et d'IL-4 à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris B6.AKR (H-2^k) et (B6.AKR x B10.P)F₁ (H-2^{k/p}). Pour induire la maturation des cellules dendritiques, différentes conditions ont été testées avec le LPS ou le TNF- α (résultats non montrés) et la meilleure maturation a été obtenue lorsque 1 μ g/ml de LPS était ajouté dans les puits durant 16 à 24 heures. Les cellules dendritiques immatures et matures ont été analysées par cytométrie en flux à l'aide de différents anticorps (figure 5). Ainsi, des doubles marquages ont été effectués avec l'anticorps CD11c-PE qui est spécifique des cellules dendritiques chez la souris et d'un autre anticorps, soit CD11b, CD80, CD86, CD40 ou un anti-chaîne α de I-E. Toutes les cellules dendritiques immatures et matures expriment évidemment le CD11c ainsi que le CD11b, un marqueur de la lignée myéloïde. Il y a augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80, mais surtout CD86 et CD40 à la surface des cellules dendritiques matures. Il y a également une très forte augmentation de l'expression de molécules du CMH II à la surface des cellules dendritiques matures. Par conséquent, les cellules dendritiques immatures et matures possèdent les caractéristiques généralement décrites dans la littérature pour des cellules dendritiques provenant de précurseurs de la moelle osseuse de souris (Yamaguchi *et al.*, 1997; Lutz *et al.*, 1999).

Par la suite, les cellules dendritiques immatures et matures ont été utilisées pour effectuer des tests de présentation d'antigènes afin de comparer leur capacité stimulatrice vis-à-vis l'hybridome T 2.102 ou les cellules T CD4⁺ naïves isolées de souris

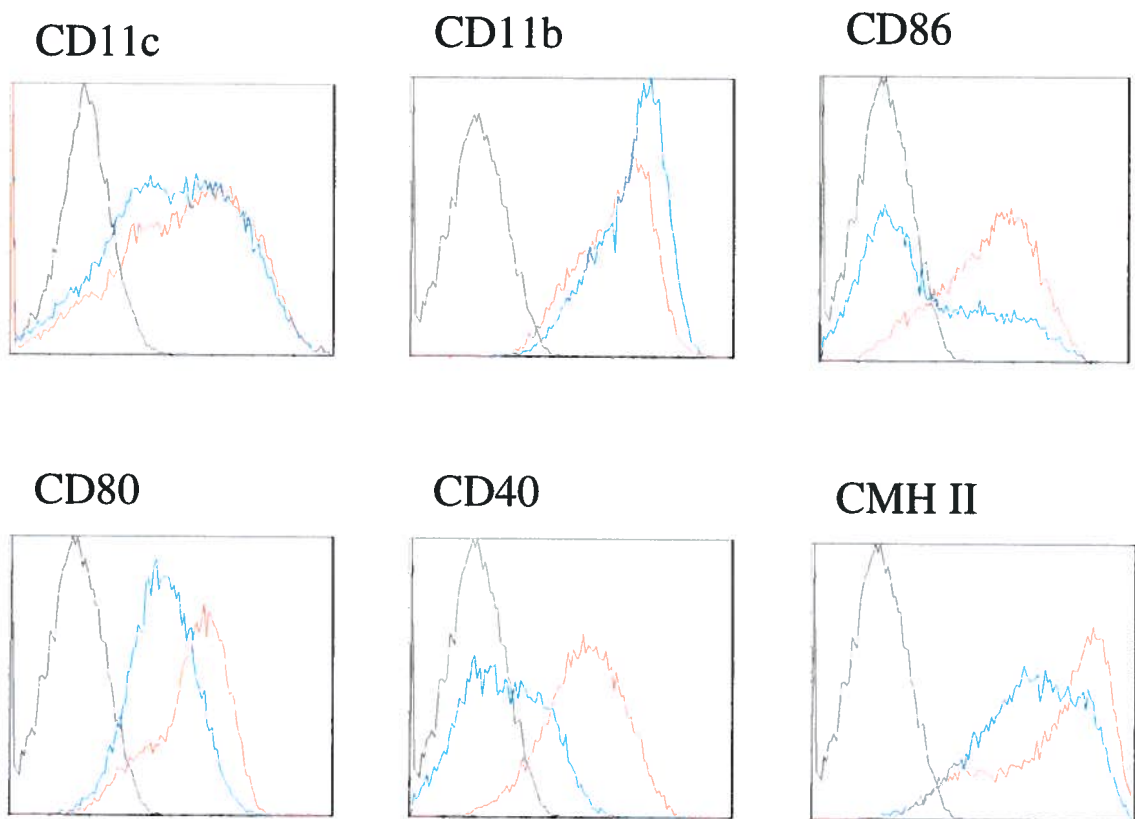


Figure 5. Analyse des cellules dendritiques par cytométrie en flux. Les cellules dendritiques générées à partir de la moelle osseuse de souris ont été différenciées en présence de GM-CSF et d'IL-4 et leur maturation a été induite par le LPS. Les cellules dendritiques immatures (bleu) et matures (rouges) ont été analysées par cytométrie en flux pour l'expression de différents marqueurs. Le témoin négatif (noir) représente la fluorescence des cellules dendritiques incubées avec le conjugué SA-FITC.

transgénique 2.102Tg. Seules les cellules dendritiques immatures et matures d'haplotype H-2^k qui présentent le peptide agoniste Hb(64-76) stimulent aussi bien l'hybridome T 2.102 (figure 6) que les cellules T naïves (figure 7). Les APLs E72, Q72, N73 et S69 n'entraînent aucune stimulation des cellules de même que les cellules dendritiques d'haplotype H-2^k seules sans peptides n'entraînent pas de stimulation des cellules T (résultats non montrés). Ces résultats confirment les données obtenus auparavant avec les différents APLs, c'est-à-dire que E72, Q72, N73 et S69 ne possèdent pas d'activité agoniste sur le clone de cellules T 2.102 (Evavold *et al.*, 1994). La stimulation induite par Hb(64-76) sur l'hybridome T ou les cellules T naïves est similaire peu importe si les cellules dendritiques utilisées sont immatures ou matures. Finalement, les cellules dendritiques hétérozygotes exprimant I-E^P/I-E^k ont été utilisée pour vérifier la capacité allostimulatrice vis-à-vis l'hybridome T et les cellules T naïves (figure 8). Les cellules dendritiques immatures et matures exprimant I-E^P stimulent effectivement l'hybridome T 2.102 et les cellules T 2.102 naïves de façon comparable peu importe l'état de maturation de la cellule dendritique utilisée comme CPA. Ainsi, les cellules dendritiques immatures et matures sont différentes phénotypiquement, car elles expriment des niveaux différents de molécules de costimulation et de CMH II, mais semblent posséder les mêmes capacité stimulatrices sur l'hybridome T 2.102 et les cellules T naïves lorsqu'elles présentent l'agoniste Hb(64-76) ou la molécule du CMH II I-E^P.

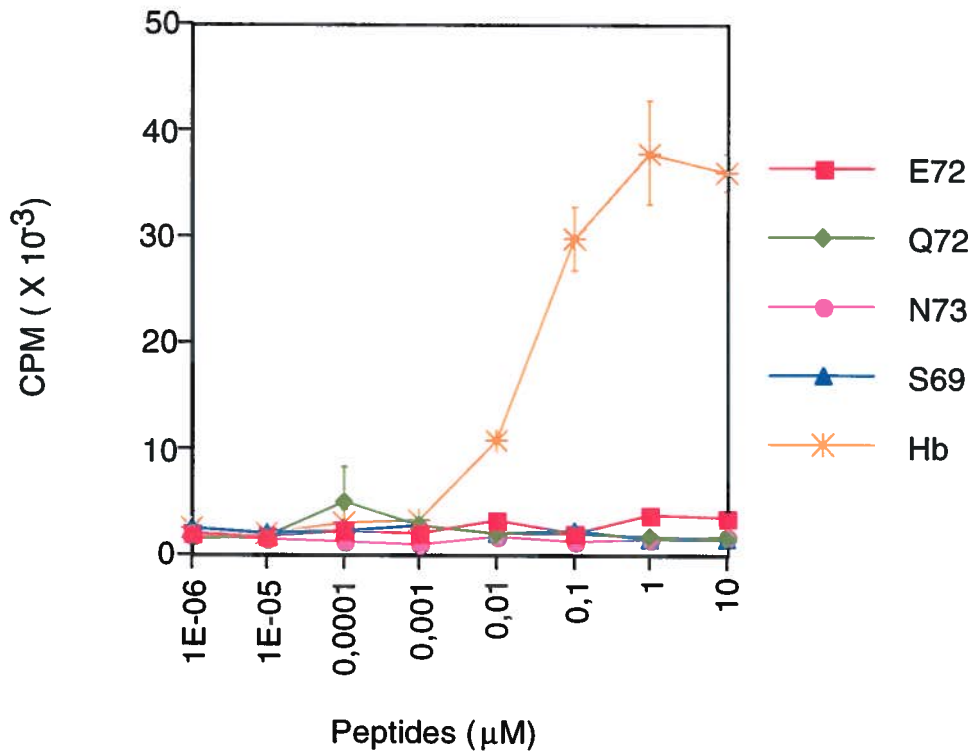
1.2 Inhibition de la réactivité restreinte au soi

1.2.1 Inhibition de l'activation de l'hybridome T 2.102

Des essais d'antagonismes avec les cellules dendritiques immatures et matures ont été réalisés afin de vérifier et comparer la capacité antagoniste des deux types de cellules dendritiques. L'état immature ou mature des cellules dendritiques pourraient influencer sur l'activité antagoniste des peptides qu'elles présentent. Les tests permettront également de définir les meilleures cellules dendritiques lors de tests futurs *in vivo*. Tout d'abord, les cellules dendritiques immatures et matures exprimant I-E^k ont été utilisées pour présenter les peptides antagonistes afin d'inhiber la réactivité restreinte au soi. Pour

Figure 6. Stimulation de la réactivité restreinte au soi de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures (A) et matures (B) ont été incubées avec différentes concentration de peptides et utilisées pour stimuler l'hybridome T 2.102. La production d'IL-2 par l'hybridome T a été mesurée à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2.

A)



B)

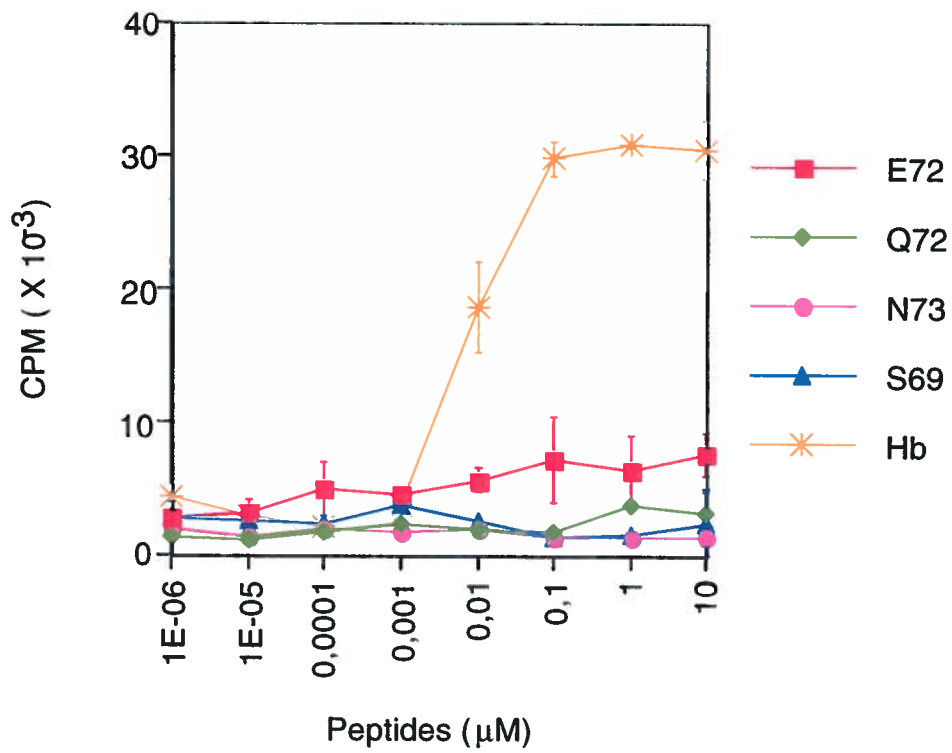
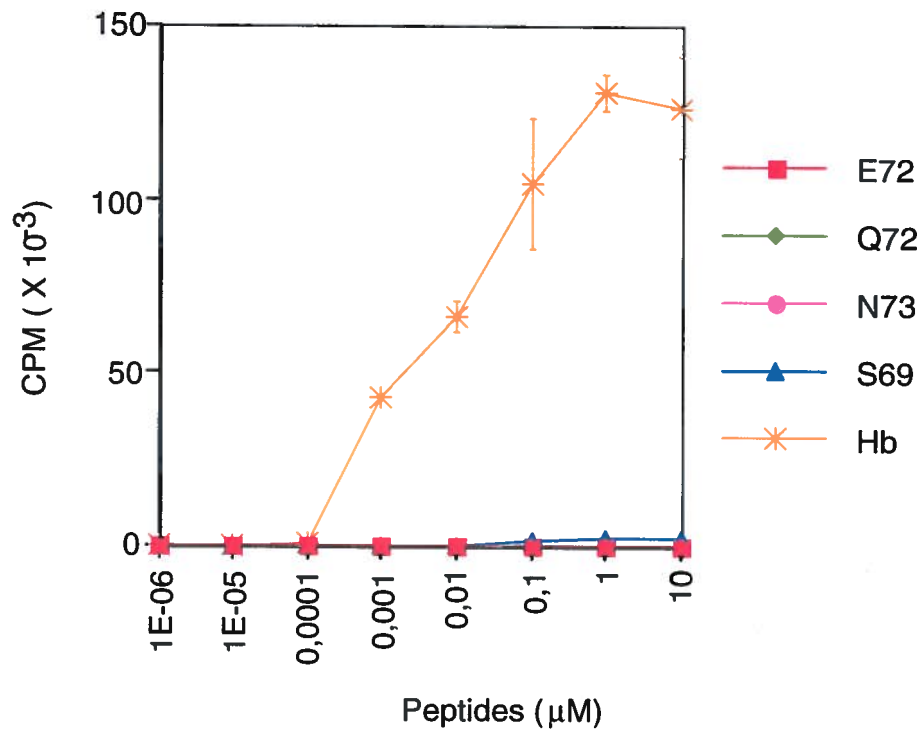


Figure 7. Stimulation de la réactivité restreinte au soi des cellules T 2.102 naïves par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures (A) et matures (B) ont été incubées avec différentes concentrations de peptides et utilisées pour stimuler des cellules T CD4⁺ naïves isolées de souris transgéniques 2.102Tg. La stimulation des cellules T naïves a été mesurée selon la prolifération des cellules T par l'incorporation de [³H]Thymidine.

