

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DES FONCTIONS AUXILIAIRES DES LYMPHOCYTES T CD4⁺
DANS UN MODÈLE MURIN DE REJET DE GREFFE DE PEAU**

par
DOMINIQUE SAUVÉ

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Jacques Bernier, INRS-IAF

Examineur externe

Jacques Thibodeau,
Université de Montréal

Directeur de recherche

Claude Daniel, INRS-IAF

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	i
TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
SOMMAIRE.....	ix
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1. LA TRANSPLANTATION.....	5
2. IMMUNOSUPPRESSION.....	5
3. LES TYPES DE REJET DE GREFFE.....	7
4. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE REJET DE GREFFES.....	8
4.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité.....	8
4.2 Initiation du rejet : migration des CPA vers les organes lymphoïdes secondaires.....	10
4.3 Cellules T CD4 ⁺	12
4.4 Cellules T CD8 ⁺	15
4.5 Production des alloanticorps par les cellules B.....	17
4.6 Autres cellules du système immunitaire impliquées dans le rejet de greffe.....	21
5. ALLORÉACTIVITÉ.....	22
5.1 Voie directe.....	23
5.2 Voie indirecte.....	28

6. UN MODÈLE DE GREFFE DE PEAU.....	31
CHAPITRE I - ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	36
Accusé de réception.....	37
Attestation de la contribution des auteurs.....	38
Page titre.....	39
Résumé.....	40
Introduction.....	41
Matériel et méthodes.....	45
Résultats.....	50
Discussion.....	75
Remerciements.....	81
Liste des références.....	82
CHAPITRE II - RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	88
Introduction.....	89
Matériel et méthodes.....	90
Résultats et discussion.....	94
Conclusion.....	107
DISCUSSION / CONCLUSION.....	108
REMERCIEMENTS.....	125
BIBLIOGRAPHIE.....	126
ANNEXE.....	140

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1.** Deux voies par lesquelles les cellules T peuvent être stimulés afin de fournir une aide à la cellule B pour la production en anticorps. (A) Interaction non cognitive. (B) Interaction cognitive.....20
- FIGURE 2.** La présentation des alloantigènes aux cellules T s'effectue via deux voies alloréactives : la voie directe et la voie indirecte..... 25
- FIGURE 3.** Allorecognition directe et indirecte par le clone de lymphocyte T 2.102.....34
- FIGURE 4.** Prolifération of 2.102Tg purified T cells after stimulation with irradiated splenocytes or spleen cells lysates.....53
- FIGURE 5.** Absence of homeostatic proliferation following adoptive transfer of 2.102Tg CD4⁺ T cells.....56
- FIGURE 6.** Kinetics of tail-skin grafts rejection by the direct and indirect alloreactivity pathways are similar.....59
- FIGURE 7.** Production of IgG alloantibodies is only observed after sensitization by the indirect pathway.....62
- FIGURE 8.** Production of alloantibodies against B10.P alloantigens is dependent on the indirect alloreactivity pathway.....65
- FIGURE 9.** IgG alloantibody isotypes produced after direct or indirect alloreactivity are comparable.....68

FIGURE 10. Comparable production of IgG alloantibodies despite different numbers of 2.102Tg CD4 ⁺ T cells transferred.....	72
FIGURE 11. Modèle de greffe de peau.....	96
FIGURE 12. Spécificité des réponses cytotoxiques.....	99
FIGURE 13. Test de cytotoxicité suite à un transfert adoptif de cellules T CD8 ⁺	102
FIGURE 14. Modulation de l'activité cytotoxique par des cellules T CD4 ⁺	103
FIGURE 15. La production en alloanticorps isotypiques IgG est similaire suite au transfert adoptif de différentes quantités de cellules T CD4 ⁺ 2.102Tg...	142
FIGURE 16. Interaction cognitive et non cognitive dans notre modèle murin de greffe de peau : aide apportée par la cellule T CD4 ⁺ 2.102 pour une production en alloanticorps spécifiques par les cellules B.....	120

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.	Survival of tail-skin grafts on TCR α KOK recipients after adoptive transfer of different numbers of purified CD4 ⁺ T cells.....	70
-------------------	--	----

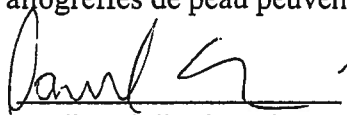
LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcMo :	anticorps monoclonaux
ADCC :	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps <i>antibody dependent cell cytotoxicity</i>
BrdU :	bromodeoxyuridine
CD :	antigène de surface <i>cluster of differentiation</i>
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	cellule présentatrices d'antigènes
Con A :	concanavoline A
Cr :	chromium
CTL :	lymphocyte T cytotoxique <i>cytotoxic T lymphocyte</i>
CyA :	cyclosporine A
DTH :	réaction d'hypersensibilité de type retardée <i>delayed type hypersensitivity</i>
FasL :	Fas ligand
FITC :	fluorescéine isothiocyanate
h :	heure
H-2 :	haplotype (système CMH chez la souris)
Hb :	hémoglobine
HEL :	lysozyme de poulet <i>hen egg lysozyme</i>
HLA :	système CMH chez les humains <i>human leukocyte antigen</i>
Ig :	immunoglobuline

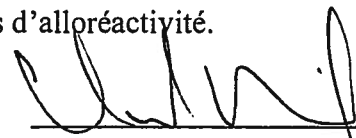
IL	:	interleukine
IFN	:	interféron
i.p.	:	intra-péritonéale
i.v.	:	intra-veineuse
2-ME	:	β -mercaptoéthanol
MPB	:	protéine basique majeure <i>major basic protein</i>
mH	:	antigènes mineurs d'histocompatibilité <i>minor histocompatibility antigens</i>
min	:	minute(s)
MLR	:	réaction lymphocytaire mixte <i>mixte lymphocyte reaction</i>
NK	:	cellule tueuse naturelle <i>natural killer cell</i>
PBS	:	tampon phosphate <i>phosphate buffer saline</i>
PE	:	phycoérythrine
SCID	:	immunodéficiences combinées sévères <i>severe combined immunodeficiency</i>
TCR	:	récepteur de la cellule T <i>T cell receptor</i>
Th	:	type de cellule T auxiliaire <i>T helper</i>
TNF	:	facteur de nécrose tumorale <i>tumor necrosis factor</i>
v/v	:	volume sur volume

SOMMAIRE

Afin d'approfondir le rôle des réponses alloréactives directe et indirecte dans la production en alloanticorps et dans la modulation des cellules T cytotoxiques CD8⁺, notre laboratoire a développé un modèle innovateur basé sur l'utilisation d'une lignée de souris transgéniques (2.102Tg) pour un récepteur de la cellule T dérivant, d'un clone de cellule T CD4⁺. Dans ce modèle, un seul clonotype de cellule T est capable à lui seul d'alloréactivité directe et indirecte. Nous avons utilisé un système de transfert adoptif avec des cellules T CD4⁺ purifiées provenant de souris 2.102Tg, et effectué des greffes de peau de queue de souris sur des C57BL/6J Tcr^{tm1/Mom} croisées avec des souris B6.AKR pour introduire la mutation dans un haplotype H-2^k (TCR α KOK). Ces souris ne possèdent pas de cellules T périphériques CD4⁺ ou CD8⁺ TCR $\alpha\beta$, et se trouvent incapables de rejet de greffe. Les observations faites indiquent que le rejet des allogreffes se produit dans les deux voies d'alloréactivité entre les jours 14 et 18. La production en alloanticorps dans les sérums obtenus avant et après le rejet a été analysée par cytométrie en flux. Les résultats démontrent, suite à un transfert adoptif de 10x10⁶ cellules T CD4⁺, une production en anticorps IgG chez les souris ayant rejeté leur allogreffe par la voie indirecte. Par contre, aucune production en anticorps IgG n'a été observée dans la voie directe d'alloréactivité. Ces résultats indiquent donc que la voie indirecte est requise pour les réponses en alloanticorps. Il a également été démontré, à partir des résultats obtenus suite au transfert adoptif de différentes quantités de cellules effectrices, une absence de corrélation entre les réponses en anticorps et le rejet aigu de greffe de peau. Les résultats obtenus suggèrent que l'absence de production en anticorps suite au rejet de greffe de peau dans la voie directe d'alloréactivité suggère une absence d'activation des cellules B, possiblement due à une absence d'activation des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires. De plus, la présence des cellules T CD4⁺ semble nécessaire pour permettre la maturation des cellules T CD8⁺ en CTL qui vont lyser les cellules cibles du greffon. Ainsi, les événements menant à l'initiation des réponses immunes responsables du rejet des allogreffes de peau peuvent différer entre les deux voies d'alloréactivité.



Dominique Sauvé



Claude Daniel

INTRODUCTION

Les transplantations représentent parfois le seul traitement de choix pour des patients avec des problèmes rénaux, cardiaques ou des maladies pulmonaires. Le développement de médicaments immunosuppresseurs a amené une amélioration de la survie à court terme des greffes. Toutefois, les drogues immunosuppressives ont un impact modeste sur le taux de survie des greffes à long terme. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le rejet de greffe est nécessaire pour développer de meilleures thérapies immunosuppressives. Il existe deux voies d'alloréactivité impliquées dans le rejet de greffe. Dans la voie d'alloréactivité directe, les cellules T du receveur reconnaissent des molécules du CMH sur la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du donneur, alors que dans la voie d'alloréactivité indirecte les cellules T du receveur reconnaissent un allopeptide présenté par une CPA du receveur. Ainsi, plusieurs études indiquent clairement le rôle essentiel des cellules T CD4⁺ dans les processus impliqués dans le rejet des allogreffes. Malgré tout, les connaissances portant sur les mécanismes exacts par lesquels les cellules T opèrent et sur la contribution réelle des voies alloréactives directe et indirecte demeurent incomplètes.

Par ailleurs, les réponses alloréactives directe et indirecte aux molécules du CMH de classe II allogéniques ont été démontrées tant dans des modèles de laboratoire qu'au niveau clinique. Néanmoins, peu de modèles expérimentaux adéquats existent pour élucider le rôle des voies directe et indirecte dans le rejet des allogreffes. Effectivement, la contribution relative des voies alloréactives dans un système biologique dont les paramètres se trouvent finement contrôlés n'a pas été évaluée. Le but de la recherche présentée dans ce mémoire rédigé par article a consisté à évaluer *in vivo* l'étendue des fonctions auxiliaires remplies par les lymphocytes T CD4⁺ lors des réponses alloréactives directe et indirecte. Pour mener à bien cette recherche, un modèle murin de greffe de peau à partir de diverses lignées de souris transgéniques et de souris congéniques a été utilisé. L'approche expérimentale considérée pour atteindre le premier objectif a été une analyse et une caractérisation de la production en anticorps par les cellules B contre des alloantigènes, suite à des analyses en cytométrie en flux des sérums de souris obtenus avant et après le rejet de greffe de peau. Le second objectif a consisté à étudier la modulation de la réponse des cellules T cytotoxiques CD8⁺ par un test de cytotoxicité

avec relargage de chrome 51 (^{51}Cr). Dans un premier temps, cette étude de la modulation des réponses cytotoxiques a été faite suite à un transfert adoptif de cellules T CD8⁺ seules dans les souris receveuses de greffe de peau, puis dans un second temps avec un transfert adoptif de cellules T CD8⁺ et de cellules T CD4⁺ combinées.

La première partie de cet ouvrage consiste en une revue de littérature détaillant les mécanismes impliqués dans le rejet de greffe, les voies alloréactives ainsi que le modèle murin de greffe de peau utilisé. Un article scientifique (chapitre I) reflétant les résultats obtenus au cours de cette étude, portant sur la production en alloanticorps, constitue la principale partie de ce mémoire. La numérotation des figures de cette section a été changée en fonction de l'apparition des figures dans ce document. Finalement, le chapitre II présente les résultats supplémentaires obtenus pour atteindre le second objectif de recherche portant sur la modulation des cellules T cytotoxiques.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. LA TRANSPLANTATION

La transplantation d'organes représente parfois le seul traitement de choix pour de nombreux patients atteints de maladies cardiaques, rénales ou de problèmes pulmonaires (Benichou 1999 ; Bushell et Wood 1999). Les greffes d'organes correspondent de nos jours à des procédures assez courantes au niveau de la pratique clinique (Bernabeu 1998). Effectivement, il y a approximativement 36 000 transplantations au niveau mondial à chaque année (Rose 1998) et en 2001, il y a eu 442 transplantations au Québec (Québec Transplant 2001). Toutefois, il y a de nombreux patients en attente pour une transplantation conséquence entre autres du faible taux de disponibilité des donneurs et des organes. Les données de Québec Transplant pour 2001 indiquent qu'il y a environ 930 patients en attente pour une transplantation.

2. IMMUNOSUPPRESSION

Le succès de la transplantation repose sur le développement et sur l'amélioration de médicaments immunosuppresseurs. Ces médicaments agissent sur la réponse immune permettant une inhibition du rejet de greffe (Bushell et Wood 1999). En absence de traitements immunosuppresseurs, les organes greffés subissent invariablement des dommages causés par la réponse immune entraînant alors une perte de la fonction des organes puis le rejet de ceux-ci. L'irradiation des patients, qui engendre une immunosuppression non spécifique, a été le premier traitement utilisé afin de diminuer les réponses du système immunitaire dirigées contre les greffons. Ce dernier a rapidement été remplacé par des drogues immunosuppressives comme les glucocorticoïdes, les stéroïdes et l'azathioprine, une analogue de purine (Auchincloss et Sachs 1993 ; Rossini *et al.* 1999). La cyclosporine A (CyA) représente également le plus important médicament immunosuppresseur qui a grandement modifié le succès de la transplantation, étant donné que cette drogue agit par une inhibition sélective des réponses immunes adaptatives (Kahan 1989). En effet, la cyclosporine A agit en bloquant la production de l'IL-2 et en conséquence son utilisation par les cellules T (Shevach 1985 ; Kahan 1989). La seconde génération des agents immunosuppresseurs comprend, entre autres, le tacrolimus (FK-

506), la rapamycine et les anticorps monoclonaux anti-CD3 (OKT3) (Bernabeu 1998 ; Sayegh et Turka 1998). Quant à la rapamycine, elle inhibe la prolifération, sans affecter les récepteurs de l'IL-2, en interférant plutôt avec les actions des cytokines au niveau de la signalisation (Dumont *et al.* 1990). Ainsi, les médicaments immunosuppresseurs permettent une atténuation de la réponse immune dirigée contre les cellules du greffon suite à la transplantation et empêchent donc le rejet et la perte des fonctions des organes greffés.

Le développement de médicaments immunosuppresseurs, au cours des deux dernières décennies, a amené une amélioration de la survie des patients et de la survie des organes greffés à court terme. Avant l'utilisation clinique de la cyclosporine A, le taux de survie des greffes rénales après un an se situait environ à 65 % (Sayegh et Turka 1998). Présentement, le taux de survie des organes durs greffés, principalement des greffes rénales, est près de 90 % un an après la transplantation (Denton *et al.* 1999 ; Rossini *et al.* 1999). Cette augmentation résulte principalement des progrès réalisés au niveau de la prévention et du traitement du rejet aigu (Denton *et al.* 1999), ainsi qu'au niveau de la compréhension des mécanismes cellulaires et biologiques impliqués dans le système immunitaire (Rossini *et al.* 1999). Pourtant, cette amélioration du taux de survie à court terme n'a pas résulté en une augmentation équivalente du taux de survie des greffes à long terme (Häyry *et al.* 1993 ; Shirwan 1999), puisque le taux de survie des greffes à long terme demeure un problème important (Denton *et al.* 1999). Effectivement, seulement 20 % des greffes vont être fonctionnelles après 10 ans (Orloff *et al.* 1995). De plus, il a été démontré que la cyclosporine A a un impact modeste sur le taux de survie des greffes (Opelz 1992). Ainsi, les médicaments immunosuppresseurs qui empêchent le rejet aigu semblent incapables de prévenir le rejet chronique. Le rejet chronique demeure donc une des complications majeures associées à la transplantation et représente une des principales sources de morbidité et de mortalité (Häyry *et al.* 1993 ; Rose 1998).

