

---

Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /  
Université libre de Bruxelles Institutional Repository  
**Thèse de doctorat/ PhD Thesis**

**Citation APA:**

Donckier De Donceel, V. (1996). *Rôle des cytokines dans la tolérance de transplantation et l'immunopathologie induites par l'injection néonatale d'alloantigènes chez la souris* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté de Médecine – Médecine, Bruxelles.

**Disponible à / Available at permalink :** <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/212299/1/f0510876-a41e-4cab-b12f-af739dfa02b5.txt>

---

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

**Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.**

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- **English Version** -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

**If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.**

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

---

Th 2723

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

FACULTE DE MEDECINE

---

**ROLE DES CYTOKINES DANS LA TOLERANCE DE  
TRANSPLANTATION ET L'IMMUNOPATHOLOGIE INDUITES  
PAR L'INJECTION NEONATALE D'ALLOANTIGENES  
CHEZ LA SOURIS**

*Vincent Donckier*

CIBLÉ

SERVICE DE CHIRURGIE DIGESTIVE, HOPITAL ERASME ET LABORATOIRE  
PLURIDISCIPLINAIRE DE RECHERCHE EXPERIMENTALE BIOMEDICALE

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade d'Agrégé de  
l'Enseignement Supérieur

-1996-

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES.  
BIBLIOTHEQUE DE MEDECINE - CAMPUS ERASME  
Route de Lennik, 808 (Bât. E - CP 607)  
1070 BRUXELLES  
☎ 555-61-70

**UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES**

**FACULTE DE MEDECINE**

Epreuve publique pour l'obtention du titre légal  
**d'agrégé de l'enseignement supérieur**

**Vincent DONCKIER de DONCEEL**

Docteur en Médecine, Chirurgie et Accouchements

défendra publiquement le **jeudi 23 mai 1996 à 20 heures**,  
une thèse d'agrégation intitulée :

**«ROLE DES CYTOKINES DANS LA TOLERANCE DE TRANSPLANTATION ET  
L'IMMUNOPATHOLOGIE INDUITES PAR L'INJECTION NEONATALE  
D'ALLOANTIGENES CHEZ LA SOURIS»**

M. DONCKIER de DONCEEL fera une leçon sur le sujet suivant :

**«LA TRANSPLANTATION HEPATIQUE»**

CIBLER

Auditoire Claude (local F2.204)  
route de Lennik 808 - 1070 Bruxelles

## **TABLE DES MATIERES**

### **I. Introduction**

1. Rappel historique
2. Caractéristiques des lymphocytes T alloréactifs
3. Mécanismes intervenant dans l'induction néonatale de tolérance
4. Immunopathologie associée à la tolérance

### **II. Buts du travail**

### **III. Résultats**

1. L'injection néonatale d'alloantigènes induit une expression accrue des ARN messagers codant pour l'IL-4 et l'IL-10 dans la rate
2. La sécrétion précoce d'IL-4 joue un rôle déterminant dans l'induction de la tolérance de transplantation après l'injection néonatale d'alloantigènes
3. L'administration d'IFN- $\gamma$  réduit l'immunopathologie induite par l'injection néonatale d'alloantigènes
4. L'administration d'IFN- $\gamma$  restaure le rejet de greffe de peau mais ne modifie pas le chimérisme après l'injection néonatale d'alloantigènes
5. La neutralisation précoce de l'IL-10 n'interfère pas avec l'induction de la tolérance
6. l'IL-10 intervient dans l'immunopathologie induite par l'injection néonatale d'alloantigènes

### **IV. Discussion**

1. Différenciation des lymphocytes TH2
2. Rôle des lymphocytes TH2 dans la tolérance de transplantation
3. Dissociation entre chimérisme lymphoïde et tolérance de transplantation
4. Rôle des lymphocytes TH2 dans l'immunopathologie
5. Conclusion et perspectives

**V. Références****VI. Thèses annexes**

## **I. INTRODUCTION**

Les progrès réalisés au cours des dernières décennies, tant dans le domaine chirurgical que dans le développement de nouveaux traitements immunosuppresseurs, ont permis à la transplantation d'organe d'occuper une place de plus en plus grande dans la pratique médicale. Si les problèmes techniques ne représentent plus qu'exceptionnellement un obstacle à la réalisation d'une greffe, la maîtrise des phénomènes de rejet demeure par contre une préoccupation essentielle. D'une part, les traitements immunosuppresseurs actuellement utilisés n'ont pas une efficacité optimale: on estime que la moitié des patients greffés présentera au moins un épisode de rejet aigu et que 10% d'entre eux souffriront d'un rejet chronique. D'autre part, ces traitements sont à l'origine d'effets secondaires importants pouvant limiter ou contre-indiquer leur utilisation. Outre leurs effets toxiques propres, ces médicaments sont responsables d'une immunosuppression non spécifique affectant notamment les mécanismes de défense contre les agents infectieux et le développement de tumeurs. L'ensemble de ces complications, infectieuses et néoplasiques, est la cause principale de morbidité et de mortalité chez les patients greffés.

Pour ces raisons, le développement de stratégies thérapeutiques permettant d'induire une tolérance de transplantation, c'est-à-dire la survie prolongée d'une allogreffe en l'absence de tout traitement immunosuppresseur, représente un intérêt majeur.

Depuis la première démonstration expérimentale de ce phénomène chez la souris par Medawar au début des années 1950, différents modèles de tolérance ont été développés chez l'animal. Malgré ces travaux, l'induction de tolérance en transplantation clinique reste hypothétique: seuls quelques cas exceptionnels de patients conservant un greffon fonctionnel en l'absence d'immunosuppression ont été rapportés.

L'étude de modèles expérimentaux reste donc nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans l'induction et le maintien de la tolérance. L'espoir est d'appliquer ensuite, chez l'homme, les protocoles qui se sont avérés efficaces chez l'animal.

## **1. RAPPEL HISTORIQUE**

Au cours de son développement, le système immunitaire apprend à tolérer les antigènes qui lui sont propres et à réagir vis-à-vis des antigènes qui lui sont étrangers. Cette propriété fondamentale, la capacité de distinguer le soi et le non-soi, est à l'origine de l'immunité de transplantation.

La tolérance à l'égard des antigènes du soi est un phénomène observé depuis longtemps. C'est selon ce principe que Tagliacozzi, chirurgien italien du sixième siècle, utilisait des lambeaux musculo-cutanés prélevés au niveau du bras pour couvrir des pertes de substances faciales chez des patients souffrant de séquelles de syphilis. Ces autogreffes étaient parfaitement tolérées et permettaient la guérison complète des plaies.

Il a fallu par contre attendre le début du vingtième siècle pour que la réaction de rejet de greffe soit clairement identifiée. Une des premières descriptions objectives de ce phénomène revient à Holman, chirurgien à l'Hôpital John Hopkins, au cours des années 1920. Holman observa que lorsqu'il appliquait des greffes de peau à des patients brûlés, les greffes provenant de donneurs non apparentés étaient rapidement rejetées alors que les autogreffes étaient tolérées. Holman décrivit également que lorsqu'il réalisait une seconde greffe provenant d'un même donneur, elle était rejetée plus rapidement que la première (Holman 1924).

Les chirurgiens anglais soignant les pilotes de la Royal Air Force durant la bataille d'Angleterre au cours de la seconde guerre mondiale firent des observations similaires. Les allogreffes de peau utilisées pour le traitement des brûlures étaient rapidement le siège d'une réaction inflammatoire suivie d'une nécrose et d'un rejet.

C'est à la suite de ces observations cliniques que plusieurs chercheurs, dont Medawar, étudièrent des modèles expérimentaux de greffe de peau chez la souris.

L'ensemble de ces travaux fondamentaux a permis d'établir les bases de l'immunologie de la transplantation.

Billingham, Brent et Medawar ont démontré que le rejet était une forme d'immunité spécifique, caractérisée par les phénomènes suivants:

Le rejet d'une greffe de peau dépend des différences génétiques entre le donneur et le receveur. Les greffes syngéniques, c'est-à-dire entre sujets génétiquement identiques, sont tolérées indéfiniment alors que les allogreffes, entre sujets génétiquement différents, sont rejetées. Le rejet survient d'autant plus rapidement que les disparités génétiques entre la souris receveuse et la souris donneuse sont importantes.

Si une même souris est greffée une seconde fois avec de la peau provenant d'un même donneur, le rejet sera accéléré par rapport à celui observé lors de la réaction primaire. Ce phénomène d'immunisation active est spécifique pour les alloantigènes de la souche donneuse. Cette forme de résistance vis-à-vis d'un alloantigène particulier peut être passivement acquise par une souris si on lui transfère des cellules lymphocytaires provenant d'une autre souris, préalablement exposée à cet alloantigène. Dans ce cas également, le rejet sera accéléré.

Parallèlement, Medawar et ses collaborateurs s'intéressèrent aux phénomènes de tolérance immunologique.

Owen avait été à l'origine de ces études en démontrant que certains mammifères et certains oiseaux perdent la capacité de réagir vis-à-vis d'antigènes étrangers lorsqu'ils y sont exposés précocement au cours de leur vie foetale. Par exemple, des veaux jumeaux dizygotés peuvent être porteurs à la naissance de globules rouges provenant de leur frère et exprimant des antigènes différents des leurs. Ces globules rouges, échangés au cours de la vie foetale par des anastomoses entre les réseaux vasculaires placentaires, ne sont pas rejetés et persistent de façon prolongée dans la circulation et les tissus de l'animal receveur, le rendant ainsi chimérique (Owen 1945). Ces mêmes animaux tolèrent à long terme une allogreffe de peau provenant de leur frère jumeau (Anderson 1951).

De façon similaire, chez le poulet, l'injection de cellules allogéniques dans la circulation chorio-allantoïdienne au cours de la vie foetale, permet d'induire un état de tolérance spécifique caractérisé, à l'âge adulte, par la survie de greffe de peau (Billingham 1953).

Chez la souris, Billingham, Brent et Medawar ont démontré que l'injection néonatale de cellules allogéniques induit une tolérance spécifique vis-à-vis des antigènes de la souche donneuse. La tolérance est caractérisée par l'induction d'un état de chimérisme et par la survie prolongée de greffes de peau portant les antigènes du donneur.

Par opposition au phénomène d'immunisation observé chez les animaux adultes, ces travaux ont permis d'établir le principe de la tolérance activement acquise durant la période néonatale (Billingham 1953).

C'est ce modèle d'induction néonatale de tolérance que nous avons étudié.

### **1.1. Protocole expérimental initial**

Le protocole expérimental initialement utilisé par Medawar et ses collaborateurs chez la souris consistait à injecter, durant la troisième semaine de grossesse, des foetus de souche CBA avec des cellules prélevées chez des animaux adultes, de souche A.

L'injection de cellules se faisait par voie intra-péritonéale, à travers la paroi utérine, après réalisation d'une laparotomie chez la femelle gravide. Les souris traitées au cours de la vie foetale étaient greffées à l'âge de huit semaines avec de la peau prélevée chez une souris adulte, de souche A.

Ce protocole permettait d'induire une tolérance de transplantation, la majorité des animaux expérimentaux conservant leur greffe au-delà du cinquantième jour, comparé à une survie moyenne de 11 jours chez des animaux témoins.

Une des difficultés inhérentes à l'utilisation de ce protocole était la haute fréquence d'avortement induit par les injections intra-utérines. Pour cette raison, les auteurs pratiquèrent les injections durant la période néonatale, au cours des 24 premières heures de vie. De façon similaire à celle observée dans le protocole initial, l'administration par voie intra-veineuse de cellules allogéniques, via la branche orbitaire de la veine faciale, facilement accessible chez le souriceau nouveau-né, permettait d'induire une tolérance de transplantation.

### **1.2. Caractéristiques principales de la tolérance**

D'une souris à l'autre, au sein d'une même expérience, il existe une variation dans la façon dont une greffe de peau donneur-spécifique est tolérée. Dans certains cas, la survie de la greffe est simplement prolongée par rapport à celle observée chez des animaux témoins, alors que dans d'autres, la greffe est tolérée de façon permanente. Les animaux chez lesquels la greffe persiste au-delà du cinquantième jour sont définis comme hautement tolérants, le rejet ne survenant jamais après ce délai. Ces mêmes animaux tolèrent à long terme une deuxième greffe provenant d'un même donneur.

La tolérance dans ce modèle est spécifique, c'est-à-dire limitée aux alloantigènes du donneur; les souris tolérantes rejettent normalement une greffe provenant d'une souche tierce.

Les cellules injectées à la naissance ne sont pas rejetées et persistent chez les animaux tolérants. Ces animaux deviennent donc chimériques, c'est-à-dire que leurs tissus

contiennent deux populations cellulaires exprimant des antigènes différents, les leurs et ceux du donneur.

La survie prolongée de greffe de peau et le chimérisme lymphoïde sont associés. Les protocoles expérimentaux ne permettant d'établir une tolérance de transplantation, par exemple lorsque l'injection de cellules allogéniques est différée par rapport à la naissance, n'induisent pas de chimérisme.

### **1.3. Conditions d'induction de la tolérance**

#### ***Influence de la disparité antigénique entre le donneur et le receveur***

Les premières observations de Medawar ont permis de démontrer qu'il existe une grande variabilité dans l'induction de la tolérance en fonction des souches de souris. Les combinaisons qui utilisent des souches génétiquement proches sont généralement les plus favorables. Ce phénomène a été largement documenté dans des expériences ultérieures. Comme nous le verrons dans la suite du travail, en fonction de la disparité antigénique entre le donneur et le receveur, non seulement l'induction de tolérance mais également les mécanismes impliqués dans la tolérance peuvent varier.

Dans des protocoles comparables, Medawar et ses collaborateurs étudièrent l'induction de tolérance par l'injection néonatale de cellules xénogéniques, c'est-à-dire provenant d'animaux d'espèces différentes. Dans ces systèmes également, la tolérance était plus facilement induite lorsqu'il s'agissait d'espèces proches, par exemple poulet et faisan, que lorsqu'il s'agissait d'espèces plus éloignées, par exemple poulet et canard.

Par ailleurs, l'induction de tolérance n'est pas constante si on inverse les souches receveuse et donneuse; par exemple, 80% des souris A injectées à la naissance avec des cellules provenant de souris CBA deviennent hautement tolérantes, alors que la combinaison inverse n'induit que 40% de tolérance à long terme.

#### ***Nature et nombre des cellules injectées à la naissance***

Le pouvoir tolérogène des cellules allogéniques injectées à la naissance varie en fonction de leur nature. Les cellules spléniques et médullaires ont une efficacité comparable, supérieure à celle observée lors de l'injection de thymocytes dans les mêmes conditions. Contrairement à l'effet transfusionnel observé chez l'animal adulte, l'injection de sang durant la période néonatale ne permet généralement pas d'établir une tolérance.

Pour des raisons de facilité, la plupart des protocoles utilisent uniquement des cellules spléniques.

Le nombre de cellules injectées à la naissance dans les différents protocoles d'induction de tolérance varie généralement de 1 à  $10 \times 10^6$  cellules. L'injection de  $2,5 \times 10^5$  cellules ne permet pas d'induire une tolérance. Comme nous le verrons plus tard, dans certaines combinaisons, l'accroissement du nombre de cellules injectées, augmente l'importance de l'immunopathologie associée à la tolérance dans ce modèle.

#### ***Voie d'administration***

L'injection intra-veineuse s'est avérée être la voie la plus efficace pour induire de la tolérance chez le nouveau-né. Utilisant les mêmes combinaisons d'animaux et le même nombre de cellules, l'administration par voie intra-péritonéale est moins tolérogène, alors que l'injection de cellules allogéniques par voie sous-cutanée n'induit pas de tolérance.

Dans certaines conditions expérimentales, notamment celles nécessitant l'injection d'un nombre élevé de cellules, l'injection intra-péritonéale sera préférée pour des raisons de facilité technique.

#### ***Moment de l'injection des cellules allogéniques***

La souris présente durant son développement trois phases distinctes au cours desquelles les effets de l'injection de cellules allogéniques seront fondamentalement différents. Au cours d'une première période s'étendant de la vie foetale jusqu'à la 48ème heure de vie, l'injection de cellules allogéniques va induire un état de tolérance. Entre le deuxième et le septième jour, s'étend une période neutre; les souris injectées dans cet intervalle de temps ne vont pas développer de tolérance ni être sensibilisées vis-à-vis de l'alloantigène. Ces animaux ne développent pas de chimérisme et une greffe de peau spécifique du donneur sera rejetée dans un délai similaire à celui observé chez des souris naïves. Après cette période, c'est-à-dire, à partir du septième jour, l'injection de cellules allogéniques va induire une immunisation active des souris receveuses, caractérisée par le rejet accéléré d'une greffe de peau provenant de la souche donneuse.

#### **1.4. Pathologie induite par l'injection néonatale d'alloantigènes**

Dans leurs premières descriptions du modèle, Medawar et ses collaborateurs rapportaient que les souris injectées à la naissance avec des cellules allogéniques pouvaient développer une pathologie particulière, caractérisée par un retard de croissance, de la diarrhée, une hypoplasie des ganglions lymphatiques et une infiltration

hépatique et rénale. En raison de sa présentation clinique, les auteurs ont baptisé cette pathologie "runt disease" ou maladie des avortons.

Cette pathologie est causée par une réaction immunologique des cellules du donneur à l'encontre de leur hôte résultant en une maladie du greffon contre l'hôte (GVH pour graft versus host disease). En effet, l'apparition de la maladie est directement dépendante de la persistance des cellules allogéniques chez l'animal receveur; les souris chez lesquelles on n'observe pas de chimérisme ne développent pas de pathologie. Par ailleurs, l'injection néonatale de cellules allogéniques foetales, immatures, permet d'induire de la tolérance mais ne provoque pas de GVH. Enfin, l'injection néonatale de cellules allogéniques provenant d'animaux préalablement immunisés contre la souche receveuse accroît la sévérité de la maladie.

Ces considérations ont conduit les auteurs à injecter des cellules semi-allogéniques, c'est-à-dire provenant d'un animal hybride de première génération dont une des souches parentales est identique à celle du receveur, par exemple des souris de souche A recevant à la naissance des cellules provenant d'un animal F1(AxB). Dans ce cas, les cellules injectées sont incapables de réagir vis-à-vis du receveur puisqu'elles partagent les mêmes antigènes.

Ainsi, des souriceaux nouveau-nés A injectés avec des cellules spléniques semi-allogéniques provenant d'un animal F1(AxB), présentent une tolérance spécifique vis-à-vis de la souche B sans développer de maladie GVH.

Toutefois, l'injection de cellules semi-allogéniques peut induire une forme différente de pathologie caractérisée notamment par une hyperplasie des ganglions lymphatiques et une splénomégalie. L'intensité de la pathologie dépend du nombre de cellules injectées et des disparités antigéniques entre les souches receveuse et donneuse.

Comme nous le détaillerons dans la suite du travail, ces manifestations pathologiques sont dues à une réaction des cellules de l'hôte contre celles du donneur (HVG pour host- versus-graft disease).

## **2. CARACTERISTIQUES DES LYMPHOCYTES T ALLOREACTIFS**

### **2.1. Activation des lymphocytes T alloréactifs**

En dehors de situations particulières dans lesquelles il existe des anticorps préformés chez des sujets sensibilisés, le rejet aigu d'allogreffe dépend essentiellement de la cytotoxicité cellulaire et de réactions inflammatoires locales. Les lymphocytes T jouent un rôle central dans ces deux mécanismes; les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont responsables de la cytotoxicité cellulaire alors que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> secrètent des cytokines qui vont permettre le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires.

Pour que les lymphocytes T soient activés, il faut que les antigènes leur soient présentés sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La structure tridimensionnelle des molécules du CMH détermine des sillons au sein desquels sont capables de se loger une série de peptides. C'est cette association particulière, peptide-CMH, que va reconnaître le récepteur des lymphocytes T. Les gènes du CMH sont très polymorphes. Le polymorphisme s'exprime au niveau des acides aminés formant les sillons liant les peptides; de cette manière, l'individu et l'espèce augmentent la diversité des antigènes auxquels ils sont capables de réagir.

Il existe deux classes de molécules du CMH, les molécules de classe I, présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme et les molécules de classe II, présentes essentiellement sur les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques.

Les peptides associés aux molécules de classe I sont reconnus par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, alors que ceux associés aux molécules de classe II sont reconnus par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

C'est au cours de la maturation thymique que les lymphocytes T acquièrent leur réactivité spécifique. Les lymphocytes T sont éduqués d'une part à ne reconnaître un peptide étranger que lorsqu'il est présenté en association avec une molécule du CMH du soi, et d'autre part, à ne pas réagir vis-à-vis d'antigènes du soi. Cette éducation se fait selon un phénomène de double sélection, une sélection positive ne retenant que les lymphocytes T ayant une affinité pour les molécules du CMH du soi, et une sélection négative éliminant les cellules autoréactives. Au sortir du thymus, il ne persiste donc pratiquement que des lymphocytes T sélectionnés pour reconnaître un peptide étranger en association avec une molécule du CMH du soi.

La capacité de nos lymphocytes à reconnaître des alloantigènes est due à une réaction croisée, la structure tridimensionnelle du CMH allogénique, associé ou non à un peptide, mimant la configuration du CMH du soi associé à un peptide étranger (CMH du soi + peptide étranger X = CMH allogénique associé ou non à un peptide Y). Cette voie d'activation, définie comme la **reconnaissance directe** des alloantigènes, joue un rôle prédominant dans le rejet d'allogreffe.

Les réactions allogéniques se différencient des réactions antigéniques classiques par leur intensité beaucoup plus forte. L'amplification de la réponse allogénique est liée à l'accroissement du recrutement lymphocytaire lors de la reconnaissance directe. En effet, alors qu'environ 1 lymphocyte/ $10^5$  ou  $10^6$  est activé lors d'une réaction antigénique simple, 1 à 10% du répertoire des lymphocytes T peuvent participer à une réaction allogénique.

La fréquence élevée des lymphocytes alloréactifs peut être expliquée par différents mécanismes. D'une part, au sein d'un même molécule du CMH allogénique, différents épitopes peuvent être reconnus directement par différents lymphocytes T. D'autre part, une molécule du CMH allogénique peut être reconnue par un lymphocyte T en association avec un peptide. Ce peptide peut être un peptide étranger ou un peptide du soi. Selon ce dernier mécanisme, la présentation par une molécule du CMH allogénique est capable de restaurer l'immunogénicité d'un grand nombre de peptides endogènes. Chacune de ces associations est reconnue spécifiquement par un lymphocyte T différent.

Enfin, il faut noter que les lymphocytes T peuvent aussi reconnaître un peptide provenant du CMH allogénique de classe I ou de classe II, en association avec une molécule du CMH du soi, de classe II principalement. Ce phénomène est appelé la **reconnaissance indirecte** des alloantigènes, par opposition à la reconnaissance directe décrite plus haut. Le grand nombre de peptides différents pouvant être générés au départ du CMH allogénique contribue à l'amplification de cette réponse.

Les deux sous-classes de lymphocytes T, CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> présentent des fonctions distinctes. C'est au cours de la maturation thymique que les cellules CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> se différencient à partir d'un précurseur commun (Bendelac 1991).

Les **lymphocytes CD8<sup>+</sup>** ou lymphocytes T cytotoxiques (CTL) reconnaissent des antigènes synthétisés dans les cellules et secondairement exprimés en association avec les molécules du CMH de classe I. Ces cellules interviennent dans les réactions contre les virus, les pathogènes intracellulaires ou le rejet d'allogreffe.

La prolifération clonale et l'activation des lymphocytes CD8<sup>+</sup> dépend de cytokines sécrétées par les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, principalement l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ . Les cellules CD8<sup>+</sup> sont capables de sécréter elles-mêmes de l'IFN- $\gamma$ .

Les **lymphocytes CD4<sup>+</sup>** ou lymphocytes auxiliaires exercent la plupart de leurs fonctions en sécrétant des cytokines. Pour que les cellules CD4<sup>+</sup> soient activées, il faut que l'antigène leur soit présenté par des cellules spécialisées ou cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CPA sont essentiellement les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B.

L'activation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs par les CPA se fait en deux étapes. Premièrement, le récepteur T reconnaît un peptide présenté par la CPA en association avec une molécule du CMH de classe II. Cette étape correspond à l'engagement du récepteur. Ensuite, la CPA fournit un signal co-stimulateur au lymphocyte T. Ces signaux secondaires peuvent être des cytokines ou dépendre de l'interaction entre des molécules accessoires présentes sur le lymphocyte et des ligands spécifiques présents sur la CPA. Parmi ces mécanismes, l'interaction entre les récepteurs lymphocytaires CD28 et les molécules B7, constitue une voie d'activation particulièrement efficace. Lorsque le récepteur T est engagé en l'absence de signal secondaire, le lymphocyte devient anergique, c'est-à-dire résistant à l'activation.

Ce sont les cellules dendritiques qui sont les CPA les plus puissantes de l'organisme. Ces cellules, distribuées dans pratiquement tous les tissus, présentent constitutivement un niveau d'expression élevé de molécules de classe II. Dans le cas d'une allogreffe cutanée, ce sont les cellules de Langerhans, cellules dendritiques de la peau, qui jouent le rôle de CPA. L'immunogénicité de la greffe et la vitesse du rejet sont directement corrélés avec la densité de cellules de Langerhans (Sena 1976). Le rejet est initié par la migration des cellules de Langerhans de la peau jusqu'aux ganglions lymphatiques de l'animal receveur où elles vont être reconnues par les lymphocytes T alloréactifs. Ainsi, la déconnection lymphatique du site receveur permet de retarder le rejet d'une greffe de peau (Barker 1968).

La distinction des fonctions des lymphocytes CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> n'est pas absolue; dans certaines conditions les lymphocytes CD8<sup>+</sup> peuvent sécréter des cytokines (Mottram 1995) et dans d'autres, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> sont capables d'une activité cytotoxique (Golding 1985 et Widmer 1981). La coopération entre les fonctions auxiliaire et cytotoxique, qu'elles soient assurées par des populations cellulaires distinctes ou non, est indispensable pour que le rejet d'une allogreffe de peau puisse se faire (Rosenberg 1992).

Le rôle relatif des lymphocytes CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> dans le rejet d'une greffe de peau dépend de la disparité antigénique entre le donneur et le receveur.

Lorsqu'il existe une disparité des antigènes du CMH de classe I uniquement, le rejet dépend des lymphocytes CD8<sup>+</sup> (Rosenberg 1986).

Par contre, en cas de disparité d'antigènes de classe II, le rejet est médié par les cellules CD4<sup>+</sup>. Dans ces combinaisons, les seules cellules exprimant constitutivement les alloantigènes de classe II au niveau de la peau sont les cellules de Langerhans. Cette population représente moins de 5% des cellules cutanées et est insuffisante pour initier le rejet de l'ensemble de la greffe. La sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules CD4<sup>+</sup> va induire l'expression d'antigènes de classe II à la surface des kératinocytes et permettre le rejet (Dallman 1983, Rosenberg 1989). La neutralisation de l'IFN- $\gamma$  retarde le rejet en cas d'incompatibilité d'antigènes de classe II, alors qu'elle n'a pas d'effet en cas de disparité d'antigènes de classe I (Rosenberg 1990).

Lorsque l'allogreffe présente une disparité portant sur les antigènes de classe I et II, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> interviennent conjointement dans le rejet.

## **2.2. Lymphocytes TH1 et TH2**

Lors d'une stimulation antigénique prolongée ou répétée, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en deux sous-populations, les lymphocytes TH1 et TH2. Il s'agit de cellules effectrices spécialisées, correspondant au dernier stade de différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup>. L'analyse de clones cellulaires chez la souris a permis de différencier ces deux sous-populations en fonction des cytokines qu'elles produisent (Mosmann 1986); les lymphocytes TH1 sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2, les lymphocytes TH2 de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10, de l'IL-13.

Les propriétés fondamentales des principales cytokines sécrétées par les cellules TH1 et TH2 sont les suivantes:

L'IL-2 est un facteur de croissance essentiel des lymphocytes T. Elle stimule la prolifération des lymphocytes TH1 et TH2 et celle des lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. L'IL-2 favorise également la prolifération et la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B.

L'IFN- $\gamma$  est un activateur puissant des macrophages. Il stimule leur activité cytotoxique, l'expression de molécule de classe II et de molécules d'adhérence à leur surface ainsi que leur sécrétion d'IL-1 et de TNF. L'IFN- $\gamma$  stimule également la

production d'IgG2a par les lymphocytes B et antagonise les effets de l'IL-4 sur ces cellules.

L'IL-4 agit principalement en activant les lymphocytes B. Elle augmente l'expression de molécules de classe II à leur surface et est à l'origine de la commutation de la synthèse d'immunoglobulines vers les isotypes IgG1 et IgE. Par ailleurs, l'IL-4 peut également influencer l'activité cytotoxique des lymphocytes CD8+. Nous reviendrons sur ce point particulier dans la suite du travail.

L'IL-5 et l'IL-6 agissent également comme facteurs de croissance des lymphocytes B. L'IL-5 induit préférentiellement la sécrétion d'IgA chez la souris. En outre, elle stimule la différenciation et la prolifération des cellules éosinophiles. L'IL-6 favorise la production d'IgG1, d'IgE et d'IgA en synergie avec l'IL-4 et l'IL-5.

L'IL-10 agit comme une cytokine suppressive. Son action s'exerce par l'intermédiaire des macrophages dont elle inhibe les fonctions de présentation d'antigènes et de co-stimulation. De cette manière, l'IL-10 contrôle certaines fonctions effectrices des lymphocytes T, des cellules tueuses naturelles (cellules NK) et des macrophages eux-mêmes. L'IL-10 inhibe notamment la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF par les macrophages. Par ailleurs, l'IL-10 peut intervenir comme facteur de croissance des thymocytes et des mastocytes. Enfin, l'IL-10 stimule les lymphocytes B; chez la souris, l'IL-10 augmente l'expression des antigènes de classe II à la surface des lymphocytes B non activés; chez l'homme, elle stimule leur prolifération et induit la production d'immunoglobulines IgM, IgG et IgA.

L'IL-10 n'est pas une cytokine spécifique des lymphocytes TH2, elle peut également être produite par des monocytes et dans certaines conditions, chez l'homme, par des clones de cellules de type TH1.

L'IL-13 partage plusieurs propriétés avec l'IL-4. En particulier, l'IL-13 active les lymphocytes B; elle favorise leur prolifération, augmente l'expression de molécules de classe II à leur surface et induit la sécrétion préférentielle d'IgE et d'IgG4. Il s'agit d'effets propres, indépendants de la présence d'IL-4. Il faut noter que ces effets ont été décrits *in vitro* chez l'homme. En outre, comme l'IL-10, l'IL-13 agit également comme facteur désactivateur des macrophages dont elle diminue les fonctions inflammatoires et cytotoxiques. L'IL-13 inhibe notamment la sécrétion macrophagique de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF et l'IL-6. L'IL-13 peut également diminuer la sécrétion d'IL-12 par les macrophages activés et, de cette façon, comme nous le verrons dans la suite du travail, favoriser la différenciation des lymphocytes TH2. Cet

effet n'est pas retrouvé lorsque les macrophages sont pré-incubés avec de l'IL-13. Enfin, contrairement à l'IL-10, l'IL-13 accroît l'expression des antigènes de classe II à la surface des macrophages et augmente leur pouvoir de présentation d'antigènes.

Ces différentes cytokines rendent compte des propriétés fonctionnelles respectives des lymphocytes TH1 et TH2. Les lymphocytes TH1 interviennent essentiellement dans les réactions immunes à médiation cellulaire comme les réactions d'hypersensibilité retardée, le rejet d'allogreffe ou la défense contre les organismes pathogènes intracellulaires. Les lymphocytes TH2 sont impliqués dans les réactions médiées par les anticorps, comme les réactions allergiques, certaines pathologies auto-immunes systémiques ou la lutte contre les pathogènes extracellulaires.

D'autres phénotypes de lymphocytes CD4+, caractérisés par des profils de cytokines différents, ont été mis en évidence: les lymphocytes TH précurseurs (pTH) et les lymphocytes TH0 (Swain 1991).

Les cellules pTH correspondent aux lymphocytes T naïfs et sécrètent essentiellement de l'IL-2, et éventuellement de faibles quantités d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  (Weinberg 1990). Chez la souris, cette population disparaît après thymectomie (Swain 1990 a). En fonction de l'environnement dans lequel il est stimulé, un même pTH peut se différencier soit en TH1, soit en TH2 (Rocken 1991).

Différentes observations, tant chez la souris (Firestein 1989, Street 1990) que chez l'homme (Paliard 1988), ont permis de démontrer qu'il existait des clones cellulaires produisant à la fois de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et de l'IL-4, correspondant au phénotype TH0. Cette population cellulaire pourrait constituer un stade intermédiaire lors de la différenciation des pTH en TH1 ou TH2 (Kamogawa 1993).

### ***Facteurs influençant la différenciation des lymphocytes TH1 et TH2***

Plusieurs facteurs tels que les cytokines, le type de cellules présentatrices d'antigène et la concentration de l'antigène influencent la différenciation des lymphocytes CD4+ en cellules TH1 ou TH2.

*In vitro*, l'importance relative de ces différents mécanismes a été étudiée soit en utilisant des cellules stimulées de façon polyclonale, soit en utilisant des souris transgéniques exprimant de façon constitutive un récepteur T reconnaissant spécifiquement un antigène de classe II déterminé. Ce dernier modèle, plus proche des conditions physiologiques, permet d'étudier la réactivité des lymphocytes T dans un contexte allospécifique.

*In vivo*, ces études ont été menées principalement dans des pathologies telles que la Leishmaniose, dans lesquelles il existe une polarité bien établie de la réponse lymphocytaire. Selon les souches, les souris vont soit développer une réponse de type TH1 leur conférant une résistance naturelle, soit une réponse de type TH2 les sensibilisant à l'infection. L'administration de cytokines recombinantes exogènes ou la neutralisation des cytokines endogènes permet d'étudier leur influence sur chaque type de réponse.

Les cytokines exercent leurs actions à différents niveaux; l'IL-4 et l'IL-12 conditionnent de façon prépondérante la différenciation des pTH en TH1 ou TH2 respectivement, alors que l'IL-10 et l'IFN- $\gamma$  interviennent surtout dans la modulation de réponses TH1 ou TH2 déjà constituées.

La présence d'IL-4 est nécessaire pour que des cellules naïves puissent se différencier en TH2 lors de stimulation polyclonale (Swain 1990 b), ou en réponse à une stimulation antigénique (Hsieh 1992, Seder 1992). Pour que l'IL-4 puisse agir, il faut qu'elle soit présente précocement. Cette action semble dépendre d'un second signal, en effet, l'IL-4 n'induit la différenciation des TH2 qu'en présence de CPA ou d'IL-2 dans le milieu (Seder 1994, Wu 1994). Réciproquement, l'IL-4 inhibe directement la différenciation des cellules TH1 (Tanaka 1993, Seder 1994). L'IL-4 peut inhiber la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  ainsi que l'expression de l'IL-2-récepteur par des lymphocytes T (Peleman 1989, Martinez 1990, Gaya 1991).

*In vivo*, dans des modèles de Leishmaniose ou d'infection à *Candida*, la neutralisation de l'IL-4 au moment de la stimulation antigénique permet d'induire une réponse de type TH1, associée dans ces conditions à la guérison de l'infection (Romani 1992, Heinzl 1989). Inversement, l'administration d'IL-4 peut induire la différenciation de lymphocytes de type TH2 et sensibiliser des souris naturellement résistantes au parasite (Chatelain 1992).

L'IL-10 agit principalement en inhibant la prolifération et la production de cytokines de lymphocytes TH1 déjà différenciés, lorsque ceux-ci sont activés par des cellules macrophagiques (Fiorentino 1991 a et b). Cette action est liée à une diminution de l'expression des molécules de classe II et des molécules B7/BB1 à la surface des macrophages (Moore 1993, Ding 1993). Par ailleurs, l'IL-10 peut indirectement favoriser la différenciation des lymphocytes TH2, notamment en augmentant l'expression des molécules de classe II et donc le pouvoir de CPA des lymphocytes B, activateurs préférentiels des TH2 (Go 1990, Fitch 1993). Enfin, l'IL-10 peut également

interférer avec la différenciation des cellules TH1 en inhibant la production d'IL-12 par les macrophages activés (D'andrea 1993).

