

Université du Québec
INRS - Institut Armand-Frappier

**ACTIVATION ET DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES T
CD4⁺ DANS UN MODÈLE DE GREFFE DE PEAU ALLOGÉNIQUE.**

Par
Karina Bonin

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Science (M.Sc.)
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Guy Delespesse
CHUM- Campus Notre-Dame

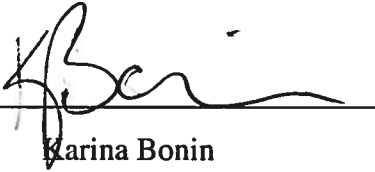
Directeur de recherche

Claude Daniel,
INRS - Institut Armand-Frappier

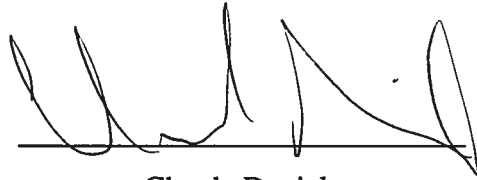
Résumé

Peu de modèle adéquat sont disponibles pour étudier les voies directe et indirecte d'alloréactivité impliquées dans les rejets de greffe. Toutefois, notre laboratoire a développé un modèle innovateur utilisant des souris transgéniques (2.102Tg) dérivées d'un clone de cellule T CD4⁺ spécifique au peptide immunodominant Hb(64-76), et restreint à la molécule I-E^k. Le clone 2.102 a également été démontré pour être exclusivement alloréactif contre la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, I-E^P. Dans notre modèle, le clone 2.102 est capable d'alloréactivité directe en reconnaissant le molécule I-E^P présentée sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA) des souris donneuses B10.P (H-2^P) aussi bien que d'alloréactivité indirecte en reconnaissant le peptide Hb(64-76) présenté par les CPA du soi (H-2^k). La spécificité du clone 2.102 a été vérifiée *in vitro* afin de s'assurer de la reconnaissance des alloantigènes décrits par leur voie d'alloréactivité respective. Le clone 2.102 reconnaît effectivement I-E^P uniquement dans la voie directe d'alloréactivité et le peptide Hb(64-76) seulement dans la voie indirecte d'alloréactivité. Suite à l'obtention de ces premiers résultats nous avons débuté la caractérisation du rôle des lymphocytes T CD4⁺ impliqué dans chacune des deux voies d'alloréactivités. Pour ce faire, des greffes de peau allogéniques ont été réalisées sur des souris 2.102Tg déficientes pour le gène RAG-1 (2.102Tg/RAG^{-/-}). Étonnamment, des cinétiques de rejet comparables ont été obtenues suite à des rejets via l'une ou l'autre des deux voies d'alloréactivité. Ces résultats démontrent qu'une population clonotypique de cellules T périphériques, alloréactives contre une molécule du CMH de classe II ou un épitope unique reconnu dans la voie indirecte d'alloréactivité, est suffisante pour initier un rejet complet de greffe de peau allogénique. Les cellules des organes lymphoïdes secondaires drainant ont ensuite été analysées à différents temps, dans le but d'étudier les fonctions effectrices de celles-ci. Une grande expansion de cellules T dans les ganglions et une forte production d'IFN- γ analysée à l'aide de test ELISA, ont été observées uniquement chez les souris qui ont utilisé la voie indirecte d'alloréactivité. Par ailleurs, afin d'étudier la prolifération des cellules T *in vivo*, les souris 2.102Tg/RAG^{-/-} ont été injectées de façon quotidienne après

la transplantation, avec de la bromodéoxyuridine (BrdU). Suivant des analyses de cytométrie en flux, des cellules T CD4⁺BrdU⁺ ont été observées seulement dans les ganglions des souris qui ont rejeté leur allogreffe par la voie indirecte d'alloréactivité. Ces résultats suggèrent qu'aucune prolifération des cellules T ne se produit dans ces organes lymphoïdes secondaires, suite au rejet par la voie directe d'alloréactivité. De plus, nous avons également étudié la présence de cellules T et la production de cytokines au site du greffon lui-même. Des analyses de RT-PCR ont démontré que des cytokines de type Th1 et de type Th2 sont présentes dans les greffons rejetés. Par ailleurs, l'infiltration des cellules T 2.102Tg est nettement plus grande dans les tissus rejetés que dans les greffes isogéniques. Collectivement, ces résultats suggèrent que les mécanismes d'activation et effecteurs des cellules T, semblent être différent dans chacune des deux voies d'alloréactivité et ce malgré des cinétiques de rejet similaires. Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse que les organes lymphoïdes secondaires ne sont pas essentiels pour le rejet d'allogreffe de peau dans le contexte de la voie directe d'alloréactivité.



Karina Bonin
Étudiante



Claude Daniel
Directeur de recherche

Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des annexes.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction	1
Chapitre 1	5
1. Revue bibliographique	6
1.1. La transplantation.....	6
1.1.1. Généralités.....	6
1.1.2. L'immunosuppression	11
1.1.3. Les rejets de greffe	15
1.2. Les alloantigènes.....	17
1.2.1. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité	17
1.2.2. Les cellules présentatrices d'antigène	21
1.3. Les lymphocytes T	22
1.4. Les voies d'alloréactivité directe et indirecte.....	27
1.5. Les mécanismes effecteurs des lymphocytes T CD4 ⁺	31
1.6. Les cytokines	32
1.7. Autres cellules pouvant participer dans les rejets de greffe.....	36
1.7.1. Les lymphocytes T CD8 ⁺	37
1.7.2. Les lymphocytes B.....	38
1.7.3. Les cellules NK	39
1.7.4. Les macrophages.....	39
1.8. La problématique	40
1.9. Le modèle de rejet de greffe de peau	41

Chapitre 2	50
2. Matériel et méthodes	51
2.1. Les souris	51
2.2. Purification des cellules T CD4 ⁺	51
2.3. Analyses de spécificité	52
2.4. Greffes de peau	52
2.5. Analyse de prolifération <i>in vitro</i>	53
2.6. Analyses de cytométrie	54
2.7. Analyses ELISA	54
2.8. Analyses d'incorporation du BrdU	55
2.9. Préparation de l'ARN	55
2.10 RT-PCR	56
Chapitre 3	57
3. Résultats	58
3.1. L'antigène H-2 ^P est reconnu par les cellules T 2.102 seulement par la voie directe d'alloréactivité et l'épitope Hb(64-76) uniquement par la voie indirecte d'alloréactivité	58
3.2. Les cellules T CD4 ⁺ 2.102 peuvent initier un rejet de greffe de peau par chacune des deux voies d'alloréactivité	61
3.3. Une expansion de cellules est uniquement observée dans les ganglions axillaires des souris qui ont rejeté par la voie indirecte d'alloréactivité	64
3.4. Aucune altération majeure de la capacité proliférative des cellules T 2.102Tg n'est observée dans les voies directe et indirecte d'alloréactivité lors d'une stimulation <i>in vitro</i>	73
3.5. Des cellules T CD4 ⁺ ayant un phénotype de cellules T activées n'ont pu être mise en évidence dans les organes lymphoïdes secondaires des souris 2.102Tg/RAG ^{-/-} qui ont rejeté leur greffe de peau.	76
3.6. Des effecteurs producteurs de cytokines sont uniquement observés dans les organes lymphoïdes secondaires des souris qui ont rejeté leur greffe de peau par la voie indirecte d'alloréactivité	79

3.7. Une prolifération significative des cellules T CD4 ⁺ est seulement observée dans les ganglions axillaires après un rejet par la voie indirecte d'alloréactivité.....	84
3.8. Des transcrits pour les gènes de l'IL-4, l'IFN- γ , Fas-L et la chaîne beta du TCR	
2.102 sont retrouvés dans les allogreffes B10.P et les allogreffes B6(mHEL-Hb)	87
Chapitre 4	90
4. Discussion	91
Annexe.....	105
Annexe 1	106
Annexe 2	108
Références	110
Liste des références	111

Liste des figures

- Figure 1: Schéma représentant les voies d'alloréactivité directe et indirecte.
- Figure 2: Spécificité du clone de cellule T CD4⁺ 2.102.
- Figure 3: Schéma de la séquence codante pour la construction de la protéine chimérique mHEL-Hb.
- Figure 4: Modèle de rejet de greffe de peau allogénique.
- Figure 5: Prolifération des cellules T 2.102Tg purifiées après une stimulation avec des cellules de rates irradiées ou des extraits cellulaires de rate générés par sonication.
- Figure 6: Cinétiques de rejet de greffe de peau par les voies directe et indirecte d'alloréactivité.
- Figure 7: Prolifération *in vitro* des cellules T 2.102Tg provenant des différentes souris greffées.
- Figure 8: Phénotype des cellules T CD4⁺ suite à des rejets de greffe de peau dans un contexte d'alloréactivité directe et indirecte.
- Figure 9: Production d'IL-4 et d'IFN- γ par les cellules T 2.102Tg des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} greffées avec des échantillons de peau provenant des souris B6.AKR, B10.P et B6(mHEL-Hb) au jour 11 suivant la transplantation.
- Figure 10: Production d'IL-4 et d'IFN- γ par les cellules T 2.102Tg des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} greffées avec des échantillons de peau provenant des souris B6.AKR, B10.P et B6(mHEL-Hb) au jour 7 suivant la transplantation.
- Figure 11: Prolifération des cellules T CD4⁺ 2.102Tg *in vivo* évaluée par l'incorporation dans les cellules du BrdU.
- Figure 12: Expression des gènes d'IL-4 et d'IFN- γ , de Fas-L et de la chaîne beta du TCR 2.102 dans les échantillons de greffe de peau.

Liste des tableaux

- Tableau 1: Nombre de patients en attente d'une transplantation au Québec.
- Tableau 2: Nombre de transplantations réalisées au Québec.
- Tableau 3: Nombre total de cellules retrouvées dans les ganglions axillaires des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} greffées.
- Tableau 4: Nombre total de cellules T CD4⁺ retrouvées dans les ganglions axillaires des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} greffées.
- Tableau 5: Nombre total de cellules retrouvées dans la rate des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} greffées.
- Tableau 6: Nombre total de cellules T CD4⁺ retrouvées dans la rate des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} greffées.

Liste des annexes

- Annexe 1:** Phénotype des cellules T CD4⁺ suite à des rejets de greffe de peau dans un contexte d'alloréactivité directe et indirecte.
- Annexe 2:** Contrôles négatifs et positifs des analyses de phénotypage des cellules T CD4⁺ suite aux rejets de greffes de peau.

Liste des abréviations

2-ME: 2-mercaptoéthanol
³H: tritium
ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN: acide ribonucléique
BCR: B cell receptor (récepteur des cellules B)
BrdU: bromodéoxyuridine
C: Celsius
cm²: centimètre carré
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CPAs: cellules présentatrices d'antigène
CPM: compte par minute
CTLs: lymphocytes T cytotoxiques
DNase I: déoxyribonucléase I
dNTPs: déoxynucléotides
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS: fetal calf serum (sérum foetal de veau)
FITC: fluorescéine isothiocyanate
g: gramme
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GVDH: graft versus host disease (maladie du greffon contre l'hôte)
Hb: hémoglobine
Hbβ^d: allèle d de la chaîne beta de l'hémoglobine
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
HEL: hen-egg lysozyme (lysozyme du poulet)
HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid
HLA: human leukocyte antigen
IFN-γ: interféron-gamma
IL: interleukine
i.p.: intra-péritonéale
M: molaire
MEM: minimum essential medium
mg: milligramme
ml: millilitre
mM: millimolaire
nm: nanomètre
PBS: phosphate buffer solution (tampon phosphate)
PCR: polymerase chain reaction (réaction en chaîne de la polymérase)
PE: phycoérythrine
pmol: picomole
rpm: rotation par minute
RT-PCR: reverse transcriptase-PCR (PCR à transcription inverse)
TCR: T cell receptor (récepteur de cellule T)

Tg: transgénique

TMB: tetramethyl Benzidine

TNF: tumour necrosis factor (facteur de nécrose de tumeur)

U: unité

μ Ci: microcurie

μ g: microgramme

μ l: microlitre

μ M: micromolaire

v: volume

INTRODUCTION

Introduction

Les réponses immunitaires qui conduisent au rejet de la greffe sont en grande partie exercées par les cellules T alloréactives activées en réponse aux antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité du non-soi, via deux voies différentes, la voie directe et la voie indirecte d'alloréactivité. Le concept de l'existence de deux voies distinctes d'alloréactivité, maintenant accepté de tous, a été originalement proposé par Lechler et Batchelor (Lechler et Batchelor, 1982). Dans la voie directe d'alloréactivité, les cellules T reconnaissent des molécules allogéniques du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) entières et intactes exprimées à la surface des cellules retrouvées dans les tissus greffés. Dans la voie indirecte d'alloréactivité, les cellules T alloréactives reconnaissent des alloantigènes transformés, qui peuvent être soit des antigènes mineurs ou soit des antigènes majeurs d'histocompatibilité, présentés comme des allopeptides par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) du soi. La voie d'alloréactivité indirecte est identique à la voie classique de reconnaissance des antigènes étrangers par les cellules T CD4⁺. Il a déjà été suggéré que la voie directe d'alloréactivité serait impliquée dans les rejets aigus, tandis que la voie indirecte jouerait un rôle essentiel dans les rejets chroniques (Bradley, 1996; Lechler et Batchelor, 1982; Pattison et Krensky, 1997; Sayegh et Carpenter, 1996; Shirwan, 1999). La différence fondamentale qui réside entre ces deux voies d'alloréactivité, se retrouve donc dans la population de CPA responsable de l'activation des cellules T. Dans la voie directe, la présentation des alloantigènes par les CPA implique une migration des CPA vers les organes lymphoïdes secondaires. Contrairement à la voie directe, la voie indirecte implique les CPA du soi, qui normalement se retrouvent déjà aux organes lymphoïdes secondaires, puisque les CPA professionnelles sont généralement localisées dans ces tissus.

Les cellules T sont reconnues pour jouer un rôle important dans les rejets de greffe. Plusieurs études ont démontré que le rejet est dépendant des cellules T CD4⁺ (Cobbold *et al.*, 1986; Dalloul *et al.*, 1996a; Krieger *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1998). En plus d'initier les rejets, les cellules T CD4⁺ fournissent l'aide nécessaire à plusieurs

fonctions effectrices impliquées dans les rejets de greffe. Ces cellules fournissent, entre autres, l'aide pour la croissance et la maturation des cellules T CD8⁺ CTL (Lee *et al.*, 1994; Popov *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1991), ainsi que l'aide pour l'activation des réponses humorales dirigées contre les antigènes spécifiques du donneur (Morton *et al.*, 1993; Steele *et al.*, 1996). Jusqu'à aujourd'hui, il y a peu d'information disponible à propos de la contribution des cellules T CD4⁺ impliquées dans chacune des deux voies d'alloréactivité lors des rejets de greffe. Ce manque d'information est attribuable au nombre peu élevé de modèles adéquats disponibles pour une telle étude.

Parmi les modèles existants, qui sont pour la plupart complètement allogénique, la caractérisation de la voie indirecte d'alloréactivité est difficile puisque comparativement à la réponse dans la voie directe, la fréquence des cellules T qui y sont activées est très faible (Benichou *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1993). Donc, l'étude des contributions de chacune des voies d'alloréactivité serait plus adéquate et plus efficace à l'aide d'un modèle capable de rejet par l'une ou l'autre des deux voies d'allorecognition.

L'objectif de ce projet de maîtrise consistait à élucider les mécanismes d'activation et de différenciation des cellules T CD4⁺ dans chacune des voies d'alloréactivité. Afin de répondre à ces questions, notre laboratoire a établi un modèle unique de rejet de greffe de peau. Ce modèle, composé de souris transgéniques, nous permet d'étudier chacune des voies d'alloréactivité, puisque les souris utilisées à titre de receveurs sont transgéniques pour un récepteur de cellule T (2.102) (Grakoui *et al.*, 1999) qui reconnaît des alloantigènes spécifiques dans chacune des voies d'alloréactivité. Donc, dépendamment de la nature de la greffe de peau réalisée, il est possible d'étudier chacune des voies de façon individuelle ou combinée. Ce mémoire est présenté en quatre parties distinctes, la première décrit l'état des connaissances actuelles sur le rejet de greffe. La deuxième et la troisième partie présentent respectivement la méthodologie employée et les résultats pertinents obtenus au cours des expériences réalisées dans ce projet. Finalement, la dernière section consiste en la discussion de ces résultats. En bref, dans ce travail, un nouveau modèle de rejet de greffe de peau permettant l'étude des voies directe et indirecte d'alloréactivité y est décrit. À l'aide de ce modèle, nous avons pu observer que

les cinétiques de rejet des greffes de peau sont similaires dans les deux voies d'alloréactivité. Cependant, la présence d'une expansion clonale et d'une maturation d'effecteurs dans les ganglions drainant la greffe sont seulement observées dans la voie indirecte d'alloréactivité. Une réponse minimale des cellules effectrices dans les organes lymphoïdes secondaires, voir même absente, est observée chez les souris qui ont rejeté par la voie directe d'alloréactivité.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Revue bibliographique

1.1 La transplantation

1.1.1 Généralités

La transplantation d'organes demeure un traitement de choix et même unique pour de nombreux patients atteints de maladies rénales, cardiaques, pulmonaires ou encore hépatiques (Benichou, 1999). La transplantation de tissus pour remplacer différents organes malades est maintenant un acte important de la thérapie médicale. Au Québec, le nombre de patients en attente d'une greffe a pratiquement doublé en sept ans, soit de 562 en 1994 à 936 en 2001 (Tableau 1). Heureusement, le nombre de transplantations réalisées au Québec a aussi augmenté au cours des années, l'organisme Québec Transplant a dénombré 442 transplantations en 2001 par rapport à 297 en 1994 (Tableau 2). À l'échelle mondiale, il y a environ 36 000 transplantations d'organes qui sont réalisées par année (Rose, 1998) dont plus de 10 000 sont des greffes de reins (Benjamini, 1996). La première greffe, réalisée en 1954 par Merrill, Murray et Harrison, fut une greffe de rein chez des jumeaux identiques (Merrill *et al.*, 1984). Par contre, c'est en 1959, par le même groupe, que la première greffe de rein entre deux individus non-apparentés a été réalisée (Merrill, 1978). Aujourd'hui, comme les statistiques le démontrent, l'organe le plus transplanté est le rein. La transplantation d'organes nécessite en premier lieu, un nombre accru de donneurs, puisque seulement 3% des individus qui acceptent de donner leurs organes deviendront donneurs d'organes et de tissus. Ensuite, la transplantation requiert une série d'analyses afin d'établir la meilleure compatibilité possible entre les receveurs et les donneurs d'organes. Les premières et les plus courantes formes de transplantations de cellules sont les transfusions sanguines. Pour effectuer une transfusion à un patient, il est nécessaire de faire la détermination des antigènes des groupes sanguins ABO et Rh, afin d'éviter une destruction rapide des globules rouges par des anticorps. Cette compatibilité est relativement facile à établir puisqu'il n'existe que 4

Tableau 1: Nombre de patients en attente d'une transplantation au Québec.

Tableau 1: Nombre de patients en attente d'une transplantation au Québec.

Années	Rein	Rein/ pancréas	Pancréas	Foie	Coeur	Coeur/ poumons	Poumons	Total
1994	465	10	3	22	32	3	27	562
1995	450	8	2	30	27	1	27	514
1996	471	16	5	32	24	1	28	577
1997	498	26	8	42	31	3	29	637
1998	486	37	6	38	29	4	27	627
1999	593	38	15	53	28	3	34	764
2000	637	47	29	46	17	4	35	815
2001	716	57	30	67	31	7	28	936

*Statistiques émises par l'organisme Québec Transplant

Tableau 2: Nombre de transplantations effectuées au Québec.

Tableau 2: Nombre de transplantations effectuées au Québec.

Années	Rein	Rein/ pancréas	Pancréas	Foie	Coeur	Coeur/ poumons	Poumons	Rein (vivant)	Total
1994	149	2	0	73	46	1	11	15	297
1995	199	2	1	87	51	2	14	26	382
1996	184	1	2	95	37	0	10	14	341
1997	167	1	3	86	44	2	22	16	341
1998	170	3	8	90	36	2	17	30	356
1999	201	7	13	112	39	2	22	31	427
2000	217	3	17	111	44	2	29	31	454
2001	214	6	11	100	39	1	25	46	442

*Statistiques émises par l'organisme Québec Transplant

types d'antigènes ABO et 2 groupes d'antigènes Rh. Toutefois, dans le cas d'une transplantation d'un organe, qui comporte des cellules nucléées, les réponses des cellules T contre les antigènes très polymorphes du CMH induisent pratiquement toujours une réponse contre l'organe greffé. Donc, plus la compatibilité pour les molécules du CMH sera grande, plus les chances d'un rejet éventuel de l'organe greffé seront petites. Il faut préciser qu'une compatibilité parfaite entre deux individus n'est que très rarement possible. Même si deux individus sont génétiquement identiques au niveau des molécules du CMH, certains antigènes mineurs peuvent aussi induire le rejet de l'organe transplanté. Le rejet de la greffe demeure donc aujourd'hui la plus commune des complications associées à la transplantation (Rose, 1998). Le développement de nouveaux agents thérapeutiques tel que les drogues immunosuppressives, a permis d'augmenter considérablement le taux de survie d'une greffe. Aujourd'hui, le taux de succès d'une transplantation pour la première année varie selon les organes, mais se situe généralement entre 85-95% pour l'ensemble des organes (statistiques émises par Québec Transplant).

1.1.2 L'immunosuppression

L'allogreffe comporte certains risques, cependant la complication majeure qui y est associée est le rejet de l'organe nouvellement greffé. Plusieurs mesures qui aident à prolonger la survie du greffon sont prises pendant et après la transplantation. La plupart de ces mesures consistent à la prise d'agents ou de drogues immunosuppressives. Comme l'indique leur nom, ces médicaments ont pour rôle de supprimer les réponses immunes afin d'éviter un éventuel rejet. C'est suite à la deuxième guerre mondiale, où plusieurs transplantations de peau furent réalisées, que Sir Peter Medawar suggéra que la destruction d'un tissu étranger était accomplie par des mécanismes immunitaires et que l'immunosuppression permettrait d'éviter l'éventuel rejet des greffes (Silverstein, A. M., 1998). Le développement des premiers agents immunosuppressifs comme la moutarde de nitrogène et les corticostéroïdes, utilisés sur les animaux, a permis de pratiquer la transplantation comme thérapie médicale. Au départ, les patients transplantés étaient irradiés, mais ce moyen d'immunosuppression a

été rapidement abandonné pour laisser place aux drogues immunosuppressives. Ces drogues incluaient les glucocorticoïdes, l'azathioprine et des sérums anti-lymphocytes. Au début des années 1980, de nouvelles drogues avec un meilleur potentiel thérapeutique et plus sécuritaire ont été développées. Ces drogues de seconde génération ont permis l'amélioration des greffes de rein et le succès des transplantations de cœur, de foie, de poumon et de pancréas (Halloran et Lui, 1998). La première de ces nouvelles drogues à être développée fut la cyclosporine. Par la suite, il y a eu, entre autres, le tacrolimus (FK-506) et les anticorps monoclonaux (anti-CD3). Aujourd'hui, le développement de nouveaux immunosuppresseurs plus spécifiques est une priorité pour plusieurs équipes de recherche. La clé du succès en transplantation, malgré la réussite de la chirurgie, de la conservation des organes et du nombre croissant de donneurs, a été la découverte et l'amélioration des thérapies immunosuppressives (Rossini *et al.*, 1999).

Les immunosuppresseurs actuellement employés sont des drogues qui ciblent l'activation des cellules T, la production de cytokines ainsi que l'expansion clonale. Un patient qui obtient une greffe quelconque est soumis à un premier traitement immunosuppresseur, l'immunosuppression initiale et à un second traitement qui est l'immunosuppression de maintenance. Le premier traitement est débuté immédiatement après l'opération, c'est-à-dire à la période où le risque d'un rejet est le plus élevé. Cette thérapie, qui est maintenue entre 7 et 14 jours, consiste à donner des doses plus élevées des agents immunosuppresseurs utilisés dans la thérapie de maintenance. Des préparations d'anticorps spécifiques aux cellules T sont ajoutées à ce premier traitement lorsqu'il s'agit de patients à haut risque de rejet comme les enfants, les patients qui ont reçu plusieurs transfusions sanguines, qui sont atteints de plusieurs maladies ou qui ont déjà subi une ou plusieurs transplantations (Denton *et al.*, 1999). Ces anticorps peuvent être dirigés, par exemple, contre le CD3 ou le récepteur de l'IL-2, qui est plus spécifique, puisque ce récepteur est exprimé seulement sur les cellules T activées. Cependant, ces préparations d'anticorps sont plus ou moins efficaces puisque ceux-ci proviennent de rongeurs, donc, en plus de posséder une demi-vie courte, le patient développe des anticorps dirigés contre les anticorps de rongeurs (Denton *et al.*, 1999). Dans la thérapie de maintenance, plusieurs des agents immunosuppresseurs sont utilisés en combinaison

afin d'en réduire les effets secondaires. Voici quelques exemples de combinaisons employées: on utilise souvent des corticostéroïdes, qui inhibent la transcription des gènes de cytokines, avec des inhibiteurs de calcineurine, qui permettent l'inhibition de la production de l'IL-2, comme la cyclosporine et le tacrolimus. Ces drogues sont souvent combinées avec des agents anti-prolifératifs comme l'azathioprine, qui est de plus en plus remplacé par le mycophenolate mofétil, qui inhibe la synthèse des purines, donc qui bloque la synthèse de l'ADN et de l'ARN.

L'immunosuppression qui permet au greffon de survivre chez l'individu transplanté réduit sensiblement l'ensemble des défenses de l'organisme face aux infections et aux maladies. La plupart des agents utilisés suppriment le système immunitaire en entier de façon non-spécifique aux antigènes du greffon. En plus d'être non-spécifiques, toutes ces drogues sont extrêmement toxiques. Les traitements avec des agents immunosuppresseurs peuvent aussi entraîner des complications sévères, notamment des infections par des microorganismes opportunistes. Par exemple, on retrouve fréquemment des infections bactériennes qui causent des pneumonies, des surinfections bronchiques et des infections urinaires. On retrouve également des infections causées par des virus, des protozoaires et des champignons. Le traitement de ces infections est aussi problématique puisque plusieurs antibiotiques ne font pas bon ménage avec la cyclosporine. L'immunosuppression peut aussi réveiller certain virus, comme les Herpesvirus, faire apparaître des verrues sur la peau et les muqueuses de la bouche et des organes génitaux. Elle empêche aussi les patients de recevoir certains types de vaccins, comme les virus vivants atténués. De plus, l'immunosuppression est associé au développement de l'ostéoporose et de certains cancers. Parmi les personnes chroniquement immunosupprimées, de 10 à 45% auront développé un cancer après 10 ans et entre 40 et 75% après 20 ans (Dantal *et al.*, 1998; Newstead, 1998). Ces agents ont également des effets néfastes à long terme sur les fonctions du greffon lui-même, telle la néphrocytotoxicité liée à l'hypertension (Halloran et Lui, 1998). Le développement de l'hypertension artérielle systémique suite à l'usage de la cyclosporine est apparu chez 66% des patients 2 semaines après la transplantation et chez 92% après 6 mois {site sur l'internet de médecins de la Belgique:

http://www.ulb.ac.be/erasme/fr/services/paramed/kine/secteurs/secteur_gn/crce/vademecum/complications.html}. Donc, il faut être très vigilant avec les doses d'immunosuppresseurs, puisqu'une dose trop faible permettra, à profit, de diminuer les risques d'apparition de cancers (Dantal *et al.*, 1998), mais augmentera les épisodes de rejet aigu tardif. Au contraire, une dose trop forte augmentera considérablement le risque d'infections ou de maladies.

Une proportion significative de greffe échoue malgré une immunosuppression continue. Les taux de survie des allogreffes depuis l'apparition de l'immunosuppression démontrent une amélioration importante de la survie à court terme, quoi que le taux de greffes fonctionnelles à long terme n'ait pas changé depuis. Bref, ces agents préviennent efficacement la perte de la greffe associée au rejet aigu mais demeurent inadéquats pour empêcher la perte tardive de la greffe suite au rejet chronique (Denton *et al.*, 1999; Rossini *et al.*, 1999; Shirwan, 1999). Aujourd'hui, plus de 90% des greffes provenant de donneurs vivants et 80-85% des greffes de rein de donneurs cadavériques sont fonctionnels après 1 an (Norman, D. J., 1998; Orloff *et al.*, 1995). Ce succès est comparable pour le cœur, le poumon et le foie, et est diminué pour le pancréas (Rossini *et al.*, 1999). La perte des greffons est attribuable à la progression incontrôlable du rejet chronique, qui est à ce jour peu défini. On retrouve aujourd'hui seulement 20% des greffes de rein fonctionnelles après 10 ans (Orloff *et al.*, 1995).

Puisque chaque transplantation requiert une thérapie immunosuppressive, la greffe d'un ou de plusieurs organes demande au patient d'accepter les risques, tout au long de sa vie, d'une immunosuppression systémique. Les effets secondaires peuvent être acceptables pour les patients qui ont un besoin urgent d'une greffe de cœur, de poumon ou de foie, mais plus risqué pour les patients en attente de reins. Dans le but d'éliminer ces effets néfastes, de nouveaux agents sont constamment en développement. Le but ultime est une drogue qui inhibera de façon sélective les réponses immunes dirigées vers les antigènes de l'allogreffe et qui, en plus, de prévenir le rejet chronique, ne possèdera aucun effet secondaire. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les rejets de greffe est donc requise afin de parvenir à de meilleures thérapies

immunosuppressives. Ces travaux permettront d'obtenir des renseignements essentiels pour la détermination de futures cibles thérapeutiques potentielles. Les nouvelles stratégies d'immunosuppression ciblent différents aspects de l'immunité. Elles ciblent, entre autres, les molécules de co-stimulation. En absence de co-stimulation, le rejet est prévenu puisque les cellules T deviennent anergiques, donc ne peuvent plus répondre aux alloantigènes du CMH (Boussiotis *et al.*, 1994; Lenschow *et al.*, 1992). Elles ciblent également les molécules d'adhésion et des molécules accessoires. Par exemple, des anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules CD4 inhiberait l'activation des cellules T par un encombrement stérique. Une immunosuppression exercée par des peptides dérivés des molécules du CMH de classe I et de classe II est aussi une thérapie envisageable pour l'avenir, puisque ces peptides sont reconnus pour avoir des effets immunomodulateurs importants *in vivo* (Magee et Sayegh, 1997; Sayegh et Krensky, 1996). Donc, plus les connaissances sur les mécanismes du système immunitaire impliqués dans les rejets de greffe seront grandes, meilleures seront les thérapies immunosuppressives.

1.1.3 Les rejets de greffe

Cliniquement, il y a trois types majeurs de rejet; le rejet hyperaigu, aigu et chronique.

Le rejet hyperaigu se manifeste de quelques minutes à quelques heures suivant la transplantation (Pattison et Krensky, 1997). Ce rejet est le résultat d'une destruction complète du greffon par des anticorps préformés retrouvés chez le patient. La synthèse de ces anticorps est habituellement induite suite à la rencontre d'antigènes du non-soi due à des transplantations antérieures, des transfusions sanguines, la maternité et des infections bactériennes qui induisent la production d'anticorps ayant une réactivité croisée avec des épitopes des HLA (Kerman *et al.*, 1997). Ces anticorps activent rapidement le système du complément, ce qui entraîne une intense infiltration des neutrophiles dans la greffe. L'inflammation ainsi provoquée entraîne ensuite l'activation et l'accumulation des plaquettes dans les capillaires, ce qui prévient la vascularisation de la greffe (Goldsby, R.