A)



B)

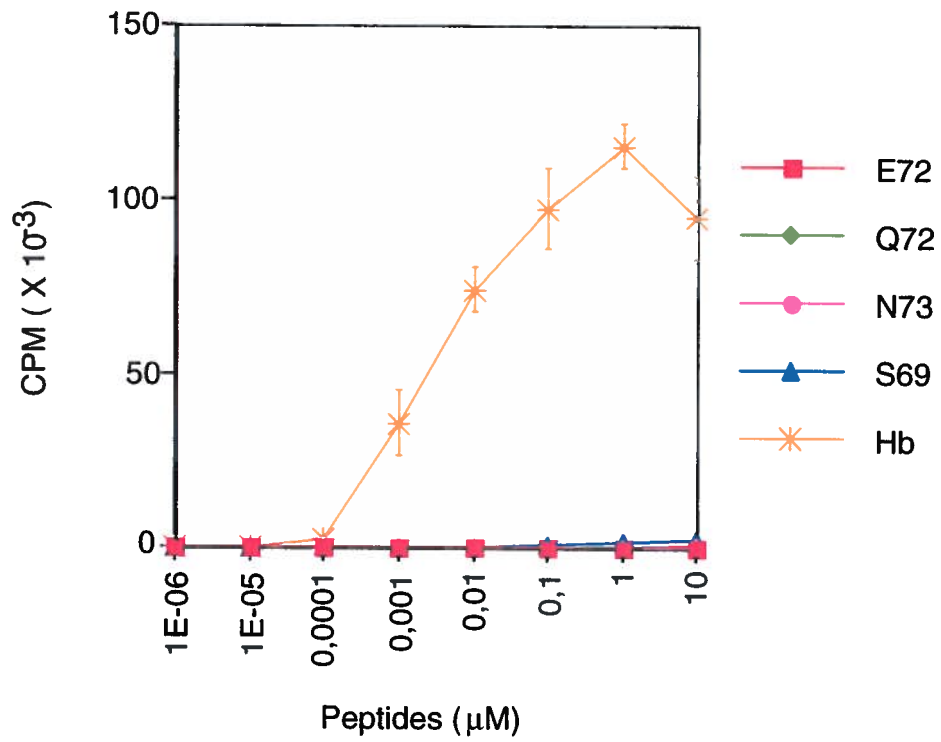
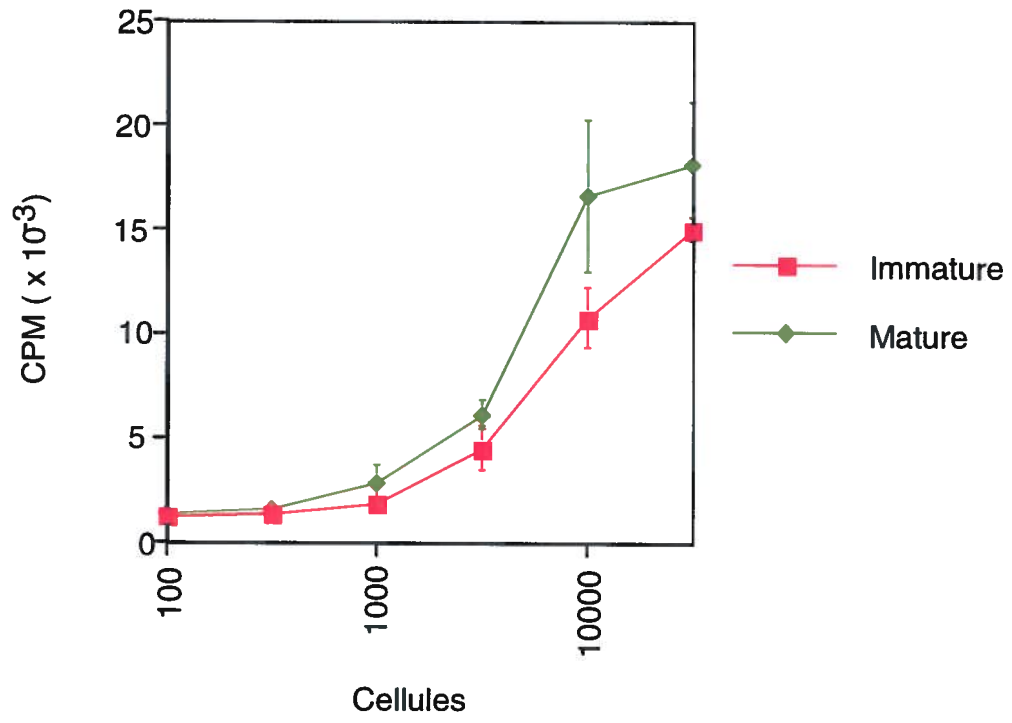
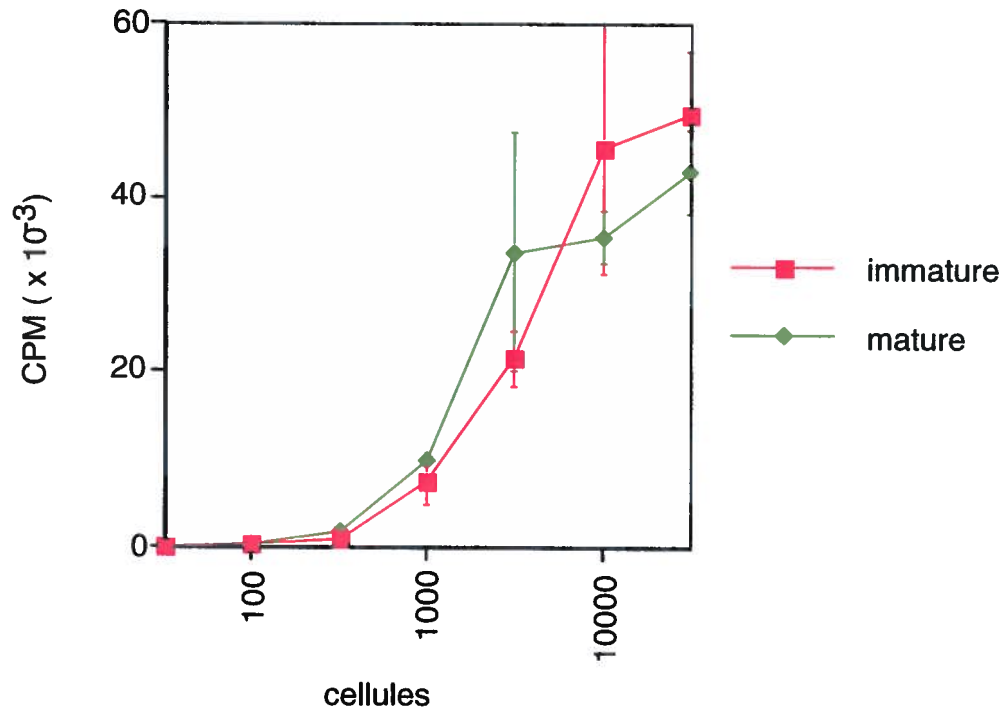


Figure 8 : Stimulation de l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 et de cellules T 2.102 naïves. Les cellules dendritiques hétérozygotes exprimant I-E^p/I-E^k ont été utilisées pour stimuler l'hybridome T 2.102 (A) ou les cellules T 2.102 naïves isolées de souris transgénique 2.102Tg (B). L'activation de l'hybridome T a été mesurée selon la production d'IL-2 et la stimulation des cellules T naïves selon leur prolifération.

A)



B)



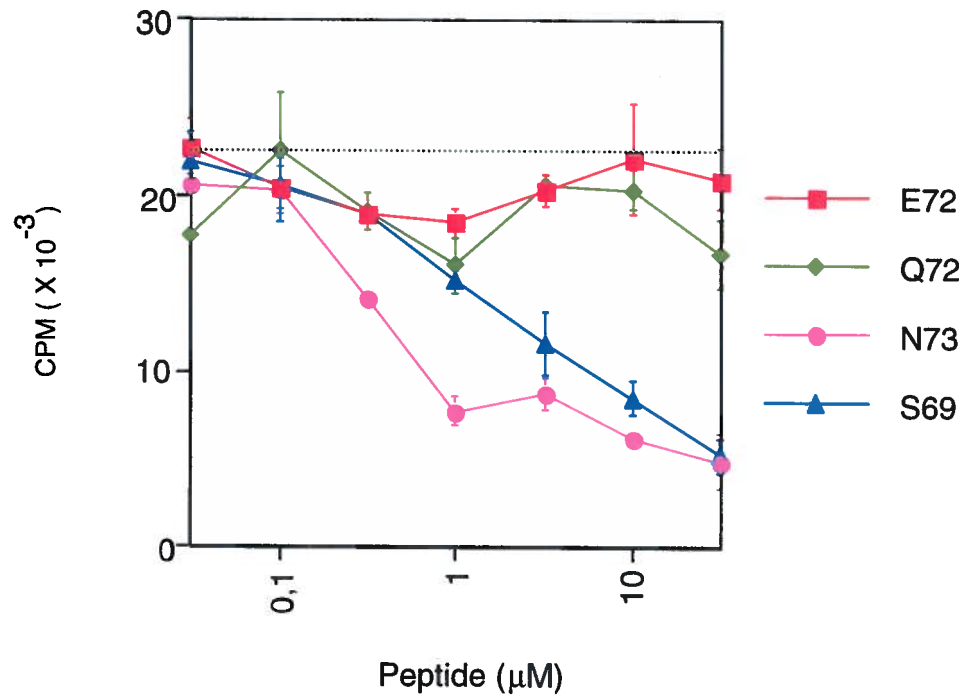
effectuer les tests antagonismes, les cellules dendritiques ont d'abord été chargées avec le peptide agoniste, puis incubées avec les APLs afin d'éviter la compétition pour la liaison aux molécules du CMH II et de réellement mesurer l'activité antagoniste des peptides. Ainsi, les cellules dendritiques ont été chargées avec 1 μ M du peptide Hb(64-76) pour les cellules dendritiques immatures et 0,3 μ M pour les cellules dendritiques matures dans le but d'obtenir un niveau de stimulation des cellules T comparable, c'est-à-dire un nombre similaire de CPM. De cette façon, il a été possible de comparer l'inhibition des cellules T par les cellules dendritiques immatures ou matures présentant les APLs. La capacité des APLs à inhiber la stimulation induite par le peptide Hb(64-76) vis-à-vis l'hybridome T 2.102 a été déterminée en mesurant la production d'IL-2 par l'hybridome T (figure 9). Les peptides antagonistes N73 et S69 inhibent la stimulation de l'hybridome T 2.102 induite par Hb(64-76), alors que les peptides nuls E72 et Q72 n'entraînent aucune inhibition. La concentration de peptides antagonistes requis pour observer un effet antagonisme est comparable à la concentration requise lorsque des lymphomes B sont utilisés comme CPA (Daniel *et al.*, 1998a). Les résultats obtenus sont les mêmes peu importe que les cellules dendritiques soient immatures ou matures, suggérant un mécanisme d'action de l'antagonisme indépendant de l'état de maturation de la cellule dendritique.

1.2.2 Inhibition de l'activation des cellules T naïves 2.102

L'antagonisme de l'hybridome T 2.102 par des cellules dendritiques présentant des peptides antagonistes a clairement été démontré. Afin de représenter une situation plus physiologique, des essais d'antagonismes avec des cellules T naïves isolées de souris transgéniques ont été réalisés puisque les cellules T naïves sont impliquées dans la réponse immunitaire générée lors de rejet de greffes. Les cellules T naïves ont été purifiées par billes magnétiques CD4 à partir de la rate de souris 2.102Tg. Les essais d'antagonismes ont été réalisés avec des cellules dendritiques immatures et matures. La stimulation des cellules T 2.102 naïves a été mesurée selon leur niveau de prolifération. Les cellules dendritiques immatures ont été chargées avec 1 μ M de Hb(64-76) et les cellules dendritiques matures avec 0,3 μ M de Hb(64-76). Les résultats démontrent que le

Figure 9. Inhibition de la réactivité restreinte au soi de l'hybridome T 2.102 par des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures (A) et matures (B) ont été chargées avec le peptides agoniste Hb(64-76), puis incubées avec les différents APLs et l'hybridome T 2.102. La capacité des peptides à inhiber la réponse de l'hybridome T a été évaluée selon la production d'IL-2 par l'hybridome T à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2. La ligne pointillée représente la stimulation de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques qui ont seulement été chargées avec le peptide agoniste Hb(64-76).

A)



B)

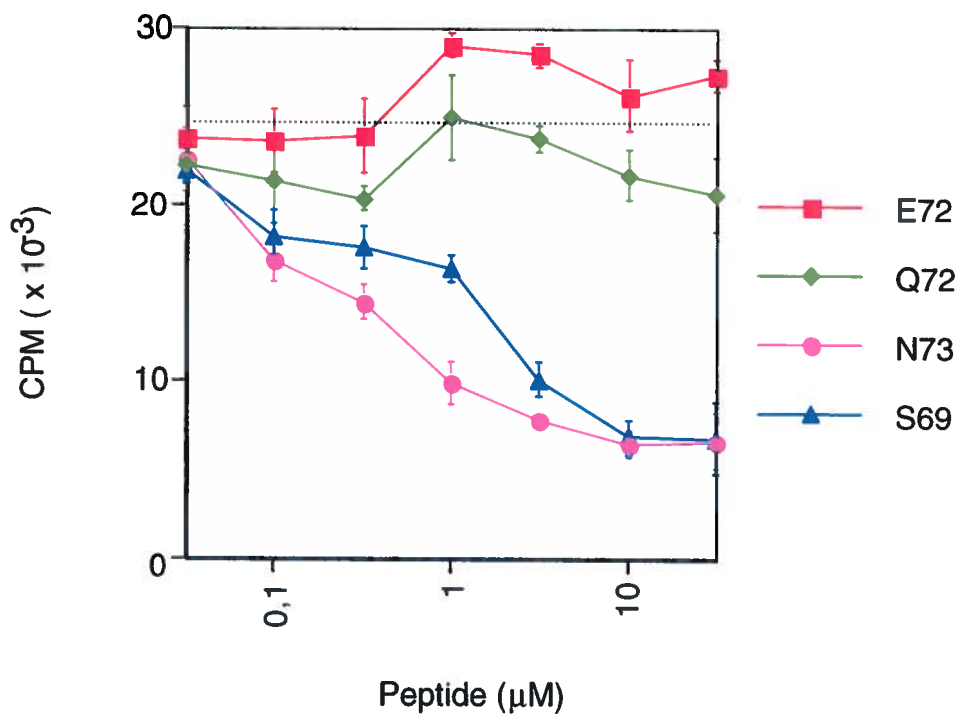
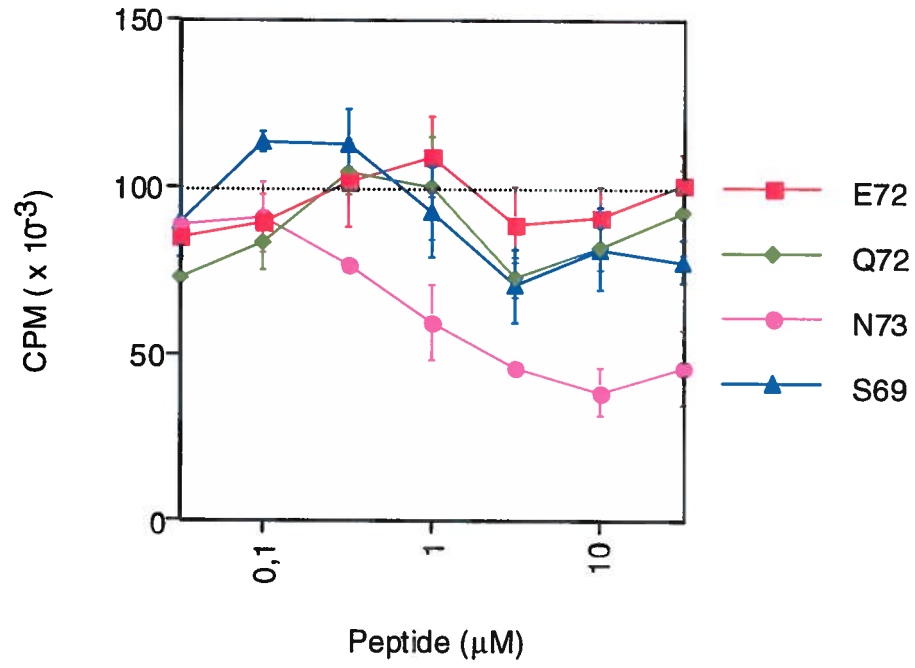
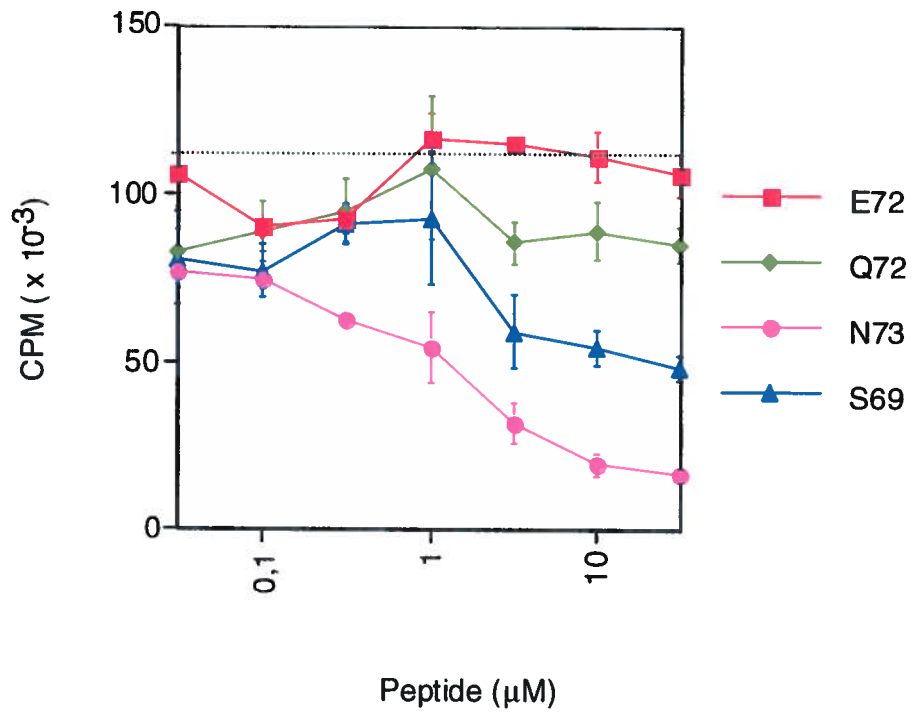


Figure 10. Antagonisme de la réactivité restreinte au soi de cellules T naïves par des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures (A) et matures (B) ont été chargées avec le peptide Hb(64-76) et incubées avec différentes concentrations d'APLs et de cellules T CD4⁺ naïves isolées de souris transgénique 2.102Tg. L'activation des cellules T naïves a été mesurée selon l'incorporation de [³H]thymidine dans les cellules T naïves. La stimulation des cellules T naïves par les cellules dendritiques chargées avec le peptide agoniste Hb(64-76) est représentée par la ligne pointillée.