Par ailleurs, une administration à long terme de médicaments immunosuppresseurs, essentielle chez les patients greffés, engendre des effets secondaires indésirables. Il existe des risques de toxicité associés aux substances à effets

immunosuppresseurs au niveau de divers tissus incluant les reins, le foie, le pancréas et le système nerveux (Dantal *et al.* 1998 ; Sayegh et Turka 1998). Par exemple, la cyclosporine A est néphrotoxique et induit aussi des problèmes d'hypertension (Denton *et al.* 1999). Ces drogues immunosuppressives à large spectre amènent également une prédisposition à des infections opportunistes et au développement de tumeurs, compte tenu qu'elles exercent des effets sans discrimination sur les réponses immunes (Bushell et Wood 1999 ; Denton *et al.* 1999). Ces agents immunosuppresseurs inhibent donc les réponses bénéfiques en même temps que les réponses délétères. En conséquence, l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs mène à une augmentation de l'incidence des cancers chez les patients transplantés. Il y a développement de cancers, principalement au niveau de la peau, chez 10 % à 45 % des patients immunosupprimés après 10 ans, alors que 40 % à 75 % des patients fortement immunosupprimés vont développer des néoplasies malignes après 20 ans (Dantal *et al.* 1998 ; Newstead 1998). Bref, les agents immunosuppresseurs utilisés en transplantation possèdent une nature non spécifique et ne peuvent pas faire la distinction entre une réponse immune bénéfique contre des infections pathogènes et une réponse immune engendrant la destruction de la greffe. Ainsi, il est important de développer en transplantation des nouvelles thérapies plus spécifiques afin de réduire, entre autres, le risque des infections opportunistes et le développement de tumeurs malignes.

3. LES TYPES DE REJET DE GREFFE

La transplantation engendre irrévocablement une activation des réponses immunes dirigées contre le greffon entraînant une perte des fonctions et le rejet des organes greffés. Il existe différents types de rejet de greffe. Le rejet hyperaigu se produit lorsqu'un organe est rejeté dans les minutes ou les heures suivant la transplantation. La présence d'anticorps préformés chez des patients correspond à un élément caractéristique du rejet hyperaigu. Ce type de rejet est prédominant dans le cas des xénogreffes (Auchincloss et Sachs 1993 ; Rossini *et al.* 1999). En outre, le rejet hyperaigu est irréversible (Pattison et Krensky 1997). Par ailleurs, la transplantation de tissus engendre automatiquement un rejet aigu basé sur la reconnaissance des cellules étrangères, et se produit dans les premières semaines après la transplantation. Le rejet aigu est principalement caractérisé

par une nécrose tissulaire, un œdème et une sévère inflammation locale (Rosenberg et Singer 1992 ; Orosz et VanBuskirk 1998) résultant notamment des infiltrations cellulaires. Il est proposé que les leucocytes passagers présents dans les organes greffés initient le rejet aigu (Sekine *et al.* 1997 ; Briscoe *et al.* 1998). Les épisodes de rejet aigu peuvent être essentiellement contrôlés grâce aux médicaments immunosuppresseurs, où justement une immunosuppression inadéquate représente un facteur de risque important pour le développement d'un tel rejet. Le rejet aigu constitue un important pronostic du rejet chronique et ultimement de la perte de la greffe (Vella *et al.* 1997a). Quant au rejet chronique, il se caractérise par une détérioration progressive des fonctions des organes greffés commençant quelques mois ou années après la transplantation et mène ultimement à la perte des organes, et ce même en présence de fortes thérapies immunosuppressives (Rose 1998). Il existe plusieurs facteurs impliqués dans ce processus mais une des principales manifestations du rejet chronique est une artériosclérose au niveau de la greffe et aussi une fibrose (Sayegh et Turka 1998 ; Shirwan 1999). Malgré les progrès effectués, le rejet chronique demeure un problème majeur en transplantation et un obstacle pour la survie à long terme des greffes.

4. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE REJET DE GREFFE

4.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité

La transplantation d'organes entre deux individus non identiques de la même espèce (allogreffe) résulte en une réponse immune spécifique qui va mener au rejet des organes greffés (Arakelov et Lakkis 2000). En général, les réponses cellulaires induites après une transplantation suivent les règles fondamentales de la réponse immunitaire. La force exceptionnelle des réponses allogéniques en transplantation repose sur le grand nombre de cellules T spécifiquement alloréactives contre des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) allogéniques. Le CMH se compose de plusieurs loci hautement polymorphiques divisés en deux classes principales (CMH I et CMH II) (Krensky *et al.* 1990). Ces loci forment un groupe de gènes étroitement liés sur le chromosome 6 chez les êtres humains ou sur le chromosome 17 chez la souris (Little et

Parham 1999 ; Rhodes et Trowsdale 1999). Les antigènes du CMH possèdent une importance critique dans l'immunité à médiation cellulaire du rejet des allogreffes (Lechler *et al.* 1991), puisqu'il représente la principale cible de la réponse immune en transplantation. En fait, la découverte des molécules du CMH découle des observations des réponses immunes obtenues suite au rejet de greffe suivant la transplantation (Rogers et Lechler 2001). Il a même été suggéré qu'une élimination des antigènes du CMH pouvait représenter une stratégie thérapeutique afin d'atteindre une meilleure survie des greffes à long terme (Lee *et al.* 1997).

L'expression des molécules du CMH de classe I se fait à la surface de la vaste majorité des cellules nucléées. Les molécules de classe I du CMH correspondent à des hétérodimères formés par une chaîne lourde (α) et une chaîne légère (β_2 -microglobuline). La chaîne lourde contient trois domaines extracellulaires α_1 , α_2 et α_3 . Les domaines α_1 et α_2 composés chacun par une hélice α et un feuillet α s'apparient pour former un sillon à la surface de la molécule afin de permettre la liaison du peptide (Bjorkman *et al.* 1987). Le CMH de classe I est codé chez la souris par les gènes H-2D, H-2K et H-2P, et il est codé chez les humains par HLA-A, HLA-B et HLA-C (Jones 1997 ; Little 1999). Les molécules de classe II consistent, quant à elles, en des hétérodimères qui forment un complexe non covalent de deux chaînes, α et β . Les gènes IA et IE codent pour les molécules de classe II chez la souris alors que HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ correspondent aux antigènes de classe II du CMH chez les humains (Jones 1997). Les molécules de classe II du CMH se retrouvent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA) comme les macrophages, les cellules B et les cellules dendritiques. Les CPA consistent en des cellules spécialisées qui vont dégrader les antigènes en fragments peptidiques et présenter ceux-ci via les molécules du CMH à la surface, en association avec les molécules nécessaires pour la stimulation des lymphocytes (Auchincloss et Sachs 1993).

Quant à la fonction physiologique des molécules du CMH, cette dernière consiste à lier des antigènes nominaux sous forme de peptides puis à présenter ceux-ci au récepteur de la cellule T (TCR) (Fangmann *et al.* 1992 ; Douillard *et al.* 1999 ; Arakelov

et Lakkis 2000). L'expression des antigènes du CMH est également augmentée en réponse à différentes cytokines chez plusieurs types cellulaires, notamment l'interféron-gamma (IFN- γ). Les cellules T CD4⁺ reconnaissent les molécules du CMH de classe II, alors que les molécules du CMH de classe I présentent les peptides fragmentés aux cellules T CD8⁺. Cette interaction entre le TCR et le CMH, en association avec des molécules de co-stimulation, va induire les réponses immunes impliquées dans le rejet de greffe (Lederman et Suci-Foca 1999).

Tel que mentionné précédemment, les molécules du CMH de classe II se retrouvent exprimées à la surface des CPA professionnelles. Toutefois, suite à une stimulation par des cytokines *in vitro* ou durant une inflammation systémique, une expression des molécules du classe II du CMH peut être induite sur une variété de cellules épithéliales et endothéliales qui vont posséder alors la capacité de présenter des antigènes (Nickoloff et Turka 1994 ; Lohse 1996). Les kératinocytes et les fibroblastes peuvent également correspondre à des cellules présentatrices d'antigènes de type non-professionnel. Néanmoins, ces cellules semblent posséder une capacité plus limitée à stimuler les cellules T comparativement aux CPA professionnelles à cause d'une expression inadéquate des molécules de co-stimulation (Laning *et al.* 2001).

4.2 Initiation du rejet : migration des CPA vers les organes lymphoïdes secondaires

Il existe plusieurs mécanismes impliqués dans le rejet des allogreffes. La contribution des différents mécanismes effecteurs et leurs fonctions relatives dans le processus du rejet dépendent de divers facteurs comme le type de greffe, la disparité antigénique entre donneur et receveur et l'histoire médicale du receveur (Bradley 1996). Des analyses effectuées sur les cellules infiltrant les greffons ont révélé la présence de divers types de cellules incluant les cellules T CD4⁺, les cellules T CD8⁺, les cellules NK, les macrophages et les cellules B (Tilney *et al.* 1975 ; Ascher *et al.* 1984 ; Yamamoto *et al.* 1998). Le premier événement à se produire dans le rejet de greffe est la sensibilisation du système immunitaire du receveur. Suite à la transplantation, les CPA migrent du

greffon vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont activer des lymphocytes T spécifiques. Cette activation résulte des interactions entre les molécules du CMH exprimées à la surface des CPA et les TCR (Rose 1998 ; Arakelov et Lakkis 2000). La réponse immune débute donc au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, la rate et les plaques de Peyer (Janeway et Travers 1997). Il est suggéré que les organes lymphoïdes secondaires soient essentiels pour une initiation des réponses immunes impliquées dans le rejet des allogreffes de peau (Lakkis *et al.* 2000).

Les cellules dendritiques interstitielles consistent en des leucocytes passagers dans les organes greffés, qui possèdent une expression constitutive élevée de molécules du CMH de classe II et qui possèdent également des propriétés de co-stimulation (Banchereau et Steinman 1998). Ces cellules dendritiques fournissent le principal stimulus responsable du rejet des greffes (Setum *et al.* 1990). En fait, une déplétion des leucocytes passagers dans les organes avant la transplantation réduit les épisodes de rejet aigu (Lechler et Batchelor 1982). Ainsi, les CPA, principalement les cellules dendritiques, suite à la transplantation migrent rapidement du greffon vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur où vont débiter les réponses immunes. Notamment, la migration des cellules de Langerhans, c'est-à-dire les cellules dendritiques de la peau, vers les organes lymphoïdes secondaires a été démontrée (Larsen *et al.* 1990a ; Richters *et al.* 1999). Il a été également démontré par Larsen *et al.* (1990b) que la migration des cellules dendritiques des allogreffes cardiaques chez les souris vers la rate joue un rôle dans l'initiation des réponses immunes impliquées dans le rejet de greffe. Ainsi, il s'en suit une interaction entre les molécules du CMH exprimées à la surface des CPA avec les récepteurs des cellules T, en association avec des molécules de co-stimulation, engendrant alors une activation des cellules T qui vont jouer un rôle clé dans le rejet des allogreffes.

4.3 Cellules T CD4⁺

Les principales cellules engagées dans le processus du rejet de greffe correspondent aux lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4⁺ qui jouent un rôle central et essentiel dans les réponses immunes (Hall 1991 ; Auchincloss et Sachs 1993 ; Pietra *et al.* 2000). Effectivement, l'activation des cellules T en réponse au CMH allogénique exprimé sur les cellules du greffon engendre le rejet des allogreffes (Benichou *et al.* 1999). Notamment, le transfert adoptif de cellules T permet de restaurer le rejet de greffe de peau dans des animaux préalablement immunosupprimés (Hall 1991). Le rôle critique des cellules T dans le rejet des allogreffes a premièrement été établi par l'incapacité de souris dont le thymus fût enlevé à la naissance (Miller 1962) ou de souris nues (*nude*) athymique de rejeter leur allogreffe (Corley et Kindred 1977). Ainsi, suite à une activation des cellules T CD4⁺ par des CPA professionnelles au niveau des organes lymphoïdes secondaires drainant, les cellules T CD4⁺ activées vont migrer vers la greffe et exercer leurs fonctions effectrices. Par conséquent, la présence des cellules T CD4⁺ est cruciale pour l'initiation, l'exécution ainsi que pour la coordination des réponses immunes requises pour le rejet des allogreffes, étant donné que ces cellules jouent un rôle important dans les multiples mécanismes menant à la destruction du greffon (Denton *et al.* 1999 ; Douillard *et al.* 1999).

L'importance des cellules T CD4⁺ dans le rejet de greffe peut être montrée, entre autres, par un traitement avec des anticorps monoclonaux anti-CD4. Les AcMo anti-CD4, qui possèdent une action de déplétion, peuvent induire une tolérance ou une prolongation de la survie à long terme de la greffe (Auchincloss *et al.* 1988), puisqu'une telle stratégie thérapeutique amène une augmentation du taux de survie à long terme chez 40 % à 60 % des receveurs de greffe cardiaque dans un modèle murin (VanBuskirk *et al.* 1998). Ainsi, un traitement avec des anticorps monoclonaux anti-CD4 a une activité immunosuppressive suite à une transplantation (Sablinski *et al.* 1991), démontrant l'importance des cellules T CD4⁺ dans le rejet de greffe. Il a été également démontré avec des souris déficientes en CD4 et CD8 que les cellules T auxiliaires CD4⁺ mais pas les cellules T cytotoxiques CD8⁺ étaient requises pour l'initiation du rejet des allogreffes

(Kreiger *et al.* 1996). De surcroît, il a été démontré utilisant un système de transfert adoptif avec des cellules T CD4⁺ provenant de souris CD8 déficientes que les cellules T CD4⁺ seules pouvaient être suffisantes pour induire le rejet des greffes de peau (Dalloul *et al.* 1996).

Généralement, les cellules T CD4⁺ interagissent avec les molécules du CMH de classe II puis produisent des cytokines nécessaires à l'activation et la différenciation des cellules T CD8⁺. Ces CTL vont par la suite reconnaître des cellules cibles exprimant des molécules du CMH de classe I. Nonobstant, les cellules T CD4⁺ peuvent rejeter des allogreffes de peau exprimant des molécules allogéniques du CMH de classe I probablement par une sécrétion de cytokines inflammatoires (Sawada *et al.* 1997). Il a été également démontré par Dalloul *et al.* (1996) que les cellules T CD4⁺, suite à un transfert adoptif dans des souris nues (nude), peuvent induire par elles-mêmes le rejet de greffe de peau disparate pour les molécules du CMH de classe II mais aussi pour les molécules du CMH de classe I, malgré une efficacité moindre contre les cellules cibles exprimant des antigènes de classe I du CMH.