A., Kindt, B. A., and Osborne, B. A., 2000). Ces actions non-spécifiques du système immunitaire entraînent généralement de l'hémorragie interstitielle dans le greffon et une perte éventuelle de ses fonctions. Dans ce type de rejet, il y a absence d'immunité cellulaire spécifique. Aucune thérapie n'existe pour prévenir ce type de rejet, c'est pourquoi les analyses de «cross-match» entre le donneur et les patients en attente d'une transplantation sont très importantes. Ces analyses permettront d'éliminer, en grande partie, ce type de rejet.

Le rejet aigu peut débiter de quelques jours à quelques mois après la transplantation (Pattison et Krensky, 1997). Ce type de rejet est le plus commun, puisque toutes transplantations, à l'exception d'individus génétiquement identiques, engendre ce type de réponse. Le rejet aigu est exercé suite à la reconnaissance de tissus étrangers, c'est-à-dire à la reconnaissance du non-soi. Par conséquent un rejet aigu se produira chez des patients plus ou moins compatibles avec le donneur ou chez des patients qui reçoivent une dose insuffisante de médicaments anti-rejet. La cause primaire de ce type de rejet est l'immunité cellulaire exercée par les cellules T en reconnaissance aux antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité du non-soi. Donc, suite à la transplantation, lorsque l'organe devient vascularisé, il y a une infiltration rapide des cellules immunitaires de l'hôte au site du greffon (Rossini *et al.*, 1999).

C'est après plusieurs mois ou plusieurs années suivant la greffe que peut survenir, même en présence continue d'immunosuppression, le troisième type de rejet, le rejet chronique (Rossini *et al.*, 1999). Celui-ci est le résultat de l'action combinée de l'immunité humorale, les anticorps, et de l'immunité cellulaire (Benjamini, 1996). Ce type de rejet, qui est plus ou moins bien compris, demeure le problème majeur retrouvé dans la transplantation (Pattison et Krensky, 1997; VanBuskirk *et al.*, 1997). Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les rejets chroniques sont jusqu'à ce jour incertains et impliqueraient certainement des mécanismes cellulaires et humoraux (Nagano *et al.*, 1997; Russell *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1996). Certains suggèrent une hypersensibilité de type retardé accompagnée de cellules T et de cellules B qui conduirait à l'activation des macrophages et à la sécrétion de facteurs de croissances

(Sayegh et Carpenter, 1996). D'autres suggèrent la possibilité d'un rejet exercé par les anticorps (Suciu-Foca *et al.*, 1991a; Suciu-Foca *et al.*, 1991b). Bref, puisque les immunosuppresseurs ne peuvent, dans pratiquement tous les cas, empêcher le rejet chronique, une meilleure compréhension de ce type de rejet est donc souhaitable.

1.2 Les alloantigènes

1.2.1 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

Les antigènes du non-soi responsables de l'initiation des réponses immunitaires impliquées dans les rejets de greffe sont ceux qui proviennent des glycoprotéines que forment les molécules du CMH (Hansen, 1993). Ces molécules ont, premièrement, été découvertes grâce à leur capacité à provoquer un rejet de greffe (Gorer, 1937). Ensuite, il y a eu la découverte d'une région à l'intérieur du génome qui était prédominante dans le processus de compatibilité tissulaire, la région du CMH. Chez l'humain, le CMH s'appelle HLA (Human Leukocyte Antigen) et se situe sur le chromosome 6, tandis que chez la souris il se nomme H-2 (Histocompatibility-2) et se retrouve sur le chromosome 17 (Little et Parham, 1999; Rhodes et Trowsdale, 1999; Klein, 1986). On estime que le CMH occupe environ 1/3000 du génome total. Cette partie importante du génome comprend donc quelques centaines de gènes réunis en complexe. Les gènes d'histocompatibilité sont définis comme des gènes codant pour des structures polymorphiques à l'intérieur d'une espèce et suffisamment immunogéniques pour évoquer un processus de rejet. Ces gènes sont presque toujours exprimés de façon co-dominante, c'est-à-dire que le produit de tous ces gènes est exprimé à la surface cellulaire, ce qui constitue l'haplotype. Le rôle des protéines codées par ces gènes est varié et concerne plusieurs aspects de la reconnaissance immune et des fonctions du système immunitaire. Le CMH en plus d'être polygénique est hautement polymorphique, puisqu'il existe plusieurs allèles pour chacun des gènes. Par exemple on retrouve environ 195 allèles connus pour les HLA-A, 395 allèles connus pour les HLA-B, 93 allèles connus pour les HLA-C et environ 500 pour les antigènes de classe II HLA-DR, DQ et DP (nombre d'allèles officiellement assignés par le WHO Nomenclature Committee for Factors of the

HLA system- août 2000). Puisque chaque antigène A peut être exprimé à la surface cellulaire avec n'importe lequel des antigènes B, C ou DR, le nombre d'haplotypes différents possibles dans une population est très grand. En plus, avec deux chromosomes non-identiques, le nombre de génotypes est aussi très grand.

Les molécules du CMH sont responsables du fonctionnement normal du système immunitaire puisqu'elles sont nécessaires aux interactions cellulaires. Ces molécules sont divisées en molécules de classe I et de classe II selon leur structure, fonction et distribution tissulaire (McCluskey *et al.*, 1989).

Les polypeptides de classe I sont codés par 3 loci différents, soient les régions A, B et C chez l'humain et K, D et L chez la souris. Les molécules de classe I sont composées d'une chaîne lourde polypeptidique liée de façon non-covalente à un petit polypeptide: la β_2 -microglobuline (Garrett *et al.*, 1989). Les antigènes de classe I du CMH sont exprimés à la surface d'une vaste majorité de cellules nucléées (Zinkernagel et Doherty, 1974). On les retrouve en abondance sur les cellules lymphoïdes, un peu moins sur les cellules du foie, des poumons et des reins et très peu sur les cellules du cerveau et des muscles (Janeway, 1996).

Les polypeptides de classe II, pour leur part, sont codés dans la région D chez l'humain et dans la région I (immune) chez la souris. Puisque plusieurs gènes sont retrouvés dans chacune de ces régions, les molécules HLA-D et H-2I se retrouvent sous-divisées en molécules DP, DQ et DR ainsi que I-A et I-E respectivement (Klein, 1986). Les molécules de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires constituées de deux chaînes polypeptidiques différentes, les chaînes α et β (Kaufman *et al.*, 1984). Contrairement aux antigènes de classe I, les antigènes de classe II du CMH sont exprimés sur une moins grande variété de cellule. On les retrouve principalement sur les cellules présentatrices d'antigène professionnelles comme les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B et sur les cellules épithéliales thymiques (Weenink et Gautam, 1997). Ces molécules, tout comme les molécules de classe I, sont aussi régulées à la hausse et à la baisse selon différents stimulus. Par exemple, l'IFN- γ augmente

l'expression à la surface des molécules du CMH de classe I et II (Billiau, 1996). La régulation à la hausse de l'expression des molécules du CMH a été un des premiers effets biologiques attribué à l'IFN- γ . La voie de présentation des antigènes par les molécules de classe II du CMH est constitutivement active dans les cellules présentatrices d'antigène professionnelles. Cependant, comme les molécules de classe I du CMH, l'expression des molécules de classe II est fortement inductible, par l'IFN- γ , sur la plupart des cellules. L'expression induite par l'IFN- γ des molécules du CMH à la surface cellulaire résulte d'une régulation à la hausse de plusieurs gènes différents, dont leurs produits contribuent à différentes étapes dans la voie de présentation des antigènes. Ces différents gènes, tel que les chaînes α et β qui composent les molécules de classe II du CMH, la chaîne invariante (Ii), et les chaînes α et β qui forment les HLA-DM, sont requis pour l'expression normale des antigènes de classe II à la surface (Cresswell, 1994; Wolf et Ploegh, 1995) et régulé par un seul facteur de transcription inductible par l'IFN- γ , CIITA (class II transactivator) (Chang et Flavell, 1995; Kern *et al.*, 1995). En absence de ce facteur, l'expression constitutive et inductible des molécules de classe II est perdue. Ainsi le CIITA forme avec d'autres protéines un complexe de transcription obligatoire à l'expression des différentes composantes essentielles à la voie de présentation des antigènes par les molécules de classe II du CMH.

Le rôle physiologique des molécules du CMH consiste en la présentation de fragments d'antigènes (peptides) dérivés de protéines présentes à l'intérieur de la cellule aux lymphocytes T (Watts, 1997). Cette présentation est tout d'abord essentielle au développement des cellules T dans le thymus. En effet, les molécules du CMH permettent aux cellules T immatures de subir les sélections positives et négatives. Au cours de ces sélections, les cellules T sont éduquées à reconnaître les antigènes dans un contexte du soi, c'est-à-dire liés aux molécules du CMH du soi. Ce contexte est appelé la restriction au soi (Zinkernagel et Doherty, 1974). Cette restriction est très importante dans la stimulation et la suppression des réponses immunes ainsi que dans la lyse cellulaire. Ces sélections permettent également d'éliminer une grande partie des cellules T potentiellement autoréactives, c'est-à-dire qui reconnaissent des fragments peptidiques du soi. En résumé cette double sélection permet d'obtenir un répertoire de cellules T

restreint pour le CMH et autotolérant. La présentation de peptides par les molécules du CMH est aussi essentielle à l'activation des mécanismes immunitaires exercés par les cellules T. Dans ce cas, les récepteurs des cellules T (TCR) reconnaissent de petits peptides antigéniques dérivés de protéines modifiées, étrangères ou provenant d'agents infectieux, en association avec les molécules du CMH. Les complexes formés des molécules du CMH et de l'antigène forment donc le ligand reconnu par les cellules T (Benacerraf, 1981). Ces complexes permettent aux cellules T d'identifier des cellules infectées, transformées et étrangères des cellules normales. Donc, les molécules du CMH ont un rôle important dans le développement des cellules T ainsi que dans le développement des réponses des cellules T. Afin de produire une réponse appropriée contre des micro-organismes infectieux, les cellules T doivent être capables de distinguer le matériel venant du compartiment cytosolique de celui qui provient du compartiment vésiculaire. Cette distinction est possible puisque les antigènes de classe I et de classe II du CMH diffèrent par le type d'antigènes présentés. Les molécules de classe I du CMH présentent des peptides générés dans le cytosol aux cellules T cytotoxiques, les lymphocytes T CD8⁺, alors que les molécules de classe II du CMH présentent des peptides générés dans le système de vésicule de la cellule, aux lymphocytes T CD4⁺(McCluskey *et al.*, 1989).

D'autres systèmes d'antigènes que ceux du CMH jouent un rôle considérable dans les rejets des allogreffes, les systèmes mineurs d'histocompatibilité (Goulmy, 1996; Simpson et Roopenian, 1997). Ces antigènes mineurs sont des peptides dérivés des protéines du soi qui varient parmi la population, comme les protéines mitochondriales, ou les protéines reliées au sexe, comme l'antigène spécifique mâle, H-Y (Pattison et Krensky, 1997). Dans le cas où plusieurs loci mineurs seraient différents entre le donneur et le receveur, la réaction du rejet pourrait être importante (Pattison et Krensky, 1997). Ces antigènes jouent surtout un rôle significatif quand le donneur et le receveur sont compatibles au niveau des molécules du CMH (Perreault *et al.*, 1998; Simpson, 1998) et un rôle particulièrement pertinent dans les maladies du greffon contre l'hôte (GVHD) retrouvées dans la transplantation de moelle osseuse (Berger *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1991). Les antigènes mineurs deviennent également des cibles

immunogéniques critiques dans les rejets chroniques de greffes vascularisées (Valujskikh *et al.*, 1999).

1.2.2 Les cellules présentatrices d'antigène

Les cellules présentatrices d'antigène sont des cellules spécialisées dans la présentation d'antigène via leurs molécules du CMH. Ces cellules captent et dégradent les antigènes en fragments peptidiques afin de les présenter à leur surface. Ces cellules expriment à la surface des molécules essentielles aux signaux secondaires d'activation, les molécules de co-stimulation. Ces molécules de co-stimulation sont définies comme étant des stimulus, délivrés en parallèle avec les signaux au TCR, nécessaires à une activation optimale des cellules T. En absence de ces signaux, les cellules T ne pourront proliférer et ainsi exercer une réponse adéquate. La molécule de co-stimulation la mieux caractérisée demeure la molécule CD28. Lorsque celle-ci interagit avec les molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86), il y a une augmentation dans la prolifération et dans la synthèse de l'IL-2. L'interaction de CD28 avec ces ligands induit également l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L (Lenschow *et al.*, 1996). Les principales CPA sont les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B. Les cellules dendritiques sont probablement les cellules qui ont le plus grand potentiel de stimulation retrouvé dans les rejets de greffes (Setum *et al.*, 1990; Steinman, 1991). Ces cellules sont les leucocytes passagers contenus dans les différentes greffes. Le site d'activation des cellules T est incertain. Il a déjà été démontré que les cellules dendritiques qui portent les alloantigènes migrent rapidement du greffon aux organes lymphoïdes secondaire (Larsen *et al.*, 1990b) mais qu'il est aussi possible, dans les greffes vascularisées, que les cellules T soient activées par les cellules dendritiques directement au site du greffon. Cette même équipe, a également démontré une migration des cellules dendritiques à la rate (Larsen *et al.*, 1990a). Les CPA sont très importantes dans l'immunité retrouvée dans la transplantation. L'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes alloréactifs sont dépendantes de la présentation efficace des allopeptides et des interactions essentielles des molécules de co-stimulation entre les CPA et les cellules T.

Les réponses des cellules T sont aussi régulées par les CPA, puisque ces cellules délivrent aussi des signaux inhibiteurs (Arakelov et Lakkis, 2000).

1.3 Les lymphocytes T

Les cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse se différencient en deux lignées principales, les cellules souches lymphoïdes et les cellules souches myéloïdes. Parmi les cellules souches lymphoïdes, on retrouve les cellules pré-T et pré-B. Les cellules pré-T vont migrer au thymus afin de devenir des cellules T matures. Elles vont alors proliférer et évoluer afin d'exprimer et de sélectionner leurs répertoires. Ces cellules vont finalement se différencier en diverses sous-populations de cellules T. Les lymphocytes T matures vont, par la suite, quitter le thymus et circuler dans le sang et la lymphe où ils circuleront d'un organe lymphoïde secondaire à un autre, comme la rate et les ganglions (von Andrian et Mackay, 2000). Le rôle ultime des lymphocytes T est la reconnaissance du soi modifié. Ces cellules reconnaissent des antigènes du non-soi liés à des molécules du CMH du soi, via un récepteur spécifique, le récepteur des cellules T (TCR). Ce récepteur possède donc, une double reconnaissance, celle du soi et celle de la modification du soi. Ce récepteur, qui forme un complexe avec les molécules CD3, est exprimé à la surface de toutes les cellules T. On retrouve deux types différents de TCR, le TCR $\alpha\beta$ et le TCR $\gamma\delta$. Le TCR $\alpha\beta$ qui est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β est le récepteur qui est exprimé sur la majorité des cellules T périphériques. Les récepteurs $\gamma\delta$ qui sont la composition d'une chaîne γ et d'une chaîne δ se retrouvent sur seulement environ 5% de tous les thymocytes (Janeway, 1996). Leur distribution est aussi beaucoup plus limitée. Le pourcentage de cellules T $\gamma\delta$ retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires se situe entre 1-3%. Par contre, elles sont la population majeure de cellules T retrouvées dans la peau et dans l'épithélium intestinal et pulmonaire (Goldsby, 2000). Au contraire des cellules T $\alpha\beta$, ces cellules ne circulent pas dans l'organisme, elles restent localisées aux tissus où elles sont logées. Le rôle des cellules $\gamma\delta$ est peu documenté, étant donné que leurs véritables fonctions à l'intérieur du corps humain ne sont pas clairement identifiées. Ces cellules semblent avoir des fonctions dans les premières lignes de défense (Haas *et al.*, 1993). Leur réactivité sélective contre

certain micro-organismes et surtout contre des protéines de stress (Goldsby, 2000) en font de bonnes sentinelles d'agression au sens large. Certaines cellules T $\gamma\delta$ peuvent exercer la lyse de cellules tumorales sans restriction pour les molécules du CMH, indiquant ainsi que leurs fonctions pourraient être semblable aux cellules NK (Goldsby, 2000). Puisque ces cellules ont aussi la propriété de migrer à l'épithélium mucosal et à la peau, il est possible qu'elles jouent un rôle important dans les rejets de greffe de peau, d'intestin, et de poumon (Hall, 1991). Ceci pourrait peut-être expliquer en partie la vulnérabilité de ces organes au rejet, comparée aux reins, au cœur et au foie (Hall, 1991). Certaines expériences ont démontré que quelques lymphocytes T $\gamma\delta$ étaient alloréactifs, possédaient une activité cytolytique et avaient la capacité de produire des cytokines (Ciccone *et al.*, 1988; Cron *et al.*, 1989; Matis *et al.*, 1987). Cependant, une autre étude a démontré que ces cellules ne contribuent d'aucune façon aux rejets de greffe (Eto *et al.*, 1994).

Les lymphocytes T reconnaissent des antigènes qui ont été générés à l'intérieur des cellules de l'organisme et qui sont déployés à la surface cellulaire. Ces antigènes peuvent dériver de pathogènes qui se répliquent à l'intérieur même des cellules, comme les virus ou les bactéries intra-cellulaires, ou de pathogènes et de leurs produits que les cellules internalisent, par endocytose, des liquides extra-cellulaires. Ces deux types d'antigène sont reconnus par deux types de cellules distinctes, les lymphocytes T $CD8^+$ et les lymphocytes T $CD4^+$ respectivement. Ces lymphocytes possèdent un TCR $\alpha\beta$ puisque les cellules $\gamma\delta$ n'expriment pas en général les molécules accessoires $CD4$ et $CD8$ (Benjamini, 1996).

La sous-population majeure de cellules T est la population de lymphocytes T auxiliaires, les cellules T $CD4^+$. Ces lymphocytes sont restreints aux molécules de classe II du CMH. Alors, afin d'être activées, de proliférer et d'exercer leurs fonctions auxiliaires, les cellules T $CD4^+$ doivent absolument reconnaître des antigènes liés aux molécules de classe II du CMH. Ce rôle de cellules auxiliaires est attribuable à leur grande importance dans la régulation des réponses cellulaires et humorales. Ces lymphocytes, une fois activés, forment deux populations cellulaires distinctes définies

selon leur activité fonctionnelle, les cellules Th1 et Th2 (Del Prete *et al.*, 1991; Mosmann *et al.*, 1986).

Au contraire des cellules T CD4⁺, les cellules T CD8⁺ sont restreintes aux molécules de classe I du CMH. Ces molécules ont pour rôle de présenter des antigènes endogènes à la cellule, donc les cellules reconnues sont dans la plupart des cas, des cellules infectées. D'autres cellules, comme des cellules transformées ou étrangères (allogéniques) peuvent également être les cibles des cellules T CD8⁺. Ces cellules T possèdent un rôle cytotoxique puisqu'elles détruisent les cellules reconnues. Une fois stimulées, ces cellules ne pourront détruire que les cellules qui présentent les peptides antigéniques en association avec les molécules de classe I du CMH. Pour leur activation, la majorité des cellules T CD8⁺ nécessitent la coopération des cellules T CD4⁺ (Bell *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1990). Les lymphocytes T CD4⁺ produisent les facteurs de croissance et de différenciation nécessaires à l'expansion clonale et la maturation des cellules T CD8⁺ en cellules T cytotoxiques (Abbas *et al.*, 1996). Ces cellules constituent, après les cellules T CD4⁺, le deuxième mécanisme effecteur majeur de la réponse immunitaire cellulaire.

Les cellules T sont vraisemblablement les cellules les plus importantes dans l'initiation du rejet de la greffe. Plusieurs études ont démontré l'importance des cellules T CD4⁺ dans les rejets de greffe. Le rôle critique de ces cellules dans le rejet des allogreffes a premièrement été établi par l'absence de rejet chez les souris thymectomisées à la naissance (Miller, J. F. A. P., 1962) et de souris *nude* (Corley et Kindred, 1977). Une étude basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques aux molécules CD4 et CD8, a également démontré le rôle clé des cellules T CD4⁺ dans le rejet des allogreffes (Cobbold *et al.*, 1986). Une autre étude utilisant des souris déficientes pour les cellules T CD4⁺ ou les cellules T CD8⁺ a démontré que malgré une absence totale de cellules T CD8⁺, le tissu greffé était rejeté (Krieger *et al.*, 1996). Cette étude a par le fait même démontré la présence essentielle des cellules T CD4⁺ dans l'initiation d'un éventuel rejet. D'autres auteurs ont aussi démontré, par des expériences de transfert adoptif de cellules T CD4⁺ provenant de souris déficientes en cellules T

CD8⁺, que les cellules T CD4⁺ seules sont suffisantes pour induire un rejet de greffe de peau (Dalloul *et al.*, 1996a; Yamamoto *et al.*, 1998). Une expérience réalisée avec des rats irradiés a aussi démontré que le transfert de cellules T CD4⁺ et de cellules T CD8⁺ restaure plus efficacement le rejet que le transfert de cellules T CD4⁺ seules (Hall *et al.*, 1985). Dans cette même expérience, les cellules T CD8⁺ seules sont incapables de rejet. Donc, ces expériences permettent de conclure que le rejet de greffe est dépendant des cellules T CD4⁺ mais que des cellules autres que celles-ci, peuvent aussi agir en tant qu'effecteurs conduisant au rejet.

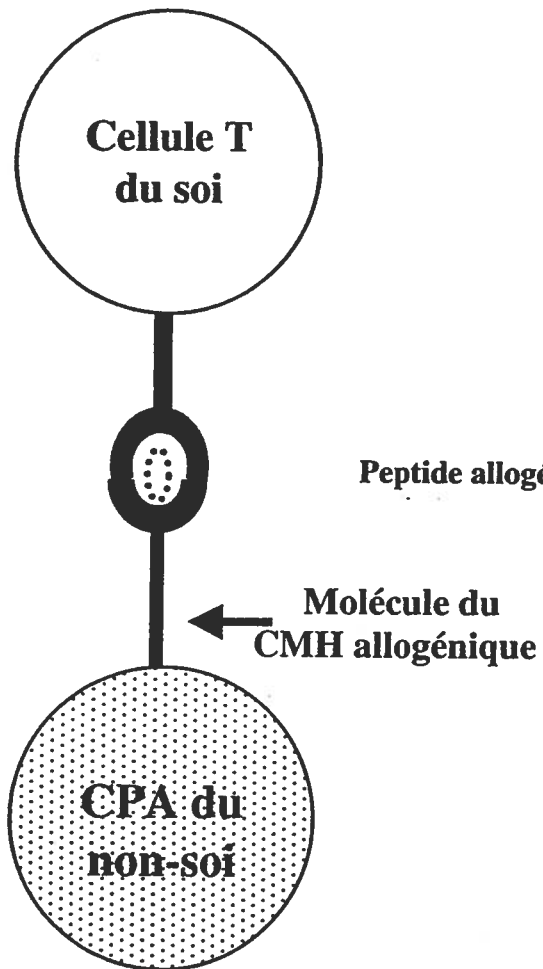
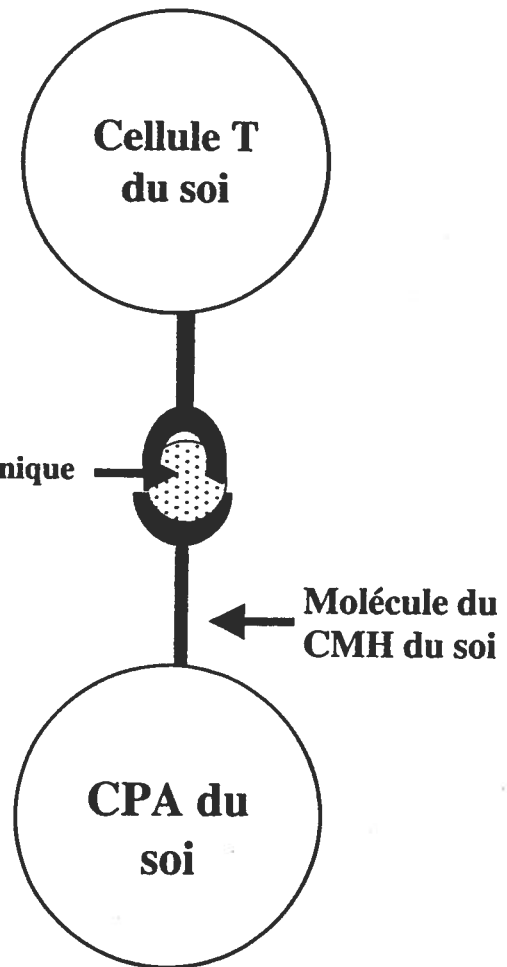
Tel que mentionné précédemment, les organes transplantés provenant de donneurs qui expriment des molécules du CMH différentes à ceux du receveur, seront rapidement rejetés par le système immunitaire. Les tissus greffés peuvent être rejeté pour une différence aussi petite qu'un acide aminé entre les différentes molécules du CMH (Janeway, 1996). Cette réaction immunitaire rapide résulte de la présence d'un grand nombre de cellules T, entre 1-10% de toutes les cellules T périphériques d'un individu, qui sont spécifiquement réactives aux molécules du CMH du non-soi (Ford *et al.*, 1975; Jones, 1973; Kaye et Janeway, 1984; Lindahl et Wilson, 1977; Wilson et Blyth, 1968). Depuis des années, plusieurs théories différentes sur les bases moléculaires des alloréponses ont été proposées afin d'expliquer cette très grande fréquence de cellules T alloréactives. Cependant, il n'y a seulement que deux hypothèses majeures qui semblent soutenir la présence de cette grande proportion de cellules T alloréactives. La première repose sur un modèle de complexité binaire. Ce dernier propose que chacune des molécules du CMH allogéniques peut s'apparier avec un très grand nombre de fragments peptidiques différents, laissant ainsi place à une très grande diversité de complexes antigéniques disponibles pour l'activation des cellules T (Matzinger et Bevan, 1977). De plus, certaines études, en accord avec cette théorie, ont aussi démontré que les réponses des cellules T alloréactives sont dépendantes des peptides associés aux molécules du CMH (Demotz *et al.*, 1991; Eckels *et al.*, 1988; Heath *et al.*, 1989; Rock et Benacerraf, 1984). À son tour, la seconde hypothèse est quant à elle basée sur un modèle de haute densité des déterminants. Celui-ci suggère que les cellules T alloréactives interagissent principalement avec des molécules allogéniques du CMH via la reconnaissance de

résidus polymorphiques (Bevan, 1984). Ainsi, contrairement au premier modèle, cette théorie suggère que les peptides liés aux molécules du CMH n'occuperaient pas un rôle clé dans l'activation des cellules T alloréactives. On expliquerait plutôt la vigueur des réponses alloréactives par une forte densité des molécules allogéniques à la surface des cellules qui conséquemment entrainerait, peu importe l'affinité des TCR, l'activation des cellules T alloréactives. Toutefois, ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusive puisqu'il existe plusieurs évidences démontrant que les molécules du CMH ainsi que les fragments peptidiques liés à ces molécules peuvent de façon indépendante contribuer aux réponses alloréactives (Lechler *et al.*, 1990; Sherman et Chattopadhyay, 1993). Ce sont les lymphocytes T alloréactifs, qui vont participer aux réactions impliquées dans les rejets de greffes. Les cellules T CD4⁺ pourront rejeter les allogreffes comportant des différences pour les molécules de classe II du CMH, tandis que les cellules T CD8⁺ rejeteront les allogreffes disparates au niveau des molécules de classe I du CMH. Cependant plusieurs expériences ont démontré que les cellules T CD4⁺ peuvent aussi rejeter des greffes différentes pour les molécules de classe I du CMH, mais les mécanismes effecteurs impliqués dans ces rejets sont incertains, puisque certains de ces travaux sont contradictoires. Une étude a démontré que les cellules T CD4⁺ seules sont suffisantes pour le rejet de greffe de peau comportant des dissimilitudes pour les molécules de classe I du CMH, en absence de cellules T CD8⁺, par la voie indirecte d'alloréactivité (Dalloul *et al.*, 1996b; Sawada *et al.*, 1997). Des souris déficientes pour les cellules T CD8⁺ rejettent aussi des greffes de peau avec des variabilités pour les molécules de classe I et de classe II du CMH sans délai comparé aux souris CD8^{+/+} (Dalloul *et al.*, 1996b). De plus, certains auteurs ont observé que le rejet était exercé par des anticorps anti-classe I produits par les cellules B, et ce avec l'aide des cellules T CD4⁺ auxillaires (Gracie *et al.*, 1990; Morton *et al.*, 1993; Sawada *et al.*, 1997). Une autre étude, quant à elle, démontre que les cellules T CD4⁺ mènent au rejet sans l'aide d'anticorps et de cellules T CD8⁺ (Wise *et al.*, 1999). Auchincloss et ses collègues ont également démontré l'implication des cellules T CD4⁺ dans le rejet d'allogreffes différentes pour les molécules de classe I du CMH. Ces cellules seront importantes pour l'activation des cellules T CD8⁺, qui à leur tour pourront reconnaître les cibles allogéniques via les les molécules de classe I du CMH (Auchincloss *et al.*, 1993).

1.4 Les voies d'alloréactivité directe et indirecte

La réponse immunitaire menant au rejet de la greffe est exercée par les lymphocytes T alloréactifs activés en réponse aux antigènes du non-soi via deux voies d'alloréactivité distinctes : la voie d'alloréactivité directe et la voie d'alloréactivité indirecte (Figure 1). Ces deux voies ont été proposées au début des années 1980 par Lechler et Batchelor (Lechler et Batchelor, 1982) suite à des travaux impliquant des greffes de rein. Brièvement, leur équipe a transplanté une seconde fois des premières allogreffes de rein chez des hôtes identiques aux premiers. Ils ont alors observé une grande réduction dans l'immunogénicité des greffes, attribuable à la perte des cellules dendritiques passagères dérivées du donneur original. Cependant, ils ont tout de même observé des rejets en absence d'immunosuppression. C'est à la suite de ces expériences qu'ils ont proposé l'existence de deux voies d'allorecognition. Dans la voie directe d'alloréactivité, les cellules T alloréactives reconnaissent une molécule du CMH allogénique intacte sur les CPA retrouvées au site du greffon (non-soi). En général, les cellules T CD4⁺ reconnaîtront directement les molécules du CMH de classe II, tandis que les cellules T CD8⁺ reconnaîtront les molécules du CMH de classe I. Cette voie a été la première et longtemps la seule à être considérée lors des rejets de greffe. Cette voie est en fait unique à la transplantation. Étant donné la force des réactions mixtes lymphocytaires (MLR) allogéniques, il est suggéré que la voie directe d'alloréactivité soit prédominante dans les rejets de greffe et qu'elle soit la principale voie responsable du rejet aigu (Bradley, 1996; Lechler et Batchelor, 1982; Pattison et Krensky, 1997). En effet, cette voie entraîne une réponse proliférative très élevée puisque la fréquence des cellules T qui reconnaissent directement une molécule du CMH est 100 fois plus élevée que celle des cellules T qui y répondent indirectement (Auchincloss et Sultan, 1996; Liu *et al.*, 1993). Lafferty et ses collègues ont démontré une survie prolongée lors d'une expérience de greffe dépourvue de CPA allogéniques en absence d'immunosuppression (Coulombe *et al.*, 1996). De plus, une autre étude a démontré la survie prolongée d'une greffe vascularisée démontrant une compatibilité parfaite pour les antigènes de classe I du CMH et une survie indéfinie des reins dans le tiers des receveurs avec une compatibilité

Figure 1: Schéma représentant les voies d'alloréactivité directe et indirecte.