A)



B)



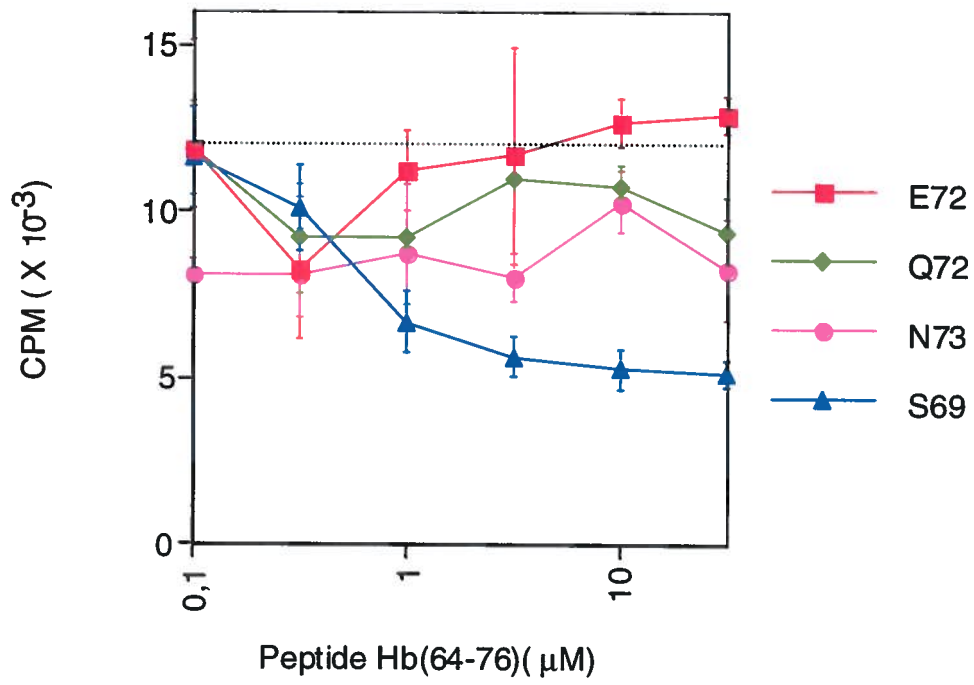
peptide antagoniste N73 présenté par les cellules dendritiques immatures et matures inhibe la prolifération des cellules T naïves tandis que le peptide S69 inhibe la prolifération des cellules T uniquement lorsqu'il est présenté par les cellules dendritiques matures. Les peptides nuls E72 et Q72 n'inhibent pas la réponse des cellules T (figure 10). Il y a une plus forte inhibition de la réponse avec le peptide antagoniste N73 que S69. Comme lors des tests avec l'hybridome T, peu importe l'état, immature ou mature, des cellules dendritiques qui présentent le peptide antagoniste N73, il y a diminution de la prolifération des cellules T naïves.

1.3 Inhibition de l'alloréactivité

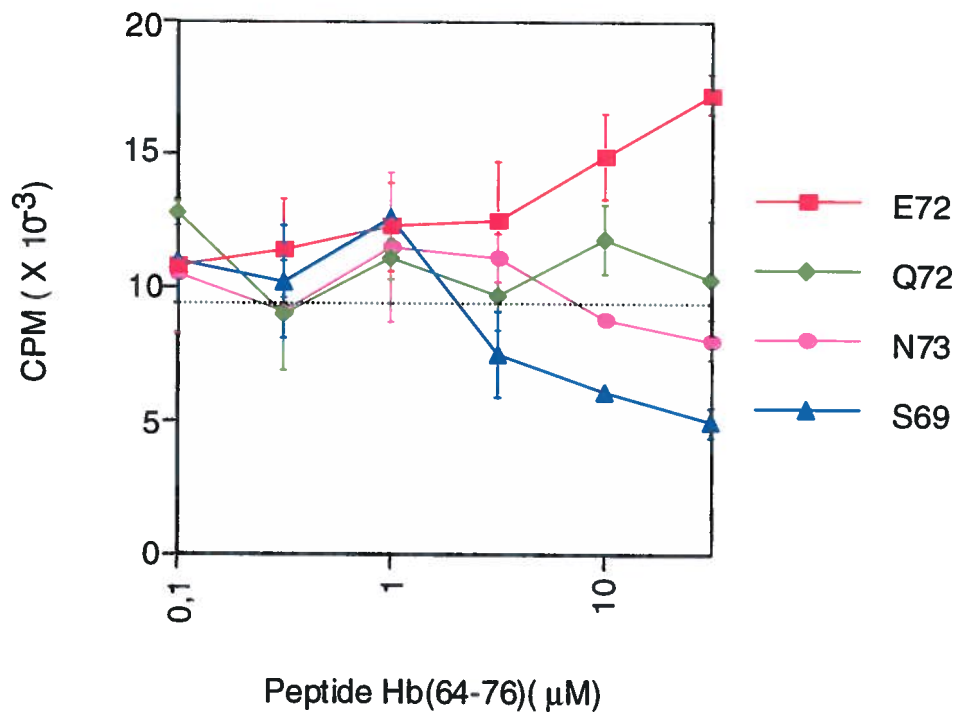
Les résultats obtenus jusqu'à présent ont démontré qu'il était possible d'inhiber la réactivité restreinte au soi en utilisant des APLs. Étant donné que l'objectif du projet à moyen terme est d'utiliser les cellules dendritiques exprimant les APLs pour moduler le rejet de greffe, des essais d'antagonismes avec les cellules dendritiques immatures et matures ont été réalisés afin d'inhiber l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102. Des cellules dendritiques hétérozygotes exprimant I-E^P/I-E^K provenant de souris (B10.P x B6.AKR)F₁ ont été utilisées pour réaliser ces essais, puisque les peptides agonistes et antagonistes doivent être présentés à la surface de la même CPA (Daniel *et al.*, 1998a). Les cellules dendritiques immatures et matures ont été incubées avec différentes concentrations des APLs et l'inhibition de l'activation de l'hybridome T 2.102 a été évaluée selon la production d'IL-2 (figure 11). Ainsi, seulement le peptide antagoniste S69 inhibe l'activation induite par la molécule du CMH II allogénique I-E^P. Contrairement aux tests d'inhibition de la réactivité restreinte au soi où N73 inhibait l'activation de l'hybridome T 2.102 davantage que S69, ce peptide ne semble pas avoir d'effet antagoniste sur l'inhibition de l'alloréactivité. Les peptides nuls E72 et Q72 n'entraînent aucun effet antagoniste sur l'hybridome T 2.102. Les cellules dendritiques immatures et matures présentant le peptide S69 inhibent de façon similaire l'hybridome T 2.102, démontrant une fois de plus que l'antagonisme semble indépendant de l'état de maturation des cellules dendritiques. Nous avons démontré que les peptides antagonistes N73 et S69 pouvaient inhiber la réactivité restreinte au soi de l'hybridome T 2.102 et de

Figure 11. Inhibition de l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 par des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures (A) et matures (B) exprimant I-E^p et I-E^k ont été incubées avec différentes concentrations d'APLs et d'hybridome T 2.102. L'activation de l'hybridome T 2.102 a été mesurée selon la production d'IL-2 à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2. La stimulation de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques est représentée par la ligne pointillée.

A)



B)



cellules T naïves 2.102 et que le peptide antagoniste S69 inhibait l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102.

2. EXPRESSION DES APLS EN FUSION AVEC LA CHAÎNE INVARIANTE

Les cellules dendritiques qui vont être utilisées lors des tests *in vivo* devront exprimées constitutivement les APLs. Ainsi, nous avons décidé d'utiliser un système d'expression des APLs en fusion avec la chaîne invariante afin de maximiser l'expression des peptides à la surface (Sanderson *et al.*, 1995; Nakano, N. *et al.*, 1997). Les différentes constructions d'ADN des APLs en fusion avec la chaîne invariante ont été générées à partir de celle permettant l'expression du peptide Hb(64-76) en fusion avec la chaîne invariante. Cette construction code pour les 209 premiers acides aminés de la chaîne invariante suivie à l'extrémité C-terminale de la séquence du peptide Hb(64-76). Les différentes constructions des APLs ont été générées par la technique d'extension d'amorces par PCR à partir de Hb(64-76)-Ii et sous-clonées dans un vecteur d'expression eucaryote, pcDNA3.1. Ces différentes constructions ont été transfectées de façon transitoire dans les cellules COS-7 avec les chaînes α et β de la molécule du CMH de classe II I-E^k. L'expression à la surface des molécules de CMH II a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps 14.4.4s qui reconnaît la chaîne α de I-E^k (figure 12). Un témoin négatif exprimant seulement Ii sans peptide ajouté à l'extension C-terminale a également été transfecté dans les cellules COS-7. Nous remarquons une très forte augmentation de molécules du CMH II à la surface des cellules COS-7 transfectées avec un peptide en fusion avec la chaîne invariante. Ainsi, l'expression d'un peptide en fusion avec la chaîne invariante dans les cellules COS-7 stabilise beaucoup plus de molécules de CMH II que les cellules COS-7 transfectées avec la chaîne invariante seule, démontrant l'efficacité du système d'expression. Des résultats identiques ont été obtenus suite à l'expression des différents peptides en fusion avec la chaîne invariante (résultats non montrés). Une des fonctions de la chaîne invariante est de guider les molécules du CMH II vers les compartiments endosomaux MIIC où se fait leurs chargements. Par conséquent, la plus grande expression de molécules du CMH II à la surface des cellules

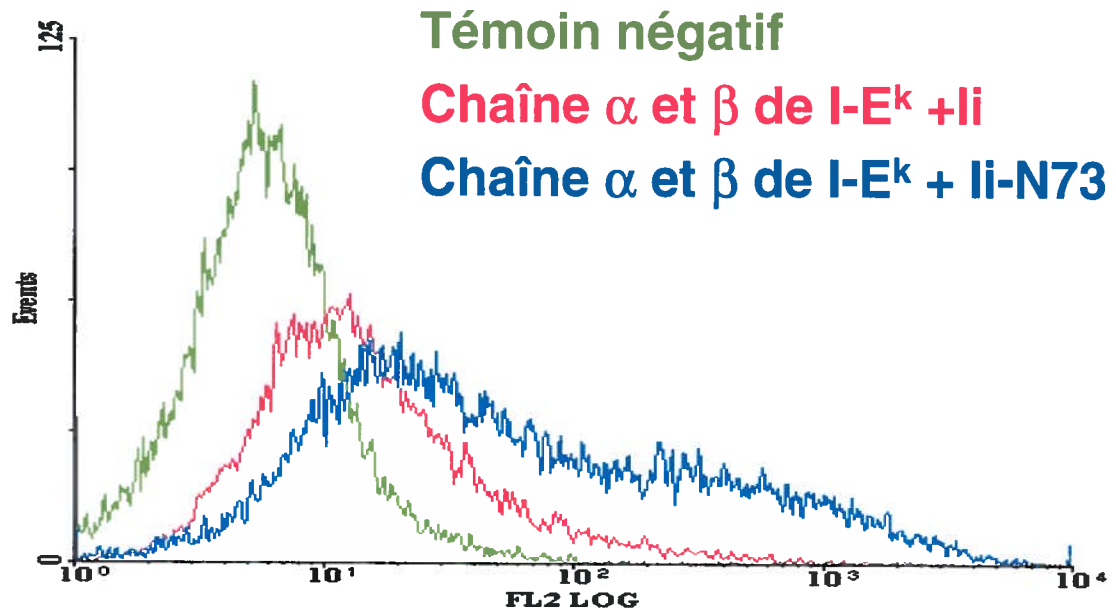


Figure 12 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de I-E^k à la surface des cellules COS-7. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec les différentes constructions APLs-li et la chaîne α et β de I-E^k en utilisant la Lipofectamine 2000. L'expression de I-E^k à la surface a été mesurée par cytométrie en flux 24 heures plus tard en marquant les cellules avec un anticorps spécifique à la chaîne α de I-E^k et avec le conjugué SA-PE. Le témoin négatif représente la fluorescence des cellules COS-7 non transfectées incubées avec l'anticorps reconnaissant I-E^k et le conjugué SA-PE.

transfectées avec la chaîne invariante en fusion avec un peptide suggère qu'une très forte proportion de ces molécules du CMH II présentent nos APLs

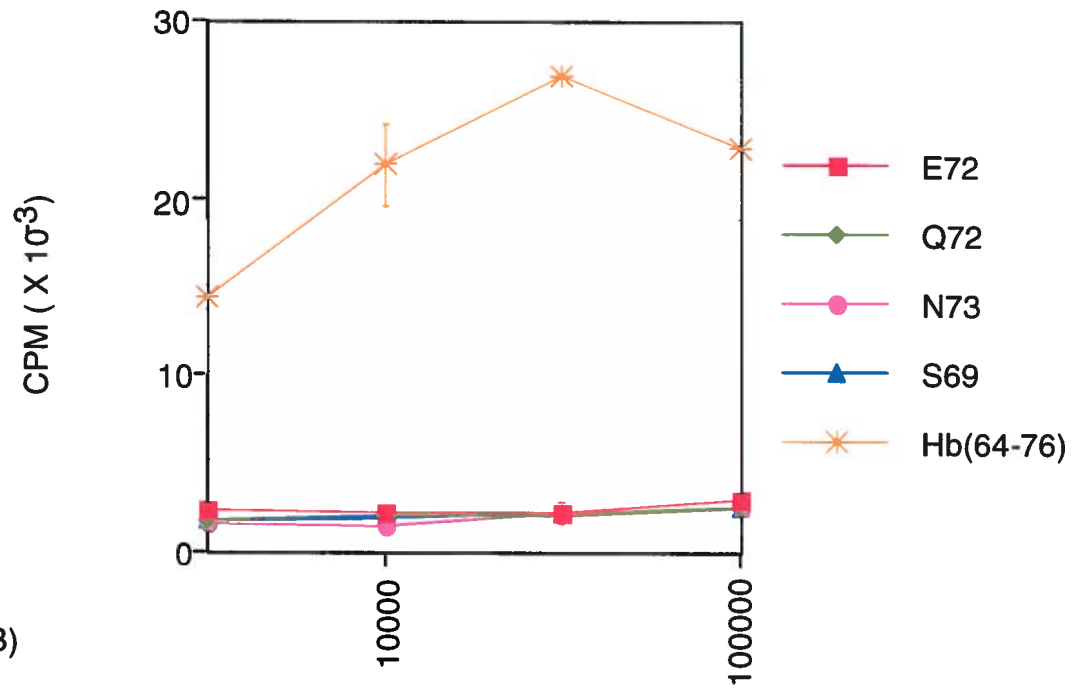
L'expression des APLs à la surface de la cellule a également été confirmée par des tests agonistes et antagonistes en utilisant les cellules COS-7 transfectées avec les différentes constructions en fusion avec la chaîne invariante et les chaînes α et β de I-E^k comme CPA (figure 13A). Seules les cellules COS-7 transfectées avec l'agoniste Hb(64-76)-Ii activent l'hybridome T 2.102. De plus, la réponse de l'hybridome T 2.102 est altérée lorsque les cellules exprimant les APLs N73 et S69 comme CPA pour présenter l'agoniste Hb(64-76) sont utilisées, comparativement aux cellules exprimant Q72 et E72 (figure 13B). Ces résultats confirment l'expression des peptides à la surface des cellules transfectées. Nous pouvons même conclure que les peptides sont fortement exprimés à la surface des cellules puisqu'il y a activation de l'hybridome T 2.102, mais surtout inhibition de la stimulation induite par le peptide Hb(64-76) par les cellules COS-7 exprimant N73 et S69. Par conséquent, le système d'expression des peptides en fusion avec la chaîne invariante est un système efficace pour exprimer des peptides à la surface d'une cellule.