En ce qui concerne la production de cytokines par les cellules T CD4⁺, cette dernière est essentielle pour permettre une activation des divers mécanismes effecteurs impliqués dans le rejet de greffe. Les cytokines contribuent à la destruction des greffes de plusieurs façons incluant une régulation à la hausse des molécules du CMH de classe II, une augmentation des molécules de co-stimulation, une expression des chemokines au niveau du greffon, une activation des macrophages et des neutrophiles mais fournissent aussi une aide aux cellules B et aux cellules cytotoxiques (Matesic *et al.* 1998). Il est généralement reconnu que les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ se différencient en deux populations basées sur le profil de production de cytokines : Th1 et Th2. Les cellules Th1 sécrètent des cytokines proinflammatoires telles que IL-2 et INF- γ . Les cellules Th2 produisent, quant à elles, les cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13. Des études suggèrent que le rejet des allogreffes résulte des réponses immunes caractérisées par une production de cytokines de type Th1. Par contre, la sécrétion de cytokines de type Th2 serait responsable de la protection contre le rejet et même de la tolérance du receveur

envers les transplants (Onodera *et al.* 1997 ; Lakkis 1998). Néanmoins, il en demeure un véritable paradigme entre le rôle des cytokines versus un rejet ou une tolérance des greffes, compte tenu du fait que les rôles exacts en transplantation des deux familles de cytokines demeurent obscurs.

Les cellules T CD4⁺ possèdent également une certaine activité cytotoxique et peuvent fonctionner en tant que CTL (Hall 1991). La population de cellules T CD4⁺ contient des cellules détenant des fonctions auxiliaire et cytotoxique impliquées dans le rejet des allogreffes de peau (Rosenberg et Singer 1992). Les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ produisent des cytokines et en réponse à cette sécrétion de cytokines, il existe des cellules T auxiliaires qui vont se différencier subséquemment en cellules T cytotoxiques (Widmer et Bach 1981 ; Roopenian *et al.* 1983 ; Hancock *et al.* 1989). Ces cellules T CD4⁺ cytotoxiques expriment également à leur surface Fas ligand (FasL) impliqué dans la mort cellulaire programmée (apoptose). De plus, il existe également des cellules T CD4⁺ qui jouent un rôle dans la suppression des réponses du système immunitaire en tant que cellules T suppressives, même si généralement la majorité de ces cellules suppressives expriment des molécules CD8 à la surface (Lederman et Suci-Foca 1999).

Bref, la reconnaissance des molécules du CMH de classe II allogéniques exprimées à la surface des CPA par les cellules T auxiliaires CD4⁺ engendre leur activation, leur différenciation et la production de diverses cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, INF- γ et TNF α) (Krensky *et al.* 1990 ; Rose 1998). Ainsi, l'activation des cellules T CD4⁺ amène la prolifération et la différenciation de ces dernières en cellules effectrices. Ces cellules effectrices peuvent alors fournir de l'aide aux autres cellules du système immunitaire (cellules T CD8⁺, cellules B et macrophages) afin de provoquer des dommages au niveau des transplants. Cet aide peut prendre la forme soit de contact cellule-cellule ou soit par la production de cytokines.

4.4 Cellules T CD8⁺

Tel que mentionné précédemment, les cellules T auxiliaires CD4⁺ produisent des cytokines, principalement de l'IL-2, qui entraînent la croissance, la maturation et le maintien des cellules T cytotoxiques CD8⁺ (Rosenberg et Singer 1992 ; Lee *et al.* 1994 ; Kalams et Walker 1998). Des cellules T cytotoxiques spécifiques au donneur peuvent être récupérées dans la rate de receveurs greffés (Gurley *et al.* 1983 ; Lowry et Gurley 1983), et de tels CTL peuvent également être isolés à partir des greffons rejetés (Tilney *et al.* 1979 ; Nemlander *et al.* 1985). Ainsi, la présence de cellules T CD8⁺ suggère un rôle direct dans le rejet de greffe. Effectivement, les cellules T CD8⁺ représentent les médiateurs majeurs du rejet des allogreffes, principalement dans le rejet aigu (Wecker et Auchincloss 1992 ; Zavazava et Kabelitz 2000). Les cellules T CD8⁺ reconnaissent les molécules allogéniques du CMH de classe I (Shelton *et al.* 1992 ; Lee *et al.* 1997), et agissent en sécrétant des perforines ou des granzymes qui vont permettre la lyse des cellules cibles du greffon. Cette lyse des cellules cibles s'effectue, entre autres, par la production de perforines qui vont former des pores dans la membrane cellulaire et causer la lyse osmotique, ainsi que par la production de granzymes qui vont pénétrer par les pores et induire la mort cellulaire par apoptose, caractérisée par une absence de réponses inflammatoires. La liaison de Fas ligand (FasL) sur la cellule T CD8⁺ avec le récepteur Fas sur la cellule cible représente une autre voie pour permettre la lyse des cellules du greffon (Ito *et al.* 1999 ; Zavazava et Kabelitz 2000).

Tel que mentionné, les processus apoptotiques se caractérisent par une absence de réponses inflammatoires. Même si l'apoptose est associée avec le rejet des allogreffes, le rejet aigu se caractérise surtout par le développement de nécrose inflammatoire. Il est suggéré que les allogreffes ne seraient pas rejetées si seulement les processus apoptotiques opéraient (Orosz et VanBuskirk 1998). Effectivement, il existe des sites immunoprivilégiés comme les yeux, le thymus, le cerveau et les testicules protégés du rejet et qui ne requièrent pas de thérapie immunosuppressive. Cette protection résulte vraisemblablement de la présence de FasL sur les cellules de ces organes immunoprivilégiés (Rossini *et al.* 1999). Ainsi, cette voie Fas - FasL est probablement

plus importante dans le contrôle de la prolifération lymphocytaire afin de détruire les cellules lymphocytaires en excès que dans la cytotoxicité directe de la greffe (Pattison *et al.* 1997). Enfin, les cytokines TNF- α et IFN- γ produites par les CTL lors des réponses cytotoxiques vont également permettre la lyse cellulaire suite à une induction des mécanismes apoptotiques.

L'activation des cellules T CD8⁺ dépend généralement de la présence de cellules T CD4⁺ qui sécrètent des cytokines. Toutefois, il existe aussi des cellules T cytotoxiques indépendantes des cellules T auxiliaires qui peuvent fournir leur propre aide en sécrétant de l'IL-2 (Deeths *et al.* 1999). Il a été démontré par Shelton et collaborateurs (1992) que le transfert adoptif de cellules T CD8⁺ dans des souris SCID résulte en un rejet des greffes de peau disparates pour H-2, en absence de cellules T CD4⁺ détectables, suggérant la présence de cellules T CD8⁺ qui sécrètent de l'IL-2. Il semble toutefois que la production autocrine de l'IL-2 ne semble pas suffisante pour supporter la réponse en cellules T CD8⁺ qui deviennent alors dépendantes des cellules T CD4⁺ (Deeths *et al.* 1999). De plus, des études démontrant des populations de cellules T alloréactives enrichies de CTL soient incapables de mener au rejet de greffe, suggèrent que les cellules T cytotoxiques risquent de ne pas être suffisantes en elles-mêmes pour induire le rejet (Gurley *et al.* 1983 ; Lowry et Gurley 1983).

En somme, le rôle des différentes populations cellulaires semble varier en fonction des tissus. Les cellules T CD4⁺ peuvent être suffisantes dans le cas du rejet de greffe de peau (Rosenberg *et al.* 1987) alors que la présence de cellules T CD8⁺ est nécessaire pour le rejet de greffe des îlots pancréatiques (Wolf *et al.* 1995). Il existe donc une différence entre le rejet de tissus et celui des organes durs. Effectivement, il semble que la contribution des cellules T CD4⁺ et le rejet de greffe, varie en fonction de la vulnérabilité des tissus et des organes au rejet qui correspond à l'ordre suivant : moelle osseuse > peau du tronc > peau de la queue > îlots pancréatiques > testicules > poumons > cœur > reins > foie (Sena *et al.* 1976 ; Rosenberg et Singer 1992 ; Warrens *et al.* 1994). Cette vulnérabilité corrèle avec la quantité de CPA présent dans les organes et les tissus. De plus, en fonction des modèles expérimentaux, les cellules T CD4⁺ jouent un rôle

primordial dans les processus impliqués dans le rejet et peuvent à elles seules induire la destruction du greffon, alors que des données suggèrent également que les cellules T CD8⁺ peuvent engendrer le rejet de greffe.

4.5 Production des alloanticorps par les cellules B

L'activation des réponses humorales contre des antigènes spécifiques du donneur est également dépendante de l'aide apportée par les cellules T CD4⁺. Les cellules T CD4⁺ activées produisent des cytokines qui mènent à la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B (Morton *et al.* 1993 ; Pattison et Krensky 1997). Les immunoglobulines IgM représentent les premiers isotypes sécrétés par les cellules B lors de la réponse immune humorale. Les cellules B entreprennent ensuite une commutation isotypique suite à une recombinaison génétique de la chaîne lourde μ qui va entraîner la production de IgG, IgA et IgE (Honjo et Kataoka 1978). Cette commutation isotypique nécessite la présence du récepteur de surface CD40 exprimé sur les lymphocytes B, où CD40 possède également une importante fonction au niveau de la prolifération et de la différenciation des cellules B (Van Kooten et Banchereau 1997). Les anticorps IgG correspondent aux isotypes les plus abondants dans le sérum normal. Il existe également des sous-classes IgG correspondant aux isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 chez la souris (Davies et Metzger 1983).

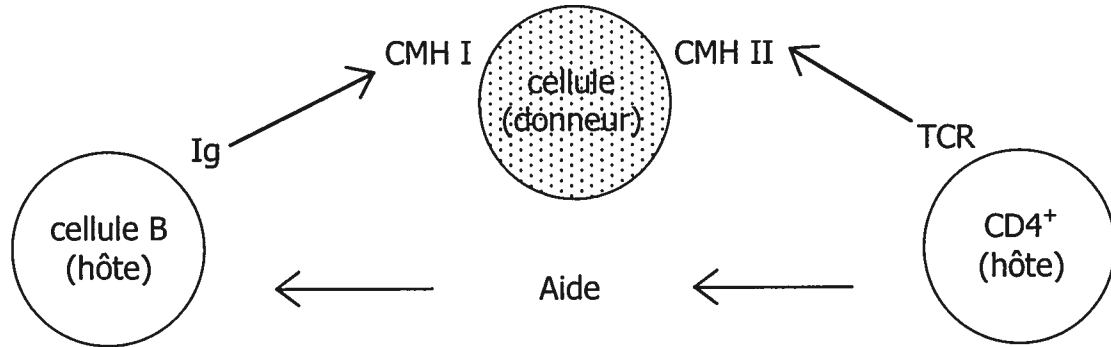
La présence d'anticorps alloréactifs suite à une transplantation, chez les receveurs de greffe, a été documentée tant au niveau expérimental que clinique (Sirinek *et al.* 1986). Les alloanticorps possèdent diverses fonctions et peuvent causer des dommages aux tissus, entre autres, par une activation du complément, par opsonisation ou par une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) (Hall 1991 ; Arakelov et Lakkis 1998). L'absence de corrélation entre la présence d'anticorps circulants spécifiques au donneur et le rejet aigu de greffe suggère que les anticorps spécifiques ne jouent pas un rôle essentiel dans le rejet de greffe (Lowry et Forbes 1984 ; MacEachern *et al.* 1998), quoique leur présence peut promouvoir la destruction des cellules endothéliales vasculaires (Auchincloss *et al.* 1988). De plus, la formation *de novo*

des anticorps chez 14 % à 45 % des patients ayant une greffe fonctionnelle après cinq ans indique que les anticorps ne causent pas nécessairement un rejet immédiat des allogreffes (McKenna *et al.* 2000). Toutefois, les anticorps préformés possèdent une fonction critique dans le rejet hyperaigu causant alors des dommages importants aux tissus greffés. Il est difficile de démontrer une implication des anticorps au niveau du rejet chronique compte tenu que les réponses immunes des cellules T et des cellules B se produisent ensemble (Auchincloss et Sachs 1993). Une étude a démontré une corrélation entre la présence en alloanticorps et des biopsies montrant une obturation des artères suite à des greffes rénales (Jeannet *et al.* 1970) .

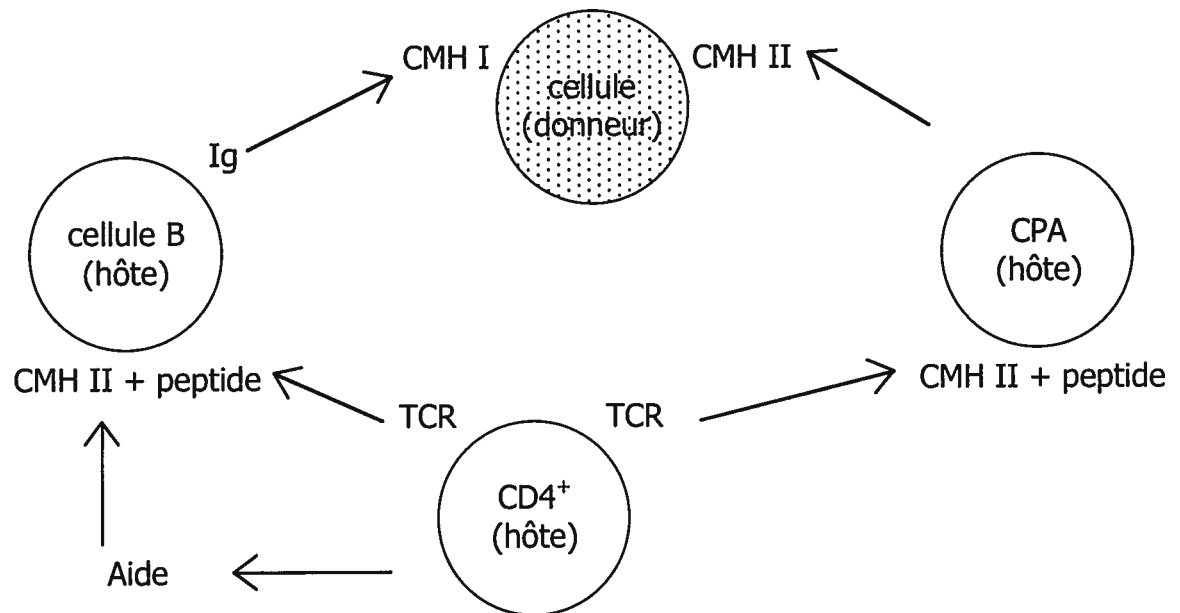
Les cellules T CD4⁺ fournissent une aide essentielle aux cellules B pour la production des alloanticorps (DeFranco *et al.* 1984 ; Van Den Eertwegh *et al.* 1992) mais également pour la commutation isotypique des anticorps produits de IgM à IgG. Il existe deux niveaux d'aide apportée par la cellule T CD4⁺ à la cellule B pour la production des alloanticorps spécifiques en réponse à des antigènes, soit un niveau impliquant une interaction non cognitive ou soit un niveau impliquant une interaction cognitive (Steele *et al.* 1996). La voie non cognitive peut être décrite comme suit : la cellule B du receveur peut être stimulée par des alloantigènes (CMH I illustré sur la Figure 1, CMH II, antigènes mH) exprimés sur la surface des cellules du donneur via son immunoglobuline de surface, alors que la cellule T CD4⁺ peut être directement stimulée par les antigènes du CMH de classe II du donneur (Figure 1A). Ceci amène les cellules B et T dans une proximité physique mais sans interaction cognitive entre le récepteur de la cellule T et le CMH de classe II de la cellule B. L'aide apportée par la cellule T à la cellule B prend à ce niveau un aspect plutôt de médiateur soluble (cytokines). Au niveau de la voie cognitive, la cellule B du receveur peut être stimulée par des alloantigènes exprimés sur la surface des cellules du donneur, alors que la cellule T CD4⁺ peut être stimulée par des cellules B présentant des peptides (Figure 1B). Il y a alors un contact physique entre le TCR des cellules T CD4⁺ activées et les antigènes du CMH de classe II de la cellule B présentant un allopeptide. Ces cellules T CD4⁺ fournissent alors une aide aux cellules B par une interaction cognitive avec les antigènes de classe II de la cellule B.