Alloréactivité directeAlloréactivité indirecte

pour les antigènes de classe II du CMH (Pescovitz *et al.*, 1984). Lechler et Batchelor ont également démontré le retour de l'immunogénicité par addition de cellules dendritiques des souris d'où provenaient les greffons (Lechler et Batchelor, 1982). Puisque la fréquence des cellules T qui répondent à un stimuli allogénique est grande, la compatibilité pour les molécules du CMH est très importante.

Cette compatibilité est tout aussi importante dans la voie indirecte d'alloréactivité, puisque les molécules du CMH y jouent aussi un très grand rôle. Dans cette voie d'alloréactivité, les cellules T allogéniques reconnaissent des alloantigènes du CMH ou mineurs d'histocompatibilité dérivés du donneur qui, suite à leur apprêtement sont présentés sous la forme de peptides antigéniques par les molécules du CMH à la surface des CPA du receveur. Cette voie d'alloréactivité est analogue à celle utilisée par les cellules T dans la reconnaissance d'antigènes protéiques, c'est-à-dire à la voie classique de présentation des antigènes exogènes (Bradley, 1996; Sayegh et Carpenter, 1996). Il est suggéré que cette voie d'alloréactivité pourrait jouer un rôle essentiel dans les rejets chroniques (Bradley, 1996; Sayegh et Carpenter, 1996; Shirwan, 1999). La fréquence de cellules T activées dans cette voie est très faible. Liu et ses collègues (Liu *et al.*, 1993) ont observé que les cellules T impliquées dans la voie indirecte d'alloréactivité sont cent fois moins fréquentes que les cellules T qui participent dans la voie directe. De plus une étude récente a démontré que le pourcentage de cellules T qui répondent via la voie indirecte d'alloréactivité représente 10% du nombre total de cellules T alloréactives retrouvées dans les rejets de greffe de peau (Benichou *et al.*, 1999). Même si cette voie est moins puissante que la première, des études ont démontré que le rejet peut être initié par la voie indirecte d'alloréactivité (Auchincloss *et al.*, 1993) et que dans certains cas le rejet dépendant de réponses indirectes se manifeste plus rapidement que le rejet dépendant de réponses directes (Gould et Auchincloss, 1999; Lee *et al.*, 1997). Donc, la différence fondamentale entre ces deux voies d'alloréactivité réside dans la population des CPA responsables des réponses des cellules T. Dans la voie directe d'alloréactivité, la population de CPA provient du greffon lui-même. Selon les connaissances actuelles des mécanismes de base de l'immunologie, ces cellules doivent alors quitter la greffe et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires drainant pour qu'une interaction avec les

cellules T soit possible. Au contraire, dans la voie d'alloréactivité indirecte, ce sont les CPA du soi qui permettent l'activation des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires drainant, puisque les CPA professionnelles, c'est-à-dire les CPA capables d'activer des lymphocytes T naïfs, sont localisées exclusivement dans ces organes.

1.5 Mécanismes effecteurs des lymphocytes T CD4⁺

Une fois activées, les cellules T CD4⁺ vont exprimer différentes molécules nécessaires à l'activation des autres cellules de l'immunité, comme la molécule CD40L. Celle-ci lie la molécule CD40 présente, entre autres, sur les CPA et les cellules endothéliales (Foy *et al.*, 1996). Comme exemple, la liaison de CD40L à la molécule CD40 présente sur les cellules endothéliales, entraîne une augmentation dans l'expression de diverses molécules d'adhésion cellulaires essentielles à la migration des leucocytes aux sites de l'inflammation (Grewal et Flavell, 1998).

Les cellules T CD4⁺ peuvent également synthétiser et sécréter différentes cytokines qui interviennent dans l'activation et la différenciation d'une variété de cellules, telles les cellules T CD8⁺ (Kalams et Walker, 1998; Lee *et al.*, 1994; Popov *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1991), les lymphocytes B (DeKruyff *et al.*, 1993; Gonzalez *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 1993; Steele *et al.*, 1996), et les macrophages (Goto *et al.*, 1997; Pattison et Krensky, 1997; Sirak *et al.*, 1997; Valujskikh *et al.*, 1998). Ces cellules nouvellement activées pourront à leur tour produire une grande variété de cytokines, facteurs de croissance et d'alloanticorps, qui tous ensemble pourront contribuer à la destruction du greffon. Les cellules T CD4⁺ activées forment deux populations cellulaires distinctes définies selon leur activité fonctionnelle, c'est-à-dire selon leur patron de sécrétion de cytokines, les cellules Th1 et Th2 (Abbas *et al.*, 1996; Del Prete *et al.*, 1991; Mosmann *et al.*, 1986). Tandis que les cellules Th1 produisent principalement de l'IL-2, de l'IFN- γ et la lymphotoxine (LT / TNF- β), les cellules Th2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et de l'IL-13 (Zhai *et al.*, 1999). Certaines études ont démontré que les cellules effectrices qui conduisent au rejet de la greffe possèdent un phénotype Th1 alors que les réponses Th2 pourraient y jouer un rôle protecteur ou régulateur

conduisant à la survie de l'allogreffe (Chen *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1996; Sayegh *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 1992). D'autres études suggèrent que selon diverses circonstances, les cellules T CD4⁺ Th2 peuvent aussi être capable d'induire le rejet d'allogreffes de cœur (Chan *et al.*, 1995; Piccotti *et al.*, 1996; VanBuskirk *et al.*, 1996b) ou de rejet de greffes de peau comportant des différences au niveau des antigènes mineurs d'histocompatibilité (Zelenika *et al.*, 1998). Les réponses de type Th1 pourraient contribuer au rejet puisque que l'IL-2 et l'IFN- γ peuvent amplifier les réponses CTL et DTH, en plus de permettre l'activation des macrophages et de la production d'anticorps fixant le complément (Dallman, 1995; Fitch *et al.*, 1993; Nickerson *et al.*, 1994; Romagnani, ; Seder et Paul, 1994). Au contraire, les réponses Th2 pourraient permettre la survie des allogreffes, par leur sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 qui inhibent le développement des réponses Th1 et qui possèdent des fonctions antagonistes aux différentes activités de l'IFN- γ (Fitch *et al.*, 1993; Romagnani, ; Seder et Paul, 1994), permettant ainsi une modulation à la baisse des réponses CTL et DTH dirigées par les cellules de type Th1. Les cellules Th2 pourraient aussi conduire à l'absence de rejet de la greffe en déviant la production d'anticorps vers des anticorps de type IgE, qui ne fixent pas le complément (Lakkis, 1998a). Toutefois, d'autres suggèrent que les cellules Th2 pourraient fournir l'aide aux cellules B pour la production d'alloanticorps (Hall, 1991). Le rôle précis de ces deux sous-populations de cellules T dans les rejets demeure à être résolu.

1.6 Les cytokines

Malgré l'identification des rôles des cytokines *in vitro*, les fonctions *in vivo* sont difficiles à déterminer à cause de leur redondance, leur pléiotropisme et le fait qu'une seule cytokine peut avoir des effets multiples sur une même cellule (Lakkis, 1998a).

La première cytokine produite par les cellules T nouvellement activées est l'IL-2. Cette cytokine induit, par sa liaison avec le récepteur de l'IL-2, la prolifération des cellules T. L'IL-2 peut agir de façon autocrine, c'est-à-dire sur la même cellule qui la produite, ou de façon paracrine, c'est-à-dire sur les cellules avoisinantes. Cette cytokine permet également la différenciation du type de cellules Th1. On a cru pendant longtemps

que l'IL-2 était une cytokine essentielle au rejet de la greffe, jusqu'à ce que des souris déficientes pour cette cytokine soient disponibles. Ces souris peuvent rejeter des allogreffes d'îlots (Nickerson *et al.*, 1994; Steiger *et al.*, 1995), et ce probablement à cause de la présence d'autres facteurs de croissance des cellules T comme l'IL-4, IL-7, IL-10, IL-12 et l'IL-15 qui rendent la prolifération indépendante de l'IL-2 (Nickerson *et al.*, 1994). Les souris déficientes en IL-2 peuvent également rejeter des allogreffes de coeur vascularisé (Dai *et al.*, 1998).

Une autre cytokine clé impliquée dans les rejets d'organes est l'IFN- γ (Pattison et Krensky, 1997). Cette cytokine et l'IL-2 contribuent à la destruction du greffon de plusieurs façons incluant: le recrutement et l'activation des macrophages (Azuma *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996; Russell, 1995; VanBuskirk *et al.*, 1996a), l'activation des cellules endothéliales (Pattison et Krensky, 1997), l'augmentation de l'expression des molécules du CMH (Halloran *et al.*, 1986), des protéines de transport associées à la présentation de l'antigène (Pattison et Krensky, 1997), des molécules de co-stimulation (Freeman *et al.*, 1995; Kuchroo *et al.*, 1995; Ohshima et Delespesse, 1997) et des chémokines (Fairchild *et al.*, 1997; Nadeau *et al.*, 1996) dans la greffe. Ces cytokines permettent également l'induction du changement de classe des anticorps de type Ig pour des anticorps fixant le complément IgG2a (Paul et Seder, 1994) en plus de fournir l'aide pour l'induction de la cytotoxicité spécifique à la greffe par les cellules T CD8⁺ (Dallman, 1995; Nickerson *et al.*, 1994). Cependant, les souris déficientes pour la production d'IFN- γ sont capables de rejet de greffe (Konieczny *et al.*, 1998; Saleem *et al.*, 1996).

L'IL-4 est une cytokine clé dans le développement des réponses Th2 et dans la différenciation des cellules B. Elle est importante pour la prolifération et la production d'anticorps des cellules B. Cette cytokine en association avec l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-13, est également impliquée dans la commutation isotypique des immunoglobulines, par exemple elle augmente la production des IgG1.

L'IL-5 est une cytokine responsable de la prolifération, l'activation et le recrutement tissulaire des éosinophiles (Foster *et al.*, 1996; Kopf *et al.*, 1996; Nakajima

et al., 1992; Sanderson, 1992). Le rôle de ces cellules dans les rejets de greffe semblerait être important lorsque les mécanismes habituellement impliqués sont inhibés par une réponse de type Th2 dominante (Chan *et al.*, 1995; Goldman *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 1993a; Matesic *et al.*, 1998b). Les éosinophiles activés produisent une variété de molécules toxiques, comme la protéine basique majeure (MBP) et des protéines cationiques (Kroegel *et al.*, 1994) qui comme les produits des macrophages peuvent causer beaucoup de dommage tissulaire au greffon. Le rôle précis de ces cellules dans les rejets est toutefois encore incertain.

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique impliquée dans la régulation des réponses immunes, les réactions inflammatoires aiguës et de l'hématopoïèse (Kishimoto *et al.*, 1992). Cette cytokine stimule la croissance des lymphocytes B activés à une phase tardive de leur différenciation en plasmocyte (Janeway, 1996) et a également été observée pour induire la différenciation Th2, *in vivo*, en stimulant la production d'IL-4 par les cellules T activées (Rincon *et al.*, 1997). L'IL-6 possède aussi plusieurs propriétés anti-inflammatoires (Tilg *et al.*, 1994; Xing *et al.*, 1998).

L'IL-10 est une cytokine principalement produite par les cellules Th2, les macrophages et les cellules T CD8⁺. Cette cytokine inhibe, entre autres, l'activité des cellules NK, la production de cytokines Th1 et l'activité des macrophages (Conti *et al.*, 2003). L'IL-10 possède également des effets immunostimulateurs sur les cellules B et sur le développement des cellules T cytotoxiques (Conti *et al.*, 2003). Le rôle de cette cytokine dans la transplantation est controversé (Bromberg, 1995). Cette cytokine qui est aussi produite par les cellules B et les CPA, possède des effets immunostimulateurs et immunosuppresseurs (Pattison et Krensky, 1997). L'IL-10 est retrouvée dans des allogreffes tolérées, mais parfois absente de greffes rejetées (Pattison et Krensky, 1997). L'inhibition de l'IL-10, avec des anticorps spécifiques, conduit directement au rejet de la greffe (Gorczynski et Wojcik, 1994). Par contre, l'addition de protéines de fusion IL-10-Fc accélère le rejet d'îlots (Zheng *et al.*, 1995).

L'IL-12 est en majeure partie sécrétée par les cellules dendritiques (Sousa *et al.*, 1997) et les macrophages (Trinchieri, 1995). Cette cytokine, avec l'IFN- γ , possède un rôle majeur dans la différenciation des cellules Th1 (Zhai *et al.*, 1999). L'IL-12, en plus d'induire la production d'IFN- γ par les cellules NK et par les cellules T, augmente la génération de cellules cytotoxiques (Trinchieri, 1995).

L'IL-15 qui n'est pas une cytokine produite par les cellules T, exerce des fonctions mitogènes pour les cellules NK et les cellules T. Cette cytokine peut, en effet, lier la chaîne β du récepteur de l'IL-2 (Russell *et al.*, 1993). Plusieurs études ont démontré la présence élevée de cette cytokine dans différentes allogreffes rejetées de reins et de poumons (Lewis *et al.*, 2001; Weiler *et al.*, 2001) (Rizzo *et al.*, 2000). Une expérience a également démontré la survie d'allogreffes de coeurs en présence de récepteurs solubles de l'IL-15 (Smith *et al.*, 2000). Cependant, une autre étude a démontré l'absence d'IL-15 dans le rejet d'allogreffes cardiaques (Alvarez *et al.*, 2001). Le rôle de l'IL-15 dans les rejets de greffes demeure à être résolu, quoique la majorité des études démontrent un rôle important de cette cytokine, surtout dans allogreffes de reins, en plus d'être une cible thérapeutique potentielle pour prévenir le rejet associé à la greffe de nouveaux organes (Lewis *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2000).

Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire qui a la capacité d'induire l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, d'augmenter les thromboses intravasculaires et d'activer les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages (Beutler, 1995). Comme l'IL-1, le TNF exerce aussi une inflammation locale des tissus (Dinarello, 1996). De plus, l'interaction du TNF avec son récepteur, TNF-R1, conduit à la mort cellulaire via des mécanismes d'apoptose (Josien *et al.*, 1998). Une étude réalisée avec des souris déficientes pour ce récepteur a démontré une survie prolongée des allogreffes de coeurs et que cette survie n'était pas attribuable à un recrutement diminué des cellules T mais plutôt à la perte de leurs activités (McKee *et al.*, 2002). D'autres études ont également observé la présence et l'importance du TNF- α et du TNF- β (Lt) dans les rejets et dans la perte des fonctions des allogreffes (Azzawi *et al.*, 1996; Azzawi *et al.*, 1999; Grenz *et al.*, 2000; Teramoto *et al.*, 1999). D'autres ont démontré que les niveaux

d'ARNm correspondant au TNF- α sont maximaux lorsque les greffes sont nécrosées et rejetées, et sont minimaux dans les greffes syngéniques (Saito *et al.*, 1993). Les fonctions pro-inflammatoires du TNF suggèrent donc qu'elles peuvent jouer un rôle important dans l'initiation et dans la mise en place des réponses alloréactives. Différentes expériences, par leurs résultats, ont identifié le TNF comme un marqueur prédominant dans le rejet d'allogreffes (Azzawi *et al.*, 1999).

Le rôle exact des cytokines dans les rejets de greffe est difficile à établir puisque les différentes études démontrent des résultats contradictoires. Ceux-ci sont certainement dus à la complexité des cascades engendrées après la transplantation (Arakelov et Lakkis, 2000). Les expériences effectuées avec des souris déficientes pour différents gènes de cytokines ou avec des anticorps neutralisants spécifiques ont permis d'établir certaines conclusions. Premièrement, les actions des cytokines sont extrêmement redondantes. En effet, les souris déficientes pour l'IL-2, l'IL-4 et l'IFN- γ rejettent les greffes malgré le fait que ces cytokines possèdent des fonctions immunostimulatoires importantes *in vitro*. Deuxièmement, une seule cytokine peut avoir de multiples actions (Lakkis, 1998b). Donc, dépendamment du contexte, de l'environnement, de la voie d'alloréactivité et de certainement plusieurs autres facteurs, les cytokines peuvent agir de façon complètement différente.

1.7 Autres cellules pouvant participer dans les rejets de greffe

Parmi les cellules infiltrantes de la greffe, certains suggèrent que les lymphocytes T spécifiques représentent moins de 1% des cellules retrouvées (Hutchinson, 1991) tandis que d'autres affirment que ces mêmes cellules sont celles qui prédominent les allogreffes (Wakabayashi *et al.*, 1986). Toutefois, en plus des contradictions sur les proportions exactes des cellules infiltrantes les allogreffes, la nature des cellules, autres que les lymphocytes T, pouvant infiltrer ces greffes est aussi contradictoire. Ces autres cellules peuvent être, entre autres, des lymphocytes B (Wakabayashi *et al.*, 1986), des macrophages (Dempster, 1977; Gassel *et al.*, 1990; Hancock *et al.*, 1983; Mayer *et al.*,

1988; von Willebrand et Hayry, 1978), des neutrophiles (Wakabayashi *et al.*, 1986) et des cellules NK (Hutchinson, 1991).

1.7.1 Les cellules T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺, en tuant les cellules qui expriment des molécules de CMH de classe I étrangères, ont un rôle important dans les rejets de greffe (Kagi *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). L'activation des cellules T CD8⁺ est induite par les CPA et est dépendante des cellules T CD4⁺. La liaison de la molécule CD40L, présente sur les cellules T CD4⁺ activées, à la molécule CD40 retrouvée sur les cellules dendritiques (CPA) fait augmenter l'expression des molécules de co-stimulation B7-1 et de B7-2 en plus d'induire la production de l'IL-12. Ces changements augmentent l'habileté des cellules dendritiques à induire la différenciation des cellules T CD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques (Bennett *et al.*, 1998) (Ridge *et al.*, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998). Toutefois, la présence de cellules T CD8⁺ capable d'activation indépendamment des cellules T CD4⁺ a été démontré dans certaines souches de souris (Rosenberg *et al.*, 1987; Sprent *et al.*, 1986). Ces cellules s'activeraient par une autoproduction d'IL-2 (Rosenberg *et al.*, 1988). Les cellules T CD8⁺, tout comme les cellules T CD4⁺, ont le potentiel de produire une grande variété de cytokines. C'est pourquoi on leur attribue aussi l'existence de deux sous-populations basées sur leur profil cytokinique, les cellules Tc1 et Tc2 (Cerwenka *et al.*, 1998; Croft *et al.*, 1994; Dobrzanski *et al.*, 1999; Sad *et al.*, 1995). Les cellules Tc1 produisent de l'IFN- γ et du TNF- α , tandis que les cellules Tc2 vont plutôt produire l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 (Dobrzanski *et al.*, 2000). Ces deux classes de cellules sont toutes deux cytotoxiques (Croft *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1996; Sad *et al.*, 1995) et peuvent également exercer un rejet de greffe de peau (Matesic *et al.*, 1998a). Les cellules cytotoxiques vont tuer les cellules de l'allogreffe par deux mécanismes distincts: le premier est la voie des perforines/granzymes qui est exercée par la sécrétion de granules cytolytiques, et le second par induction de l'apoptose via la voie Fas/Fas-L (Arakelov et Lakkis, 2000). Des transcrits de granzyme B et de perforines ont été observés, en grande quantité, dans les rejets aigus (Lipman *et al.*, 1994). De plus, des transcrits de Fas sont exprimés de façon constitutive chez des receveurs de cœur

syngénique et allogénique, quoique l'expression de Fas-L est régulé à la hausse seulement dans les greffes de souris qui ont rejeté (Larsen *et al.*, 1995). Dans ce même modèle de souris, une inhibition de la voie Fas/Fas-L n'altère pas le processus du rejet. L'inhibition de la voie des perforines/granzymes n'altère pas non plus les rejets (Schulz *et al.*, 1995). Donc, ces voies sont probablement plus importantes dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes que dans la cytotoxicité directe envers la greffe (Pattison et Krensky, 1997). Des lymphocytes T CD4⁺ peuvent aussi agir comme des CTL (Hancock *et al.*, 1989; Rosenberg et Singer, 1992). La cytotoxicité de ces cellules serait également exercé via la voie Fas/Fas-L (Hahn *et al.*, 1995; Van Parijs et Abbas, 1996).

1.7.2 Les lymphocytes B

Les cellules B exercent leurs fonctions effectrices par la sécrétion d'alloanticorps, c'est-à-dire d'anticorps spécifiques aux molécules du CMH allogéniques. L'activation de ces cellules est dépendante des CPA et des cellules T activées. La liaison de la molécule CD40 sur les lymphocytes B activés par les CPA, avec les molécules CD40 à la surface des cellules T est essentielle à la génération des réponses immunes humorales adaptatives caractérisées par un changement isotypique des anticorps IgM en IgG (Grewal et Flavell, 1998). Les différents alloanticorps d'une variété d'isotype exercent différentes fonctions incluant l'opsonisation, permettant ainsi l'activation du complément et une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) par les cellules NK ou les macrophages (Arakelov et Lakkis, 2000), et l'activation des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles tous impliqués dans le rejet des allogreffes (Hall, 1991). L'exemple le plus dramatique des fonctions des alloanticorps est le rejet hyperaigu. L'importance relative des alloanticorps dans les rejets aigus et chroniques est peu définie (Arakelov et Lakkis, 2000). Par exemple, des souris déficientes pour les cellules B sont capables de rejet aigu, alors que de l'artériosclérose chronique ne s'est jamais manifesté après une transplantation chez ces mêmes souris, suggérant un rôle important des alloanticorps dans le rejet chronique (Russell *et al.*, 1997).

1.7.3 Les cellules NK

Les cellules NK sont activées par différentes cytokines comme l'IL-2, IL-15 et l'IFN- α . Ces cellules ne requièrent pas d'activation directe des cellules T CD4⁺. Ces cellules sont des cellules cytotoxiques comme les CTL, elles tuent les cellules cibles par des sécrétions de perforines et de granzymes. De plus, elles sécrètent du TNF, qui induit l'apoptose des cellules qui expriment le récepteur du TNF (Arakelov et Lakkis, 2000). Ces cellules ne possèdent pas de récepteur spécifique à l'antigène. Cependant, elles expriment un récepteur de faible affinité pour les portions Fc des IgG. Donc les cellules NK pourront lier des cibles recouvertes d'anticorps IgG et les tuer par un mécanisme d'ADCC. C'est par ce mécanisme que les cellules NK, aidées des anticorps, jouent un certain rôle dans les rejets de greffe. Une étude récente a démontré que lorsqu'on élimine l'activité des cellules NK dans des souris CD28^{-/-}, il y a une survie prolongée des allogreffes de coeurs (Maier *et al.*, 2001). Cependant, d'autres études ont également démontré l'inverse, c'est-à-dire où, en absence de cellules NK, on ne pouvait observer aucune amélioration sur la survie des greffes de peau, de cœur ou de rein (Markus *et al.*, 1991). (Bradley *et al.*, 1985) Ces résultats suggèrent donc que leur présence dans les greffons rejetés n'indique pas nécessairement leur contribution. Même si ces cellules ne peuvent rejeter directement les allogreffes, elles contribuent certainement aux dommages causés au greffon (Rossini *et al.*, 1999) Ces cellules jouent plutôt un rôle dans les rejets de greffes de moelle osseuse (Taylor *et al.*, 2002) et dans les rejets des xéno greffes (Lin *et al.*, 1997) (Auchincloss, 1988; Lim *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1991).

1.7.4 Les macrophages

Les macrophages peuvent jouer plusieurs rôles dans l'initiation et la propagation des réponses immunes aux greffes. Tout comme les cellules T CD8⁺, les macrophages vont eux aussi être stimulés par les lymphocytes T CD4⁺ activés. L'activation s'exerce via les molécules CD40 et CD40L. La liaison de la molécule CD40 sur les macrophages par les cellules T augmente leurs activités pro-inflammatoires (Grewal et Flavell, 1998). Les productions d'IFN- γ et de lymphotoxines par les cellules T CD4⁺ vont aussi permettre

aux macrophages de se différencier (Arakelov et Lakkis, 2000). Les macrophages effecteurs vont libérer plusieurs médiateurs de l'inflammation comme des cytokines (TNF, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15), des chemokines, des réactifs oxygénés, l'oxyde nitrique (NO), des enzymes protéolytiques et des protéines de matrice extracellulaires qui conduisent à la fibrose et à l'endommagement de la greffe (Arakelov et Lakkis, 2000; Azuma *et al.*, 1995; Dalloul *et al.*, 1996a; Gomez-Flores *et al.*, 1997; Schook *et al.*, 1994; Sekine *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1994). Les macrophages semblent jouer un rôle important dans les rejets de greffe puisqu'une étude a démontré que la destruction d'une greffe de peau est inhibée par l'absence de macrophages dans la greffe (Hou *et al.*, 2001). Une autre étude a obtenu des résultats qui suggèrent que les principales cellules effectrices exerçant le rejet de peau sont les macrophages (Yamamoto *et al.*, 1998).

1.8 Problématique

Étonnamment, à ce jour, nous ne connaissons pas réellement les mécanismes précis qui causent les rejets de greffe et ce dans les deux voies d'alloréactivité. Ceci est attribuable au fait que le processus du rejet de greffes est un phénomène complexe exercé par la coopération de différentes cellules du système immunitaire et que peu de modèles adéquats sont disponibles pour permettre une telle étude. Les modèles utilisés jusqu'à présent pour l'étude des voies d'alloréactivité impliquées dans les rejets de greffe sont presque tous des modèles complètement allogéniques. Dans ceux-ci la caractérisation de la voie indirecte d'alloréactivité est difficile à accomplir puisque la fréquence de précurseurs, comparativement à la voie directe, y est très faible. Comme mentionné auparavant les cellules T qui répondent à la voie indirecte d'alloréactivité représente seulement 10% du nombre total de cellules T qui sont activées au cours du rejet (Benichou *et al.*, 1999). Alors, l'étude des contributions des deux voies d'alloréactivité serait beaucoup plus facile avec un modèle d'étude qui serait capable, de façon indépendante, de rejet par chacune des deux voies d'alloréactivité. Puisque ces deux voies d'alloréactivité diffèrent au niveau des molécules et des cellules impliquées dans la reconnaissance des alloantigènes, il est fort probable que les événements suivant cette initiation des réponses immunitaires diffèrent également. La compréhension des

mécanismes d'activation et des activités effectrices des cellules T CD4⁺ pourrait nous informer sur plusieurs aspects de la réponse immunitaire impliquée dans les rejets de greffe. Une telle compréhension permettra certainement de mieux caractériser les actions précises du système immunitaire impliquées dans les rejets de greffe et éventuellement permettre d'identifier adéquatement des cibles potentielles pour la mise en place de futures thérapies immunosuppressives.

1.9 Modèle de rejet de greffe de peau

L'objectif de notre étude était d'élucider les fonctions effectrices des cellules T CD4⁺ dans un modèle de rejet de greffe de peau exercé par les voies directe et indirecte d'alloréactivité. Nous avons établi un modèle unique de greffe de peau composé de souris transgéniques pour un récepteur de cellule T (TCR). Dans ce modèle, deux ligands peuvent être reconnus par un seul et même TCR. Donc, ce modèle nous donne une opportunité unique d'étudier les deux voies d'alloréactivité exercé par un seul clonotype de cellule T (Figure 2). Une des lignées de souris (2.102Tg) est transgénique pour un récepteur $\alpha\beta$ de cellule T dérivé du clone de cellule T 2.102 (Grakoui *et al.*, 1999). Ce clone de cellule T CD4⁺ est spécifique au peptide immunodominant Hb(64-76) et restreint à la molécule de classe II I-E^k (Lorenz et Allen, 1988) (Figure 2). Ce peptide correspond aux acides aminés compris entre les résidus 64 et 76 de l'allèle d de la chaîne bêta de l'hémoglobine murine (Hb β d). Donc, afin d'étudier la voie indirecte d'alloréactivité, nous avons pris avantage d'une seconde lignée de souris transgéniques, la lignée B6(mHEL-Hb), qui a aussi été générée dans le laboratoire du Dr. Paul Allen (Washington University, St-Louis, MO, USA). Cette lignée a été générée à partir de souris C57BL/6 et est transgénique pour la protéine chimérique mHEL-Hb. Cette protéine chimérique a été générée en introduisant la séquence codante pour l'épitope Hb(64-76) entre les codons 43 et 44 du gène du lysozyme du poulet (HEL). Cette protéine est exprimée de façon membranaire par fusion avec la partie codante de la portion transmembranaire de la molécule du CMH de classe I, L^d. Par ailleurs, cette construction est exprimée sous le contrôle du promoteur E α , promoteur du gène de la chaîne alpha de la molécule de classe II du CMH I-E (Nelson *et al.*, 1997; Williams *et*

titre de souris receveuses, des souris 2.102Tg déficientes pour le gène RAG-1 (2.102Tg/RAG^{-/-}). La déficience pour le gène RAG-1 entraîne l'expression d'une population clonotypique de cellules T 2.102Tg, puisque ce gène est essentiel aux recombinaisons des gènes des TCR et BCR.

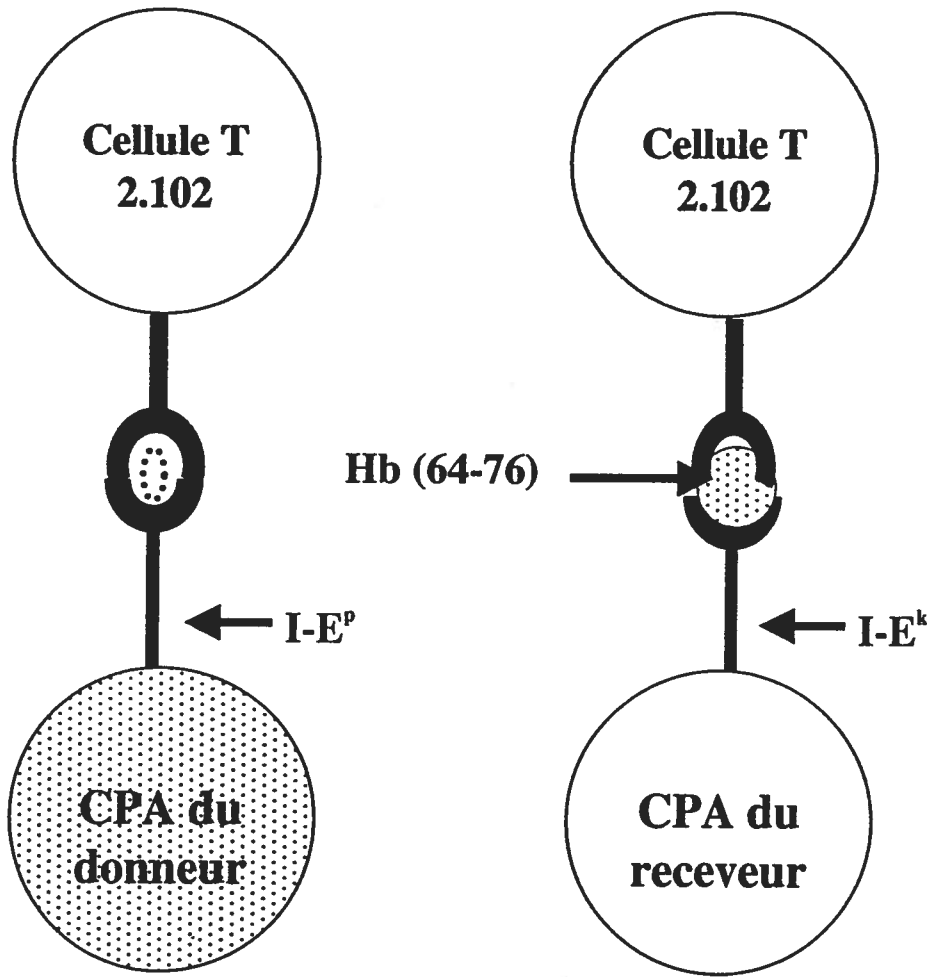


Figure 3: Schéma de la séquence codante pour la construction de la protéine chimérique mHEL-Hb.