2.1 Mutation des résidus d'ancrage P1, P4, P6 et P9 de Hb(64-76)

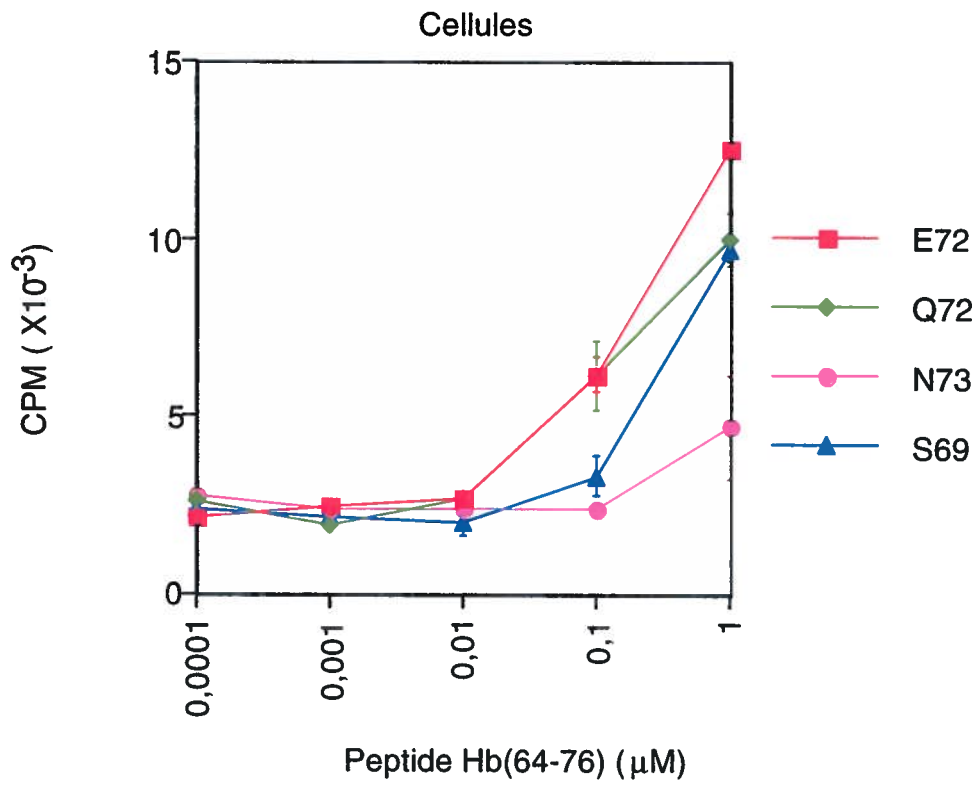
Afin de mieux caractériser le système d'expression li-peptides et de confirmer dans notre système d'expression l'importance de la liaison du peptide pour la stabilisation en surface des complexes peptides/CMH II, nous avons décidé de muter les résidus d'ancrage du peptide Hb(64-76) à la molécule du CMH II I-E^k de Hb(64-76). Il a déjà été démontré que les résidus P1, P4, P6 et P9 étaient les résidus importants pour l'ancrage du peptide Hb(64-76) à I-E^k (Fremont *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2000). Ces résidus ont donc été mutés en alanine, par une technique de mutations par PCR, pour empêcher la liaison du peptide au CMH II. Par la suite, cette nouvelle construction a été cotransfectée dans les cellules COS-7 avec les chaînes α et β de I-E^k et l'expression de I-E^k à la surface a été mesurée par cytométrie en flux (figure 14). Le niveau d'expression de I-E^k à la surface suite à l'expression de la construction mutée est identique au niveau d'expression des

Figure 13. Stimulation et inhibition de l'hybridome T 2.102 par des cellules COS-7 transfectées avec les APLs ou le peptide Hb(64-76). Les cellules COS-7 transfectées avec les différentes constructions et les chaînes α et β de I-E^k ont été utilisées comme CPA pour stimuler l'hybridome T 2.102 (A). Ces cellules transfectées ont également été incubées avec le peptide agoniste Hb(64-76) afin de mesurer l'inhibition de l'activation de l'hybridome T 2.102 par les APLs (B). La stimulation de l'hybridome T 2.102 a été évalué selon la production d'IL-2 à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2.

A)



B)



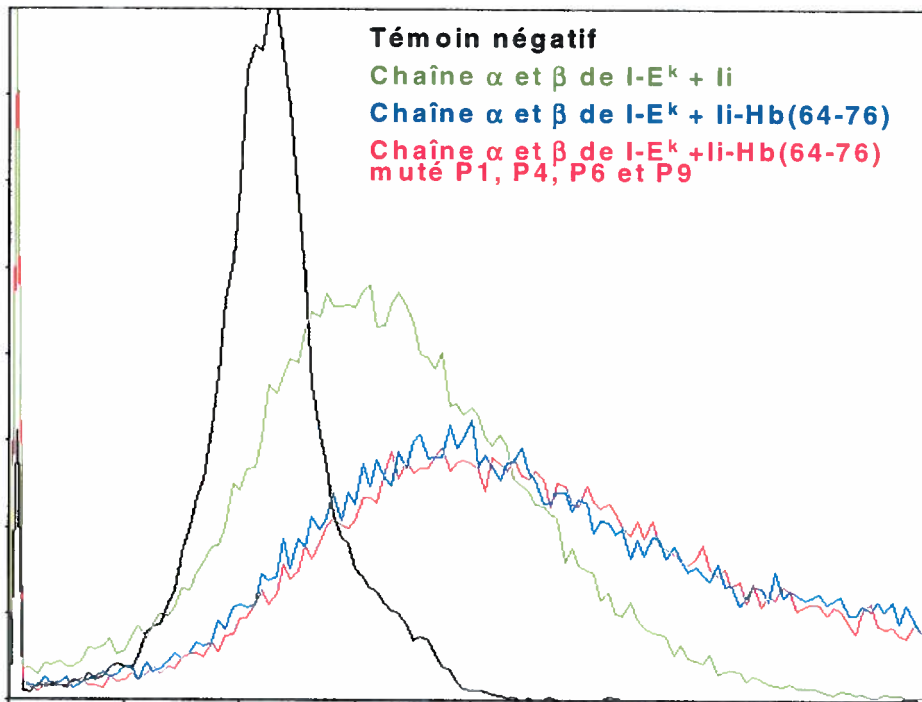


Figure 14. Analyse par cytométrie en flux de l'expression de I-E^k à la surface des cellules COS-7 transfectées avec Hb(64-76) muté P1, P4, P6 et P9. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec les différentes constructions et les chaînes α et β de I-E^k. L'expression de I-E^k à la surface des cellules a été mesurée 24 heures plus tard par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps anti chaîne α de I-E^k. Le témoin négatif représente la fluorescence par les cellules COS-7 non transfectées incubées avec l'anticorps anti-chaîne de I-E et la SA-PE.

cellules transfectées avec la construction Hb(64-76)-Ii. Ces résultats laissant supposé une présentation du peptide Hb(64-76) muté P1, P4, P6, P9 à la surface, nous avons vérifié la capacité stimulatrice de ce peptide muté vis-à-vis l'hybridome T 2.102. Le peptide Hb(64-76) muté P1, P4, P6, P9 stimule que très faiblement l'hybridome T 2.102 (figure 15), ce qui suggère que, même s'il semble se lier à I-E^k, il serait lié dans une conformation différente qui ne permet pas la stimulation maximale de l'hybridome T 2.102. Ainsi, le peptide muté P1, P4, P6, P9 stabilise une aussi grande proportion de molécule I-E^k que le peptide Hb(64-76) à la surface de la cellule, mais n'entraîne pas la même stimulation que ce dernier.

3. GÉNÉRATION DES ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS

Nous avons démontré dans les expériences décrites précédemment l'efficacité des cellules dendritiques à présenter des peptides antagonistes synthétiques. Cependant, pour vérifier la capacité des cellules dendritiques à moduler *in vivo* le rejet de greffe, les cellules dendritiques devront exprimer constitutivement les peptides antagonistes. Il a été démontré que la transfection des cellules dendritiques avec des agents liposomaux ne donnent pas une bonne efficacité de transfection (Yang, S. *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2000; Rughetti *et al.*, 2000). Ainsi, d'autres techniques existent pour obtenir un grand nombre de cellules dendritiques transfectées, dont l'utilisation d'adénovirus recombinants non répliquatifs. Ceux-ci peuvent être utilisés pour transférer les cellules dendritiques et ainsi obtenir un plus grand nombre de cellules dendritiques exprimant les APLs. Nous avons démontré que l'expression des APLs en fusion avec la chaîne invariante permettait d'exprimer un niveau adéquat de peptides à la surface des cellules COS-7. Par conséquent, ces constructions ont été sous-clonées dans un vecteur de transfert adénovirus qui contient la protéase PS, une protéine essentielle impliquée dans plusieurs étapes du cycle viral, la GFP ainsi que des séquences homologues à l'adénovirus de type 5 (Elahi *et al.*, 2002). Ainsi, il pourra y avoir recombinaison homologue *in vivo* si des cellules 293 sont infectées avec un adénovirus de type 5 et transfectées avec le vecteur de transfert (figure 16). L'adénovirus de type 5 utilisé est déficient pour les gènes E1, E3, E4 excepté l'orf 6 et la protéase de l'adénovirus. Ceci rend l'adénovirus incapable de se répliquer

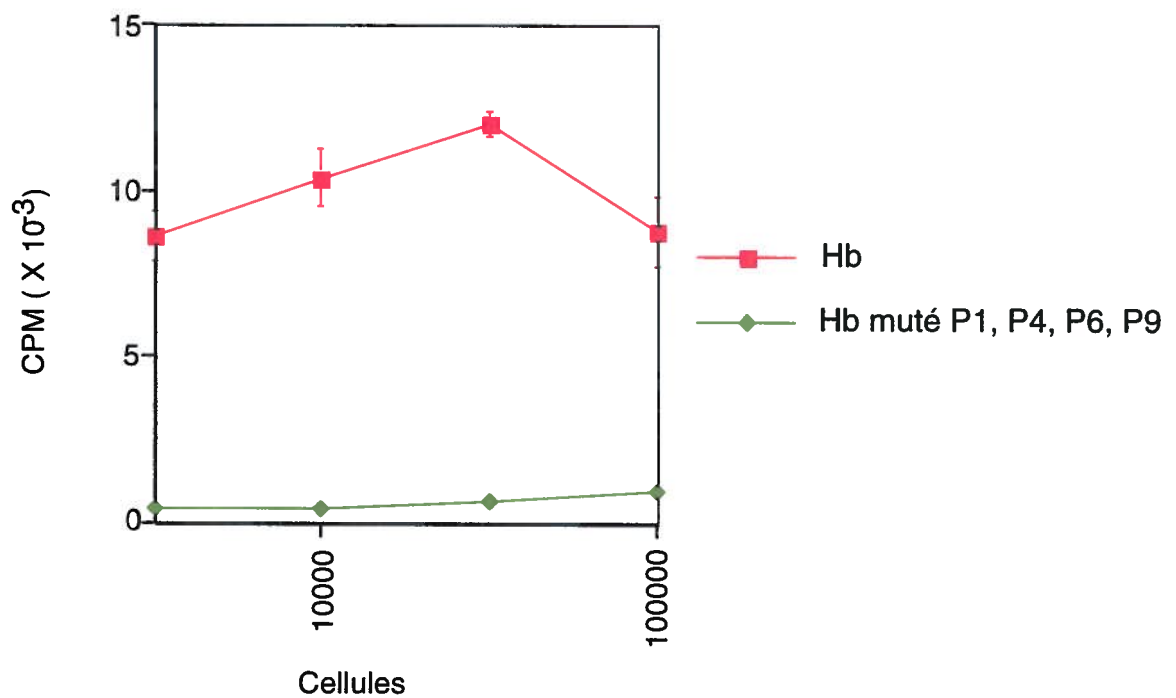
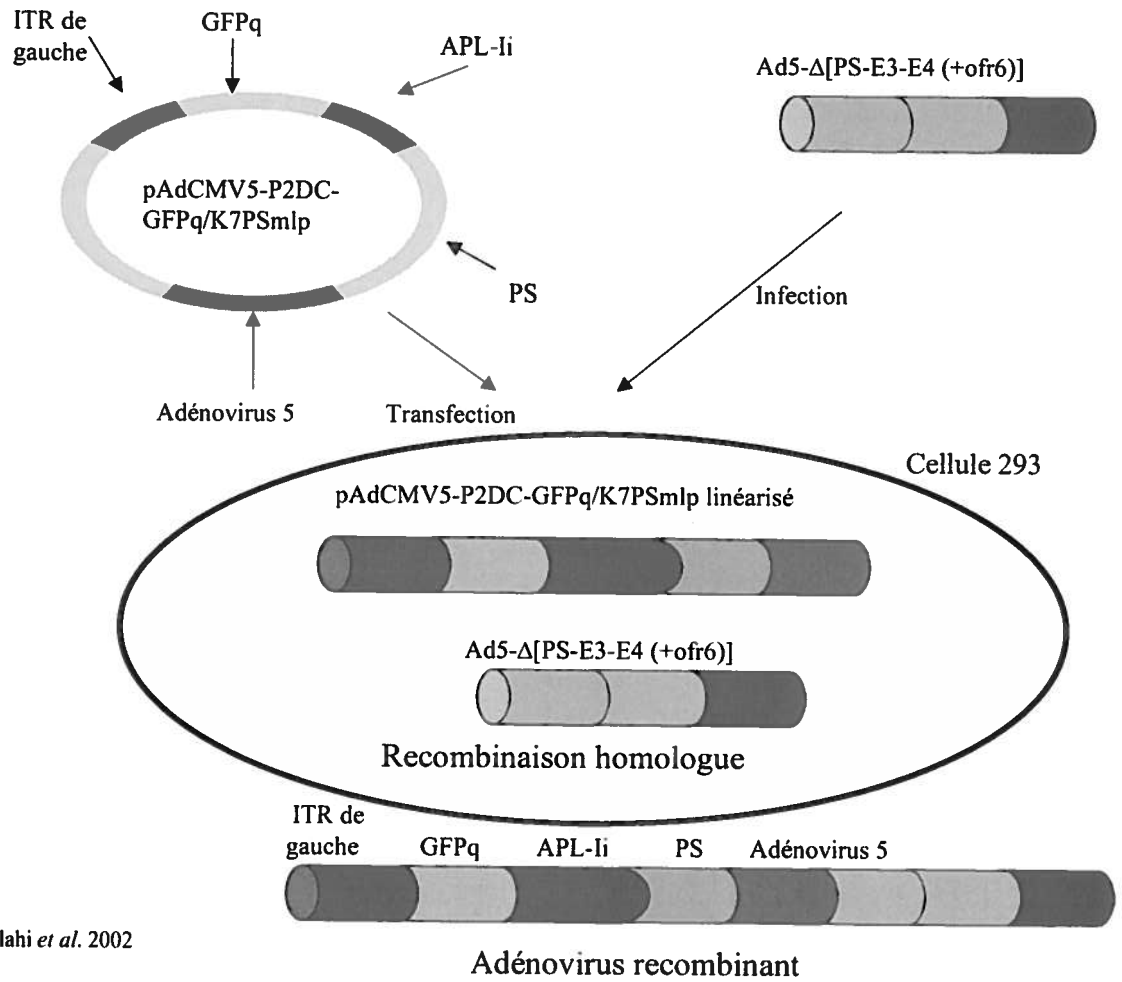


Figure 15. Stimulation de l'hybridome T 2.102 par le peptide Hb(64-76) muté aux résidus P1, P4, P6 et P9. Les cellules COS-7 transfectées avec une construction li-Hb(64-76) ou Hb(64-76) mutés P1, P4, P6 et P9 ont été utilisées comme CPA pour activer l'hybridome T 2.102. La stimulation de l'hybridome a été mesurée selon la production d'IL-2 à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2.



Adapté de Elahi *et al.* 2002

Figure 16 : Mécanisme de recombinaison homologue *in vivo* pour générer les adénovirus recombinants.

sauf dans les cellules permissives qui contiennent les gènes E1 et PS. Lors de la recombinaison homologue *in vivo*, l'adénovirus acquérira l'insert, c'est-à-dire nos constructions en fusion avec la chaîne invariante et la protéase, rendant celui-ci capable de se répliquer dans les cellules 293 qui expriment le gène E1. Cependant, lors de l'infection de cellules dendritiques avec cet adénovirus, il ne pourra pas y avoir de réplication dû à l'absence du gène E1 dans les cellules dendritiques.

Les constructions APLs-Ii ont été sous-cloné au site de restriction *Bgl* II du vecteur de transfert pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp. Ce vecteur a ensuite été transfecté dans les cellules 293ACYMR et les cellules ont été infectées avec l'adénovirus Ad5-Δ[PS, E1, E3, E4 (+ orf6)]. Parmi les adénovirus recombinants obtenus, un adénovirus recombinant de chaque construction APLs-Ii a été sélectionné, purifié, amplifié et titré. Le titre final des adénovirus n'a pas été aussi élevé que prévu, soit un maximum de l'ordre de 10^8 PFU/ml au lieu d'un titre attendu de l'ordre de 10^9 PFU/ml, puisqu'il est possible dans des conditions optimales de produire des adénovirus à un titre de l'ordre de 10^{10} PFU/ml. Cependant, ces adénovirus ont été utilisés pour infecter différents types cellulaires et réaliser des essais préliminaires d'agonismes et d'antagonismes.