FIGURE 1. Deux voies par lesquelles les cellules T peuvent être stimulées afin de fournir une aide à la cellule B pour la production en alloanticorps. (A) Interaction non cognitive. (B) Interaction cognitive.

A) Interaction non cognitive



B) Interaction cognitive



Adaptée de Steele *et al.* (1996)

4.6 Autres cellules du système immunitaire impliquées dans le rejet de greffe

Un autre mécanisme effecteur impliqué dans les processus du rejet est l'infiltration cellulaire du greffon, entre autres, par des macrophages, des neutrophiles et des éosinophiles, où les cellules T CD4⁺ jouent aussi à ce niveau un rôle important. Par exemple, une infiltration des monocytes dans les organes greffés et leur différenciation en macrophages nécessite une activation par les cellules T CD4⁺, ce qui peut mener à une réaction d'hypersensibilité de type retardée (DTH) (Sirak *et al.* 1997 ; LeMoine *et al.* 1999). La réponse DTH est une manifestation de la réponse immune cellulaire caractérisée par une infiltration cellulaire, un œdème et même une nécrose tissulaire qui nécessite une activation des cellules T alloréactives (Sirak *et al.* 1997 ; VanBuskirk *et al.* 1998). Les macrophages secrètent des molécules toxiques (radicaux oxygène, TNF- α et enzymes) qui contribuent à l'endommagement de la greffe (Dalloul *et al.* 1996 ; Sekine *et al.* 1997). Les éosinophiles activés relâchent des granules qui contiennent plusieurs molécules toxiques tel que la MBP ou des ribonucléases pouvant causer, comme les macrophages, des dommages au niveau du greffon (Le Moine *et al.* 1999 ; Le Moine *et al.* 2002). Quant aux neutrophiles, ces leucocytes phagocytaires abondent au niveau des sites inflammatoires et font partie de la population cellulaire qui infiltre les greffons. Par exemple, il a été démontré que la destruction rapide des allogreffes de cœur résultant du rejet hyperaigu était caractérisée par une infiltration des neutrophiles au niveau des organes greffés (Zehr *et al.* 1993).

En ce qui concerne l'activation des cellules NK, leur rôle est incertain dans le rejet de greffe puisque par elles-mêmes ces cellules ne peuvent pas rejeter une allogreffe sauf dans le cas des xéngreffes et des greffes de moelle osseuse. Toutefois, les cellules NK font partie de la population cellulaire qui infiltre la greffe et peuvent donc contribuer à l'endommagement du greffon par la production de perforines et de granzymes mais également de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ) (Zijlstra *et al.* 1992 ; Rossini *et al.* 1999). Néanmoins, il a été démontré qu'une inhibition des cellules NK résulte en une acceptation de greffes cardiaques dans des souris déficientes pour CD28 (Maier *et al.* 2001). En somme, le rejet de greffe constitue un phénomène complexe requérant la

coordination du système immunitaire où les différents mécanismes effecteurs impliqués amènent ultimement la destruction du greffon. Quant aux cellules T $\gamma\delta$, ces dernières représentent une population minoritaire dans le sang périphérique mais leur présence a été détectée dans les infiltrats provenant des allogreffes. Des auteurs proposent un rôle aux cellules T $\gamma\delta$ dans la destruction des greffes de reins alors que certains suggèrent que ces cellules ne possèdent pas de rôle majeur dans le rejet des allogreffes (Douillard *et al.* 1999).

5. ALLORÉACTIVITÉ

Les molécules du CMH allogéniques engendrent des réponses cellulaires exceptionnellement puissantes et rapides. Ainsi, une activation des cellules T suite à la reconnaissance des molécules du CMH allogéniques exprimées sur les cellules du greffon va induire le rejet des allogreffes. Les greffes tissulaires peuvent être rejetées sur la base d'une différence au niveau d'un seul acide aminé entre les molécules du CMH du donneur et du receveur. Cette réponse immune dirigée contre les antigènes du CMH du non soi peut être définie par le terme alloréactivité, c'est-à-dire la reconnaissance du polymorphisme allélique sur les molécules du CMH allogéniques (Janeway et Travers 1997). Par ailleurs, tout comme pour la reconnaissance des antigènes nominaux les cellules T reconnaissent des molécules du CMH allogéniques en association avec des ligands peptidiques (Sherman et Chattopadhyay 1993). La description moléculaire de la reconnaissance des cellules T indique une orientation diagonale du TCR relativement au complexe CMH / peptide. Il existe néanmoins une différence au niveau des interactions entre un TCR avec un ligand nominal restreint au soi et entre un TCR avec un ligand allogénique. Il a été démontré que des résidus polymorphiques localisés au niveau des hélices α des molécules de classe II I-E pouvaient élargir la spécificité du TCR pour la portion centrale des épitopes (Daniel *et al.* 1998).

Dans le contexte du rejet de greffe, il est désormais établi que cette alloréactivité peut se faire via deux voies distinctes (Lechler et Batchelor 1982 ; Benichou *et al.* 1999). La cellule T peut reconnaître les molécules du CMH allogéniques

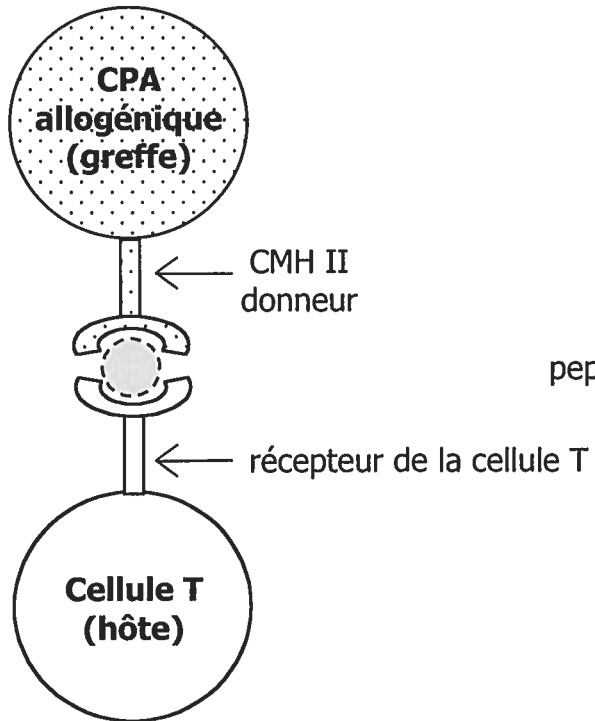
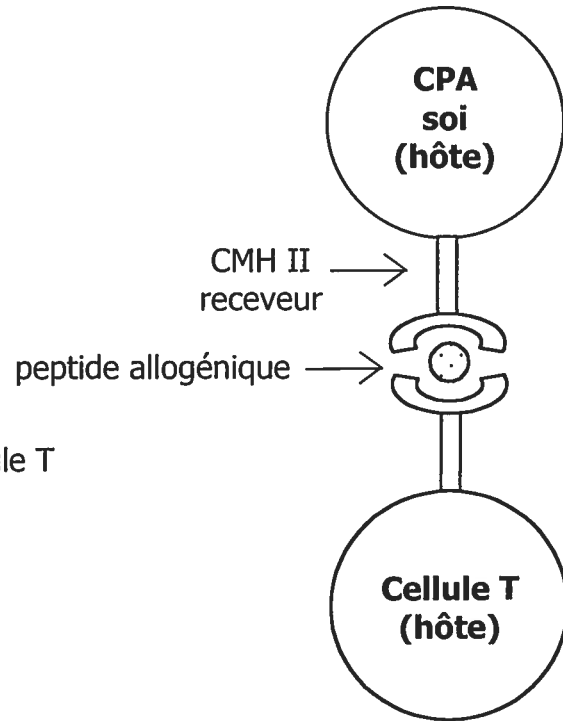
soit par la voie directe en tant que molécules intactes ou soit par la voie indirecte en tant que peptides suite à une dégradation antigénique. En transplantation, les cellules T peuvent reconnaître directement les molécules du CMH allogéniques. Toutefois, il a aussi été observé par Lechler et Batchelor (1982) que dans certaines souches de rats, des reins résidant depuis plusieurs semaines dans un hôte intermédiaire immunosupprimé demeuraient rapidement rejetés suite à leur transfert dans un second receveur même en absence présumé de cellules dendritiques du donneur. Alors que les connaissances sur les implications de la voie directe dans le rejet de greffe remontaient à quelques années, cette étude a révélé une seconde voie impliquée dans les réponses alloréactives i.e. la voie indirecte.

5.1 Voie directe

La voie directe d'alloréactivité est une voie unique à la transplantation. Dans cette voie, les cellules T du receveur reconnaissent des molécules intactes du CMH allogéniques sur la surface des cellules du donneur (Figure 2). Ainsi, dans la voie directe, les cellules T CD4⁺ interagissent directement avec des molécules du CMH de classe II allogéniques, alors que les cellules T CD8⁺ reconnaissent des molécules intactes du CMH de classe I à la surface des cellules du donneur. Il a été suggéré que la voie directe d'alloréactivité initie le rejet de la greffe et joue surtout un rôle clé dans les réponses immunes impliquées dans le rejet aigu des greffes (Wecker et Auchincloss 1992 ; Bradley 1996 ; Waaga *et al.* 1998). La voie directe est principalement responsable du rejet aigu puisque le greffon contient au départ un nombre significatif de CPA provenant du donneur, principalement des cellules dendritiques. En plus, ces cellules présentent une haute densité de molécules intactes du CMH ainsi que les molécules de co-stimulation nécessaires pour une activation complète des cellules T (Sayegh et Carpenter 1996 ; Vella *et al.* 1999).

En réalité, cette voie est responsable de la forte réponse proliférative observée contre des alloantigènes mais aussi des événements menant au rejet aigu des greffes de peau (Shoskes et Wood 1994). Notamment, il a été démontré que des cellules T qui

FIGURE 2. La présentation des alloantigènes aux cellules T s'effectue via deux voies alloréactives : la voie directe et la voie indirecte.

VOIE DIRECTE**VOIE INDIRECTE**

Adaptée de Rossini *et al.* (1999)

reconnaissent les molécules du CMH du donneur par la voie directe pouvaient initier le rejet aigu des greffes de reins nouvellement transplantés chez des rats mais pas le rejet des reins ayant survécu plus de 50 jours avant le transfert adoptif des cellules T (Braun *et al.* 1993). Les auteurs de cette étude ont suggéré que les CPA avaient déjà migrées hors du greffon à ce moment, empêchant un rejet par la voie directe. De plus, trois observations supportent les implications de la voie directe dans le rejet de greffe : (1) une très forte stimulation directe des cellules T naïves par des CPA allogéniques dans la réponse lymphocytaire mixte (MLR) ; (2) une déplétion des CPA du donneur peut prolonger la survie des allogreffes ; et (3) les molécules du CMH du donneur sont plus importantes que les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mH) dans le rejet de greffe, compte tenu que le rejet de greffe est plus rapide lorsque les organes diffèrent au niveau des molécules du CMH que pour les greffes disparates seulement pour un antigène mineur (Gould et Auchincloss 1999).

Les molécules du CMH allogéniques provoquent des réponses à médiation cellulaire exceptionnellement fortes et rapides. Cette réponse se manifeste *in vivo* par un rejet rapide des allogreffes. En réalité, la fréquence de précurseurs des cellules T qui reconnaissent directement des molécules du CMH allogéniques est extrêmement élevée avec 1 % à 10 % des cellules T périphériques qui répondent à un alloantigène particulier. Ce vaste répertoire alloréactif des cellules T dépasse largement le répertoire des cellules T réagissant contre des antigènes nominaux ou environnementaux (Lechler *et al.* 1991 ; Fangmann *et al.* 1992 ; Sherman et Chattopadhyay 1993 ; Burrows *et al.* 1999). La vigueur des réponses alloréactives repose donc sur la forte fréquence de précurseurs des cellules T qui reconnaissent les molécules du CMH allogéniques, mais ces cellules T alloréactives se caractérisent aussi par la diversité de la spécificité de leur TCR (Benichou 1999). Ainsi, la voie directe fournit un fort stimulus pour engendrer les réponses DTH et la réponse des cellules T cytotoxiques contre les cellules cibles du greffon (Fangmann *et al.* 1992). Néanmoins, une activation directe des cellules T CD8⁺ ne semble pas être aussi forte qu'une activation par la voie directe des cellules T CD4⁺ puisque les greffes

exprimant seulement une disparité au niveau des antigènes de classe I du CMH rejettent plus lentement que les greffes disparates pour les molécules du CMH de classe II (Auchincloss et Sachs 1993).

Par ailleurs, il existe deux hypothèses avancées pour expliquer la haute fréquence de précurseurs des cellules T alloréactives interagissant avec les molécules du CMH allogéniques. Le modèle de complexes binaires propose qu'une molécule d'un CMH allogénique peut se coupler à différents peptides formant plusieurs complexes qui permettent une activation des cellules T ayant chacune une spécificité différente (Matzinger et Bevan 1977). Les liaisons entre la cellule T et les CPA se caractérisent par une dominance peptidique. Ainsi, les peptides liés à la molécule du CMH allogénique peuvent être reconnus par le TCR permettant une liaison même sans un ajustement au CMH tout à fait adéquat (Daniel *et al.* 1998a). Le modèle de complexité binaire suggère donc que la fréquence élevée des cellules T alloréactives possédant une spécificité différente, résulte du fait que chaque molécule du CMH allogénique génère un nombre élevé de déterminants (Auchincloss et Sachs 1993).

Quant au second modèle, le modèle de la haute densité des déterminants, il propose que les cellules T alloréactives interagissent principalement avec des molécules de CMH allogéniques via la reconnaissance de résidus polymorphiques (Bevan 1984). À ce niveau, il est possible que les peptides liés ne jouent pas un rôle central. La molécule du CMH allogénique présente une conformation qui permet une liaison ferme avec le TCR indépendamment du peptide lié. Les molécules du CMH allogéniques peuvent en conséquence interagir en tant que ligand pour les cellules T alloréactives (Rogers et Lechler 2001). Ainsi, la magnitude de la réponse des cellules T est attribuable à la forte densité des molécules allogéniques présentes à la surface des CPA. Néanmoins, il ne semble pas y avoir une exclusion mutuelle entre les deux hypothèses puisque plusieurs évidences suggèrent que ces deux modèles peuvent contribuer à l'alloréactivité (Bradley 1996). En conséquence, ces deux mécanismes se complètent pour contribuer à la fréquence de précurseurs élevée de cellules T qui répondent aux molécules du CMH allogéniques exprimées à la surface des cellules du greffon.

5.2 Voie indirecte

La seconde route de présentation des alloantigènes correspond à la voie indirecte d'alloréactivité. Dans cette voie d'allorecognition, les cellules T du receveur reconnaissent des antigènes captés, dégradés et présentés similairement comme allopeptides par des CPA du soi (Figure 2). Ces alloantigènes reconnus par les cellules T alloréactives peuvent être des molécules du CMH du donneur ou encore des antigènes mineurs d'histocompatibilité (Waaga *et al.* 1998 ; Benichou *et al.* 1999). Dans les semaines suivant la transplantation, les cellules dendritiques dérivant du donneur quittent le site du greffon. Les cellules du receveur représentent alors les principales CPA présentes au site du greffon et permettent une activation et une reconnaissance des cellules T par la voie indirecte (Vella *et al.* 1997a). Cette voie est analogue à la voie classique de reconnaissance des antigènes nominaux par les cellules T (Bradley 1996 ; Sayegh et Carpenter 1996).