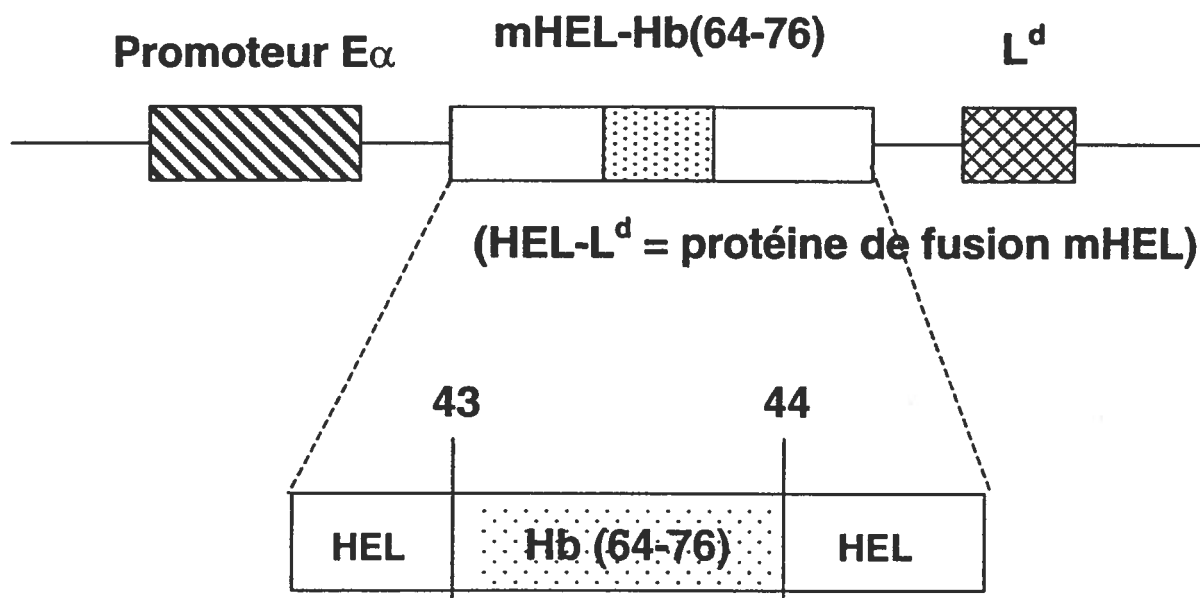
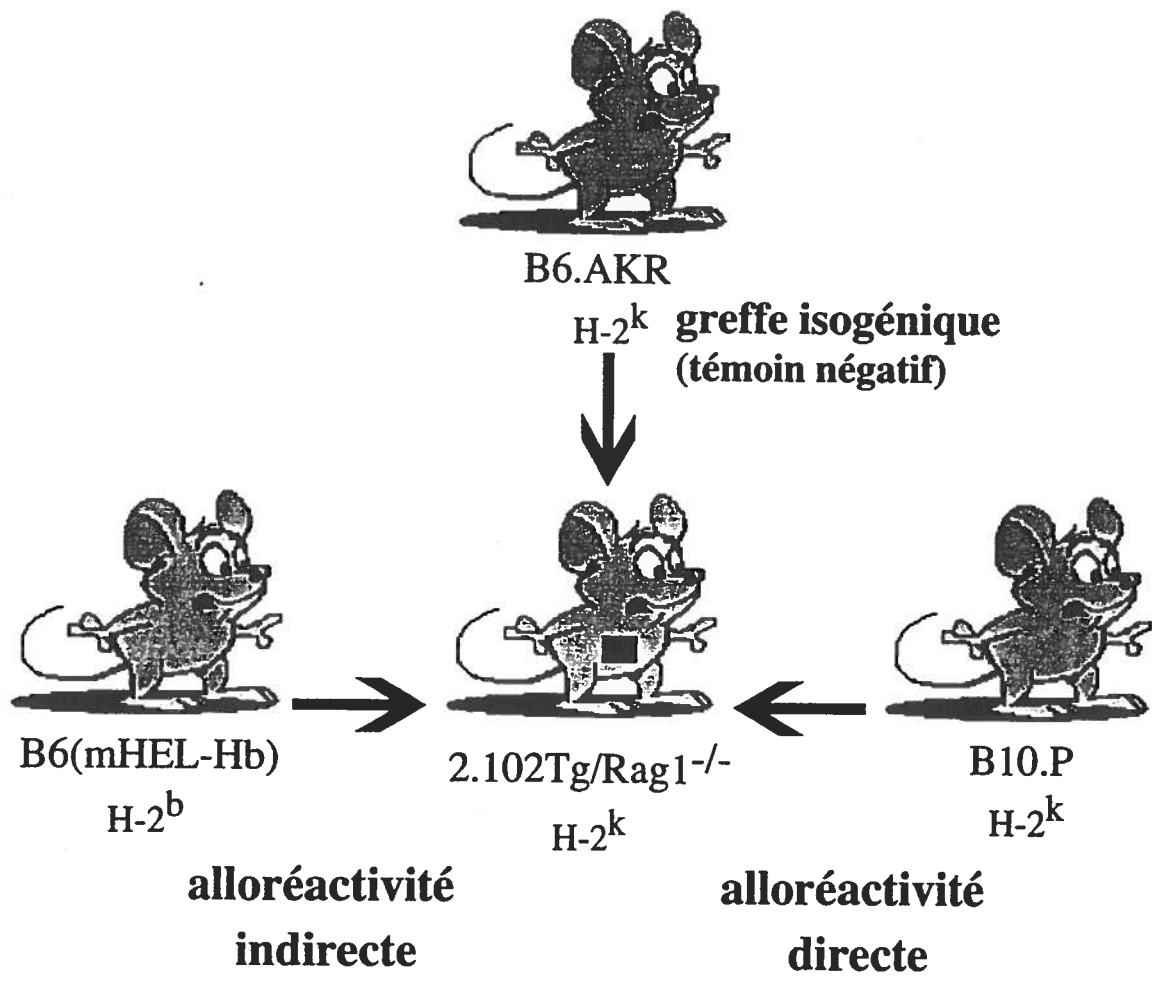


Figure 4: Modèle de rejet de greffe de peau allogénique.



CHAPITRE 2
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Souris

Les souris C57BL/6 (H-2^b) proviennent du Laboratoire Jackson (Bar Harbor, ME, USA). Les souris transgéniques pour la molécule mHEL-Hb (B6(mHEL-Hb)) ont été générées avec des souris C57BL/6, donc d'haplotype H-2^b. Ces souris ont été décrites précédemment par Williams et ses collègues (Williams *et al.*, 1998). Brièvement, cette lignée de souris transgéniques exprime l'épitope Hb(64-76) inséré dans une forme transmembranaire de la molécule du lysozyme du poulet (HEL). Cette protéine chimérique, qui se nomme mHEL-Hb, est exprimée sous le contrôle du promoteur de la chaîne alpha des molécules de classe II du CMH, I-E. La deuxième lignée de souris utilisée dans notre modèle, est transgénique pour un récepteur de cellule T dérivé d'un clone de cellule T $\alpha\beta$ CD4⁺ spécifique, le clone 2.102 (Grakoui *et al.*, 1999). Ces souris ont été générées avec des souris de type B6.AKR, donc d'haplotype H-2^k. Ces mêmes souris sont aussi déficientes pour le gène RAG-1, un gène essentiel aux recombinaisons des TCR et des BCR (2.102Tg/RAG^{-/-}). Les deux lignées de souris transgéniques mentionnées ainsi que les souris B10.P (H-2^p) et B6.AKR (H-2^k) nous ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr. Paul Allen (Washington University, St-Louis, MO, USA) et leur reproduction s'est effectuée au Centre de Biologie Expérimentale de l'INRS - Institut Armand-Frappier.

2.2 Purification des cellules T CD4⁺

Afin d'obtenir une population exclusive de cellules T CD4⁺ 2.102, 3 rates de souris 2.102Tg ont été récupérées et broyées. Suite à une série de trois lavages et une filtration, la suspension cellulaire a été resuspendue ($10^7/80\mu\text{l}$) dans un tampon de purification (PBS avec 0,5% BSA et 5mM EDTA). Après une incubation de 15 minutes à 4°C avec des microbilles magnétiques couplées à des anticorps anti-CD4 (L3T4) (MACS, Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) et une seconde série de lavage, la

suspension de cellules (10^8 /ml) a été purifiée par un passage sur une colonne à sélection positive LS (MACS, Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA). Des analyses de cytométrie en flux démontre que la population résultante correspond à plus de 90% de cellules T CD4⁺ et moins de 1% de cellules T CD8⁺ et de cellules CMH II⁺ (résultats non-présentés).

2.2 Analyses de spécificité

Des cellules T CD4⁺ (1×10^5) purifiées (MACS, Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) de souris 2.102Tg ont été stimulées, en triplicata, avec différentes dilutions (10^3 - 10^6) de cellules de rate irradiées (2000 rad) ou d'antigènes solubles provenant de différentes souris. Après une incubation standard de 72 heures, de la [³H]Thymidine (0,4 µCi/puit) a été ajoutée à chacune des cultures pour une période de 18 heures. La prolifération des cellules a été mesurée par l'incorporation de la radioactivité dans les cellules, exprimée en CPM. La préparation des antigènes solubles a été effectuée selon un protocole modifié décrit par Benichou et ses collègues (Benichou *et al.*, 1999). Brièvement, des cellules de rate irradiées ont été resuspendues à 40×10^6 cellules/ml dans du HBSS (GIBCO BRL, Canadian Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada), soniquées 10 fois 1 seconde sur de la glace, congelées dans un bain de glace sèche avec de l'éthanol et décongelées à la température de la pièce. Après une centrifugation à 1200 rpm de 10 minutes, les préparations d'antigènes solubles se retrouvant dans les surnageants ont été utilisées. Des dilutions 1:2 des surnageants obtenus ont été ajoutées dans des plateaux de culture cellulaire de 96 puits. Des cellules de rate irradiées de souris B6.AKR (5×10^5) ont aussi été ajoutées aux plateaux comme source de cellules présentatrices d'antigène.

2.3 Greffes de peau

Les allogreffes de peau provenant de queues de souris ont été effectuées selon des techniques standard de greffe de peau (Rosenberg *et al.*, 1991). À l'aide d'un scalpel et de pinces, la peau entière présente sur la queue des souris donneuses a été complètement

enlevée, et puis coupée en plusieurs pièces d'environ 1 cm². Ces pièces ont ensuite été déposées dans du HBSS (GIBCO BRL) stérile jusqu'au moment de la transplantation. Les souris receveuses 2.102Tg/RAG^{-/-} ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine/xylazine (1/10, v/v; 0,2 ml/g du poids de la souris) (Wyatt-Ayerst/Bayer, ce mélange nous est préparé par les techniciens animalier du centre de biologie expérimentale de l'INRS-IAF) et rasées sur le dos et l'abdomen. Les greffons ont alors été déposés sur le dos, aux endroits préalablement départis de peau (de la surface vascularisé jusqu'au pelage), des souris receveuses. Les greffons ont ensuite été stabilisés à l'aide de points de suture 6-0 (CDMV, St-Hyacinthe, QC, Canada) réalisés aux quatre coins du greffon et protégés par des pansements de type Band-Aid. Ces pansements ont été enlevés à la septième journée suivant la greffe et les greffons observés quotidiennement jusqu'à l'apparition du rejet. Les allogreffes ont été considérées rejeté lorsqu'elles sont nécrosées à plus de 90%.

2.4 Analyses de prolifération *in vitro*

Des cellules de rate (5×10^4) des souris greffées ont été déposées dans des plaques de culture de 96 puits et stimulées avec différentes dilutions des peptides Hb(64-76) ou Hb(64-76)Q72 en présence de cellules de rate (5×10^5) de souris B6.AKR (H-2^k) irradiées. Après une incubation de 72 heures, de la [³H]Thymidine (0,4μCi/puit) (ICN, Aurora, OH, USA) a été ajoutée à chacune des culture pour une période de 18 heures. La prolifération des cellules est mesurée par l'incorporation de la radioactivité dans les cellules, exprimée en CPM. De plus, les concentrations effectrices qui engendrent 50% de la prolifération maximale (EC₅₀) ont été calculées à l'aide des courbe de prolifération obtenues. La séquence en acides aminés des peptides Hb(64-76) et Hb(64-76)Q72 sont respectivement GKKVITAFNEGLK et GKKVITAFQEGLK. Ces peptides nous ont été généreusement donnés par le laboratoire du Dr. Paul Allen (Washington University, St-Louis, MO, USA).

2.5 Analyses de cytométrie en flux

Les cellules de rate et de ganglions (1×10^6) ont été incubées 30 minutes dans un bain de glace avec un ou l'autre des anticorps spécifiques aux molécules CD25 (clone 7D4, Pharmingen, Mississauga, ON, Canada), CD62L (clone MEL-14, Cedarlane, Hornby, ON, Canada), CD44 (clone IM7.8.1, Cedarlane) et CD95L (clone MFL3, Pharmingen) couplés à la biotine. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées à nouveau 30 minutes à la noirceur, dans un bain de glace avec un anticorps spécifique à la molécule CD4 conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (clone H129.19, Pharmingen) et de la streptavidine-PE-Cy5 (Cedarlane). Les cellules ont alors été lavées, resuspendues dans du tampon de cytométrie (PBS avec 1% de BSA et 0,02% de sodium azide) et analysées par cytométrie en flux sur un appareil de type Coulter Epics XL (Hialeah, FL, USA).

2.6 Analyses ELISA

Des cellules de rate ou de ganglions axillaires ($2,5 \times 10^5$) des souris transplantées ont été stimulées *in vitro* avec des cellules de rate irradiées (2000 rad) de souris B6.AKR (5×10^6) comme source de cellules présentatrices d'antigène et $1 \mu\text{M}$ du peptide Hb(64-76) dans 2 ml de milieu complet (RPMI 1640 (GIBCO BRL), 10% FCS (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 1% Glutamax (GIBCO BRL), 0,5% gentamicin (GIBCO BRL), 1% β -ME (ICN, Aurora, OH, USA), 1% MEM Non-essential Amino Acids Solution (GIBCO BRL), 1% HEPES Buffer Solution (GIBCO BRL)) dans des plateaux de 24 puits. Les surnageants ont été récoltés après une incubation de 48 heures à 37°C , 5% CO_2 . Les profils cytokiniques (IL-4 et IFN- γ) des surnageants récupérés ont été analysés à l'aide de trousse ELISA commerciales OptEIA™ (Pharmingen,) dans des plaques ELISA Maxi-Sorp (Nunc, Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Canada). La réaction de liaison des anticorps a été déterminée à l'aide d'un substrat commercial appelé TMB (Pharmingen) et analysée à une longueur d'onde de 450nm.

2.7 Analyses d'incorporation du BrdU

Des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} ont été greffées et injectées (i.p.) quotidiennement avec 2 mg d'une solution de BrdU (Sigma, St-Louis, MO, USA) (5mg/ml de PBS). Les cellules de rate et de ganglions ont été récupérées et marquées selon un protocole modifié décrit par Norwich et ses collaborateurs (Norwich *et al.*, 1999). Brièvement, les cellules (1×10^6) ont été incubées sur de la glace pour une période de 30 minutes avec un anticorps spécifique aux molécules CD4 de souris, conjugué à la phycoérythrine (PE) (clone H129.19, Pharmingen). Les cellules ont par la suite été lavées et fixées par addition goutte à goutte d'éthanol 70% froid. Après une incubation de 30 minutes sur de la glace, les cellules ont été lavées avec 1 ml de PBS et incubées à nouveau 30 minutes, à la température de la pièce dans 1 ml de PBS contenant 1% de paraformaldéhyde et 0,01% Tween-20. Les cellules ont ensuite été centrifugées et traitées avec 60 µg de DNase I (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) dans 1 ml d'une solution de 0,15M de NaCl, 4,2mM de MgCl₂ à un pH de 5 pour une période de 15 minutes à la température de la pièce. Pour terminer, les cellules ont été incubées avec un anticorps monoclonal spécifique au BrdU, conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (clone 3D4, Pharmingen), lavées et finalement analysées par cytométrie en flux sur un appareil de type Coulter Epics XL (Hialeah, FL, USA).

2.8 Préparation de l'ARN

Les greffons ont été récupérés des souris greffées et immédiatement déposés dans une solution commerciale de préservation de l'ARN appelée RNAlater (Ambion Inc., Austin, TX, USA) afin d'éviter la dégradation éventuelle de l'ARN. L'extraction de l'ARN total du greffon a ensuite été effectuée selon les indications retrouvées dans la trousse commerciale d'extraction RNeasy Mini Kits, disponible à la compagnie QIAGEN (Qiagen, MD, USA).

2.9 RT-PCR

La synthèse du premier brin d'ADN complémentaire a été effectuée avec une quantité de 1 µg d'ARN total, un mélange d'hexanucléotides 1X (Roche Diagnostics) et 200 U de l'enzyme SUPERSRIPT™II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL). Nous avons utilisé les conditions de réaction recommandées par le manufacturier de l'enzyme pour la synthèse de l'ADNc. Le PCR a été réalisé dans un volume total de 20 µl selon les conditions suivantes : 35 cycles de 94°C pour un temps de 30 secondes, 60°C pour un temps de 30 secondes et 72°C pour un temps de 50 secondes. Brièvement, 1 µl d'ADNc a été ajouté à une solution contenant du tampon de PCR 1X (GIBCO BRL), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs (Roche Diagnostics), 1 pmol de chacun des amorces et 1,25U de l'enzyme Taq platinum polymerase (GIBCO BRL). Les séquences des oligonucléotides utilisés sont les suivantes : IL-4(+): accgatgaatccaggcatcg, IL-4(-): atgcacggagatggatgtgc, IFN-γ(+): acggcacagtcattgaaagc, IFN-γ(-): gcaatactcatgaatgcaccc, 2.102(+): tcgattccccttctgtctgtattacac, 2.102(-): aaaattgcggccgcacgtggggccccagctcagtagcaccgatagtcgggtgc, GAPDH(+): ccttcattgacctcaactacat, GAPDH(-): ccaaagttgtcatggatgacc. Ces amorces ont été synthétisées dans le laboratoire du Dr. François Shareck de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les oligonucléotides pour Fas-L nous ont gracieusement été donnés par le laboratoire du Dr. Pascale Duplay (INRS-Institut Armand-Frappier). Les échantillons ont été analysés à l'aide de gels d'électrophorèse et de marquage au bromure d'éthidium.

CHAPITRE 3
RÉSULTATS

Chapitre 3

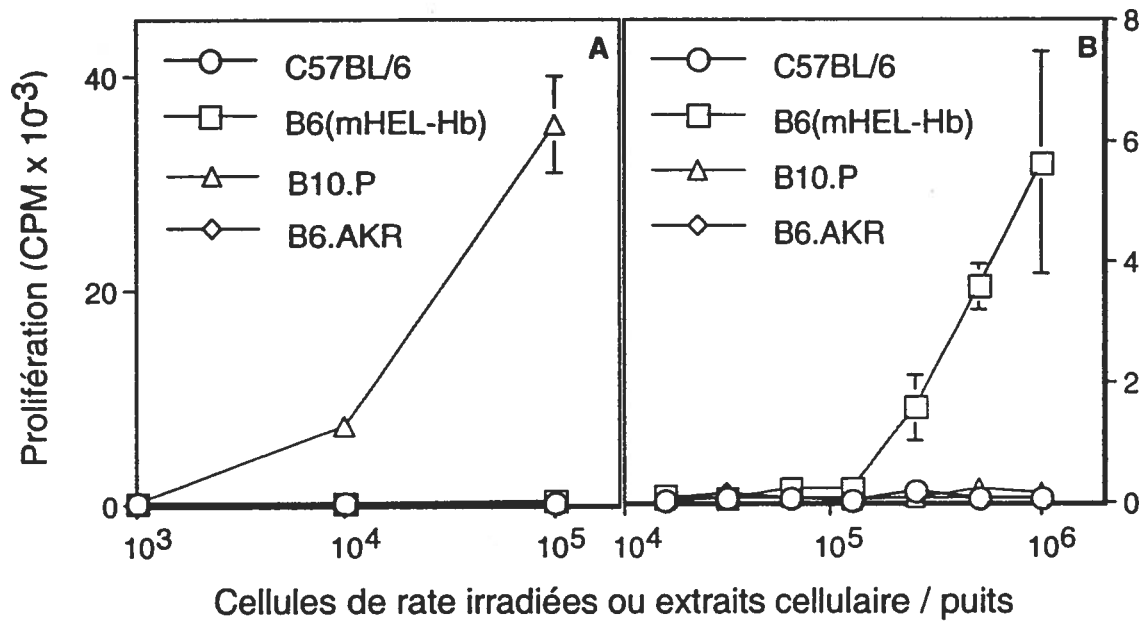
Résultats

L'étude de chacune des voies d'alloréactivité, qui est le sujet principal du laboratoire, est réalisée à l'aide d'un modèle d'étude bien caractérisé de rejet de greffe de peau allogénique. La greffe de peau est pour l'instant le type de greffe réalisé puisque cette greffe est techniquement facile et rapide. De plus, avec ce type de greffe les rejets y sont facilement observés. Brièvement, le modèle employé au sein du laboratoire est composé de diverses souris transgéniques qui permettent l'étude des deux voies d'alloréactivité de façon indépendante. La lignée de souris qui est greffée est transgénique pour un récepteur de cellule T CD4⁺ dérivé d'un clone de cellule T, le clone 2.102. Dans notre modèle, ce clone reconnaît directement la molécule de classe II du CMH allogénique I-E^P et indirectement le peptide Hb(64-76) en association avec la molécule de classe II du CMH du soi, I-E^K. Il est à noter que dans ce modèle d'étude, le peptide Hb(64-76) est exprimé de façon analogue aux molécules de classe II du CMH, permettant ainsi l'étude de la voie indirecte d'alloréactivité.

3.1 L'antigène H-2^P est reconnu par les cellules T 2.102 seulement par la voie directe d'alloréactivité et l'épitope Hb(64-76) seulement par la voie indirecte d'alloréactivité.

Puisque le modèle d'étude utilisé dans ce projet est entièrement basé sur la capacité des cellules T 2.102 Tg à reconnaître deux antigènes différents à l'intérieur de chacune des deux voies d'alloréactivité, il était donc essentiel de confirmer expérimentalement ces spécificités avec les antigènes utilisés. Ainsi, la réactivité des cellules T CD4⁺ 2.102 transgéniques (2.102Tg) contre les alloantigènes H-2^P et mHEL-Hb a été comparée *in vitro*, en utilisant des extraits cellulaires irradiés ou des cellules de rate de souris B10.P (H-2^P), B6(mHEL-Hb) (H-2^b), B6.AKR (H-2^k) et C57BL/6 (H-2^b). Les cellules T 2.102Tg ont démontré une forte réactivité contre les cellules intactes de

Figure 5: Prolifération des cellules T 2.102Tg purifiées après une stimulation avec des cellules de rate irradiées ou des extraits de cellules de rate générés par sonication. Des cellules de rate ou des extraits cellulaires de souris C57BL/6 (cercle), B6(mHEL-Hb) (carré), B10.P (triangle) et B6.AKR (losange) ont été utilisés pour l'activation des cellules T 2.102Tg. Des cellules T CD4⁺ purifiées (5x10⁵ cellules/puit) de souris 2.102Tg ont été stimulées en triplicata avec a) un nombre croissant de cellules de rate irradiées et b) des dilutions en série d'extraits cellulaires provenant de différentes quantités de cellules de rate. L'activation des cellules T a été mesurée en CPM, par l'incorporation de la [³H]Thymidine. Chacune des valeurs représentées sur ce graphique représente la moyenne ± l'écart-type. Ce résultat est représentatif d'une série de trois expériences.

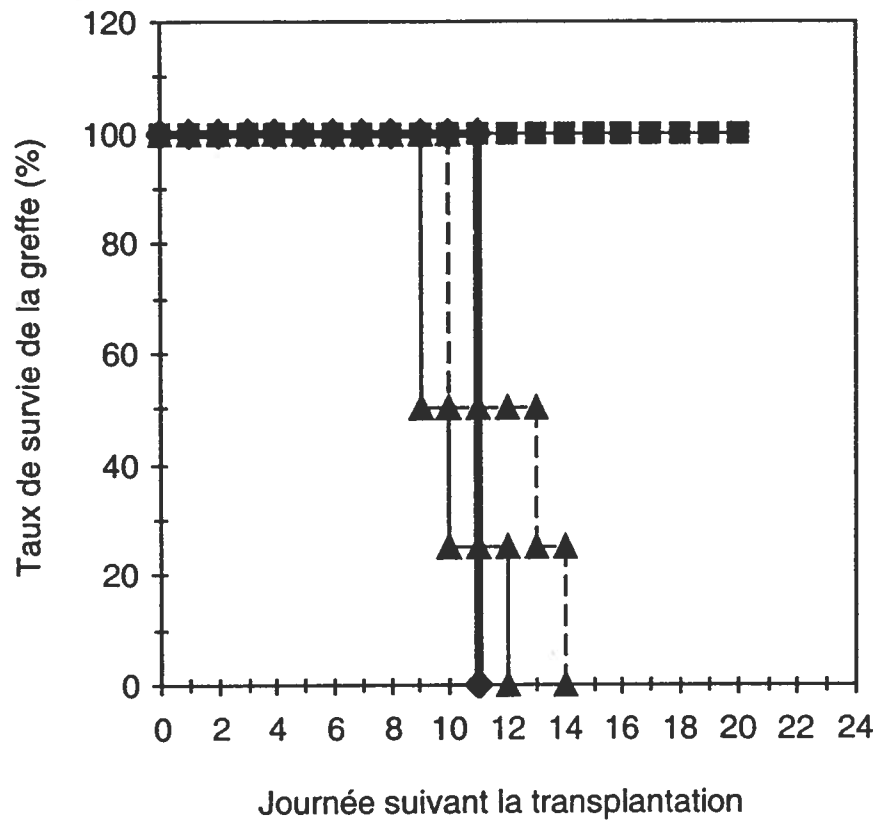


rate de souris B10.P, contrairement aux extraits cellulaires provenant de ces mêmes souris, qui sont incapables de stimuler une quelconque prolifération (Figure 5). Ces résultats nous permettent donc de conclure que les cellules T 2.102Tg sont alloréactives aux alloantigènes H-2^P seulement par la voie directe d'alloréactivité. De plus, nous avons aussi observé que les cellules T 2.102Tg sont alloréactives aux antigènes mHEL-Hb seulement par la voie indirecte d'alloréactivité puisqu'elles ont démontré une forte réactivité envers les extraits cellulaires de souris B6(mHEL-Hb) (Figure 5B) et aucune réactivité contre les cellules de rate de ces mêmes souris (Figure 5A). Les résultats obtenus avec les cellules de rate et les extraits cellulaires provenant des souris C57BL/6 ont démontré que ceux-ci sont incapable de stimuler une prolifération chez les cellules T 2.102Tg. Ce résultat nous indique donc qu'aucun antigène H-2^b n'est reconnu par les cellules T 2.102Tg autant pour la voie directe qu'indirecte, démontrant ainsi que la réactivité de ces dernières contre les extraits cellulaires de souris B6(mHEL-Hb) est uniquement due à la molécule mHEL-Hb. Dans cette même expérience, les cultures avec les cellules de rate et les extraits cellulaires des souris B6.AKR ont été utilisées à titre de témoin isogénique.

3.2 Les cellules T CD4⁺ 2.102 peuvent initier un rejet de greffe de peau par chacune des deux voies d'alloréactivité.

Notre étude entière repose sur un modèle murin de greffe de peau allogénique où chacune des voies d'alloréactivité sont étudiées par la réalisation de greffes de peau provenant de souris B10.P (voie directe) et de souris B6(mHEL-Hb) (voie indirecte) à des souris 2.102Tg déficiente pour le gène RAG-1 (2.102Tg/RAG^{-/-}). Étonnamment, la comparaison des cinétiques de rejet par ces souris révèle qu'elles sont similaires pour les deux voies d'alloréactivité. En effet, les rejets apparaissent entre 9 et 12 jours suivant la transplantation (Figure 6). Il est intéressant de noter que les cinétiques de rejet des souris non-transgéniques B6.AKR greffées avec de la peau de souris B10.P sont aussi similaires à celles des souris transgéniques 2.102Tg/RAG^{-/-}. De plus, tel qu'attendu, les greffes

Figure 6: Cinétiques de rejet de greffe de peau par les voies directe et indirecte d'alloréactivité. Des échantillons de peau de queue de souris B10.P (triangle), B6(mHEL-Hb) (losange) ou B6.AKR (carré) ont été greffés sur le dos de souris du même sexe 2.102Tg/RAG^{-/-} (ligne pleine) ou B6.AKR (ligne pointillée). Les greffons sont considérés rejeté lorsqu'ils sont nécrosés à 90% et plus. Ces résultats sont représentatifs d'une série de plus de 5 expériences.



—▲— Allogreffe B10.P (n=4)

—◆— Allogreffe B6(mHEL-Hb) (n=4)

—■— Isogreffe B6.AKR (n=4)

--▲-- Allogreffe B10.P (n=4)

isogéniques B6.AKR (H-2^k), ne sont pas rejetées et de plus, elles sont demeurées intactes plusieurs mois suivant la greffe (résultats non-présentés). Ainsi, nos résultats démontrent clairement que les cellules T CD4⁺ 2.102 ont la capacité d'induire, *in vivo*, des rejets de greffe de peau allogénique via chacune des voies d'alloréactivité.

3.3 Une expansion de cellules est uniquement observée dans les ganglions axillaires des souris qui ont rejeté par la voie indirecte d'alloréactivité.

Afin de vérifier notre hypothèse de travail, qui propose que certains mécanismes effecteurs ou d'activation seraient spécifiques pour chacune des deux voies d'alloréactivité, la caractérisation de ces mécanismes a été effectuée par l'étude de la différenciation, suite au rejet, des cellules T 2.102Tg en cellules effectrices. Pour ce faire, la rate et les différents ganglions des souris greffées ont été prélevés après l'apparition de tous les rejets, c'est-à-dire à la onzième journée suivant la transplantation. Comme on peut l'observer aux tableaux 3 et 4, les nombres totaux de cellules ainsi que de cellules T CD4⁺ retrouvées dans les quatre ganglions drainant la greffe, les ganglions axillaires, ont considérablement augmentés chez les souris qui ont rejeté via la voie indirecte d'alloréactivité (les allogreffes B6(mHEL-Hb)). Cependant, aucune expansion cellulaire CD4⁺ significative n'est observée dans ces mêmes organes lymphoïdes secondaires des souris qui ont rejeté par la voie directe d'alloréactivité (les allogreffes B10.P) (Tableau 4). De plus, aucune augmentation dans le nombre total de cellules pour chacune des voies d'alloréactivité n'a été observée dans les ganglions mésentériques, poplitéaux, et inguinaux (résultats non-présentés). Afin d'établir une cinétique d'activation des cellules T CD4⁺ 2.102, les différents organes lymphoïdes secondaires ont aussi été prélevés à la troisième et à la septième journée suivant les transplantations. Aucune expansion significative des cellules T n'est observée pour chacune des voies au jour 3 (résultats non-présentés) et au jour 7 suivant la greffe (Tableaux 3 et 4). Par ailleurs, aucune expansion significative n'a été observée aux jours expérimentaux 3, 7 et 11 dans les rates des souris qui ont été greffées avec des échantillons de peau de souris B10.P et B6(mHEL-Hb) (Tableaux 5 et 6). Ces premiers résultats sur la différenciation

Tableau 3. Nombre total de cellules retrouvées dans les ganglions axillaires des souris 2.102Tg/RAG⁺ greffées. Les suspensions cellulaires des ganglions axillaires des différentes souris greffées, récupérés aux jours 7 et 11 suivant la transplantation, ont été comptées au microscope dans des solutions de PBS avec 2% d'acide acétique.