3.1 Inhibition de l'activation de cellules T 2.102 par des cellules CHO-E^k infectées avec des adénovirus recombinants

Tout d'abord, des essais d'agonismes et d'antagonismes ont été effectués avec des cellules plus facile à infecter étant donné que le titre des adénovirus recombinants était peu élevé, soit des CHO-E^k. Les cellules CHO-E^k sont des cellules CHO transfectées de façon stable avec les chaînes α et β de I-E^k, donc exprimant la molécule du CMH II I-E^k à sa surface (Daniel *et al.*, 1998b). Les cellules ont été infectées à une MOI de 100 pendant 16-20 heures dans un volume de 5 ml. Ces cellules ont ensuite été utilisées pour stimuler l'hybridome T 2.102 ou inhiber la stimulation induite par le peptide Hb(64-76). Seules les cellules infectées avec l'adénovirus recombinant Hb(64-76) stimulent l'hybridome T 2.102 (figure 17). Il n'y a aucune stimulation par les cellules infectées avec les autres

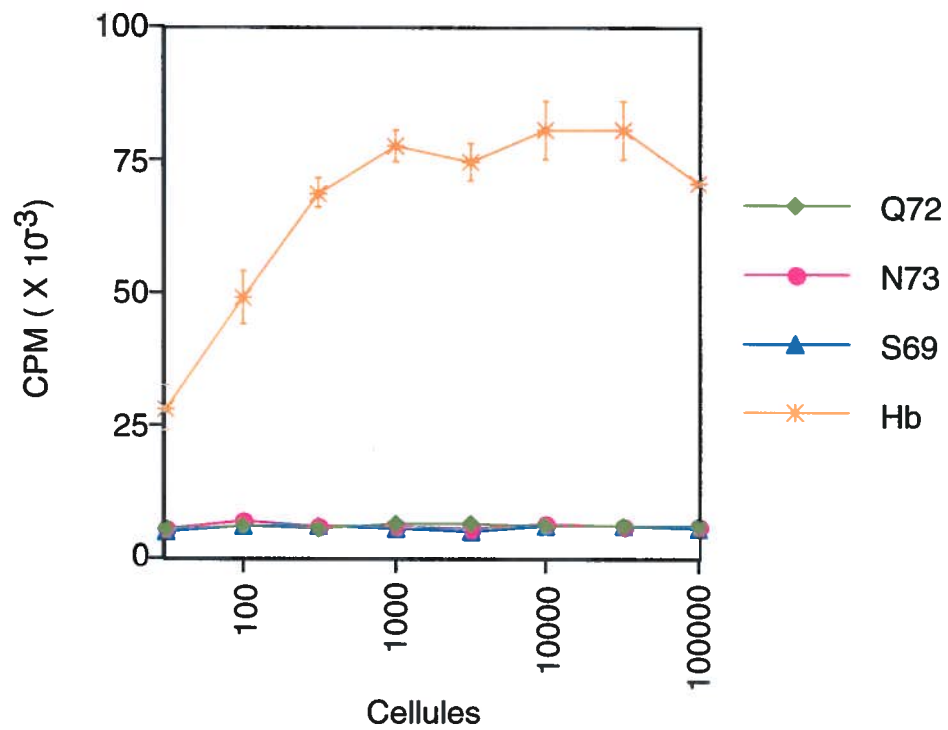


Figure 17. Stimulation de l'hybridome T 2.102 par les cellules CHO-E^k infectées avec les adénovirus recombinants. Les cellules CHO-E^k ont été infectées avec les différents adénovirus recombinants à une MOI de 100. Le lendemain, ces cellules ont été utilisées pour stimuler l'hybridome T 2.102. La stimulation de l'hybridome T 2.102 a été mesurée selon la production d'IL-2 à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2.

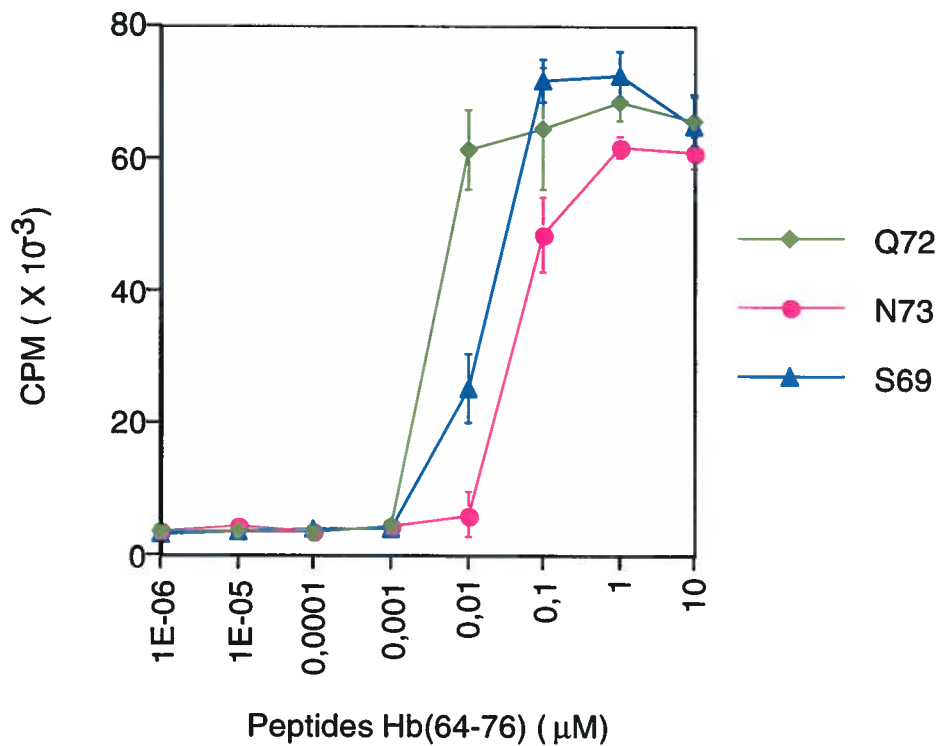


Figure 18. Inhibition de l'hybridome T 2.102 par les cellules CHO-E^k infectées avec les adénovirus recombinants. Les cellules CHO-E^k ont été infectées à une MOI de 100 par les différents adénovirus recombinants et utilisées comme CPA pour effectuer des tests antagonistes avec l'hybridome T 2.102. Ainsi, les cellules infectées ont été incubées avec différentes concentrations du peptide Hb(64-76) et l'hybridome T 2.102. L'activation de l'hybridome T a été mesurée selon la production d'IL-2 à l'aide de la lignée cellulaire CTLL-2.

adénovirus recombinants, démontrant ainsi que la stimulation est spécifique au peptide agoniste Hb(64-76). Le peptide semble également fortement exprimé à la surface des cellules puisque moins de 100 cellules sont nécessaires pour induire une réponse. Par la suite, des essais d'antagonismes ont été réalisés avec les cellules infectées (figure 18). La stimulation de l'hybridome T 2.102 est diminuée par les cellules infectées avec les adénovirus recombinants exprimant les peptides antagonistes N73 et S69 comparativement aux cellules infectées avec l'adénovirus recombinant Q72. Les peptides sont présents à la surface de la cellule à un niveau suffisant pour inhiber la réponse de l'hybridome T 2.102 à une concentration de moins de 0,1 μM de peptides Hb(64-76). Ces résultats démontrent une fois de plus que la stratégie d'expression des peptides en fusion avec li permet d'obtenir un bon niveau d'expression de peptides à la surface des cellules. Ces résultats confirment également que les adénovirus recombinants sont fonctionnels et expriment bien les APLs.

3.2 Activation de cellules T 2.102 par des cellules dendritiques infectées avec l'adénovirus recombinant Hb(64-76)

Les essais d'agonismes et d'antagonismes avec les cellules CHO-E^k ayant donné de bons résultats, des essais préliminaires ont été réalisés avec des cellules dendritiques immatures différenciées à partir de précurseur de la moelle osseuse de souris B6.AKR. Les cellules ont été infectées dans le plus petit volume possible à une MOI de 100. Les cellules dendritiques auraient normalement dû être infectées dans un volume de 200 μl , mais comme le titre des adénovirus n'était pas assez élevé, elles ont plutôt été infectées dans un volume de 2 ml. Les cellules dendritiques immatures infectées ont ensuite été analysées en cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de cellules infectées. Ainsi, étant donné la présence de la GFPq dans les adénovirus recombinants, il était facile de vérifier par cytométrie en flux, la quantité de cellules dendritiques infectées. Le pourcentage de cellules infectées était très faible, soit moins de 2% de cellules infectées (résultats non montrés). Des essais d'agonismes et d'antagonismes ont tout de même été réalisés avec ces cellules dendritiques immatures infectées. Tout d'abord, les cellules

dendritiques immatures infectées avec les adénovirus recombinants ont été utilisées pour stimuler l'hybridome T 2.102. Seules les cellules dendritiques infectées avec l'adénovirus recombinant Hb(64-76) ont stimulé l'hybridome T 2.102 (figure 19). Les autres cellules dendritiques infectées avec les adénovirus recombinants Q72, N73 ou S69 n'ont pas activé l'hybridome T 2.102, démontrant une fois de plus que la stimulation est spécifique au peptide Hb(64-76). Quant aux essais d'antagonismes réalisés avec ces cellules dendritiques, aucune inhibition de la stimulation de l'hybridome T 2.102 n'a été observée même avec les cellules infectées avec les adénovirus recombinants exprimant les peptides antagonistes N73 et S69 (figure 20). Cependant, étant donné le pourcentage très faible de cellules infectées par les adénovirus recombinants, d'autres tests devront être effectués avec un titre plus élevé d'adénovirus recombinants.

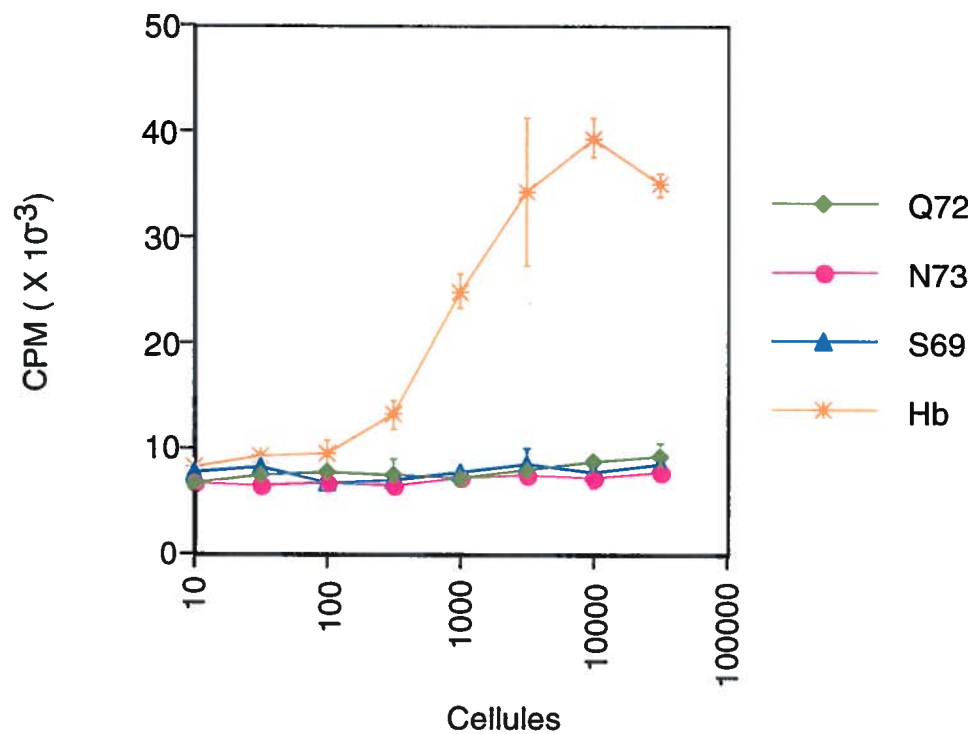


Figure 19. Stimulation de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques infectées avec les adénovirus recombinants. Les cellules dendritiques ont été infectées avec les adénovirus recombinants à une MOI de 100 pendant 2 heures, puis elles ont été utilisées pour stimuler l'hybridome T 2.102. La stimulation de l'hybridome T 2.102 a été évaluée selon la production d'IL-2.

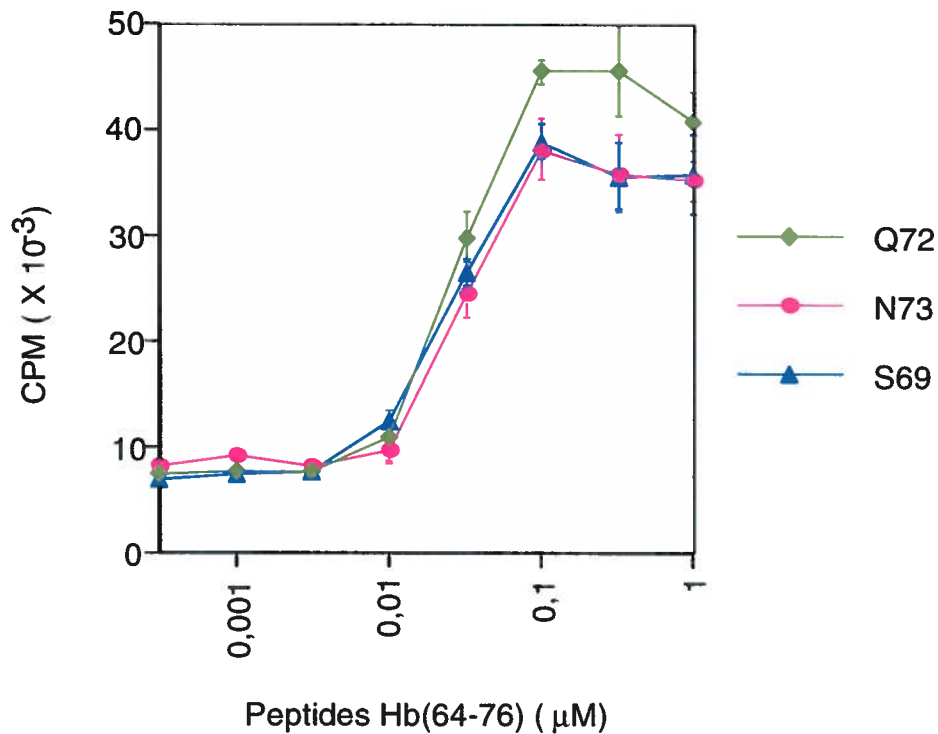


Figure 20. Inhibition de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques infectées avec les adénovirus recombinants. Les cellules dendritiques ont été infectées pendant 2 heures à une MOI de 100 et utilisées pour effectuer des tests antagonistes. Les cellules infectées ont été incubées en présence de différentes concentrations de Hb(64-76) et de l'hybridome T 2.102. La stimulation de l'hybridome a été mesurée selon la production d'IL-2.

DISCUSSION

1. CELLULES DENDRITIQUES

Le but du projet était d'évaluer la capacité des cellules dendritiques à présenter des APLs pour inhiber la réponse des cellules T et de développer une stratégie d'expression des APLs dans un vecteur adénovirus. Des essais d'antagonisme avec un lymphome B présentant des APLs ont démontré qu'il était possible d'inhiber la réponse de cellules T naïves et de lignées cellulaires Th1 et Th2 (Daniel *et al.*, 1998a). Étant donné que les cellules dendritiques sont d'excellentes CPA, nous voulons utiliser ces cellules pour présenter les APLs et moduler le rejet de greffe *in vivo*. Ainsi, les cellules dendritiques exprimant constitutivement les APLs vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et inhiber la réponse des cellules T naïves (Banchereau *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Merad *et al.*, 2000). Cependant, avant d'effectuer ces tests, il fallait effectuer des essais d'antagonismes *in vitro* avec les cellules dendritiques comme CPA. Aucune étude préalable n'avait jusqu'à maintenant comparée la capacité des cellules dendritiques immatures et matures à induire l'antagonisme de cellules T par la présentation de peptides. Nous avons décidé d'utiliser des cellules dendritiques différenciées à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris, car la quantité de cellules dendritiques obtenues est beaucoup plus élevée que par une technique d'isolation de cellules dendritiques à partir de la rate. Cette méthode nous a permis d'obtenir des cellules dendritiques immatures qui ont été activées et différenciées en cellules dendritiques matures. Ces cellules dendritiques ont été caractérisées par cytométrie en flux et, tel qu'attendu nous avons noté une différence d'expression des molécules de costimulation et des molécules du CMH II entre les cellules dendritiques immatures et matures (figure 5).

Des tests de présentation d'antigènes ont permis de vérifier la capacité des cellules dendritiques à présenter des peptides à l'hybridome T 2.102 et aux cellules T transgéniques naïves. Les résultats obtenus ont démontré que les cellules dendritiques immatures et matures stimulent de façon comparable l'hybridome T 2.102 et également les cellules T naïves (figure 6, 7, 8). Aucune différence notable entre la stimulation de cellules T naïves induite par les cellules dendritiques immatures ou matures n'a pu être

démontrée. Quant à la stimulation avec l'hybridome T, nous nous attendions à une stimulation comparable peu importe si les cellules dendritiques étaient immatures ou matures, puisque l'activation des hybridomes est moins dépendante des molécules de costimulation. Cependant, en ce qui concerne les cellules T naïves, nous pouvions présumer que les cellules dendritiques matures stimuleraient beaucoup plus les cellules T naïves que les cellules dendritiques immatures étant donné la forte expression de molécules de costimulation. Néanmoins, la stimulation des cellules T naïves a été induite par un agoniste fort, Hb(64-76), ou la molécule allogénique I-E^P qui elle aussi engendre une réponse très forte. Dans ce contexte antigénique, la présence de molécules de costimulation n'est donc probablement pas réellement nécessaire pour engendrer une réponse d'où l'absence de différence de stimulation entre les cellules dendritiques immatures et matures (Kissler *et al.*, 2002). L'utilisation d'un agoniste faible pour stimuler les cellules T naïves par les cellules dendritiques immatures et matures engendrerait probablement une réponse différente, puisque, dans ce cas-ci, les molécules de costimulation joueraient un rôle plus important. De plus, lors des essais d'agonismes et d'antagonismes, la manipulation des cellules dendritiques peut être responsable de l'absence de différence observée entre la stimulation des cellules T naïves par les cellules dendritiques immatures et matures. Ainsi, la suspension cellulaire de cellules dendritiques immatures pouvait être plutôt hétérogène, c'est-à-dire contenir des cellules dendritiques déjà matures. De plus, l'incubation prolongée des cellules dendritiques avec les cellules T naïves a peut-être permis aux cellules dendritiques immatures de devenir des cellules dendritiques matures. Par conséquent, il serait important de vérifier les caractéristiques phénotypiques des cellules dendritiques à la fin des essais agonistes et antagonistes.