Fonctionnellement, l'IFN- $\gamma$  inhibe la différenciation et la prolifération des cellules TH2. Cet effet n'est observé que si la concentration d'IL-4 dans le milieu est basse (Seder 1992, Gajewski 1989). Le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans la différenciation préférentielle des cellules TH1 n'est pas définitivement établi; certaines expériences semblent démontrer que l'IFN- $\gamma$  peut induire directement le développement des TH1 à partir de cellules naïves (Swain 1990 b). Cette observation n'est pas confirmée dans tous les modèles, d'autres arguments permettant de penser que l'effet de l'IFN- $\gamma$  est lié à son effet inhibiteur du développement des cellules TH2 (Seder 1992, Svetic 1993).

*In vivo*, le rôle de l'IFN- $\gamma$  est clairement démontré dans le modèle de la Leishmaniose. La neutralisation de l'IFN- $\gamma$  au moment de la stimulation antigénique induit une réponse de type TH2 et sensibilise les animaux à l'infection (Belosevic 1989, Chatelain 1992). Inversement, chez des souris susceptibles, l'administration d'IFN- $\gamma$  permet d'induire la différenciation des lymphocytes TH1 et d'assurer une protection contre la maladie (Scott 1991).

L'IL-12 est une cytokine d'origine macrophagique qui induit la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T et les cellules NK (Kobayashi 1989, Wolf 1991, Chan 1991). Des modèles utilisant des cellules provenant de souris transgéniques ont permis de démontrer que l'IL-12 favorisait directement la différenciation des cellules TH1, indépendamment de l'IFN- $\gamma$  (Hsieh 1993 a, Seder 1993). *In vivo* dans le modèle de la Leishmaniose, l'administration d'IL-12 au moment de l'infection permet d'induire une réponse de type TH1 et de protéger des souris naturellement susceptibles (Heinzel 1993).

L'IL-2 stimule la prolifération des TH1 et des TH2 mais n'influence pas directement leur différenciation. Pour que des cellules naïves puissent se différencier en TH2, il faut qu'il y ait de l'IL-2 présente (Powers 1988, Legros 1990). Le rôle de l'IL-2 dans le développement des cellules TH1 a été moins bien établi; il semble néanmoins que sa présence soit requise pour que l'IL-12 puisse induire la différenciation des TH1 (Seder J. Exp. Med. 1994-95 à rechercher).

Comme nous l'avons vu, l'IL-4 et l'IL-12 interviennent de façon déterminante dans la différenciation des TH1 et des TH2. L'orientation de la réponse immune dépendra donc de cellules capables de sécréter précocement ces cytokines lors de l'initiation de la réaction antigénique.

Les macrophages peuvent sécréter rapidement de l'IL-12 lorsqu'ils sont activés, par exemple par un pathogène intracellulaire. Outre son action directe, l'IL-12 va favoriser la différenciation des TH1 en stimulant la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK.

Les cellules responsables de la production précoce d'IL-4 ne sont pas connues avec certitude. Ce rôle pourrait dépendre de lymphocytes T particuliers, exprimant les antigènes de surface NK1.1, et capables de produire de l'IL-4 en stimulation primaire. En effet, ce sont les cellules NK1.1+ qui sont responsables de la production de taux élevés d'IL-4 lors de la stimulation de thymocytes matures ou de lymphocytes T périphériques ayant récemment émigré à partir du thymus (Bendelac 1992, Arase 1993). C'est également la fraction NK1.1+ des lymphocytes T qui est à l'origine de la production précoce d'IL-4 lors de l'administration d'anticorps anti-CD3 *in vivo* (Flamand 1990, Yoshimoto 1994).

Les mastocytes sont également capables de sécréter de l'IL-4 lorsqu'ils fixent par leur récepteur Fc des IgE ayant agrégé l'antigène. A ce titre, on peut constater que l'immunisation par voie muqueuse est souvent associée à une réponse de type TH2.

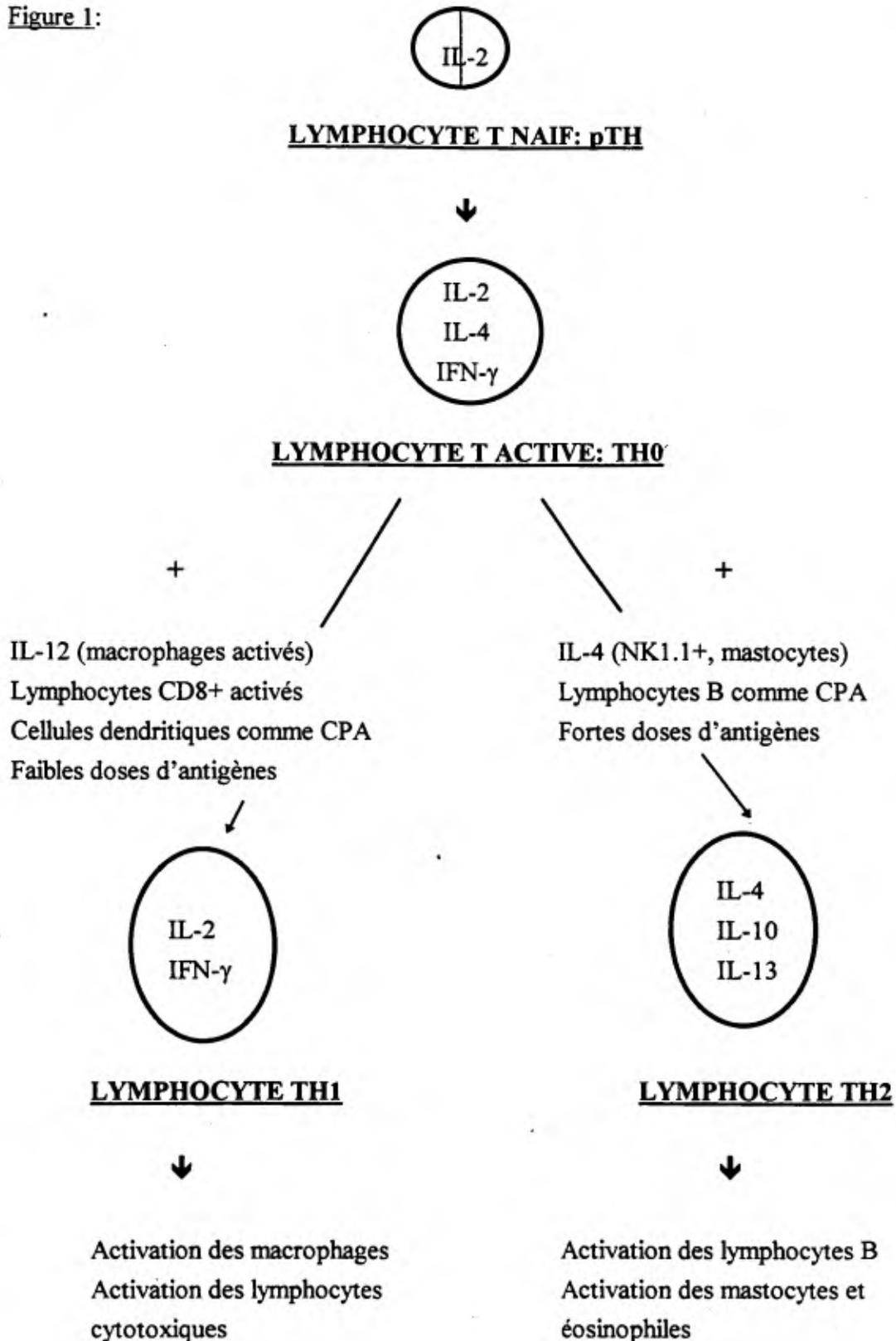
Lors d'une réponse secondaire, certains lymphocytes CD4+ de mémoire peuvent sécréter suffisamment d'IL-4 pour induire la différenciation de lymphocytes TH2 (Gollob 1994).

La nature des CPA peut également influencer la différenciation des cellules TH1 et TH2. Les lymphocytes B favorisent le développement des TH2, alors que les macrophages et les cellules dendritiques induisent plutôt la prolifération des TH1 (Fitch 1993). Par ailleurs, les CPA peuvent exercer une influence en fonction des signaux co-stimulateurs qu'ils fournissent aux lymphocytes T. L'interaction CD28-B7 semble induire préférentiellement les réponses de type TH1 (Fraser 1991, Sayegh 1995). **cf. différences B7-1 et B7-2.**

Enfin, au sein d'une même souche de souris, un même antigène peut induire la différenciation de TH1 ou TH2 en fonction de sa concentration. Différents travaux, utilisant un antigène provenant de la salmonelle (Parish 1972) ou dans le modèle de la Leishmaniose (Bretscher 1992), ont montré que l'immunisation par des faibles doses d'antigène induisait une réaction de type TH1, alors que l'exposition à des doses élevées lors de la stimulation primaire favorisait une réponse de type TH2. Confirmant ces observations, des études récentes ont démontré que la stimulation antigénique continue ou répétée de lymphocytes CD4+ naïfs pouvait induire la sécrétion de taux suffisants d'IL-4 pour favoriser la différenciation de lymphocytes TH2 (Croft 1995).

Les facteurs intervenant dans la différenciation des lymphocytes TH1 et TH2 sont résumés dans la Figure 1.

Figure 1:



### ***Implication de lymphocytes TH1 et TH2 dans le rejet d'allogreffe***

L'implication des **lymphocytes TH1** dans le rejet est bien établie. La présence de cellules de phénotype TH1 au sein d'allogreffes en cours du rejet a été démontrée dans de nombreuses situations expérimentales et cliniques, notamment lors de greffes cardiaques ou hépatiques chez la souris (Dallman 1992, Thai 1995) et dans des greffons rénaux chez l'homme (Benvenuto 1991). Parallèlement, l'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisant les cytokines produites par les lymphocytes TH1, l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-2, permet de prévenir ou de retarder le rejet d'allogreffe cardiaque ou de peau chez la souris (Kirkman 1985, Rosenberg 1990). Les lymphocytes TH1 interviennent également dans d'autres réactions inflammatoires à médiation cellulaire; en particulier, des clones de cellules TH1 sont capables de médier des réactions d'hypersensibilité retardée (Cher 1987, Müller 1993).

L'IFN- $\gamma$  est un médiateur essentiel de l'action des cellules TH1 dans le rejet d'allogreffe. D'une part, il active des mécanismes spécifiques en stimulant la différenciation et la prolifération des lymphocytes CD8<sup>+</sup> alloréactifs. D'autre part, il favorise des réactions inflammatoires non spécifiques, notamment par son action sur les macrophages décrite précédemment, mais aussi en augmentant l'expression de molécules d'adhérence, en particulier de l'ICAM-1, à la surface des cellules endothéliales (Dustin 1986). L'IFN- $\gamma$  augmente également l'expression des molécules du CMH de classe II à la surface de cellules n'en possédant pas à l'état normal, ce qui contribue à entretenir et amplifier la réaction allogénique (Rosenberg 1989). Enfin, l'IFN- $\gamma$  stimule la sécrétion par les lymphocytes B d'immunoglobulines d'isotype IgG2a qui participent à la cytotoxicité à médiation cellulaire ("ADCC", pour antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) (Finkelman 1990).

L'IL-2 favorise également le rejet d'allogreffe en stimulant de façon autocrine la prolifération des lymphocytes TH1 et en activant les lymphocytes CD8<sup>+</sup> allospécifiques. Le rôle de l'IL-2 est illustré dans certains modèles d'induction de tolérance de transplantation dans lesquels l'administration d'IL-2 recombinante rétablit la réaction de rejet (Dallman 1991a).

Dans de nombreux modèles expérimentaux, l'induction de tolérance de transplantation est associée à une différenciation préférentielle des **lymphocytes TH2** et à une inhibition sélective des cellules TH1 (Dallmann 1992, Takeuchi 1992, Gorczyński 1994a, Mottram 1995, Sayegh 1995, Akalin 1995). Dans les protocoles particuliers d'immunisation par voie orale ou intra-portale, l'induction de tolérance peut être

prévenue par l'administration d'anticorps neutralisant l'IL-4 (Burstein 1993) ou l'IL-10 (Gorczyński 1994b). De façon inconstante, l'administration directe de cytokines recombinantes de type TH2 peut favoriser la survie d'allogreffe: l'administration d'IL-4 peut prolonger la survie de greffes cardiaques chez la souris (Dallman 1994) et le rat (Papp 1993, Levy 1995). L'IL-10, à certaines concentrations et en association avec un anticorps anti-CD3, peut avoir une action similaire (Konieczny 1994).

D'autres conditions expérimentales démontrent cependant que les lymphocytes TH2 et les cytokines qu'ils sécrètent peuvent être associés au rejet d'allogreffe ou à des mécanismes y contribuant. En transplantation rénale, certaines équipes ont décrit une corrélation positive entre le rejet et l'expression de l'ARN messager codant pour l'IL-10 (Xu 1995). Chez la souris, on peut également observer une accumulation des ARN messagers codant pour l'IL-4 dans des allogreffes en cours de rejet (Dallman 1991b, Wang 1991). Enfin, des clones de cellules TH2 sont capables de médier une réaction d'hypersensibilité retardée (Müller 1993) ou de sécréter des enzymes cytolytiques comme la perforine (Lancki 1991).

Les effets contradictoires des cellules TH2 dans le rejet peuvent être, en partie, dépendants de l'action de l'IL-4. En effet, en fonction des conditions, l'IL-4 peut moduler de façon opposée l'activité des cellules cytotoxiques. Lorsqu'elle est présente à l'initiation de la réponse allogénique, l'IL-4 inhibe la différenciation et la prolifération des cellules cytotoxiques, lymphocytes T (CTL) et cellules LAK (lymphokine activated killer cell), induite par l'IL-2 (Widmer 1987a). L'IL-4 peut également induire la transformation des cellules CD8<sup>+</sup> en cellules CD4-CD8<sup>-</sup>, dépourvues d'activité cytolytique et sécrétant des cytokines de type TH2 (Erard 1993). Par contre, lorsqu'elle intervient plus tardivement, l'IL-4 stimule la différenciation et la prolifération des CTL allospécifiques (Widmer 1987a, 1987b). Il s'agit d'un effet direct sur les cellules CD8<sup>+</sup>, indépendant de l'IL-2. L'IL-4 peut également moduler de façon sélective l'activité d'enzymes cytotoxiques présents dans les lymphocytes CD8<sup>+</sup>. L'IL-4 est capable d'inhiber l'expression de l'ARN messager codant pour la perforine (Erard 1993), alors que dans les conditions où elle stimule la cytotoxicité, elle augmente l'expression de la sérine-estérase au sein des CTL (Trenn 1988). L'IL-4 peut également favoriser le rejet par d'autres mécanismes, notamment en augmentant l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (Masinovsky 1990, Schleimer 1992) ou ICAM-1 sur les cellules endothéliales (Piela Smith 1992).

Enfin, l'IL-4 stimule la production d'immunoglobulines d'isotypes IgE et IgG1 qui, à l'inverse des IgG2a, n'activent pas le complément et ne participent pas à l'ADCC mais pourraient néanmoins intervenir dans certaines formes de rejet chronique (Chan 1995).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'**IL-10** peut intervenir comme cytokine anti-inflammatoire. Outre son action sur la fonction de présentation d'antigène, l'**IL-10** inhibe la production macrophagique de cytokines inflammatoires, telles que l'**IL-1**, l'**IL-6**, l'**IL-8**, l'**IL-12**, le **TNF** et l'oxyde nitrique (de Waal Malefyt 1992, Gazzinelli 1992). Dans certaines conditions cependant, l'**IL-10** peut être associée à une augmentation du recrutement des cellules inflammatoires (Wogensen 1993); cet effet pourrait dépendre de l'induction d'antigènes de classe II et de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. Par ailleurs, dans certaines conditions, l'**IL-10** favorise la différenciation de lymphocytes **CD8+** cytotoxiques à partir de leurs précurseurs thymiques (Chen 1991). Dans la plupart des modèles, l'**IL-10** est incapable de prévenir le rejet d'allogreffe. Ceci pourrait être dû à l'incapacité relative de l'**IL-10** d'interférer avec l'activation des lymphocytes T naïfs par les cellules dendritiques (Macatonia 1993).

En conclusion, la redondance entre certains effets des cytokines de type **TH1** et **TH2** et la multitude d'effets, parfois opposés, de chacune de ces cytokines suggèrent que le rejet ou la tolérance d'une allogreffe n'est pas simplement dépendant de la polarité **TH1** ou **TH2** de la réponse immune.

Dans la plupart des cas néanmoins, il existe une association entre le rejet d'allogreffe et la présence de cellules **TH1** d'une part, et l'induction de tolérance et la différenciation préférentielle des cellules **TH2** d'autre part.

Le rôle effecteur des cellules **TH1** lors du rejet a été largement documenté.

Les cellules **TH2** sont certainement moins efficaces que les **TH1** pour médier le rejet aigu; toutefois leur rôle actif dans l'induction et le maintien de la tolérance n'a pas été clairement établi. Comme il existe une régulation croisée entre les deux sous-populations **TH1** et **TH2**, le rôle tolérogène des lymphocytes **TH2** pourrait être essentiellement lié à leur action inhibitrice sur les **TH1**.

## **2.2. Lymphocytes T du nouveau-né**

Chez la souris, les lymphocytes T périphériques du nouveau-né présentent des caractéristiques qui les différencient fondamentalement de ceux d'un animal adulte. En stimulation *in vitro*, comparés à des cellules adultes naïves, les lymphocytes T du nouveau-né sécrètent des quantités accrues d'IL-4 mais peu d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Adkins 1993). La sécrétion préférentielle d'IL-4 est limitée à la période néonatale immédiate. Par contre, le défaut de production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  persiste jusqu'à la sixième semaine (Argyris 1985, Adkins 1993). Il existe donc une période prolongée d'hyporéactivité pendant laquelle les lymphocytes T ne sécrètent ni IL-4 ni IL-2 ou IFN- $\gamma$  lorsqu'ils sont stimulés. Cette période correspond à celle au cours de laquelle l'injection de cellules allogéniques n'induit ni tolérance, ni immunisation (Billingham 1953).

Le défaut de production d'IL-2 et de prolifération en réponse primaire existe également lors d'une réponse secondaire (Adkins 1994).

Le déficit de production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les cellules CD4<sup>+</sup> du nouveau-né correspond à un double phénomène; il s'agit d'une part d'un défaut de réponse du lymphocyte T lui-même et d'autre part, d'une action inhibitrice directe de l'IL-4 (Adkins 1993). Ce dernier mécanisme n'intervient que durant la période néonatale précoce.

Plusieurs observations expérimentales suggèrent que les caractéristiques de la réponse immune néonatale pourrait dépendre de la coopération entre les cellules accessoires présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T. Lorsque la stimulation se fait de manière indépendante des CPA, par exemple en utilisant un anticorps anti-CD3 fixé, il persiste un défaut de production d'IL-2 mais l'hyperproduction d'IL-4 n'apparaît plus (Adkins 1992). En outre, lorsque les lymphocytes T du nouveau-né sont stimulés indépendamment de leur récepteur, par l'association PMA-Calcium ionophore, ils se comportent comme des cellules adultes (Adkins 1992).

Nous avons vu que le signal secondaire induit par l'interaction CD28-B7 favorise la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . Durant la période néonatale, cette voie de co-stimulation pourrait être spécifiquement inefficace. En effet, l'utilisation d'un anticorps liant la molécule CD28 à la surface des lymphocytes T corrige le défaut de prolifération et de production d'IL-2 observé lors de culture primaire (Adkins 1994).

Chez le nouveau-né, la totalité des lymphocytes T présents en périphérie est constituée par les cellules ayant émigré récemment depuis le thymus, alors que cette population ne représente qu'une fraction limitée des cellules T périphériques de l'adulte. Chez les souris adultes, les précurseurs thymiques matures prêts à l'exportation sécrètent également des quantités élevées d'IL-4 et peu d'IL-2 (Bendelac 1991 et 1993).

Néanmoins, contrairement aux lymphocytes périphériques du nouveau-né, ces cellules produisent également de l'IL-5 et de l'IFN- $\gamma$  en stimulation polyclonale (Bendelac 1991). Ce profil sécrétoire particulier s'apparente à celui de lymphocytes CD4+ récemment activés, de phénotype TH0. Ceci pourrait être la conséquence du processus de sélection positive au sein du thymus qui comprend une étape de stimulation par le récepteur T (Bendelac 1991).

Comme nous l'avons vu, parmi les thymocytes matures CD4+, ce sont les cellules NK1.1+ qui sont responsables de la sécrétion d'IL-4 ( Arase 1993, Yoshimoto 1994).

Lors de leur exportation vers les organes lymphoïdes périphériques, les cellules CD4+ perdent progressivement la capacité de sécréter de l'IL-4 et acquièrent le phénotype de lymphocytes de repos (pTH) c'est-à-dire sécrétant essentiellement de l'IL-2 (Bendelac 1993). Ce processus de maturation post-thymique dure 3 à 6 jours.

Les thymocytes matures et les lymphocytes T périphériques du nouveau-né ont comme caractéristique commune de sécréter des taux élevés d'IL-4. Ces deux populations cellulaires ne sont cependant pas identiques, les thymocytes matures étant capables de produire des quantités significatives d'IFN- $\gamma$  en stimulation polyclonale (Bendelac 1991). D'autres phénomènes que la proportion élevée d'immigrants thymiques récents pourraient dès lors contribuer à établir la spécificité de la réactivité des lymphocytes du nouveau-né.

La maturation intrathymique et l'exportation vers la périphérie des cellules T est un processus qui dure 4 à 6 jours (Shortman 1991). Ceci signifie que les lymphocytes T périphériques du nouveau-né proviennent de précurseurs thymiques foetaux. Ces dernières cellules présentent des caractéristiques différentes de celles des thymocytes de l'adulte (Bendelac 1991, Adkins 1991).

Par ailleurs, la maturation intrathymique se fait dans un environnement particulier, le tissu thymique lui-même étant l'objet d'un processus de maturation qui se poursuit au cours de la période néonatale (Adkins 1988, Smith 1989, Surh 1993).

Il faut noter également, que chez l'adulte, des lymphocytes activés dans les organes lymphoïdes périphériques peuvent être secondairement exportés vers le thymus. Cette fraction cellulaire particulière pourrait contribuer à la sécrétion de taux élevés d'IL-4 au sein du thymus.

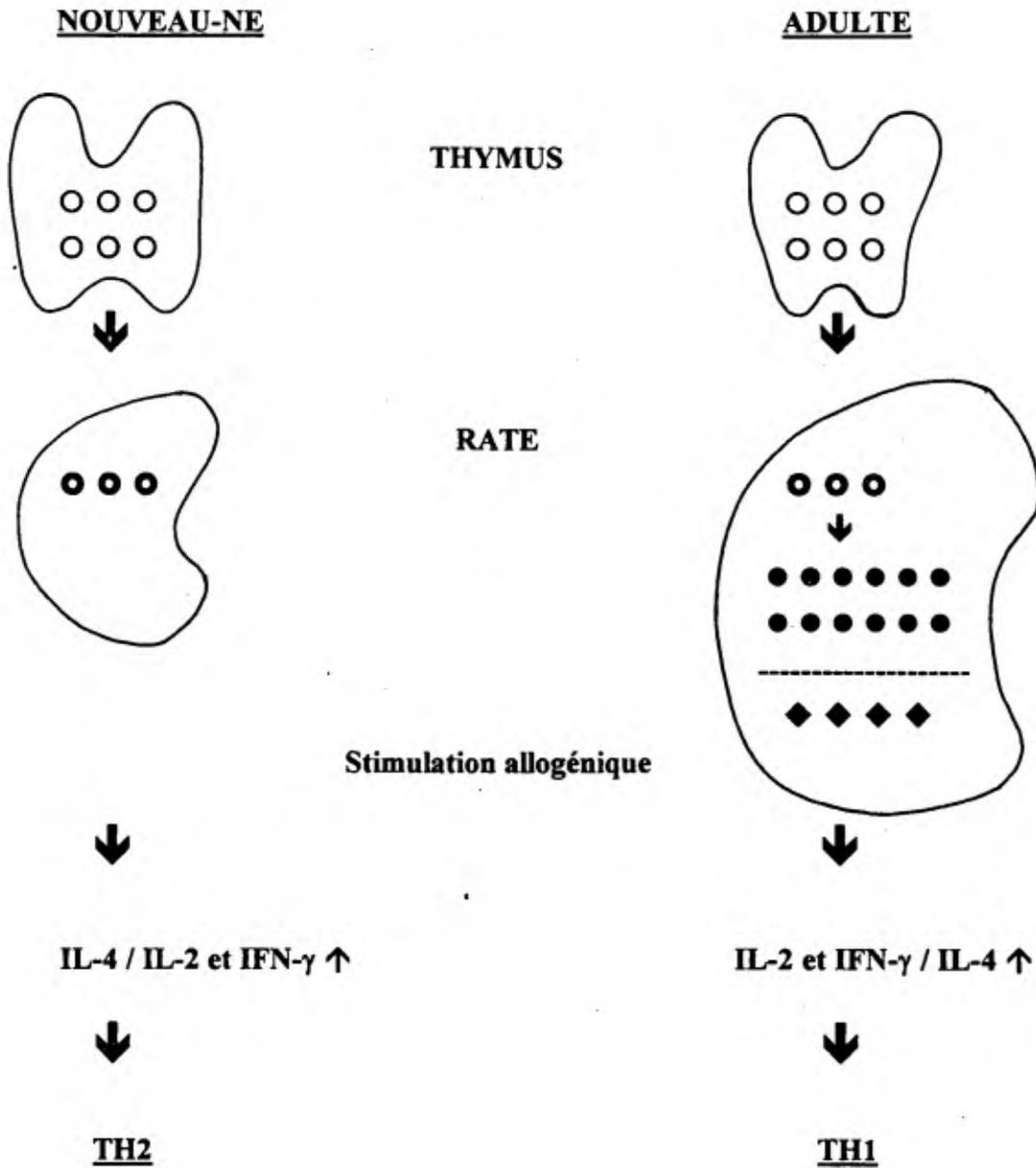
Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, la fonction de présentation d'antigène peut être altérée de façon spécifique durant la période néonatale. Chez la souris, les cellules macrophagiques de nouveau-né activent moins efficacement les lymphocytes T que celles d'animaux adultes (Lu 1980). Ce défaut, associé au déficit de

co-stimulation par la voie CD28/B7, pourrait contribuer à l'inhibition globale des réponses de type TH1 observée durant la période néonatale.

Le profil sécrétoire des lymphocytes présents en périphérie au moment de la stimulation antigénique va déterminer l'orientation de la réponse immune. Chez le nouveau-né, la sécrétion de taux élevés d'IL-4 va induire la différenciation préférentielle de lymphocytes TH2. Chez l'adulte par contre, la sécrétion d'IL-2 par les pTH et d'IFN- $\gamma$  par les cellules CD8<sup>+</sup> va favoriser la différenciation de cellules TH1.

Les caractéristiques comparées des lymphocytes du nouveau-né et de l'adulte sont résumées dans la figure 2.

Figure 2:



<u>Cellules</u>	<u>Cytokines s<span>é</span>cr<span>é</span>t<span>é</span>es</u>
○ Thymocytes matures CD4+	IL-4 $\uparrow$ , IL-2 et IFN- $\gamma$
● Immigrants thymiques CD4+	IL-4 $\uparrow$
● pTH	IL-2 $\uparrow$
◆ CD8+	IFN- $\gamma$ $\uparrow$

### **3. MECANISMES INTERVENANT DANS L'INDUCTION DE LA TOLERANCE NEONATALE**

La délétion clonale de l'ensemble des cellules alloréactives a longtemps été considérée comme le mécanisme exclusif intervenant dans l'induction néonatale de tolérance aux alloantigènes. De cette manière, en accord avec le principe formulé par Burnet, la tolérance néonatale était considérée comme une forme étendue de tolérance aux antigènes du soi (Burnet 1959). Un des arguments fondamentaux supportant initialement cette hypothèse était le fait que le transfert de cellules syngéniques provenant d'animaux naïfs permettait d'abolir la tolérance (Billingham 1953).

C'est le développement des techniques de culture cellulaire et la découverte des superantigènes endogènes qui ont permis de mieux comprendre les différents mécanismes intervenant dans l'induction et le maintien de la tolérance. Dans la plupart des modèles, il s'agit d'un processus complexe associant des phénomènes de délétion clonale, d'anergie et de suppression.

#### **3.1. Délétion clonale**

Les concepts actuels concernant les phénomènes de délétion clonale lors de l'induction néonatale de tolérance aux alloantigènes proviennent de l'extrapolation d'observations faites dans des modèles utilisant les superantigènes.

Les superantigènes se lient spécifiquement à certaines des chaînes bêta ( $v\beta$ ) du récepteur des lymphocytes T. De cette manière, ils sont capables de stimuler 5 à 20% du répertoire des lymphocytes T alors que les antigènes conventionnels ne sont reconnus que par  $1/10^5$  à  $1/10^6$  des lymphocytes T. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre certains récepteurs  $v\beta$  permet d'identifier des lymphocytes T de spécificité antigénique déterminée, sans avoir recours à des tests fonctionnels. La visualisation directe de ces lymphocytes permet de différencier les phénomènes de délétion et d'anergie.

Les superantigènes peuvent être des produits endogènes, exprimés durant l'ontogénèse comme des antigènes du soi (antigènes du système Mls ou minor lymphocyte-stimulating locus) (Acha-Orbea 1991). L'absence de visualisation de cellules portant un certain récepteur  $v\beta$  chez les souris exprimant constitutivement l'antigène Mls correspondant a permis de confirmer l'hypothèse de la délétion clonale des

lymphocytes T autoréactifs au cours de l'ontogénèse (Kappler 1987 et 1988, Mc Donald 1988 a, Bill 1989). Cette sélection négative se fait dans le thymus, au stade des thymocytes immatures CD4+8+, selon un processus de mort cellulaire programmée ou apoptose. Des expériences sur des souris thymectomisées indiquent que des phénomènes de sélection négative peuvent également avoir lieu en périphérie (Webb cell 1990).

De façon similaire, la délétion clonale peut intervenir lors de l'établissement de la tolérance néonatale. En effet, l'injection néonatale de cellules présentant une disparité isolée d'antigène du système Mls induit la délétion clonale des lymphocytes T alloréactifs exprimant le récepteur  $v\beta$  correspondant (Mc Donald 1988 b, Eto 1991). Cette délétion se produit dans le thymus, au stade CD4+8+ et concerne donc les lymphocytes auxiliaires et cytotoxiques. Il s'agit bien de délétion et non pas d'une simple modulation puisque la culture à long terme de thymocytes matures en présence de différents stimuli ne permet pas la réexpression du récepteur (Mc Donald 1988 b).

Les mêmes phénomènes peuvent intervenir dans l'induction de tolérance vis-à-vis d'antigènes du CMH.

En cas de disparité d'antigènes de classe I, la technique des dilutions limites a permis de démontrer chez les animaux tolérants, une réduction très importante de la fréquence des précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques (pCTL) et des lymphocytes T auxiliaires sécrétant de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  (Nossal 1981, Mc Carthy 1983 a, Feng 1983, Wood 1987 a). Dans cette combinaison, l'absence de cytotoxicité à l'égard des cellules du donneur ne se retrouve pas dans des co-cultures avec des cellules provenant de souris naïves et n'est donc pas due à un phénomène de suppression (Mc Carthy 1983 a). Ces expériences ne permettent toutefois pas de différencier la délétion clonale de l'anergie.

Par ailleurs, selon des phénomènes encore incomplètement compris, la réactivité vis-à-vis de certains antigènes de classe II (Ie) peut être associée à l'expression de récepteurs  $v\beta$  particuliers ( $v\beta$  5 et  $v\beta$  11) à la surface des lymphocytes T. L'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant directement ces récepteurs a permis de démontrer que l'injection néonatale de cellules présentant une disparité d'antigène de classe II de ce type induisait également une délétion clonale précoce des cellules exprimant le récepteur  $v\beta$  correspondant (Ruiz 1993).

Il existe une relation étroite entre la délétion clonale des cellules alloréactives et l'établissement du chimérisme thymique, ces deux événements étant contemporains lors de l'administration néonatale des cellules allogéniques (Wood 1982, Streilein 1991 b).

La pénétration des cellules allogéniques dans le thymus est un phénomène spécifique de la période néonatale. Chez la souris, il existe très peu de cellules alloréactives dans les organes lymphoïdes périphériques au moment de la naissance (Wood 1982); les cellules allogéniques vont donc pouvoir circuler et parvenir au thymus. D'autre part, le thymus du nouveau-né présente une perméabilité élevée aux cellules circulantes, supérieure à celle observée à l'âge adulte (Eto 1990). Au sein du thymus, la capacité des cellules chimériques à induire la délétion clonale des cellules alloréactives dépend d'interactions étroites entre ces deux types cellulaires. La neutralisation de signaux co-stimulateurs au moment de la reconnaissance allogénique inhibe la délétion clonale des lymphocytes cytotoxiques anti-donneurs et l'induction de chimérisme (Schurmans 1994).

### **3.2. Anergie clonale**

Dans plusieurs modèles, l'induction néonatale de tolérance est accompagnée de la persistance de cellules allospécifiques. Ces cellules sont incapables d'induire le rejet d'une allogreffe et, en l'absence des mécanismes suppresseurs, elles peuvent être considérées comme anergiques. *In vitro*, ces cellules sont incapables de proliférer et de sécréter de l'IL-2 en présence de l'alloantigène (Speiser 1991, Holan 1992).

L'anergie peut affecter plus spécialement certaines populations ou sous-populations cellulaires. Dans ces conditions, la mise en évidence du défaut fonctionnel dépendra du test expérimental utilisé.

Comme nous l'avons vu, en cas de disparité d'antigène du CMH de classe I, la plupart des lymphocytes cytotoxiques allospécifiques sont éliminés dans le thymus. Néanmoins, il peut persister un petit nombre de cellules cytotoxiques alloréactives résiduelles. Ces cellules sont toutefois anergiques; elles prolifèrent faiblement en présence des cellules de type donneur et ont un pouvoir cytolytique réduit (Wood 1987 b). L'activité réduite de ces cellules et le fait qu'elles aient échappé à la délétion clonale provient probablement de leur faible avidité/affinité pour les cellules tolérogènes.

Des phénomènes similaires pourraient intervenir dans des modèles d'histoincompatibilité d'antigènes de classe II (Matriano 1994b).

Certaines fonctions des lymphocytes auxiliaires peuvent également être spécifiquement inactivées. Dans plusieurs combinaisons dans lesquelles il existe une incompatibilité d'antigènes de classe II, associées ou non à une incompatibilité d'antigènes de classe I, des cellules CD4+ alloréactives peuvent échapper à l'induction de tolérance.

Les cellules alloréactives persistantes chez ces animaux présentent un profil de type TH2; en effet, stimulées en culture mixte, elles sécrètent préférentiellement de l'IL-4 et de l'IL-10 et peu d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Mohler 1989 a, Powell 1990, Abramowicz 1990 a et b, Kramar 1993, Chen 1995). Des expériences de dilutions limites démontrent que ce profil particulier est bien lié à l'expansion préférentielle de cellules de type TH2 (Powell 1990).

Le rôle des lymphocytes alloréactifs de type TH2 dans l'induction et le maintien de la tolérance dans ces modèles n'est pas établi. Des expériences récentes du groupe de Streilein suggèrent qu'ils pourraient intervenir dans la suppression des fonctions cytotoxiques à l'égard des cellules du donneur (Matriano 1994 a).

Enfin, il faut remarquer que l'anergie observée *in vitro* n'est pas nécessairement le reflet d'un état de tolérance *in vivo*. Dans plusieurs modèles, il existe une dissociation entre ces deux phénomènes, des animaux étant capables de rejeter une allogreffe alors que leurs cellules allospécifiques sont anergiques en culture mixte (Streilein 1989, Ruiz 1995).