Origine du greffon	Nombre total de cellules ($\times 10^5$)	
	Jour 7	Jour 11
Souris B6.AKR (n=4)	1,91 \pm 1,19	1,93 \pm 0,92
Souris B10.P (n=5)	4,11 \pm 2,07	4,49 \pm 3,22
Souris B6(mHEL-Hb) (n=5)	3,13 \pm 2,08	17,90 \pm 8,44 *

* $p < 0.05$

Les statistiques des résultats obtenus ont été analysées à l'aide du test de type Student.

Tableau 4. Nombre total de cellules T CD4⁺ retrouvées dans les ganglions axillaires des souris 2.102Tg/RAG⁻ greffées. Les suspensions cellulaires des ganglions axillaires des différentes souris greffées, récupérés aux jours 7 et 11 suivant la transplantation, ont été comptées par cytométrie en flux. La totalité des cellules a été marquée avec un anticorps spécifique au marqueur CD4 conjugué à la phycoérythrine (PE) (clone H129.19, Pharmingen) dans un bain de glace pour une période de 30 minutes. Les cellules ont alors été lavées, resuspendues dans du tampon de cytométrie (PBS avec 1% de BSA et 0,02% de sodium azide) et analysées par cytométrie en flux sur un appareil de type Coulter Epics XL (Hialeah, FL, USA). Le nombre total de cellules T CD4⁺ a été établi en fonction du pourcentage de cellules T CD4⁺ présent dans la population totale de cellules analysées.

Origine du greffon	Nombre total de cellules T CD4 ⁺ (x10 ⁴)	
	Jour 7	Jour 11
Souris B6.AKR	0,29 ± 0,31	0,30 ± 0,32
Souris B10.P	4,24 ± 5,13	4,31 ± 3,99
Souris B6(mHEL-Hb)	3,59 ± 7,03	98,00 ± 51,60 *

* p<0.05

Les statistiques des résultats obtenus ont été analysées à l'aide du test de type Student.

Tableau 5. Nombre total de cellules retrouvées dans la rate des souris 2.102Tg/RAG⁺ greffées. Les suspensions cellulaires de la rate des différentes souris greffées, récupérés aux jours 7 et 11 suivant la transplantation, ont été comptées au microscope dans des solutions de PBS avec 2% d'acide acétique.

Origine du greffon	Nombre total de cellules ($\times 10^7$)	
	Jour 7	Jour 11
Souris B6.AKR	$3,85 \pm 2,00$	$2,44 \pm 1,31$
Souris B10.P	$3,05 \pm 2,53$	$1,72 \pm 0,74$
Souris B6(mHEL-Hb)	$2,27 \pm 0,45$	$1,63 \pm 0,86$

Tableau 6. Nombre total de cellules T CD4⁺ retrouvées dans la rate des souris 2.102Tg/RAG⁺ greffées. Les suspensions cellulaires de la rate des différentes souris greffées, récupérés aux jours 7 et 11 suivant la transplantation, ont été comptées par cytométrie en flux. Les cellules (1×10^6) ont été incubées avec un anticorps spécifique au marqueur CD4 conjugué à la phycoérythrine (PE) (clone H129.19, Pharmingen) dans un bain de glace pour une période de 30 minutes. Les cellules ont alors été lavées, resuspendues dans du tampon de cytométrie (PBS avec 1% de BSA et 0,02% de sodium azide) et analysées par cytométrie en flux sur un appareil de type Coulter Epics XL (Hialeah, FL, USA). Le nombre total de cellules T CD4⁺ a été établi en fonction du pourcentage de cellules T CD4⁺ présent dans la population totale de cellules analysées.

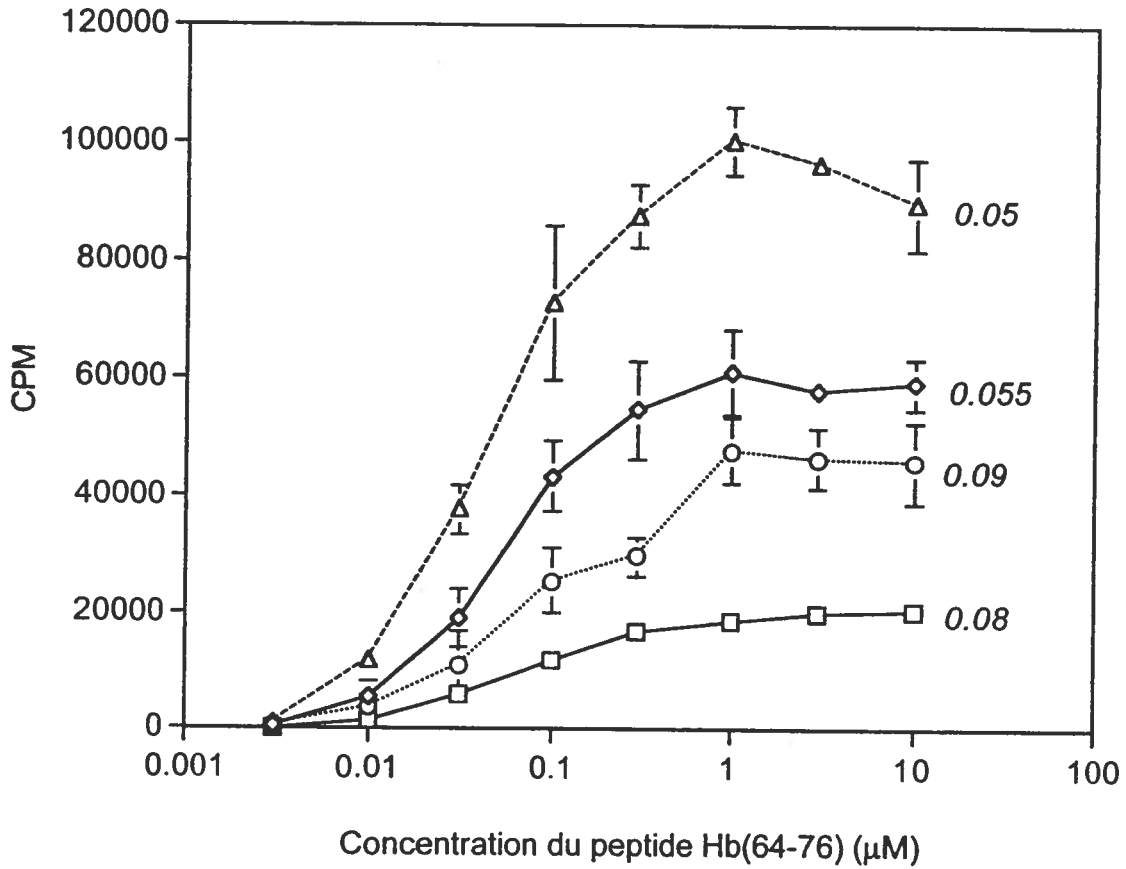
Origine du greffon	Nombre total de cellules T CD4 ⁺ (x10 ⁶)	
	Jour 7	Jour 11
Souris B6.AKR	1,14 ± 0,92	1,61 ± 0,90
Souris B10.P	3,25 ± 1,75	2,82 ± 1,30
Souris B6(mHEL-Hb)	2,11 ± 1,63	2,67 ± 1,11

des cellules indiquent qu'une activation cellulaire CD4⁺ est uniquement présente dans les ganglions drainant la greffe des souris qui ont rejeté leur greffe de peau par la voie indirecte d'alloréactivité.

3.4 Aucune altération majeure de la capacité proliférative des cellules T 2.102Tg n'est observée dans les voies directe et indirecte d'alloréactivité lors d'une stimulation *in vitro*.

Afin de s'assurer de la capacité des cellules T 2.102Tg à proliférer *in vitro* suite à leurs réponses exercées au cours des rejets de greffe de peau, les cellules de la rate des souris transplantées ont été stimulées *in vitro*. Les courbes obtenues démontrent tous un profil similaire de prolifération suite à une stimulation avec le peptide agoniste Hb(64-76) (Figure 7). Les variations des CPM obtenus entre les souris analysées lors de cette expérience peuvent tout simplement être associées à des différences dans la fréquence de cellules T CD4⁺ transgéniques qui est variable (10-50% des splénocytes totaux) d'une souris à l'autre (Grakoui *et al*, données non-publiées). On peut observer, à la figure 7, que la concentration effectrice qui engendre 50% de la prolifération maximale (EC_{50}) (nombre en italique) est similaire pour chacune des courbes de prolifération. Bref, cette concentration se situe, pour l'ensemble du graphique, entre 0,05 et 0,09 μ M de peptide Hb(64-76). Tel qu'attendu, aucune prolifération n'a été observée dans les cultures réalisées avec le peptide Hb(64-76)Q72 (résultats non-présentés). Ce peptide correspond au peptide Hb(64-76) où l'asparagine en position 72 a été modifiée pour une glutamine, abolissant ainsi toute activité biologique pour le clone de cellule T 2.102Tg (Evavold *et al.*, 1994) . Ces cultures étaient donc les témoins négatifs de nos expériences de prolifération. Les courbes de prolifération obtenues ainsi que les résultats de la section précédente nous indiquent donc, que les cellules T 2.102Tg sont toujours présentes dans les organes lymphoïdes secondaires suite à un rejet de greffe de peau allogénique. De plus, les courbes nous indiquent également que, suite au rejet, les cellules T 2.102Tg n'ont subi aucune altération majeure dans leur capacité à proliférer *in vitro*.

Figure 7: Prolifération *in vitro* des cellules T 2.102Tg provenant des différentes souris greffées. Des cellules de rate de souris greffées avec des échantillons de peau de souris B10.P (losange), B6(mHEL-Hb) (cercle), B6.AKR (carré) et de souris non-greffées (triangle) ont été stimulées en triplicata avec différentes dilutions du peptide Hb(64-76). La prolifération des cellules T a été mesurée en CPM, par l'incorporation de la [³H]Thymidine. Les valeurs correspondant à l'EC₅₀ sont indiquées pour chacune des courbes (nombre en italique). Chacune de ces courbes représente la prolifération cellulaire des splénocytes d'une souris et est représentative de 4 souris pour chaque type de greffe.

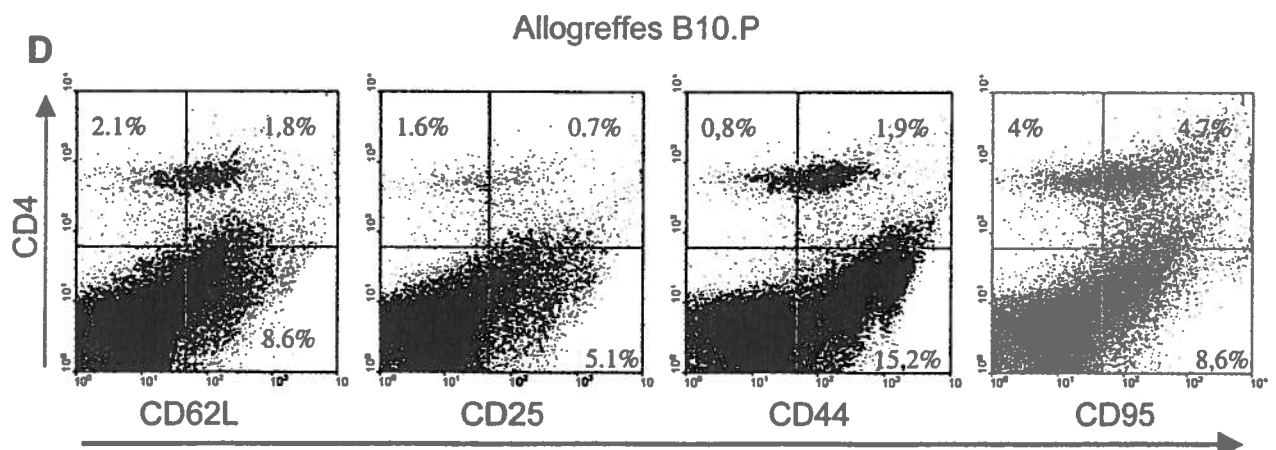
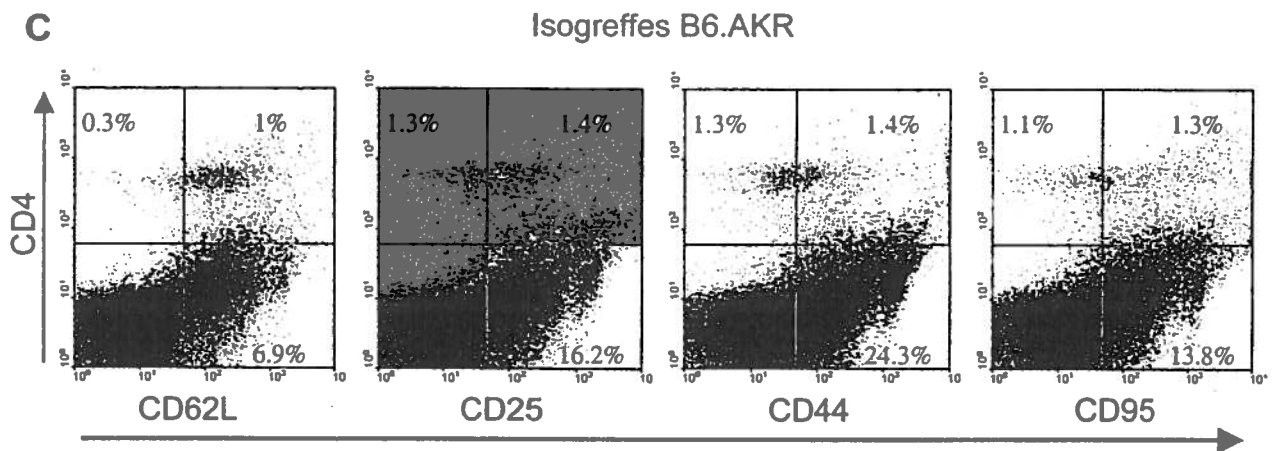
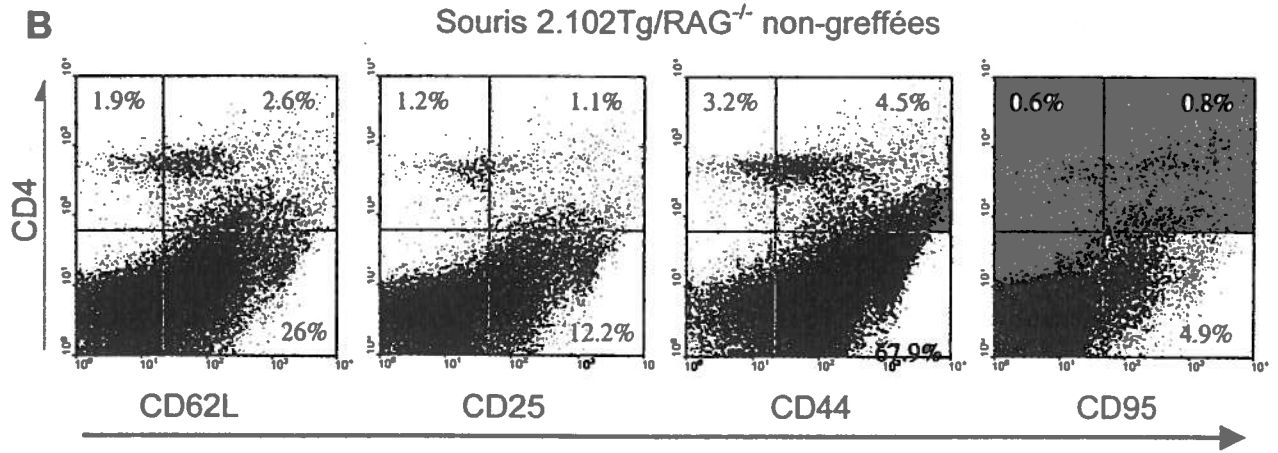
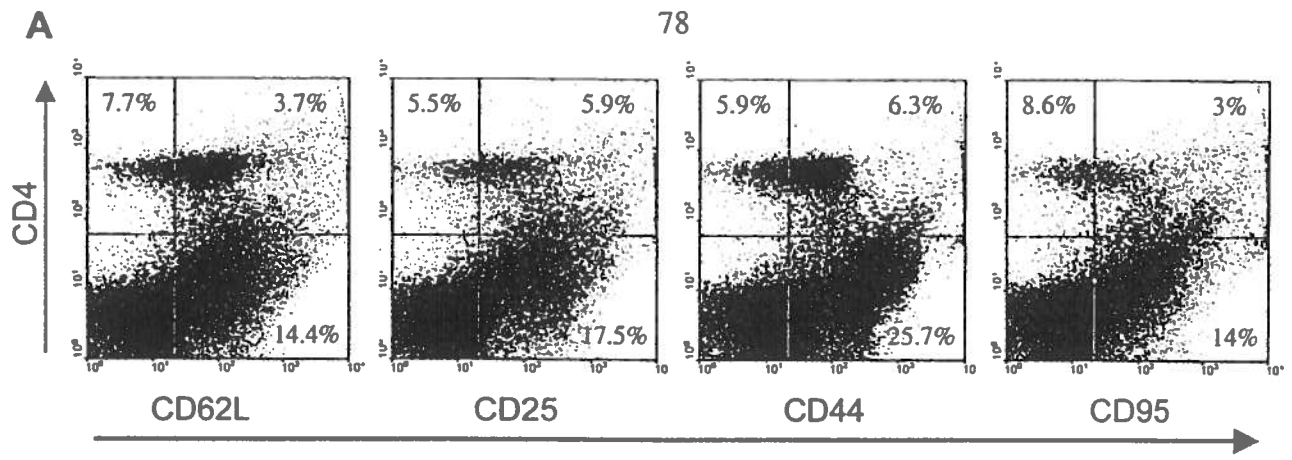


—◇— Allogreffe B10.P -○- Allogreffe B6(mHEL-Hb)
 —□— Greffe isogénique B6.AKR -△- Souris non-greffée

3.5 Des cellules T CD4⁺ ayant un phénotype de cellules T activées n'ont pu être mise en évidence dans les organes lymphoïdes secondaires des souris 2.102Tg/RAG⁺ qui ont rejeté leur greffe de peau.

Afin de réaliser une étude de phénotypage des cellules 2.102Tg, suite à des stimulations par chacune des voies d'alloréactivité, l'analyse de différents marqueurs d'activation cellulaire a été effectuée par cytométrie en flux. Des changements dans les niveaux d'expression à la surface des marqueurs CD25, CD44, CD62L et CD95L peuvent nous indiquer l'état d'activation des cellules T. Sur les lymphocytes T activées il y aura une augmentation dans l'expression des molécules CD25, CD44 et CD95L (Waters *et al.*, 2003), ainsi qu'une diminution de la molécule CD62L (Waters *et al.*, 2003). Brièvement, le CD25 correspond à la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2, cytokine essentielle pour la prolifération des cellules T activées. Le CD44 est une molécule qui lie l'acide hyaluronique et la fibronectine (Dailey, 1998). Cette liaison permet d'assurer l'adhésion dans les tissus des lymphocytes T activées. La L-sélectine (CD62L) est une molécule d'adhésion qui contribue à l'extravasation des cellules T naïves vers les tissus lymphoïdes (Dailey, 1998). Une fois activées, les cellules T vont diminuer l'expression de la L-sélectine et du fait même cesser de recirculer aux organes lymphoïdes secondaires (Waters *et al.*, 2003). Quant au CD95L, qui est le ligand de Fas, on peut le retrouver à la surface des cellules T activées. L'étude de ce marqueur permet également d'évaluer si la voie Fas-Fas-L est impliquée dans les rejets de greffe par les cellules T 2.102Tg. Avant d'effectuer les analyses de cytométrie sur les cellules T des souris greffées, l'optimisation des concentration d'anticorps à utiliser ainsi que les mises au point des protocoles de cytométrie ont été réalisées à l'aide de cellules T 2.102Tg activées *in vitro*. À notre grande surprise, aucune cellule T dans la rate et les ganglions des souris ayant rejeté leur greffon n'a démontré un phénotype de cellule activée (Figure 8). Malgré le fait que nos analyses n'aient pas permis de mettre en évidence des différences significatives dans les populations cellulaires analysées, des études supplémentaires réalisées, entre autre suite à l'optimisation des marquages et à l'augmentation du nombre de souris par groupe, démontrent la présence d'une population de lymphocytes T activés (Annexe 2) (Baratin,

Figure 8: Phénotype des cellules T CD4⁺ suite à des rejets de greffe de peau dans un contacte d'alloréactivité directe et indirecte. Les cellules de la rate des souris A) non greffées, B) avec des isogreffes B6.AKR C) des allogreffes B10.P et D) des allogreffes B6(mHEL-Hb) ont été analysées par cytométrie en flux pour les marqueurs d'activation CD25, CD44, CD62L et CD95L. Les témoins négatifs et positifs de ces marquages sont présentés en Annexe 2. Les pourcentages indiqués dans chacun des graphiques correspondent au pourcentage de cellules positives présent dans la population totale de cellules analysées. Les résultats présentés sont représentatifs de plus de 5 expériences et sont également représentatifs des résultats obtenus dans les ganglions axillaires.



Allogreffes B6(mHEL-Hb)

données non-publiées). On remarque toutefois que les différences, observées entre les populations de cellules provenant des souris greffées et celle du témoin, sont très faibles.

3.6 Des effecteurs producteurs de cytokines sont uniquement observés dans les organes lymphoïdes secondaires des souris qui ont rejeté leur greffe de peau par la voie indirecte d'alloréactivité.

Des analyses à l'aide de trousse ELISA commerciales ont permis d'étudier la différenciation des cellules T 2.102Tg en effecteurs producteurs de cytokines, dans chacune des voies d'alloréactivité. Après une période de 48 heures de stimulation *in vitro*, les surnageants des cultures des cellules de rate et des ganglions axillaires ont été analysés pour la production d'IL-4 et d'IFN- γ . Pour ces expériences, il était primordial de prélever les surnageants après une stimulation de 48 heures, puisque nous voulions détecter uniquement les cytokines produites par les cellules différenciées *in vivo* au cours du processus de rejet. Il a déjà été démontré que le phénotype acquis par les cellules T 2.102 au cours d'une stimulation primaire est maintenu par la suite, peu importe la nature des stimulations secondaires (Grakoui *et al.*, 1999). Par conséquent, il n'était pas nécessaire de re-stimuler les cellules des souris qui ont rejeté leur greffe par la voie directe d'alloréactivité avec des cellules intactes d'haplotype H-2^P. Ainsi, les re-stimulations *in vitro* ont été effectuées avec un seul ligand, le peptide Hb(64-76). Nos analyses démontrent donc une forte production d'IFN- γ , à la onzième journée suivant la transplantation, par les cellules des ganglions des souris greffées avec de la peau de souris B6(mHEL-Hb) (alloréactivité indirecte) (Figure 9). Cependant, ces mêmes analyses démontrent une production beaucoup plus faible d'IFN- γ dans les ganglions axillaires des souris qui ont rejeté par la voie directe d'alloréactivité (les allogreffes B10.P) (Figure 9). Les analyses effectuées à la septième journée suivant la greffe, démontrent également une faible production de cytokines, dans les ganglions axillaires, des souris qui ont rejeté via les deux voies d'alloréactivité (Figure 10). Par ailleurs, les résultats obtenus au jour 7 et 11 avec les cellules provenant des rates des souris transplantées sont aussi similaires aux résultats précédents, où une faible production de

Figure 9: Production d'IL-4 et d'IFN- γ par les cellules T 2.102Tg des souris 2.102Tg/RAG⁺ greffées avec des échantillons de peau provenant des souris B6.AKR, B10.P et B6(mHEL-Hb) au jour 11 suivant la transplantation. Les cellules A) de la rate et B) des ganglions axillaires des souris transplantées ont été stimulées in vitro avec le peptide Hb(64-76). La présence de cytokines dans les surnageants de culture de 48 heures a été analysée à l'aide de tests ELISA. (Isogreffe n=3, allogreffe n=5)

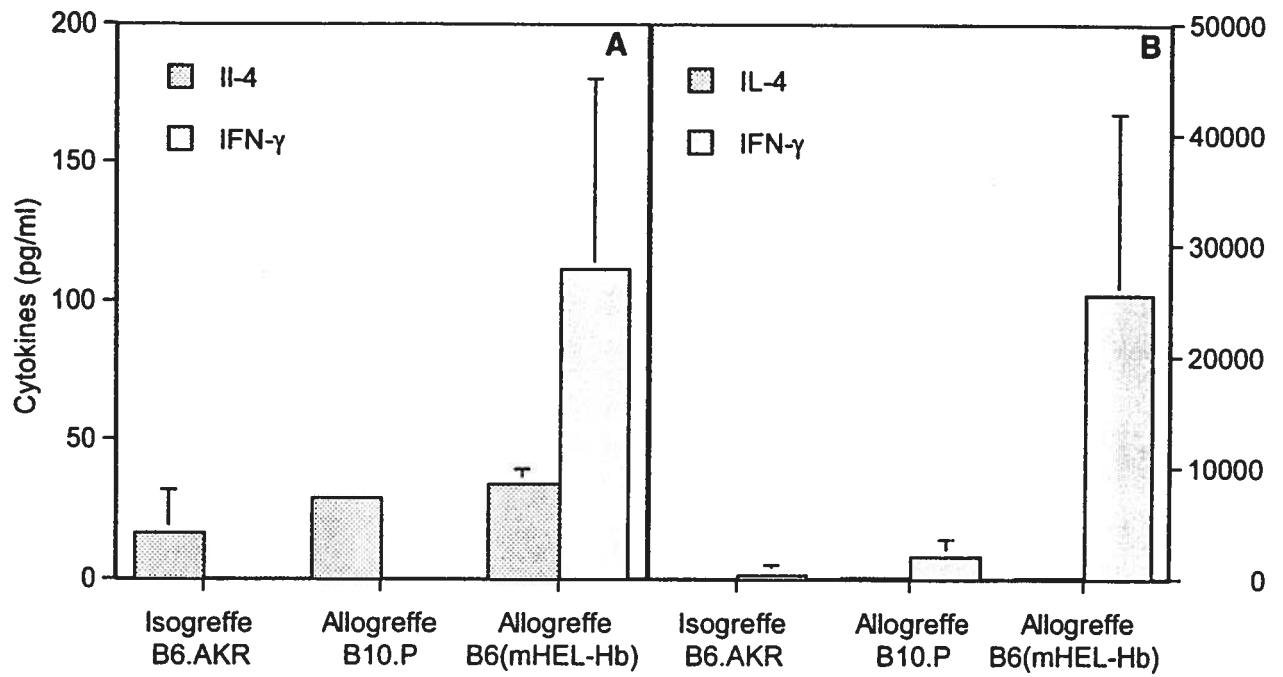
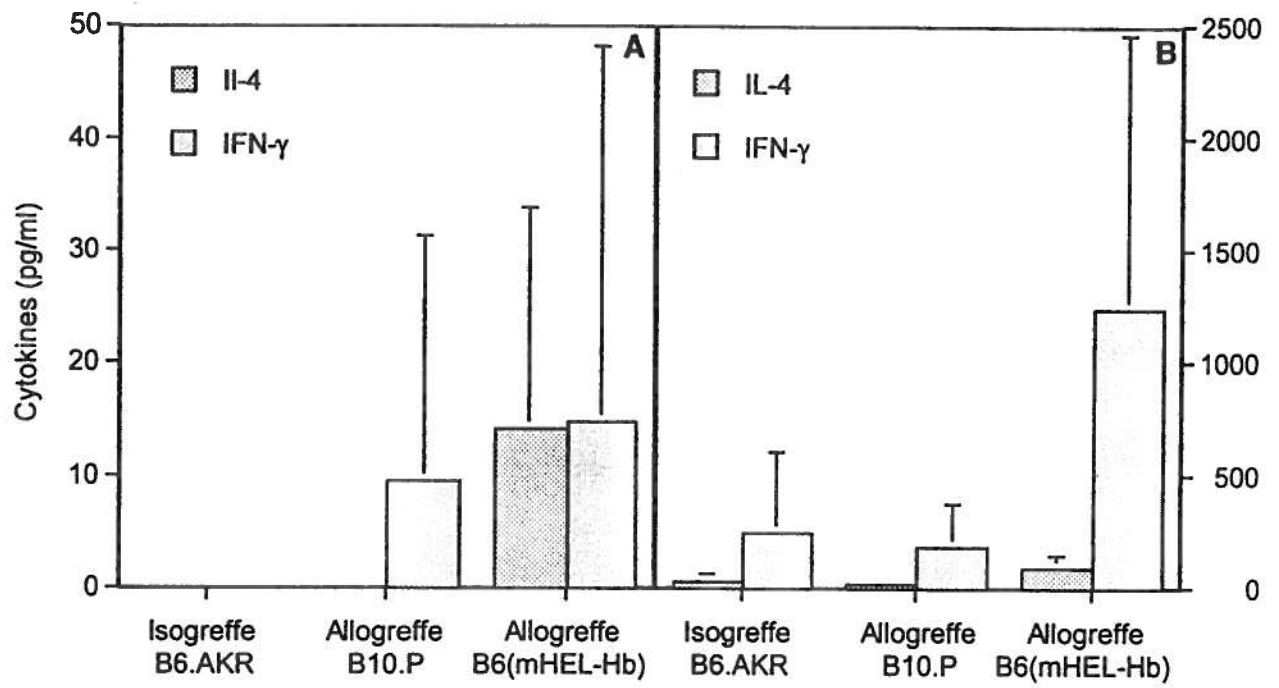


Figure 10: Production d'IL-4 et d'IFN- γ par les cellules T 2.102Tg des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} greffées avec des échantillons de peau provenant des souris B6.AKR, B10.P et B6(mHEL-Hb) au jour 7 suivant la transplantation. Les cellules A) de la rate et B) des ganglions axillaires des souris transplantées ont été stimulées *in vitro* avec le peptide Hb(64-76). La présence de cytokines dans les surnageants de culture de 48 heures a été analysée à l'aide de tests ELISA. (Isogreffe n=3, allogreffe n=5)

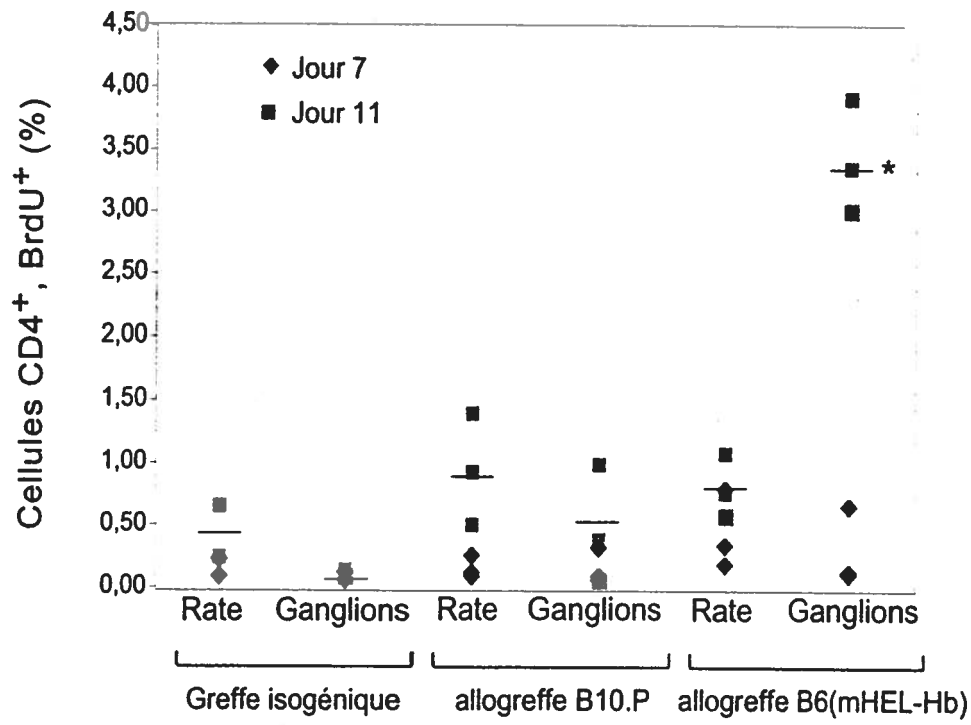


cytokines y est observé. De plus, des analyses réalisées à la troisième journée suivant la transplantation démontrent aucune production de cytokine dans chacune des voies d'alloréactivité (résultats non-présentés). Ces résultats, ajoutés aux précédents, suggèrent qu'une réponse effectrice spécifique aux alloantigènes est seulement retrouvée dans la voie indirecte d'alloréactivité et que l'absence de réponse des cellules T dans la voie directe d'alloréactivité ne serait pas due à une différence dans les cinétiques d'activation des cellules aux organes lymphoïdes secondaires.