La voie directe d'allorecognition a longtemps été considérée comme la plus importante des voies d'alloréactivité, sinon la seule, compte tenu de la forte réponse proliférative des cellules T allospécifiques. Effectivement, des estimés quantitatifs sur la contribution de la voie directe et indirecte au niveau des réponses cellulaires suggèrent que la fréquence de cellules T engagées dans la voie indirecte est approximativement 100 fois moindre que la fréquence des cellules T participant dans la voie directe d'alloréactivité (Liu *et al.* 1993a). Les cellules T impliquées dans la voie indirecte se trouvent généralement dirigées contre un seul ou quelques déterminants immunodominants sur les molécules du CMH du donneur même lorsque donneurs et receveurs diffèrent au niveau des allèles DR (Benichou *et al.* 1994 ; Liu *et al.* 1997). Ces cellules démontrent aussi une utilisation limitée de segments de gène V β du TCR (Liu *et al.* 1993b). Similairement, il a été démontré que les cellules T interagissant via la voie indirecte représentent seulement environ 10 % du nombre total de cellules T allospécifiques après le rejet des allogreffes de peau (Benichou 1999).

Par ailleurs, il existe de nos jours plusieurs évidences qui suggèrent que la voie indirecte est également importante dans le rejet des allogreffes. Cette alloreconnaissance par la voie indirecte a été démontrée dans des études possédant un aspect plus clinique. La démonstration que les cellules T activées par la voie indirecte peuvent reconnaître des peptides HLA de classe I a été faite chez des greffés du poumons (SivaSai *et al.* 1999). L'alloreconnaissance indirecte des peptides HLA-DR chez des patients ayant rejeté des greffes de reins (Gallon *et al.* 1995 ; Vella *et al.* 1997b), de foies (Molajoni *et al.* 1997) et de cœurs (Liu *et al.* 1996 ; Suci-Foca *et al.* 1998) a également été démontrée. Des études initiales dans des souris démontrent que la présentation des allopeptides par la voie indirecte *in vivo* pouvait sensibiliser un hôte à rejeter subséquemment des allogreffes de peau (Sherwood *et al.* 1986). De plus, il a été également démontré en utilisant des souris déficientes pour les antigènes de classe II du CMH que la voie indirecte pouvait initier un rejet rapide des greffes de peau (Auchincloss *et al.* 1993), puisque la stimulation des cellules T CD4⁺ par la voie directe nécessite justement la présence des molécules du CMH de classe II à la surface des CPA du donneur.

La voie indirecte semble jouer un rôle critique particulièrement dans le développement du rejet chronique. L'implication de la voie indirecte dans le rejet chronique résulte de la migration des CPA du greffon qui se trouvent alors remplacées par les cellules dendritiques du receveur (Wecker et Auchincloss 1992). Théoriquement, la voie indirecte représente la seule voie pouvant persister avec le temps, puisqu'il y a une expression continue des antigènes du donneur sur les cellules du parenchyme de la greffe. Avec le temps suivant la transplantation, les cellules du greffon exprimant les alloantigènes CMH I et CMH II restent abondantes et risquent de « perdre » leurs antigènes dans la circulation. Les CPA hôtes représentent alors des candidats parfaits pour la capture, la dégradation puis la présentation de ces molécules allogéniques du CMH aux cellules T CD4⁺ du receveur (Shoskes et Wood 1994). Il a été démontré que le rejet chronique est associé avec une production de cytokines et de lymphokines qui endommagent les vaisseaux sanguins et qui induisent la prolifération et la différenciation des cellules B produisant des alloanticorps (Suci-Foca *et al.* 1991a ; Suci-Foca *et al.* 1991b). Étant donné que ces alloanticorps formés durant le rejet chronique réagissent aux

cellules de la greffe et montrent une spécificité aux molécules allogéniques du CMH, il est fort possible que ce processus soit engendré par des cellules T CD4⁺ activées par la voie indirecte (Liu *et al.* 1992). Ainsi, une implication des cellules T CD4⁺ spécifiques à des alloantigènes dans une activation des réponses en anticorps, suggèrent que la voie indirecte joue un rôle essentiel dans le rejet chronique.

Une étude faite par Fangmann *et al.* (1992) a démontré que la voie indirecte joue un rôle dans la production en anticorps dans le contexte des allogreffes de peau. Cette conclusion est tirée du fait que des rats LEW immunisés avec des peptides synthétiques de classe I DA RT1.A, afin d'activer les cellules T CD4⁺, présentaient une cinétique accélérée au niveau de la production en anticorps suite à des allogreffes de peau de type DA. De plus, la voie indirecte serait également requise pour la commutation isotypique de IgM à IgG (Steele *et al.* 1996). Quant aux résultats obtenus par Lee *et al.* (1994), ceux-ci amènent des évidences sur le fait que des cellules T auxiliaires activées par la voie indirecte peuvent fournir une aide effective dans l'induction des CTL durant le rejet de greffe. Une étude récente a aussi démontré que le rejet de greffe de peau pouvait être induit chez des souris receveuses SCID après le transfert de clones de cellules T spécifiques pour un allopeptide restreint au CMH de classe II, mettant une autre emphase sur le rôle important de la voie indirecte dans le rejet des allogreffes (Valujskikh *et al.* 1998). Bref, la reconnaissance des cellules T CD4⁺ par la voie indirecte semble capable d'induire des réponses DTH, une production en anticorps et une réponse cytotoxique. Par conséquent, la voie indirecte en transplantation joue un rôle critique dans la réponse immune dirigée contre des tissus étrangers.

En somme, il est suggéré que la voie directe joue surtout un rôle clé dans le rejet aigu, alors que le rejet chronique résulte principalement de la voie indirecte suite à la migration des CPA du donneur en dehors de la greffe. En outre, la réponse immunitaire suite à une transplantation est modifiée avec les thérapies immunosuppressives réduisant les risques de rejet aigu, mais malgré tout une détérioration de la fonction des greffons persiste. En effet, les voies alloréactives directe et indirecte démontrent une sensibilité différente face aux médicaments immunosuppresseurs, telle que la cyclosporine A, qui ne

semble pas inhiber adéquatement l'activation des cellules T par la voie indirecte (Shoskes et Wood 1994). Tel que mentionné auparavant, la voie indirecte est impliquée au niveau du rejet chronique puisque suite à la migration des CPA allogéniques du donneur hors du site du greffon, les cellules T CD4⁺ du receveur vont surtout interagir avec des CPA du receveur. Ainsi, une diminution de l'action de la cyclosporine A sur les cellules T CD4⁺ activées par la voie indirecte supporte le fait que les drogues immunosuppressives ne peuvent pas empêcher adéquatement le rejet chronique. De plus, il est également suggéré que la voie directe joue surtout un rôle dans les fonctions des cellules T cytotoxiques alors que la voie indirecte serait impliquée dans les fonctions des cellules T auxiliaires. Généralement, les molécules du CMH de classe II présentent des peptides exogènes, et compte tenu que les alloantigènes provenant des greffons correspondent à des antigènes exogènes, il semble que la reconnaissance de ces allopeptides par les cellules T auxiliaires CD4⁺ se fait principalement par la voie indirecte (Shoskes et Wood 1994 ; Rose 1998).

Bref, la voie directe et la voie indirecte sont toutes deux impliquées de façon importante dans les processus du rejet de greffe mais y jouent des rôles différents. Néanmoins, la disponibilité des modèles expérimentaux permettant la dissection de la contribution relative des rôles de chacune des voies dans le rejet des allogreffes est problématique (Bradley 1996 ; Sayegh et Carpenter 1996 ; Benichou 1999). Dans les modèles existant, presque tous totalement allogénique, la caractérisation de la voie d'alloréconnaissance indirecte est difficile à déterminer. Ceci résulte de la faible fréquence des cellules T qui reconnaissent les antigènes conventionnels, contrairement à la forte réponse fournie par la voie directe d'alloréactivité avec une fréquence de précurseur élevée permettant une reconnaissance des molécules allogéniques du CMH.

6. UN MODÈLE DE GREFFE DE PEAU

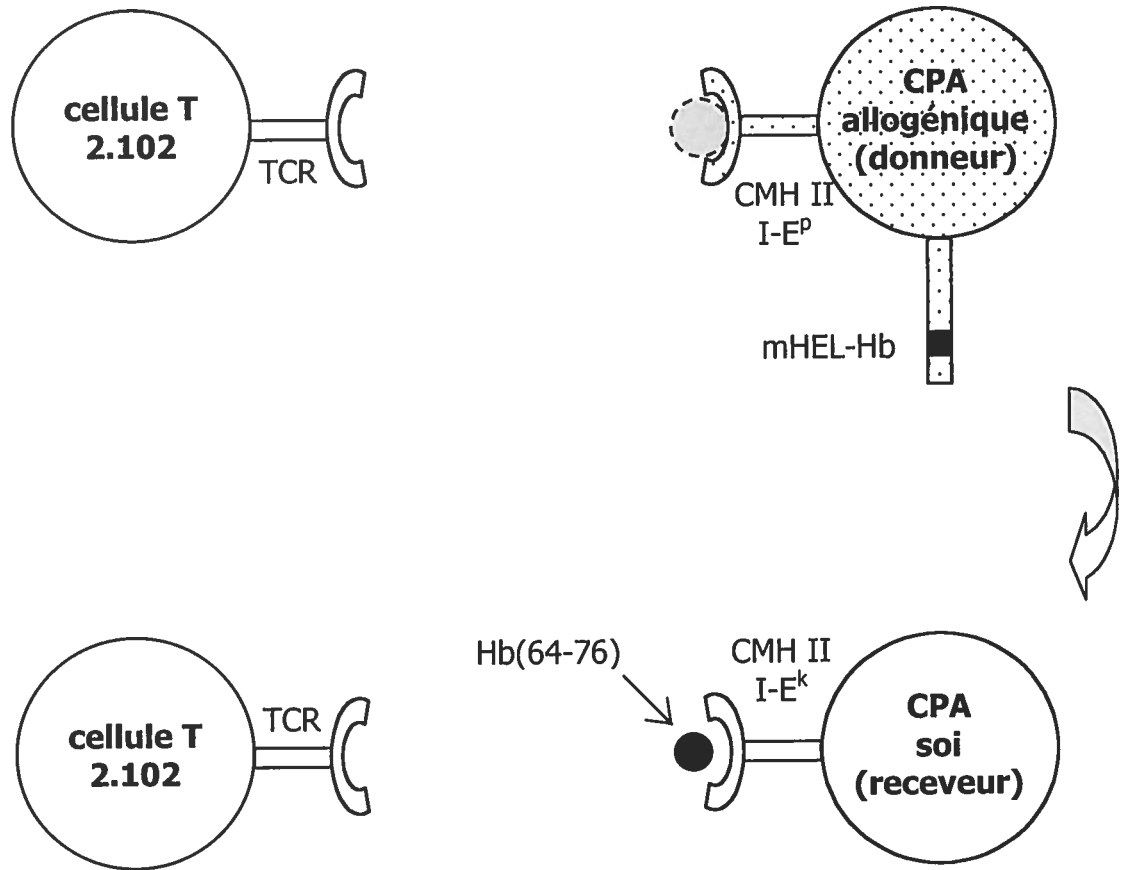
Les connaissances actuelles indiquent clairement que les cellules T jouent un rôle essentiel dans les processus impliqués dans le rejet des allogreffes. Malgré tout, les mécanismes exacts par lesquels les cellules T opèrent et la contribution réelle des voies alloréactives directe et indirecte demeurent obscurs (Orosz et VanBuskirk 1998 ;

Benichou 1999 ; Rogers et Lechler 2001). Peu de modèles expérimentaux adéquats existent pour élucider le rôle des voies directe et indirecte dans le rejet de greffe. Toutefois, il est possible d'étudier le rejet des allogreffes de peau initié par la voie directe et par la voie indirecte suite à une alloreconnaissance des antigènes du CMH de classe II allogéniques, en utilisant des lignées de souris transgéniques. La lignée de souris 2.102 (2.102Tg) est transgénique pour le récepteur $\alpha\beta$ des cellules T, et cette lignée dérive du clone de cellule T nommé 2.102 (Grakoui *et al.* 1999). Ce clone possède la particularité de reconnaître des molécules spécifiques via les deux voies d'alloréactivité, directe et indirecte (Figure 3). Ainsi, la réactivité du clone de cellule T 2.102 envers deux ligands indépendants fournit l'opportunité d'étudier les deux voies d'alloréactivité par l'intermédiaire d'un seul clonotype de cellule T.

Effectivement, ce clone de cellule T auxiliaire $CD4^+$ 2.102 reconnaît spécifiquement le peptide immunodominant Hb(64-76) dans le contexte du CMH de classe II I-E^k, et est également restreint aux molécules du CMH de classe II I-E^k (Evavold *et al.* 1992). Cet épitope immunodominant correspond en fait aux acides aminés 64 à 76 de l'allèle *d* mineur de la chaîne bêta de l'hémoglobine de souris ($Hb\beta^d$ mineur) (Lorenz et Allen 1988), et a été identifié par immunisation de souris H-2^k avec de l'hémoglobine de souris. Par ailleurs, la lignée de souris transgéniques B6(mHEL-Hb) exprime une forme membranaire du lysozyme de poulet (HEL) contenant le peptide Hb(64-76) sous le contrôle du promoteur de la chaîne I-E α . En fait, la protéine chimérique mHEL-Hb a été générée en introduisant la séquence codant pour l'épitope Hb(64-76) entre les acides aminés 43 et 44 du gène du lysozyme de poulet. Cette protéine est exprimée de façon membranaire suite à la fusion avec la portion transmembranaire de la molécule du CMH de classe I L^d (Nelson *et al.* 1997 ; Williams *et al.* 1998). Il a été démontré que le promoteur E α permet une expression de mHEL-Hb analogue aux molécules du CMH de classe II, et ce à des niveaux physiologiques dans toutes les cellules positives pour les antigènes du CMH de classe II autant dans le thymus que dans la rate (Williams *et al.* 1998 ; Williams *et al.* 1999). Étant donné que son expression est restreinte aux cellules exprimant des antigènes de classe II et son accès limité aux compartiments cellulaires où le chargement des peptides de classe II se fait, l'épitope Hb(64-76) peut être alors

FIGURE 3. Allorecognition directe et indirecte par le clone de lymphocyte T 2.102.

VOIE DIRECTE



VOIE INDIRECTE

considéré comme un substitut de molécules du CMH de classe II. En conséquence, l'utilisation de la lignée de souris transgéniques B6(mHEL-Hb) en tant que donneur de peau permet d'étudier la voie indirecte d'alloréactivité, puisque la présentation de l'épitope Hb(64-76) par les molécules du CMH de classe II I-E^k requiert la capture, la dégradation et la présentation de la molécule mHEL-Hb par les CPA de la souris receveuse ayant un haplotype H-2^k.

De plus, le clone de cellule T 2.102 est aussi exclusivement alloréactif contre les splénocytes possédant un haplotype H-2^p et est restreint à I-E^p (Daniel *et al.* 1998b). La reconnaissance par les cellules T 2.102 des alloantigènes exprimés sur des cellules ayant un haplotype H-2^p, dépend entièrement de la présence de molécules intactes du CMH sur les CPA. Cette alloréactivité de la cellule 2.102 contre I-E^p permet d'étudier la voie directe en utilisant une souche de souris donneuse est d'haplotype H-2^p, telle que la lignée de souris congéniques B10.P. Ainsi, l'alloréactivité directe du clone de cellule T 2.102 contre I-E^p et l'alloréactivité indirecte restreinte au soi pour le peptide allogénique Hb(64-76) permettent de créer un modèle de greffe de peau unique afin d'étudier les deux voies alloréactives indépendamment grâce à un seul clonotype de cellule T.