### **3.3. Suppression**

Plusieurs travaux ont documenté le rôle de phénomènes supprimeurs dans l'induction de tolérance néonatale, en particulier dans les combinaisons dans lesquelles la délétion clonale intervient le moins, c'est-à-dire en cas de disparité d'antigènes du CMH de classe II. Les démonstrations les plus convaincantes des phénomènes de suppression active ont été apportées par les expériences de transfert adoptif de la tolérance *in vivo*. En effet, dans certaines combinaisons, l'infusion de cellules provenant d'animaux tolérants permet de prévenir ou de retarder le rejet d'une greffe de peau chez des souris syngéniques naïves (Gruchalla 1983, Streilein 1991 b, Gorczynski 1979). Le même phénomène a été décrit chez le rat, dans un modèle similaire de tolérance néonatale (Dorsch 1982). Le transfert de cellules provenant d'animaux tolérants peut également inhiber une réaction d'hypersensibilité retardée induite par l'injection de cellules du donneur à des animaux sensibilisés (Streilein 1989).

*In vitro*, le défaut de cytotoxicité observé chez les animaux tolérants peut également être transféré à des cellules provenant d'animaux naïfs (Heeg 1985, Powell 1991, Matriano 1994).

Les mécanismes intervenant dans la suppression de l'alloréactivité ne sont pas clairement identifiés.

La suppression pourrait dépendre d'une réaction anti-idiotypique, c'est-à-dire une réaction dirigée spécifiquement à l'encontre des cellules alloréactives ou du couple formé par les cellules alloréactives et l'alloantigène (Roser 1989). En effet, les cellules provenant d'un animal tolérant perdent leur pouvoir suppresseur lorsqu'elles sont pré-incubées avec des cellules alloréactives fixées, provenant d'un animal naïf sensibilisé contre l'alloantigène (Stockinger 1984). De plus, l'injection répétée d'un petit nombre de cellules alloréactives provenant d'un animal naïf augmente le pouvoir suppresseur des animaux tolérants (Dorsch 1982). Ce phénomène pourrait être lié à l'expansion des cellules anti-idiotypiques.

Comme nous l'avons vu, dans certains modèles de tolérance aux antigènes de classe II, la suppression des fonctions cytotoxiques dépend de cellules CD4+ allospécifiques (Matriano 1994 a). D'autres travaux chez le rat ont confirmé le rôle possible des cellules CD4+ en montrant que la déplétion de ces cellules inhibait le pouvoir suppresseur d'un inoculum provenant d'un animal tolérant (Roser 1989).

Enfin, des facteurs sériques, probablement des anticorps, peuvent également contribuer aux mécanismes de suppression observés dans la tolérance néonatale. Ce phénomène est défini comme la facilitation. *In vitro*, le sérum de souris tolérantes peut inhiber la cytotoxicité anti-donneur de cellules naïves (Gorczynski 1979 a, Brent 1972). L'administration *in vivo* de ces sérums favorise également la croissance d'une tumeur allogénique (Voisin 1972). Il s'agit d'une action allospécifique, le sérum d'animaux tolérants est capable de diminuer la réaction de GVH induite par l'injection de cellules de la souche receveuse à une souris semi-allogénique de souche parentale (Voisin 1972).

Le rôle particulier des anticorps dans le maintien de la tolérance n'est pas connu. Il faut noter que les animaux tolérants sécrètent préférentiellement des anticorps d'isotypes IgG1 et IgA, non cytotoxiques et ne fixant pas le complément (Voisin 1972). En comparaison, des souris témoins immunisées sécrètent surtout des anticorps cytotoxiques IgG2 et IgM. Les immunoglobulines circulantes chez les souris tolérantes pourraient intervenir comme anticorps bloquants.

Toutefois, les anticorps ne semblent intervenir dans la tolérance de transplantation qu'en association avec d'autres mécanismes; en effet, l'injection de serum d'animaux tolérants ne permet pas de prolonger la survie d'une greffe de peau (Brent 1972).

En conclusion, plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'induction néonatale de tolérance aux alloantigènes. Ces mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent se succéder ou être associés. Le phénomène prédominant dépendra de nombreux facteurs tels que le terrain génétique des souris receveuses, la nature des

disparités antigéniques, l'âge auquel les souris sont testées, le nombre et le type de cellules injectées ainsi que la voie d'administration.

Chez les souris tolérantes aux antigènes de classe I, la délétion clonale des cellules alloréactives intervient prioritairement. Par contre, l'anergie clonale et la suppression jouent un rôle essentiel dans l'induction de la tolérance aux antigènes de classe II.

Indépendamment des mécanismes impliqués, la persistance du chimérisme intervient dans le maintien de la tolérance. Chez les animaux adultes tolérants, l'élimination des cellules du donneur par des alloanticorps spécifiques (Harris 1973, Lubaroff 1973) ou par l'infusion de splénocytes syngéniques provenant d'animaux naïfs (Wren 1993) permet de restaurer le rejet d'une greffe de peau donneur-spécifique

#### **4. IMMUNOPATHOLOGIE ASSOCIEE A LA TOLERANCE**

Parallèlement à la tolérance, l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques peut induire un syndrome auto-immun ressemblant au lupus érythémateux disséminé et caractérisé par une lymphosplénomégalie, une anémie hémolytique, une thrombocytopenie, une hypergammaglobulinémie et le dépôt de complexes immuns au niveau du rein, de la peau et des plexus choroïdes (Goldman 1983). Certaines de ces manifestations pathologiques étaient déjà observées par Medawar et ses collaborateurs lors de leurs premiers travaux (Billingham 1956); ces auteurs rapportaient également que l'intensité de la pathologie variait considérablement en fonction des souches de souris utilisées. Le plus souvent, ce syndrome se présente sous une forme chronique, éventuellement associée à une mortalité tardive (Hard 1970).

L'hypergammaglobulinémie concerne l'ensemble des isotypes avec une prédominance des IgG1 et des IgE (Voisin 1972, Hard 1975, Goldman 1988). Le même profil isotypique se retrouve au niveau des anticorps déposés dans le rein (Florquin 1991).

Les auto-anticorps retrouvés chez les souris tolérantes peuvent appartenir à différentes catégories: anticorps anti-nucléaire, anti-thymocyte, anti-SSDNA et facteur rhumatoïde (Goldman 1983). La glomérulonéphrite est associée à la production d'anticorps dirigés contre des constituants de la membrane basale, notamment des anticorps anti-laminine et anti-collagène de type IV (Florquin 1991).

Le développement de la pathologie chez les souris injectées à la naissance est étroitement corrélé à l'induction de chimérisme (Luzuy 1986, Abramowicz 1987). Dans les conditions dans lesquelles l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques n'induit pas de chimérisme, on n'observe pas d'immunopathologie (Gonzalez 1995, Schurmans 1994). De la même façon, l'accroissement du nombre de cellules injectées à la naissance augmente l'intensité de la pathologie (Abramowicz 1987). Enfin, dans certaines combinaisons, la disparition progressive du chimérisme est corrélée avec le contrôle spontané de la pathologie (de la Hera 1992).

L'apparition d'un syndrome auto-immun chez les animaux chimériques dépend de l'interaction spécifique entre les lymphocytes B du donneur, injectés à la naissance, et les lymphocytes T alloréactifs du receveur. En effet, comme nous l'avons vu précédemment dans les modèles de tolérance aux antigènes de classe II, des lymphocytes T CD4+alloréactifs peuvent échapper à l'induction de tolérance. Ces lymphocytes alloréactifs sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-10 lorsqu'ils sont en présence des cellules du donneur, en culture mixte.

Le rôle des lymphocytes T du receveur dans le développement du syndrome auto-immun a été démontré dans plusieurs études. Notamment, l'induction de tolérance par l'injection de cellules semi-allogéniques à des souris athymiques, ne possédant pas de lymphocytes T, n'induit pas de pathologie. Par contre, la reconstitution de ces souris par des cellules CD4<sup>+</sup> syngéniques entraîne l'apparition de l'ensemble des stigmates d'auto-immunité observés chez les souris euthymiques (Merino 1989). D'une façon similaire, l'administration d'un anticorps anti-CD4, après l'injection néonatale des cellules du donneur, prévient l'apparition de la pathologie (Merino 1987). Par ailleurs, *in vitro*, la lyse spécifique des cellules CD4<sup>+</sup> du donneur abolit l'hyperproduction d'immunoglobulines observée lors de la culture de cellules spléniques provenant d'animaux chimériques (Abramowicz 1990 b).

Différentes expériences ont démontré que ce sont bien les lymphocytes B du donneur qui interviennent principalement dans la surproduction d'anticorps. *In vivo*, les auto-anticorps sont porteurs de l'allotype de la souche donneuse (Goldman 1983 et 1988, Merino 1989). Chez les animaux présentant une limitation spontanée de la pathologie associée à la perte du chimérisme, la ré-injection de cellules B du donneur permet la ré-activation du syndrome auto-immun (de la Hera 1992). Enfin, en culture, la lyse des cellules du donneur inhibe l'hyperproduction d'immunoglobulines (Goldman 1988).

Les immunoglobulines appartenant aux isotypes IgE et IgG1 sont particulièrement élevées chez les animaux chimériques. Ceci suggère que l'IL-4 sécrétée en culture mixte par les lymphocytes alloréactifs (Abramowicz 1990 a) pourrait intervenir préférentiellement dans la stimulation polyclonale des lymphocytes B. Plusieurs études confirment le rôle de cette cytokine. *In vivo*, la neutralisation précoce de l'IL-4 après l'injection néonatale des cellules semi-allogéniques inhibe l'hyperproduction d'IgE et d'IgG1 mesurée dans le sérum d'animaux âgés de deux ou trois semaines (Schurmans 1990). Ce traitement permet également de diminuer l'importance de la splénomégalie et de prévenir le dépôt d'immunoglobulines au niveau du rein (Schurmans 1990, Takai 1993). Ces résultats sont confirmés en culture, où la présence d'un anticorps monoclonal anti-IL-4, réduit la production d'IgG1 par les lymphocytes B du donneur (Goldman 1989, Abramowicz 1990 b).

Parallèlement, la neutralisation précoce de l'IL-4 peut interférer avec l'induction du chimérisme et l'absence de réponse cytotoxique chez ces souris. Néanmoins, la modulation de l'immunopathologie ne dépend pas seulement de la restauration de la capacité de rejeter les cellules du donneur, injectées à la naissance. En effet, lorsque des doses faibles d'anti-IL-4 sont administrées, on peut observer un effet dissocié, les souris restant chimériques mais présentant une pathologie moins marquée (Schurmans 1990).

La persistance de taux élevés d'immunoglobulines d'autres isotopes après traitement des souris chimériques par un anticorps anti-IL-4 suggère que d'autres médiateurs sont impliqués dans l'activation polyclonale des cellules B.

En particulier, la production en quantité accrue d'IL-6 par les macrophages pourrait participer à l'hyperproduction d'IgG1 et d'IgM chez les souris tolérantes (Vandenabeele 1993).

L'IL-10 a également été impliquée dans le développement de certaines maladies auto-immunes. Chez l'homme, les lymphocytes B et les monocytes de patients atteints de LED produisent des taux accrus d'IL-10. Ce phénomène intervient dans la stimulation polyclonale des lymphocytes B et la production d'autoanticorps observée chez ces patients (Llorente 1994 et 1995). Le rôle pathogène de l'IL-10 pourrait également être lié à l'inhibition de la production de TNF par les macrophages. L'administration prolongée d'anticorps anti-IL-10, à des souris développant spontanément un syndrome lupique, diminue la sévérité de la pathologie. Cet effet est lié à l'augmentation de la production endogène de TNF (Ishida 1994).

Enfin, il faut noter que les cellules B de l'hôte peuvent également intervenir dans la pathologie induite par l'injection néonatale d'alloantigènes. D'une part, dans certains modèles, les lymphocytes B du receveur participent à la production d'auto-anticorps (Goldman 1983). D'autre part, les souris chimériques peuvent présenter une incidence élevée de maladies lymphoprolifératives et de lymphomes malins liés à l'expansion non contrôlée de cellules B immatures d'origine médullaire (Janossy 1993). Ces phénomènes pourraient être liés à un effet de proximité (bystander) des cytokines sécrétées par les cellules T alloréactives de l'hôte lorsqu'elles sont en présence des cellules du donneur. Les cytokines TH2 sécrétées dans ces conditions pourraient stimuler de manière non spécifique les lymphocytes B du receveur.

D'autres modèles expérimentaux chez la souris et le rat mettent en évidence une association entre la différenciation préférentielle de cellules de type TH2 et le développement de syndromes auto-immuns. Par exemple chez le rat, l'injection de dérivés mercuriels, de sels d'or ou de D-pénicillamine peut induire une pathologie caractérisée notamment par une splénomégalie, une hypergammaglobulinémie et une glomérulonéphrite auto-immune. Dans ces modèles, l'administration d'un anticorps anti-IL-4 peut contrôler la sécrétion d'immunoglobulines, en particulier des IgE et des IgG1. Le transfert de cellules de type TH1 atténue l'intensité de la pathologie observée

chez ces animaux, alors que le transfert de cellules de type TH2 l'aggrave (Druet 1995).

## **II. BUTS DU TRAVAIL**

L'objectif général de notre travail était de préciser le rôle de la production précoce de cytokines dans l'induction de la tolérance et le développement de l'immunopathologie après l'injection néonatale d'alloantigènes chez la souris.

Dans ce but, nous avons d'abord déterminé quel était le phénotype des lymphocytes T alloréactifs persistants chez les animaux tolérants.

Nous avons ensuite étudié les effets de traitements modulant les cytokines secrétées durant la période néonatale précoce, soit par l'administration d'anticorps monoclonaux bloquant les cytokines endogènes, soit par l'injection de cytokines recombinantes exogènes. Nous avons étudié les effets de ces traitements sur l'induction de la tolérance de transplantation, le syndrome auto-immun associé et le profil des lymphocytes T alloréactifs.

### **III. RESULTATS**

1. L'injection néonatale d'alloantigènes induit une expression accrue des ARN messagers codant pour l'IL-4 et l'IL-10 dans la rate
2. La sécrétion précoce d'IL-4 joue un rôle déterminant dans l'induction de la tolérance de transplantation après l'injection néonatale d'alloantigènes
3. L'administration d'IFN- $\gamma$  réduit l'immunopathologie induite par l'injection néonatale d'alloantigènes
4. L'administration d'IFN- $\gamma$  restaure le rejet de greffe de peau mais ne modifie pas le chimérisme après l'injection néonatale d'alloantigènes
5. La neutralisation précoce de l'IL-10 n'interfère pas avec l'induction de la tolérance
6. l'IL-10 intervient dans l'immunopathologie induite par l'injection néonatale d'alloantigènes

## **1. L'INJECTION NEONATALE D'ALLOANTIGENES INDUIT UNE EXPRESSION ACCRUE DES ARN MESSAGERS CODANT POUR L'IL-4 ET L'IL-10 DANS LA RATE**

Neonatal induction of transplantation tolerance in mice is associated with in vivo expression of IL-4 and IL-10 mRNAs. D. Abramowicz, P. Durez, C. Gérard, V. Donckier, Z. Amraoui, T. Velu and M. Goldman. *Transplant. Proc.* 1993; 25:312.

Plusieurs études ont démontré que des lymphocytes CD4<sup>+</sup> alloréactifs pouvaient persister après l'injection néonatale d'alloantigènes.

Dans ce travail, afin de préciser le phénotype de ces cellules, nous avons déterminé quelles étaient les cytokines préférentiellement secrétées au niveau de la rate, chez les animaux tolérants.

Le protocole expérimental que nous avons utilisé consistait à injecter, au cours des 24 premières heures de vie, des souriceaux de souche BALB/c (H-2<sup>d</sup>, IA<sup>d</sup>) avec 10<sup>8</sup> cellules spléniques semi-allogéniques provenant d'un animal hybride de première génération (A/JxBALB/c)F1. La souche donneuse A/J exprime les alloantigènes H-2<sup>k</sup> et Ia<sup>k</sup> et présente donc une disparité de classe I et de classe II par rapport à la souche BALB/c receveuse. Nous avons utilisé cette combinaison pour l'ensemble de nos travaux, le nombre de cellules injectées pouvant varier d'un protocole à l'autre. Préalablement, nous avons vérifié que ce protocole permettait d'induire une tolérance de transplantation spécifique, caractérisée par la survie prolongée d'une greffe de peau provenant de la souche A/J.

L'expression des ARN messagers (ARNm) codant pour l'IL-4, l'IL-10, l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  a été déterminée par amplification génique (PCR) au sein de cellules spléniques provenant d'animaux tolérants et d'animaux témoins non injectés, âgés de 1 et 4 semaines.

Chez les animaux tolérants âgés de 4 semaines, nous avons démontré qu'il existe une expression accrue des ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-10. Ce profil de type TH2 s'observe déjà chez des animaux âgés d'une semaine. Par contre, nous n'avons pas objectivé d'expression des ARNm codant pour l'IL-2 ou l'IFN- $\gamma$ , ni chez les animaux tolérants, ni chez les animaux témoins.

Nos résultats indiquent que, dans la combinaison que nous étudions, l'induction néonatale de tolérance est associée *in vivo* à une production accrue des ARNm codant pour les cytokines de type TH2. Bien que nous ayons réalisé ces expériences sur des cellules spléniques totales, ce profil TH2 correspond probablement aux lymphocytes CD4+ alloréactifs persistants chez les animaux tolérants.

C'est le rôle spécifique de ces cellules et des cytokines qu'elles sécrètent que nous avons étudié dans la suite de notre travail.

# TOLERANCE OF VASCULARIZED ALLOGRAFTS AND MECHANISMS

## Neonatal Induction of Transplantation Tolerance in Mice is Associated With In Vivo Expression of IL-4 and -10 mRNAs

D. Abramowicz, P. Durez, C. Gerard, V. Donckier, Z. Amraoui, T. Velu, and M. Goldman

IT has been known since the studies of Medawar and coworkers that neonatal injection of semiallogeneic spleen cells ( $5$  to  $10 \times 10^6$  cells/recipient) induces a state of tolerance resulting in the persistence in the host of the allogeneic cells injected at birth.<sup>1</sup> We found that increasing 10-fold the numbers of semiallogeneic spleen cells (SCs) injected results in the occurrence of an autoimmune disorder mimicking systemic lupus erythematosus.<sup>2</sup> These mice develop a polyclonal activation of persisting donor B cells that preferentially secrete immunoglobulin (Ig)E and IgG1 antibodies.<sup>3</sup> This syndrome is characterized by the development of a host-vs-graft (HVG) disease, as host CD4+ T cells specific for donor Class II major histocompatibility complex (MHC) antigens are responsible for donor B-cell activation.<sup>4,5</sup> Donor-specific CD4+ cells secrete high levels of IL-4 but no IL-2 or interferon (IFN)- $\gamma$  so that they behave like Th2 cells.<sup>5,6</sup> In association with this T-cell-dependent B-cell activation, HVG mice display a profound defect in the production of IL-2<sup>7</sup> and IFN- $\gamma$  (unpublished results) in response to T-cell mitogens. As IL-10 produced by Th2 cells is known to be a potent inhibitor of the production of Th1-type cytokines,<sup>8</sup> we determined whether IL-10 is spontaneously produced during HVG disease.

### MATERIAL AND METHODS

#### Induction of HVG Disease

BALB/c mice were injected with  $10^8$  (A/J  $\times$  BALB/c) F1 SC intraperitoneally (IP) on the first day of life.

#### RNA Isolation and Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated from spleens by the guanidium thiocyanate method.<sup>9</sup> The reverse transcription and the polymerase chain reaction (PCR) have been described previously,<sup>10</sup> and RNA was amplified with primers specific for IL-10, as well as for IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$ . Similar amplification of the RNA of the housekeeping

gene HPRT was used as control for each PCR experiment. Mice injected with the anti-CD3 monoclonal antibody (MAb) 145-2c11 were used as positive controls. PCR products were run on 3% agarose gel and stained with ethidium bromide.

### RESULTS

#### In Vivo Expression of IL-4 and IL-10 mRNA in Spleens of HVG Mice

Neither IL-4 nor IL-10 mRNA (or only minimal levels) were found in the spleens of control mice, while clear accumulation of IL-4 as well as IL-10 mRNA were detected in the spleens of 1-month-old HVG mice (Fig 1). This Th2-like cytokine profile was already apparent in 1-week-old mice and IL-10 expression was maintained for at least 2 months. Neither IL-2 nor IFN- $\gamma$  were expressed at any stage of the HVG disease.

### DISCUSSION

Neonatal injection of semiallogeneic spleen cells leads in this model to an accumulation of IL-4 and -10 mRNAs. This is most likely related to the differentiation of host CD4+ cells specific for donor alloantigens into Th2 cells. IL-4 is responsible for IgG1 and IgE hyperproduction,<sup>11</sup> while IL-10 is most probably involved in the impairment of Th1 responses. A similar pattern of predominant Th2 responses has been observed in mice undergoing parasitic or viral infections.<sup>12,13</sup> In these situations, the impaired

From the Hôpital Erasme and IRIBHN, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

Supported by grants of the Fonds National de la Recherche Scientifique/Télévie.

Address reprint requests to D. Abramowicz, Hôpital Erasme, 808 Route de Lennir, 1070 Brussels, Belgium.

© 1993 by Appleton & Lange

0041-1345/93/\$3.00/+0

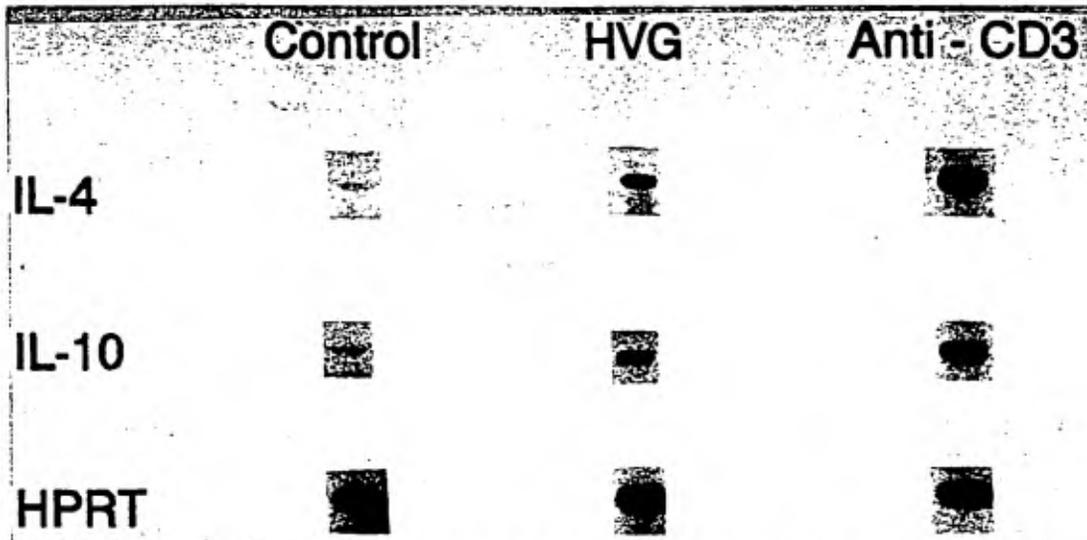


Fig 1. In vivo induction of IL-4 and -10 mRNA. The presence of the mRNAs for IL-4 and -10 in spleens of 1-month-old HVG mice and controls was evaluated by PCR. Mice injected with 25  $\mu$ g 142-2c11 MAb IP 2 h before killing served as positive controls.

production of IFN- $\gamma$  by SC after mitogenic stimulation could be corrected by addition of neutralizing anti-IL-10 MAb to the cell cultures.<sup>13</sup> The possible role played by IL-10 in the specific allotolerance, as well as in the T-cell immunodeficiency of mice injected at birth with alloantigens, is currently being investigated.

#### REFERENCES

1. Billingham RE, Brent L: *Philos Trans Roy Soc Lond (Biol)* 242:439, 1959
2. Goldman M, Feng H, Engers H, et al: *J Immunol* 131:251, 1983
3. Goldman M, Abramowicz D, Lambert P, et al: *Clin Exp Immunol* 72:79, 1988
4. Merino J, Schurmans S, Luzuy S, et al: *J Immunol* 139:1426, 1987
5. Abramowicz D, Doutrelepont JM, Lambert P, et al: *Eur J Immunol* 20:1647, 1990
6. Abramowicz D, Vandervorst P, Bruyns C, et al: *Eur J Immunol* 20:469, 1990
7. Simpson E, O'Hopp S, Harrison M, et al: *Immunology* 27:989, 1974
8. Howard M, O'Garra A: *Immunol Today* 13:198, 1992
9. Chirgwin M, Przybyla AE, MacDonald RJ, et al: *Biochemistry* 18:5294, 1979
10. Goldman M, Gerard C, Abramowicz D, et al: *Clin Transplant* 6:265, 1992
11. Schurmans S, Heusser CQ, Qin H, et al: *J Immunol* 145:2465, 1990
12. Street NE, Mossman TR: *FASEB J* 5:171, 1991
13. Gazzinelli RT, Makino M, Chattopadhyay SK, et al: *J Immunol* 148:182, 1991

## **2. LA SECRETION PRECOCE D'IL-4 JOUE UN ROLE DETERMINANT DANS L'INDUCTION DE LA TOLERANCE DE TRANSPLANTATION APRES L'INJECTION NEONATALE D'ALLOANTIGENES**

Critical role of interleukin 4 in the induction of neonatal transplantation tolerance.

V. Donckier, M. Wissing, C. Bruyns, D. Abramowicz, M. Lybin, M.L. Vanderhaeghen and M. Goldman. *Transplantation* 1995; 59:1571.

En stimulation polyclonale *in vitro*, les lymphocytes T du nouveau-né secrètent des taux élevés d'IL-4, le facteur principal favorisant les réponses de type TH2. De cette manière, la sécrétion précoce d'IL-4, en réponse à l'injection néonatale d'alloantigènes, pourrait jouer un rôle dans la différenciation préférentielle des lymphocytes TH2 chez les animaux tolérants. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord déterminé si l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques induisait effectivement la sécrétion précoce d'IL-4 *in vivo*. Ensuite, nous avons étudié les effets de la neutralisation précoce de l'IL-4 sur l'induction de la tolérance de transplantation et le phénotype des lymphocytes T alloréactifs en culture lymphocytaire mixte.

Des souris BALB/c ont été injectées de  $10^7$  cellules (A/JxBALB/c)F1, administrées par voie intra-veineuse, le jour de la naissance. Chez ces animaux, nous avons examiné par PCR, l'expression des ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-2 dans les ganglions lymphatiques, 2 et 5 jours après l'injection de cellules semi-allogéniques. Le rôle des cellules CD4+ et CD8+ dans la production de ces ARNm a été déterminé lors d'expériences de déplétion utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD4 ou anti-CD8, administrés à la naissance, avant l'injection d'alloantigènes. Les quantités d'ARNm codant pour l'IL-4 chez des souris injectées avec des cellules semi-allogéniques ou des souris témoins, injectées avec des cellules syngéniques, ont été évaluées lors d'expériences de PCR semi-quantitative, utilisant un compétiteur interne.

Afin d'étudier le rôle de l'IL-4, certains animaux ont reçu 1 mg d'anticorps monoclonal anti-IL-4 aux jours 1 et 3. Les animaux témoins ont été traités avec un anticorps contrôle, de même isotype, selon le même protocole. Les souris ont été greffées à l'âge de 4 semaines. Les cultures mixtes ont été réalisées 3 semaines après la greffe de peau pour déterminer les fonctions cytotoxiques (CTL) et la production de cytokines des cellules alloréactives.

L'étude par PCR des ganglions lymphatiques d'animaux âgés de 2 jours, démontre une expression accrue des ARNm codant pour l'IL-4, après l'injection néonatale de cellules

semi-allogéniques. On n'observe, par contre, pratiquement pas d'expression des ARNm codant pour l'IL-2. Les expériences de PCR semi-quantitative démontrent, chez ces animaux, des quantités d'ARNm de l'IL-4 16 fois supérieures à celles mesurées chez des animaux témoins. Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> du nouveau-né participent à l'expression accrue des ARNm codant pour l'IL-4. En effet, la lyse *in vivo* des cellules CD4<sup>+</sup> avant l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques, diminue fortement l'expression des ARNm de l'IL-4 dans les ganglions d'animaux âgés de 3 jours.

Nous avons ensuite observé que la neutralisation précoce de l'IL-4 *in vivo* inhibe l'induction de la tolérance de transplantation. Les souris traitées avec l'anticorps anti-IL-4 rejettent une greffe de peau provenant de la souche donneuse de la même manière que des animaux témoins. Chez ces animaux, le rejet de greffe de peau ne provient pas de la restauration des fonctions cytotoxiques anti-donneur. Les tests CTL démontrent que les animaux injectés à la naissance avec des cellules semi-allogéniques sont incapables de générer une activité cytotoxique allospécifique, qu'ils aient reçu l'anticorps anti-IL-4 ou l'anticorps témoin.

Enfin, la neutralisation précoce de l'IL-4 empêche la différenciation préférentielle de lymphocytes TH2 après l'injection néonatale d'alloantigènes. Les lymphocytes T provenant de souris traitées avec l'anticorps anti-IL-4 présentent un phénotype TH0; ils sécrètent de l'IL-4, mais également de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  en culture mixte avec les cellules du donneur. Des expériences sur des populations cellulaires purifiées démontrent que ce profil sécrétoire dépend bien de cellules CD4<sup>+</sup>.

En conclusion, la réactivité particulière des lymphocytes T du nouveau-né, caractérisée par un rapport IL-4/IL-2 élevé en réponse à l'injection néonatale d'alloantigènes, intervient de façon déterminante dans l'établissement de la tolérance de transplantation. La sécrétion précoce d'IL-4 conditionne la différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> alloréactifs en cellules de type TH2, incapables de médier un rejet aigu. La neutralisation précoce de l'IL-4 inhibe l'induction de la tolérance de transplantation. Chez ces souris, en l'absence de lymphocytes cytotoxiques fonctionnels, le rejet de greffe de peau dépend probablement de la restauration de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> alloréactifs.

## CRITICAL ROLE OF INTERLEUKIN 4 IN THE INDUCTION OF NEONATAL TRANSPLANTATION TOLERANCE<sup>1,2</sup>

VINCENT DONCKIER,<sup>3</sup> MARTIN WISSING,<sup>3</sup> CATHERINE BRUYNS,<sup>4</sup> DANIEL ABRAMOWICZ,<sup>3</sup> MYRIAM LYBIN,<sup>3</sup> MARIE-LINE VANDERHAEGHEN,<sup>3</sup> AND MICHEL GOLDMAN<sup>3,5</sup>

*Laboratoire Pluridisciplinaire de Recherche Expérimentale Biomédicale-Department of Immunology and Department of Medical Genetics-IRIBHN, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, B-1070 Brussels, Belgium*

Neonatal injection of semiallogeneic cells is known to promote differentiation of donor-specific CD4<sup>+</sup> T cells into TH2-like cells in the peripheral lymphoid organs. We reasoned that the propensity of neonatal T cells to synthesize high levels of IL-4 might be involved in this polarization of the alloreactive response and thereby in the development of neonatal transplantation tolerance. First, analysis of cytokine gene expression in lymph nodes after neonatal injection of 10<sup>7</sup> (A/J×BALB/c)F1 cells in BALB/c mice indicated that IL-4 but not IL-2 is rapidly produced by CD4<sup>+</sup> cells after allogeneic challenge in vivo. To determine whether the early production of IL-4 was involved in the establishment of allotolerance, BALB/c mice neonatally injected with (A/J×BALB/c)F1 spleen cells received on days 1 and 3 after birth 1 mg of anti-IL-4 mAb (11B11) or the same amount of control mAb. When grafted with A/J skin at 4 weeks, 88% of mice treated with control mAb retained their graft for more than 50 days, whereas rejection occurred within 30 days in 93% of mice treated with anti-IL-4 mAb. Analysis of T cell functions after in vitro restimulation with A/J spleen cells indicated that early IL-4 neutralization did not prevent donor-specific CTL unresponsiveness but allowed the emergence of alloreactive T cells secreting increased levels of IL-2 and IFN- $\gamma$ . We conclude that early production of IL-4 is critical for the establishment of neonatal transplantation tolerance in this strain combination, which has disparities across the entire H-2 region.

Since the pioneer studies of Billingham, Brent, and Medawar (1, 2), the model of transplantation tolerance induced by neonatal injection of semiallogeneic cells has been studied extensively to reveal the factors promoting allograft acceptance. While intrathymic clonal elimination appears as the main mechanism silencing CD8<sup>+</sup> cells recognizing donor MHC class I alloantigens, some donor MHC class II-specific

CD4<sup>+</sup> cells escape this process, as indicated by their presence in peripheral lymphoid organs (reviewed in 3). In several strain combinations, the profile of cytokines secreted by persisting anti-donor CD4<sup>+</sup> cells led to their characterization as TH2 cells, as they were found deficient in IL-2 production but secreted high levels of IL-4 (4-6).

In vitro and in vivo studies established that the presence of IL-4 in the induction phase of the immune response is a crucial factor for the differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells into TH2 cells (7-15) and might also influence the development of CTL activities (6, 16). As neonatal T cells were shown to synthesize high levels of IL-4 upon polyclonal activation (17-19), we reasoned that the TH2 polarization of the newborn response to alloantigens and the associated transplantation tolerance might be related to early production of IL-4. To test this hypothesis, we evaluated IL-4 mRNA expression in lymph nodes after neonatal injection of semiallogeneic cells and we analyzed the effects of anti-IL-4 mAb administration on the induction of neonatal transplantation tolerance.

### MATERIALS AND METHODS

*Mice.* BALB/c (H-2<sup>d</sup>), A/J (H-2<sup>k</sup>), and C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) mice were purchased from Harlan CPB (Zeist, The Netherlands), the Centre National de la Recherche Scientifique (Orléans, France), and Iffa Credo (L'Arbresle, France), respectively. (A/J×BALB/c)F1 hybrids were bred at our own colony.

*Neonatal induction of transplantation tolerance.* Neonatal tolerance was induced in BALB/c mice by the injection into the retro-orbital vein of 10<sup>7</sup> (A/J×BALB/c)F1 hybrid spleen cells within the first 24 hr of life, according to the original protocol of Billingham and Brent (2). As controls, mice were neonatally injected with syngeneic BALB/c spleen cells.

*Analysis of IL-2 and IL-4 gene expression in lymph nodes.* Lymph nodes were removed 2 and 5 days after neonatal inoculation of either (A/J×BALB/c)F1 or syngeneic BALB/c spleen cells. Total RNA was extracted using the guanidium thiocyanate method; preparations of cDNA and polymerase chain reaction (PCR)\* for IL-2 and IL-4 genes and for  $\beta$ -actin housekeeping gene were performed using standard procedures (20). PCR primers used were: IL-2: 5' primer, TGATGACCTACAGGAGCTCCTGAG, and 3' primer, GAGTCAAATCCAGAACATGCCGAG; IL-4: 5' primer, AACACCACAGAGAGTGGAGCTCGTCT, and 3' primer, TGGACTCATTTCATGGTGCAGCTTAT; and  $\beta$  actin: 5' primer, TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAAC, and 3' primer, TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG. Reactions were incubated in a DNA thermal cycler (Techne PHC-3, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) for 34 cycles for IL-2 and IL-4 and 31 cycles for  $\beta$ -actin. PCR products were run on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. For quantitation of IL-4 mRNA, co-amplification with a multispecific internal standard (competitor) was performed according to Bouaboula et al. (21), using the pMus2 construction

\* Abbreviation: PCR, polymerase chain reaction.

<sup>1</sup> V. Donckier and M. Wissing contributed equally to this study. Parts of this work were presented at the 15th World Congress of the Transplantation Society, August 28-September 2, 1994, Kyoto, Japan.

<sup>2</sup> This work was supported by grants from the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (Belgium) and from Cilag-Benelux (Belgium). Vincent Donckier and Martin Wissing are research fellows from the Fondation Erasme.

<sup>3</sup> Laboratoire Pluridisciplinaire de Recherche Expérimentale Biomédicale-Department of Immunology.

<sup>4</sup> Department of Medical Genetics-IRIBHN.