3.7 Une prolifération significative des cellules T CD4⁺ est seulement observée dans les ganglions axillaires après un rejet par la voie indirecte d'alloréactivité.

Afin d'étudier la prolifération *in vivo* des cellules T CD4⁺, 2 mg de bromodéoxyuridine (BrdU) a été injectée quotidiennement aux souris greffées. Puisque le BrdU est un analogue de base de l'ADN (Dolbeare et al., 1983; Gratzner, 1982; Penit, 1986), il s'incorpore à celui-ci lorsqu'il y a division cellulaire, c'est-à-dire prolifération de la cellule. Cette prolifération est ensuite analysée par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage avec un anticorps dirigé contre le BrdU (Gratzner, 1982). Suite à la transplantation et aux injections quotidiennes de BrdU, la rate et les ganglions drainant la greffe ont été récupérés à la septième et à la onzième journée suivant la greffe. Les suspensions cellulaires ont ensuite été marquées avec des anticorps anti-CD4 et anti-BrdU, puis analysées au cytomètre en flux. Les conditions de marquage ont préalablement été optimisées à l'aide des cellules 2.102Tg stimulées *in vitro* avec le peptide Hb(64-76). Nos analyses de cytométrie démontrent au jour 11 post-transplantation, dans les ganglions axillaires, une prolifération cellulaire CD4⁺ des souris qui ont rejeté leur greffe dans un contexte d'alloréactivité indirecte (Figure 11). Ces résultats démontrent également une absence de cellules T CD4⁺BrdU⁺ dans la rate et les ganglions drainant des souris qui ont rejeté leur greffe de peau via la voie directe d'alloréactivité (les allogreffes B10.P). Bref, ces résultats sont de toute évidence très cohérents avec ceux précédemment présentés, où une présence de cellules T activées est uniquement observée chez les souris greffées avec de la peau de souris B6(mHEL-Hb) (voie indirecte d'alloréactivité).

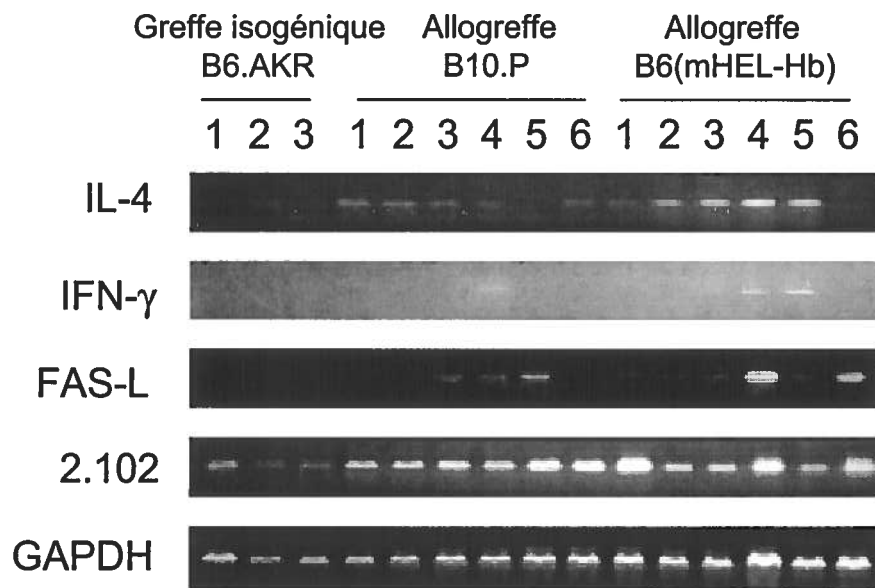
Figure 11: Prolifération des cellules T CD4⁺ 2.102Tg *in vivo* évaluée par l'incorporation dans les cellules du BrdU. Les souris 2.102Tg/RAG^{-/-} greffées ont été injectées quotidiennement avec une solution de BrdU. Les cellules de la rate et des ganglions axillaires ont été récupérées au jour 7 (losange) et au jour 11 (carré) suivant la transplantation. La prolifération des cellules a été observée par l'incorporation du BrdU, analysée à l'aide de la cytométrie en flux. *p<0.01 (Isogrefe n=2, allogreffes n=3). Les statistiques des résultats obtenus ont été analysées à l'aide du test de type Student.



3.8 Des transcrits pour les gènes de l'IL-4, l'IFN- γ , Fas-L et la chaîne beta du TCR 2.102 sont retrouvés dans les allogreffes B10.P et les allogreffes B6(mHEL-Hb).

Les expériences précédentes suggèrent une activation des cellules T CD4⁺ 2.102Tg, uniquement dans les organes lymphoïdes secondaires des souris qui ont rejeté leur greffe de peau par la voie indirecte d'alloréactivité. Afin de caractériser les cellules T effectrices présentes dans les allogreffes rejetées par la voie directe ou indirecte d'alloréactivité, des analyses de RT-PCR sur les greffons ont été effectuées à la onzième journée suivant la transplantation. Des transcrits pour les gènes de l'IL-4 et Fas-L sont pratiquement détectés dans chacune des souris qui ont rejeté leur greffe de peau par les voies directe et indirecte d'alloréactivité (Figure 12). Les transcrits d'IFN- γ sont observés dans seulement une souris sur six pour les allogreffes B10.P (alloréactivité directe) et trois sur six pour les allogreffes B6(mHEL-Hb) (alloréactivité indirecte) (Figure 12). Les résultats de RT-PCR démontrent également, en comparaison avec les greffes isogéniques, une infiltration plus grande des cellules T 2.102Tg au site des greffons, et ce pour les deux types d'allogreffes (Figure 12). La présence de cellules T 2.102Tg a été analysée à l'aide d'amorces spécifiques à la chaîne beta du TCR 2.102. Ces résultats nous indiquent donc, contrairement aux résultats obtenus dans les organes lymphoïdes secondaires, qu'au site du greffon lui-même il y a la présence de cytokines de type Th1 et de type Th2. De plus, cette expérience suggère un rôle possible pour des mécanismes de cytotoxicité exercés par la voie Fas/Fas-L. Finalement, nos résultats démontrent également la migration des cellules T 2.102Tg dans tous les greffons.

Figure 12: Expression des gènes d'IL-4, d'IFN- γ , de Fas-L et de la chaîne beta du TCR 2.102 dans les échantillons de greffe de peau. Les greffes isogéniques ainsi que les allogreffes B10.P et B6(mHEL-Hb) ont été récupérées, au jour 11 suivant la transplantation, des souris greffées 2.102Tg/RAG^{-/-}. Des analyses de RT-PCR pour les gènes de l'IL-4, l'IFN- γ , Fas-L et la chaîne beta du TCR 2.102 ont été réalisées avec l'ARN préalablement extrait des différents greffons. Les produits de PCR ont été analysés à l'aide de marquage au bromure d'éthidium sur des gels d'électrophorèse.



CHAPITRE 4
DISCUSSION

Chapitre 4

Discussion

La transplantation est une solution thérapeutique très efficace pour plusieurs maladies. Malheureusement, ce procédé chirurgical est associé à une complication majeure, le rejet du nouvel organe greffé. Afin de retarder ou d'empêcher le processus du rejet, les patients nouvellement transplantés sont soumis à d'importantes thérapies immunosuppressives. Toutefois, en plus d'être extrêmement toxiques, ces thérapies sont souvent associées à l'apparition de plusieurs infections opportunistes et de maladies, tel le cancer. Les thérapies immunosuppressives actuelles sont inadéquates puisqu'elles ne ciblent pas les mécanismes immunitaires spécifiques aux rejets des allogreffes. Cela est principalement dû au manque de connaissances à propos de ces mécanismes. L'étude des voies d'alloréactivité impliquées dans les rejets de greffe est complexe et nécessite l'aide de modèles d'étude appropriés. Plusieurs modèles déjà existants permettent l'étude des mécanismes effecteurs des cellules de l'immunité, sans distinction des voies d'alloréactivité, puisque ces modèles sont complètement allogéniques. D'autres modèles permettent, quant à eux, l'étude de l'une ou de l'autre voie d'alloréactivité. Par contre, aucun modèle permet l'étude de ces deux voies d'alloréactivité, *in vivo*, par une seule et même population de cellules T. De plus, comme mentionné dans le chapitre 1, l'étude de la voie indirecte d'alloréactivité est difficile puisque la fréquence de cellules T qui y participe est très faible (Benichou *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1993). L'étude de cette voie d'alloréactivité requiert un modèle qui permet de retrouver un contexte où la voie indirecte représente l'unique voie disponible pour l'activation des cellules T alloréactives. Cependant, la disponibilité d'un tel modèle est plutôt rare et même difficile à obtenir. Jusqu'à tout récemment ceux qui sont employés impliquent soit un transfert adoptif de cellules, étudiées par la suite *in vitro* pour l'alloréconnaissance indirecte (Valujskikh *et al.*, 1998), soit une transplantation d'organes déficients en molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Lee *et al.*, 1994). Par contre, ces modèles comportent certains désavantages importants, tel le manque d'exclusivité de chacune des deux voies d'alloréconnaissance lors des rejets de greffe ou encore la présence de cellules B ou de

cellules T CD8⁺ qui peuvent aussi exercer le rejet. Dernièrement, une équipe a développé un modèle qui permet d'étudier uniquement la voie indirecte d'alloréactivité (Braun *et al.*, 2001). Celui-ci est composé de souris déficientes pour le gène RAG-2 et transgéniques pour un TCR spécifique aux antigènes H-Y et restreint à I-A^b.

Un tel modèle a également été développé dans notre laboratoire. Dans celui-ci, une seule et même population clonotypique de cellules T 2.102Tg est capable d'alloréactivité directe et indirecte aux alloantigènes de classe II du CMH. Contrairement au modèle employé par Braun et ses collègues, cette double reconnaissance du clone de cellule T 2.102 nous donne l'opportunité d'étudier les différences entre les mécanismes effecteurs retrouvés dans chacune des voies d'alloréactivité. Pour réaliser ce projet, les expériences décrites dans ce travail ont fait appel à des souris transgéniques pour le clone 2.102 et déficientes pour le gène RAG-1. Par conséquent, ces souris expriment une population clonotypique de cellules T CD4⁺ périphériques 2.102Tg. C'est à l'aide de ces souris que l'étude de l'activation et de la caractérisation des cellules T CD4⁺ dans chacune des deux voies d'alloréactivité ont été réalisées. Puisque le modèle de rejet de greffe de peau n'avait jamais été utilisé avant la réalisation des expériences décrites dans ce mémoire, nous nous sommes d'abord assuré que la spécificité du clone 2.102 était bel et bien exclusive à chacune des voies d'alloréactivité. Nos résultats démontrent clairement la spécificité du clone 2.102 à reconnaître chacun des alloantigènes, soit le peptide Hb(64-76) et la molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité I-E^P, respectivement par la voie indirecte et directe d'alloréactivité. Le doute souvent associé à notre modèle, avant qu'il ne soit testé, était qu'il était possible que des antigènes H-2^P soient reconnus dans la voie indirecte d'alloréactivité, rendant ainsi notre modèle moins intéressant. Nos expériences démontrent bien qu'aucun épitope H-2^P n'est reconnu par la voie indirecte d'alloréactivité (Figure 5b). Cette expérience indique également, qu'aucun antigène mHEL-Hb n'est reconnu dans la voie directe d'alloréactivité (Figure 5a). Les résultats ont aussi démontré qu'aucun antigène H-2^b ne peut être reconnu par les cellules T 2.102Tg. Donc, nous pouvons ainsi conclure que notre modèle respecte les spécificités requises à son bon fonctionnement.

Afin de débiter notre étude, différentes greffes de peau allogénique ont été effectuées sur les souris 2.102Tg/RAG^{-/-}. Les rejets observés suite à ces greffes démontrent que les cellules T 2.102Tg sont capables de rejet de greffe de peau allogénique par chacune des voies d'alloréactivité. Ainsi, suite aux résultats décrits à la section précédente, nous pouvons conclure que les rejets exercés via la voie indirecte d'alloréactivité (allogreffes B6(mHEL-Hb) (H-2^b)) résultent d'une activation des cellules T par le peptide Hb(64-76) dérivé de la protéine chimérique mHEL-Hb, présenté par I-E^k sur les CPA du soi, puisque aucun antigène H-2^b n'est reconnu par les cellules T 2.102Tg. Par ailleurs, nos résultats indiquent et confirment ce que d'autres ont déjà établi, c'est-à-dire que la voie indirecte d'alloréactivité est importante dans le rejet des allogreffes (Fangmann *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1993; Sayegh *et al.*, 1993; Wecker *et al.*, 1995) et qu'elle est aussi suffisante pour induire une destruction complète du greffon en absence totale de la voie directe (Auchincloss *et al.*, 1993; Braun *et al.*, 2001; Valujskikh *et al.*, 1998). Les résultats confirment également qu'une population clonotypique de cellules T CD4⁺, en absence de cellules T CD8⁺ et de cellules B, est suffisante pour induire un rejet de greffe de peau par chacune des voies d'alloréactivité.

Étonnamment, les résultats obtenus à l'aide de notre modèle, où la même population de cellules T exercent un rejet via chacune des deux voies, démontrent que les cinétiques de rejet des greffes de peau sont similaires pour chacune des voies d'alloréactivité. Il est intéressant de constater que malgré une variation dans les pourcentages de cellules T CD4⁺ des souris transgéniques, les cinétiques des rejets demeurent comparables. Cependant, la plupart des études similaires à la nôtre, ont démontré que la voie directe est généralement plus rapide que la voie indirecte. En effet, des études ont démontré que les cinétiques de rejet exercé par la voie indirecte sont retardées, même parfois non-visible, en comparaison à celles de rejet exercé par les cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ via la voie d'alloréactivité directe (Dalloul *et al.*, 1996a; Wecker *et al.*, 1995). D'autres ont aussi démontré que les rejets exercés via la voie indirecte d'alloréactivité par les cellules T CD4⁺ sont aussi retardés par rapport aux rejets de greffes complètement allogéniques (Auchincloss *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; Sawada *et al.*, 1997). Toutefois, Braun et ses collègues n'ont observé aucune différence dans les

cinétiques des rejets exercés via la voie indirecte versus une combinaison des deux voies (Braun *et al.*, 2001). Donc, dépendamment des modèles utilisés, les cinétiques pour les deux voies d'alloréactivité peuvent différer. Cependant, nous devons considérer que dans nos expériences, en plus de retrouver un très grand répertoire de cellules T allospécifiques (100% des cellules T), celui-ci est identique pour chacune des deux voies d'alloréactivité. Tandis que dans des modèles de souris complètement allogénique, plus de 90% des cellules alloréactives aux antigènes du greffon participent au rejet aigu via la voie directe d'alloréactivité, et que seulement de 1-10% répondent via la voie indirecte (Benichou *et al.*, 1999). Ainsi, dans notre modèle, nous pouvons probablement associer une telle cinétique de rejet rapide par la voie indirecte d'alloréactivité au pourcentage anormalement élevé de cellules T qui peuvent initier et participer au rejet via cette voie. Néanmoins, des expériences ont démontré que selon certaines situations cliniques (Opelz et Lenhard, 1983; Rankin *et al.*, 1990) ou selon des expositions précédentes à des peptides antigéniques (Gallimore *et al.*, 1998; Kwok *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 1993), la voie d'alloréactivité indirecte pouvait aussi dominer les alloréponses. Des expériences complémentaires réalisées dans le laboratoire ont également démontré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les temps de rejet des deux voies d'alloréactivité selon qu'il y ait un transfert adoptif de 2.5 , 10 et 15×10^6 cellules T CD4⁺ (Sauvé, données non-publiées).

De plus, nos courbes de rejets nous indiquent, de façon surprenante, que les cinétiques de rejets des souris transgéniques ne sont pas plus rapides que celles des souris non-transgéniques (B6.AKR). Similaire à nos résultats, la majorité des études effectuant des greffes de peau allogéniques avec des souris non-transgéniques observent des rejets entre 10-20 jours après la transplantation (Krieger *et al.*, 1996; Le Moine *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1998). Dans nos expériences, nous nous serions attendu à des rejets beaucoup plus rapides chez les souris transgéniques, où la fréquence des précurseurs est très grande. Par contre, il ne faut pas oublier que les rejets de greffe de peau, indépendamment du type de souris employé, sont généralement déjà très rapide.

Tel que mentionné dans nos résultats, les greffes syngéniques sont demeurées intactes plusieurs mois suivant la transplantation. Ceci nous suggère donc, que les rejets observés sont spécifiques aux actions immunitaires exercées par les cellules T allospécifiques et non suite à une inflammation provoquée par la chirurgie. Cependant, Matzinger et ses collaborateurs ont déjà mentionné qu'il était possible que les cellules T dérivées du greffon pouvaient participer à une réaction de la greffe contre l'hôte (GVHD) (Anderson et Matzinger, 2001). Cette réaction pourrait, en fait, initier l'inflammation et conduire au rejet de l'allogreffe. Par conséquent, les réponses étudiées par la suite ne seraient pas spécifiques aux conditions d'activation retrouvées dans chacune des voies d'alloréactivité. Puisque, les résultats obtenus avec notre modèle suggèrent que les mécanismes effecteurs dans chacune des voies d'activation seraient différents, il est peu probable que l'initiation des rejets pour chacune des voies ait été exercée via des réactions de GVHD. Toutefois, afin de s'en assurer, il faudrait effectuer des greffes de peau dépourvues de cellules T.

Suite à la réalisation des différentes greffes de peau, les organes lymphoïdes secondaires des souris transplantées ont été récupérés à la onzième journée suivant la greffe. C'est en récupérant ces organes que nous avons observé une augmentation dans la taille des ganglions axillaires des souris qui avaient rejeté leur greffe de peau via la voie indirecte d'alloréactivité (allogreffes B6(mHEL-Hb)). De plus, en accord avec cette augmentation nous avons obtenu, pour ces mêmes organes, des comptes cellulaires totaux plus élevés. En fait, l'augmentation du nombre de cellules dans les ganglions axillaires pourrait résulter d'une migration des cellules présentatrices d'antigène présentes dans les greffons, d'une expansion de cellules T spécifiques aux alloantigènes ainsi que d'un recrutement dans ces organes, des cellules T 2.102Tg. En effet, il a été démontré que dans les premiers jours après la transplantation d'un organe, les leucocytes passagers du donneur constituent de 1-20% des cellules mononucléaires circulantes chez le receveur (Starzl et Zinkernagel, 1998). Le pourcentage de ces cellules dépend de l'organe transplanté. La peau est un tissu où l'on retrouve un grand nombre de ces cellules. Différentes études ont démontré la migration des cellules dendritiques de la peau, les cellules de Langerhans, via les vaisseaux lymphatiques aux ganglions drainant, où elles

peuvent ainsi initier les réponses des cellules T (Hoefsmit *et al.*, 1982; Silberberg-Sinakin *et al.*, 1976). Une étude plus récente effectuant des greffes de peau avec des rats, a démontré par immunohistochimie que c'est au jour 7 suivant la transplantation que les ganglions étaient les plus gros et qu'on retrouvait le plus grand nombre de CPA appartenant au greffon (entre 130 et 200 cellules) (Richters *et al.*, 1996). Dix jours après la transplantation, le nombre de ces cellules était redevenu très faible. Cependant, nos résultats ne semblent pas démontrer une telle migration des CPA au jour 7 puisque les comptes totaux des cellules des ganglions axillaires pour ce jour sont sensiblement les mêmes qu'au jour 11 (Tableau 4). Toutefois, afin de s'en assurer, des expériences d'immunohistochimie ou de cytométrie en flux devraient être effectuées afin d'étudier la migration et la localisation des CPA allogéniques suite à la transplantation, puisque les différences observées par Richters et ses collègues n'auraient pu être détectées par de simples comptes cellulaires. De plus, nous pouvons, suite aux analyses de cytométrie, affirmer que l'augmentation du nombre de cellules observée au tableau 3 est en partie attribuable à une expansion clonale de cellules T CD4⁺ et/ou à une migration dans ces organes des cellules T 2.102Tg (Tableau 4). Par conséquent, les analyses de BrdU (Figure 7) démontrent également une expansion clonale de cellules T CD4⁺ à la onzième journée suivant la transplantation dans les ganglions axillaires des souris qui ont rejeté leur greffe de peau via la voie indirecte d'alloréactivité (allogreffes B6(mHEL-Hb)). Toutefois, il n'est pas nécessairement surprenant de constater qu'aucune expansion cellulaire T CD4⁺ n'est présente dans la rate des souris greffées (Tableau 6) puisque des expériences similaires aux nôtres ont déjà démontré une absence de réponse dans cet organe (Matesic *et al.*, 1998b). Cependant, contrairement à ces dernières, d'autres expériences ont démontré, suite au rejet, une activation des cellules T CD4⁺ dans la rate (Lehmann *et al.*, 1997).

Aussitôt récupérées, les cellules des rates et des ganglions ont été mises en culture afin d'analyser leurs productions en cytokines. Une telle production est significative de la présence de cellules effectrices dans ces organes. De plus, l'étude de la production des cytokines permet aussi d'analyser les profils cytokiniques acquis par ces cellules. Nos analyses ELISA démontrent une plus grande production d'IFN- γ dans les ganglions

axillaires des souris qui ont rejeté par la voie indirecte d'alloréactivité (allogreffes B6(mHEL-Hb)). Ces résultats concordent avec l'observation d'une prolifération des cellules T chez ces mêmes souris. De plus, nous pouvons aussi suggérer qu'il y a très peu de cellules productrices d'IFN- γ dans les organes lymphoïdes secondaires des souris qui ont reçu les allogreffes B10.P, étant donné que la production observée de cette cytokine est beaucoup plus faible (10 fois moins). La production d'IFN- γ chez ces souris est similaire à celle obtenue chez les souris qui ont reçu les greffes isogéniques (greffes B6.AKR). Par ailleurs, nous pourrions croire que les cellules T 2.102Tg se différencient, dans la voie indirecte d'alloréactivité, en cellules de type Th1, puisque nous n'avons détecté aucune production d'IL-4 significative pour chacune des souris. En effet, la production d'IL-4 observée est très faible, on retrouve environ dix fois moins d'IL-4 par rapport à l'IFN- γ dans chacun des groupes de souris. Cependant, certains travaux ont démontré l'inefficacité de la méthode ELISA à détecter l'IL-4 dans des surnageants de culture par rapport à la méthode, beaucoup plus sensible, qu'est l'ELISPOT. Matesic et ses collègues ont conclu que cette incapacité à détecter l'IL-4 était engendrée par la consommation de cette cytokine par des récepteurs spécifiques exprimés à la surface de cellules présentes dans les cultures (Matesic *et al.*, 1998a). Alors, dans nos expériences, nous ne pouvons réellement conclure que le phénotype acquis par les cellules T est de type Th1. Le profil pourrait être également de type Th2 puisqu'il est connu que l'IL-4 et l'IFN- γ provoquent respectivement une production d'anticorps d'isotype IgG1 et IgG2a (Finkelman *et al.*, 1990; Snapper *et al.*, 1988). Or, des expériences réalisées avec un modèle de transfert adoptif de cellules 2.102Tg dans des souris déficientes pour les cellules T ayant un TCR $\alpha\beta$, ont démontré une production similaire de ces deux isotypes dans les souris qui ont rejeté par la voie indirecte d'alloréactivité (les allogreffes B6(mHEL-Hb) (Sauvé *et al.*, 2002, soumis à *Journal of Immunology*). De plus, en accord avec nos résultats, aucune production d'anticorps n'a été observée dans les souris qui ont rejeté par la voie directe d'alloréactivité (les allogreffes B10.P).

Plusieurs expériences, similaires aux nôtres, utilisant l'ELISPOT ont démontré la présence d'un phénotype mixte Th1/Th2 où la production d'IFN- γ est généralement beaucoup plus élevée en comparaison avec la production d'IL-4 (Benichou *et al.*, 1999).

Dans cette même étude, ils ont aussi observé, à l'aide de l'ELISPOT, que la fréquence de précurseurs dans la réponse indirecte correspondait à 5% de la réponse directe observée. Nos résultats illustrent donc un phénomène tout à fait contraire, puisqu'en supposant que la production de cytokines soit représentative de la fréquence de précurseurs producteurs de cytokines, nous retrouvons, basé sur la production de cytokines, un plus grand nombre de cellules productrices d'IFN- γ dans la réponse indirecte. Par contre, il faut noter que ces deux études ont été réalisées de façon complètement différente puisque dans la nôtre, les rejets s'effectuent par l'une ou l'autre des deux voies d'alloréactivité, tandis que dans l'étude menée par l'équipe du Dr. Benichou le rejet s'effectue via les deux voies combinées. Donc, lors des rejets exercés via les deux voies d'alloréactivité, les réponses d'une voie peuvent influencer les réponses des cellules T de l'autre voie puisque l'environnement est modifié par cette production de cytokines, rendant ainsi les réponses des cellules T biaisées. En effet, certains ont démontré qu'au début des réponses immunitaires, il y a une dominance des cellules T de type Th0, suivie plus tard d'une différenciation en type Th1 et Th2 dépendante du micro-environnement (Mosmann *et al.*, 1991). Une autre équipe a également démontré, *in vivo*, que les phénotypes Th1 et Th2 peuvent être renversés par des altérations dans le micro-environnement (Daynes *et al.*, 1990).

Bref, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les réponses des témoins isogéniques et les souris qui ont rejeté leur greffe par la voie directe d'alloréactivité. Puisqu'il est toutefois possible que la technique utilisée pour ces analyses ne soit tout simplement pas assez sensible, ces expériences pourraient être reprises à l'aide d'une méthode beaucoup plus sensible comme l'ELISPOT.

Malgré des cinétiques de rejet similaire, nous pouvons suggérer que les mécanismes conduisant au rejet de la greffe semblent être différents dans chacune des deux voies d'alloréactivité. Toutefois, il serait possible d'attribuer l'absence de cellules effectrices, dans la voie directe d'alloréactivité, à la disparition ou encore à l'anergie des clones allospécifiques. En effet, il est connu que suite à leurs réponses immunitaires, la plupart des cellules T meurent par apoptose (von Andrian et Mackay, 2000). Cependant,

l'expérience de prolifération *in vitro* démontre clairement que parmi les cellules récupérées suite aux rejets des allogreffes, les cellules T ont toujours la capacité de proliférer suite à une stimulation antigénique. De plus, les profils de prolifération des cellules T 2.102Tg des souris greffées ne sont aucunement modifiés par rapport à ceux des souris non-greffées (figure 8). Toutefois, ces expériences démontrent la capacité à proliférer des cellules provenant de la rate. Nous n'avons pas comparé la capacité à proliférer des cellules des ganglions. Certes, il aurait été préférable de répéter cette expérience avec les cellules provenant des ganglions, mais compte tenu de la faible quantité de cellules dans ces organes et du nombre restreint de souris disponibles pour nos travaux, nous n'avons pas jugé essentiel de faire cette analyse. Par ailleurs, comme nous le démontre les résultats de nos analyses ELISA et de BrdU, nous pouvons malgré tout proposer que les cellules T provenant des ganglions des souris greffées ont toujours la capacité de proliférer et de sécréter des cytokines. De plus, certaines études ont déjà démontré que les réponses, aux greffes de peau, observées dans la rate et les ganglions étaient comparables (Benichou *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1997). Bref, cette expérience nous confirme qu'il n'y pas d'anergie ou d'atténuation systémique de la réponse des cellules T CD4⁺.

L'analyse par RT-PCR de l'expression des cytokines IL-4 et IFN- γ au niveau des allogreffes nous démontre un profil de cytokines complètement différent de celui retrouvé aux organes lymphoïdes secondaires. En effet, nous observons de l'IL-4 et de l'IFN- γ dans les allogreffes B10.P et B6(mHEL-Hb). Ces résultats nous indiquent qu'il y a soit une population mixte de cellules Th1 et Th2 ou soit une population de cellules Th0 qui possède les deux phénotypes à la fois. Nos résultats sont en désaccord avec certaines études qui indiquent que les rejets de greffe de peau sont exercés par des cellules effectrices de type Th1, alors que les cellules de type Th2 sont généralement associées à la survie des allogreffes (Chen *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1996). Cependant, plusieurs études, incluant celle présentée auparavant (Benichou *et al.*, 1999), ont également retrouvé des cytokines appartenant aux deux phénotypes de cellules T. Par exemple, une étude de greffe de peau a démontré une production d'IFN- γ et d'IL-4 dans les rates des souris qui avaient rejeté (Zelenika *et al.*, 1998). Dans cette même étude, ils ont aussi

effectué des transferts adoptifs de lignée cellulaire différenciée Th1 et Th2. Les deux types de cellules ont démontré une capacité à rejeter. D'ailleurs, il serait aussi intéressant d'effectuer ce genre d'expérience avec notre modèle de rejet de greffe de peau. De plus, une autre étude a démontré que des populations de cellules T CD4⁺ Th0 et Th2 peuvent rejeter des allogreffes d'îlots avec la même efficacité que les cellules T CD4⁺ Th1 (Barbara *et al.*, 2000). Une autre équipe de chercheur a quant à elle démontré qu'en présence de cellules T CD8⁺, les cytokines retrouvés étaient de type Th1 et qu'en absence de ces cellules cytotoxiques le profil cytokinique était mixte (Th1/Th2) avec une présence d'éosinophiles élevée dans les greffons (Chan *et al.*, 1995). Par conséquent, il est possible que dans notre modèle, où il y a absence de cellules T CD8⁺, que les éosinophiles contribuent activement aux mécanismes de rejets des greffes de peau.