1.1 Tests antagonistes

La capacité des cellules dendritiques à inhiber la réactivité restreinte au soi et l'alloréactivité a été déterminée par des tests d'antagonismes avec des peptides synthétiques. Nous avons utilisé les cellules dendritiques immatures et matures pour effectuer les tests antagonistes afin de déterminer si l'état de maturation de la cellule dendritique pouvait influencer sur le mécanisme de l'antagoniste. Ceci nous permettra de

définir les meilleures cellules dendritiques pour les tests *in vivo*. Les tests antagonistes ont clairement démontré que les cellules dendritiques immatures et matures pouvaient inhiber la réactivité restreinte au soi de l'hybridome T 2.102 et également des cellules T 2.102 naïves (figure 9, 10). Cependant, les tests d'antagonismes pour inhiber l'alloréactivité ont donné des résultats moins concluants. Le peptide antagoniste S69 a inhibé légèrement la réponse de l'hybridome T 2.102 tandis que le peptide N73 n'a entraîné aucune inhibition de la réponse de l'hybridome T 2.102 alors qu'il était le meilleur antagoniste dans la réactivité restreinte au soi (figure 11). De plus, l'inhibition de l'alloréactivité de cellules T naïves n'a pas pu être démontré de façon significative. L'utilisation de cellules T CD4⁺ isolées de lignée de souris 2.102TgRAG⁻ au lieu de lignée de souris 2.102Tg aurait peut-être donné de meilleurs résultats et serait envisageable puisque toutes les cellules T posséderaient le TCR 2.102. La différence observée entre l'alloréactivité et la réactivité restreinte au soi avec les peptides N73 et S69 pourrait s'expliquer par les deux molécules du CMH II impliquées dans l'alloréactivité, soit I-E^P et I-E^k, tandis que dans la réactivité restreinte au soi, seule la molécule I-E^k est présente.

En effet, il a été démontré que les molécules du CMH II étaient présentes sous forme de dimères à la surface des cellules (Schafer *et al.*, 1994). Il semblerait que lorsque la CPA n'est pas activée, les CMH II ne seraient pas dimérisées, mais que l'activation induirait la dimérisation des CMH II (Schafer *et al.*, 1995; Triantafilou *et al.*, 2000). Ces dimères de CMH II seraient très importants pour l'activation de la cellule T. Ils seraient retrouvés principalement au centre de la synapse immunologique où ils interagiraient avec le TCR aussi dimérisé. Cette interaction de dimères de TCR et de dimères de CMH II serait beaucoup plus longue et plus stable qu'une interaction de monomère de CMH/TCR. Ainsi, dans le cas de la cellule T 2.102, l'interaction du TCR avec les complexes CMH/peptides de dimères I-E^P/I-E^k serait modifiée comparativement à l'interaction avec les complexes CMH/peptides I-E^k/ I-E^k d'où la réponse différente observée. De plus, ces dimères de CMH II pourraient être importants dans le mécanisme de l'antagonisme. En effet, Chmielowski et collaborateurs ont démontré que les complexes CMH/peptides nuls avaient tendance à être exclus de la synapse immunologique (Chmielowski *et al.*, 2002). Cependant, lorsque des peptides antagonistes

étaient présentés, ce mécanisme d'exclusion était absent. Par conséquent, les dimères de complexes CMH/peptides où il y a présence d'un peptide agoniste et antagoniste pourraient jouer un rôle important dans le mécanisme de l'antagonisme. De plus, plusieurs équipes ont démontré que pour avoir un effet antagonisme, les peptides agonistes et antagonistes devaient être présentés à la surface de la même CPA (Daniel *et al.*, 1998a; Dittel *et al.*, 1999; Frasca *et al.*, 1999). Ceci pourrait appuyer l'importance de la dimérisation dans le mécanisme de l'antagonisme. Néanmoins, d'autres équipes ont démontré que l'antagonisme pouvait également s'effectuer si le peptide agoniste et antagoniste était présenté sur des CPA différentes (Kent *et al.*, 1997; Preckel *et al.*, 1997; Gilbert *et al.*, 1998). Cependant, la plupart de ces études ont été effectuées avec des cellules T CD8⁺, donc avec des dimères de CMH I. Par conséquent, il est possible que le mécanisme de l'antagonisme soit très complexe et diffère selon les molécules du CMH impliquées.

Afin de mieux définir l'implication de la dimérisation de complexes hétérogènes I-E^P/I-E^k, il serait intéressant de caractériser des peptides antagonistes se liant à la molécule du CMH II I-E^P et d'effectuer divers tests antagonistes avec ces nouveaux peptides. Un allomimotope, nommé EPM, stimulant l'alloréactivité de la cellule T 2.102 a déjà été identifié par criblage d'une banque peptidique combinatoire (Daniel *et al.*, 1998b). Ce peptide pourrait être utilisé pour caractériser des APLs et ainsi réaliser des essais d'antagonisme avec la molécule du CMH II I-E^P.

Nous avons effectué les essais d'agonisme et d'antagonisme uniquement avec des cellules dendritiques provenant de précurseurs de la moelle osseuse de souris, donc d'origine myéloïde pour une raison pratique de quantité de cellules dendritiques. Cependant, il semble que les différentes populations de cellules dendritiques pourraient avoir des fonctions différentes dans le système immunitaire. Ainsi, certaines cellules dendritiques, comme les cellules lymphoïdes CD8⁺ seraient plus impliquées dans le maintien de la tolérance périphérique que les cellules myéloïdes CD8⁻ (Coates *et al.*, 2002). Par conséquent, il serait intéressant d'effectuer des essais d'antagonisme avec différentes populations de cellules dendritiques afin de comparer leurs propriétés. Des

cellules isolées de la rate, donc d'origine lymphoïde, donneraient peut-être des résultats différents. Si ces cellules sont beaucoup plus efficace dans le maintien de la tolérance périphérique, l'inhibition de la réponse pourrait être plus importante. Aussi, des tests antagonismes avec des cellules de Langerhans isolées de la peau pourraient être très intéressant, puisque lors des greffes de peau dans le modèle 2.102, ces cellules doivent jouer un rôle important. En effet, il a déjà été démontré que les cellules de Langerhans migrent rapidement vers les organes lymphoïdes secondaires lors de greffes de peau (Richters *et al.*, 1999). Donc, l'utilisation de ces cellules dendritiques lors des tests *in vivo* pourraient nous donner des résultats différents.

2. EXPRESSION DES PEPTIDES EN FUSION AVEC LA CHAÎNE INVARIANTE

Lors des tests *in vivo*, les cellules dendritiques devront exprimées constitutivement les APLs afin d'obtenir une expression suffisante de peptides à la surface de celles-ci. Nous avons décidé de choisir une méthode permettant de diriger nos peptides vers les compartiments endosomaux, en exprimant nos peptides en fusion avec la chaîne invariante. La chaîne invariante a pour fonction, entre autres, de stabiliser les molécules du CMH II et de les orienter vers les compartiments endosomaux MIIC (Cresswell, 1994). Par conséquent, les peptides en fusion avec la chaîne invariante vont également être guidés vers les compartiments endosomaux où ils pourront être chargés sur les molécules du CMH II et exprimés à la surface de la cellule. Nous avons démontré par deux méthodes indirectes que nos peptides se retrouvaient bien exprimés à la surface des cellules. Tout d'abord, les résultats obtenus par cytométrie en flux ont permis de démontrer qu'il y avait une plus grande expression de molécules du CMH II à la surface des cellules COS-7 transfectées avec la chaîne invariante en fusion avec un peptide que la chaîne invariante seule (figure 12). Ces résultats suggéraient que la plus grande stabilisation de molécules du CMH II était occasionnée par nos peptides, ceux-ci occupant la molécule du CMH II. Afin de confirmer que l'expression des peptides en fusion avec la chaîne invariante permet bien une plus grande expression de peptides à la surface, il faudrait démontrer que la quantité de protéines synthétisées par les cellules lors

des transfections est identique. Ceci pourrait être vérifié par FACS intra-cellulaire avec un anticorps dirigé contre la chaîne invariante ou par immunobuvardage de type Western avec le même anticorps. Les tests de présentation d'antigènes et les tests d'antagonismes avec les cellules COS-7 transfectées ont permis de démontrer que les peptides étaient exprimés à la surface à un niveau suffisant pour influencer la réponse de l'hybridome T 2.102 (figure 13). Par conséquent, l'expression de peptides en fusion avec la chaîne invariante est un moyen efficace d'exprimer des peptides à la surface d'une cellule.

Pour bien caractériser le système d'expression d'un peptide en fusion avec la chaîne invariante, nous avons muté les résidus d'ancrage du peptide Hb(64-76) à la molécule du CMH II I-E^k. Ainsi, nous voulions exprimer un peptide en fusion avec la chaîne invariante qui ne se lie pas à la molécule I-E^k. Les résidus P1, P4, P6 et P9 de Hb(64-76) ayant déjà été identifiés comme les résidus d'ancrage à la molécule I-E^k (Fremont *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2000), ils ont été mutés en alanine. Cependant, nous avons démontré que même ce peptide muté semble se lier à I-E^k et stabilise une aussi grande proportion de molécules I-E^k que Hb(64-76) non muté (figure 14). Un test de présentation d'antigènes a permis de conclure que le peptide était présenté de manière altéré puisqu'il n'y avait qu'une très faible stimulation de l'hybridome T 2.102 (figure 15). Ainsi, le peptide muté se lierait dans une conformation différente de Hb(64-76) puisque les résidus interagissant avec le TCR 2.102 ne sont plus accessibles pour celui-ci. Il a déjà été démontré que les résidus situés aux extrémités de la séquence peptidique pouvaient également jouer un rôle important pour la stabilisation des peptides dans la niche peptidique (Nelson *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1994). Ainsi, il serait intéressant de muter quelques résidus aux extrémités, par exemple P-1, P-2, P-3 et P-4, et de vérifier s'il y a encore stabilisation d'une plus grande proportion de molécules I-E^k à la surface des cellules.

3. ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS

Les adénovirus recombinants ont été choisis pour infecter les cellules dendritiques afin d'obtenir des cellules dendritiques exprimant constitutivement les

peptides antagonistes. Le choix d'utiliser un vecteur adénovirus reposait tout d'abord sur la facilité à générer par recombinaison homologue les adénovirus recombinants. Les adénovirus infectent assez facilement les cellules dendritiques immatures et surtout matures, contrairement aux rétrovirus qui infectent seulement les cellules en division, donc ne peuvent infecter les cellules dendritiques matures. Ainsi, normalement avec une MOI entre 50 et 100, il est possible d'obtenir 80% de cellules infectées. De plus, il est habituellement possible d'obtenir un titre de l'ordre de 10^9 et même de 10^{10} lors de l'amplification des adénovirus. Par conséquent, des adénovirus recombinants exprimant les APLs et le peptide agoniste Hb(64-76) ont été générés. Malheureusement, le titre des adénovirus recombinants obtenu lors des amplifications n'a pas été aussi élevé que prévu, soit un maximum de l'ordre de 10^8 . Donc, lors d'infections des cellules avec les adénovirus recombinants, il a été impossible d'infecter les cellules dans un volume plus petit que 2 ml d'adénovirus recombinants. Pour remédier à ce problème, l'utilisation de cellules 293A en suspension serait une bonne alternative pour obtenir un titre plus élevé, puisque la concentration cellulaire serait beaucoup plus élevée et, par conséquent la concentration en virus également.

3.1 Infection des cellules CHO-E^k

Les cellules dendritiques différenciées à partir de la moelle osseuse étant des cellules très fragiles dont la culture nécessite des conditions particulières, nous avons tout d'abord infecté des cellules CHO-E^k avec les adénovirus recombinants dans le plus petit volume possible. Ceci ne représente pas les conditions d'infection que nous voulions utiliser, mais nous voulions tout d'abord vérifier l'infection par les adénovirus recombinants et la fonctionnalité des adénovirus recombinants, c'est-à-dire l'expression des APLs. Ainsi, les cellules CHO-E^k infectées avec les adénovirus recombinants ont été utilisés pour réaliser des tests de présentation d'antigènes et d'antagonistes. Les cellules CHO-E^k infecté avec l'adénovirus recombinant Hb(64-76) ont stimulé l'hybridome T 2.102 (figure 17) et les cellules infectées avec les adénovirus recombinants N73 et S69 ont inhibé la réponse de l'hybridome T 2.102 (figure 18). Ainsi, nous avons démontré l'activité fonctionnelle des adénovirus puisqu'ils sont capables d'infecter les cellules et

d'exprimer les APLs.

3.2 Infection des cellules dendritiques

Par la suite, nous avons vérifié si les adénovirus recombinants pouvaient infecter une grande proportion de cellules dendritiques, et ce à une MOI de 100 ou moins. Cependant, étant donné le titre peu élevé, les cellules dendritiques n'ont pu être infectées dans le volume désiré. Elles ont été infectées dans un volume 20 fois supérieur au volume prévu. Nous avons tout de même pu démontrer la stimulation de l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques immatures infectées avec l'adénovirus recombinant Hb(64-76) (figure 19). L'antagonisme par les adénovirus recombinants N73 et S69 n'a pas pu être démontré (figure 20). Cependant, comme les données en cytométrie indiquaient moins de 2% de cellules dendritiques exprimant la GFP, la proportion de cellules dendritiques présentant le peptide Hb(64-76) était de loin supérieur aux cellules exprimant les APLs. Donc, nous pouvons présumer que l'effet antagonisme des peptides n'a pas été observé étant donné ce faible pourcentage de cellules dendritiques infectées. L'obtention d'un titre élevé aurait permis de définir les meilleures conditions d'infection. Les cellules dendritiques pourraient être infectées à une MOI inférieure à 100 afin d'évaluer le pourcentage de cellules infectées et également le taux de mortalité des cellules dendritiques. De plus, comme le volume total lors de l'infection joue un rôle primordial, celui-ci pourrait être ajusté afin d'obtenir le meilleur taux de transfection. Le temps d'infection est un autre paramètre important qui devrait être ajusté afin d'obtenir les conditions optimales d'infection.

De plus, les conséquences de l'infection par les adénovirus recombinants sur la maturation des cellules dendritiques n'ont pas été déterminées. Pour effectuer les tests, nous avons utilisé seulement des cellules dendritiques immatures. L'infection de cellules dendritiques matures versus des cellules dendritiques immatures pourrait ne pas être identique. Lors de la culture des cellules dendritiques *in vitro*, celles-ci semblaient beaucoup plus fragiles que les cellules dendritiques immatures puisque la quantité de cellules dendritiques matures obtenues était plus faible. Par conséquent, les cellules

dendritiques matures pourraient être moins résistantes lors d'infection avec les adénovirus recombinants. Les conséquences de l'infection de l'adénovirus recombinant sur les propriétés des cellules dendritiques n'ont également pas été déterminées. Plusieurs équipes ont démontré que l'infection par des adénovirus entraînaient la maturation des cellules dendritiques tandis que d'autres équipes ont démontré que l'adénovirus était un moyen efficace et non perturbant pour transférer des cellules dendritiques (Rea *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1999; Morelli *et al.*, 2000). Ainsi, comme les essais d'antagonismes vont être réalisés avec des cellules dendritiques immatures et matures, il serait primordial de définir l'impact de l'infection par l'adénovirus sur les cellules dendritiques. Dans le cas où les cellules dendritiques deviendraient matures par l'infection de l'adénovirus, il serait possible d'inhiber la maturation des cellules dendritiques avec l'IL-10 ou le TGF- β . L'infection de cellules dendritiques avec un adénovirus exprimant le TGF- β a déjà été démontré comme efficace pour empêcher la maturation des cellules dendritiques (Lee *et al.*, 1998). Ainsi, plusieurs paramètres restent à optimiser afin d'obtenir les meilleures conditions d'infection et pour caractériser les effets des adénovirus recombinants sur les cellules dendritiques.