<sup>5</sup> Address correspondence to: Michel Goldman, MD, Department of Immunology, Hôpital Erasme, 808 route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium.

kindly provided by Dr. D. Shire (Sanofi, Elf Bio Recherches, Labège-Innople, France). This construction is a multispecific standard of 410 bp that consists of the 5' and 3' primer sequences of 19 mouse target genes. After linearization with *EcoRI* followed by transcription using a T7 polymerase and DNase treatment, standard RNA was purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, and quantitated at 260 nm. Serial amounts of this standard RNA (from 1.5 to 24 fg) were added as competitor to 1 µg of cellular RNA before reverse transcription and co-amplification with the IL-4 primers (34 cycles).

**mAb treatments.** For *in vivo* neutralization of IL-4, mice were injected on days 1 and 3 with 1 mg of 11B11 anti-mouse IL-4 mAb in ascites form, or with an isotype-matched irrelevant mAb (LO-DNP) as control. Hybridoma cells secreting these antibodies were kindly provided by Dr. W. Paul (NIH, Bethesda, MD) and Dr. H. Bazin (Experimental Immunology Unit, Louvain-en-Woluwe, Belgium), respectively.

***In vivo* depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells.** For *in vivo* depletion of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells, mice received a single intraperitoneal injection of 1 mg of the GK1.5 anti-CD4 mAb or H35-17.2 anti-CD8 mAb 12 hr before the injection of semiallogeneic cells, as adapted from a standard protocol (22). These procedures depleted more than 99% of corresponding T cell populations in lymph nodes, as assessed by flow cytometry analysis using phycoerythrin-conjugated L3T4 anti-CD4 mAb and fluoresceinated Lyt2 anti-CD8 mAb, both obtained from Becton Dickinson (San Jose, CA).

**Skin grafting.** Mice were grafted at 4 weeks of age with tail skin from A/J mice. Diagnosis of rejection was made when total epithelial breakdown had occurred. Mice that retained their graft for more than 50 days were considered to be tolerant.

**Measurement of CTL activities.** MLC were prepared 3 weeks after skin grafting between  $5 \times 10^6$  spleen cells from experimental mice and  $5 \times 10^6$  irradiated A/J spleen cells in 2 ml of culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 1% pyruvate, 1% glutamine, 1% nonessential amino acids, and  $5 \times 10^{-5}$  M 2-MER). After incubation for 5 days at 37°C in 10% CO<sub>2</sub>, effector cells were harvested and resuspended with chromium-labeled A/J target cells as described previously (23). After 4 hr of incubation, <sup>51</sup>Cr release was measured in a gamma-counter. Spontaneous and maximum <sup>51</sup>Cr release were quantified by culturing the target cells in medium or acid, respectively. Results were expressed as percentages of specific lysis (cpm experimental release - cpm spontaneous release/cpm maximum release - cpm spontaneous release) at E:T ratio varying from 10:1 to 100:1.

**Lymphokine production in MLC.** MLC were prepared 3 weeks after skin grafting between  $2.5 \times 10^6$  nylon wool-enriched splenic T cells from experimental mice and  $2.5 \times 10^6$  irradiated spleen cells from donor-type A/J or third-party C57BL/6 mice. Supernatants were harvested after 48 hr for IL-2 determination and after 72 hr for IFN-γ and IL-4. IL-2 and IFN-γ were measured by ELISA, using a commercially available test for IL-2 (Genzyme, Cambridge, MA), and the F1 and Db-1 anti-IFN-γ mAbs were provided by Dr. A. Billiau (K.U.L., Leuven, Belgium) and Dr. P.H. Van Der Meide (TNO Health Research, The Netherlands) for IFN-γ, as described previously (24). IL-4 was measured using CTLL-2 cells, according to a standard protocol (25). Briefly,  $5 \times 10^3$  CTLL-2 cells were suspended in 100 µl of different dilutions of the supernatants containing saturating amounts of anti-IL-2 neutralizing mAb (1:20 dilution of S4B6 ascites). After 18-24 hr, survival and/or proliferation of the CTLL-2 cells was determined using the MTT assay (25) and IL-4 levels were calculated by reference to a standard curve obtained with recombinant mouse IL-4 kindly provided by Dr. P. Vandenabeele (Laboratory of Molecular Biology, University of Ghent, Belgium). The lower limits of detection in these tests were 15 pg/ml, 0.5 U/ml, and 1 U/ml for IL-2, IFN-γ, and IL-4, respectively. In an additional experiment, we evaluated the anti-A/J responses of pools of CD4<sup>+</sup>-enriched T cells ( $2.5 \times 10^6$ /ml) obtained by *in vitro* treatment with anti-CD8 mAb and baby rabbit complement (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada).

These preparations contained less than 0.3% CD8<sup>+</sup> cells and more than 75% CD4<sup>+</sup> cells by flow cytometry.

## RESULTS

**Neonatal injection of semiallogeneic spleen cells rapidly induces accumulation of IL-4 but not IL-2 mRNA in lymph nodes.** We first analyzed by reverse PCR the expression of IL-2 and IL-4 mRNA in lymph nodes 2 and 5 days after neonatal injection of (A/J×BALB/c)F1 spleen cells. As shown in Figure 1, a basal expression of IL-4 mRNA was found in lymph nodes from unmanipulated 2-day-old mice, in agreement with the recent demonstration that peripheral T cells from newborn mice spontaneously express IL-4 mRNA (26). The *in vivo* inoculation of semiallogeneic cells induced virtually no IL-2 mRNA, while IL-4 mRNA accumulation was already apparent after 2 days and increased until day 5 (Fig. 1). *In vivo* administration of anti-CD4 mAb but not anti-CD8 mAb strongly reduced IL-4 mRNA expression (Fig. 2), indicating that CD4<sup>+</sup> cells were associated with IL-4 synthesis. To assess IL-4 mRNA accumulation quantitatively, we performed an additional experiment on RNA extracted from lymph nodes at day 5 after injection of either syngeneic or semiallogeneic cells. As shown in Figure 3, coamplification with serial amounts of the internal standard revealed that IL-4 mRNA level was about 16-fold higher in mice that received the semiallogeneic cells as compared with controls.

**Perinatal administration of anti-IL-4 mAb prevents the induction of transplantation tolerance by neonatal injection of semiallogeneic spleen cells.** To determine whether the early IL-4 production after neonatal injection of semiallogeneic cells is involved in the induction of transplantation tolerance, mice received 2 injections of 1 mg of the 11B11 anti-IL-4 mAb or of an irrelevant isotype-matched control mAb on days 1 and 3 after the cell transfer, and were transplanted with an A/J skin graft 4 weeks later. As shown in Figure 4, early IL-4 neutralization almost completely prevented the establishment of transplantation tolerance, while the 88% long-term graft survival observed in mice that received the control mAb

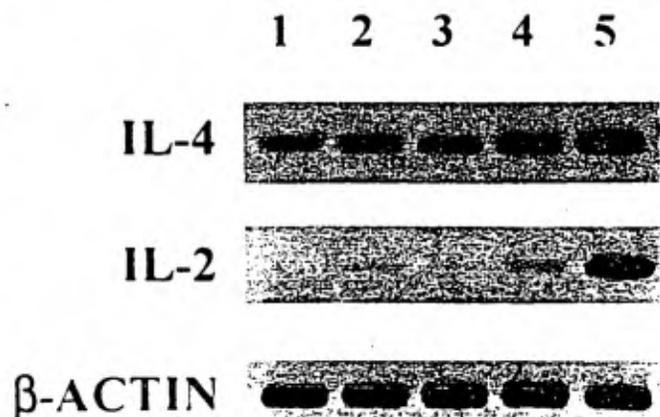


FIGURE 1. Reverse PCR analysis of IL-2, IL-4, and  $\beta$ -actin gene expression in lymph nodes of newborn mice. Lane 1: Two-day-old control un.injected BALB/c mice; lane 2: 2-day-old BALB/c mice injected at birth with  $10^7$  (A/J×BALB/c)F1 spleen cells; lane 3: 5-day-old mice injected at birth with  $10^7$  syngeneic BALB/c spleen cells; lane 4: 5-day-old mice injected at birth with  $10^7$  (A/J×BALB/c)F1 spleen cells; lane 5: adult mice 1 hr after injection of 50 µg of 145-2C11 anti-CD3 mAb (positive control).

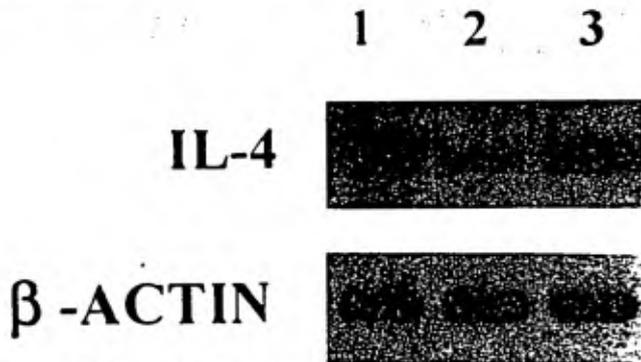


FIGURE 2. Reverse PCR analysis of IL-4 and  $\beta$ -actin mRNA expression in lymph nodes of 3-day-old BALB/c mice inoculated at birth with (A/J $\times$ BALB/c)F1 spleen cells mice and injected 24 hr later with either control medium (lane 1), anti-CD4 mAb (lane 2), or anti-CD8 Ab (lane 3).

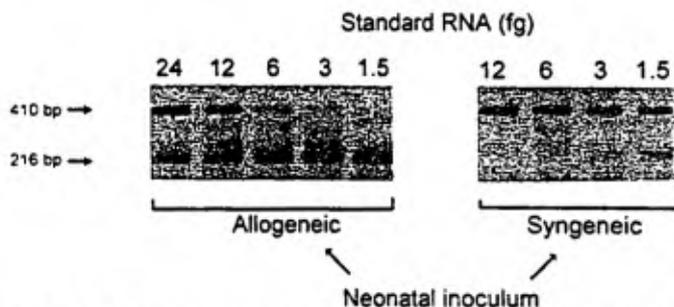


FIGURE 3. Quantification of IL-4 mRNA in lymph nodes 5 days after neonatal injection of  $10^7$  spleen cells from either (A/J $\times$ BALB/c)F1 ("allogeneic") or BALB/c ("syngeneic") mice. Sizes of DNA amplification products were 410 bp for the dilutions of the internal standard (competitor) and 216 bp for genuine IL-4. In mice injected with semiallogeneic cells, equivalent amounts of genuine cDNA and competitor cDNA amplification products appear in the lane showing 24 fg of the competitor. In mice injected with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells, equivalent amounts of genuine cDNA and competitor cDNA amplification products appear in the lane showing 1.5 fg of the competitor.

corresponds to the percentages routinely observed after neonatal injection of semiallogeneic cells alone.

*Perinatal administration of anti-IL-4 mAb does not prevent anti-donor CTL unresponsiveness but results in the emergence of alloreactive T cells secreting increased levels of IL-2 and IFN- $\gamma$ .* To get insight into the mechanisms by which early IL-4 neutralization might prevent the establishment of transplantation tolerance, we first analyzed the ability of spleen cells of the different groups of mice to generate anti-donor CTL activities. As shown in Figure 5, mice injected at birth with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells were unable to generate anti-A/J CTL activities whether or not they received perinatal injections of anti-IL-4 mAb, while control mice displayed the expected response in this assay. These data indicate that IL-4 neutralization did not interfere with the induction of CTL unresponsiveness in the present model. We then measured the production of IL-2, IFN- $\gamma$ , and IL-4 in MLC prepared between T cells harvested 3 weeks after skin grafting and donor-type A/J or third-party C57BL/6 stimulator cells. We first confirmed that the production of IL-2 and IFN- $\gamma$  by anti-donor T cells from tolerant mice was markedly deficient while these cells secreted higher levels of IL-4 than control T

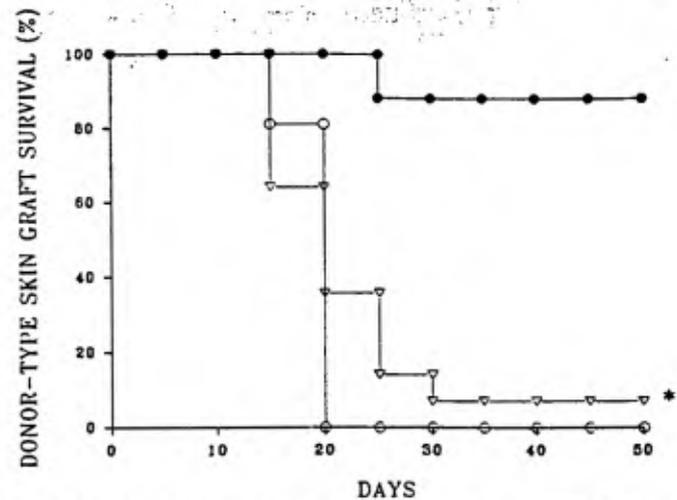


FIGURE 4. Effect of early IL-4 neutralization on donor-type skin graft survival.  $\circ$ : Control uninjected BALB/c mice ( $n=11$ );  $\bullet$ : BALB/c mice injected at birth with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells and control mAb ( $n=14$ );  $\nabla$ : BALB/c mice injected at birth with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells and anti-IL-4 mAb ( $n=9$ ). Mice were transplanted at 4 weeks of age with A/J skin and followed every other day for graft survival. \* $P<0.001$  by chi-square test as compared with mice treated with control mAb.

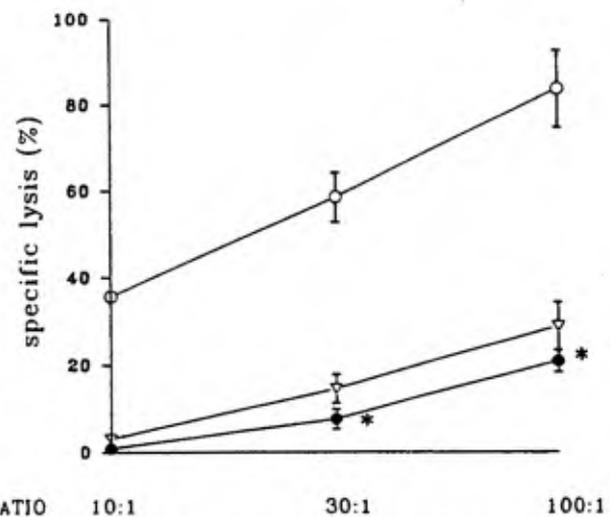


FIGURE 5. Effect of early IL-4 neutralization on anti-donor CTL activity.  $\circ$ : Control uninjected BALB/c mice ( $n=10$ );  $\bullet$ : BALB/c mice injected at birth with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells and control mAb ( $n=11$ );  $\nabla$ : BALB/c mice injected at birth with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells and anti-IL-4 mAb ( $n=3$ ). Three weeks after A/J skin grafting,  $5 \times 10^6$  spleen cells from mice of each group were cultured with  $5 \times 10^6$  A/J spleen cells, followed by a  $^{51}\text{Cr}$  release assay on A/J blast cells. Data are shown as % specific lysis (mean  $\pm$  SD) at different E:T ratio. \* $P<0.01$  by Student's test as compared with control uninjected mice, for both experimental groups.

cells (Table 1). In mice that received perinatal injections of anti-IL-4 mAb in addition to (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells, the amounts of IL-2 and IFN- $\gamma$  secreted by anti-donor T cells were significantly increased as compared with mice injected with F1 cells and irrelevant isotype-matched mAb, but remained below the levels produced by T cells from control mice

TABLE 1. Effects of perinatal administration of anti-IL-4 mAb on the production of cytokines in MLC

Perinatal treatment of BALB/c mice	Stimulator cells in MLC <sup>a</sup>					
	A/J			C57BL/6		
	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (U/ml)	IL-4 (U/ml)	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (U/ml)	IL-4 (U/ml)
None (n=4)	902 $\pm$ 274	55 $\pm$ 11	4 $\pm$ 1	1286 $\pm$ 53	32 $\pm$ 6	<1
(A/J $\times$ BALB/c) F1 cells + control mAb (n=5)	162 $\pm$ 42	3 $\pm$ 1	13 $\pm$ 7	915 $\pm$ 159	19 $\pm$ 4	<1
(A/J $\times$ BALB/c) F1 cells + anti-IL-4 mAb (n=4)	328 $\pm$ 22 <sup>b</sup>	10 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 3	1051 $\pm$ 104	17 $\pm$ 2	<1

<sup>a</sup> MLC were prepared 3 weeks after A/J skin transplantation between  $2.5 \times 10^6$  splenic T cells and  $2.5 \times 10^6$  irradiated stimulator spleen cells. Cytokine levels in MLC supernatants were measured as described in *Materials and Methods*. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of values obtained in individual mice.

<sup>b</sup>  $P < 0.02$  by Student's *t* test as compared with mice injected with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells and control mAb.

(Table 1). Although there was a trend toward decreased IL-4 levels in anti-IL-4 mAb-injected mice as compared with control mAb-injected mice, this effect did not reach statistical significance. A similar modification of the cytokine profile was observed when we analyzed cytokine production by pools of CD4<sup>+</sup>-enriched T cells in response to A/J stimulators: as compared with mice injected with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells + control mAb, IL-2 levels were 2.6-fold higher and IFN- $\gamma$  levels were 3.0-fold higher in mice injected with (A/J $\times$ BALB/c)F1 cells + anti-IL-4 mAb; IL-4 levels were 1.6-fold lower. The cytokine levels measured in MLC with C57BL/6 stimulators were not influenced by perinatal administration of anti-IL-4 mAb, indicating that this treatment specifically affected T cells recognizing the alloantigens injected at birth (Table 1).

#### DISCUSSION

The first observation made in this study is that IL-4 but not IL-2 mRNA expression is rapidly up-regulated in lymph node CD4<sup>+</sup> cells after neonatal injection of semiallogeneic cells. This is consistent with previous *in vitro* studies showing that thymic emigrants retain their IL-4-producing potentiality for a short period of time after they reach peripheral lymphoid organs (27) and that neonatal T cells secrete high levels of IL-4 but low levels of IL-2 upon polyclonal activation (18, 19). It is possible that the neonatal alloreactive CD4<sup>+</sup> cells synthesizing IL-4 belong to the same subset as the NK1.1<sup>+</sup> T cells that promptly produce IL-4 in response to challenge with anti-CD3 mAb (28), but this question could not be addressed in the present model because BALB/c mice do not express NK1.1.

The high IL-4/low IL-2 profile of neonatal T cells appears to play a critical role in the establishment of transplantation tolerance. Indeed, rIL-2 administration was shown previously to break neonatal transplantation tolerance (29). We found in the present study that early IL-4 neutralization had the same effect. MLC experiments revealed that perinatal administration of anti-IL-4 mAb did not restore anti-donor CTL activity as it was the case in a related model (6). Indeed, *in vitro* studies have shown that IL-4 induces CTL activation and amplification in some systems (30), whereas it promotes differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells into noncytolytic CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> cells in others (16). In the neonatal tolerance model to MHC class I and class II alloantigens, clonal deletion of anti-class I MHC CTL has been well documented by limiting dilution analysis (31). Addition of exogenous IL-2 in the MLC did not

restore CTL activity in this setting (31), which is consistent with our observation of persistent anti-donor CTL unresponsiveness despite increased IL-2 production in anti-IL-4 mAb-treated mice. Recently, precursor CTL were found to persist in mice made tolerant to class II alloantigens only and to be suppressed by CD4<sup>+</sup> cell-derived soluble factor(s), without evidence for the involvement of IL-4 (32, 33). As our model of tolerance involve both class I and class II alloantigens, we assume that, under our experimental conditions, early IL-4 neutralization did not interfere with the intrathymic clonal deletion of anti-donor class I CTL precursors and did not prevent the putative peripheral anergy of anti-donor class II CTL.

On the other hand, early IL-4 neutralization led to increased production of IL-2 and IFN- $\gamma$  by anti-donor T cells, as observed previously in several studies (7-15). From those studies, one would also anticipate a down-regulation of IL-4 production as a consequence of IL-4 neutralization. Although IL-4 production in MLC was lower in anti-IL-4 mAb-treated mice, the difference as compared with controls was not statistically significant. This might be related to incomplete IL-4 neutralization, as the concentrations of IL-4 required to prime for IL-4 production are lower than those required for down-regulation of IL-2 and IFN- $\gamma$  production (12). Alternatively, this could indicate the existence of an IL-4-independent pathway for induction of IL-4-producing cells, as suggested by Gross et al. (34), who found that anti-IL-4 treatment generally failed to completely abrogate the IL-4 response to keyhole limpet hemocyanin.

As the experiment on pools of CD4<sup>+</sup>-enriched T cells confirmed the observations made on whole T cells, the interpretation of our data in terms of T cell subsets would be that early IL-4 neutralization after neonatal injection of semiallogeneic cells either allows the differentiation of anti-donor helper T cells into TH0-type cells instead of TH2-type cells or led to the differentiation of both TH1-type and TH2-type cells. The emergence of anti-donor T cells secreting increased levels of IFN- $\gamma$  as a consequence of anti-IL-4 mAb administration is reminiscent of the effects of IL-4 neutralization in *Leishmania*-major-infected mice (35), in murine candidiasis (36), as well as in a model of tolerance to aqueous antigen (13). As far as the effects on IL-2 production are concerned, IL-4 is known to inhibit priming of adult naive T cells for IL-2 production (12, 14, 37) and the IL-2 defect of neonatal T cells was found to be partly related to their high production of IL-4 (19). As IL-2 and IFN- $\gamma$  were shown to play critical roles in

transplantation immunity (38, 39), it is likely that their production by anti-donor T cells is involved in the process of skin allograft rejection occurring in anti-IL-4 mAb-treated mice.

Several mechanisms were shown previously to be involved in the establishment of neonatal allotolerance, including the persistence of donor cells in the thymus leading to intrathymic deletion or anergy of alloreactive cells, and possibly the induction of suppressor cells (3, 40-42). We suggest that the rapid production of IL-4 in the immediate postnatal period might be required for TH2 differentiation of the very first wave of anti-donor T cells which migrate from the thymus before it is colonized by donor cells. Although these TH2 cells are not tolerant to donor alloantigens, they are not able to mediate allograft rejection because they do not produce inflammatory cytokines. Additional experiments are in progress to determine whether IL-4 and/or IL-10 secreted by donor-specific TH2 cells contributes to the maintenance of allotolerance in adult mice.

## REFERENCES

1. Billingham RE, Brent L, Medawar P. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172: 603.
2. Billingham RE, Brent L. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 1959; 242: 439.
3. Streilein JW. Neonatal tolerance of H-2 alloantigens. *Transplantation* 1991; 52: 1.
4. Powell TJ, Streilein JW. Neonatal tolerance induction by class II alloantigens activates IL-4 secreting, tolerogen-responsive T cells. *J Immunol* 1990; 144: 854.
5. Abramowicz D, Vandervorst P, Bruyns C, Doutrelepont JM, Vandenaabee P, Goldman M. Persistence of anti-donor allohelper T cells after neonatal induction of allotolerance in mice. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1647.
6. Schuurmans S, Heusser CH, Qin HY, Merino J, Brighthouse G, Lambert PH. In vivo effects of anti-IL-4 monoclonal antibody on neonatal induction of tolerance and on an associated autoimmune syndrome. *J Immunol* 1990; 145: 2465.
7. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin-4 (IL-4) producing cells. *J Exp Med* 1990; 172: 921.
8. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of TH2-like helper effectors. *J Immunol* 1990; 145: 3796.
9. Betz M, Fox B. Regulation and development of cytochrome c-specific IL-4 producing T cells. *J Immunol* 1990; 145: 1046.
10. Abehsira-Amar O, Gibert M, Jolij M, Theze J, Jankovic DL. IL-4 plays a dominant role in the differential development of TH0 into TH1 and TH2 cells. *J Immunol* 1992; 148: 3820.
11. Chatelain R, Varkila R, Coffman RL. IL-4 induces a TH2 response in Leishmania-major-infected mice. *J Immunol* 1992; 148: 1182.
12. Seder RA, Paul WE, Davis M, Fazekas de St. Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine potential of CD4<sup>+</sup> cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992; 176: 1091.
13. Burstein HJ, Abbas AK. In vivo role of interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. *J Exp Med* 1993; 177: 457.
14. Hsieh CS, Heimberger AS, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by IL-4 and IL-10 in an  $\alpha/\beta$  TCR transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 89: 6065.
15. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993; 362: 245.
16. Erard F, Wild MT, Garcia-Sanz JA, Le Gros G. Switch of CD8<sup>+</sup> T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* 1993; 260: 1802.
17. Bendelac A, Schwartz RH. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* 1991; 353: 68.
18. Adkins B, Hamilton K. Freshley isolated, murine neonatal T cells produce IL-4 in response to anti-CD3 stimulation. *J Immunol* 1992; 149: 3448.
19. Adkins B, Ghanei A, Hamilton K. Developmental regulation of IL-4, IL-2, and IFN- $\gamma$  production by murine peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 1993; 151: 6617.
20. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1989; 15: 1.
21. Bouaboula M, Legoux P, Pességue B, et al. Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J Biol Chem* 1992; 267: 21830.
22. Coligan J, Kruisbeek A, Margulies D, Shevach E, Strober W. *Current protocols in immunology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1992: 3.5.1.
23. Abramowicz D, Doutrelepont JM, Lambert P, Vandervorst P, Bruyns C, Goldman M. Increased expression of Ia antigens on B cells after neonatal induction of lymphoid chimerism in mice: role of interleukin-4. *Eur J Immunol* 1990; 20: 469.
24. De Wit D, Van Mechelen M, Zanin C, et al. Preferential activation of TH2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J Immunol* 1993; 150: 1.
25. Mosmann TR, Fong TAT. Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods* 1989; 116: 151.
26. Coutinho GC, Delassus S, Kourilsky P, Bandeira A, Coutinho A. Developmental shift in the patterns of interleukin production in early post-natal life. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1858.
27. Bendelac A, Matzinger P, Seder RA, Paul WE, Schwartz RH. Activation events during thymic selection. *J Exp Med* 1992; 175: 731.
28. Yoshimoto T, Paul WE. CD4<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup> T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994; 179: 1285.
29. Malkovsky M, Medawar PB, Thatcher DR, et al. Acquired immunological tolerance of foreign cells is impaired by recombinant interleukin 2 or vitamin A acetate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 536.
30. Widmer MB, Grabstein KH. Regulation of cytolytic T-lymphocyte generation by B-cell stimulatory factor. *Nature* 1987; 326: 795.
31. Feng HM, Glasebrook AL, Engers HD, Louis J. Clonal analysis of T cell unresponsiveness to alloantigens induced by neonatal injection of F1 spleen cells into parental mice. *J Immunol* 1983; 131: 2165.
32. Matriano JA, Socarra S, Streilein JW. Cellular mechanisms that maintain neonatally induced tolerance of class II alloantigens. Evidence that factor-mediated suppression silences cytotoxic T cell activity. *J Immunol* 1994; 153: 1505.
33. Matriano JA, Socarra S, Streilein JW. Cellular mechanisms that maintain neonatally induced tolerance of class II alloantigens. Evidence that precursor cytotoxic T cells are present but silenced. *J Immunol* 1994; 153: 1515.
34. Gross A, Ben-Sasson SZ, Paul W. Anti-IL-4 diminishes in vivo priming for antigen-specific IL-4 production by T cells. *J Immunol* 1993; 150: 2112.
35. Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell dependent interfer-

- on- $\gamma$  independent mechanism. *J Exp Med* 1990; 171: 115.
36. Romani L, Menacci L, Grohmann U, et al. Neutralizing antibody to interleukin 4 induces protection and T helper type-1 associated immunity in murine candidiasis. *J Exp Med* 1992; 176: 19.
37. Tanaka T, Hu-Li J, Seder RA, Fazekas de St. Groth B, Paul WE. Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon  $\gamma$  production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5914.
38. Dallman MJ, Shiho O, Page TH, Wood KJ, Morris PJ. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin-2 pathway. *J Exp Med* 1991; 173: 79.
39. Rosenberg AS, Finbloom DS, Maniero TG, Van der Meide PH, Singer A. Specific prolongation of MHC class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody. *J Immunol* 1990; 144: 4648.
40. Morrissey PJ, Sharrow SO, Kohno Y, Berzofsky JA, Singer A. Correlation of intrathymic tolerance with intrathymic chimerism in neonatally tolerized mice. *Transplantation* 1985; 40: 68.
41. Brent L, Brooks CG, Medawar PB, Simpson E. Transplantation tolerance. *Br Med Bull* 1976; 32: 101.
42. Dorsch SE, Roser B. Recirculating suppressor T cells in transplantation tolerance. *J Exp Med* 1977; 145: 144.

Received 29 September 1994.

Accepted 20 December 1994.

### **3. L'ADMINISTRATION D'IFN- $\gamma$ MODULE L'IMMUNOPATHOLOGIE INDUITE PAR L'INJECTION NEONATALE D'ALLOANTIGENES.**

IFN- $\gamma$  prevents Th2 cell-mediated pathology after neonatal injection of semiallogenic spleen cells in mice. V. Donckier, D. Abramowicz, C. Bruyns, S. Florquin, M.L. Vanderhaeghen, Z. Amraoui, C. Dubois, P. Vandenabeele and M. Goldman.  
*J. Immunol.* 1994; 153:2361.

Chez les animaux injectés à la naissance avec des cellules semi-allogéniques, les cellules TH2 alloréactives sont à l'origine d'un syndrome auto-immun en stimulant de façon polyclonale les lymphocytes B du donneur. L'IFN- $\gamma$  favorisant les réponses TH1 et inhibant les réponses TH2, nous avons étudié les effets de l'administration précoce de cette cytokine sur le développement de l'immunopathologie après l'injection néonatale d'alloantigènes.

Des souris BALB/c ont reçu 10  $\mu$ g d'IFN- $\gamma$  recombinant aux jours 1 et 3 après l'injection néonatale de  $10^8$  cellules semi-allogéniques. Chez ces animaux, les taux sériques d'immunoglobulines, l'immunopathologie rénale, le chimérisme lymphoïde et la réactivité en culture mixte ont été évalués chez des animaux âgés de 3 semaines.

Nous avons d'abord observé que l'administration précoce d'IFN- $\gamma$  module l'hypergammaglobulinémie induite par l'injection néonatale d'alloantigènes. Les taux sériques d'IgE et d'IgG1 sont significativement diminués chez les souris ayant reçu de l'IFN- $\gamma$ . Une modulation similaire est observée pour le profil isotypique des anticorps anti-DNA. Parallèlement, ce traitement prévient totalement la sécrétion d'anticorps anti-laminine et anti-membrane basale glomérulaire et consécutivement, diminue l'intensité des dépôts d'immunoglobulines au niveau rénal.

Les effets de l'administration d'IFN- $\gamma$  ne dépendent pas de l'élimination des cellules du donneur. En effet, les taux sériques d'allotype du donneur ne sont pas modifiés chez les souris ayant reçu de l'IFN- $\gamma$ . La persistance du chimérisme est également confirmée par le marquage direct des cellules du donneur dans les ganglions lymphatiques, à l'aide d'anticorps anti-H-2<sup>k</sup>.

L'administration d'IFN- $\gamma$  n'empêche pas la délétion ou l'inactivation des lymphocytes cytotoxiques; les tests CTL chez ces animaux démontrant une absence de cytotoxicité allospécifique, similaire à celle observée chez les animaux témoins.

Enfin, les expériences de culture lymphocytaire mixte démontrent que l'administration précoce d'IFN- $\gamma$  restaure la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T

alloréactifs. Ces cellules secrètent également des taux élevés d'IL-4 et d'IL-10 et présentent donc un phénotype TH0.

En conclusion, l'administration précoce d'IFN- $\gamma$  diminue l'intensité du syndrome auto-immun induit par l'injection néoantale de cellules semi-allogéniques. Les effets de l'IFN- $\gamma$  ne sont pas liés au rejet des cellules du donneur mais plutôt à l'inhibition de la différenciation préférentielle des lymphocytes alloréactifs en cellules de type TH2. Ces résultats confirment ceux observés dans d'autres modèles et suggèrent que l'IFN- $\gamma$  pourrait exercer une action thérapeutique dans les pathologies faisant intervenir des cellules TH2.

## IFN- $\gamma$ Prevents Th2 Cell-Mediated Pathology After Neonatal Injection of Semiallogenic Spleen Cells in Mice<sup>1</sup>

Vincent Donckier,\* Daniel Abramowicz,\* Catherine Bruyns,<sup>†</sup> Sandrine Florquin,\* Marie-Line Vanderhaeghen,\* Zoulikha Amraoui,\* Christine Dubois,\* Peter Vandenaabeele,<sup>‡</sup> and Michel Goldman<sup>2\*</sup>

\*Interdisciplinary Laboratory of Experimental Biomedical Research and <sup>†</sup>Department of Medical Genetics-Interdisciplinary Research Institute in Human and Nuclear Biology, Free University of Brussels, Brussels, Belgium; and <sup>‡</sup>Laboratory of Molecular Immunology, University of Gent, Gent, Belgium

BALB/c mice injected at birth with  $10^8$  (A/J  $\times$  BALB/c)<sub>F<sub>1</sub></sub> hybrid spleen cells develop an autoimmune host-vs-graft (HVG) disease as a result of activation of donor B cells by host CD4<sup>+</sup> cells. The antidonor CD4<sup>+</sup> cells seem to be Th2-like cells, inasmuch as they are profoundly deficient in IL-2 and IFN- $\gamma$  production, but secrete high levels of IL-4 and IL-10. As IFN- $\gamma$  is known to inhibit the development of TH2 cells, we attempted to modulate HVG disease by injecting rIFN- $\gamma$ . First, we found that 10  $\mu$ g of rIFN- $\gamma$  given on days 1 and 3 after birth reduced the serum hyper-IgE of HVG mice by 90% and the serum hyper-IgG1, by 70%. In addition, rIFN- $\gamma$  administration significantly decreased the anti-DNA IgG1 titers and prevented the occurrence of anti-glomerular basement membrane and anti-laminin IgG1 Abs as well as the formation of immune deposits in renal glomeruli. These effects were not caused by the abrogation of chimerism, as indicated by the persistence of donor-type B cells in lymph nodes and of Igs bearing donor allotype in serum. MLC experiments indicated that the major effect of early rIFN- $\gamma$  administration was to restore the production of IL-2 and IFN- $\gamma$  by donor-specific T cells while these cells still secreted significant amounts of IL-4 and IL-10. Unresponsiveness of antidonor cytolytic T cells was not influenced by rIFN- $\gamma$ . We conclude that rIFN- $\gamma$  prevents the TH2-type response induced by the neonatal injection of semiallogenic spleen cells and the associated pathology. *The Journal of Immunology*, 1994, 153: 2361.

As originally described by Medawar et al. (1), the neonatal inoculation of semiallogenic cells results in a state of allotolerance, which allows for the persistence of donor cells in lymphoid organs. When  $10^8$  (C57Bl/6  $\times$  BALB/c)<sub>F<sub>1</sub></sub> or (A/J  $\times$  BALB/c)<sub>F<sub>1</sub></sub> hybrid spleen cells (SC)<sup>3</sup> are injected i.p. into BALB/c newborns, neonatal tolerance involves clonal deletion of donor class I MHC-specific CD8<sup>+</sup> cells, as well as deficient production of IL-2 and

IFN- $\gamma$  by donor class II MHC-specific CD4<sup>+</sup> cells (2, 3). The latter cells are not deleted, but differentiate into TH2-like cells, as indicated by their production of IL-4 (3). In vivo, these alloreactive Th2-like cells activate donor B cells derived from the neonatal inoculum to produce high levels of IgE and IgG1 Abs (4–7). Indeed, the interactions between host T cells and donor B cells result in the so-called host-vs-graft (HVG) disease, which resembles SLE in that it is characterized by the production of various autoantibodies, including anti-nuclear Abs, and by immune deposits in several tissues, including the kidney, in which a membranous glomerulonephritis develops (8).