L'ARN codant pour la molécule effectrice associée à la membrane Fas-L est retrouvé parmi toutes les allogreffes. Ceci suggère donc la présence d'un mécanisme effecteur cytotoxique des cellules T CD4⁺ dans les deux types d'allogreffes. Plusieurs études ont démontré que l'activité cytotoxique développée par les cellules T CD4⁺ résulte de l'interaction entre Fas-L et Fas sur les cibles allogéniques (Hahn *et al.*, 1995; Van Parijs et Abbas, 1996). Dans la peau, les kératinocytes sont connus pour exprimer la molécule Fas à un niveau basal. Ces cellules sont donc des cibles potentielles à l'apoptose exercée par Fas-L, induit sur les cellules T CD4⁺ cytotoxiques allogéniques (Baker *et al.*, 1996; Lindner *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1998). De plus, des études réalisées avec des allogreffes rénales humaines ont démontré l'importance de la voie Fas/Fas-L dans l'immunité exercée par les cellules T (Sharma *et al.*, 1996). Par ailleurs, ce même groupe a également observé, dans des biopsies de reins, la présence d'ARNm correspondant à la molécule Fas-L dans les reins rejetés et l'absence de cette même molécule dans les allogreffes de reins bien tolérées. Cependant, une étude a aussi démontré que les souris déficientes pour la molécule Fas-L rejettent leur greffe de peau aussi bien que des souris normales. Ils ont associé ce rejet à la présence d'IL-5 et d'éosinophiles dans les greffons (Le Moine *et al.*, 1999). D'ailleurs, c'est cette même équipe qui a apporté les premières évidences de l'IL-5 comme médiateur clé du rejet en absence de cytotoxicité. Toutefois, d'autres études avaient aussi rapporté, dans des

biopsies d'allogreffes de rein et de foie, la présence élevée d'éosinophiles (de Groen *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1993b; Nolan *et al.*, 1995; Ten *et al.*, 1989). Alors, il semble que l'IL-5 et les éosinophiles contribuent à une certaine forme de rejet dans la transplantation. Il serait donc intéressant de vérifier à l'aide de notre modèle la présence d'IL-5 par ELISPOT et RT-PCR et d'éosinophiles par immunohistochimie. Des expériences de RT-PCR spécifiques à l'IL-5 avaient déjà été entreprises dans notre laboratoire. Par contre, aucune expérience n'a été véritablement concluante. Ces expériences devraient, en effet, être reproduites à l'aide de nouvelles amorces ainsi que de nouvelles conditions de PCR.

Les analyses de RT-PCR nous démontrent également une infiltration de cellules T 2.102Tg dans tous les types de greffes. Cependant, nous pouvons observer à la figure 11 que l'infiltration des cellules T est beaucoup plus grande dans les allogreffes que dans les greffes isogéniques. Cette augmentation illustre bien la présence accrue d'effecteurs aux sites du rejet. Toutefois, la faible présence de cellules T 2.102Tg dans les isogreffes ne provient certainement pas d'un recrutement spécifique, puisque nous n'observons aucun rejet de ces greffes. Ce recrutement peut être attribuable à l'inflammation provoquée lors de la réalisation des greffes. La chirurgie associée aux transplantations peut conduire à l'activation de plusieurs cellules, comme les cellules endothéliales et épithéliales, qui produisent et sécrètent différentes chémokines. Ces molécules permettent ainsi l'infiltration de diverses cellules immunitaires, incluant les cellules T, au site de l'inflammation, dans notre cas, au greffon. Une étude a d'ailleurs démontré que dans les 4 premiers jours suivant la transplantation, il y avait la présence de chémokines autant dans les isogreffes que dans les allogreffes (Watarai *et al.*, 2000). À la septième journée suivant la greffe, aucune chémokine ne pouvait être détectée dans les deux types de greffes. Cependant, pour les allogreffes, une nouvelle apparition de ces molécules était observée au jour 9 suivant la transplantation. Par conséquent, dans cette expérience, il y avait dans les journées qui suivaient la greffe un recrutement non-spécifique de diverses cellules au greffon.

Bref, en résumé, nous n'avons pas identifié de cellules effectrices participant au rejet, via la voie directe d'alloréactivité, dans les organes lymphoïdes secondaires des

souris greffées. Cependant, une présence de cellules T 2.102Tg ainsi que de cytokines de type Th1 et Th2 ont été observé dans les greffons rejetés par cette même voie d'alloréactivité. Ainsi, les résultats obtenus au site du greffon sont similaires pour les deux types de voies d'alloréactivité. Puisque dans nos expériences, ce sont les évènements qui se produisent aux organes lymphoïdes secondaires qui diffèrent pour les deux voies impliquées dans les rejets de greffe, nous pouvons supposer que ce sont les mécanismes d'initiation des rejets de greffe de peau qui sont différents pour chacune des voies. Toutefois, afin de mieux comprendre et de comparer les événements d'initiation et effecteurs impliqués dans les rejets au site des greffons, des analyses complémentaires d'histologie et d'immunochimie devraient être entreprises. Suite aux résultats obtenus pour l'ensemble de ce projet, nous avons émis l'hypothèse que dans notre modèle, les organes lymphoïdes secondaires ne joueraient pas un rôle majeur dans les rejets par la voie directe d'alloréactivité. En fait, ces organes auraient un rôle différent selon le contexte d'alloréactivité dans lequel ils sont impliqués. D'autres expériences sur l'étude de la production d'alloanticorps réalisées par Dominique Sauvé dans notre laboratoire (Sauvé, données non-publiées) ont démontré la présence d'alloanticorps de type IgG, seulement, dans la voie indirecte d'alloréactivité. Ainsi, ces résultats nous permettent également d'appuyer notre hypothèse, puisque sans la présence de cellules T activées aux organes lymphoïdes secondaires, il ne peut y avoir de production d'anticorps par les cellules B. Jusqu'à présent, il est généralement accepté de tous que l'initiation des réponses des cellules T dans la transplantation se produit via la reconnaissance d'alloantigènes présentés sur les leucocytes passagers du donneur qui infiltrer les organes lymphoïdes secondaires du receveur (Benichou, 1999). Suite à cette reconnaissance de l'antigène, les cellules T activées infiltrer la greffe et sécrètent des cytokines. Après que les cellules passagères aient quitté le greffon, les cellules endothéliales et épithéliales sont les seules cellules du donneur qui expriment les molécules de classe II du CMH (Benichou, 1999). Les cellules T naïves qui reconnaîtront ces molécules du CMH allogéniques à la surface de ces cellules, qui ne sont pas des CPA professionnelles, deviendront alors anergiques, devenant ainsi incapable de proliférer et de produire de l'IL-2 (Gaspari *et al.*, 1988; Lo *et al.*, 1989). Ainsi, en contradiction avec ces énoncés, selon notre hypothèse nous suggérons que les cellules T

allospécifiques pourraient s'activer directement au site du greffon, c'est-à-dire sans rencontre au préalable dans les organes lymphoïdes secondaires drainant. Valujskikh et ses collègues ont eux aussi déjà suggéré la possibilité que les cellules T seraient activées par les CPA dans la greffe elle-même (Valujskikh *et al.*, 1998). D'autres ont également suggéré cette possibilité pour des greffes de coeurs et de reins (Briscoe *et al.*, 1998; Pedersen et Morris, 1970; Pober *et al.*, 1996). De plus, une étude plus récente a démontré que les cellules endothéliales (cellules non-hématopoïétiques) peuvent devenir des CPAs potentielles pour l'alloréconnaissance des cellules T CD8⁺ *in vivo* et *in vitro*. Cette même étude a aussi établi, à l'aide d'un modèle allogénique de greffe de coeur dans un contexte unique d'alloréactivité directe, que les greffes de coeur sont rejetées en absence de CPAs hématopoïétiques du greffon (Kreisel *et al.*, 2002). Valujskikh et ses collègues ont également démontré que les cellules T CD8⁺ peuvent rejeter des greffes de peau par reconnaissance de cellules endothéliales de l'hôte qui ont préalablement acquis les alloantigènes du greffon (Valujskikh *et al.*, 2002). Par contre, certaines études concluent que les organes lymphoïdes secondaires sont essentiels dans les rejets de greffe de peau et de coeur (Barker et Billingham, 1968; Lakkis *et al.*, 2000; Miyawaki *et al.*, 1994).

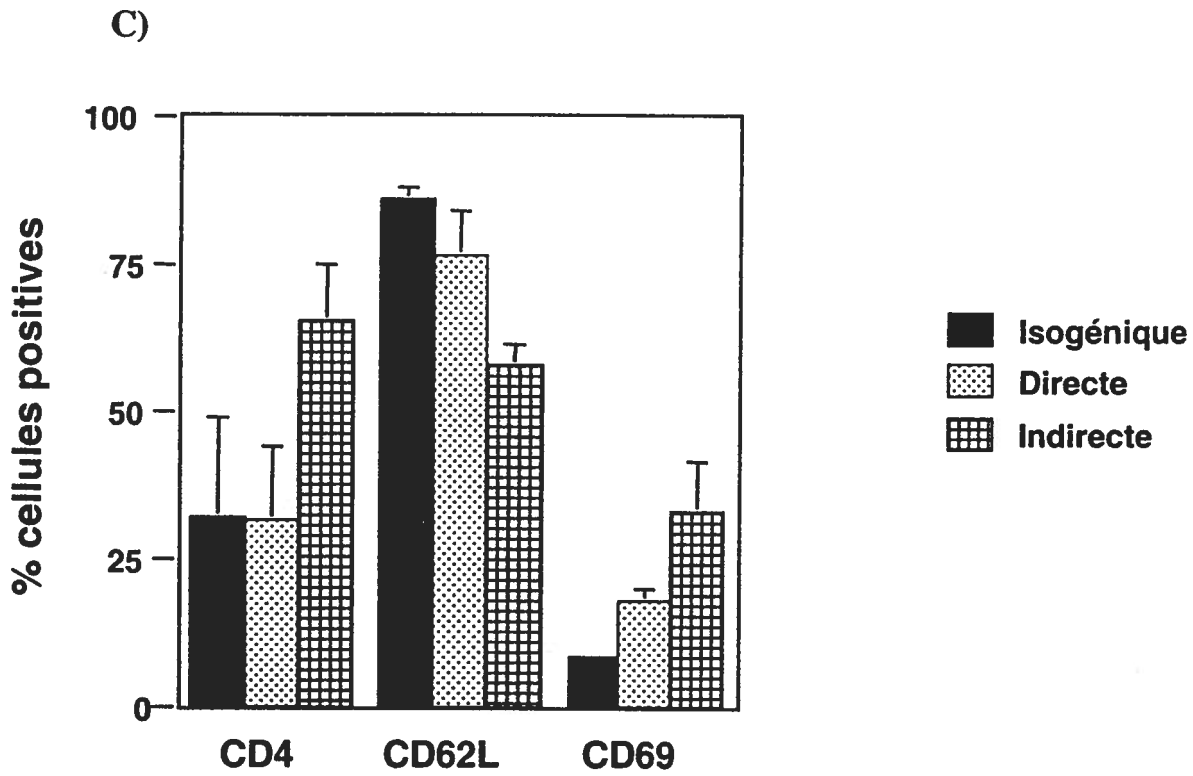
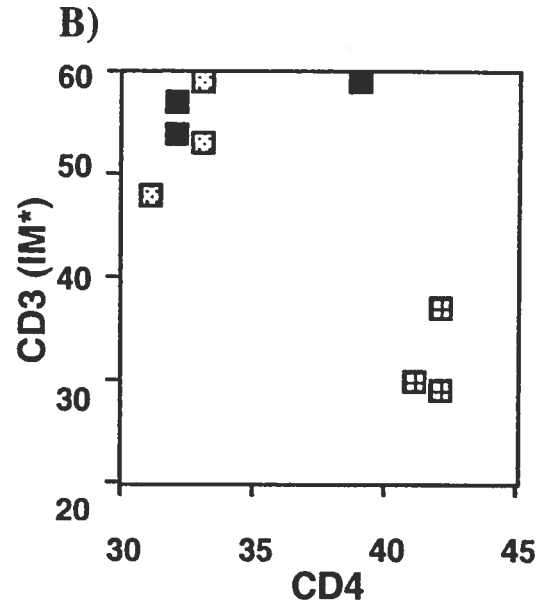
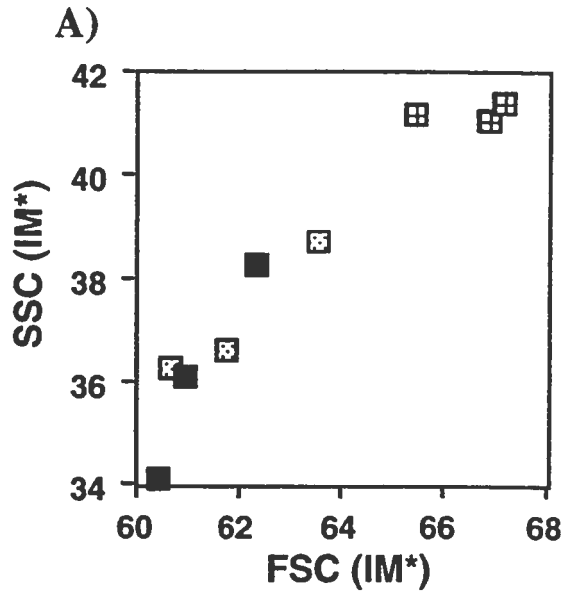
Afin de vérifier notre hypothèse, de futures expériences devront être réalisées au sein du laboratoire. Présentement, des croisements entre des souris 2.102Tg/RAG^{-/-} et des souris déficiente pour le récepteur de la lymphotoxine β (Lt β R^{-/-}) sont effectués. Grâce à cette dernière mutation, les souris nouvellement croisées ne posséderont aucun organe lymphoïde secondaire fonctionnel (Futterer *et al.*, 1998). Donc, des expériences d'allogreffes B10.P et B6(mHEL-Hb) avec ces souris permettront de confirmer si oui ou non l'hypothèse avancée s'avère exacte. Selon notre hypothèse, dans ces expériences les allogreffes B10.P pourraient, chez ces souris, être rejetées, même en absence des organes lymphoïdes secondaires.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise correspondaient à la première étude réalisée dans le laboratoire. Grâce à un tel modèle de rejet de greffe de peau, où les voies d'alloréactivité directe et indirecte peuvent être étudiées de façon

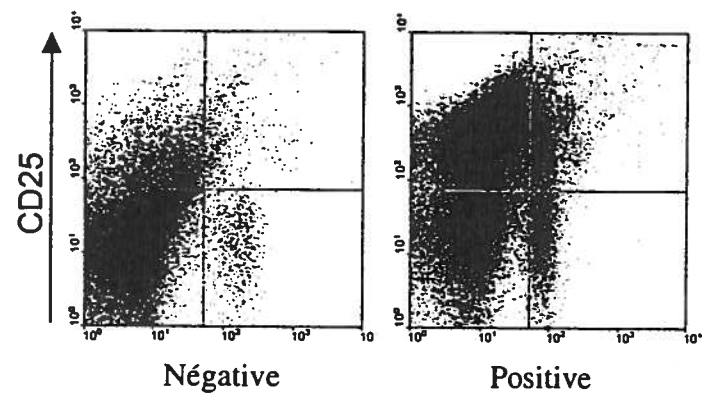
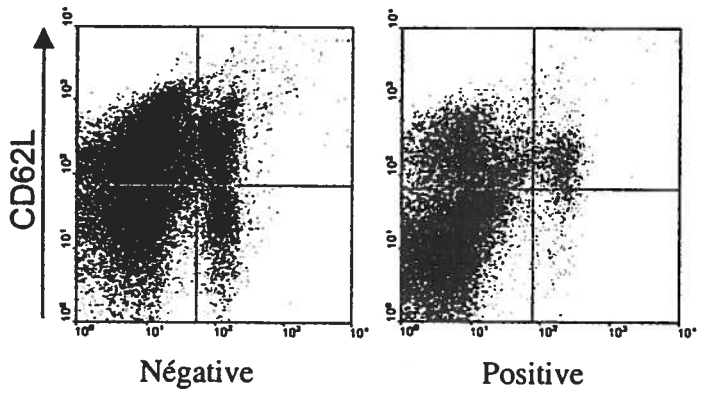
indépendante, plusieurs aspects de la réponse immunitaire impliqués dans les rejets d'allogreffes de peau et éventuellement de tout autre organe vascularisé pourront y être étudiés. Nos résultats démontrent clairement que les mécanismes d'activation des cellules T CD4⁺ semblent être différents pour chacune des voies d'alloréactivité. Puisque les thérapies immunosuppressives actuelles ne parviennent pas à empêcher de façon adéquate les éventuels rejets, il est impératif de poursuivre ces études afin d'obtenir de meilleures connaissances à propos des mécanismes immunitaires impliqués lors des rejets de greffe. Une telle compréhension de ces mécanismes permettra de définir de nouvelles et surtout de meilleures cibles potentielles pour l'élaboration de futures thérapies immunosuppressives.

ANNEXE

Annexe 1: Phénotype des cellules T CD4⁺ suite à des rejets de greffe de peau dans un contexte d'alloréactivité directe et indirecte. Les cellules de la rate des souris greffées ont été analysées par cytométrie en flux pour A) leur morphologie B) les marqueurs de cellules T CD3 et CD4, ainsi que C) les marqueurs d'activation cellulaire CD62L et CD69. Les résultats présentés sont représentatifs des résultats obtenus dans les ganglions axillaires. (Baratin, M, données non publiées) (IM*:Intensité moyenne)

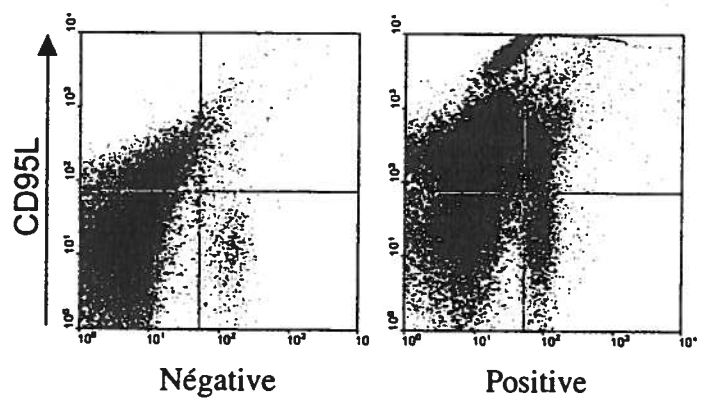
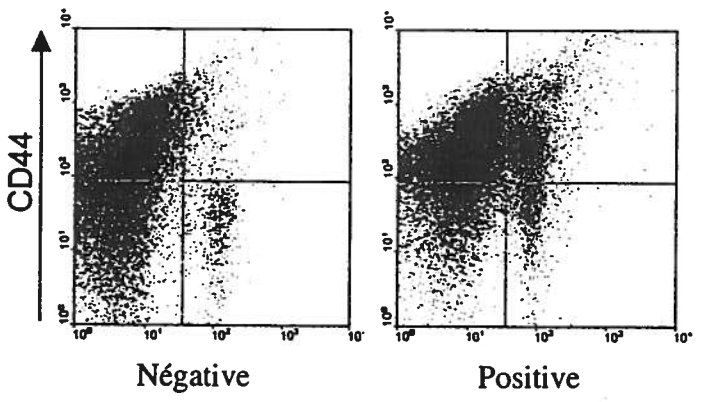


Annexe 2: Témoins négatifs et positifs des analyses de phénotypage des cellules T CD4⁺ suite aux rejets de greffes de peau. Des cellules T 2.102Tg ont été stimulées *in vitro* avec 1 μ M du peptide Hb(64-76) et des splénocytes irradiés de souris B6.AKR. Après une incubation de 48 heures, les cellules ont été marquées à l'aide des anticorps spécifiques aux molécules CD4 et à l'une des molécules suivantes, A) CD62L, B) CD25, C) CD44 et D) CD95L et analysées par cytométrie en flux sur un appareil de type Coulter Epics XL (Hialeah, FL, USA). Les populations négatives représentent des cellules T 2.102Tg non-stimulées.



CD4 →

CD4 →



CD4 →

CD4 →

RÉFÉRENCES

Liste des références

Abbas, A. K., K. M. Murphy et A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.

Alvarez, C. M., D. Fernandez, M. Builes, J. Zabaleta, L. M. Restrepo, A. Villegas et L. F. Garcia. 2001. Intra-graft cytokine expression in heart transplants with mild or no histological rejection. *Clin Transplant* 15: 228-235.

Anderson, C. C. et P. Matzinger. 2001. Immunity or tolerance: opposite outcomes of microchimerism from skin grafts. *Nat Med* 7: 80-87.

Arakelov, A. et F. G. Lakkis. 2000. The alloimmune response and effector mechanisms of allograft rejection. *Semin Nephrol* 20: 95-102.

Auchincloss, H. Jr. 1988. Xenogeneic transplantation. A review. *Transplantation* 46: 1-20.

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.

Auchincloss, H. Jr et H. Sultan. 1996. Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr Opin Immunol* 8: 681-687.

Azuma, H., K. C. Nadeau, M. Ishibashi et N. L. Tilney. 1995. Prevention of functional, structural, and molecular changes of chronic rejection of rat renal allografts by a specific macrophage inhibitor. *Transplantation* 60: 1577-1582.

Azzawi, M., S. D. Grant, P. S. Hasleton, N. Yonan, C. S. Campbell, A. K. Deiraniya, A. Rahman et I. V. Hutchinson. 1996. TNF alpha mRNA and protein in cardiac transplant biopsies: comparison with serum TNF alpha levels. *Cardiovasc Res* 32: 551-556.

Azzawi, M., P. S. Hasleton et I. V. Hutchinson. 1999. TNF-alpha in acute cardiac transplant rejection. *Cytokines Cell Mol Ther* 5: 41-49.

Baker, M. B., N. H. Altman, E. R. Podack et R. B. Levy. 1996. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med* 183: 2645-2656.

Barbara, J. A., S. E. Turvey, C. I. Kingsley, B. M. Spriewald, M. Hara, O. Witzke, P. J. Morris et K. J. Wood. 2000. Islet allograft rejection can be mediated by CD4+, alloantigen experienced, direct pathway T cells of TH1 and TH2 cytokine phenotype. *Transplantation* 70: 1641-1649.

Barker, C. F. et R. E. Billingham. 1968. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. *J Exp Med* 128 : 197-221.

Bell, E. B., D. Rejali, E. H. Whitby, S. M. Sparshott et C. P. Yang. 1990. Allograft rejection in athymic nude rats by transferred T cell subsets. II. The response of naive CD4+ and CD8+ thoracic duct lymphocytes to an isolated MHC class I disparity. *Transplantation* 50: 690-696.

Benichou, G. 1999. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci* 1999 May 15;4:D476-80. D476-480.

Benichou, G., A. Valujskikh et P. S. Heeger. 1999. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol* 162: 352-358.

1996. *In*: "Immunology, a short course". Benjamini, E., Sunshine, G. and Leskowitz, S. (Ed.), Wiley-Liss Publishing, New-York, pp. 377-398.

Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller et W. R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393: 478-480.

Berger, M., P. J. Wettstein et R. Korngold. 1994. T cell subsets involved in lethal graft-versus-host disease directed to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 57: 1095-1102.

Beutler, B. 1995. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med* 43: 227-235.

Bevan, M. J. 1984. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* 5: 128-130.

Billiau, A. 1996. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 1996;62:61-130. 62: 61-130.

Boussiotis, V. A., J. G. Gribben, G. J. Freeman et L. M. Nadler. 1994. Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Curr Opin Immunol* 6: 797-807.

Bradley, J. A. 1996. Indirect T cell recognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol* 13: 245-255.

Bradley, J. A., D. W. Mason et P. J. Morris. 1985. Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T cells and not by nonspecific effectors. *Transplantation* 39: 169-175.

Braun, M. Y., I. Grandjean, P. Feunou, L. Duban, R. Kiss, M. Goldman et O. Lantz. 2001. Acute rejection in the absence of cognate recognition of allograft by T cells. *J Immunol* 166: 4879-4883.

Briscoe, D. M., S. I. Alexander et A. H. Lichtman. 1998. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 10: 525-531.

Bromberg, J. S. 1995. IL-10 immunosuppression in transplantation. *Curr Opin Immunol* 7: 639-643.

Chan, S. Y., L. A. DeBruyne, R. E. Goodman, E. J. Eichwald et D. K. Bishop. 1995. In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. *Transplantation* 59: 1155-1161.

Chang, C. H. et R. A. Flavell. 1995. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J Exp Med* 181: 765-767.

Chen, W., B. Murphy, A. M. Waaga, T. A. Willett, M. E. Russell, S. J. Khoury et M. H. Sayegh. 1996. Mechanisms of indirect allorecognition in graft rejection: class II MHC allopeptide-specific T cell clones transfer delayed-type hypersensitivity responses in vivo. *Transplantation* 62 : 705-710.

Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler et H. L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265: 1237-1240.

Ciccone, E., O. Viale, C. Bottino, D. Pende, N. Migone, G. Casorati, G. Tambussi, A. Moretta et L. Moretta. 1988. Antigen recognition by human T cell receptor gamma-positive lymphocytes. Specific lysis of allogeneic cells after activation in mixed lymphocyte culture. *J Exp Med* 167: 1517-1522.

Cobbold, S. P., G. Martin, S. Qin et H. Waldmann. 1986. Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* 323: 164-166.

Corley, R. B. et B. Kindred. 1977. In vivo responses of alloreactive lymphocytes stimulated in vitro. Helper-cell activity of MLR-primed lymphocytes. *Scand J Immunol* 6: 923-932.

Coulombe, M., H. Yang, S. Guerder, R. A. Flavell, K. J. Lafferty et R. G. Gill. 1996. Tissue immunogenicity: the role of MHC antigen and the lymphocyte costimulator B7-1. *J Immunol* 157: 4790-4795.

Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 1994;12:259-93. 12: 259-293.

Cron, R. Q., T. F. Gajewski, S. O. Sharrow, F. W. Fitch, L. A. Matis et J. A. Bluestone. 1989. Phenotypic and functional analysis of murine CD3+,CD4-,CD8- TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells. *J Immunol* 142: 3754-3762.

Dai, Z., B. T. Konieczny, F. K. Baddoura et F. G. Lakkis. 1998. Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 161: 1659-1663.

Dallman, M. J. 1995. Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol* 7: 632-638.

Dalloul, A. H., E. Chmouzis, K. Ngo et W. P. Fung-Leung. 1996a. Adoptively transferred CD4+ lymphocytes from CD8 -/- mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts. *J Immunol* 156: 4114-4119.

Dalloul, A. H., K. Ngo et W. P. Fung-Leung. 1996b. CD4-negative cytotoxic T cells with a T cell receptor alpha/beta intermediate expression in CD8-deficient mice. *Eur J Immunol* 26: 213-218.

Daniel, C., A. Grakoui et P. M. Allen. 1998. Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J Immunol* 160: 3244-3250.

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.

Davies, J. D., G. Martin, J. Phillips, S. E. Marshall, S. P. Cobbold et H. Waldmann. 1996. T cell regulation in adult transplantation tolerance. *J Immunol* 157: 529-533.

Daynes, R. A., B. A. Araneo, T. A. Dowell, K. Huang et D. Dudley. 1990. Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J Exp Med* 171: 979-996.

de Groen, P. C., G. M. Kephart, G. J. Gleich et J. Ludwig. 1994. The eosinophil as an effector cell of the immune response during hepatic allograft rejection. *Hepatology* 20: 654-662.

DeKruyff, R. H., L. V. Rizzo et D. T. Umetsu. 1993. Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+ T cell clones. *Semin Immunol* 5: 421-430.

Del Prete, G. F., M. De Carli, C. Mastromauro, R. Biagiotti, D. Macchia, P. Falagiani, M. Ricci et S. Romagnani. 1991. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 88: 346-350.

Demotz, S., A. Sette, K. Sakaguchi, R. Buchner, E. Appella et H. M. Grey. 1991. Self peptide requirement for class II major histocompatibility complex allorecognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8730-8734.

Dempster, W. J. 1977. The migrant cells in allotransplants of heart, kidney and skin. III. The source and evolution of migrant cells in association with allotransplant fibroplasia. *Br J Exp Pathol* 58: 683-702.

Denton, M. D., C. C. Magee et M. H. Sayegh. 1999. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 353: 1083-1091.

- Dinareello, C. A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87: 2095-2147.
- Eckels, D. D., J. Gorski, J. Rothbard et J. R. Lamb. 1988. Peptide-mediated modulation of T-cell allorecognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8191-8195.
- Eto, M., Y. Yoshikai, Y. Nishimura, K. Hiromatsu, T. Maeda, K. Nomoto, Y. Y. Kong, R. T. Kubo, J. Kumazawa et K. Nomoto. 1994. Inhibition of allograft rejection by anti-T-cell receptor-alpha beta monoclonal antibodies preserving resistance to bacterial infection. *Immunology* 81: 198-204.
- 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.
- Fairchild, R. L., A. M. VanBuskirk, T. Kondo, M. E. Wakely et C. G. Orosz. 1997. Expression of chemokine genes during rejection and long-term acceptance of cardiac allografts. *Transplantation* 63: 1807-1812.
- Fangmann, J., R. Dalchau, G. J. Sawyer, C. A. Priestley et J. W. Fabre. 1992. T cell recognition of donor major histocompatibility complex class I peptides during allograft rejection. *Eur J Immunol* 22: 1525-1530.
- Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban Jr, M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann et W. E. Paul. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 1990;8:303-33. 8: 303-333.
- Fitch, F. W., M. D. McKisic, D. W. Lancki et T. F. Gajewski. 1993. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol* 1993;11:29-48. 11: 29-48.
- Ford, W. L., S. J. Simmonds et R. C. Atkins. 1975. Early cellular events in a systemic graft-vs.-host reaction. II. Autoradiographic estimates of the frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B-determined antigenic complex. *J Exp Med* 141: 681-696.
- Foster, P. S., S. P. Hogan, A. J. Ramsay, K. I. Matthaei et I. G. Young. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183: 195-201.
- Foy, T. M., A. Aruffo, J. Bajorath, J. E. Buhlmann et R. J. Noelle. 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 1996;14:591-617. 14: 591-617.
- Freeman, G. J., V. A. Boussiotis, A. Anumanthan, G. M. Bernstein, X. Y. Ke, P. D. Rennert, G. S. Gray, J. G. Gribben et L. M. Nadler. 1995. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 2: 523-532.

Futterer, A., K. Mink, A. Luz, M. H. Kosco-Vilbois et K. Pfeffer. 1998. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* **9**: 59-70.

Gallimore, A., A. Glithero, A. Godkin, A. C. Tissot, A. Pluckthun, T. Elliott, H. Hengartner et R. Zinkernagel. 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* **187**: 1383-1393.

Gaspari, A. A., M. K. Jenkins et S. I. Katz. 1988. Class II MHC-bearing keratinocytes induce antigen-specific unresponsiveness in hapten-specific Th1 clones. *J Immunol* **141**: 2216-2220.

Gassel, A. M., M. L. Hansmann, H. J. Radzun et M. Weyand. 1990. Human cardiac allograft rejection. Correlation of grading with expression of different monocyte/macrophage markers. *Am J Clin Pathol* **94**: 274-279.

Goldman, M., A. Le Moine, M. Braun, V. Flamand et D. Abramowicz. 2001. A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends Immunol* **22**: 247-251.

2000. *In*: "Kuby, Immunology". Goldsby, R. A., Kindt, B. A. and Osborne, B. A. (Ed.), W. H. Freeman and company publishing, New-York, pp. 261-264.

Gomez-Flores, R., C. Rodriguez-Padilla, R. T. Mehta, L. Galan-Wong, E. Mendoza-Gamboa et R. Tamez-Guerra. 1997. Nitric oxide and TNF-alpha production by murine peritoneal macrophages activated with a novel 20-kDa protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* parasporal bodies. *J Immunol* **158**: 3796-3799.

Gonzalez, M., R. Merino, A. L. Gonzalez et J. Merino. 1995. The ability of B cells to participate in allogeneic cognate T-B cell interactions in vitro depends on the presence of CD4+ T cells during their development. *J Immunol* **155**: 1091-1100.