4. TESTS *IN VIVO*

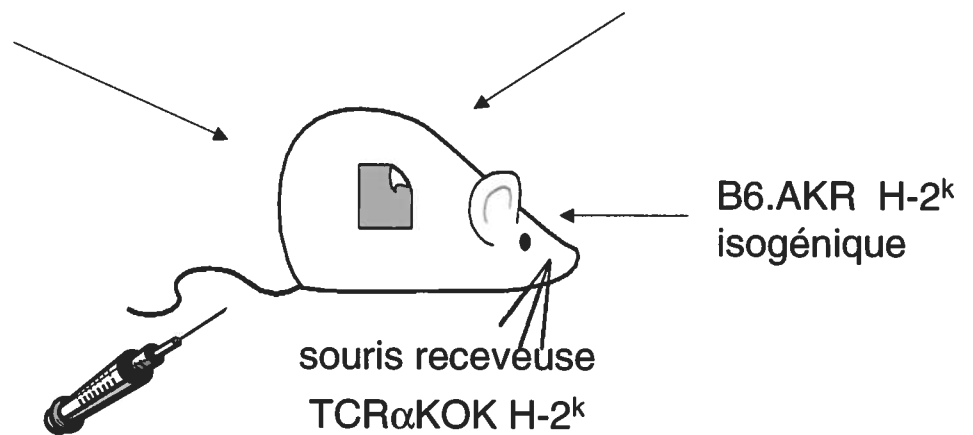
À moyen terme, le but du projet est de tester la capacité des peptides antagonistes à moduler *in vivo* le rejet de greffes dans un modèle de souris transgéniques 2.102. Pour ce faire, nous avons développé un modèle de greffe de peau (figure 21) où des souris déficientes pour la chaîne α du TCR (TCR α KOK) (H-2^k) servent de souris receveuses. Ces souris n'expriment pas de TCR $\alpha\beta$ fonctionnel, mais possèdent des populations normales de cellules B, de cellules NK et de lymphocytes $\gamma\delta$. Ces souris sont incapables de rejeter un greffon. Ainsi, avant la greffe de peau, des cellules T 2.102 isolées de souris transgéniques 2.102Tg sont transférées à ces souris, puis de la peau provenant de la queue de souris donneuses sont greffés à la souris receveuse. Nous possédons également une lignée de souris (B6(mHEL-Hb)) qui exprime une forme membranaire du lysozyme de poulet (HEL) contenant le peptide Hb(64-76) inséré sous le contrôle du promoteur de la chaîne I-E α (Williams, C. B. *et al.*, 1998). Par conséquent, Hb(64-76) agit comme un

épitope immunodominant et peut être considéré comme un substitut de molécules du CMH II. Il est possible d'étudier le rejet de greffe par la voie indirecte en utilisant des souris donneuses (B6(mHEL-Hb) x B6.AKR)F₁ et d'étudier le rejet de greffe par la voie directe en utilisant des souris donneuses exprimant les deux molécules du CMH II I-E^p et I-E^k, (B6.AKR x B10.P)F₁. L'injection de cellules dendritiques du donneur exprimant les APLs permettra d'évaluer la modulation du rejet par les peptides antagonistes dans les deux voies d'alloréactivité directe et indirecte. Comme nous avons démontré que tant les cellules dendritiques immatures que matures peuvent inhiber la réactivité restreinte au soi ou l'alloréactivité de la cellules T 2.102 *in vitro*, les 2 types de cellules dendritiques pourront être utilisés pour moduler le rejet de greffe *in vivo*.

Mis à part la modulation du rejet de greffe, les cellules dendritiques exprimant des peptides antagonistes pourraient être utilisées *in vivo* afin d'étudier la sélection thymique et le maintien de la tolérance périphérique. Ces deux aspects du système immunitaire demeurant quelques peu nébuleux, l'utilisation de cellules dendritiques exprimant les APLs permettrait de mieux caractériser la sélection thymique et la tolérance périphérique. Tout d'abord, les cellules dendritiques exprimant les APLs pourraient être ajoutées dans un système *ex vivo* de « fetal thymic organ cultures »(FTOC) afin de définir la nature des peptides impliqués dans la sélection négative et positive. Aussi, les cellules dendritiques exprimant les APLs pourraient être injectés directement dans le thymus afin d'étudier *in vivo* l'impact de l'expression de différents APLs par les cellules dendritiques dans le thymus. Finalement, il serait possible d'étudier l'implication des APLs et des cellules dendritiques dans le maintien de la tolérance périphérique dans un modèle d'auto-immunité, par exemple dans un modèle murin d'EAE. De plus, l'utilisation de différentes sortes de cellules dendritiques exprimant des APLs pourraient nous permettre de mieux évaluer le rôle de chaque type de cellules dendritiques dans le maintien de la tolérance périphérique et le déclenchement de la réponse immunitaire.

(B10.P x B6.AKR) F_1 H-2^{p/k}
alloreconnaissance directe

(B6(mHEL-Hb) x B6.AKR) F_1 H-2^{k/b}
Alloreconnaissance indirecte



B6.AKR H-2^k
isogénique

Cellules effectrices : - cellules T CD4⁺ de souris 2.102Tg H-2^k
- cellules dendritiques transfectées avec
les peptides antagonistes et témoins

Figure 21. Modèle de greffe *in vivo*.

CONCLUSION

Le but de cette étude était de démontrer la capacité des cellules dendritiques à présenter des peptides antagonistes afin de moduler éventuellement la réponse de cellules T *in vivo* dans un modèle murin de rejet de greffes. Nous avons inhibé la réactivité restreinte au soi d'hybridomes T 2.102 et de cellules T 2.102 naïves en utilisant des cellules dendritiques différenciées à partir de précurseurs de la moelle osseuse de souris présentant des peptides synthétiques. Pour exprimer constitutivement des peptides dans les cellules dendritiques, nous avons choisi un système d'expression des peptides en fusion avec la chaîne invariante. Nous avons démontré que ce système d'expression permettait d'exprimer nos peptides à la surface de cellules COS-7 à un niveau suffisant pour inhiber la réponse de l'hybridome T 2.102 stimulé par l'agoniste Hb(64-76). De plus, nous avons généré des adénovirus recombinants qui expriment les différents APLs. En infectant des cellules CHO-E^k, nous avons démontré que ces adénovirus étaient fonctionnels et que les peptides étaient exprimés par les cellules infectées. Des essais préliminaires d'infections de cellules dendritiques avec les adénovirus recombinants ont permis de stimuler l'hybridome T 2.102 par les cellules dendritiques infectées avec l'adénovirus exprimant Hb(64-76). Cependant, l'antagonisme par des cellules dendritiques infectées avec les adénovirus recombinants exprimant les peptides antagonistes n'a pas pu être démontré. Des tests supplémentaires d'antagonisme devraient être effectués avec les adénovirus recombinants afin de démontrer l'efficacité des cellules dendritiques exprimant constitutivement des APLs à inhiber la réponse de cellules T *in vitro*, puis *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

Aicher, A., J. Westermann, S. Cayeux, G. Willimsky, K. Daemen, T. Blankenstein, W. Uckert, B. Dorken et A. Pezzutto. 1997. Successful retroviral mediated transduction of a reporter gene in human dendritic cells: feasibility of therapy with gene-modified antigen presenting cells. Exp Hematol, 25: 39-44.

Alleva, D. G., A. Gaur, L. Jin, D. Wegmann, P. A. Gottlieb, A. Pahuja, E. B. Johnson, T. Motheral, A. Putnam, P. D. Crowe, N. Ling, S. A. Boehme et P. J. Conlon. 2002. Immunological characterization and therapeutic activity of an altered-peptide ligand, NBI-6024, based on the immunodominant type 1 diabetes autoantigen insulin B-chain (9-23) peptide. Diabetes, 51: 2126-2134.

Anjuere, F., G. Martinez del Hoyo, P. Martin et C. Ardavin. 2000. Langerhans cells acquire a CD8+ dendritic cell phenotype on maturation by CD40 ligation. J Leukoc Biol, 67: 206-209.

Ardavin, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. Nat Rev Immunol, 3: 582-590.

Ardehali, A., M. P. Fischbein, J. Yun, Y. Irie, M. C. Fishbein et H. Laks. 2002. Indirect alloreactivity and chronic rejection. Transplantation, 73: 1805-1807.

Ascher, N. L., R. A. Hoffman, D. W. Hanto et R. L. Simmons. 1984. Cellular basis of allograft rejection. Immunol Rev, 77: 217-232.

Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere et G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. Nat Immunol, 2: 1144-1150.

Auchincloss, H., Jr., R. Lee, S. Shea, J. S. Markowitz, M. J. Grusby et L. H. Glimcher. 1993. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 90: 3373-3377.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran et K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, 18: 767-811.

Banchereau, J. et R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, 392: 245-252.

Basu, D., C. B. Williams et P. M. Allen. 1998. In vivo antagonism of a T cell response by an endogenously expressed ligand. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 14332-14336.

- Benichou, G., E. Fedoseyeva, P. V. Lehmann, C. A. Olson, H. M. Geysen, M. McMillan et E. E. Sercarz. 1994. Limited T cell response to donor MHC peptides during allograft rejection. Implications for selective immune therapy in transplantation. J Immunol, 153: 938-945.
- Bertoletti, A., A. Sette, F. V. Chisari, A. Penna, M. Levrero, M. De Carli, F. Fiaccadori et C. Ferrari. 1994. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. Nature, 369: 407-410.
- Bevan, M. J. 1984. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. Immunol Today, 5: 128-130.
- Bielekova, B., B. Goodwin, N. Richert, I. Cortese, T. Kondo, G. Afshar, B. Gran, J. Eaton, J. Antel, J. A. Frank, H. F. McFarland et R. Martin. 2000. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. Nat Med, 6: 1167-1175.
- Bradley, J. A. 1996. Indirect T cell recognition in allograft rejection. Int Rev Immunol, 13: 245-255.
- Burrows, S. R., R. Khanna et D. J. Moss. 1999. Direct alloreactivity by human cytotoxic T lymphocytes can be inhibited by altered peptide ligand antagonism. Blood, 93: 1020-1024.
- Chmielowski, B., R. Pacholczyk, P. Kraj, P. Kisielow et L. Ignatowicz. 2002. Presentation of antagonist peptides to naive CD4+ T cells abrogates spatial reorganization of class II MHC peptide complexes on the surface of dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 15012-15017.
- Coates, P. T. et A. W. Thomson. 2002. Dendritic cells, tolerance induction and transplant outcome. Am J Transplant, 2: 299-307.
- Colovai, A. I., Z. Liu, P. E. Harris, R. Cortesini et N. Suci-Foca. 1997. Allopeptide-specific T cell reactivity altered by peptide analogs. J Immunol, 158: 48-54.
- Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. Annu Rev Immunol, 12: 259-293.
- Daniel, C., A. Grakoui et P. M. Allen. 1998 a. Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. J Immunol, 160: 3244-3250.
- Daniel, C., S. Horvath et P. M. Allen. 1998 b. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. Immunity, 8: 543-552.
- Daniels, M. A., S. L. Schober, K. A. Hogquist et S. C. Jameson. 1999. Cutting edge: a test of the dominant negative signal model for TCR antagonism. J Immunol, 162: 3761-3764.

- Dantal, J., M. Hourmant, D. Cantarovich, M. Giral, G. Blancho, B. Dreno et J. P. Souillou. 1998. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. Lancet, 351: 623-628.
- De Magistris, M. T., J. Alexander, M. Coggeshall, A. Altman, F. C. Gaeta, H. M. Grey et A. Sette. 1992. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. Cell, 68: 625-634.
- den Haan, J. M., S. M. Lehar et M. J. Bevan. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. J Exp Med, 192: 1685-1696.
- Denton, M. D., C. C. Magee et M. H. Sayegh. 1999. Immunosuppressive strategies in transplantation. Lancet, 353: 1083-1091.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque et C. Caux. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J Exp Med, 188: 373-386.
- Dieu-Nosjean, M. C., A. Vicari, S. Lebecque et C. Caux. 1999. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. J Leukoc Biol, 66: 252-262.
- Dittel, B. N., I. Stefanova, R. N. Germain et C. A. Janeway, Jr. 1999. Cross-antagonism of a T cell clone expressing two distinct T cell receptors. Immunity, 11: 289-298.
- Elahi, S. M., W. Oualikene, L. Naghdi, M. O'Connor-McCourt et B. Massie. 2002. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. Gene Ther, 9: 1238-1246.
- Evavold, B. D. et P. M. Allen. 1991. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. Science, 252: 1308-1310.
- Evavold, B. D., J. Sloan-Lancaster et P. M. Allen. 1994. Antagonism of superantigen-stimulated helper T-cell clones and hybridomas by altered peptide ligand. Proc Natl Acad Sci U S A, 91: 2300-2304.
- Evavold, B. D., S. G. Williams, B. L. Hsu, S. Buus et P. M. Allen. 1992. Complete dissection of the Hb(64-76) determinant using T helper 1, T helper 2 clones, and T cell hybridomas. J Immunol, 148: 347-353.
- Frasca, L., P. Del Porto, L. Tuosto, B. Marinari, C. Scotta, M. Carbonari, A. Nicosia et E. Piccolella. 1999. Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells. J Immunol, 163: 650-658.

Frasca, L., A. Tamir, S. Jurcevic, B. Marinari, A. Monizio, R. Sorrentino, M. Carbonari, E. Piccolella, R. I. Lechler et G. Lombardi. 2000. Peptide analogues as a strategy to induce tolerance in T cells with indirect allospecificity. Transplantation, 70: 631-640.

Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, P. Marrack et J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. Science, 272: 1001-1004.

Fu, F., Y. Li, S. Qian, L. Lu, F. Chambers, T. E. Starzl, J. J. Fung et A. W. Thomson. 1996. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. Transplantation, 62: 659-665.

Garcia-Peydro, M., A. Paradela, J. P. Albar et J. A. Castro. 2000. Antagonism of direct alloreactivity of an HLA-B27-specific CTL clone by altered peptide ligands of its natural epitope. J Immunol, 165: 5680-5685.

Giannoukakis, N., C. A. Bonham, S. Qian, Z. Chen, L. Peng, J. Harnaha, W. Li, A. W. Thomson, J. J. Fung, P. D. Robbins et L. Lu. 2000. Prolongation of cardiac allograft survival using dendritic cells treated with NF- κ B decoy oligodeoxyribonucleotides. Mol Ther, 1: 430-437.

Gilbert, S. C., M. Plebanski, S. Gupta, J. Morris, M. Cox, M. Aidoo, D. Kwiatkowski, B. M. Greenwood, H. C. Whittle et A. V. Hill. 1998. Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. Science, 279: 1173-1177.

Grakoui, A., D. L. Donermeyer, O. Kanagawa, K. M. Murphy et P. M. Allen. 1999. TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. J Immunol, 162: 1923-1930.

Guermontprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery et S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol, 20: 621-667.

Hirao, M., N. Onai, K. Hiroishi, S. C. Watkins, K. Matsushima, P. D. Robbins, M. T. Lotze et H. Tahara. 2000. CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes. Cancer Res, 60: 2209-2217.

Hochrein, H., M. O'Keeffe et H. Wagner. 2002. Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. Hum Immunol, 63: 1103-1110.

Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan et F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. Cell, 76: 17-27.

Hojo, M., T. Morimoto, M. Maluccio, T. Asano, K. Morimoto, M. Lagman, T. Shimbo et M. Suthanthiran. 1999. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. Nature, 397: 530-534.

Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins et G. G. MacPherson. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. J Exp Med, 191: 435-444.

Huang, J., K. Sugie, D. M. La Face, A. Altman et H. M. Grey. 2000. TCR antagonist peptides induce formation of APC-T cell conjugates and activate a Rac signaling pathway. Eur J Immunol, 30: 50-58.

Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu et R. M. Steinman. 1992 a. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med, 176: 1693-1702.

Inaba, K., R. M. Steinman, M. W. Pack, H. Aya, M. Inaba, T. Sudo, S. Wolpe et G. Schuler. 1992 b. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. J Exp Med, 175: 1157-1167.

Jameson, S. C., F. R. Carbone et M. J. Bevan. 1993. Clone-specific T cell receptor antagonists of major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T cells. J Exp Med, 177: 1541-1550.

Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop et A. H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med, 192: 1213-1222.

Kamath, A. T., S. Henri, F. Battye, D. F. Tough et K. Shortman. 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. Blood, 100: 1734-1741.

Kappos, L., G. Comi, H. Panitch, J. Oger, J. Antel, P. Conlon et L. Steinman. 2000. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. Nat Med, 6: 1176-1182.

Karin, N., D. J. Mitchell, S. Brocke, N. Ling et L. Steinman. 1994. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis by a soluble peptide variant of a myelin basic protein epitope: T cell receptor antagonism and reduction of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha production. J Exp Med, 180: 2227-2237.

Kent, S. J., P. D. Greenberg, M. C. Hoffman, R. E. Akridge et M. J. McElrath. 1997. Antagonism of vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells by primary HIV-1 infection: potential mechanism of vaccine failure. J Immunol, 158: 807-815.

- Kersh, E. N., G. J. Kersh et P. M. Allen. 1999. Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation. J Exp Med, 190: 1627-1636.
- Kersh, G. J. et P. M. Allen. 1996 a. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. Nature, 380: 495-498.
- Kersh, G. J. et P. M. Allen. 1996 b. Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. J Exp Med, 184: 1259-1268.
- Khanna, R., S. R. Burrows, S. L. Silins, D. J. Moss, L. M. Poulsen et J. M. Burrows. 1996. Cytotoxic T-lymphocyte clones specific for an immunodominant epitope display discerning antagonistic response to naturally occurring Epstein-Barr virus variants. J Virol, 70: 7306-7311.
- Kissler, S., S. M. Anderton et D. C. Wraith. 2002. Cross-reactivity and T-cell receptor antagonism of myelin basic protein-reactive T cells is modulated by the activation state of the antigen presenting cell. J Autoimmun, 19: 183-193.
- Klenerman, P., S. Rowland-Jones, S. McAdam, J. Edwards, S. Daenke, D. Laloo, B. Koppe, W. Rosenberg, D. Boyd, A. Edwards et et al. 1994. Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. Nature, 369: 403-407.
- Kraj, P., R. Pacholczyk, H. Ignatowicz, P. Kisielow, P. Jensen et L. Ignatowicz. 2001. Positive selection of CD4(+) T cells is induced in vivo by agonist and inhibited by antagonist peptides. J Exp Med, 194: 407-416.
- Krasinskas, A. M., S. D. Eiref, A. D. McLean, D. Kreisel, A. E. Gelman, S. H. Popma, J. S. Moore et B. R. Rosengard. 2000. Replacement of graft-resident donor-type antigen presenting cells alters the tempo and pathogenesis of murine cardiac allograft rejection. Transplantation, 70: 514-521.
- Krensky, A. M., A. Weiss, G. Crabtree, M. M. Davis et P. Parham. 1990. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. N Engl J Med, 322: 510-517.
- Larsen, C. P., R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris et J. M. Austyn. 1990. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. J Exp Med, 172: 1483-1493.
- Lechler, R. I. et J. R. Batchelor. 1982. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. J Exp Med, 155: 31-41.
- Lee, W. C., C. Zhong, S. Qian, Y. Wan, J. Gaudie, Z. Mi, P. D. Robbins, A. W. Thomson et L. Lu. 1998. Phenotype, function, and in vivo migration and survival of allogeneic dendritic cell progenitors genetically engineered to express TGF-beta. Transplantation, 66: 1810-1817.