The factors that lead to the differentiation of alloreactive CD4<sup>+</sup> cells into Th2-like cells after neonatal injection of allogeneic cells are unclear. Because neonatal T cells produce high levels of IL-4 as compared with adult T cells (9, 10), we reasoned that a disequilibrium in the production of IL-4 and IFN- $\gamma$  at the initiation of the alloreactive response might be involved. We evaluated this hypothesis by injecting rIFN- $\gamma$  at the time of cell transfer and assessing the effects of this treatment

Received for publication October 12, 1993. Accepted for publication June 20, 1994.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by the Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium) and the Loterie Nationale de Belgique. V.D. is a fellow of the Fondation Erasme and S.F. is a recipient of a research fellowship from the Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgium).

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Michel Goldman, Department of Immunology, Hôpital Erasme, 808 route de Lennik, B-1070 Brussels, Belgium.

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: SC, spleen cells; HVG, host-vs-graft; GBM, glomerular basement membrane; LN, lymph nodes.

on the HVG disease and on the profile of cytokines secreted by alloreactive T cells in MLC.

## Materials and Methods

### Mice and neonatal induction of HVG disease

BALB/c (H-2<sup>d</sup>), A/J (H-2<sup>k</sup>), and C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) mice were purchased from Harlan CPB (Zeist, The Netherlands), the Centre National de la Recherche Scientifique (Orléans, France), and Iffa Credo (l'Arbresle, France), respectively. (A/J $\times$ BALB/c)<sub>F</sub><sub>1</sub> hybrids were bred at our own colony. HVG disease was induced in BALB/c mice by the i.p. injection of 10<sup>6</sup> (A/J $\times$ BALB/c)<sub>F</sub><sub>1</sub> hybrid SC within the first 24 h of life. Control animals were BALB/c mice that were left untreated.

### In vivo treatment with rIFN- $\gamma$

rIFN- $\gamma$  derived from *Escherichia coli* was given i.p. on days 1 and 3 after the neonatal injection of semi-allogeneic cells. The biologic activity of this preparation was 5  $\times$  10<sup>6</sup> IU/mg.

### Determination of chimerism

First, by using an ELISA, we determined the presence of donor-type (A/J) allotype on circulating Igs of neonatally injected mice. Plates were coated with a purified mouse IgG1 mAb directed against the Ig<sup>e</sup> allotype expressed on IgG2b molecules of the A/J strain (4). After incubation of serum dilutions, bound Igs were revealed by a biotinylated goat anti-mouse IgG2b antiserum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Results were expressed as percentages of the allotype levels present in serum of (A/J $\times$ BALB/c)<sub>F</sub><sub>1</sub> mice.

Second, cellular chimerism in lymph nodes (LN) was assessed by flow cytometry with the use of anti-donor MHC class I mAb. Briefly, 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells were incubated with 1  $\mu$ g of FITC-conjugated anti-H-2 K<sup>k</sup> mAb (PharMingen, San Diego, CA) and the percentage of fluorescent cells was determined with a fluorescence-activated cell sorter (FACStar<sup>Plus</sup>; Becton Dickinson, Mountain View, CA). In control experiments, 100% of LN cells from (A/J $\times$ BALB/c)<sub>F</sub><sub>1</sub> mice were stained positively by this mAb. To determine the nature of chimeric cells, a series of experiments included double-staining with phycoerythrin-conjugated anti-B220 mAb (PharMingen), biotinylated anti-CD8 mAb, or phycoerythrin-conjugated anti-CD4 mAb (Becton Dickinson, San Jose, CA).

### Quantification of Ig isotypes

Blood samples from 3-wk-old mice were obtained by retro-orbital puncture. As described previously (4), serum levels of IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgM were measured by solid-phase ELISA with the use of isotype-specific antisera obtained from Sigma Chemical Co., except for rabbit anti-mouse IgE antiserum, which was purchased from Miah (Uppsala, Sweden).

### Detection of autoantibodies

Anti-ssDNA Abs were determined by solid-phase ELISA, as described previously (11). Briefly, serum dilutions were incubated in plates pre-coated with ssDNA prepared from calf thymus DNA (Sigma Chemical Co.). Anti-DNA Abs were revealed by alkaline phosphatase-conjugated isotype-specific antiserum (Sigma Chemical Co.). Results were expressed in titration units by reference with a pool of sera from autoimmune HVG mice. Similar solid-phase ELISA tests were used to measure anti-glomerular basement membrane (GBM) Abs by using purified rat GBM, which was kindly provided by Dr. J. Weening (University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands), and anti-laminin Abs, by using purified laminin (Sigma Chemical Co.), as described previously (12).

### Renal immunopathology

Renal tissue was snap frozen in CO<sub>2</sub> ice-cooled isopentane. Two-micrometer sections were cut, air-dried, washed three times in PBS, fixed in acetone-ethanol solution for 5 min and in 100% ethanol for 10 min, and re-washed in PBS. To detect Ig deposits in renal tissue, direct immunofluorescence was performed with fluorescein-conjugated goat antiserum

directed against mouse IgG or IgG1 (Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands). The sections were incubated with the antiserum for 1 h at room temperature, rinsed three times in PBS, and mounted in Fluorep (Biomérieux, Belgium). Sections were examined with a Leitz Orthoplan fluorescence microscope and scored for immunofluorescence intensity on a scale graded from 0 to 4+.

### Measurement of CTL activities

MLCs were prepared between 5  $\times$  10<sup>6</sup> unseparated responder SC and 5  $\times$  10<sup>6</sup> irradiated SC from (A/J $\times$ BALB/c)<sub>F</sub><sub>1</sub> or C57BL/6 mice in 2 ml of culture medium. After incubation for 5 days at 37°C, effector cells were harvested and resuspended with chromium-labeled BALB/c, (A/J $\times$ BALB/c)<sub>F</sub><sub>1</sub>, or C57BL/6 target cells, as described previously (13). After 4 h of incubation, <sup>51</sup>Cr release was measured in a gamma counter. Spontaneous and maximum <sup>51</sup>Cr release were quantified by culturing the target cells in medium and acid, respectively. Results are expressed as the percent specific lysis (cpm experimental release - cpm spontaneous release/cpm maximum release - cpm spontaneous release) at E:T ratios that varied from 10:1 to 100:1.

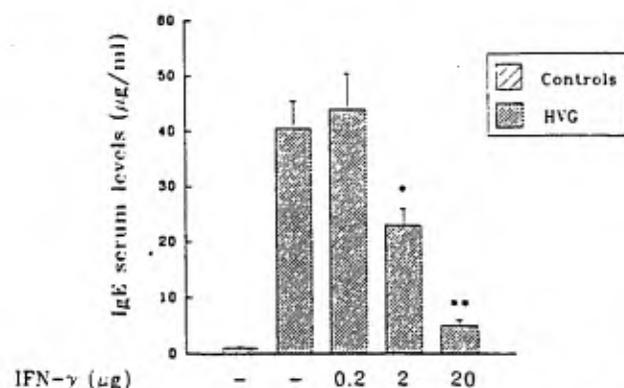
### Lymphokine production in MLC

Single cell suspensions of spleen were obtained by teasing the tissue in RPMI 1640 medium. Culture medium was RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 1% pyruvate, 1% glutamine, 1% nonessential amino acids, and 5  $\times$  10<sup>-5</sup> M 2-ME. MLCs were prepared in duplicate at 37°C in 10% CO<sub>2</sub> between 2.5  $\times$  10<sup>6</sup> nylon wool-enriched splenic T cells and 2.5  $\times$  10<sup>6</sup> irradiated SC from donor-type (A/J $\times$ BALB/c)<sub>F</sub><sub>1</sub> hybrids or third party C57BL/6 mice. Supernatants were harvested after 24 h for IL-2 determination and after 72 h for IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 assays. IL-2 was measured with a commercially available ELISA Kit (Genzyme, Cambridge, MA). As described previously (14, 15), IFN- $\gamma$  and IL-10 also were quantified by a two-site ELISA with the use of the following mAbs: F<sub>1</sub>, provided by Dr. A. Billiau (Katholic University of Leuven, Belgium) and Db-1, provided by Dr. P.H. Van Der Meide (TNO Health Research, The Netherlands) for the IFN- $\gamma$  assay; and JESS-2A5 and SXC1 (PharMingen, San Diego, CA) for IL-10. IL-4 activity of MLC supernatants was evaluated by their ability to increase MHC class II expression on fresh splenic B cells in culture, as described previously (13). Briefly, B cell preparations were obtained from A/J mice by lysis of T cells with anti-Thy-1.2 mAb and C. After 18 h of culture with 75% of MLC supernatants, indicator B cells were harvested, stained with FITC-conjugated anti-mouse I-A<sup>b</sup> mAb (PharMingen), and assayed for intensity of I-A<sup>b</sup> Ag expression by FACS analysis. The lower limit of detections of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-4 were 15 pg/ml, 15 U/ml, 2 U/ml, and 0.5 U/ml, respectively.

## Results

### Early administration of rIFN- $\gamma$ prevents IgE hyperproduction after neonatal injection of semiallogeneic SC

Because serum hyper-IgE is a reliable marker of HVG disease, we first evaluated the effects of various dosages of rIFN- $\gamma$  on IgE serum levels. rIFN- $\gamma$  was given in two divided doses on days 1 and 3 after birth and IgE levels were measured at 3 wk, a time point that corresponds to their peak values (6, 16). As shown in Figure 1, a significant decrease of IgE levels was already observed with an rIFN- $\gamma$  dose of 2  $\mu$ g, whereas the maximal effect corresponding to a 90% reduction in serum IgE was obtained with a dose of 20  $\mu$ g. Therefore, the latter was chosen for additional experiments.



**FIGURE 1.** The effect of rIFN- $\gamma$  administration on IgE serum levels in 3-wk-old mice. Results represented are the mean  $\pm$  SEM of 8 to 24 mice per group. rIFN- $\gamma$  was given in two divided doses on days 1 and 3. \*,  $p < 0.05$  as compared with HVG mice; \*\*,  $p < 0.001$  as compared with HVG mice.

#### rIFN- $\gamma$ does not prevent the establishment of lymphoid chimerism

Because there is evidence that donor-type B cells are responsible for the hyperproduction of Igs (4-7), we assessed the effects of rIFN- $\gamma$  on the establishment of chimerism. First, we enumerated H-2K<sup>k</sup>-positive cells in LN of 3-wk-old mice. Although the percentage of donor cells was somewhat lower in rIFN- $\gamma$ -treated mice, these mice remained clearly chimeric (Table I). Double staining experiments, which are shown in Figure 2, indicated that donor B cells, as well as CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, were present in LN of HVG mice and that their relative proportions were similar in control and rIFN- $\gamma$ -treated mice.

Chimerism was confirmed by measuring the serum levels of Igs that bear the Ig<sup>e</sup> allotype specific of the A/J strain. As shown in Table I, the levels of Ig<sup>e</sup>-positive Igs were not influenced by the neonatal administration of rIFN- $\gamma$ , thus indicating the persistence of donor B cells engaged in the production of Abs. In control experiments, H-2K<sup>k</sup>-positive cells and Ig<sup>e</sup>-positive Igs were undetectable in mice that received the donor inoculum at day 4 after birth, which confirmed that chimerism is only induced when the neonatal injection is given within the first 48 h of life (1).

#### rIFN- $\gamma$ modifies the isotypic profile of serum Igs and anti-DNA Abs

As reported in previous studies (5, 6), HVG mice displayed increased serum levels of all IgG isotypes and IgM. Although rIFN- $\gamma$  administration entailed a 70% reduction in IgG1 serum levels, it did not significantly modify the hyperproduction of other isotypes, whereas there was a trend toward a decrease in IgM levels and an increase in IgG2a levels (Table II). The determinations of anti-DNA

**Table I.** rIFN- $\gamma$  administration does not abrogate cellular chimerism

Mice <sup>a</sup>	Donor-Derived H-2K <sup>k</sup> Cells in LN (%)	Donor Allotype Serum Levels (%)
BALB/c controls	<1	<2
HVG	9.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	19.8 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
HVG + rIFN- $\gamma$	5.7 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	23.5 $\pm$ 4.6 <sup>d</sup>
BALB/c mice injected with 10 <sup>8</sup> (A/J) $\times$ BALB/c)F1 SC on day 4	<1	<2

<sup>a</sup> Mice (5 to 25 per group) were tested at 3 wk. Results shown are the mean  $\pm$  SEM.

<sup>b</sup>  $p < 0.001$  vs BALB/c controls.

<sup>c</sup>  $p < 0.001$  vs BALB/c controls and  $p < 0.005$  vs HVG mice.

<sup>d</sup>  $p < 0.001$  vs BALB/c controls, but not significantly different from HVG mice.

Ab levels also indicated a preferential effect of rIFN- $\gamma$  treatment on the IgG1 isotype (Table III).

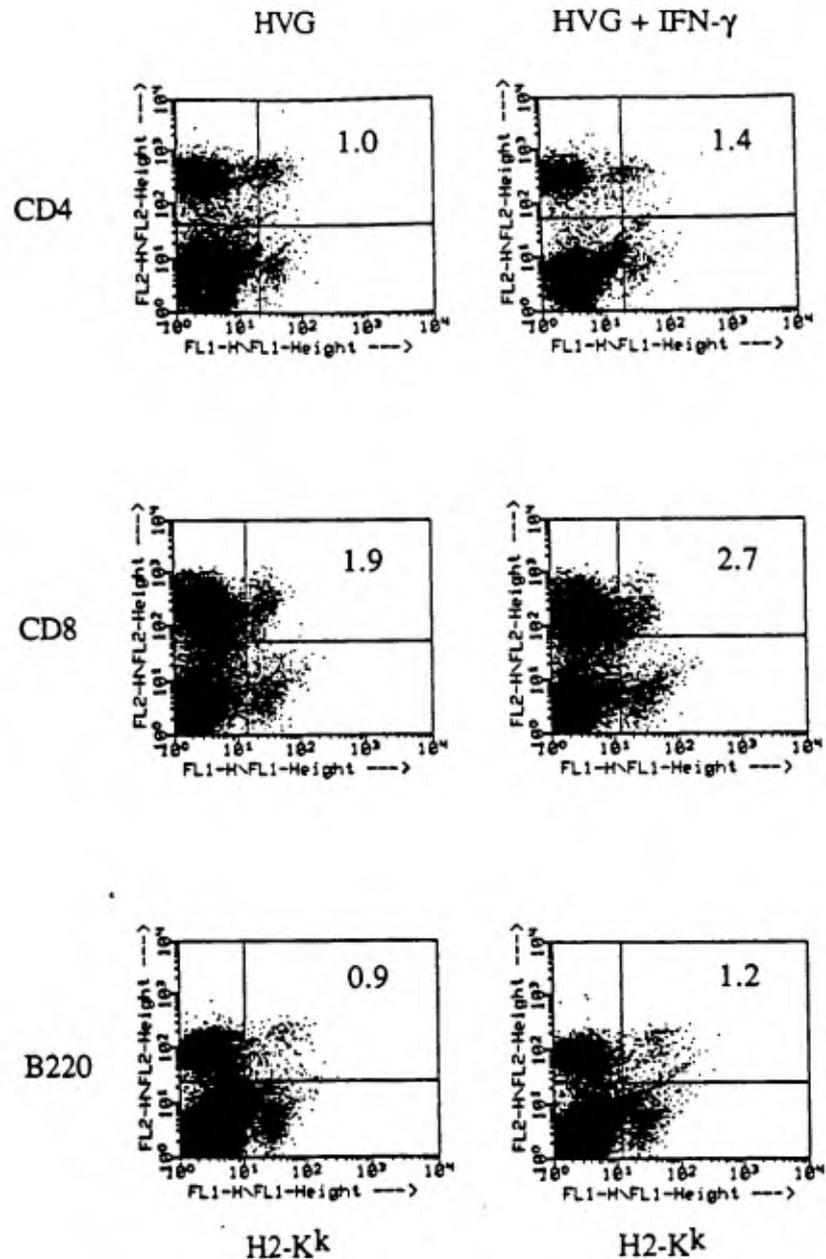
#### rIFN- $\gamma$ treatment reduces glomerular IgG deposits in HVG mice

Immunofluorescence studies of kidneys of 3-wk-old HVG mice revealed IgG deposits in the mesangium and along the capillary walls in a linear broken pattern (Fig. 3A). rIFN- $\gamma$  treatment completely prevented the deposition of IgG along the capillary walls and also significantly reduced the mesangial deposits (Fig. 3B and Table IV). Inasmuch as we previously had established that Igs deposited in glomeruli of HVG mice are mainly IgG1 directed against GBM Ags, including laminin, we determined the effects of rIFN- $\gamma$  on the serum levels of these nephritogenic Abs. As shown in Figure 4, rIFN- $\gamma$  treatment completely prevented the occurrence of both anti-GBM and anti-laminin IgG1 Abs.

#### Effects of rIFN- $\gamma$ on MLC activities

To determine the influence of rIFN- $\gamma$  administration on donor-specific T cell activities, we evaluated cytokine production and CTL generation in MLCs between splenic T cells from HVG mice and irradiated (A/J) $\times$ (BALB/c)F<sub>1</sub> donor-type cells. First, in three independent experiments, we found that rIFN- $\gamma$  treatment did not interfere with the induction of CTL unresponsiveness as assessed in 3-wk-old animals. In the experiment presented in Figure 5, specific lysis of (A/J  $\times$  BALB/c)F<sub>1</sub> cells by T cells from HVG mice was 0% at an E:T ratio of 30:1, as compared with 73% in control unmanipulated BALB/c mice. In mice that received rIFN- $\gamma$  in addition to the F<sub>1</sub> donor inoculum, specific lysis was reduced to 5% under the same experimental conditions.

In contrast, rIFN- $\gamma$  administration profoundly modified the profile of cytokines secreted by alloreactive T cells from HVG mice. As shown in Table V, the pattern of cytokines produced by T cells from untreated HVG mice in response to F<sub>1</sub> donor alloantigens was characteristic of Th2 cells, inasmuch as they secreted high levels of IL-4



**FIGURE 2.** Flow cytometry analysis of pooled LN cells from 3-wk-old HVG mice after double staining with anti-H2-K<sup>k</sup> mAb and anti-CD4, anti-CD8, or anti-B220 mAb. Percentages of double-positive cells are indicated in the right upper quadrant of each graph.

**Table II.** *rIFN- $\gamma$  administration modulates the hyperimmunoglobulinemia of HVG mice*

Mice	IgG1 ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	IgG2a ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	IgG2b ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	IgG3 ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	IgM ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>
BALB/c controls	2,585 $\pm$ 482	194 $\pm$ 15	63 $\pm$ 4	572 $\pm$ 85	349 $\pm$ 83
HVG	18,195 $\pm$ 2,902 <sup>b</sup>	729 $\pm$ 117 <sup>b</sup>	460 $\pm$ 47 <sup>b</sup>	1,864 $\pm$ 452 <sup>c</sup>	3,787 $\pm$ 485 <sup>b</sup>
HVG + rIFN- $\gamma$	7,223 $\pm$ 1,847 <sup>d</sup>	1,108 $\pm$ 246 <sup>e</sup>	324 $\pm$ 37 <sup>e</sup>	1,809 $\pm$ 299 <sup>e</sup>	2,205 $\pm$ 461 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Ig serum levels (mean  $\pm$  SEM of five to seven mice per group) were measured by ELISA at 3 wk.

<sup>b</sup>  $p < 0.005$  vs BALB/c controls.

<sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs BALB/c controls.

<sup>d</sup>  $p < 0.001$  vs BALB/c controls and  $p < 0.05$  vs HVG mice.

<sup>e</sup>  $p < 0.005$  vs BALB/c controls, but not significantly different from HVG mice.

and IL-10, whereas their production of IL-2 and IFN- $\gamma$  was markedly impaired, as compared with controls. In MLCs conducted with third party (C57 Bl/6) alloantigens, the same T cells produce only low amounts of IL-4 and no

detectable IL-10, and their secretion of IL-2 and IFN- $\gamma$  also was reduced, as reported previously (3, 11). In two independent experiments, rIFN- $\gamma$  administration restored the ability of donor-specific T cells from HVG mice to

Table III. *rIFN- $\gamma$  modulates the isotypic profile of circulating anti-DNA Abs*

Mice	Anti-ssDNA Ab Response <sup>a</sup>				
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
BALB/c controls	0.1 $\pm$ 0.05	1.4 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.7	15 $\pm$ 1	19.5 $\pm$ 4
HVG	212 $\pm$ 32 <sup>b</sup>	261 $\pm$ 47 <sup>b</sup>	211 $\pm$ 60 <sup>c</sup>	313 $\pm$ 123 <sup>c</sup>	311 $\pm$ 85 <sup>c</sup>
HVG + rIFN- $\gamma$	91 $\pm$ 22 <sup>d</sup>	302 $\pm$ 93 <sup>e</sup>	193 $\pm$ 65 <sup>f</sup>	689 $\pm$ 228 <sup>f</sup>	159 $\pm$ 34 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Anti-DNA serum levels (mean  $\pm$  SEM of 5 to 15 mice per group) were measured at 3 wk and expressed in titration units.

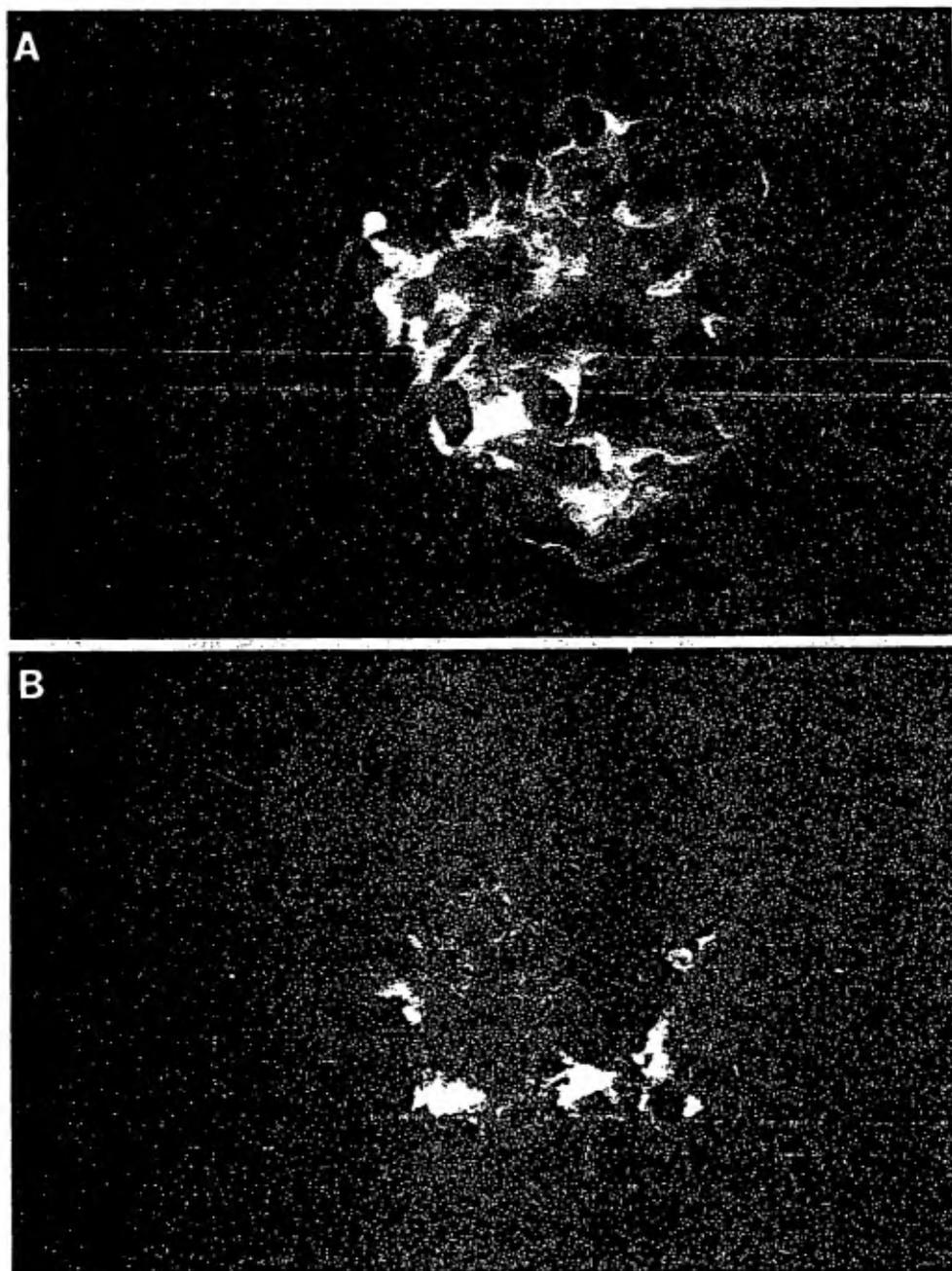
<sup>b</sup>  $p < 0.005$  vs BALB/c controls.

<sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs BALB/c controls.

<sup>d</sup>  $p < 0.005$  vs BALB/c controls and  $p < 0.05$  vs HVG mice.

<sup>e</sup>  $p < 0.005$  vs BALB/c controls and not significantly different from HVG mice.

<sup>f</sup>  $p < 0.05$  vs BALB/c and not significantly different from HVG mice.



**FIGURE 3.** Immunofluorescence studies for IgG of kidneys of rIFN- $\gamma$ -treated and HVG mice. A) Kidney of a 3-wk-old HVG mouse showing IgG deposits in the mesangium and along the glomerular capillary walls in a predominant linear pattern ( $\times 400$ ). B) Kidney of a 3-wk-old rIFN- $\gamma$ -treated HVG mouse showing absence of IgG deposits along the capillary walls and reduced mesangial immune deposits ( $\times 400$ ).

Table IV. rIFN- $\gamma$  administration reduces renal Ig deposits\*

Mice	IgG Deposits		IgG1 Deposits	
	Mes	CW	Mes	CW
BALB/c controls	+	0	$\pm$	0
HVG	++	++	++	++
HVG + rIFN- $\gamma$	+	=	+	0

\* Mice (10 per group) were analyzed at 3 wk. Results represent the immunofluorescence intensity score on a scale graded from 0 to 4+. Mes, mesangial deposits; CW, deposits along capillary walls.

secrete IL-2 and IFN- $\gamma$  to normal or even supranormal levels. In parallel, the deficient production of IL-2 and IFN- $\gamma$  in MLCs conducted with third party alloantigens was also corrected. Significant levels of IL-4 and IL-10 were produced by T cells from rIFN- $\gamma$ -treated HVG mice in response both to donor and third party alloantigens (Table V).

## Discussion

This study establishes that early administration of rIFN- $\gamma$  profoundly influences the HVG disease induced by neonatal injection of semiallogeneic SC. This finding was first indicated by a 90% decrease in serum IgE and a 70% decrease in serum IgG1. In respect to autoantibodies, anti-DNA IgG1 levels were significantly lowered in rIFN- $\gamma$ -treated mice, whereas the occurrence of anti-GBM and anti-laminin IgG1 was completely prevented. Because the latter autoantibodies were previously found to play a critical role in the renal immunopathology of HVG mice (12), this might explain how rIFN- $\gamma$  strongly inhibited the development of immune deposits in glomeruli. Although rIFN- $\gamma$  was also shown to reduce IgG1 and IgE serum levels in murine chronic graft-vs-host disease, it did not influence animal survival in this model (17). On the other hand, spontaneous lupus-like diseases were found to be accelerated by administration of IFN preparations (18–20), which indicates that rIFN- $\gamma$  might have very different effects in systemic autoimmune diseases, depending on the mechanisms involved in the activation of autoreactive B cells.

Because F<sub>1</sub> donor B cells were found to be responsible for the hyperproduction of Igs in HVG mice (4–7), it was important to determine whether rIFN- $\gamma$  treatment interfered with the development of lymphoid chimerism. This was found not to be the case, as assessed by the presence of B cells expressing donor class I MHC molecules in LN 3 wk after the cell transfer. Moreover, the serum levels of Igs that bear a donor-type allotypic marker were not modified by rIFN- $\gamma$  administration. Although this parameter might not reflect the degree of chimerism, it demonstrates the persistence of donor B cells engaged in the secretion of Abs. Likewise, the hyperproduction of IgG2a and IgG3 was not inhibited in rIFN- $\gamma$ -treated mice and, although there was a trend toward a decrease in total, as well as anti-DNA IgM levels, statistically significant effects of

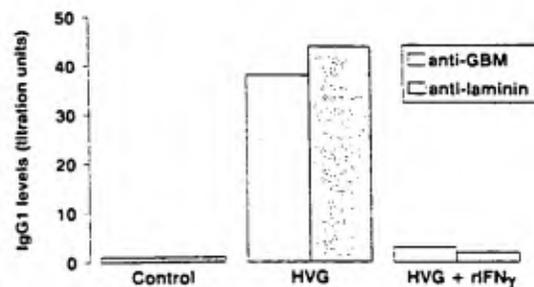


FIGURE 4. The effect of rIFN- $\gamma$  administration on anti-GBM and anti-laminin IgG1 serum levels in 3-wk-old mice. Results expressed in titration units were obtained from pools of three to five mice per group.

rIFN- $\gamma$  were observed only for the IgE and IgG1 isotypes that are known to be IL-4-dependent (21). Indeed, the effects of anti-IL-4 mAb administration observed by Schurmans et al. (6) were very similar to those obtained by neonatal administration of rIFN- $\gamma$ . In rIFN- $\gamma$ -treated mice, the inhibition of B cell hyperactivity could be related to a direct action of rIFN- $\gamma$  administered at birth on the injected donor B cells, as well as to restoration of endogenous IFN- $\gamma$  production by antidonor T cells. Both effects might contribute to the preferential inhibition of IL-4-dependent isotypes, which also has been observed during a classical immune response in adult mice (22).

In addition to IL-4, other cytokines are involved in HVG disease. Thus, we recently have reported that macrophage-derived IL-6 plays a role in donor B cell stimulation (23). In this study, donor-specific T cells from HVG mice were found to produce IL-10 in addition to IL-4, thus confirming their Th2 profile (24). In the course of HVG disease, IL-10 might synergize with IL-4 in the activation of donor B cells (25) and could also be involved in the nonspecific immunosuppression of Th1 activities, as illustrated by the deficient IL-2 and IFN- $\gamma$  production in response to third party alloantigens. This finding would be consistent with our recent observation that IL-10 neutralization restored the defect of IFN- $\gamma$  production in response to polyclonal T cell activation (our manuscript in preparation).

Several factors might be responsible for the differentiation of donor-specific CD4<sup>+</sup> cells into Th2 cells after neonatal injection of allogeneic cells, including the deletion of donor-specific CTLs (26), the presentation of alloantigens by B cells (26), and the imbalance in the production of IL-4 and IFN- $\gamma$  by neonatal T cells, which are known to be high IL-4 producers (9, 10). Indeed, data from murine models of leishmaniasis indicate that the IL-4/IFN- $\gamma$  balance at the initiation of the immune response critically influences the differentiation of parasite-specific CD4<sup>+</sup> cells into Th1 or Th2 cells (27–29). In HVG disease, early administration of rIFN- $\gamma$  clearly prevented the development of a Th2-type response, as indicated by the normal

**FIGURE 5.** The effect of rIFN- $\gamma$  administration on CTL activity against donor cells. Either  $5 \times 10^6$  SC from HVG mice ( $\bullet$ ), control mice ( $\circ$ ), or rIFN- $\gamma$ -treated HVG mice ( $\nabla$ ) were cultured for 5 days with the same number of  $F_1$  donor-irradiated SC, followed by a  $^{51}\text{Cr}$ -release assay on donor-type blast cells, as described in *Materials and Methods*. Data are shown as the percent specific lysis at different E:T ratios.

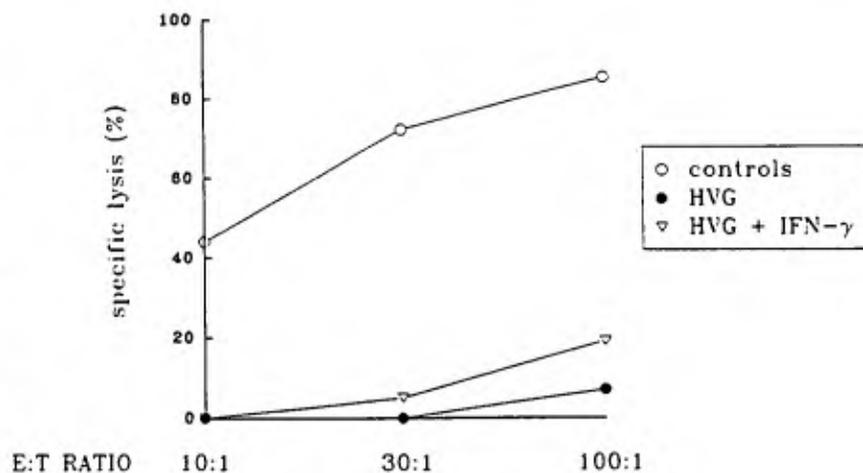


Table V. Effect of rIFN- $\gamma$  on cytokine production in MLC\*

Responders	(A)xBALB(c)F <sub>1</sub> Stimulators				C57 Bl/6 Stimulators			
	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (U/ml)	IL-4 (U/ml)	IL-10 (U/ml)	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (U/ml)	IL-4 (U/ml)	IL-10 (U/ml)
BALB/c controls	51	43.5	14.5	<2	350	165.1	15	<2
HVG	<15	<15	238.5	11.6	<15	80.6	3	<2
HVG + rIFN- $\gamma$	279	60.7	110	8.3	490	137.9	69	4.5

\* MLCs were prepared between  $2.5 \times 10^6$  responder T cells and  $2.5 \times 10^6$  irradiated stimulator SC. Cytokine levels in MLC supernatants were measured as described in *Materials and Methods*. Results are values obtained with a pool of three to six mice per group.

levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  secreted in MLCs. However, alloreactive T cells still produced IL-4 and IL-10. Experiments at a single-cell level are required for a precise interpretation of these data in terms of T cell subsets, but they suggest that the neonatal injection of rIFN- $\gamma$  promoted the differentiation of alloreactive T cells into Th0-type cells (24). Although the response of rIFN- $\gamma$ -treated mice did not prevent the establishment of chimerism, the number of donor cells was significantly lower in LN of those animals compared with LN of untreated HVG mice. As rIFN- $\gamma$ -treated mice did not generate antidonor CTLs in MLC, thus indicating a lack of antidonor MHC class I cytotoxic activity, it is possible that their CD4<sup>+</sup> cells were able to mediate the rejection of some donor cells. Along this line, we observed that the neonatal injection of rIFN- $\gamma$  completely abrogated tolerance to a donor-type skin graft (data not shown). This result might be related to the restoration of rIFN- $\gamma$  production by donor-specific CD4<sup>+</sup> cells (30).

Finally, this study extends previous observations made in studies of experimental leishmaniasis (31), which suggest that rIFN- $\gamma$  could be useful in the treatment or prevention of immunopathologic syndromes mediated by Th2 cells. Indeed, recently we reported dramatic effects of rIFN- $\gamma$  administration in Omenn's syndrome, a congenital form of human immunodeficiency associated with hyper-eosinophilia and expansion of Th2-type cells (32). Certain forms of mycobacterial diseases (33) and early stages of

HIV infection (34) are other examples of pathologic settings associated with TH2 activities in which immunointervention with rIFN- $\gamma$  might prove to be beneficial.

### Acknowledgment

We thank Dr. J. J. Weening (University of Amsterdam) for providing purified rat GBM.

### References

1. Billingham, R. E., L. Brent, and P. Medawar. 1956. Quantitative studies on transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 239:357.
2. Feng, H. M., A. L. Glasebrook, H. D. Engers, and J. A. Louis. 1983. Clonal analysis of T cell unresponsiveness to alloantigens induced by neonatal injection of  $F_1$  spleen cells into parental mice. *J. Immunol.* 131:2165.
3. Abramowicz, D., P. Vandervorst, C. Bruyns, J. M. Doutrelepon, C. Bruyns, and M. Goldman. 1990. Persistence of anti-donor allohelper T cells after neonatal induction of allotolerance in mice. *Eur. J. Immunol.* 20:1647.
4. Goldman, M., D. Abramowicz, P. Lambert, P. Vandervorst, C. Bruyns, and C. Toussaint. 1988. Hyperactivity of donor B cells after neonatal induction of lymphoid chimerism in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 72:79.
5. Luzuy, S., J. Merino, H. D. Engers, S. Izui, and P. H. Lambert. 1986. Autoimmunity after induction of neonatal tolerance to alloantigens: role of B cell chimerism and  $F_1$  donor B cell activation. *J. Immunol.* 136:4420.
6. Schurmans, S., C. H. Heusser, H. Y. Qin, J. Merino, G. Brighthouse, and P. H. Lambert. 1990. In vivo effects of anti-IL-4 monoclonal antibody on neonatal induction of tolerance and on associated autoimmune syndrome. *J. Immunol.* 145:2465.