Gorczyński, R. M. et D. Wojcik. 1994. A role for nonspecific (cyclosporin A) or specific (monoclonal antibodies to ICAM-1, LFA-1, and IL-10) immunomodulation in the prolongation of skin allografts after antigen-specific pretransplant immunization or transfusion. *J Immunol* **152**: 2011-2019.

Goto, M., Y. Yamaguchi, O. Ichiguchi, N. Miyanari, E. Akizuki, F. Matsumura, T. Matsuda, K. Mori et M. Ogawa. 1997. Phenotype and localization of macrophages expressing inducible nitric oxide synthase in rat hepatic allograft rejection. *Transplantation* **64**: 303-310.

Gould, D. S. et H. Auchincloss Jr. 1999. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* **20**: 77-82.

Goulmy, E. 1996. Human minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* **8**: 75-81.

Gracie, J. A., E. M. Bolton, C. Porteous et J. A. Bradley. 1990. T cell requirements for the rejection of renal allografts bearing an isolated class I MHC disparity. *J Exp Med* 172: 1547-1557.

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.

Grenz, A., M. Schenk, A. Zipfel et R. Viebahn. 2000. TNF-alpha and its receptors mediate graft rejection and loss after liver transplantation. *Clin Chem Lab Med* 38: 1183-1185.

Grewal, I. S. et R. A. Flavell. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998;16:111-35. 16: 111-135.

Haas, W., P. Pereira et S. Tonegawa. 1993. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 1993;11:637-85. 11: 637-685.

Hahn, S., R. Gehri et P. Erb. 1995. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 1995 Aug;146:57-79. 146: 57-79.

Hall, B. M. 1991. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 51: 1141-1151.

Hall, B. M., K. E. Gurley et S. E. Dorsch. 1985. The possible role of cytotoxic T cells in the mediation of first-set allograft rejection. *Transplantation* 40: 336-339.

Halloran, P. F. et S. L. Lui. 1998. Approved immunosuppressants. *In*: "In: Primer on Transplantation". Thorofare, NJ: Am. Soc. Transplant Physicians, pp. 93-102.

Halloran, P. F., A. Wadgymar et P. Autenried. 1986. The regulation of expression of major histocompatibility complex products. *Transplantation* 41: 413-420.

Hancock, G. E., Z. A. Cohn et G. Kaplan. 1989. The generation of antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes of the CD4+ phenotype. Enhancement by the cutaneous administration of interleukin 2. *J Exp Med* 169: 909-919.

Hancock, W. W., N. M. Thomson et R. C. Atkins. 1983. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation* 35: 458-463.

1993. The major histocompatibility Complex. *In*: "Paul WE". Hansen, T. H., Carreno, B. M. and Sachs, D. H. (Ed.), Raven Press, New-York, pp. 577-628.

Heath, W. R., M. E. Hurd, F. R. Carbone et L. A. Sherman. 1989. Peptide-dependent recognition of H-2Kb by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 341: 749-752.

Hoefsmit, E. C., A. M. Duijvestijn et E. W. Kamperdijk. 1982. Relation between langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells. *Immunobiology* 161: 255-265.

Hou, G., A. Valujskikh, J. Bayer, A. B. Stavitsky, C. Metz et P. S. Heeger. 2001. In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor prevents skin graft destruction after indirect allorecognition. *Transplantation* 72: 1890-1897.

Hutchinson, I. V. 1991. Cellular mechanisms of allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 3: 722-728.

Jones, G. 1973. The number of reactive cells in mouse lymphocyte cultures stimulated by phytohemagglutinin, concanavalin A or histocompatibility antigen. *J Immunol* 111: 914-920.

Josien, R., M. Muschen, E. Gilbert, P. Douillard, J. M. Heslan, J. P. Soulillou et M. C. Cuturi. 1998. Fas ligand, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 66: 887-893.

Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, R. M. Zinkernagel et H. Hengartner. 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996;14:207-32. 14: 207-232.

Kalams, S. A. et B. D. Walker. 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 188: 2199-2204.

Kaye, J. et C. A. Janeway Jr. 1984. The Fab fragment of a directly activating monoclonal antibody that precipitates a disulfide-linked heterodimer from a helper T cell clone blocks activation by either allogeneic Ia or antigen and self-Ia. *J Exp Med* 159: 1397-1412.

Kerman, R. H., C. G. Orosz et M. I. Lorber. 1997. Clinical relevance of anti-HLA antibodies pre and post transplant. *Am J Med Sci* 313: 275-278.

Kern, I., V. Steimle, C. A. Siegrist et B. Mach. 1995. The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes. *Int Immunol* 7: 1295-1299.

Klein, J. 1986. *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*, New-York, Wiley.

Konieczny, B. T., Z. Dai, E. T. Elwood, S. Saleem, P. S. Linsley, F. K. Baddoura, C. P. Larsen, T. C. Pearson et F. G. Lakkis. 1998. IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J Immunol* 160: 2059-2064.

Kopf, M., F. Brombacher, P. D. Hodgkin, A. J. Ramsay, E. A. Milbourne, W. J. Dai, K. S. Ovington, C. A. Behm, G. Kohler, I. G. Young et K. I. Matthaei. 1996. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 4: 15-24.

Krieger, N. R., D. P. Yin et C. G. Fathman. 1996. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorecognition. *J Exp Med* 184: 2013-2018.

Kroegel, C., J. C. Virchow Jr, W. Luttmann, C. Walker et J. A. Warner. 1994. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur Respir J* 7: 519-543.

Kuchroo, V. K., M. P. Das, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel, H. L. Weiner, N. Nabavi et L. H. Glimcher. 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80: 707-718.

Kwok, W. W., A. W. Liu, E. J. Novak, J. A. Gebe, R. A. Ettinger, G. T. Nepom, S. N. Reymond et D. M. Koelle. 2000. HLA-DQ tetramers identify epitope-specific T cells in peripheral blood of herpes simplex virus type 2-infected individuals: direct detection of immunodominant antigen-responsive cells. *J Immunol* 164: 4244-4249.

Lakkis, F. G. 1998a. Cytokines in graft rejection and acceptance: An ever-shifting paradigm. *Graft* 1: 143-146.

Lakkis, F. G. 1998b. Role of cytokines in transplantation tolerance: lessons learned from gene-knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 9: 2361-2367.

Lakkis, F. G., A. Arakelov, B. T. Konieczny et Y. Inoue. 2000. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 6: 686-688.

Larsen, C. P., D. Z. Alexander, R. Hendrix, S. C. Ritchie et T. C. Pearson. 1995. Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune responses? *Transplantation* 60: 221-224.

Larsen, C. P., P. J. Morris et J. M. Austyn. 1990a. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 171: 307-314.

Larsen, C. P., R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris et J. M. Austyn. 1990b. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172: 1483-1493.

Le Moine, A., M. Surquin, F. X. Demoor, J. C. Noel, M. A. Nahori, M. Pretolani, V. Flamand, M. Y. Braun, M. Goldman et D. Abramowicz. 1999. IL-5 mediates eosinophilic rejection of MHC class II-disparate skin allografts in mice. *J Immunol* 163: 3778-3784.

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.

Lechler, R. I., G. Lombardi, J. R. Batchelor, N. Reinsmoen et F. H. Bach. 1990. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 11: 83-88.

Lee, R. S., M. J. Grusby, L. H. Glimcher, H. J. Winn et H. Auchincloss Jr. 1994. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J*

Exp Med 179: 865-872.

Lee, R. S., M. J. Grusby, T. M. Laufer, R. Colvin, L. H. Glimcher et H. Auchincloss Jr. 1997. CD8+ effector cells responding to residual class I antigens, with help from CD4+ cells stimulated indirectly, cause rejection of "major histocompatibility complex-deficient" skin grafts. *Transplantation* 63: 1123-1133.

Lehmann, P. V., D. Matesic, G. Benichou et P. S. Heeger. 1997. Induction of T helper 2 immunity to an immunodominant allopeptide. *Transplantation* 64: 292-296.

Lenschow, D. J., T. L. Walunas et J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58. 14: 233-258.

Lenschow, D. J., Y. Zeng, J. R. Thistlethwaite, A. Montag, W. Brady, M. G. Gibson, P. S. Linsley et J. A. Bluestone. 1992. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 257: 789-792.

Lewis, E., M. Weiler, C. Chaimovitz et A. Douvdevani. 2001. Interleukin-15 is the main mediator of lymphocyte proliferation in cultures mixed with human kidney tubular epithelial cells. *Transplantation* 72: 886-890.

Lim, S. M., A. Wee, S. M. Chong et D. J. White. 1990. An analysis of concordant xenograft rejection in the nude rat model. *Transplant Proc* 22: 2095-2096.

Lin, Y., M. Vandeputte et M. Waer. 1997. Natural killer cell- and macrophage-mediated rejection of concordant xenografts in the absence of T and B cell responses. *J Immunol* 158: 5658-5667.

Lindahl, K. F. et D. B. Wilson. 1977. Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *J Exp Med* 145: 508-522.

Lindner, G., V. A. Botchkarev, N. V. Botchkareva, G. Ling, C. van der Veen et R. Paus. 1997. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 151: 1601-1617.

Lipman, M. L., A. C. Stevens et T. B. Strom. 1994. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 152: 5120-5127.

Liu, C. C., L. H. Young et J. D. Young. 1996. Lymphocyte-mediated cytolysis and disease. *N Engl J Med* 335: 1651-1659.

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.

Lo, D., L. C. Burkly, R. A. Flavell, R. D. Palmiter et R. L. Brinster. 1989. Tolerance in transgenic mice expressing class II major histocompatibility complex on pancreatic acinar cells. *J Exp Med* 170: 87-104.

- 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.
- MacDonald, H. R., J. L. Casanova, J. L. Maryanski et J. C. Cerottini. 1993. Oligoclonal expansion of major histocompatibility complex class I-restricted cytolytic T lymphocytes during a primary immune response in vivo: direct monitoring by flow cytometry and polymerase chain reaction. *J Exp Med* 177: 1487-1492.
- Magee, C. C. et M. H. Sayegh. 1997. Peptide-mediated immunosuppression. *Curr Opin Immunol* 9: 669-675.
- Markus, P. M., M. van den Brink, X. Cai, J. Harnaha, L. Palomba, J. C. Hiserodt et D. V. Cramer. 1991. Effect of selective depletion of natural killer cells on allograft rejection. *Transplant Proc* 23: 178-179.
- Martinez, O. M., N. L. Ascher, L. Ferrell, J. Villanueva, J. Lake, J. P. Roberts et S. M. Krams. 1993a. Evidence for a nonclassical pathway of graft rejection involving interleukin 5 and eosinophils. *Transplantation* 55: 909-918.
- Martinez, O. M., J. C. Villanueva, J. Lake, J. P. Roberts, N. L. Ascher et S. M. Krams. 1993b. IL-2 and IL-5 gene expression in response to alloantigen in liver allograft recipients and in vitro. *Transplantation* 55: 1159-1166.
- Matesic, D., P. V. Lehmann et P. S. Heeger. 1998a. High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice. *Transplantation* 65: 906-914.
- Matesic, D., A. Valujskikh, E. Pearlman, A. W. Higgins, A. C. Gilliam et P. S. Heeger. 1998b. Type 2 immune deviation has differential effects on alloreactive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 161: 5236-5244.
- Matis, L. A., R. Cron et J. A. Bluestone. 1987. Major histocompatibility complex-linked specificity of gamma delta receptor-bearing T lymphocytes. *Nature* 330: 262-264.
- Matzinger, P. et M. J. Bevan. 1977. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* 29: 1-5.
- Mayer, T. G., A. K. Bhan et H. J. Winn. 1988. Immunohistochemical analyses of skin graft rejection in mice. Kinetics of lymphocyte infiltration in grafts of limited immunogenetic disparity. *Transplantation* 46: 890-899.
- McKee, C. M., R. Defina, H. He, K. J. Haley, J. R. Stone et D. L. Perkins. 2002. Prolonged allograft survival in TNF receptor 1-deficient recipients is due to immunoregulatory effects, not to inhibition of direct antigraft cytotoxicity. *J Immunol* 168: 483-489.
- Merrill, J. P. 1978. Transplantation immunology 1957-1975. *Ann Immunol (Paris)* 129: 347-352.

Merrill, J. P., J. E. Murray, J. H. Harrison et W. R. Guild. 1984. Landmark article Jan 28, 1956: Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. By John P. Merrill, Joseph E. Murray, J. Hartwell Harrison, and Warren R. Guild. *JAMA* 251: 2566-2571.

1962. Role of the thymus in transplantation tolerance and immunity. *In*: "Wolstenholme GEW, Cameron M. P.". Miller, J. F. A. P. (Ed.), London: Churchill, pp. 397.

Miyawaki, S., Y. Nakamura, H. Suzuka, M. Koba, R. Yasumizu, S. Ikehara et Y. Shibata. 1994. A new mutation, *aly*, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur J Immunol* 24: 429-434.

Morton, A. L., E. B. Bell, E. M. Bolton, H. E. Marshall, C. Roadknight, M. McDonagh et J. A. Bradley. 1993. CD4+ T cell-mediated rejection of major histocompatibility complex class I-disparate grafts: a role for alloantibody. *Eur J Immunol* 23: 2078-2084.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin et R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357.

Mosmann, T. R., J. H. Schumacher, N. F. Street, R. Budd, A. O'Garra, T. A. Fong, M. W. Bond, K. W. Moore, A. Sher et D. F. Fiorentino. 1991. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells. *Immunol Rev* 1991 Oct;123:209-29. 123: 209-229.

Murphy, G. F., D. Whitaker, J. Sprent et R. Korngold. 1991. Characterization of target injury of murine acute graft-versus-host disease directed to multiple minor histocompatibility antigens elicited by either CD4+ or CD8+ effector cells. *Am J Pathol* 138: 983-990.

Nadeau, K. C., H. Azuma et N. L. Tilney. 1996. Sequential cytokine expression in renal allografts in rats immunosuppressed with maintenance cyclosporine or mycophenolate mofetil. *Transplantation* 62: 1363-1366.

Nagano, H., R. N. Mitchell, M. K. Taylor, S. Hasegawa, N. L. Tilney et P. Libby. 1997. Interferon-gamma deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts. *J Clin Invest* 100: 550-557.

Nakajima, H., I. Iwamoto, S. Tomoe, R. Matsumura, H. Tomioka, K. Takatsu et S. Yoshida. 1992. CD4+ T-lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. *Am Rev Respir Dis* 146: 374-377.

Nelson, C. A., I. Vidavsky, N. J. Viner, M. L. Gross et E. R. Unanue. 1997. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 628-633.

Newstead, C. G. 1998. Assessment of risk of cancer after renal transplantation. *Lancet* 351: 610-611.

Nickerson, P., W. Steurer, J. Steiger, X. Zheng, A. W. Steele et T. B. Strom. 1994.

Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol* 6: 757-764.

Nolan, C. R., K. P. Saenz, C. A. Thomas 3rd et K. D. Murphy. 1995. Role of the eosinophil in chronic vascular rejection of renal allografts. *Am J Kidney Dis* 26: 634-642.

1998. *In*: "Expected clinical outcomes/risk factors. In: Primer on transplantation." Norman, D. J. (Ed.), Norman, D. J. // Suki, W. N., Thorofare, NJ: Am. Soc. Transplant Physicians, pp. 245-250.

Norwich, K. H., S. Ramanathan et P. Poussier. 1999. Kinetics of T cell turnover following thymectomy. *Cell Prolif* 32: 195-201.

Ohshima, Y. et G. Delespesse. 1997. T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J Immunol* 158: 629-636.

Opelz, G. et V. Lenhard. 1983. Immunological factors influencing renal graft survival. *Annu Rev Med* 1983;34:133-44. 34: 133-144.

Orloff, M. S., E. M. DeMara, M. L. Coppage, N. Leong, M. A. Fallon, J. Sickel, X. J. Zuo, J. Prehn et S. C. Jordan. 1995. Prevention of chronic rejection and graft arteriosclerosis by tolerance induction. *Transplantation* 59: 282-288.

Pattison, J. M. et A. M. Krensky. 1997. New insights into mechanisms of allograft rejection. *Am J Med Sci* 313: 257-263.

Paul, W. E. et R. A. Seder. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251.

Pedersen, N. C. et B. Morris. 1970. The role of the lymphatic system in the rejection of homografts: a study of lymph from renal transplants. *J Exp Med* 131: 936-969.

Perreault, C., D. C. Roy et C. Fortin. 1998. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol Today* 19: 69-74.

Pescovitz, M. D., J. R. Thistlethwaite Jr, H. Auchincloss Jr, S. T. Ildstad, T. G. Sharp, R. Terrill et D. H. Sachs. 1984. Effect of class II antigen matching on renal allograft survival in miniature swine. *J Exp Med* 160: 1495-1508.

Piccotti, J. R., S. Y. Chan, R. E. Goodman, J. Magram, E. J. Eichwald et D. K. Bishop. 1996. IL-12 antagonism induces T helper 2 responses, yet exacerbates cardiac allograft rejection. Evidence against a dominant protective role for T helper 2 cytokines in alloimmunity. *J Immunol* 157: 1951-1957.

Pober, J. S., C. G. Orosz, M. L. Rose et C. O. Savage. 1996. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* 61: 343-349.

Popov, I. A., E. V. Fedoseyeva, P. L. Orr, M. R. Garovoy et G. Benichou. 1995. Direct evidence for in vivo induction of CD8+ cytotoxic T cells directed to donor MHC class I peptides following mouse allotransplantation. *Transplantation* 60: 1621-1624.

- Rankin, G. W. Jr, X. M. Wang et P. I. Terasaki. 1990. Sensitization to kidney transplants. *Clin Transpl* 417-424.
- Richters, C. D., A. M. van Pelt, E. van Geldrop, M. J. Hoekstra, J. van Baare, J. S. du Pont et E. W. Kamperdijk. 1996. Migration of rat skin dendritic cells. *J Leukoc Biol* 60: 317-322.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa et P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393: 474-478.
- Rincon, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig et R. A. Flavell. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 185: 461-469.
- Rizzo, M., K. S. SivaSai, M. A. Smith, E. P. Trulock, J. P. Lynch, G. A. Patterson et T. Mohanakumar. 2000. Increased expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules by alveolar macrophages of human lung allograft recipients with acute rejection: decline with resolution of rejection. *J Heart Lung Transplant* 19: 858-865.
- Rock, K. L. et B. Benacerraf. 1984. Selective modification of a private I-A allostimulating determinant(s) upon association of antigen with an antigen-presenting cell. *J Exp Med* 159: 1238-1252.
- Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-57.
- Rose, M. L. 1998. Endothelial cells as antigen-presenting cells: role in human transplant rejection. *Cell Mol Life Sci* 54: 965-978.
- 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.
- Rosenberg, A. S., T. Mizuochi et A. Singer. 1988. Evidence for involvement of dual-function T cells in rejection of MHC class I disparate skin grafts. Assessment of MHC class I alloantigens as in vivo helper determinants. *J Exp Med* 168: 33-45.
- Rosenberg, A. S., T. I. Munitz, T. G. Maniero et A. Singer. 1991. Cellular basis of skin allograft rejection across a class I major histocompatibility barrier in mice depleted of CD8+ T cells in vivo. *J Exp Med* 173: 1463-1471.
- Rosenberg, A. S. et A. Singer. 1992. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu Rev Immunol* 1992;10:333-58. 10: 333-358.
- Rossini, A. A., D. L. Greiner et J. P. Mordes. 1999. Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiol Rev* 79 : 99-141.
- Russell, M. E. 1995. Macrophages and transplant arteriosclerosis: known and novel molecules. *J Heart Lung Transplant* 14: S111-115.

Russell, P. S., C. M. Chase et R. B. Colvin. 1997. Alloantibody- and T cell-mediated immunity in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis: lack of progression to sclerotic lesions in B cell-deficient mice. *Transplantation* 64: 1531-1536.

Russell, P. S., C. M. Chase, H. J. Winn et R. B. Colvin. 1994. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. III. Effects of recipient treatment with a monoclonal antibody to interferon-gamma. *Transplantation* 57: 1367-1371.

Russell, S. M., A. D. Keegan, N. Harada, Y. Nakamura, M. Noguchi, P. Leland, M. C. Friedmann, A. Miyajima, R. K. Puri, W. E. Paul et al. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 262: 1880-1883.

Saito, R., J. Prehn, X. J. Zuo, A. Marchevesky, J. Castracane, P. Waters, J. Matloff et S. C. Jordan. 1993. The participation of tumor necrosis factor in the pathogenesis of lung allograft rejection in the rat. *Transplantation* 55: 967-972.

Saleem, S., B. T. Konieczny, R. P. Lowry, F. K. Baddoura et F. G. Lakkis. 1996. Acute rejection of vascularized heart allografts in the absence of IFNgamma. *Transplantation* 62: 1908-1911.

Sanderson, C. J. 1992. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79: 3101-3109.

Sawada, T., Y. Wu, D. H. Sachs et J. Iacomini. 1997. CD4+ T cells are able to reject class I disparate allografts. *Transplantation* 64: 335-340.

Sayegh, M. H., E. Akalin, W. W. Hancock, M. E. Russell, C. B. Carpenter, P. S. Linsley et L. A. Turka. 1995. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 181: 1869-1874.

Sayegh, M. H. et C. B. Carpenter. 1996. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol* 13: 221-229.

Sayegh, M. H. et A. M. Krensky. 1996. Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides. *Kidney Int Suppl* 1996 Jan;53:S13-20. 53: S13-20.

Sayegh, M. H., N. Perico, O. Imberti, W. W. Hancock, C. B. Carpenter et G. Remuzzi. 1993. Thymic recognition of class II major histocompatibility complex allopeptides induces donor-specific unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation* 56: 461-465.

Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa et C. J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393: 480-483.

Schook, L. B., H. Albrecht, P. Gallay et C. V. Jongeneel. 1994. Cytokine regulation of TNF-alpha mRNA and protein production by unprimed macrophages from C57Bl/6 and NZW mice. *J Leukoc Biol* 56: 514-520.

Schulz, M., H. J. Schuurman, J. Joergensen, C. Steiner, T. Meerloo, D. Kagi, H.

Hengartner, R. M. Zinkernagel, M. H. Schreier, K. Burki et al. 1995. Acute rejection of vascular heart allografts by perforin-deficient mice. *Eur J Immunol* 25: 474-480.

Seder, R. A. et W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12: 635-673.

Sekine, Y., L. K. Bowen, K. M. Heidler, N. Van Rooijen, J. W. Brown, O. W. Cummings et D. S. Wilkes. 1997. Role of passenger leukocytes in allograft rejection: effect of depletion of donor alveolar macrophages on the local production of TNF-alpha, T helper 1/T helper 2 cytokines, IgG subclasses, and pathology in a rat model of lung transplantation. *J Immunol* 159: 4084-4093.

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.

Sharma, V. K., R. M. Bologa, B. Li, G. P. Xu, M. Lagman, W. Hiscock, J. Mouradian, J. Wang, D. Serur, V. K. Rao et M. Suthanthiran. 1996. Molecular executors of cell death--differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 62: 1860-1866.

Sherman, L. A. et S. Chattopadhyay. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 11: 385-402.

Shi, C., W. S. Lee, Q. He, D. Zhang, D. L. Fletcher Jr, J. B. Newell et E. Haber. 1996. Immunologic basis of transplant-associated arteriosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4051-4056.

Shirwan, H. 1999. Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 68: 715-726.

Silberberg-Sinakin, I., G. J. Thorbecke, R. L. Baer, S. A. Rosenthal et V. Berezowsky. 1976. Antigen-bearing langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell Immunol* 25: 137-151.

1998. *In*: "A history of immunology". Silverstein, A. M. (Ed.), Academic, San Diego, CA, pp. 1-422.

Simpson, E. 1998. Minor transplantation antigens: animal models for human host-versus-graft, graft-versus-host, and graft-versus-leukemia reactions. *Transplantation* 65: 611-616.

Simpson, E. et D. Roopenian. 1997. Minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* 9: 655-661.

Sirak, J., C. G. Orosz, E. Wakely et A. M. VanBuskirk. 1997. Alloreactive delayed-type hypersensitivity in graft recipients: complexity of responses and divergence from acute rejection. *Transplantation* 63: 1300-1307.

Smith, X. G., E. M. Bolton, H. Ruchatz, X. Wei, F. Y. Liew et J. A. Bradley. 2000. Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival. *J Immunol* 165: 3444-3450.

Snapper, C. M., C. Peschel et W. E. Paul. 1988. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 140: 2121-2127.

Sousa, C. R., S. Hieny, T. Scharon-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain et A. Sher. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186: 1819-1829.

Sprent, J., M. Schaefer, D. Lo et R. Korngold. 1986. Functions of purified L3T4+ and Lyt-2+ cells in vitro and in vivo. *Immunol Rev* 91: 195-218.

Starzl, T. E. et R. M. Zinkernagel. 1998. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. *N Engl J Med* 339: 1905-1913.

Steele, D. J., T. M. Laufer, S. T. Smiley, Y. Ando, M. J. Grusby, L. H. Glimcher et H. Auchincloss Jr. 1996. Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med* 183: 699-703.

Steiger, J., P. W. Nickerson, W. Steurer, M. Moscovitch-Lopatin et T. B. Strom. 1995. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol* 155: 489-498.

Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-96. 9: 271-296.

Suciu-Foca, N., E. Reed, V. D. D'Agati, E. Ho, D. J. Cohen, A. I. Benvenisty, R. McCabe, J. M. Brensilver, D. W. King et M. A. Hardy. 1991a. Soluble HLA antigens, anti-HLA antibodies, and antiidiotypic antibodies in the circulation of renal transplant recipients. *Transplantation* 51: 593-601.

Suciu-Foca, N., E. Reed, C. Marboe, P. Harris, P. X. Yu, Y. K. Sun, E. Ho, E. Rose, K. Reemtsma et D. W. King. 1991b. The role of anti-HLA antibodies in heart transplantation. *Transplantation* 51: 716-724.

Takeuchi, T., R. P. Lowry et B. Konieczny. 1992. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation* 53: 1281-1294.

Taylor, M. A., B. Ward, J. D. Schatzle et M. Bennett. 2002. Perforin- and Fas-dependent mechanisms of natural killer cell-mediated rejection of incompatible bone marrow cell grafts. *Eur J Immunol* 32: 793-799.

Ten, R. M., G. J. Gleich, K. E. Holley, J. D. Perkins et V. E. Torres. 1989. Eosinophil granule major basic protein in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 47: 959-963.

- Teramoto, K., Y. Tanaka, F. Kusano, Y. Hara, K. Ishidate, T. Iwai et C. Sato. 1999. Expression of tumor necrosis factor-alpha gene during allograft rejection following rat liver transplantation. *Liver* 19: 19-24.
- Thomas, F. T., W. Marchman, A. Carobbi, D. Araneda, W. Pryor et J. Thomas. 1991. Immunobiology of the xenograft response: xenograft rejection in immunodeficient animals. *Transplant Proc* 23: 208-209.
- Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 251-276.
- Valujskikh, A., D. Matesic, A. Gilliam, D. Anthony, T. M. Haqqi et P. S. Heeger. 1998. T cells reactive to a single immunodominant self-restricted allopeptide induce skin graft rejection in mice. *J Clin Invest* 101: 1398-1407.
- Valujskikh, A., D. Matesic et P. S. Heeger. 1999. Characterization and manipulation of T cell immunity to skin grafts expressing a transgenic minor antigen. *Transplantation* 68: 1029-1036.
- Van Parijs, L. et A. K. Abbas. 1996. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 8: 355-361.
- VanBuskirk, A. M., D. J. Pidwell, P. W. Adams et C. G. Orosz. 1997. Transplantation immunology. *JAMA* 278: 1993-1999.
- VanBuskirk, A. M., M. E. Wakely et C. G. Orosz. 1996a. Acute rejection of cardiac allografts by noncytolytic CD4(+) T cell populations. *Transplantation* 62: 300-302.
- VanBuskirk, A. M., M. E. Wakely et C. G. Orosz. 1996b. Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. *Transplantation* 62: 229-238.
- Viard, I., P. Wehrli, R. Bullani, P. Schneider, N. Holler, D. Salomon, T. Hunziker, J. H. Saurat, J. Tschopp et L. E. French. 1998. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 282: 490-493.
- von Andrian, U. H. et C. R. Mackay. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343: 1020-1034.
- von Willebrand, E. et P. Hayry. 1978. Composition and in vitro cytotoxicity of cellular infiltrates in rejecting human kidney allografts. *Cell Immunol* 41: 358-372.
- Wakabayashi, T., S. Mori, H. Degawa, Y. Takeda, S. Tomikawa, H. Sugimoto, J. Yamauchi, O. Ohtsubo et N. Akiyama. 1986. Identification of inflammatory cells infiltrating renal allografts. *Acta Pathol Jpn* 36: 953-962.
- Watarai, Y., S. Koga, D. R. Paolone, T. M. Engeman, C. Tannenbaum, T. A. Hamilton et R. L. Fairchild. 2000. Intraallograft chemokine RNA and protein during rejection of

MHC-matched/multiple minor histocompatibility-disparate skin grafts. *J Immunol* **164**: 6027-6033.

Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1997;15:821-50. **15**: 821-850.

Wecker, H., M. J. Grusby et H. Auchincloss Jr. 1995. Effector cells must recognize antigens expressed in the graft to cause efficient skin graft rejection in SCID mice. *Transplantation* **59**: 1223-1227.

Weenink, S. M. et A. M. Gautam. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol* **75**: 69-81.

Weiler, M., L. Kachko, C. Chaimovitz, C. Van Kooten et A. Douvdevani. 2001. CD40 ligation enhances IL-15 production by tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* **12**: 80-87.

Williams, C. B., D. L. Engle, G. J. Kersh, J. Michael White et P. M. Allen. 1999. A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. *J Exp Med* **189**: 1531-1544.

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.

Wilson, D. B. et J. L. Blyth NOWELL PC. 1968. Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. 3. Kinetics of the response. *J Exp Med* **128**: 1157-1181.

Wise, M., D. Zelenika, F. Bemelman, D. Latinne, H. Bazin, S. Cobbold et H. Waldmann. 1999. CD4 T cells can reject major histocompatibility complex class I-incompatible skin grafts. *Eur J Immunol* **29**: 156-167.

Wolf, P. R. et H. L. Ploegh. 1995. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 267-306.

Yamamoto, H., M. Monden, M. Kawai, A. Uenaka, M. Gotoh, T. Mori, M. Sakurai, H. Shiku et E. Nakayama. 1990. The role of CD8+ and CD4+ cells in islet allograft rejection. *Transplantation* **50**: 120-125.

Yamamoto, N., K. Einaga-Naito, M. Kuriyama, Y. Kawada et R. Yoshida. 1998. Cellular basis of skin allograft rejection in mice: specific lysis of allogeneic skin components by non-T cells. *Transplantation* **65**: 818-825.

Yang, X., N. Chowdhury, B. Cai, J. Brett, C. Marboe, R. R. Sciacca, R. E. Michler et P. J. Cannon. 1994. Induction of myocardial nitric oxide synthase by cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* **94**: 714-721.

Zelenika, D., E. Adams, A. Mellor, E. Simpson, P. Chandler, B. Stockinger, H.

Waldmann et S. P. Cobbold. 1998. Rejection of H-Y disparate skin grafts by monospecific CD4+ Th1 and Th2 cells: no requirement for CD8+ T cells or B cells. *J Immunol* 161: 1868-1874.

Zhai, Y., R. M. Ghobrial, R. W. Busuttil et J. W. Kupiec-Weglinski. 1999. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Crit Rev Immunol* 19: 155-172.

Zheng, X. X., A. W. Steele, P. W. Nickerson, W. Steurer, J. Steiger et T. B. Strom. 1995. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J Immunol* 154: 5590-5600.

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

