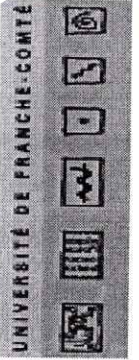




TH/M 140



Diplôme de Master 2 Recherche
« RELATIONS HÔTE-GREFFON »
en Transplantation d'Organes et Greffe de tissus

**Etude in vivo de la réponse humorale anti-donneur
et du microchimérisme après injection de cellules
dendritiques du donneur dans un modèle de rejet
chronique : rat Fisher donneur - rat Lewis receveur.**

Méthodologie.

Présenté et soutenu par :

Katia ABDELOUHAB

le 06 juillet 2005 à Besançon



Sous la direction de :

Pr. Gérard RIFLE, Pr. Laurent MARTIN

TH/M140

laboratoire d'immunomanipulation et immunosuppresseurs en auto et alloréactivité,
UPRES-EA 563.

Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, Dijon.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	3
LNTRODUCTION.....	4
RAPPELS SUR LES ANTICORPS ANTI-DONNEUR ET SUR L'INDUCTION DE TOLERANCE.....	5
1. Rôle des anticorps anti-donneur dans les rejets d'allogreffes.....	5
2. Anticorps et tolérance.....	10
II. MATERIEL ET METHODES.....	15
1. Animaux.....	15
1.1 Hébergement.....	15
1.2 Anesthésie-euthanasie.....	15
1.3 Groupes expérimentaux.....	16
2. Isolement des cellules dendritiques.....	16
2.1 Splenectomie.....	16
2.2 Isolement des cellules dendritiques.....	17
2.3 Caractérisation des cellules dendritiques en cytométrie de flux.....	18
3. Etude <i>in vivo</i> du microchimérisme.....	19
3.1 Marquage <i>ex vivo</i> des cellules dendritiques du donneur au PKH-26.....	19
3.2 Etude au microscope à fluorescence.....	20
4. Cross match en cytométrie de flux.....	20
4.1 Isolement des lymphocytes totaux ganglionnaires.....	20
4.2 Congélation et conservation des lymphocytes en azote liquide.....	21
4.3 Prélèvement sanguin.....	21
4.4 Cross match.....	21
5. Détermination <i>in vivo</i> de la dose de l'AcMo W3/25.....	22
III. RESULTATS.....	23
1. Isolement et caractérisation des cellules dendritiques.....	23
1.1 Isolment par la technique enzymatique	23
1.2 caractérisation en cytométrie de flux des cellules dendritiques.....	23
2. Etude du microchimérisme <i>in vivo</i>.....	24
3. Recherche des Acs anti-donneur chez le receveur en cytométrie de flux.....	28
4. détermination de la dose d'anticorps anti-CD4 (W3/25) opsonisation.....	29
IV. DISCUSSION.....	32
V. CONCLUSION.....	36
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	37

Résumé

L'objectif final du projet est de tester l'hypothèse selon laquelle un anticorps monoclonal anti-CD4 associé à des CD matures du donneur pourrait induire une tolérance dans un modèle de rejet chronique de cœur dans une combinaison rat Fisher donneur/rat Lewis receveur. A côté de son effet bénéfique potentiel, ce modèle en orientant la réponse immune vers une réponse TH2 pourrait favoriser la sécrétion d'anticorps anti-donneur et donc le développement du rejet chronique. L'objectif de ce travail, a été de réaliser la première partie du projet qui a cherché à définir la réponse anticorps après injection de cellules dendritiques, la réalité d'un microchimérisme induit par cette injection et de définir la dose d'anticorps monoclonal anti-CD4 à injecter en même temps que les cellules dendritiques. L'injection de 5.10^6 cellules dendritiques du donneur induit chez le receveur une réponse anticorps mise en évidence en cytométrie en flux. L'injection de la même dose de cellules dendritiques induit chez le receveur un microchimérisme dans les organes lymphoïdes primaire et secondaires qui se prolonge au moins jusqu'à J 45. Une opsonisation complète des lymphocytes est observée pendant 12 heures après une injection de 2 mg d'anticorps monoclonal anti-CD4 (W3-25). Ces données préliminaires nous permettrons d'utiliser le modèle de greffes de cœur rat Fisher vers rat Lewis associé à une injection à J0 de 2.10^6 cellules du donneur avec ou sans 2 mg d'anticorps monoclonal anti-CD4 par rat.

Summary

The final goal of this project is to check if anti-CD4 monoclonal antibodies plus mature dendritic cells could induce tolerance in a model of chronic rejection of cardiac allografts (Fischer to Lewis). Behind tolerance, a Th2 deviation of the immune response, leading to donor specific antibodies and chronic rejection, could also occur. In the first part of the project, the humoral response and the reality of microchimerism after dendritic cells injection was studied. Furthermore, the dose of anti-CD4 monoclonal to inject with dendritic cells was defined. Injection of 5.10^6 dendritic cells of donor origin induces a humoral response detected by flow cytometric cross matches. The same dose of dendritic cells lead to microchimerism detected in primary and secondary lymphoid tissues for at least 45 days. Opsonisation of recipient lymphocytes was detected for 12 hours after injection of 2 mg of anti-CD4 antibodies (W3/25). These preliminary data validate the model of cardiac allograft transplantation after injection of 2.10^6 dendritic cells with or without anti-CD4 monoclonal antibodies (2mg) at day 0.