7. Merino, J., S. Schurmans, M. A. Dochosal, S. Izui, and P. H. Lambert. 1989. Autoimmune syndrome after induction of neonatal tolerance to alloantigen. *J. Immunol.* 143:2202.
8. Goldman, M., H. M. Feng, H. Engers, A. Hochman, J. Louis, and P. H. Lambert. 1983. Autoimmunity and immune complex disease after neonatal induction of transplantation tolerance in mice. *J. Immunol.* 131:251.
9. Adkins, B., and K. Hamilton. 1992. Freshly isolated, murine neonatal T cells produce IL-4 in response to anti-CD3 stimulation. *J. Immunol.* 149:3448.
10. Bendelać, A., and R. H. Schwartz. 1991. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* 353:68.
11. Abramowicz, D., M. Goldman, C. Bruyns, P. Lambert, Y. Thoua, and C. Toussaint. 1987. Autoimmune disease after neonatal injection of semi-allogeneic spleen cells in mice: involvement of donor B and T cells and characterization of glomerular deposits. *Clin. Exp. Immunol.* 70:61.
12. Florquin, S., D. Abramowicz, E. de Heer, J. A. Bruijn, J. M. Doutrelepon, M. Goldman, and P. Hoedemaeker. 1991. Renal immunopathology in murine host-versus-graft disease. *Kidney Int.* 40:852.
13. Abramowicz, D., J. M. Doutrelepon, P. Lambert, P. Vandervorst, C. Bruyns, and M. Goldman. 1990. Increased expression of Ia antigens on B cells after neonatal induction of lymphoid chimerism in mice: role of interleukin-4. *Eur. J. Immunol.* 20:469.
14. De Wit, D., M. Van Mechelen, C. Zanin, J. M. Doutrelepon, T. Velu, C. Gérard, D. Abramowicz, J. P. Scheerlinck, P. De Baetselier, J. Urbain, M. Goldman, and M. Moser. 1993. Preferential activation of TH2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J. Immunol.* 150:1.
15. Durez, P., D. Abramowicz, C. Gerard, M. Van Mechelen, Z. Amraoui, C. Dubois, T. Velu, and M. Goldman. 1993. In vivo induction of interleukin-10 by anti-CD3 monoclonal antibody or bacterial lipopolysaccharide: differential modulation by cyclosporin A. *J. Exp. Med.* 177:551.
16. Takai, S., M. Tateno, T. Hirano, N. Kondo, S. Hirose, and T. Yoshiki. 1993. Increased IgE level as a marker of host-versus-graft disease: inhibition of this HVG with a monoclonal antibody to IL-4. *Cell. Immunol.* 149:1.
17. Umland, S. P., S. Razac, D. K. Nahrebne, and B. W. Scymour. 1992. Effects of in vivo administration of interferon (IFN)- $\gamma$ , anti-IFN- $\gamma$ , or anti-interleukin-4 monoclonal antibodies in chronic autoimmune graft-versus-host-disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 63:66.
18. Heremans, S., A. Billiau, A. Colombatti, J. Hilgers, and P. De Somer. 1978. Interferon treatment of NZB mice: accelerated progression of autoimmune disease. *Infect. Immun.* 21:925.
19. Adam, C., Y. Thoua, P. Ronco, P. Verroust, M. Tovey, and L. Morel-Maroger. 1980. The effect of exogenous interferon: acceleration of autoimmune and renal diseases in (NZB/W)<sub>F1</sub> mice. *Clin. Exp. Immunol.* 40:373.
20. Jacob, C. O., P. H. van der Meide, and H. O. McDevitt. 1987. In vivo treatment of (NZB  $\times$  NZW)<sub>F1</sub> lupus-like nephritis with monoclonal antibody to interferon  $\gamma$ . *J. Exp. Med.* 166:798.
21. Snapper, C. M., and W. E. Paul. 1987. Interferon- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236:944.
22. Finkelman, F. D., I. M. Katona, T. R. Mosmann, and R. L. Coffman. 1988. IFN- $\gamma$  regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* 140:1022.
23. Vandenabeele, P., D. Abramowicz, D. Berus, J. Van Der Heyden, J. Grooten, V. Donckier, E. L. Hooghe-Peters, M. Goldman, and W. Fiers. 1993. Increased IL-6 production and IL-6-mediated Ig secretion in murine host-versus-graft disease. *J. Immunol.* 150:4179.
24. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145.
25. Go, N. F., B. E. Castle, R. Barret, R. Kastelein, W. Dang, T. R. Mosmann, K. W. Moore, and M. Howard. 1990. Interleukin-10 (IL-10), a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.* 172:1625.
26. Fitch, F. W., M. D. McKisic, D. W. Lancki, and T. F. Gajewski. 1993. Differential regulation of murine lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.* 11:29.
27. Chatelain, R., K. Varkila, and R. L. Coffman. 1992. IL-4 induces a TH2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol.* 148:1182.
28. Belosevic, M., D. S. Finbloom, P. H. Van Der Meide, M. V. Slayter, and C. A. Nacy. 1989. Administration of monoclonal anti-IFN- $\gamma$  antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 143:266.
29. Sadick, M. D., F. P. Heinzel, B. J. Holaday, R. T. Pu, R. S. Dawkins, and R. M. Locksley. 1990. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody: evidence for a T cell-dependent interferon  $\gamma$ -independent mechanism. *J. Exp. Med.* 171:115.
30. Rosenberg, A. S., D. S. Finbloom, T. G. Maniero, P. H. Van der Meide, and A. Singer. 1990. Specific prolongation of MHC class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody. *J. Immunol.* 144:4648.
31. Scott, P. 1991. IFN- $\gamma$  modulates the early development of TH1 and TH2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 144:3149.
32. Schandené, L., A. Ferster, F. Mascart-Lemoine, A. Crusiaux, C. Gérard, A. Marchant, M. Lybin, T. Velu, E. Sariban, and M. Goldman. 1993. T helper type-2 like cells and therapeutic effects of interferon- $\gamma$  in combined immunodeficiency with hyper eosinophilia (Omenn's syndrome). *Eur. J. Immunol.* 23:56.
33. Modlin, R. L., and T. B. Nutman. 1993. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr. Opin. Immunol.* 5:511.
34. Clerici, M., F. A. Hakim, D. J. Venzon, S. Blatt, C. W. Hendrix, T. A. Wynn, and G. M. Shearer. 1993. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J. Clin. Invest.* 91:759.

#### **4. L'ADMINISTRATION D'IFN- $\gamma$ RESTAURE LE REJET DE GREFFE DE PEAU MAIS NE MODIFIE PAS LE CHIMERISME APRES L'INJECTION NEONATALE D'ALLOANTIGENES**

Données non publiées.

Dans ce travail, nous avons déterminé l'effet de l'administration d'IFN- $\gamma$  sur l'induction de la tolérance de transplantation après l'injection néonatale d'alloantigènes.

Nous avons suivi le même protocole expérimental que dans le travail précédent, les souris étant greffées à l'âge de 4 semaines avec de la peau de souris A/J.

Nous avons observé que l'administration précoce d'IFN- $\gamma$  restaure la capacité de rejeter une greffe de peau de type donneur. La persistance des cellules du donneur ayant été démontrée chez ces animaux, il existe donc dissociation entre le chimérisme lymphoïde et le rejet d'allogreffe.

Ces observations démontrent que l'établissement du chimérisme est une condition nécessaire mais non suffisante pour maintenir la tolérance de transplantation dans ce modèle. Chez les animaux traités avec de l'IFN- $\gamma$ , le rejet de la greffe de peau dépend probablement de la sécrétion endogène d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T alloréactifs alors que l'incapacité de rejeter les cellules du donneur injectées à la naissance pourrait être secondaire à l'absence de lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxiques allospécifiques.

## **DISSOCIATION ENTRE CHIMERISME ET TOLERANCE DE TRANSPLANTATION APRES INJECTION NEONATALE D'ALLOANTIGENES**

### **Introduction**

Le chimérisme lymphoïde et la survie prolongée d'une allogreffe sont le plus souvent associés après l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques (1, 2, 3). Les mécanismes par lesquels le chimérisme intervient dans l'induction de la tolérance sont incomplètement compris. Lorsqu'il existe une disparité d'antigènes de classe I et de classe II, comme dans le modèle que nous avons étudié, les animaux présentent une tolérance dissociée. Alors que des lymphocytes CD4+ alloréactifs de phénotype TH2 peuvent persister chez les animaux tolérants, les lymphocytes CD8+ allospécifiques sont éliminés ou inactivés dans le thymus (4, 5, 6). L'établissement du chimérisme joue un rôle prépondérant dans ce double phénomène. D'une part, la différenciation des cellules CD4+ en TH2 dépend d'une interaction étroite entre les cellules du donneur et les lymphocytes naïfs chez le nouveau-né (Schurmans 1994). D'autre part, l'introduction des cellules allogéniques dans le thymus des animaux receveurs peut induire la déletion clonale des cellules cytotoxiques allospécifiques. Dans certaines souches de souris résistantes à l'induction de tolérance de transplantation, la perte progressive du chimérisme coïncide avec la ré-apparition de cellules CD8+ anti-donneurs (7).

Des travaux récents ont également mis en évidence une association entre le chimérisme et la survie prolongée d'allogreffe en transplantation clinique (8). La contribution du chimérisme à l'acceptation de la greffe dans ces cas n'est pas établie. La migration des cellules du donneur dans les organes lymphoïdes du receveur pourrait être la conséquence et non la cause d'une certaine forme de tolérance à l'égard des alloantigènes.

Dans le travail suivant, nous avons étudié la relation entre le chimérisme lymphoïde et la survie d'une greffe de peau, après injection néonatale d'alloantigènes, dans deux situations différentes. Premièrement, nous avons vérifié que le rejet de greffe de peau observé chez certaines souris uniquement injectées avec des cellules semi-allogéniques, n'était pas du à un défaut d'induction de chimérisme. Deuxièmement, nous avons observé que l'administration précoce d'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), après l'injection néonatale d'alloantigène, permettait de restorer le rejet d'une greffe de peau donneur-spécifique sans interférer avec l'induction du chimérisme. Dans ces deux conditions

nous avons donc démontré que la persistance du chimérisme lymphoïde n'était pas une condition suffisante pour induire une tolérance de transplantation.

### **Matériel et méthodes**

#### **Souris et induction néonatale de tolérance**

Les souriceaux nouveau-nés BALB/c sont injectés par voie intra-péritonéale, au cours des 24 premières heures de vie, avec  $10^8$  cellules spléniques semi-allogéniques provenant d'un animal hybride de première génération F1(A/JxBALB/c). Les animaux témoins sont des souris BALB/c non manipulées.

#### **Administration in vivo d'IFN- $\gamma$**

Dans certaines expériences, les souris injectées à la naissance avec les cellules semi-allogéniques, ont reçu  $2 \times 10^6$   $\mu\text{g}$  d'IFN- $\gamma$ , injectés par voie intra-péritonéale, aux jours 1 et 3 après la naissance.

#### **Mesure du chimérisme**

Deux méthodes ont été utilisées:

Premièrement, nous avons mesuré dans le sérum, les taux d'immunoglobulines produites spécifiquement par les cellules du donneurs. Ces immunoglobulines sont détectées lors d'un test ELISA utilisant un anticorps monoclonal reconnaissant l'allotype Ig<sup>e</sup> des IgG2b de la souche A/J. Les résultats sont exprimés en pourcents par rapport aux taux d'allotype mesurés chez une souris F1(A/JxBALB/c).

Deuxièmement, le chimérisme lymphoïde a été confirmé par la détection directe des cellules du donneur au niveau des ganglions lymphatiques des animaux receveurs. Dans ces expériences, nous avons utilisé un anticorps monoclonal couplé à la biotine et reconnaissant spécifiquement l'antigène de classe I (Ia<sup>k</sup>) du donneur. Le pourcentage de cellules fluorescentes a été déterminé à l'aide d'un cytofluorographe. Dans des expériences contrôles, 100% des cellules provenant des ganglions lymphatiques de souris F1(A/JxBALB/c) étaient positives dans ce test.

#### **Grefte de peau**

Les greffes de peau ont été réalisées chez des souris âgées de 4 semaines, en utilisant de la peau prélevée au niveau de la queue de souris A/J. Le rejet a été défini comme la perte totale de la greffe.

## **Résultats**

### **Survie de greffe de peau et chimérisme après injection néonatale de cellules semi-allogéniques**

Comme attendu, l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques prolonge significativement la survie d'une greffe de peau provenant de la souche donneuse (Figure 1). Parmi ces animaux, on peut distinguer 2 groupes: Un premier groupe est constitué par les souris chez lesquelles la greffe survit au-delà du cinquantième jour après la transplantation. Ces animaux sont défini comme hautement tolérants. Un deuxième groupe est représenté par les animaux présentant une tolérance intermédiaire, chez lesquels la survie de greffe est significativement plus longue que chez des souris contrôles (Tableau I), mais limitée, ne dépassant pas trente jours. Chez les souris hautement tolérantes, les greffes de peau subissent des modifications morphologiques les distinguant clairement de greffes syngéniques réalisées lors d'expériences contrôles.

La mesure des taux d'allotype du donneur dans ces deux groupes indique que le rejet observé chez 50% des souris n'est pas du à un défaut d'induction de chimérisme. En effet, les taux sériques d'allotype mesurés à trois semaines sont identiques dans les deux groupes (Tableau I).

### **Effet de l'IFN- $\gamma$**

L'administration de 20  $\mu$ g d'IFN- $\gamma$  recombinant permet la restauration du rejet de greffe chez les souris injectées à la naissance avec des cellules semi-allogéniques, tous les animaux, rejetant leur greffe avant le 25ème jour (Figure 1).

Ce traitement, par contre, n'interfère pas avec l'induction de chimérisme. Les souris ayant reçu de l'IFN- $\gamma$ , présentent des taux sériques d'allotype mesurés à trois semaines similaires à ceux observés après la simple injection néoantale de cellules semi-allogéniques (Tableau I). Ces résultats sont confirmés par la visualisation directe des cellules du donneur dans les ganglions lymphatiques d'animaux âgés de 3 semaines. 5.7  $\pm$  0.7 % des cellules présentes dans les ganglions lymphatiques sont marquées par un anticorps reconnaissant spécifiquement les cellules du donneur. Chez des animaux contrôles non injectés, on ne détecte pas de cellules marquées de façon non spécifique.

## **Discussion**

Ces résultats démontrent que, dans le modèle d'injection néonatale d'alloantigènes, le chimérisme est une condition nécessaire mais non suffisante pour induire une tolérance de transplantation. Alors que nous n'avons jamais observé de survie prolongée d'allogreffe en l'absence de chimérisme, certaines souris peuvent en même temps rejeter une greffe de peau et tolérer de façon prolongée les cellules du donneur injectées à la naissance. D'autres modèles d'induction de tolérance ont démontré de façon similaire qu'il pouvait exister une dissociation entre le chimérisme et la tolérance vis-à-vis d'une allogreffe (9). Différents mécanismes peuvent intervenir dans ce phénomène.

Chez les souris qui non pas reçu d'IFN- $\gamma$ , les taux sériques d'IgE, reflétant l'activité biologique de l'IL-4, sont similaires dans le groupe des animaux qui rejettent une greffe de peau et dans le groupe des animaux hautement tolérantes (données non montrées). Le défaut de tolérance de transplantation n'est donc pas secondaire à un défaut de différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> alloréactives en lymphocytes de type TH2. Au contraire, ces cellules pourraient intervenir dans le rejet différé observé chez ces animaux. En effet, certaines expériences ont montré que des cellules TH2 sont capables de médier des réactions d'hypersensibilité retardée (10) et peuvent induire certaines formes de rejets chroniques, associées à un infiltrat riche en éosinophiles (11). En comparaison avec les souris injectées avec un plus petit nombre de cellules semi-allogéniques, les animaux étudiés dans ce protocole développent en même temps une immunopathologie plus sévère et une moins bonne tolérance à l'égard d'une greffe de peau provenant du donneur. Des réactions médiées par des anticorps ou des dépôts de complexe immuns au sein de la greffe pourraient également contribuer au rejet chez ces animaux.

Chez les souris traitées par l'IFN- $\gamma$ , les mécanismes intervenant dans la dissociation entre le chimérisme et le rejet d'une greffe de peau sont probablement différents. Comme nous l'avons précédemment observé, l'administration d'IFN- $\gamma$  restaure la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> alloréactifs (12). La production de cytokines TH1, en particulier d'IFN- $\gamma$ , par ces cellules joue probablement un rôle fondamental dans la restauration du rejet. En effet, en cas de disparité d'antigène de classe II, le rejet d'une greffe de peau dépend essentiellement de la production d'IFN- $\gamma$  (13). Les souris ayant reçu de l'IFN- $\gamma$  secrètent également des taux accrus d'IgG2a. Ces anticorps cytotoxiques capables d'activer le complément pourraient participer au rejet.

En parallèle, les souris traitées à l'IFN- $\gamma$  restent incapables de rejeter les cellules du donneur injectées à la naissance. Les cellules du donneur circulantes chez ces animaux sont en grande partie constituées des lymphocytes B, différenciés en plasmocytes exprimant essentiellement des antigènes de classe I. La reconnaissance et le rejet de ces cellules pourrait donc dépendre de la présence de lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxiques compétents. Or, comme nous l'avons vu (12), le traitement par l'IFN- $\gamma$  ne permet pas de restorer les fonctions cytotoxiques des lymphocytes CD8<sup>+</sup> allospécifiques, ces cellules étant probablement éliminées durant la période néonatale.

Enfin, d'autres modèles ont mis en évidence une dissociation entre le rejet de greffe de peau et l'acceptation d'un autre organe (14). L'immunogénicité particulière de la peau pourrait notamment être liée à la présence d'antigènes spécifiques (15, 16) ou à l'efficacité particulière de la fonction de présentation d'antigènes par les cellules de Langerhans de la peau.

**Figure 1: Survie des greffes de peau**

**Tableau I: Taux d'allotype dans le sérum de souris âgées de trois semaines**

Traitement neonatal	N	Survie moyenne greffe de peau (jours)	Allotype du donneur (%)
Néant	10	14±1	<2
10 <sup>8</sup> cellules (A/JxBALB/c)F1 ip	9	<50	18.2±4.8
10 <sup>8</sup> cellules (A/JxBALB/c)F1 ip	9	21±2 <sup>a</sup>	12.6±3.1 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup> cellules (A/JxBALB/c)F1 ip + 20 µg IFN-γ	14	19±1 <sup>a</sup>	23.4±4.6 <sup>b</sup>

Les résultats représentés sont des moyennes ± SEM.

<sup>a</sup>: p<0.01 comparé aux souris contrôles non injectées

<sup>b</sup>: Non statistiquement différent comparé aux taux mesurés chez les souris hautement tolérantes

**Bibliographie**

1. Harris TN et al. Effect of antigraft strain antibodies on skin allografts in immunologically tolerant mice. *Transplantation* 1973; 15:383.
2. Sterilein JW et al. Neonatal tolerance to H-2 alloantigens: procuring graft acceptance the "old-fashioned" way. *Transplantation* 1991; 52:1.
3. Luzuy S et al. Autoimmunity after induction of neonatal tolerance to alloantigens: role of B cells chimerism and F1 donor B cell activation. *J. Immunol.* 1986; 136:4420.
4. Abramowicz D et al. Persistence of anti-donor allohelper T cells after neonatal induction of allotolerance in mice. *Eur. J. Immunol.* 1990; 20:1647.
5. Mohler KM et al. (a) Lymphokine production by MLR-reactive reaction lymphocytes obtained from normal mice and mice rendered tolerant of class II MHV antigens. *Transplantation* 1989; 47:625.
6. Chen N et al. Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation* 1995; 59:933.
7. Ruiz P et al. Evidence that I-E negative mice resistant to neonatal H-2 tolerance induction display ubiquitous thymic clonal deletion of donor-reactive T cells. *Transplantation* 1993; 55:321.
8. Starzl TE et al. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *The Lancet* 1992; 339:1579.
9. Alard. *Transplantation* 1995 (à compléter)
10. Müller KM et al. TH2 cells mediate IL-4 dependent local tissue inflammation. *J. Immunol.* 1993; 150:5576.
11. Chan SH et al. In vivo depletion of CD8+ T cells results in TH2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59:1155.
12. Donckier V et al. IFN- $\gamma$  prevents TH2 mediated pathology after neonatal injection of semiallogeneic spleen cells in mice. *J. Immunol.* 1994; 153:2361.
13. Rosenberg AS et al. Specific prolongation of MHC Class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN-gamma monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1990; 144:4648.

14. Dahmen U et al. Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice. *Transplantation* 1994; 58:1.
15. Fleming HL et al. An immunogenetic analysis of skin antigens in mice. *Immunogenetics* 1981; 14:517.
16. Steinmuller D et al. Transplantation biology and immunogenetics of murine skin-specific (sk) alloantigens. *Transplant. Proc.* 1980; 12:100.

## **5. LA NEUTRALISATION PRECOCE DE L'IL-10 N'EMPECHE PAS L'INDUCTION DE TOLERANCE.**

Early neutralization of IL-4 but not of IL-10 abrogates neonatal induction of transplantation tolerance in mice. V. Donckier, M. Wissing, D. Abramowicz, C. Bruyns, M.L. Vanderhaeghen, M. Lybin and M. Goldman. *Transplant. Proc.* 1995; 27:186.

L'IL-10 pouvant également influencer la différenciation des lymphocytes T CD4+, nous avons étudié le rôle de cette cytokine dans l'induction de la tolérance de transplantation après l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques.

Des souris BALB/c ont reçu 1 mg d'anticorps monoclonal anti-IL-10 aux jours 1 et 3 après l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques. Les taux sériques d'IgE ont été mesurés à 3 semaines. Les greffes de peau de type donneur ont été réalisées à 4 semaines.

Nous avons observé que l'administration précoce d'anticorps anti-IL-10 n'empêche pas l'induction de la tolérance de transplantation. Les animaux traités avec l'anticorps neutralisant tolèrent une greffe de peau de la souche donneuse de la même façon que des animaux traités avec l'anticorps témoin.

Parallèlement, la neutralisation précoce de l'IL-10 ne modifie pas l'hypersécrétion d'IgE chez les animaux injectés à la naissance de cellules semi-allogéniques.

Ces résultats démontrent que l'IL-10 n'intervient pas de façon prépondérante dans l'induction néonatale de la tolérance de transplantation. Les taux élevés d'IgE mesurés chez les souris traités précocement avec l'anticorps anti-IL-10 indiquent également qu'il persiste une activation préférentielle persistante des fonctions de type TH2 chez ces animaux.

## NEONATAL TOLERANCE

## Early Neutralization of IL-4 But Not of IL-10 Abrogates Neonatal Induction of Transplantation Tolerance in Mice

V. Donckier, M. Wissing, D. Abramowicz, C. Bruyns, M.L. Vanderhaeghen, M. Lybin, and M. Goldman

NEONATAL injection of semi-allogeneic cells in mice induces a state of tolerance characterized by persistent lymphoid chimerism and prolonged survival of donor-type skin graft.<sup>1</sup> In several strain combinations, this tolerance is associated with differentiation of anti-donor T cells into TH2-type cells secreting high levels of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10) and with a lack of antidonor TH1 activities as indicated by deficient interleukin-2 and interferon-gamma production.<sup>2-3</sup> Our previous works demonstrated that this TH2-like cytokine profile was already present at the mRNA level 1 week after neonatal injection of semi-allogeneic cells.<sup>4</sup> Furthermore, the increased IgE serum levels indicated that IL-4 was biologically active in tolerant mice.<sup>5</sup> In the present study, we investigated whether IL-4 or IL-10 are involved in the establishment of neonatal transplantation tolerance.

## MATERIALS AND METHODS

## Induction of Tolerance and MAb Treatment

BALB/c mice were injected intravenously with  $10^7$  (A/JxBALB-c)-F1 spleen cells on the first day of life. In vivo neutralization of IL-4 or IL-10 was achieved by intraperitoneal injection of 1 mg of 11B11 anti-mouse IL-4 MAb in ascites form or the same amount of JE2.5 anti-mouse IL-10 MAb given on days 1 and 3. Control mice were

From the Hopital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

This work was supported by grant of the Fonds National de la Recherche Scientifique/Télévie. V. Donckier and M. Wissing are research fellows of the Fondation Erasme.

Address reprint requests to Dr M. Goldman, Department of Immunology, Hopital Erasme, 808 route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium.

© 1995 by Appleton & Lange  
0041-1345/95/\$3.00/+0

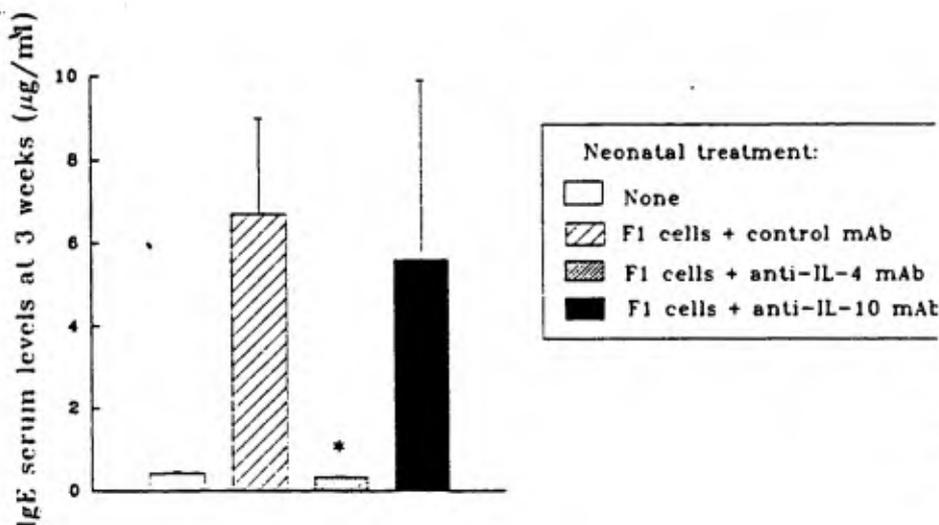


Fig 1. Effects of anti-cytokine MAb treatments on IgE serum levels (mean  $\pm$  SD of at least four mice per group) measured 3 weeks after neonatal injection of semi-allogeneic cells; \*  $P < .02$  as compared with mice treated with control MAb.

## EARLY NEUTRALIZATION OF IL-4

treated following the same protocol with isotype-matched irrelevant MAb (LO-DNP).

## Skin Grafting

Mice were grafted at 4 weeks of age using tail skin from (A/J x BALB/c)F1 hybrid mice. Mice that retained their graft for more than 50 days were considered as tolerant.

## Quantification of IgE Serum Levels

Blood samples from 3-week-old mice were obtained by retroorbital puncture. Serum levels of IgE were measured by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using isotype-specific antisera obtained from MAb (Uppsala, Sweden). The limit of detection in this test was 0.016 µg/mL.

## RESULTS AND DISCUSSION

First, we verified the efficiency of anti-IL-4 MAb treatment by confirming previous observations<sup>5</sup> indicating that perinatal anti-IL-4 MAb injection prevented the development of serum hyper IgE after neonatal injection of semi-allogeneic spleen cells (Fig 1). In parallel experiments, anti-IL-10 MAb injection did not influence IgE serum levels. As shown in Table 1, treatment with anti-IL-4 MAb almost completely prevented the induction of transplantation tolerance. Indeed, although neonatal injection of semi-allogeneic spleen cells and control MAb led to tolerance in more than 85% of mice, treatment with anti-IL-4 MAb resulted in less than 10% of tolerant animals. In contrast, administration of anti-IL-10 MAb did not influence the establishment of tolerance (Table 1).

These data indicate that early secretion of IL-4 but not of IL-10 is required for the establishment of neonatal toler-

TABLE 1. Effects of Perinatal Administration of Anti-IL-4 or Anti-IL-10 MAbs on Neonatal Transplantation Tolerance

Neonatal Treatment	N	% of Mice Free of Rejection	
		Day 20	Day 50
None	11	0	0
F1 cells + control MAb	9	88	88
F1 cells + anti-IL-4 MAb	14	35*	7*
F1 cells + anti-IL-10 MAb	4	75	75

\*P < 0.01 as compared with mice treated with control MAb or anti-IL-10 MAb.

ance to alloantigens. As IL-4 is known to promote the differentiation of TH2 cells and to inhibit the production of TH1-type cytokines,<sup>6</sup> we currently investigate the possibility that abrogation of tolerance by perinatal administration of anti-IL-4 MAb is related to restoration of antidonor TH1 functions involved in allograft rejection.

## REFERENCES

1. Billingham RE, Brent L: *Phil Trans Roy Soc Lond (Biol)* 242:439, 1959
2. Abramowicz D, Doutrelepont JM, Lambert P, et al: *Eur J Immunol* 20:1647, 1990
3. Donckier V, Abramowicz D, Bruyts C, et al: *J Immunol* 153:2361, 1994
4. Abramowicz D, Durez P, Gérard C, et al: *Transplant Proc* 25:312, 1993
5. Schurmans S, Heusser CH, Qin HY, et al: *J Immunol* 145:2465, 1990
6. Seder RA, Paul WE, Davis M, et al: *J Exp Med* 176:1091, 1992

## **6. L'IL-10 INTERVIENT DANS L'IMMUNOPATHOLOGIE INDUITE PAR L'INJECTION NEONATALE D'ALLOANTIGENES.**

Role of interleukin 10 in immunopathology induced by neonatal injection of semiallogenic cells in mice. V. Donckier, D. Abramowicz, M.L. Vanderhaeghen and M. Goldman. (travail soumis à publication).

Différents travaux ont démontré que l'IL-10 pouvait intervenir comme facteur de stimulation des lymphocytes B. Chez les souris injectées à la naissance avec des cellules semi-allogéniques, les lymphocytes alloréactifs de type TH2 stimulent de façon polyclonale les lymphocytes B du donneur et induisent de la sorte un syndrome auto-immun. Les lymphocytes TH2 produisant des taux élevés d'IL-10 en culture mixte, nous avons étudié le rôle de cette cytokine dans le développement de l'immunopathologie chez les animaux tolérants.

Nous avons d'abord vérifié que chez ces souris il existe effectivement une sécrétion accrue d'IL-10 *in vivo*. Ensuite, afin de préciser le rôle pathogène de cette cytokine, nous avons étudié l'effet de l'administration prolongée d'anticorps anti-IL-10 sur la sécrétion d'immunoglobulines chez les souris injectées à la naissance avec des cellules semi-allogéniques.

Des souris de souche BALB/c ont été injectées à la naissance avec  $10^8$  cellules (AxB)F1. Chez ces animaux, nous avons évalué la production d'IL-10 *in vivo*; d'une part, par des expériences de PCR réalisées à partir de cellules CD4+ purifiées, et d'autre part, par la mesure des taux sériques d'IL-10 après administration d'un anticorps anti-CD3 activateur, le 145-2C11. Nous avons ensuite étudié les effets de l'administration prolongée d'anticorps anti-IL-10, les souris recevant 1 mg d'anticorps neutralisant, tous les 2 jours, pendant 2 semaines, après l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques. Les taux sériques d'IgE, d'IgG1, d'IgG2a, d'IgM et d'anticorps anti-DNA ont été mesurés chez des animaux âgés de 3 semaines. Les animaux témoins ont reçu un anticorps de même isotype, selon le même protocole.

Nous avons d'abord observé que l'injection néonatale d'alloantigènes induisait l'expression accrue des ARNm codant pour l'IL-10 dans les splénocytes CD4+ d'animaux âgés de 3 semaines. Chez ces animaux, l'administration d'un anticorps anti-CD3 activant les lymphocytes T, induit également la sécrétion de taux accrus d'IL-10. Par ailleurs, la neutralisation prolongée de l'IL-10 endogène par un anticorps monoclonal atténue l'hypergammaglobulinémie induite par l'injection néonatale

d'alloantigènes. Chez les animaux traités avec l'anticorps anti-IL-10, les taux sériques d'IgM sont significativement réduits. On observe en outre, une tendance à la réduction de l'hypersécrétion d'IgE et d'IgG1.

Ces résultats confirment que dans le modèle que nous avons étudié, les souris tolérantes sécrètent des taux accrus d'IL-10. Les cellules CD4+ participent à cette hypersécrétion. Chez ces animaux, l'IL-10 joue un rôle dans la pathogénie du syndrome auto-immun, notamment en induisant une hypersécrétion des IgM.

Ces données rejoignent celles observées dans d'autres modèles de maladies auto-immunes, notamment dans le lupus érythémateux chez l'homme, et suggèrent que la neutralisation de l'IL-10 pourrait représenter un intérêt thérapeutique dans ces conditions.

## ROLE OF INTERLEUKIN-10 IN IMMUNOPATHOLOGY INDUCED BY NEOANATAL INJECTION OF ALLOANTIGENS IN MICE

### Introduction

It is known since the works of Medawar that neonatal injection of semi-allogeneic cells can induce a state of specific tolerance to donor tissue (1). In several strain combinations, the induction of tolerance is associated with the occurrence of a lupus-like autoimmune syndrome characterized by hypergammaglobulinaemia, secretion of autoantibodies, circulating immune complexes, lymphosplenomegaly and glomerulonephritis (2). These mice present a state of split tolerance: while the anti-donor CD8<sup>+</sup> cells undergo to clonal deletion or inactivation, the anti-donor CD4<sup>+</sup> cells are persistent in adult tolerant mice (3). These alloreactive CD4<sup>+</sup> cells display a TH2 phenotype, as they secrete increased levels of IL-4 and IL-10 but are deficient to produce IL-2 or IFN- $\gamma$  in mixed lymphocyte culture (4). The development of the autoimmune syndrome is closely related to the induction of chimerism and interactions between host TH2 cells and donor B cells resulting in host-versus-graft (HVG) disease. According this, several reports have demonstrated that IL-4, secreted by anti-donor TH2 cells plays a major role in polyclonal activation of donor B cells, leading to production of high levels of immunoglobulins, especially of IgE and IgG1 isotypes (5). Nevertheless, the neutralization of IL-4 does not totally prevent the development of the pathology, suggesting that other mediators are implicated.

It was recently reported that IL-10 could be involved in the pathogeny of SLE syndroms both in human and in experimental models in mice (6, 7, 8). These studies have demonstrated that IL-10 participate to the hypersecretion of IgM, IgG and IgA and secretion of autoantibodies in patients with SLE (7). Moreover, *in vivo* neutralization of IL-10 significantly reduced the intensity of the immunopathology in mice wich spontaneously developed a lupus-like syndrom (8).

The aim of the present study was first to confirm that mice injected at birth with alloantigens secrete indeed increased levels of IL-10, both *in vivo* and *in vitro*. Second, we investigate the possible role of IL-10 in the immunopathology in these mice.

## **Materials and methods**

### **Mice and neonatal injection of alloantigen**

BALB/c and A/J mice were purchased from Harlan CPB (Zeist, The Netherlands) and the Centre National de la Recherche Scientifique (Orléans, France), respectively. (A/JxBALB/c)F1 hybrids were bred at our own colony. HVG disease was induced in BALB/c mice by the i.p. injection of  $10^8$  (A/JxBALB/C)F1 hybrid spleen cells within the first 24h of life. Control mice were left untreated.

### **Anti-IL-10 treatment**

For *in vivo* neutralization of IL-10, mice were injected from day 1 to day 14 with 1 mg of anti-mouse IL-10 JES5-2A5 in ascites form, given intraperitoneally each 2 days. In control experiments, mice were injected with the same amounts of an isotype-matched irrelevant mAb (LO-DNP), following the same timing.