**CHAPITRE I -
ARTICLE SCIENTIFIQUE**



The Journal of Immunology
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814-3994
Phone: (301) 530-7197 FAX: (301) 571-1813

April 17, 2002

TO:
Dr. Claude Daniel
Universite du Quebec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frapplier
531 boulevard des Prairies
Laval, Quebec H7V 1B7,
CANADA

FAX: 450-686-5301

EMAIL: claudedaniel@iaf.quebec.ca

FROM: The Journal of Immunology

RE: 02-2069

Dear Dr. Daniel:

This letter is to acknowledge receipt of your manuscript entitled, "The indirect pathway of allorecognition by CD4+ helper T cells is essential for production of antibodies against alloantigens" to be considered for publication in *The Journal of Immunology*. Your manuscript has been assigned the identification number: 02-2069.

A further notice will follow as soon as a decision has been reached concerning the suitability of this paper for publication. Please refer to the manuscript number in all inquires. For status questions, please contact The Journal of Immunology at (301) 530-7197.

Sincerely,
The JI Staff

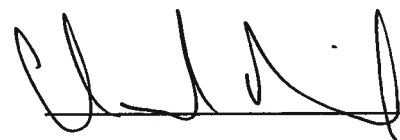
* If you are not already an AAI member, please visit our website at www.aai.org and fill-out a membership application.

Attestation de la contribution des auteurs

Dominique Sauvé, premier auteur de l'article scientifique intitulé « The indirect pathway of allorecognition by CD4⁺ helper T cells is essential for production of antibodies against alloantigens », a effectué toutes les manipulations (purification des cellules, greffes de peau et analyses en cytométrie en flux) ayant mené aux résultats du tableau I ainsi que des Figures 5 à 10 inclusivement. Karina Bonin a effectué les injections par intra-veineuse des souris pour les transferts adoptifs des cellules T, et a également participé conjointement aux greffes de peau et aux expériences sur la prolifération homéostatique des cellules effectrices (Figure 5). Elle est aussi responsable des expériences effectuées et des résultats obtenus pour la Figure 4 présentée dans le manuscrit inclus dans ce mémoire.



Dominique Sauvé



Claude Daniel

**THE INDIRECT PATHWAY OF ALLORECOGNITION BY CD4⁺ HELPER T
CELLS IS ESSENTIAL FOR PRODUCTION OF ANTIBODIES AGAINST
ALLOANTIGENS¹**

Running title: Requirement of the indirect pathway for production of alloantibodies.

Dominique Sauvé, Karina Bonin, and Claude Daniel²

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

Keywords: Transplantation, antibodies, B lymphocytes, cellular differentiation

ABSTRACT

The immune response to allograft is mediated by T cells that recognize antigens through the direct and the indirect allorecognition pathways. CD4⁺ T cells play an important role in the effector pathways that lead to skin allograft rejection. The exact mechanisms by which they operate and the actual contribution of direct and indirect alloreactivity pathways remain to be fully characterized. To address this issue, we have developed a model based on TCR transgenic mice derived from a CD4⁺ T cell clone which recognize specific alloantigens in both alloreactivity pathways. We have established an adoptive transfer model using $\alpha\beta$ T cell deficient mice as recipients in order to further study the role of direct and indirect alloresponses in alloantibody production by B cells. Skin allografts on mice adoptively transferred with transgenic CD4⁺ T cells were rejected without significant delay between the two alloreactivity pathways. However, IgG alloantibody production was shown only in mice that had rejected their allografts by the indirect pathway. Furthermore, no alloantibody (IgG nor IgM) was produced following allograft rejection by the direct alloreactivity pathway alone. Production of antibodies against alloantigens of the direct pathway was shown to require help from CD4⁺ T cells activated by the indirect pathway. These results indicate that the events leading to the initiation of immune responses responsible for graft rejection are different for the two alloreactivity pathways, and are clearly dependent on the population of APCs (donor or recipient) involved in T and B lymphocytes activation.

INTRODUCTION

The critical role of T cells in immune responses against allografts has long been established, where T-cell recognition of alloantigen is the central and primary event that initiates the rejection process (1, 2). It is now widely accepted that there are two distinct pathways of allorecognition (3-5). In the direct pathway of allorecognition (unique to transplantation), T cells interact with intact allogeneic MHC molecules on the surface of donor cells. In the indirect alloreactivity pathway, alloreactive T cells recognize processed alloantigens, which could either be donor MHC or minor histocompatibility antigens, presented as allopeptides by self antigen-presenting cells (APCs) (6-9). This pathway of allorecognition is analogous to the classical pathway of nominal antigens recognition by CD4⁺ T cells. Hence, a fundamental difference between these two pathways of allorecognition is the population of APCs responsible for T cell responses. In the direct alloreactivity pathway, alloreactive T cell activation involves interactions with allogeneic APCs, in contrast to the indirect alloreactivity pathway which involves interactions with self-APCs. It has been suggested that the direct pathway may be responsible for the vigorous immune response in acute rejection, whereas the indirect pathway may play an essential role in chronic rejection (4, 10-13).

CD4-positive T cells are known to play an important role in the effector pathways that lead to allograft rejection. It has been demonstrated with CD4 and CD8 knockout mice that CD4⁺ T cells, in contrast to CD8⁺ T cells, were required for initiating allograft rejection (14). Furthermore, it has also been shown using an adoptive transfer system with CD4⁺ T cells from CD8-deficient mice that CD4⁺ T cells alone were sufficient to induce skin allograft rejection (15). CD4⁺ T helper cells participate in multiple effector

mechanisms of allograft rejection. These cells activated by the direct and indirect alloreactivity pathways provide an important help, as main producers of cytokines, for the growth, maturation and maintenance of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (16-18). The activation of a humoral response against donor-specific antigens is also dependent on help provided by CD4⁺ T cells. Activated CD4⁺ T cells produce cytokines required for differentiation of B lymphocytes and production of alloantibodies (19, 20). Although production of donor-specific IgM can occur with help from CD4⁺ T cells activated through the direct and indirect alloreactivity pathways, the isotype switching from IgM to IgG was shown to require CD4⁺ T cells activated through the indirect pathway (21). However, mice of different genetic backgrounds were used as recipients in the latter study to compare the direct and indirect pathways (C57BL/6 and BALB/c, respectively), and consequently make it more difficult to directly link these observations to the allorecognition pathway involved in antibody production. Finally, CD4⁺ T cells play a role in recruiting and activating macrophages within the allograft, leading to delayed-type hypersensitivity reactions (22). Although it is recognized that CD4⁺ T cells are essential to the process of graft rejection, the exact mechanisms by which they operate and the actual contribution of direct and indirect alloreactivity pathways remain poorly understood (3, 23).

Experimental models allowing the dissection of the relative roles of each pathways in allograft rejection are not readily available. In existing models, which are almost fully allogeneic, the contribution of the indirect pathway of allorecognition is difficult to determine because of the low frequency of responding T cells recognizing conventional antigens, in contrast to the response provided by the direct pathway which is

characterized by a high precursor frequency of T cells able to recognize allogeneic MHC molecules. Indeed, the precursor frequency for direct alloreactivity is extremely high with as many as 1 to 10% of peripheral T cells responding to an alloantigen, and this alloreactive repertoire of T cells largely overlaps the normal T cell repertoire (24-27). Quantitative estimates of the contribution of direct and indirect recognition to T cell alloresponses suggest that the frequency of T cells engaged in the indirect pathway of allorecognition is about 100-fold less frequent than that of T cells participating in direct alloreactivity pathway (28). In fact, T cells in the indirect pathway are directed to a few dominant determinants on donor MHC molecules (29). Similarly, it has been demonstrated that T cells responding via the indirect pathway represented approximately 10% of the total number of allospecific T cell after skin allograft rejection (30).

The aim of this study was to elucidate the contribution of the direct and indirect pathways of T cell recognition to the production of alloantibodies by B lymphocytes after activation and differentiation of CD4⁺ T cells. Our laboratory has established a model for the study of skin graft rejection initiated by direct and indirect allorecognition of MHC class II alloantigens using transgenic mice. The skin graft model utilized in the current study is based on mice transgenic for an $\alpha\beta$ T cell receptor (2.102) (31) which recognize specific alloantigens in the two alloreactivity pathways. The direct alloreactivity of the 2.102 T cell clone for I-E^P (32) and its nominal, self-restricted reactivity against a mouse hemoglobin peptide (33) were exploited to design an experimental system that allowed us to study both pathways of allorecognition, independently mediated by a single T cell clonotype. Mice deficient for $\alpha\beta$ T cells were adoptively transferred with purified CD4⁺ T cells derived from 2.102 TCR-transgenic mice as effectors, and grafted with skin

allogeneic for direct, indirect or combined alloreactivity pathways. We demonstrated that despite similar mean graft survival time between both pathways of allorecognition, IgG alloantibody production was strictly associated with the presence of indirect alloreactivity. Importantly, no alloantibody was produced following allograft rejection by the direct alloreactivity pathway alone. Thus, antibody production against alloantigens in the direct pathway requires help from T cells activated by the indirect alloreactivity pathway.

MATERIALS AND METHODS

Mice

C57BL/6J Tcr^{tm1/Mom} (H-2^b) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and bred with B6.AKR (H-2^k) to introduce the mutation into an H-2^k haplotype (referred herein as TCR α KOK). These $\alpha\beta$ T-cell deficient mice (34) were used as recipients of skin grafts. Mice transgenic for the CD4⁺ $\alpha\beta$ T cell clone 2.102 (H-2^k) have been described previously (31). Transgenic mice for the mHEL-Hb molecule generated on a C57BL/6 background (H-2^b) (referred to as B6(mHEL-Hb)) have also been described elsewhere (35). This transgenic mouse line expresses a membrane form of hen-egg lysozyme molecule (HEL)³ containing the Hb(64-76) epitope. This chimeric molecule, referred to as mHEL-Hb, is expressed under the control of the I-E α chain promoter. The mHEL-Hb transgene was also introduced into B10.A(4R) (H-2^{h4}) mice, which were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). B10.P (H-2^p) mice were crossed with B6(mHEL-Hb) to generate (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 progeny (H-2^{p/b}) (referred to herein as F1). TCR and mHEL-Hb transgenics, B10.P and B6.AKR mouse lines were kindly provided by Dr. Paul M. Allen (Washington University, St-Louis, MO) and all mice were maintained in our pathogen-free animal facilities.

Antibodies

Cells were stained for flow cytometry analyses with the following anti-mouse monoclonal antibodies: PE-conjugated anti-CD4 (clone H129.19), PE-conjugated anti-CD8 α (clone 53-6.7), biotin-conjugated anti-CD25 (clone 7D4), biotin-conjugated anti-CD62L (clone MEL-14), FITC-conjugated anti-IgG1 (clone A85-1), biotin-conjugated anti-IgG2a^b Igh-1b (clone 5.7), FITC-conjugated anti-IgG2b (clone R12-3), FITC-conjugated anti-IgG3

(clone R40-82), FITC-conjugated anti-IgM (clone R6-60.2) (PharMingen, Mississauga, ON Canada) and FITC-conjugated anti-IgG (H+L) (Cederlane, Hornby, ON Canada). FITC-conjugated anti-BrdU antibody (clone 3D4) (PharMingen, Mississauga, ON Canada), anti-HEL (clone F10.6.6) (36) and anti-H-2^P (clone B8.24.3, anti-H-2^b and crossreactive with H-2^P) (37) antibodies were also used. Cells stained with biotinylated antibodies were subsequently incubated with streptavidin PE-Cy5 (Cederlane, Hornby, ON Canada) or streptavidin-FITC (PharMingen, Mississauga, ON Canada).

Cell lines

The T cell lymphoma BW5147 (H-2^k) was transfected with a plasmid encoding for mHEL-Hb by electroporation using 3 µg of DNA (gift of Dr. Calvin B. Williams, Washington University School of Medicine, St-Louis, MO), followed by one pulse of 960 µF at 350 V using a Gene Pulser (Bio Rad, Mississauga, ON Canada). A plasmid encoding for MHC class I H-2D^P (kindly provided by Dr. François Denis, INRS - Institut Armand-Frappier) was also transfected into BW5147 as described above. Cells were seeded into flat-bottom 96-well microtiter plates, and stable transfectants were selected by the addition of the specific drug. Drug-resistant clones were analyzed by flow cytometry for the expression of the antigen with F10.6.6 (anti-HEL) or B8.24.3 (anti-H-2^P) antibodies.

Purification of CD4⁺ cells

Single cell suspensions of freshly isolated spleen cells from 2.102Tg mice were incubated with Macs CD4 (L3T4) MicroBeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) for 15 minutes at 4°C, washed, and purified on a positive selection LS column. The eluent gave a population of more than 90% CD4⁺ T cells by flow cytometry analysis with less than 3%

of CD8⁺ T cells (data not shown). Adoptive transfers of T cells into TCR α KOK recipients were performed by i.v. injection into the tail vein, the day before grafting.

Specificity assays

CD4⁺ T cells (1×10^5) purified from 2.102Tg mice were cultured with various dilution of irradiated (2000 rad) splenocytes (10^3 to 10^6) or donor soluble antigens in triplicates. After 72 h incubation, the cells were pulsed with 0.4 μ Ci/well [³H]Thymidine for 16 h and then harvested. Proliferation was measured as CPM incorporated. Soluble donor antigens were prepared as described by Benichou and colleagues (30) with some modifications. Irradiated splenocytes were suspended at 40×10^6 cells/ml in HBSS, sonicated 10 times with 1-second pulse on ice, frozen in a dry ice/ethanol bath, and then thawed at room temperature. Residual intact cells or cell membranes were removed by centrifugation at 1200 rpm for 10 min at room temperature. Two-fold serial dilutions of the supernatant was added in flat-bottom 96-well culture plates. Irradiated B6.AKR splenocytes (5×10^5) were added as a source of APCs in cultures with donor antigens.

BrdU analyses

TCR α KOK mice were injected intravenously on day 0 with 10×10^6 purified CD4⁺ T cells, and injected intraperitoneally daily with 2 mg of bromodeoxyuridine (BrdU) solution (Sigma, Oakville, ON Canada) (5 mg/ml in PBS). Spleen cells and lymph nodes cells were recovered at different times after adoptive transfer and labeled as described by Norwich and colleagues (38) with some modifications. Briefly, 1×10^6 cells were incubated on ice for 30 min with the appropriate antibodies. Cells were then washed and fixed by drop wise addition of 70% ice-cold ethanol. After a 30 min incubation period on ice, cells were washed and incubated with 1 ml of PBS containing 1% paraformaldehyde

and 0.01% Tween-20 for 30 min at room temperature. Cells were pelleted and treated with 60 µg of DNase I (Roche Diagnostics, Laval, QC Canada) in 1 ml of 0.15 M NaCl, 4.2 mM MgCl₂ pH 5.0 for 15 min at room temperature. Finally, cells were incubated with FITC-conjugated BrdU antibody (PharMingen, Mississauga, ON Canada), washed and analyzed by flow cytometry on a Coulter Epics XL (Hialeah, FL). Positive controls were obtained by *in vitro* stimulation of 2.102Tg naive spleen cells with 5 µg/ml of concanavaline A (Sigma, Oakville, ON Canada).