Lin, H., J. C. Rathmell, G. S. Gray, C. B. Thompson, J. M. Leiden et M. L. Alegre. 1998. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. J Exp Med, 188: 199-204.

Liu, Z., Y. K. Sun, Y. P. Xi, A. Maffei, E. Reed, P. Harris et N. Suci-Foca. 1993. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. J Exp Med, 177: 1643-1650.

Lohse, A. W., P. A. Knolle, K. Bilo, A. Uhrig, C. Waldmann, M. Ibe, E. Schmitt, G. Gerken et K. H. Meyer Zum Buschenfelde. 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. Gastroenterology, 110: 1175-1181.

Lorenz, R. G. et P. M. Allen. 1988. Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 85: 5220-5223.

Lu, L., C. A. Bonham, X. Liang, Z. Chen, W. Li, L. Wang, S. C. Watkins, M. A. Nalesnik, M. S. Schlissel, A. J. Demestris, J. J. Fung et S. Qian. 2001. Liver-derived DEC205+B220+CD19- dendritic cells regulate T cell responses. J Immunol, 166: 7042-7052.

Lu, L., A. Gambotto, W. C. Lee, S. Qian, C. A. Bonham, P. D. Robbins et A. W. Thomson. 1999 a. Adenoviral delivery of CTLA4Ig into myeloid dendritic cells promotes their in vitro tolerogenicity and survival in allogeneic recipients. Gene Ther, 6: 554-563.

Lu, L., W. C. Lee, T. Takayama, S. Qian, A. Gambotto, P. D. Robbins et A. W. Thomson. 1999 b. Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4Ig). J Leukoc Biol, 66: 293-296.

Lu, L., J. Woo, A. S. Rao, Y. Li, S. C. Watkins, S. Qian, T. E. Starzl, A. J. Demetris et A. W. Thomson. 1994. Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. J Exp Med, 179: 1823-1834.

Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani et G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods, 223: 77-92.

Lutz, M. B., R. M. Suri, M. Niimi, A. L. Ogilvie, N. A. Kukutsch, S. Rossner, G. Schuler et J. M. Austyn. 2000. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. Eur J Immunol, 30: 1813-1822.

Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain et M. Moser. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses

of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. J Exp Med, 189: 587-592.

Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman et H. J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. J Exp Med, 184: 1953-1962.

Martin, P., G. M. del Hoyo, F. Anjuere, S. R. Ruiz, C. F. Arias, A. R. Marin et C. Ardavin. 2000. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. Blood, 96: 2511-2519.

Martin, P., S. R. Ruiz, G. M. del Hoyo, F. Anjuere, H. H. Vargas, M. Lopez-Bravo et C. Ardavin. 2002. Dramatic increase in lymph node dendritic cell number during infection by the mouse mammary tumor virus occurs by a CD62L-dependent blood-borne DC recruitment. Blood, 99: 1282-1288.

Matsue, H., K. Matsue, M. Kusahara, T. Kumamoto, K. Okumura, H. Yagita et A. Takashima. 2001. Immunosuppressive properties of CD95L-transduced "killer" hybrids created by fusing donor- and recipient-derived dendritic cells. Blood, 98: 3465-3472.

Matzinger, P. et M. J. Bevan. 1977. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?. Cell Immunol, 29: 1-5.

Merad, M., L. Fong, J. Bogenberger et E. G. Engleman. 2000. Differentiation of myeloid dendritic cells into CD8alpha-positive dendritic cells in vivo. Blood, 96: 1865-1872.

Min, W. P., R. Gorczynski, X. Y. Huang, M. Kushida, P. Kim, M. Obataki, J. Lei, R. M. Suri et M. S. Cattral. 2000. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. J Immunol, 164: 161-167.

Moodycliffe, A. M., V. Shreedhar, S. E. Ullrich, J. Walterscheid, C. Bucana, M. L. Kripke et L. Flores-Romo. 2000. CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. J Exp Med, 191: 2011-2020.

Morelli, A. E., A. T. Larregina, R. W. Ganster, A. F. Zahorchak, J. M. Plowey, T. Takayama, A. J. Logar, P. D. Robbins, L. D. Falo et A. W. Thomson. 2000. Recombinant adenovirus induces maturation of dendritic cells via an NF-kappaB-dependent pathway. J Virol, 74: 9617-9628.

Morelli, A. E. et A. W. Thomson. 2003. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. Immunol Rev, 196: 125-146.

- Nakano, H., M. Yanagita et M. D. Gunn. 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med, 194: 1171-1178.
- Nakano, N., R. Rooke, C. Benoist et D. Mathis. 1997. Positive selection of T cells induced by viral delivery of neopeptides to the thymus. Science, 275: 678-683.
- Nelson, C. A., S. J. Petzold et E. R. Unanue. 1993. Identification of two distinct properties of class II major histocompatibility complex-associated peptides. Proc Natl Acad Sci U S A, 90: 1227-1231.
- Nelson, C. A., S. J. Petzold et E. R. Unanue. 1994. Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell. Nature, 371: 250-252.
- Newell, K. A., G. He, J. Hart et J. R. Thistlethwaite, Jr. 1997. Treatment with either anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibodies blocks alphabeta T cell-mediated rejection of intestinal allografts in mice. Transplantation, 64: 959-965.
- Nicholson, L. B., A. Murtaza, B. P. Hafler, A. Sette et V. K. Kuchroo. 1997. A T cell receptor antagonist peptide induces T cells that mediate bystander suppression and prevent autoimmune encephalomyelitis induced with multiple myelin antigens. Proc Natl Acad Sci U S A, 94: 9279-9284.
- Nickoloff, B. J. et L. A. Turka. 1994. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. Immunol Today, 15: 464-469.
- O'Connell, P. J., W. Li, Z. Wang, S. M. Specht, A. J. Logar et A. W. Thomson. 2002. Immature and mature CD8alpha+ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts. J Immunol, 168: 143-154.
- Opelz, G. 1992. Collaborative Transplant Study--10-year report. Transplant Proc, 24: 2342-2355.
- Pascual, M., R. D. Swinford, J. R. Ingelfinger, W. W. Williams, A. B. Cosimi et N. Tolkoff-Rubin. 1998. Chronic rejection and chronic cyclosporin toxicity in renal allografts. Immunol Today, 19: 514-519.
- Pearson, T. C., D. Z. Alexander, K. J. Winn, P. S. Linsley, R. P. Lowry et C. P. Larsen. 1994. Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. Transplantation, 57: 1701-1706.
- Peugh, W. N., J. M. Austyn, N. P. Carter, K. J. Wood et P. J. Morris. 1987. Inability of dendritic cells to prevent the blood transfusion effect in a mouse cardiac allograft model. Transplantation, 44: 706-711.

- Pfeiffer, C., J. Stein, S. Southwood, H. Ketelaar, A. Sette et K. Bottomly. 1995. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. J Exp Med, 181: 1569-1574.
- Preckel, T., R. Grimm, S. Martin et H. U. Weltzien. 1997. Altered hapten ligands antagonize trinitrophenyl-specific cytotoxic T cells and block internalization of hapten-specific receptors. J Exp Med, 185: 1803-1813.
- Pulendran, B., J. Lingappa, M. K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C. R. Maliszewski et E. Maraskovsky. 1997. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. J Immunol, 159: 2222-2231.
- Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky et C. R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 1036-1041.
- Rastellini, C., L. Lu, C. Ricordi, T. E. Starzl, A. S. Rao et A. W. Thomson. 1995. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-stimulated hepatic dendritic cell progenitors prolong pancreatic islet allograft survival. Transplantation, 60: 1366-1370.
- Rea, D., F. H. Schagen, R. C. Hoeben, M. Mehtali, M. J. Havenga, R. E. Toes, C. J. Melief et R. Offringa. 1999. Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type 1-inducing subset. J Virol, 73: 10245-10253.
- Richters, C. D., E. van Gelderop, J. S. du Pont, M. J. Hoekstra, R. W. Kreis et E. W. Kamperdijk. 1999. Migration of dendritic cells to the draining lymph node after allogeneic or congenic rat skin transplantation. Transplantation, 67: 828-832.
- Robertson, J. M. et B. D. Evavold. 1999. Cutting edge: dueling TCRs: peptide antagonism of CD4+ T cells with dual antigen specificities. J Immunol, 163: 1750-1754.
- Rogers, N. J. et R. I. Lechler. 2001. Allorecognition. Am J Transplant, 1: 97-102.
- Romani, N., S. Holzmann, C. H. Tripp, F. Koch et P. Stoitzner. 2003. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. Apmis, 111: 725-740.
- Rosenberg, A. S., T. Mizuochi, S. O. Sharrow et A. Singer. 1987. Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection. J Exp Med, 165: 1296-1315.
- Rughetti, A., M. Biffoni, M. Sabbatucci, H. Rahimi, I. Pellicciotta, A. Fattorossi, L. Pierelli, G. Scambia, M. Lavitrano, L. Frati et M. Nuti. 2000. Transfected human dendritic cells to induce antitumor immunity. Gene Ther, 7: 1458-1466.
- Sanderson, S., K. Frauwirth et N. Shastri. 1995. Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 92: 7217-7221.

- Santori, F. R., S. M. Brown, Y. Lu, T. A. Neubert et S. Vukmanovic. 2001. Cutting edge: positive selection induced by a self-peptide with TCR antagonist activity. J Immunol, 167: 6092-6095.
- Sayegh, M. H. et L. A. Turka. 1998. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. N Engl J Med, 338: 1813-1821.
- Schafer, P. H. et S. K. Pierce. 1994. Evidence for dimers of MHC class II molecules in B lymphocytes and their role in low affinity T cell responses. Immunity, 1: 699-707.
- Schafer, P. H., S. K. Pierce et T. S. Jardetzky. 1995. The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers. Semin Immunol, 7: 389-398.
- Setum, C. M., O. D. Hegre, J. R. Serie et W. V. Moore. 1990. The potency of splenic dendritic cells as alloantigen presenters in vivo. Quantitation of the number of cells required to achieve graft rejection. Transplantation, 49: 1175-1177.
- Shortman, K. et Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol, 2: 151-161.
- Sloan-Lancaster, J. et P. M. Allen. 1996. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. Annu Rev Immunol, 14: 1-27.
- Sloan-Lancaster, J., B. D. Evavold et P. M. Allen. 1993. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. Nature, 363: 156-159.
- Specht, J. M., G. Wang, M. T. Do, J. S. Lam, R. E. Royal, M. E. Reeves, S. A. Rosenberg et P. Hwu. 1997. Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. J Exp Med, 186: 1213-1221.
- Stefanova, I., B. Hemmer, M. Vergelli, R. Martin, W. E. Biddison et R. N. Germain. 2003. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. Nat Immunol, 4: 248-254.
- Stotz, S. H., L. Bolliger, F. R. Carbone et E. Palmer. 1999. T cell receptor (TCR) antagonism without a negative signal: evidence from T cell hybridomas expressing two independent TCRs. J Exp Med, 189: 253-264.
- Suciu-Foca, N. et R. Cortesini. 1998. Specific immunosuppression of the indirect recognition pathway. Transplant Proc, 30: 4060-4061.
- Szot, G. L., P. Zhou, A. H. Sharpe, G. He, O. Kim, K. A. Newell, J. A. Bluestone et J. R. Thistlethwaite, Jr. 2000. Absence of host B7 expression is sufficient for long-term murine vascularized heart allograft survival. Transplantation, 69: 904-909.

- Takayama, T., K. Kaneko, A. E. Morelli, W. Li, H. Tahara et A. W. Thomson. 2002. Retroviral delivery of transforming growth factor-beta1 to myeloid dendritic cells: inhibition of T-cell priming ability and influence on allograft survival. Transplantation, 74: 112-119.
- Takayama, T., Y. Nishioka, L. Lu, M. T. Lotze, H. Tahara et A. W. Thomson. 1998. Retroviral delivery of viral interleukin-10 into myeloid dendritic cells markedly inhibits their allostimulatory activity and promotes the induction of T-cell hyporesponsiveness. Transplantation, 66: 1567-1574.
- Tillman, B. W., T. D. de Gruijl, S. A. Luykx-de Bakker, R. J. Scheper, H. M. Pinedo, T. J. Curiel, W. R. Gerritsen et D. T. Curiel. 1999. Maturation of dendritic cells accompanies high-efficiency gene transfer by a CD40-targeted adenoviral vector. J Immunol, 162: 6378-6383.
- Traver, D., K. Akashi, M. Manz, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman et I. L. Weissman. 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. Science, 290: 2152-2154.
- Triantafilou, K., M. Triantafilou et N. Fernandez. 2000. Molecular associations and microdomains in antigen-presenting cell-T-cell interactions. Crit Rev Immunol, 20: 359-373.
- Vella, J. P., L. Vos, C. B. Carpenter et M. H. Sayegh. 1997. Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. Transplantation, 64: 1823-1828.
- Vidal, K., C. Daniel, I. Vidavsky, C. A. Nelson et P. M. Allen. 2000. Hb(64-76) epitope binds in different registers and lengths to I-Ek and I-Ak. Mol Immunol, 37: 203-212.
- Vidal, K., B. L. Hsu, C. B. Williams et P. M. Allen. 1996. Endogenous altered peptide ligands can affect peripheral T cell responses. J Exp Med, 183: 1311-1321.
- Waaga, A. M., A. Chandraker, M. Spadafora-Ferreira, A. R. Iyengar, S. J. Khoury, C. B. Carpenter et M. H. Sayegh. 1998. Mechanisms of indirect allorecognition: characterization of MHC class II allopeptide-specific T helper cell clones from animals undergoing acute allograft rejection. Transplantation, 65: 876-883.
- Wecker, H. et H. Auchincloss, Jr. 1992. Cellular mechanisms of rejection. Curr Opin Immunol, 4: 561-566.
- Williams, C. B., K. Vidal, D. Donermeyer, D. A. Peterson, J. M. White et P. M. Allen. 1998. In vivo expression of a TCR antagonist: T cells escape central tolerance but are antagonized in the periphery. J Immunol, 161: 128-137.
- Williams, O., Y. Tanaka, R. Tarazona et D. Kioussis. 1997. The agonist-antagonist balance in positive selection. Immunol Today, 18: 121-126.

- Windhagen, A., C. Scholz, P. Hollsberg, H. Fukaura, A. Sette et D. A. Hafler. 1995. Modulation of cytokine patterns of human autoreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. Immunity, 2: 373-380.
- Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust et P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. J Exp Med, 185: 317-328.
- Wolf, L. A., M. Coulombe et R. G. Gill. 1995. Donor antigen-presenting cell-independent rejection of islet xenografts. Transplantation, 60: 1164-1170.
- Wu, L., A. Nichogiannopoulou, K. Shortman et K. Georgopoulos. 1997. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. Immunity, 7: 483-492.
- Yamaguchi, Y., H. Tsumura, M. Miwa et K. Inaba. 1997. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. Stem Cells, 15: 144-153.
- Yamashiro, H., N. Hozumi et N. Nakano. 2002. Development of CD25(+) T cells secreting transforming growth factor-beta1 by altered peptide ligands expressed as self-antigens. Int Immunol, 14: 857-865.
- Yanagihara, S., E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai et Y. Yamaguchi. 1998. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. J Immunol, 161: 3096-3102.
- Yang, S., C. E. Vervaert, J. Burch, Jr., J. Grichnik, H. F. Seigler et T. L. Darrow. 1999. Murine dendritic cells transfected with human GP100 elicit both antigen-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses and are more effective than DNA vaccines at generating anti-tumor immunity. Int J Cancer, 83: 532-540.
- Yang, W. et H. M. Grey. 2003. Study of the mechanism of TCR antagonism using dual-TCR-expressing T cells. J Immunol, 170: 4532-4538.
- Zavazava, N. et D. Kabelitz. 2000. Alloreactivity and apoptosis in graft rejection and transplantation tolerance. J Leukoc Biol, 68: 167-174.
- Zhong, L., A. Granelli-Piperno, Y. Choi et R. M. Steinman. 1999. Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. Eur J Immunol, 29: 964-972.