### **Purification of T and CD4+ cells**

CD4+ cells were isolated by a combination of nylon wool passage and panning techniques as previously described (9). Briefly, spleen cells from a pool of 5 mice per group were enriched for T cells by passage over nylon wool columns after RBC lysis. T cells were purified by incubation on petri dishes precoated with anti-rat Igs rabbit Abs cross-reacting with murine Igs (Dako, Glostrup, Denmark). At this step, the Ig-negative nonadherent cells were recovered for experiments with purified T cells. The percentage of T cells in this preparation was of 90% as assessed by flow cytometry using . For further purification of CD4+ cells, cells were incubated on ice with appropriate dilutions of anti-CD4 mAb. After washing, these cells were incubated on ice in a surface-activated cell culture flask (Applied Immune Sciences, Menlo Park, Ca) precoated with anti-rat Ig rabbit Abs (Dako). The non-adherent population was discarded by gentle washes with cold PBS. To recover the adherent CD4+ cells, 10 ml of RPMI 1640 containing 10% FCS were added to the flask. After 15 min incubation at room temperature, the flask was vigorously shaken and CD4+ cells were harvested by forceful pipetting. More than 99% of recovered cells were CD4+ cells as shown by FACS analysis using phycoerythrin-conjugated L3T4 anti-CD4 mAb (San Jose, Ca).

### **Analysis of IL-10 and IL-4 gene expression**

Total RNA was isolated from CD4+ purified spleen cells from HVG and control mice of 3 weeks of age by guanidium thiocyanate method. the reverse transcription and the polymerase chain reaction (PCR) have been previously described. PCR primers used were: IL-10: 5' primer, AAGGCATGCACAGCTCAGCACTGCTC, and 3' primer,

CCACCCTGATGTCTCAGTTTCGTATC; IL-4: 5' primer, AACACCACAGAGAGTGAGCTCGTCT, and 3' primer, TGGACTCATTTCATGGTGCAGCTTAT, and  $\beta$ -actin housekeeping gene: 5' primer, TGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC, and 3' primer, TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG.

#### **In vivo production of IL-10**

In order to determine the in vivo production of IL-10 induced by the injection of anti-CD3 mAb, control and chimeric mice of 3 weeks of age were injected intraperitoneally with 50  $\mu$ g of the 145-2C11 mAb. Serum levels of IL-10 were measured by ELISA 5h after the injection.

#### **In vitro experiments**

The ability of splenic T cells from control and chimeric mice to produce IL-10 was assessed after in vitro stimulation for 72h with PMA-ionophorus ( ).

#### **Cytokines assays**

IL-10 levels in serum or supernatant were determined by two-site ELISA using the JES5-2A5 and SXC1 mAbs purchased from Pharmingen (San Diego, CA) as described elsewhere (10).

IFN- $\gamma$  was quantitated by ELISA using the Db-1 and F1 rat anti-mouse IFN- $\gamma$  mAbs kindly provided by Dr. P.H. Van Der Meide (TNO Health Research, The Netherlands) and Dr. A. Biliau (K.U.L. Leuven, Belgium).

#### **Quantification of Ig isotypes and auto-antibodies**

Blood samples from 3-weeks old mice were obtained by retro-orbital puncture. As previously described (11), serum levels of IgE, IgG1, IgG2a and IgM were measured by solid-phase ELISA using the isotype-specific antisera obtained from Sigma Chemical Co., except for rabbit anti-mouse IgE antiserum, which was purchased from Miab (Uppsala, Sweden).

Anti-ssDNA Abs were measured by ELISA, with the use of plates pre-coated with ssDNA prepared from calf thymus DNA (Sigma Chemical Co.) and alkaline phosphatase-conjugated isotype-specific antiserum (Sigma Chemical Co.) for revelation. Results were expressed as titration units by reference with a pool of sera from chimeric mice.

## **Results**

### **Neonatal injection of alloantigens induces the accumulation of IL-10 mRNA in CD4+ spleen cells**

As shown in Figure 1, PCR experiments performed on CD4+ spleen cells in HVG mice of 3 weeks of age, demonstrated the accumulation of IL-10 mRNA. In control uninjected mice of the same age, virtually no expression of IL-10 mRNA was found. CD4+ lymphocytes of the mice injected with allogeneic cells at birth also display increased level of IL-4 mRNA, confirming their TH2 phenotype.

### **Mice injected at birth with alloantigens secrete increased levels of IL-10 in vivo**

IL-10 was not detectable in serum of unstimulated control and HVG mice of 3 weeks of age. The injection of 50 µg of 145-2C11 anti-CD3 mAb induced the systemic release of significant amounts of IL-10 in both groups of mice. The secretion of IL-10 is significantly higher in HVG mice (Figure 2).

### **Splenic T cells from mice injected at birth with alloantigens secrete increased levels of IL-10 in vitro**

In order to confirm the results that we observed *in vivo*, we realized *in vitro* experiments with purified splenic T cells from control uninjected mice and mice injected at birth with alloantigens. Using an APC-independent way of stimulation with PMA and Ca ionophorus, we observed that T cells from HVG mice secrete higher levels than controls (Table I). The same results were observed in experiments using coated anti-CD3 mAb as stimulator (data not shown).

### **In vivo neutralization of IL-10 modulates Ig secretion in chimeric mice**

As previously reported, HVG mice treated with control mAb display increased serum levels of IgE, IgG1, IgM and anti-DNA Abs measured at 2 weeks of age (Table II). Prolonged *in vivo* neutralization of IL-10 induces a significant reduction of IgM serum levels. In parallel, in HVG mice treated with anti-IL-10 mAb, there is a trend toward a decrease in IgE, IgG1 and anti-DNA Abs but this effect did not reach statistical significance. IgG2a serum levels were unaffected by anti-IL-10 mAb administration. In control experiments we observed that a similar treatment with anti-IL-10 mAb did not modify basal immunoglobulin serum levels in uninjected mice of the same age (data not shown).

## **Discussion**

In the present study, we first confirmed at the mRNA level that, in this strain combination, neonatal injection of semiallogeneic cells induced the differentiation of TH2 type CD4<sup>+</sup> cells. Since a similar phenotype was observed in mixed lymphocyte culture with alloantigens (4), the TH2-type CD4<sup>+</sup> cells that we identified by PCR are most probably anti-donor cells.

The capacity of T cells from HVG mice to secrete increased levels of IL-10 was confirmed both *in vivo* in response to anti-CD3 stimulation and *in vitro* in experiments with purified cells. These results are in contrast with previous works demonstrating that B cells and macrophages are the main source of IL-10 in SLE patients (6).

IL-10 is involved in the hyperimmunoglobulinaemia in HVG mice. In anti-IL-10 treated HVG mice, a statistically significant reduction was observed only for IgM secretion but there was a trend toward a decrease in IgE, IgG1 and anti-DNA serum levels. These results are consistent with previous works demonstrating that IL-10 might synergize with IL-4 in the polyclonal activation of B cells (12, 13). Moreover, these observations confirm previous data indicating the role of IL-10 in the pathogeny of lupus-like syndroms in man and in experimental models in mice (6, 7, 8).

As anti-IL-10 mAb was administered from the neonatal period, its effects could be related either to the inhibition of the differentiation of TH2 cells after injection of alloantigens or to neutralization of IL-10 secreted by TH2 cells. With the reserve that we need MLC experiments in anti-IL-10 treated mice to answer to this question, the first hypothesis appears less probable. Indeed, in contrast with IL-4, IL-10 does not play a crucial role in the differentiation of the TH2 cells (14); according this we have previously reported that early neutralization of IL-10 did not interfere with the induction of TH2 activities and transplantation tolerance in mice injected at birth with alloantigens (15).

The tendency to the diminution of IgE and IgG1 suggests that increased endogenous levels of IFN- $\gamma$  could play a role in the modulation of the immunoglobulin hypersecretion in anti-IL-10 HVG mice, by inhibition of the IL-4 effects on B cells (5). However, the absence of hypersecretion of IgG2a in anti-IL-10 treated mice, indicates that this mechanism is probably not preponderant as less IFN- $\gamma$  is required to enhance IgG2a production than to inhibit IgE and IgG1 production (16).

Finally, in contrast with previous works (17), in control mice, IgM serum levels were unaffected by anti-IL-10 administration (data not shown) indicating that under our experimental conditions no depletion of Ly. 1 B cell was induced.

Taken together, our data indicate that the effects of anti-IL-10 mAb in our protocols are most probably related to the inhibition of the direct stimulation of donor B cells by IL-10 secreted by alloreactive TH2 cells.

In conclusion, our results extend previous observations underlying the role of TH2 cells in the development of autoimmune disease. The role of IL-10 in hyperimmunoglobulinaemia in mice injected at birth with alloantigens that we observed and the protective effects of IL-10 neutralization in mice which spontaneously developed a lupus-like syndrome (8) suggest that IL-10 antagonists may be beneficial in the treatment of human SLE.

**Figure 1: Reverse PCR analysis of IL-4 and IL-10 mRNAs in CD4+ cells.**

**Figure 2: In vivo secretion of IL-10 after injection of anti-CD3 mAb**

**Table I: *In vitro* hyperproduction of IL-10 (U/ml) by T cells from HVG mice**

Mice	Stimulus	
	None	PMA-ionophorus
Controls	<5	5.6
HVG	<5	18.1

T cells were purified as described in material and methods from splenic cells of a pool of 5 mice per group. IL-10 levels in the supernatants were measured by Elisa after 72h of culture.

**Table II: IL-10 neutralization modulates the hyperimmunoglobulinemia in HVG mice**

Mice	IgE ( $\mu\text{g/ml}$ )	IgG1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	IgG2a ( $\mu\text{g/ml}$ )	IgM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Anti- DNA (%)
BALB/c controls (N=3)	0.25 $\pm$ 0.03	566 $\pm$ 132	278 $\pm$ 30	51 $\pm$ 9	5.2 $\pm$ 2.2
HVG + LoDNP (N=9)	5.2 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	20267 $\pm$ 6018 <sup>a</sup>	291 $\pm$ 25	1414 $\pm$ 456 <sup>a</sup>	47.3 $\pm$ 28 <sup>a</sup>
HVG + anti-IL-10 (N=10)	1.26 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	12147 $\pm$ 3636 <sup>b</sup>	228 $\pm$ 32	298 $\pm$ 64 <sup>c</sup>	10.2 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>

Ig serum levels (mean $\pm$ SEM) were measured by Elisa at 2 wk.

<sup>a</sup> p<0.005 vs BALB/c controls

<sup>b</sup> not significantly different from HVG mice treated with LoDNP mAb

<sup>c</sup> p<0.05 as compared with HVG mice treated with LoDNP mAb

## **References**

1. Billingham RE, Brent L, Medawar P. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953, 172:603.
2. Goldman M, Feng HM, Engers H, Hochman A, Louis J, Lambert PH. Autoimmunity and immune complex disease after neonatal induction of transplantation tolerance in mice. *J. Immunol.* 1983; 131:251.
3. Abramowicz D, Vandervorst P, Bruyns C, Doutrelepont JM, Vandenabeele P, Goldman M. Persistence of anti-donor allohelper cells after neonatal induction of allotolerance in mice. *Eur. J. Immunol.* 1990; 20:1647.
4. Donckier V, Abramowicz D, Bruyns C, Florquin S, Vanderhaeghen ML, Amraoui Z, Dubois C, Vandenabeele P, Goldman M. Ifn-g prevents Th2-mediated pathology after neonatal injection of semiallogenic spleen cells in mice. *J. Immunol.* 1994; 153:2361.
5. Schurmans S, Heusser CH, Qin HY, Merino J, Brighthouse G, Lambert PH. In vivo effects of anti-IL-4 monoclonal antibody on neonatal induction of tolerance and on associated autoimmune syndrome. *J. Immunol.* 1990; 145: 2465.
6. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Morel-Fourier B, Galanaud P, Emilie D. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1994; 37:1647.
7. Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, Morel-Fourier B, Brouet JC, Alarcon-Segovia D, Galanaud P, Emilie D. Role of interleukin-10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 1995; 181:839.
8. Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. Continuous administration delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J. Exp. Med.* 1994; 179:305.
9. Florquin S. (à compléter).

10. Durez P, Abramowicz D, Gérard C, et al. In vivo induction of interleukin-10 by anti-CD3 monoclonal antibody or bacterial lipopolysaccharide: differential modulation by cyclosporin-A. *J. Exp. Med.* 1993; 177:551.
11. Goldman M, Abramowicz D, Lambert P, Vandervorst P, Bruyns C, Toussaint C. Hyperactivity of donor B cells after neonatal induction of lymphoid chimerism in mice. *Clin. exp. Immunol.* 1988; 72:79.
12. Go NF, Castle BE, Barret R, Kastelein R, Dang W, Mosman TR, Moore KW, Howard M. Interleukin-10 (IL-10), a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.* 1990; 172:1625.
13. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89:1890.
14. Seder RA, Paul W. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:635.
15. Donckier V, Wissing M, Abramowicz D, Bruyns C, Vanderhaeghen ML, Lybin M, Goldman M. Early neutralization of IL-4 but not of IL-10 abrogates neonatal induction of transplantation tolerance in mice. *Transplant. Proc.* 1995; 27:186.
16. Finkelman FD, Holmes J. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8:303.
17. Ishida H, Hastings R, Kearney J, Howard M. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J. Exp. Med.* 1992; 175:1213.

## **IV. DISCUSSION**

La discussion de nos résultats sera divisée en cinq chapitres concernant:

1. La différenciation des cellules CD4+ allo-réactives en lymphocytes TH2.
2. Le rôle des lymphocytes TH2 dans la tolérance de transplantation.
3. La dissociation entre le chimérisme lymphoïde et la tolérance de transplantation
4. Le rôle des lymphocytes TH2 dans l'immunopathologie.
5. Conclusions et perspectives.

## 1. DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES TH2

Chez la souris BALB/c, l'injection néonatale de cellules semi-allogéniques (A/JxBALB/c) présentant une disparité d'antigènes de classe I et de classe II induit la différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> alloréactifs de type TH2. En culture mixte avec les cellules du donneur, les lymphocytes T des animaux tolérants produisent des taux élevés d'IL-4 et d'IL-10 mais pas d'IL-2 ni d'IFN- $\gamma$ . Ce profil TH2 est confirmé dans les expériences d'amplification génique qui démontrent une expression accrue des ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-10 dans les cellules spléniques de ces animaux.

Ces observations rejoignent celles d'autres travaux ayant mis en évidence la persistance de lymphocytes TH2 dans des modèles d'induction néonatale de tolérance aux antigènes de classe II (Mohler 1989 a, Powell 1990) et plus récemment dans un modèle utilisant la même combinaison de souris que celle que nous avons étudié (Chen 1995 a et b).

Parmi les facteurs pouvant favoriser la différenciation des lymphocytes TH2, la propension des lymphocytes T du nouveau-né à produire de l'IL-4 joue un rôle fondamental. Contrairement aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs présents chez un animal adulte, les lymphocytes du nouveau-né sécrètent des taux élevés d'IL-4 mais peu d'IL-2 ou d'IFN- $\gamma$  lors d'une réponse primaire. Ces caractéristiques avaient été décrites précédemment en stimulation polyclonale *in vitro* (Adkins 1993) et nous avons montré qu'elles se reproduisaient lors d'une stimulation allogénique *in vivo*. En effet, après l'injection néonatale de cellules allogéniques, l'analyse par amplification génique des cellules CD4<sup>+</sup> dans les ganglions lymphatiques d'animaux âgés de 2 jours, démontre une expression élevée des ARNm codant pour l'IL-4 mais faible des ARNm codant pour l'IL-2.

Il est possible que les cellules alloréactives CD4<sup>+</sup> à l'origine de la sécrétion précoce d'IL-4 appartiennent à la même sous-population cellulaire que les lymphocytes NK1.1<sup>+</sup> responsables de la sécrétion d'IL-4 lors de la stimulation polyclonale de thymocytes matures (Bendelac 1992, Arase 1993) ou lors de l'administration d'anticorps anti-CD3 *in vivo* (Yoshimoto 1994). Nous n'avons pas pu étudier ce point particulier dans notre modèle, les souris de souche BALB/c n'exprimant pas l'antigène de surface NK1.1.

Il faut noter que dans d'autres conditions de stimulation, des lymphocytes T d'un phénotype différent peuvent également sécréter précocement de l'IL-4 et favoriser le développement de réponse de type TH2. Dans le modèle de la Leishmaniose, des

travaux récents ont en effet démontré que la sécrétion précoce d'IL-4 chez les animaux sensibles à l'infection dépendait de cellules CD4<sup>+</sup> NK1.1- (Launois 1995).

La sécrétion de taux élevés d'IL-4 mais faibles d'IL-2 et probablement d'IFN- $\gamma$  induite par l'injection néonatale d'alloantigènes conditionne la différenciation des lymphocytes TH2. De façon similaire aux observations faites dans des modèles de pathologies infectieuses telles que la Leishmaniose ou la Candidose (Heinzel 1989, Scott 1991, Romani 1992), nous avons constaté que la neutralisation de l'IL-4 endogène ou l'administration d'IFN- $\gamma$  exogène durant la période néonatale permettait de modifier la polarité de la réponse immune après l'injection de cellules semi-allogéniques. Chez les animaux ayant reçu l'anticorps anti-IL-4 ou de l'IFN- $\gamma$ , la sécrétion de cytokines de type TH1 est partiellement restaurée, comme en atteste la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les cellules alloréactives en culture mixte. En même temps, ces cellules sécrètent toujours des taux élevés d'IL-4 et d'IL-10. Des expériences de dilutions limites ou le clonage des cellules alloréactives pourraient permettre de déterminer si ce profil sécrétoire dépend de la présence simultanée de cellules TH1 et TH2 ou d'une seule population cellulaire, de phénotype TH0. En outre, des expériences de déplétion cellulaire pourraient préciser le rôle des cellules CD8<sup>+</sup> dans ces phénomènes, en particulier en ce qui concerne la sécrétion d'IFN- $\gamma$ .

Dans le protocole que nous avons utilisé, la neutralisation précoce de l'IL-4 *in vivo* n'empêche pas la différenciation de cellules capables de produire de l'IL-4. Ceci pourrait être dû à une neutralisation incomplète, les taux d'IL-4 nécessaires pour induire sa propre sécrétion par les lymphocytes T étant inférieurs à ceux requis pour inhiber la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Seder 1992). Dans certaines conditions également, le développement de cellules produisant de l'IL-4 pourrait être indépendant de la présence d'IL-4 au moment de l'initiation de la réponse (Gross 1994).

D'autres facteurs que les cytokines présentes au moment de la stimulation allogénique pourraient intervenir dans l'orientation particulière de la réponse immune chez la souris nouveau-né. Parmi eux, la stimulation prolongée des lymphocytes T alloréactifs par les cellules du donneur pourrait jouer un rôle. Les expériences d'amplification génique que nous avons réalisées démontrent que des lymphocytes alloréactifs sont présents dans les organes lymphoïdes périphériques chez les nouveau-nés. Ces lymphocytes sont toutefois incapables de rejeter les cellules du donneur et vont donc être stimulés de façon répétée par celles-ci. Ce phénomène particulier pourrait favoriser la génération de lymphocytes TH2. En effet, des expériences *in vitro* ont démontré que l'exposition prolongée de lymphocytes T naïfs à leur antigène spécifique induit leur différenciation en cellules de type TH2 (Croft 1995). La délétion ou l'inactivation clonale des

lymphocytes CD8+ cytotoxiques observée chez les souris injectées à la naissance avec des cellules allogéniques, participe probablement à ce phénomène. Parallèlement, l'absence de cellules CD8+ alloréactives fonctionnelles peut également favoriser l'induction d'une réponse de type TH2 en contribuant au défaut global de sécrétion d'IFN- $\gamma$  durant la période néonatale.

La différenciation préférentielle des cellules TH2 chez les animaux tolérants pourrait également être liée aux conditions de présentation d'antigènes et de co-stimulation durant la période néonatale. Les cellules spléniques injectées à la naissance contiennent une proportion élevée de lymphocytes B. La présentation des alloantigènes par ces cellules, à l'état de lymphocytes B de repos, peut favoriser la différenciation de lymphocytes TH2 (Fitch 1993). Le profil sécrétoire particulier des lymphocytes du nouveau-né pourrait dépendre d'un défaut global de co-stimulation. En particulier, le signal co-stimulateur dépendant de l'interaction CD28/B7, activant préférentiellement les lymphocytes TH1 (Sayegh 1995), pourrait être déficient durant la période néonatale (Adkins 1994).

Enfin, les cellules macrophagiques du nouveau-né présentant des propriétés différentes de celles de l'adulte (Lu 1980), il est possible qu'un défaut de sécrétion d'IL-12 contribue à l'absence de différenciation des TH1 durant la période néonatale.

Actuellement, nous ne savons pas si les lymphocytes alloréactifs TH2 présents chez les animaux tolérants sont générés en permanence à partir du thymus ou résultent d'une seule vague de cellules se différenciant durant la période néonatale.

Confortant la première hypothèse, la persistance de cellules alloréactives a été observée au sein du thymus de souris adultes, tolérantes aux antigènes de classe II (Wood 1993). Chez ces animaux, des expériences de culture mixte démontrent que les thymocytes, contrairement aux splénocytes, gardent la capacité de proliférer et d'exercer une action cytotoxique à l'encontre des cellules du donneur. Dans ce cas, des phénomènes de régulation post-thymiques participent donc à l'induction de la tolérance. Les lymphocytes TH2 présents dans les organes lymphoïdes périphériques pourraient jouer un rôle dans ces phénomènes, notamment en inhibant les fonctions cytotoxiques de cellules alloréactives exportées à partir du thymus. Nous reviendrons sur ce dernier point dans la suite de la discussion.

Dans d'autres modèles par contre, l'établissement d'un chimérisme thymique peut induire la délétion clonale des précurseurs des lymphocytes T alloréactifs au stade CD4+8+ (Mc Donald 1988b). Le chimérisme thymique se maintient chez les animaux

tolérants, la génération de lymphocytes CD4+ et CD8+ allospécifiques serait inhibée de façon prolongée. Si un phénomène similaire se produisait dans notre modèle, les lymphocytes TH2 présents chez les animaux tolérants proviendraient exclusivement de cellules différenciées durant la période néonatale. Ces cellules pourraient être soit des thymocytes matures exportés secondairement vers la périphérie, soit des cellules alloréactives déjà présentes dans les organes lymphoïdes périphériques au moment de l'injection des cellules allogéniques.

## **2. ROLE DES LYMPHOCYTES TH2 DANS LA TOLERANCE DE TRANSPLANTATION**

Dans notre modèle, au niveau lymphocytaire, l'induction néonatale de tolérance correspond à un double phénomène. D'une part, les lymphocytes auxiliaires se différencient en cellules TH2 et, d'autre part, les lymphocytes cytotoxiques subissent un processus de délétion clonale ou d'inactivation fonctionnelle. Ces deux événements pourraient être liés. Comme nous l'avons vu, l'absence de lymphocytes cytotoxiques peut favoriser l'émergence de cellules TH2. Respectivement, les cytokines produites par les cellules TH2 peuvent être impliquées dans la suppression des fonctions cytotoxiques.

### **2.1. Incapacité des lymphocytes TH2 à induire le rejet aigu d'allogreffe cutanée**

Les lymphocytes TH2 sont des cellules spécialisées dans l'élimination des antigènes solubles et des pathogènes extracellulaires. Les mécanismes effecteurs activés par les lymphocytes TH2, principalement la sécrétion d'anticorps non cytotoxiques et l'activation des mastocytes et des éosinophiles n'interviennent généralement pas prioritairement dans le rejet aigu d'allogreffe. En particulier, les IgE et les IgG1 dont la sécrétion est induite préférentiellement par l'IL-4 et l'IL-13 secrétées par les cellules TH2 n'activent pas le complément et ne participent pas aux réactions de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps.

Ceci explique que, dans le modèle que nous avons étudié, les lymphocytes TH2 alloréactifs persistants chez les animaux injectés à la naissance avec des cellules allogéniques sont le plus souvent incapables d'induire le rejet d'une greffe de peau de type donneur.

Dans certaines conditions toutefois, les lymphocytes TH2 pourraient intervenir dans le rejet. Chez la souris, en l'absence de cellules CD8+, les lymphocytes TH2 peuvent médier le rejet d'une allogreffe cardiaque selon un mécanisme faisant probablement intervenir des éosinophiles (Chan 1995). Chez l'homme, en transplantation hépatique, les éosinophiles peuvent également être impliqués dans le rejet aigu (DeGroen 1994). Cette caractéristique pourrait dépendre de l'activation préférentielle des fonctions de type TH2 lorsque l'initiation de la réponse immune se fait au niveau du foie (Gorczyński 1994).

Des phénomènes similaires pourraient se produire dans le modèle que nous avons étudié. En effet, lorsque l'on accroît le nombre de cellules allogéniques injectées à la naissance, on observe non seulement une augmentation de la pathologie médiée par les cellules TH2 mais également une moins bonne induction de la tolérance de transplantation. Seules 50% des souris injectées selon ce protocole deviennent tolérantes, comparées aux 90% d'animaux tolérants observés après l'injection néonatale d'un nombre plus faible de cellules. Bien que nous n'ayons pas investigué ce phénomène, il est possible que la différenciation d'un grand nombre de cellules TH2, après une stimulation allogénique plus forte, soit directement responsable du rejet de greffe de peau chez ces animaux.

D'autres mécanismes peuvent intervenir dans le contrôle des fonctions effectrices des cellules TH2. Ainsi, les lymphocytes TH2 présents chez les animaux tolérants peuvent être considérés comme anergiques. En effet, contrairement à ce qui est rapporté pour la plupart des clones TH2 (Fitch 1993), ces cellules ne prolifèrent pas en réponse à l'IL-4 produite en culture mixte. L'absence d'expansion clonale des cellules TH2 alloréactives pourrait constituer un facteur supplémentaire favorisant la survie d'allogreffe.

Le rôle des lymphocytes TH2 dans le maintien de la tolérance n'est pas connu. Dans un modèle similaire au nôtre, des études récentes ont démontré que la neutralisation de l'IL-4 et de l'IL-10 *in vitro*, permettait de restaurer la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes alloréactifs chez les animaux tolérants (Chen 1995 b). De cette manière, il est possible que les lymphocytes TH2 présents dans les organes lymphoïdes périphériques participent au maintien de la tolérance en inhibant la sécrétion de cytokines TH1 par des cellules alloréactives récemment exportées à partir du thymus.

En dehors des capacités propres des lymphocytes TH2, l'absence de différenciation de lymphocytes TH1 alloréactifs joue un rôle prépondérant dans l'induction de la tolérance dans ce modèle. Chez les souris ayant reçu l'anticorps anti-IL-4 ou de l'IFN- $\gamma$  durant la période néonatale, la restauration des fonctions de type TH1 permet le rejet d'une greffe de peau de type donneur. Chez ces animaux, où nous avons pu démontrer l'absence de lymphocytes cytotoxiques anti-donneurs, le rejet dépend probablement d'une réaction inflammatoire médiée par l'IFN- $\gamma$  au sein de la greffe (Dallman 1991a, Rosenberg 1990).

De cette manière, l'association entre la différenciation des lymphocytes TH2 et la tolérance de transplantation observée dans plusieurs modèles expérimentaux

n'implique pas une relation de causalité. L'induction de la tolérance dans ces conditions pourrait dépendre essentiellement de l'absence de différenciation de cellules de type TH1.

## **2.2. Rôle des lymphocytes TH2 dans l'inhibition des fonctions cytotoxiques**

Dans le modèle que nous avons étudié, les animaux tolérants ne possèdent pas de lymphocytes cytotoxiques actifs à l'égard des cellules du donneur. Ce défaut n'est pas corrigé chez les souris ayant reçu l'anticorps anti-IL-4 ou de l'IFN- $\gamma$ . Le pouvoir cytotoxique étant défini lors de tests fonctionnels, nous ne pouvons pas déterminer si ce phénomène correspond à une délétion clonale ou à une inactivation fonctionnelle des cellules concernées. Ces deux mécanismes pourraient être associés chez les animaux que nous avons étudiés. Comme il existe une disparité antigénique de classe I et de classe II entre le donneur et le receveur, les réactions de cytotoxicité dépendent de deux sous-populations cellulaires différentes, reconnaissant spécifiquement les alloantigènes de classe I ou de classe II. Ces deux sous-populations pourraient évoluer différemment après l'injection néonatale d'alloantigènes. Conformément aux données de la littérature (Feng 1983, Streilein 1991), il est possible que les lymphocytes cytotoxiques dirigés contre les alloantigènes de classe I soient éliminés précocement dans le thymus. Par contre, des cellules reconnaissant les alloantigènes de classe II pourraient échapper au phénomène de délétion clonale et persister chez les animaux tolérants. Dans ce dernier cas, plusieurs arguments expérimentaux suggèrent que les lymphocytes TH2 pourraient être impliqués dans la suppression du pouvoir cytotoxique de ces cellules.

La persistance de lymphocytes cytotoxiques anti-donneurs a été démontrée dans différents modèles d'induction néonatale de tolérance.

Dans certains cas, ces lymphocytes sont de faible affinité pour les cellules tolérogènes (Wood 1987 b), ce qui explique probablement qu'ils aient échappé aux processus de sélection négative dans le thymus. *In vitro*, ces cellules ne sont capables d'exercer une action cytotoxique qu'en présence de facteurs d'activation exogènes.

Dans d'autres modèles, l'absence d'activité cytotoxique anti-donneur dépend de phénomènes actifs de suppression. Ces processus ont été démontrés lors d'expériences de transfert adoptif de la tolérance, aussi bien *in vivo* (Streilein 1991 b) que *in vitro* (Powell 1991). La suppression des fonctions cytotoxiques chez ces animaux pourraient dépendre des lymphocytes TH2 et des cytokines qu'ils sécrètent.

En effet, dans certains modèles d'induction de tolérance aux antigènes de classe II, l'inhibition de la différenciation des cellules cytotoxiques dépend d'un facteur soluble sécrété par les cellules CD4<sup>+</sup> alloréactives de type TH2 (Matriano 1994 a). Bien que l'addition d'IL-4 exogène n'inhibe pas la différenciation de lymphocytes cytotoxiques anti-classe II en culture mixte (Powell 1991), plusieurs observations suggèrent que cette cytokine pourrait néanmoins intervenir comme facteur suppresseur. Lorsqu'elle est présente à l'initiation de la réponse allogénique, l'IL-4 peut inhiber la différenciation des cellules cytotoxiques (Widmer 1987 a) et favoriser la différenciation des cellules CD8<sup>+</sup> en cellules CD4-CD8<sup>-</sup> non cytotoxiques (Erard 1993). D'autre part, *in vivo*, dans un modèle proche de celui que nous avons étudié, la neutralisation prolongée de l'IL-4 après l'injection de cellules semi-allogéniques, restaure le pouvoir cytotoxique des cellules alloréactives (Schurmans 1990). Nous n'avons pas observé de phénomène similaire; dans les conditions expérimentales que nous avons étudiées, la neutralisation précoce de l'IL-4 ne permet pas de corriger le défaut de cytotoxicité anti-donneur. Comme nous avons utilisé des doses faibles d'anticorps, administrées durant une période limitée, l'inactivation fonctionnelle persistante des lymphocytes cytotoxiques pourrait être liée à la neutralisation incomplète de l'IL-4.

L'IL-10 sécrétée par les lymphocytes TH2 pourrait également contribuer à la suppression des fonctions cytotoxiques chez les souris tolérantes. En effet, cette cytokine est capable d'inhiber la prolifération et la production d'IFN- $\gamma$  par des cellules CD8<sup>+</sup> lorsque leur activation dépend de la présence de CPA (Bejarano 1992, Moore 1993).

Enfin, des travaux ayant mis en évidence le rôle suppresseur de lymphocytes TH2 après administration d'anticorps anti-CD2, suggèrent que le TGF- $\beta$  pourrait également participer à l'inhibition des fonctions cytotoxiques (Chavin 1994).

L'action suppressive des lymphocytes TH2 pourrait s'appliquer à deux types de cellules cytotoxiques allospécifiques. D'une part, il peut s'agir de cellules ayant d'emblée échappé au processus de délétion clonale dans le thymus. Ce phénomène particulier pourrait dépendre d'un défaut de présentation de certains alloantigènes au sein du thymus, durant la période néonatale (Lu 1979, Roberts 1990). D'autre part, dans certains modèles, parallèlement à la perte progressive du chimérisme thymique, des cellules alloréactives peuvent réapparaître à partir du thymus, après une période initiale de délétion clonale (Ruiz 1995). Dans ce dernier cas, en inhibant le pouvoir cytotoxique de ces cellules, les lymphocytes TH2 présents dans les organes lymphoïdes périphériques pourraient jouer un rôle prépondérant dans le maintien de la tolérance.

### **3. DISSOCIATION ENTRE CHIMERISME LYMPHOÏDE ET TOLÉRANCE DE TRANSPLANTATION**

Conformément aux données de la littérature (Lubaroff 1973, Luzuy 1986), l'induction de la tolérance est étroitement associée à l'établissement du chimérisme lymphoïde dans le modèle que nous avons étudié. Nous n'avons pas observé d'animaux présentant de survie prolongée d'allogreffe en l'absence de chimérisme.

La relation inverse, par contre, n'est pas absolue et des animaux peuvent rejeter une greffe de peau tout en étant incapables de rejeter les cellules du donneur injectées à la naissance. Nous avons observé ce phénomène chez 50% des souris injectées avec un grand nombre de cellules allogéniques à la naissance et de façon systématique chez les souris ayant reçu de l'IFN- $\gamma$ . Des phénomènes similaires ont été décrits dans d'autres modèles dans lesquels l'injection néonatale d'alloantigènes ne permettant pas d'induire une tolérance de transplantation malgré la persistance des cellules injectées à la naissance (Alard 1995).

Les mécanismes intervenant dans la dissociation entre le chimérisme lymphoïde et la tolérance de transplantation sont encore spéculatifs.

Il est possible que le rejet des cellules du donneur injectées à la naissance, constituées principalement par des plasmacytes n'exprimant plus les antigènes de classe II, requière la présence de lymphocytes cytotoxiques anti-classe I. Comme nous l'avons vu précédemment, ces dernières cellules pourraient être éliminées précocement dans le thymus. De cette manière, la perte progressive de l'expression de certains alloantigènes à la surface des cellules du donneur permettrait à celles-ci d'échapper à leur élimination. Des mécanismes similaires ont été impliqués dans la persistance de cellules tumorales (Restifo 1991).

Par ailleurs, la susceptibilité aux mécanismes effecteurs du rejet d'un organe pourrait être différente de celle des cellules isolées provenant de l'innoculum néonatal. En particulier, les cellules regroupées au sein d'un tissu pourraient être plus sensibles aux réactions inflammatoires locales.

Enfin, d'autres phénomènes tels que la présence d'antigènes tissulaires spécifiques, absent de l'innoculum de cellules tolérogènes (Fleming 1981), ou la forte densité de cellules dendritiques pourraient également favoriser le rejet sélectif d'une greffe de peau.

#### **4. ROLE DES LYMPHOCYTES TH2 DANS L'IMMUNOPATHOLOGIE**

Les lymphocytes TH2 alloréactifs persistants chez les animaux tolérants sont à l'origine d'une maladie de l'hôte contre le greffon en stimulant de façon polyclonale les lymphocytes B du donneur injectés à la naissance. Lorsqu'un nombre élevé de cellules allogéniques est administré, cette réaction se traduit par l'apparition d'un syndrome auto-immun ressemblant au lupus érythémateux disséminé (Goldman 1983).

Le rôle de l'IL-4 dans l'hyperproduction d'anticorps par les lymphocytes B allogéniques et la commutation vers certains isotopes d'immunoglobulines a été largement documenté (Finkelman 1990). Dans le protocole que nous avons utilisé, nous avons vérifié que l'administration précoce d'anticorps anti-IL-4 permet de contrôler l'hypersécrétion d'IgE, sans induire le rejet des cellules allogéniques.