Skin grafting

Tail skin of male donors was engrafted onto the trunk (1 cm²) of male recipients using standard techniques (39). Mice were anesthetized with ketamine/xylazine (1/10, v/v; 0.01 ml/g). Grafts were placed on the trunk, secured with 6-0 silk sutures and protected with a bandage. Bandages were removed on day 7, and the grafts were visually scored daily for evidence of rejection. The allografts were considered fully rejected when > 90% necrosis or shrinkage was observed. Statistical analyses were performed with the two-ways analysis of variance test.

Alloantibody analyses

To detect donor-specific alloantibodies, sera were obtained at day 0, 18 or 21 post-transplant by bleeding the mice in the retro-orbital plexus. IgG, IgG isotypes and IgM alloantibodies were detected by flow cytometry analyses. Briefly, donor strain spleen cells or BW5147 T cell lines expressing mHEL-Hb or H-2D^P were incubated with 50 µl of serial dilutions (1:100 to 1:6400) of TCRαKOK recipients serum for 30 min on ice. Cells were then washed twice and stained with the secondary antibody. Following a 30 min incubation period on ice, cells were washed twice again and resuspended in 0.5 ml of

PBS supplemented with 0.5% BSA and 0.1% sodium azide. The cells were analyzed on a Coulter Epics XL (Hialeah, FL). Antibody titers were determined as the reciprocal of the highest dilution of serum which gave a mean fluorescence intensity (MFI) greater than the cut-off MFI, a value determined as two standard deviations above the MFI of dilutions of a control, pre-immune serum.

RESULTS

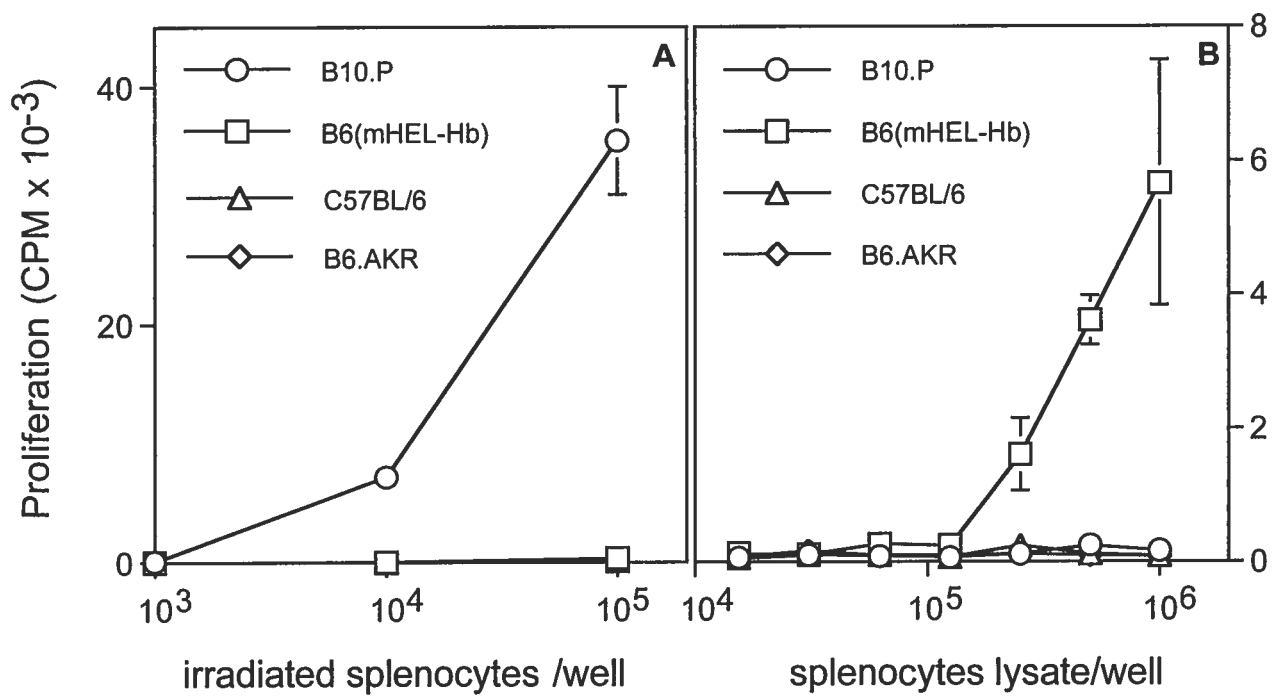
The purpose of our study was to assess the helper functions of CD4⁺ T cells in the direct and indirect pathways of allorecognition, in a skin graft model. To address these questions, we have developed a unique model based on TCR transgenic mice (2.102Tg) derived from the CD4⁺ T cell clone 2.102 (31). The reactivity of this T cell clone with two independent ligands provides an opportunity to study both direct and indirect alloreactivity pathways mediated by a single T cell clonotype. The T helper cell clone 2.102 recognize the immunodominant determinant Hb(64-76) and is restricted to the class II molecule I-E^k (33). This peptide comprises amino acids 64 to 76 of the *d* minor allele of mouse hemoglobin beta chain (Hbβ^{d minor}) (40). In order to study indirect allorecognition restricted to self MHC molecule, we have used a transgenic mouse line (B6(mHEL-Hb)) that expresses a membrane form of a chimeric hen egg-white lysozyme (HEL) containing the Hb(64-76) peptide under the control of I-Eα chain promoter (35, 41). It has been demonstrated that the Eα promoter is effective in expressing mHEL-Hb, analogous to MHC class II molecules, at physiologic levels in all class II-positive cells in both the thymus and the spleen (35, 42). Because its expression is restricted to class II bearing cells and its access to cellular compartments where class II peptide loading occurs, the Hb(64-76) epitope contained within the mHEL-Hb molecule can be considered as a surrogate MHC class II immunodominant epitope. Because the transgenic mouse line B6(mHEL-Hb) is maintained on a C57BL/6 (H-2^b) genetic background, presentation of the Hb(64-76) epitope by the I-E^k molecule requires processing of the mHEL-Hb molecule by the H-2^k APCs from recipient mice. This mHEL-Hb transgenic mouse line was used as skin donor for the study of indirect

allorecognition. The 2.102 T cell clone was also shown to be exclusively alloreactive against the I-E^P molecule, and importantly for this study, not alloreactive against the H-2^b haplotype (32). Thus, the B10.P (H-2^P) congenic line was used as skin donor to study the direct alloreactivity pathway. C57BL/6J Tcra^{tm1/Mom} mice were bred with B6.AKR to introduce the mutation into an H-2^k background, and these mice (TCRαKOK) were used as recipient of skin allograft. These mice have no peripheral CD4⁺ or CD8⁺ αβ T cells, and have been shown to be unable to reject skin allografts, although having normal populations of B cells, γδ T cells and NK cells (34, 43). Therefore, the initiation of graft rejection is strictly dependent on the effector cells adoptively transferred. We have used an adoptive transfer system with purified naive CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice as effectors. Hence in this model, a single T cell clonotype (2.102) is able to mediate graft rejection by direct alloreactivity after recognizing I-E^P presented on B10.P (H-2^P) allograft, as well as by indirect alloreactivity after recognizing the Hb(64-76) epitope, derived from B6(mHEL-Hb) (H-2^b) allograft, and presented on self-APCs (H-2^k). Furthermore, B10.P mice were crossed with B6(mHEL-Hb) to generate (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 progeny that were used as skin donor to study the possible synergy between both alloreactivity pathways, whereas B6.AKR mice (H-2^k) were used for isogenic controls.

2.102Tg T cells recognize B10.P (H-2^P) alloantigens only by direct alloreactivity, and B6(mHEL-Hb) alloantigens only by indirect alloreactivity

In order to strictly establish the specificity of 2.102Tg CD4⁺ T cells to recognize H-2^P alloantigens only by direct alloreactivity, and mHEL-Hb alloantigens only by indirect alloreactivity, the *in vitro* proliferative response of 2.102Tg T cells against irradiated

Figure 4. Proliferation of 2.102Tg purified T cells after stimulation with irradiated splenocytes or spleen cells lysates. Purified CD4⁺ T cells (5×10^5 cells/well) from 2.102Tg mice were stimulated for 72 h in triplicates with A) an increasing number of irradiated splenocytes or B) serial dilutions of spleen cells lysates from B10.P (circles), B6(mHEL-Hb) (squares), C57BL/6 (triangles), and B6.AKR (diamonds) mice. Irradiated B6.AKR (5×10^5 cells/well) splenocytes were used as APCs for cell lysates antigens. T cell activation was measured by incorporation of [³H]Thymidine over a 16 h pulse period. The values represent the mean \pm SD of triplicate wells, and are representative of three experiments.

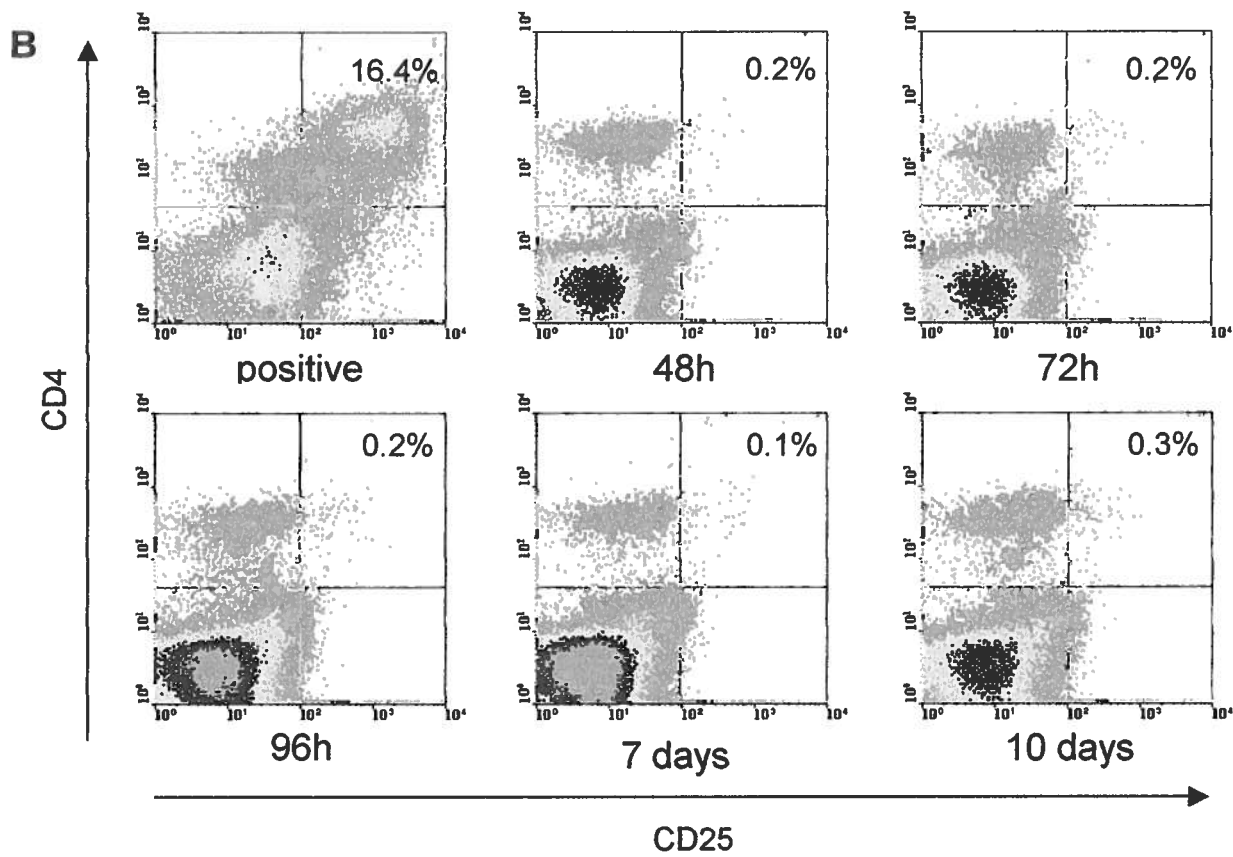
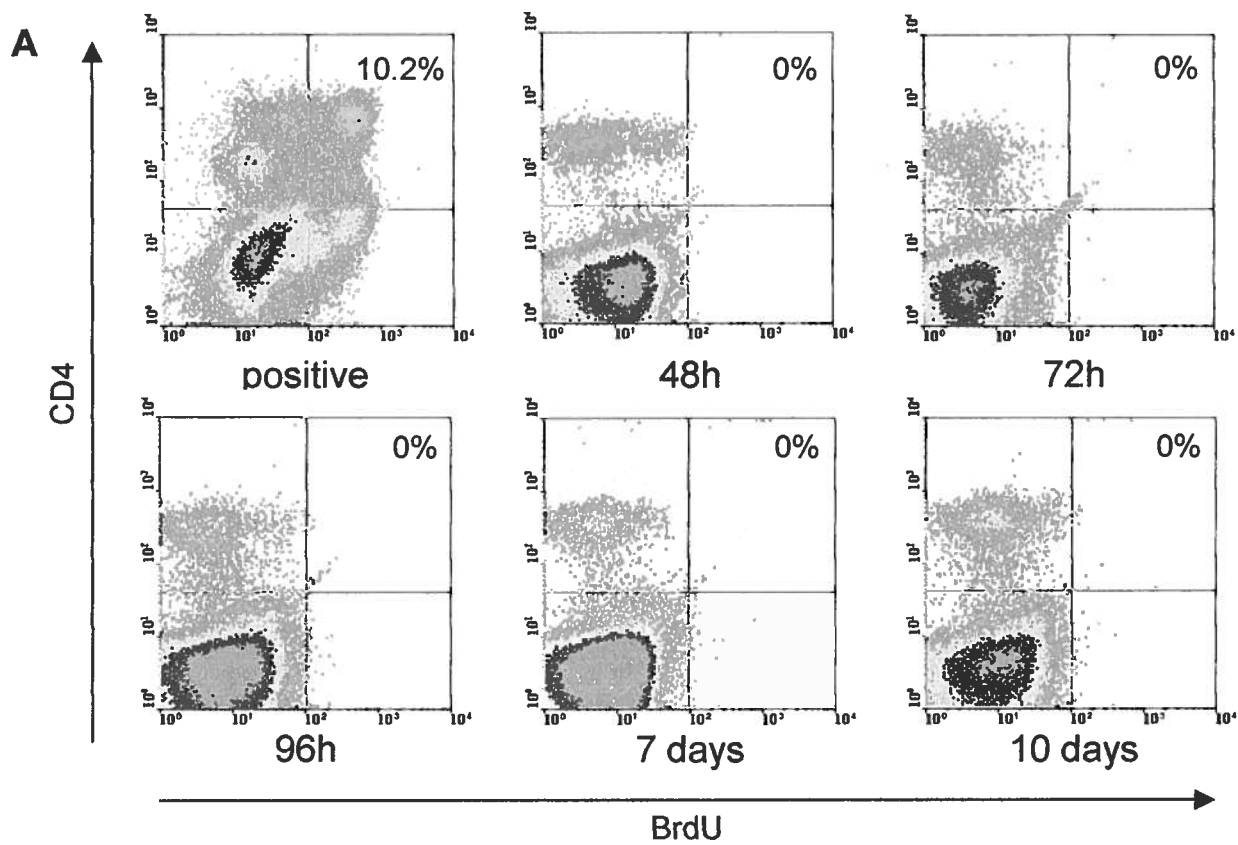


splenocytes or cell lysates from B10.P (H-2^P), transgenic B6(mHEL-Hb) (H-2^b), B6.AKR (H-2^k) and C57BL/6 (H-2^b) mice were compared. The 2.102Tg T cells showed a strong reactivity against B10.P splenocytes, whereas B10.P cell lysates were unable to stimulate proliferation, thus confirming the 2.102Tg T cells as being alloreactive against H-2^P alloantigens only by the direct alloreactivity pathway (Figure 4). In contrast, 2.102Tg T cells showed a strong reactivity against B6(mHEL-Hb) cell lysates and no reactivity against B6(mHEL-Hb) splenocytes, demonstrating the alloreactivity of the 2.102Tg T cells only by the indirect pathway for these alloantigens. Results with C57BL/6 cell lysates and splenocytes demonstrated that none of the H-2^b antigens could be recognized by 2.102Tg T cells in either alloreactivity pathways. Cultures with B6.AKR cell lysates and splenocytes were used as isogeneic controls in these experiments. Thus, we have demonstrated the exclusive alloreactivity of the 2.102Tg T cells against H-2^P alloantigens (specifically I-E^P) by the direct pathway, and B6(mHEL-Hb) alloantigens (specifically the Hb(64-76) peptide) by the indirect pathway.