Nos travaux ont montré que la sécrétion d'IL-10 pouvait également participer à l'activation des lymphocytes B chez les souris présentant une maladie de l'hôte contre le greffon. En effet, chez ces animaux, la neutralisation prolongée de l'IL-10 endogène réduit significativement l'hypersécrétion d'IgM. Parallèlement, on observe une tendance à la réduction des taux sériques d'IgE, d'IgG1 et d'anticorps anti-DNA, ces effets n'étant toutefois pas statistiquement significatifs.

Ces résultats sont en accord avec des rapports précédents ayant démontré que l'IL-10 pouvait stimuler les lymphocytes B en synergie avec l'IL-4 (Go 1990). Plus particulièrement, des travaux récents ont souligné le rôle de l'IL-10 dans l'hypergammaglobulinémie et la sécrétion d'autoanticorps au cours de syndromes lupiques, tant en clinique chez l'homme que dans des modèles expérimentaux chez la souris (Llorente 1994, Ishida 1994). Chez l'homme, la sécrétion de taux accrus d'IL-10 intervient dans l'hypersécrétion d'IgM, d'IgG et d'IgA observée chez des patients présentant un lupus érythémateux disséminé (Llorente 1995). Il faut noter que dans ces conditions, ce sont les lymphocytes B et les macrophages qui sont responsables de la production d'IL-10 alors que chez les souris développant une maladie de l'hôte contre le greffon elle dépend au moins partiellement des lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type TH2.

Nous n'avons pas étudié les mécanismes précis par lesquels l'anticorps anti-IL-10 module la sécrétion d'immunoglobulines. L'anticorps monoclonal étant administré dès le premier jour après la naissance, il est possible que la neutralisation précoce de l'IL-10 interfère avec la différenciation des cellules TH2. Cette hypothèse semble cependant peu probable, l'IL-10, contrairement à l'IL-4, ne jouant pas un rôle essentiel dans l'induction d'une réponse de type TH2 (Seder 1994). Il est possible également que

l'administration prolongée d'anticorps anti-IL-10 induit une augmentation de la sécrétion endogène d'IFN- $\gamma$  comme cela a été décrit lors de protocoles similaires (Ishida 1992). De cette manière, la présence de taux accrus d'IFN- $\gamma$  pourrait inhiber les effets de l'IL-4, en particulier en ce qui concerne la sécrétion d'IgE et d'IgG1 (Finkelman 1990, Umland 1992). Nous n'avons toutefois pas observé d'augmentation des taux sériques d'IgG2a chez les animaux ayant reçu de l'anti-IL-10, cet effet étant décrit comme le témoin le plus sensible de l'action de l'IFN- $\gamma$  sur la sécrétion d'immunoglobulines (Finkelman 1988). Enfin, l'action de l'anticorps anti-IL-10 ne semble pas liée à la déplétion des lymphocytes B de type Ly.1 responsables principaux de la production d'IgM (Ishida 1992). En effet, l'administration d'anticorps anti-IL-10 dans notre protocole n'induit pas de modification des taux sériques d'IgM chez des souris contrôles, non injectées à la naissance.

Enfin, nous avons observé que parallèlement à la restauration des fonctions de type TH1 des cellules alloréactives, l'administration précoce d'IFN- $\gamma$  permettait de réduire l'intensité de l'immunopathologie induite par l'injection néonatale d'alloantigènes. Ce traitement induit une diminution très significative de la production totale d'immunoglobulines d'isotypes IgE et IgG1. Parallèlement, la réduction des taux d'auto-anticorps anti-DNA, anti-membrane basale glomérulaire et anti-laminine explique probablement l'atténuation des dépôts rénaux observés chez les animaux ayant reçu de l'IFN- $\gamma$  (Goldman 1983, Florquin 1991).

La réduction de l'immunopathologie observée chez les souris ayant reçu de l'IFN- $\gamma$  n'est pas due au rejet des cellules allogéniques injectées à la naissance, ces animaux restant chimériques. La sécrétion de taux d'allotype comparables à ceux observés chez les animaux tolérants indique en outre que les cellules du donneur restent capables de produire des immunoglobulines.

L'IFN- $\gamma$  exerçant sur les lymphocytes B une action antagoniste de celle de l'IL-4, la modulation de la production d'immunoglobulines peut dépendre directement de l'IFN- $\gamma$  recombinant injecté durant la période néonatale. Cependant, ce traitement n'étant administré que durant une période courte, juste après la naissance, il est probable que la restauration de la production endogène d'IFN- $\gamma$  par les cellules CD4<sup>+</sup> alloréactives joue un rôle prédominant.

Nos observations chez les souris présentant une maladie de l'hôte contre le greffon rejoignent celles faites dans d'autres modèles expérimentaux comme la Leishmaniose chez la souris (Scott 1991) ou le syndrome auto-immun induit par l'injection de dérivés

mercuriels chez le rat (Mathieson 1991). Dans ces conditions également, la neutralisation des activités des lymphocytes TH2 a un effet favorable.

La mise en évidence de ces phénomènes permet d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, chez l'homme également, certaines pathologies peuvent être associées à la différenciation préférentielle de cellules de type TH2. C'est le cas au cours d'infections par des agents pathogènes intracellulaires comme *Mycobacterium leprae* (Yamamura 1991) ou lors de la Leishmaniose (Pirmez 1993). Lors de l'infection par le virus HIV également, la progression de la maladie pourrait dépendre de la modification de la réponse immune de type TH1 dans les premiers stades vers une réponse de type TH2 dans les stades avancés (Clerici 1993).

Dans ces conditions pathologiques, l'administration d'IFN- $\gamma$ , d'anti-IL-4 ou d'anti-IL-10 pourrait exercer une action bénéfique en favorisant le développement de cellules TH1 ou en inhibant certains effets médiés par les cellules TH2. Cette possibilité thérapeutique a été vérifiée récemment chez un patient présentant un syndrome d'Omenn, une forme rare d'immunodéficience primaire associée à une hyperéosinophilie et à l'activation de cellules de type TH2. Chez ce patient, l'administration d'IFN- $\gamma$  a induit parallèlement une amélioration de l'état clinique, une normalisation de l'éosinophilie et une réduction de l'expression des cytokines de type TH2 (Schandené 1993).

## **5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les observations que nous avons faites dans le modèle de la tolérance néonatale chez la souris se vérifient-elles dans d'autres modèles expérimentaux de tolérance et peuvent-elles s'appliquer à la transplantation d'organe chez l'homme?

La présence de lymphocytes TH2 a été mise en évidence dans de nombreux modèles d'induction de tolérance de transplantation chez des animaux adultes. Ce phénomène a notamment été observé après transfusion sanguine donneur-spécifique (Takeuchi 1992, Gorczynski 1994) et lors de traitements utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD4 (Mottram 1995) ou des anticorps bloquant la costimulation par la voie CD28-B7 (Sayegh 1995).

Certains traitements immunosuppresseurs favorisent également la différenciation de lymphocytes TH2. La cyclosporine peut à certaines doses induire la sécrétion d'IL-4 (Chen 1992) et l'accumulation de cellules de type TH2 au sein d'allogreffe (Takeuchi 1992). Les corticoïdes peuvent favoriser la sécrétion d'IL-4 et induire la différenciation de cellules de type TH2 (Daynes 1990). Enfin, lors de l'administration répétée d'anticorps anti-CD3, les réponses de type TH2 sont épargnées alors que la sécrétion de cytokines de type TH1 est profondément inhibée (Wissing 1995).

Bien que le rôle tolérogène propre des lymphocytes TH2 dans ces situations ne soit pas absolument démontré, certaines études récentes indiquent que ces cellules pourraient effectivement jouer un rôle suppresseur actif et inhiber les mécanismes effecteurs du rejet aigu. En effet, le transfert de cellules alloréactives de type TH2 permet de prolonger la survie d'une greffe de peau allospécifique (Maeda 1994). Plus directement, chez la souris, l'administration d'IL-4 recombinante au sein d'un greffon cardiaque peut induire une prolongation très significative de la survie de celui-ci (Levy 1995). Cet effet pourrait être lié à la différenciation préférentielle de cellules TH2 dans le greffon.

Chez l'homme, jusqu'à présent, les fonctions spécifiques des lymphocytes TH2 dans le rejet d'allogreffe n'ont pu être définies.

La présence de cellules TH1 lors du rejet d'allogreffe a été clairement démontrée (Benvenuto 1991, Krams 1992). Dans plusieurs situations cependant, le rejet est associé à une activation lymphocytaire non sélective, caractérisée par la sécrétion accrue de cytokines TH1 et TH2 (Xu 1995, Melville 1994 ou 1995)

Dans l'ensemble, les données expérimentales accumulées chez l'animal suggèrent que l'induction préférentielle de cellules alloréactives de type TH2, par exemple par l'administration d'IL-4 au moment de l'initiation de la réponse, pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique en transplantation d'organes.

Plusieurs réserves doivent néanmoins être faites en ce qui concerne l'application de ces protocoles. D'une part, si les lymphocytes TH2 ont fort probablement une action favorable dans le contrôle des mécanismes effecteurs du rejet aigu, leur rôle dans le rejet chronique n'est pas connu. Il est possible que les anticorps, dont la sécrétion est induite par l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, favorisent cette forme de rejet. D'autre part, les lymphocytes TH2 jouent un rôle pathogène dans plusieurs situations, tant expérimentales que cliniques. En particulier, par leur action stimulatrice sur les lymphocytes B, les cellules TH2 pourraient favoriser l'apparition de maladies auto-immunes et le développement de syndromes lymphoprolifératifs.

Ces observations soulignent la nécessité de compléter nos informations dans des conditions plus proches de celles rencontrées lors de la transplantation d'organe chez l'homme, par exemple dans des expériences de greffe vascularisée, chez le grand animal.

## **V. REFERENCES**

Abramowicz D et al. Autoimmune disease after neonatal injection of semi-allogeneic spleen cells in mice: involvement of donor B and T cells and characterization of glomerular deposits. *Clin. exp. Immunol.* 1987; 70:61.

Abramowicz D et al. Increased expression of Ia antigens on B cells after neonatal induction of lymphoid chimerism in mice: role of interleukin 4. *Eur. J. Immunol.* 1990a; 20:469.

Abramowicz D et al. Persistence of anti-donor allohelper T cells after neonatal induction of allotolerance in mice. *Eur. J. Immunol.* 1990b; 20:1647.

Acha-Orbea H et al. Mls- a retrovirus exploits the immune system. *Immunol. Today* 1991; 12:356.

Adkins B et al. Normal thymic cortical epithelial cells developmentally regulate the expression of a B-lineage transformation associated antigen. *Immunogenetics* 1988; 27:180.

Adkins et al. Developmental regulation of the intrathymic T cell precursor population. *J. Immunol.* 1991; 146:1387.

Adkins B et al. Freshly isolated, murine neonatal T cells produce IL-4 in response to anti-CD3 simulation. *J. Immunol.* 1992; 149:3448.

Adkins B et al. Developmental regulation of IL-4, IL-2 and IFN-g production by murine peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.* 1993; 151:6617.

Adkins B et al. Up-regulation of murine neonatal T helper cell responses by accessory cell factors. *J. Immunol.* 1994; 153:3378.

Akalin E et al. Blocking cell microtubule assembly inhibits the alloimmune response in vitro and prolongs renal allograft survival by inhibition of TH1 and sparing of TH2 cell function in vivo. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1995; 5:1418.

Alard. *Transplantation* 1995;

Anderson, D et al. *Heredity* 1951; 5:379.

Araneo BA et al. Regulation of murine lymphokine production in vivo. Ultraviolet exposure depresses IL-2 and enhances IL-4 production by T cells through an IL-1 dependent mechanism. *J. Immunol.* 1989; 143:1737.

Arase H et al. NK1.1 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23:307.

Argyris BF et al. Interleukin-2 production in the neonatal mouse. *Transplantation* 1985; 40:284.

Barker CF et al. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. *J. Exp. Med.* 1968; 128:197.

Belosevic MDS et al. Administration of monoclonal anti-IFN- $\gamma$  antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 1989; 143:266.

Bendelac A et al. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* 1991; 353:68.

Bendelac A et al. Activation events during thymic selection. *J. Exp. Med.* 1992; 175:731.

Bill J et al. The MHC molecule I-E is necessary but not sufficient for the clonal deletion of V $\beta$ 11-bearing T cells. *J. Exp. Med.* 1989; 169:1405.

Billingham RE et al. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172:603.

Billingham RE et al. Quantitative studies on tissue transplantation immunity; I. The survival times of skin homografts exchanged between members of different inbred strains of mice. *Proc. Roy. Soc.* 1954; 143:43.

Billingham RE et al. Quantitative studies on tissue transplantation immunity; II. The origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity. *Proc. Roy. Soc.* 1954; 143:58.

Billingham RE et al. Acquired tolerance of foreign cells in newborn animals. *Proc. Roy. Soc.* 1957; 146:78.

Billingham RE et al. Quantitative studies on tissue transplantation immunity; IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Phil. Trans. B.* 1959; 242:439.

Brent L et al. Attempt to demonstrate an in vivo role for serum blocking factors in tolerant mice. *Transplantation* 1972; 14:382.

Bretscher PA et al. Establishment of stable cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 1992; 257:539.

Burnet FM. The clonal selection theory of acquired immunity. 1959; Cambridge University Press, Cambridge.

Burstein HJ et al. In vivo role for interleukin-4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. *J. Exp. Med.* 1993; 177:457.

Chan SH et al. Induction of interferon-gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 1991; 173:869.

Chan SH et al. In vivo depletion of CD8+ T cells results in TH2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59:1155.

Chatelain R et al. IL-4 induces a TH2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol.* 1992; 148:1182.

Chen N et al. Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation* 1995; 59:933.

Cher DJ et al. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* 1987; 138:3688.

Clerici M et al. A TH1-TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 1993; 14:107.

Croft M et al. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J. Immunol.* 1995; 154:4269.

Dallman MJ et al. Induction of Ia antigens on murine epidermal cells during the rejection of skin allografts. *Transplantation* 1983; 36:222.

Dallman MJ et al. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J. Exp. Med.* 1991a; 173:79.

Dallman MJ et al. Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 1991b; 174:493.

Dallman MJ et al. An early imbalance in IL-2 and IL-10 production is associated with the induction of transplantation tolerance. XIVth International Congress of the Transplantation Society. Paris 1992.

Dallman MJ et al. Continuous production of interleukin-4 in vivo causes prolongation of graft survival. XVth International Congress of the Transplantation Society. Kyoto 1994.

D'Andrea A et al. Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon-gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor / IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 1993; 178:1042.

Daynes RA et al. Regulation of murine lymphokine production in vivo. II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *Eur. J. Immunol* 1990; 29:793.

DeGroen PC et al. The eosinophils as an effector of the immune response during hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1994; 20:654.

de la Hera M et al. Self-limited autoimmune disease related to transient donor B cell activation in mice neonatally injected with semi-allogeneic F1 cells. *Int. Immunol.* 1992; 4:67.

Del Prete GF et al. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 (Th2) T cell clones and inhibit their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 1993; 150:1.

de Waal Malefyt R et al. Interleukin-10. *Cur. Opin. Immunol.* 1992; 4:314.

Ding L et al. IL-10 inhibits macrophage co-stimulatory activity by selectively inhibiting the upregulation of B7 expression. *J. Immunol.* 1993; 151:1224.

Dorsch S et al. Suppressor cells in transplantation tolerance. *Transplantation* 1982; 33:518.

Doutrelepon JM et al. Hyper IgE in stimulatory graft-versus-host disease: role of interleukin-4. *Clin. Exp. Immunol.* 1991; 83:133.

Druet P et al. Les lymphocytes Th1 et Th2 dans l'auto-immunité. *Actualités néphrologiques* 1995. Flammarion Médecine-sciences.

Dustin ML et al. Induction by IL-1 and interferon, tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 1986; 137:245.

Erard F et al. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* 1993; 260:1802.

Eto M et al. Intrathymic clonal deletion of  $\nu\beta$  6+ T cells in cyclophosphamide-induced tolerance to H-2 compatible, Mls-disparate antigens. *J. Exp. Med.* 1990; 171:97.

Eto M et al. Similarity and difference in the mechanisms of neonatally induced tolerance and cyclophosphamide-induced tolerance in mice. *J. Immunol.* 1991; 147:2439.

Fanslow WC et al. Regulation of alloreactivity in vivo by IL-4 and the soluble IL-4 receptor. *J. Immunol.* 1991; 147:535.

- Feng HM et al. Clonal analysis of T cell unresponsiveness to alloantigens induced by neonatal injection of F1 spleen cells into parental mice. *J. Immunol.* 1983; 131:2165.
- Finkelman FD et al. Interferon- $\gamma$  regulates the isotypes of immunoglobulin secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* 1988; 140:1022.
- Finkelman FD et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8:303.
- Fiorentino DF et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 1991a; 146:3444.
- Fiorentino DF et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 1991b; 147:3815.
- Firestein GS et al. A new murine CD4<sup>+</sup> T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.* 1989; 143:518.
- Fitch FW et al. Differential regulation of murine lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11:29.
- Fleming HL et al. An immunogenetic analysis of Ska antigens in mice. *Immunogenetics* 1981; 14:517.
- Florquin S et al. Renal immunopathology in murine host-versus-graft disease. *Kidney Int.* 1991; 40:852.
- Fraser JD et al. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991; 251:313.
- Gajewski et al. Antiproliferative effect of IFN- $\gamma$  in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 1989; 143:15.
- Gazzinelli RT et al. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$  activated macrophages. *J. Immunol.* 1992; 148:1792.

Go NF et al. Interleukin-10 (IL-10), a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.* 1990; 172:1625.

Golding H et al. Role of accessory cell processing and presentation of shed H-2 alloantigens in allospecific cytotoxic T lymphocyte response. *J. Immunol.* 1984; 133:597.

Golding H et al. Specificity, phenotype, and precursor frequency of primary cytolytic T lymphocytes specific for class II major histocompatibility antigens. *J. Immunol.* 1985; 135:1610.

Goldman M et al. Autoimmunity and immune complex disease after neonatal induction of transplantation tolerance in mice. *J. Immunol.* 1983; 131:251.

Goldman M et al. Hyperactivity of donor B cells after neonatal induction of lymphoid chimerism in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 1988; 72:79.

Goldman M et al. *Transplant. Proc.* 1989; 21:328. (à compléter).

Gollob KJ et al. A minority subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells directs the development of naive CD4<sup>+</sup> T cells into IL-4 secreting cells. *J. Immunol.* 1994; 152:5180.

Gonzalez M et al. CD4<sup>+</sup> T cells determine the ability of spleen cells from F1 mice to induce neonatal tolerance to alloantigens and autoimmunity in parental mice. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25:1760.

Gorczynski RM et al. Suppression of cytotoxic response to histoincompatible cells. *J. Immunol.* 1979; 122:737.

Gorczynski RM et al. (a) Adoptive transfer of unresponsiveness to allogeneic skin grafts with hepatic  $\gamma\delta^+$  T cells. *Immunology* 1994; 81:27.

Gorczynski RM et al. (b) 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.* 1994; 152:2011.

Gorczynski RM et al. Tolerance induction to multiple minor histoincompatible cells by activated B cells is associated with preferential activation of TH2 cells. *Transplantation* 1994; 58:51.

Gross A et al. Anti-IL-4 diminishes in vivo priming for antigen-specific IL-4 production by T cells. *J. Immunol.* 1993; 150:2112.

Gruchalla RS et al. Analysis of neonatally induced tolerance of H-2 alloantigens. *Transplantation* 1983; 36:318.

Hancock WW et al. Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated allograft rejection by selective intragraft TH2 cell activation. *Transplantation* 1993; 55:1112.

Hard RC et al. Etiology, pathogenesis, and prevention of a fatal host-versus-graft syndrome in parent/F1 mouse chimeras. *Am. J. Pathol.* 1970; 59:203.

Hard RC et al. Hyperimmunoglobulinaemia, T-cell deficiency and plasmacytosis in RFM mice with host versus graft disease induced by the perinatal inoculations of (T6xRFM)F1 spleen cells. *Clin. exp. Immunol.* 1975; 22:330.

Heeg K et al. Analysis of immunological tolerance to major histocompatibility complex antigens. *Eur. J. Immunol.* 1985; 15:25.

Heinzel FP et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 1989; 169:59.

Heinzel FP et al. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 1993; 177:1505.

Hsieh CS et al. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:6065.

Hsieh CS et al. (a) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993; 260:547.

Hsieh CS et al. (b) Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4<sup>+</sup> ab-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int. Immunol.* 1993; 5:371.

Holan V et al. Specific suppression of antigen-reactive cells in neonatal transplantation tolerance. *Nature* 1978; 274:895.

Holan V et al. Antigen recognition and IL-2 receptor gene expression as evidence against clonal deletion in mice with neonatally induced transplantation tolerance. *Cell. Immunol.* 1992; 140:257.

Holman E. Protein sensitization in isoskin graft. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1924; 38:100.

Janossy T et al. Autoimmunity, hyporeactivity to T cell mitogens and lymphoproliferative disorders following neonatal induction of transplantation tolerance in mice. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23:3011.

Kamogawa Y et al. The relationship of IL-4 and IFN- $\gamma$  producing T cells studied by lineage ablation of IL-4 producing cells. *Cell* 1993; 75:985.

Kappler JW et al. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49:273.

Kappler JW et al. Self-tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* 1988; 332:35.

Kelso A. TH1 and TH2 subsets: paradigms lost ?. *Immunol. Today* 1995; 16:374.

Kemeny DM et al. Immune regulation: a new role for the CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol. Today* 1994; 15:107.

Kirkman RL et al. The effect of anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody on allograft rejection. *Transplantation* 1985; 40:719.

Kobayashi M et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989; 170:827.

Koide S et al. Induction of murine interleukin-1: still

muli and responsive primary cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84:3802.

Konieczny B et al. Interleukin-10 eliminates mortality in anti-CD3 monoclonal antibody treated mice. XVth International Congress of the Transplantation Society. Kyoto 1994.

Kramar G et al. Characterization of host CD4+ T lymphocytes in mice neonatally tolerized to alloantigens. Eur. J. Immunol. 1993; 23:2551.

Launois P et al. In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1-. Eur. J. Immunol. 1995; 25:3298.

Lechler RI et al. The molecular basis of alloreactivity. Immunol. Today 1990; 11:83.

Legros GG et al. Generation of interleukin 4 (IL-4) producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4 producing cells. J. Exp. Med. 1990; 172:921.

Levin D et al. Antigen presentation by neonatal murin spleen cells. Cell. Immunol. 1989; 120:132.

Lu CY et al. Nature 1979; 282:327 (à compléter)

Lu CY et al. During ontogeny, Ia bearing cells are found early in the thymus but late in the spleen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980; 77:1597.

Luzuy S et al. Autoimmunity after induction of neonatal tolerance to alloantigens; role of B cell chimerism and F1 donor B cell activation. J. Immunol. 1986; 136:4420.

Macatonia SE et al. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN- $\gamma$  production. J. Immunol. 1993; 150:3755.

Maeda H et al. Adoptive transfer of a TH2-like cell line prolongs MHC class II antigen disparate skin allograft survival in the mouse. Int. Immunol. 1994; 6:855.

Masinovski B et al. IL-4 acts synergistically with IL-1 $\beta$  to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. J. Immunol. 1990; 145:2886.

Mathieson PW et al. Regulatory role of OX22high T cells in mercury-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. *J. Exp. Med.* 1993; 177:1309.

Matriano JA et al. (a) Cellular mechanisms that maintain neonatally-induced tolerance to class II alloantigens: Evidence that factor-mediated suppression silences cytotoxic T cell activity. *J. Immunol.* 1994; 153:1505.

Matriano JA et al. Cellular mechanisms that maintain neonatally-induced tolerance to class II alloantigens: Evidence that precursor cytotoxic T cells are present but silenced. *J. Immunol.* 1994; 153:1515.

Mc Arthur JG et al. CD28-induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin-4. *J. Exp. Med.* 1993; 178:1645.

Mc Carthy SA et al. (a) The cellular mechanism of maintenance of neonatally induced tolerance to H-2 class I antigens. *J. Immunol.* 1983; 131:1676.

Mc Carthy SA et al. (b) A comparison of the neonatal tolerance-inducing capacities of H-2 class I and class II antigens. *J. Immunol.* 1983; 131:1670.

Mc Donald HR et al. (a) T-cell receptor V $\beta$  use predicts reactivity and tolerance to Mls<sup>a</sup>-encoded antigens. *Nature* 1988; 332:40.

Mc Donald HR et al. (b) Intrathymic elimination of Mls<sup>a</sup>-reactive (V $\beta$ 6<sup>+</sup>) cells during neonatal tolerance induction to Mls<sup>a</sup>-encoded antigens. *J. Exp. Med.* 1988; 167:2005.

Merino J et al. Autoimmune syndrome after induction of neonatal tolerance to alloantigens: effects of in vivo treatment with anti-T cell subset monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1987; 139:1426.

Merino J et al. Autoimmune syndrome after induction of neonatal tolerance to alloantigens: CD4<sup>+</sup> T cells from the tolerant host activate autoreactive F1 B cells. *J. Immunol.* 1989; 143:2202.

Merino J et al. Autoimmune syndrome after induction of neonatal tolerance to alloantigens: analysis of the role of donor T cells in the induction of autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 1990; 79:273.

Mohler KM et al. (a) Lymphokine production by MLR-reactive reaction lymphocytes obtained from normal mice and mice rendered tolerant of class II MHV antigens. *Transplantation* 1989; 47:625.

Mohler KM et al. (b) Differential expression of helper versus effector activity in mice rendered neonatally tolerant of class II MHC antigens. *Transplantation* 1989; 47:633.

Moore KW et al. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11:165.

Mosman TR et al. Two types of murine helper T cell clone. *J. Immunol.* 1986; 136:2348.

Mottram PL et al. Increased expression of IL-4 and IL-10 and decreased expression of IL-2 and interferon-g in long surviving mouse heart allografts after brief CD4-monoclonal antibody therapy. *Transplantation* 1995; 59:559.

Müller KM et al. TH2 cells mediate IL-4 dependent local tissue inflammation. *J. Immunol.* 1993; 150:5576.

Munoz E et al. Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 1990; 172:95.

Nassiri M et al. Donor-specific skin transplants activate allodestructive T cells in mice resistant to neonatal H-2 tolerance induction. *Transplantation* 1993; 56:1460.

Nossal GJV et al. Functional clonal deletion in immunological tolerance to major histoincompatibility complex antigens. *PNAS* 1981; 78:3844.

Owen RD. *Science* 1945; 102:400.

Paliard X et al. Simultaneous production of IL-2, IL-4, IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J. Immunol.* 1988; 141:849.

Parish CR et al. Immune response to chemically modified flagellin. 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. *J. Exp. Med.* 1972; 135:298.

Pfeiffer C et al. Selective activation of Th1 and Th2-like cells in vivo-response to human collagen IV. *Immunol. Rev.* 1991; 123:65.

Piela Smith TH et al. Regulation of ICAM-1 expression and function in human dermal fibroblasts by IL-4. *J. Immunol.* 1992; 148:1375.

Pirmez C et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:1390.

Powell TJ et al. Neonatal tolerance induction by class II alloantigens activates IL-4 secreting, tolerogen-responsive T cells. *J. Immunol.* 1990; 144:854.

Powell TJ et al. *Transplantation* 1991; 54:383. (a compléter).

Powers GD et al. Frequencies of IL-2 and IL-4 secreting T cells in naive and antigen-stimulated lymphocyte populations. I. *Immunol.* 1988; 140:3352.

Ramos A et al. Differences in non-MHC alloantigens promote tissue rejection but fail to mediate allogeneic co-operation and auto-immunity in mice neonatally injected with semi-allogeneic F1 B cells. *Immunology* 1994; 82:287.

Restifo NP et al. Defective presentation of endogenous antigens by a murine sarcoma: implications for the failure of anti-tumor immune response. *J. Immunol.* 1991; 147:1453.

Rocken M et al. Lectin-mediated induction of IL-4 Producing CD4+ T cells. *J. Immunol.* 1991; 146:577.

Romani N et al. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to cell clones. *J. Exp. Med.* 1989; 169:1169.

Romani L et al. Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1 associated immunity in murine candidiasis. *J. Exp. Med.* 1992; 176:19.

Rosenberg AS et al. Analysis of T cell subsets in rejection of Kb mutant skin allograft differing at class I MHC. *Nature* 1986; 322:829.

Rosenberg AS et al. Rejection of skin allografts by CD4+ T cells is antigen specific and requires expression of target alloantigen on Ia- epidermal cells. *J. Immunol.* 1989; 143:2452.

Rosenberg AS et al. Specific prolongation of MHC Class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN-gamma monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1990; 144:4648.

Rosenberg AS. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10:333.

Roser BJ et al. Cellular mechanisms in neonatal and adult tolerance. *Immunol. Rev.* 1989; 107:179.

Ruiz P et al. Evidence that I-E negative mice resistant to neonatal H-2 tolerance induction display ubiquitous thymic clonal deletion of donor-reactive T cells. *Transplantation* 1993; 55:321.

Ruiz P et al. Characterization of donor chimerism, alloreactive host T cells and memory cell development in thymi from mice resistant to neonatal transplantation tolerance. *J. Immunol.* 1995; 154:633.

Sayegh MH et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits TH1 cytolines but spares TH2. *J. Exp. Med.* 1995; 181:1869.

Schleimer RP et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. *J. Immunol.* 1992; 148:1086.

Schurmans S et al. In vivo effects of anti-IL-4 monoclonal antibody on neonatal induction of tolerance and an associated autoimmune syndrome. *J. Immunol.* 1990; 145:2465.

Schurmans S et al. Transient T and B cell activation after neonatal induction of tolerance to MHC class II or MIs alloantigens. *J. Immunol.* 1991; 146:2152.

Schurmans S et al. Anti-LFA-1 (CD11a) monoclonal antibody interferes with neonatal induction of tolerance to alloantigens. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24:985.

Scott P et al. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 1991; 147:3149.

Seder RA et al. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 1992; 176:1091.

Seder RA et al. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon g production and diminishes interleukin 4 inhibition on such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:10188.

Seder RA et al. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:635.

Sena J et al. A comparison of the survival of H-Y incompatible ear, tail and body skin grafts. *Transplantation* 1976; 21:412.

Shortman K et al. The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4+8+ thymocytes: Delineation of CD4+8+32+ thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. *J. Exp. Med.* 1991; 173:323.

Smith H et al. Neonatal thymectomy results in a repertoire enriched in T cells deleted in adult thymus. *Science* 1989; 245:749.

Speiser *Int.Immunol.* 1991 (à compléter)

Steinmuller D et al. Transplantation biology and immunogenetics of murine skin-specific (sk) alloantigens. *Transplant. Proc.* 1980; 12:100.

Street NE et al. Heterogeneity of mouse helper cells. *J. Immunol.* 1990; 144:162.

Streilein WJ et al. Suppression in class II MHC tolerance is mediated by Ia-specific lymphocytes that fail to mature into allodestructive effectors. *Transplantation Proceedings* 1981; 21:236.

Steilein JW et al. Failure of in vitro assays to predict accurately the existence of neonatally induced H-2 tolerance. *Transplantation* 1989; 48:630.

Streilein JW et al (a). Influence of I-E expression on induction of neonatal transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21:261.

Streilein JW (b). Neonatal tolerance to H-2 alloantigens. *Transplantation* 1991; 52:1.

Stockinger B et al. Cytotoxic T-cell precursors revealed in neonatally tolerant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984; 81:220.

Surh CD et al. Exclusion of circulating T cells from the thymus does not apply in the neonatal period. *J. Exp. Med.* 1993; 177:379.

Svetic A et al. *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN-g in CD4+ T cells. *Int. Immunol.* 1993; 5:877.

Swain SL et al. (a) CD4+ T cells subsets. *J. Immunol.* 1990; 144:1788.

Swain SL et al. (b) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 1990; 145:3796.

Swain SL et al. Helper T-cell subsets: Phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol. Rev.* 1991; 123:115.

Takai S et al. Increased IgE levels as a marker of host-versus-graft disease: inhibition of this HVGD with a monoclonal antibody to IL-4. *Cell. Immunol.* 1993; 149:1.

Takeuchi T et al. Heart allografts in murine systems - the differential activation of TH2-like effectors cells in peripheral tolerance. *Transplantation* 1992; 53:1281.

Tanaka T et al. Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon g production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:5914.

Thai NL et al. Cytokine mRNA profiles in mouse orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1995; 27:274.

Trenn G et al. B cell stimulatory factor 1 (IL-4) enhances the development of cytotoxic T cells from Lyt-2+ resting murine T lymphocytes. *J. Immunol.* 1988; 140: 1101.

Umland SP et al. Effects of in vivo administration of interferon (IFN)- $\gamma$ , anti-IFN- $\gamma$ , or anti-interleukin-4 monoclonal antibodies in chronic autoimmune graft-versus-host-disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992; 63:66.

Vandenabeele P et al. Increased interleukin-6 production and IL-6 mediated immunoglobulin secretion in host-versus-graft disease. *J. Immunol.* 1993; 150:4179.

Voisin GA et al. Immune status of mice tolerant of living cells. *J. Exp. Med.* 1972; 135:1185.

Wang SC et al. Cytokine products of T-Helper 2 (Th2) cells are present in rejecting sponge matrix allografts. *Transplant. Proc.* 1991; 23:809.

Weaver CT et al. T helper cell subsets require the expression of distinct costimulatory signals by antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85:8181.

Weinberg AD et al. Distinct regulation of lymphokine production is found in fresh versus in vitro primed murine helper T cells. *J. Immunol.* 1990;144:1800.

Widmer MB et al. Antigen driven helper cell independent cloned cytotoxic T lymphocyte. *Nature* 1981; 294:750.

Widmer MB et al. Regulation of cytolytic cell populations from human peripheral blood by B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4). *J. Exp. Med.* 1987a; 166:1447.

Widmer MB et al. Regulation of cytolytic T-lymphocyte generation by B-cell stimulatory factor. *Nature* 1987b; 326:795.

Wissing M et al. Modulation of host-versus-graft disease by anti-CD3 monoclonal antibody. *Clin. Exp. Immunol.* 1991; 83:333.

Wissing et al. Emergence of TH2-like cells after anti-CD3 monoclonal antibody administration in mice. *Transplant. Proc.* 1995; 27:378.

Wogensen L et al. Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J. Exp. Med.* 1993; 178:175.

Wolf SF et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* 1991; 146:3074.

Wood PJ et al. Ontogeny of acquired immunological tolerance to H-2 alloantigens. *Eur. J. Immunol.* 1982; 12:188.

Wood PJ et al. (a) Characterization of cytotoxic cells in mice rendered neonatally tolerant of MHC alloantigens: evidence for repertoire modification. *J. Immunol.* 1987; 138:3661.

Wood PJ et al. (b) Modification of the cytotoxic T cell repertoire in neonatal tolerance. *J. Immunol.* 1987; 139:3236.

Wren SM et al. CD4<sup>+</sup> T cells, but not CD8<sup>+</sup> T cells, mediate the breaking of tolerance in mixed allogeneic chimeras (B10+B10.BR B10). *Transplantation* 1993; 55:1382.

Wu CY et al. IL-12 induces the production of IFN- $\gamma$  by neonatal human CD4 T cells. *J. Immunol.* 1993; 151:1938.

Wu CY et al. In vitro maturation of human neonatal CD4 T lymphocytes. *J. Immunol.* 1994; 152:1141.

Xu GP et al. Intra-graft expression of IL-10 messenger RNA: a novel correlate of renal allograft rejection. *Kidney Int.* 1995; 48:1504.

Yamamura M et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254:277.

Yoshimoto T et al. CD4<sup>pos</sup>, NK1.1<sup>pos</sup> T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* 1994; 179:1285.

## **VI. THESES ANNEXES**

1. L'interleukine 10 prévient la toxicité induite par l'injection d'anticorps monoclonal anti-CD3 chez la souris.
2. L'autotransplantation immédiate de tissu parathyroïdien n'est pas indiquée lorsque moins de 4 glandes sont identifiées au cours d'une parathyroïdectomie pour hyperparathyroïdie secondaire.
3. Le scanner abdominal est un examen décisif dans la mise au point et la décision thérapeutique en cas d'occlusion intestinale.