Absence of homeostatic proliferation of CD4⁺ T cells after adoptive transfer in TCR α KOK mice

Numerous reports have described homeostatic proliferation of naive T cells when these are transferred into immunocompromised or T cell-depleted hosts (44, 45). It has been demonstrated that naive T cells can undergo homeostatic proliferation and acquire effector functions such as the ability to produce IFN- γ (46). Therefore, activation and proliferation of 2.102Tg CD4⁺ T cells in TCR α KOK mice could have been attributed to purification and adoptive transfer of effector cells instead of a result of skin graft rejection. To determine if adoptive transfer would elicit a homeostatic proliferation,

Figure 5. Absence of homeostatic proliferation following adoptive transfer of 2.102Tg CD4⁺ T cells. Purified 2.102Tg CD4⁺ T cells (10×10^6) were adoptively transferred into C57BL/6J Tcr $\alpha^{tm1/Mom}$ (TCR α KOK) mice by tail-vein injection. Recipients were also treated with a daily dose of BrdU (2 mg/ml i.p.). Splenocytes were harvested at different times after adoptive transfer, and stained with anti-BrdU antibodies, co-stained with either anti-CD4 antibodies (A) or anti-CD25 antibodies (B), and analyzed by flow cytometry. The positive controls correspond to 2.102Tg spleen cells stimulated *in vitro* with 5 mg/ml of Con A. The percentage indicated in each dot-plot graphs corresponds to the percentage of CD4⁺ and BrdU⁺ (A) or CD4⁺ and CD25⁺ (B) cells from the total cells analyzed and gated on lymphocytes on forward- and side-scatter plots. Percentage below 0.1% were indicated as 0%.

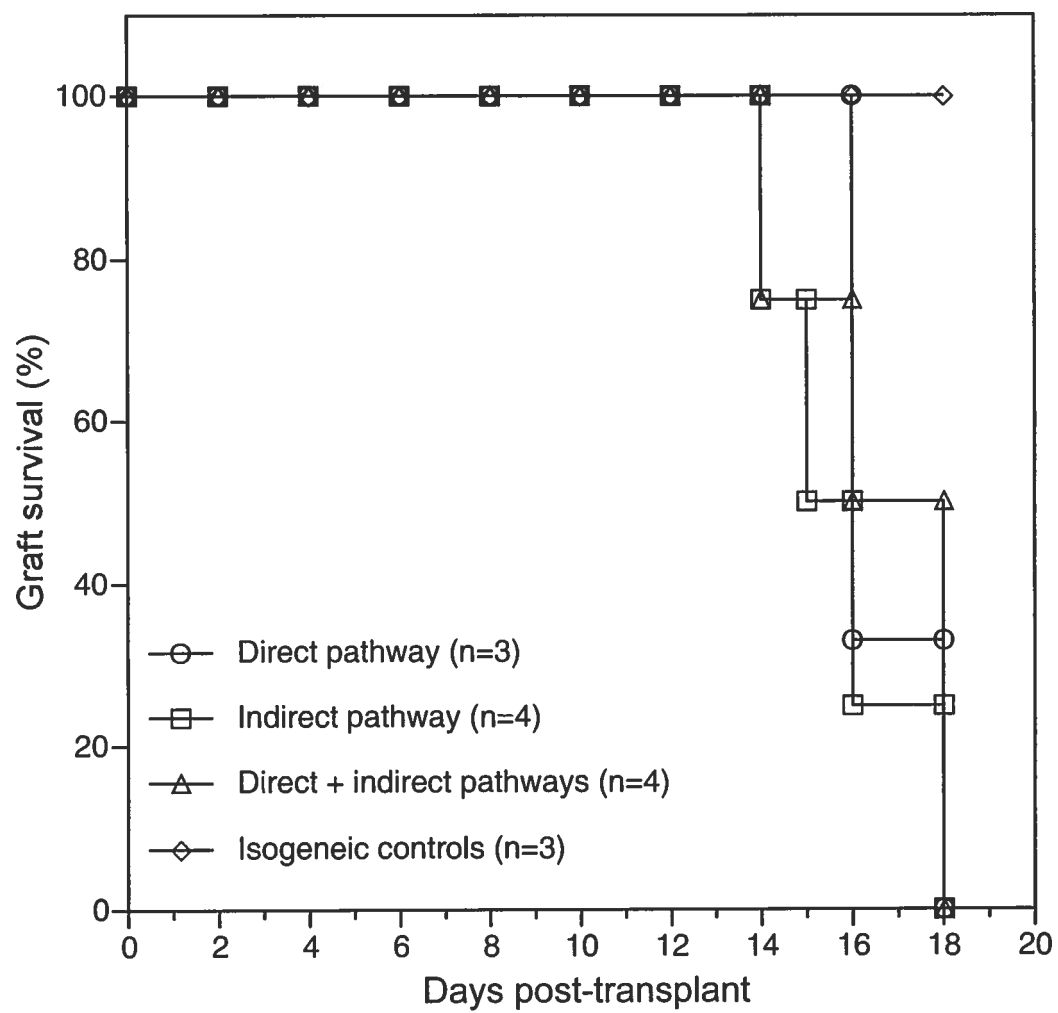


TCR α KOK mice were adoptively transferred with 10×10^6 CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice and injected daily with bromodeoxyuridine (BrdU) to assess T cell proliferation and activation *in vivo*. Spleen and lymph nodes were recovered at different times after adoptive transfer and CD4⁺ T cells were analyzed for BrdU incorporation by flow cytometry. CD4⁺BrdU⁺ T cells could not be detected in spleen cells recovered 48 h, 72 h, 96 h, 7 days and 10 days following adoptive transfer (Figure 5A), suggesting an absence of T cells homeostatic proliferation in TCR α KOK recipients. In order to further confirm the absence of T cell activation following adoptive transfer, the upregulation of CD25 and down regulation of CD62L activation markers were analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 5B, the absence of CD4⁺CD25⁺ cells in splenocytes harvested at different times after adoptive transfer of CD4⁺ T cells indicates a lack of T cell activation. Similar conclusions were drawn from staining with CD62L antibody and analyses of lymph node cells (data not shown). Thus, these results confirm that 2.102Tg T cells transferred into TCR α KOK recipients were and remained naive before performing skin transplant, and that proliferation and activation of CD4⁺ T cells should be initiated by skin allografts.

2.102Tg CD4⁺ T cells mediate skin graft rejection by direct and indirect alloreactivity pathways

We next investigated the kinetic of skin graft rejection by both alloreactivity pathways in our model of transgenic mice. TCR α KOK recipient mice were adoptively transferred the day before grafting with 10×10^6 CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice as effectors. Surprisingly, the kinetic of graft rejection was similar for both alloreactivity pathways, as rejection occurred between 14 and 18 days post-transplantation (Figure 6). Interestingly,

Figure 6. Kinetics of tail-skin graft rejection by the direct and indirect alloreactivity pathways are similar. Samples of tail-skin from B10.P (circles), B6(mHEL-Hb) (squares), (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 (triangles), or B6.AKR (diamonds) donors were grafted onto the back of TCR α KOK mice, adoptively transferred with 10×10^6 CD4⁺ T cells one day prior to skin grafting. The allograft was considered fully rejected when over 90% shrinkage or necrosis was observed. The results are representative of three experiments.

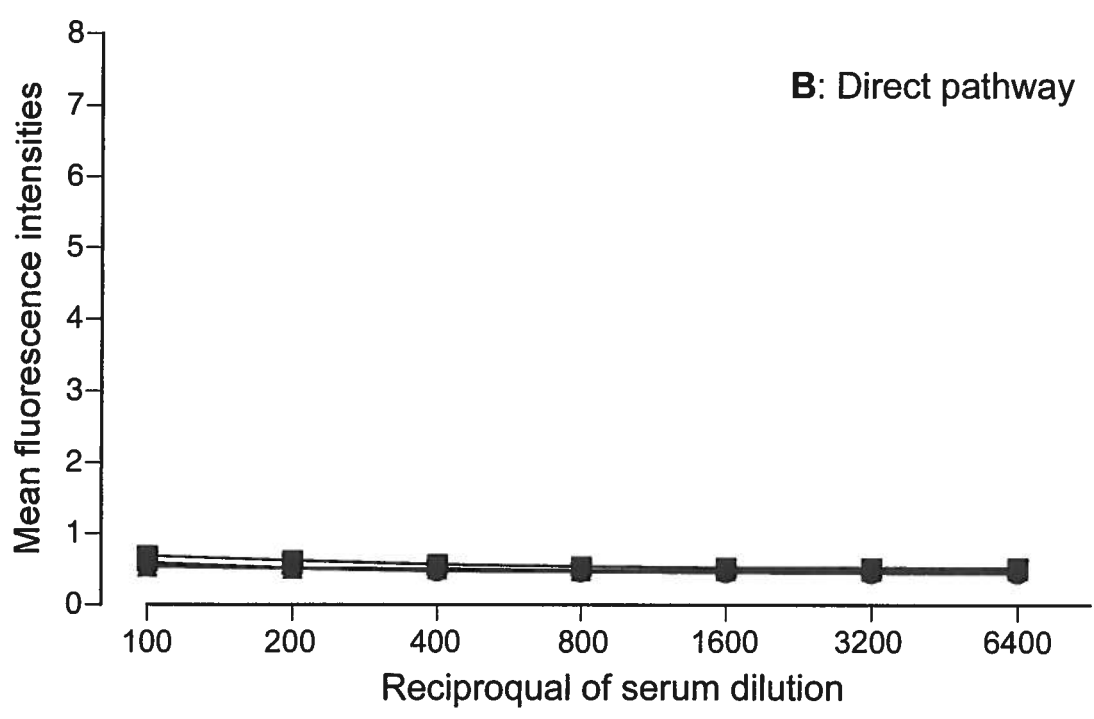
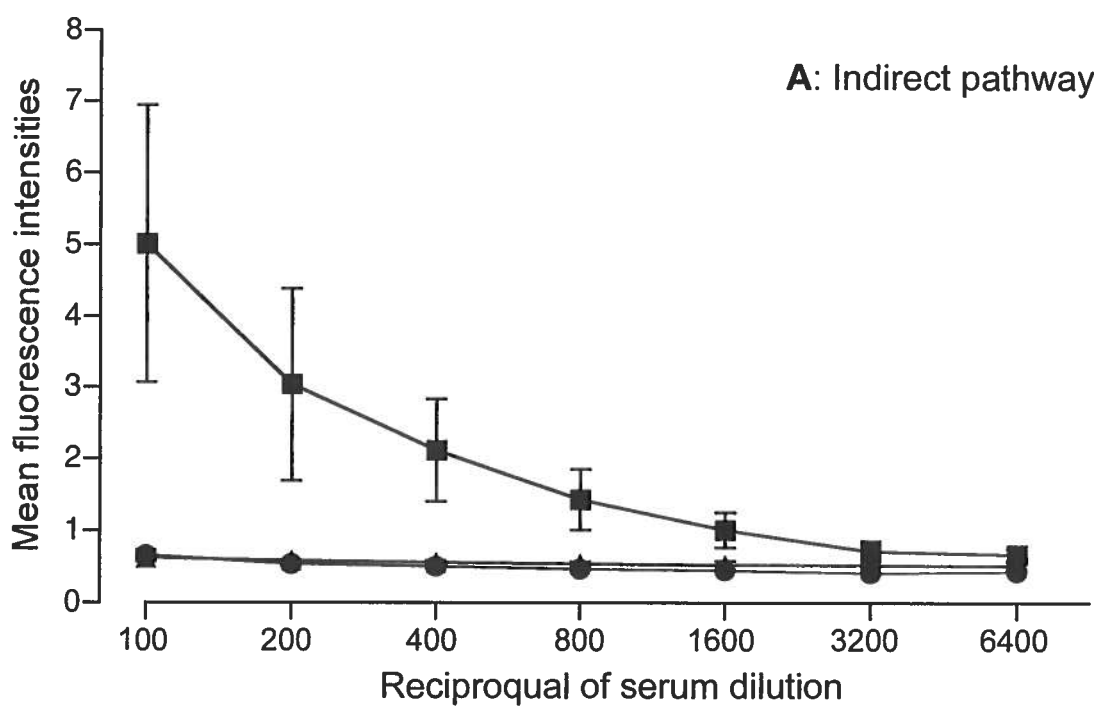


the kinetic of skin allograft rejection against alloantigens of both alloreactivity pathways (F1) was comparable to the graft rejection kinetic of direct or indirect pathways alone. These data indicate that there was no significant difference between groups in the time course of skin graft rejection following allorecognition by the direct or indirect pathways, after adoptive transfer of 10×10^6 CD4⁺ T cells. As expected, the isogeneic control B6.AKR (H-2^k) skin graft were not rejected by TCR α KOK recipient mice and remained intact for several weeks after transplantation (data not shown). Thus, we have demonstrated that 2.102Tg T cells were effective at initiating allograft rejection by direct or indirect alloreactivity pathways.

IgG alloantibody production is only observed in the indirect pathway of alloreactivity

The presence of donor-reactive IgG alloantibodies in TCR α KOK recipient mice after adoptive transfer of 10×10^6 CD4⁺ T cells was determined by flow cytometry analyses of serial dilutions of serum samples. As shown in Figure 7A, mice that had rejected their graft by the indirect pathway of allorecognition (B6(mHEL-Hb) allografts) produced IgG alloantibodies specific to BW5147 cells expressing the mHEL-Hb alloantigen whereas no response was observed when tested against BW5147 control cells or BW5147 cells expressing H-2D^P. Surprisingly, production of H-2D^P-specific IgG alloantibodies was not observed in mice that had rejected their graft by the direct alloreactivity pathway (B10.P allografts) (Figure 7B). In fact, reactivity against BW5147 H-2D^P cells was comparable to the reactivity against the control cell lines BW5147 and BW5147mHEL-Hb. Furthermore, no IgG alloantibody production was observed in sera of TCR α KOK recipient mice that were transplanted with B6(mHEL-Hb) skin allografts, but were not adoptively transferred (data not shown), confirming the requirement of CD4⁺ T cells for

Figure 7. Production of IgG alloantibodies is only observed after sensitization by the indirect pathway. Sera from TCR α KOK mice that were adoptively transferred with 10×10^6 CD4⁺ T cells and grafted with tail-skin from B6(mHEL-Hb) (A: indirect pathway) or B10.P (B: direct pathway) donors were recovered by bleeding from retro-orbital plexus at 18 days post-transplant. Serial dilutions of sera from individual mice were analyzed by flow cytometry against BW5147 T cells (triangles), BW5147 T cells expressing H-2D^p (circles) or mHEL-Hb (squares) using FITC-conjugated goat anti-mouse antibodies. The values represent the mean \pm SD of the mean fluorescence intensities of serum dilutions from individual mice. The results are representative of three experiments.

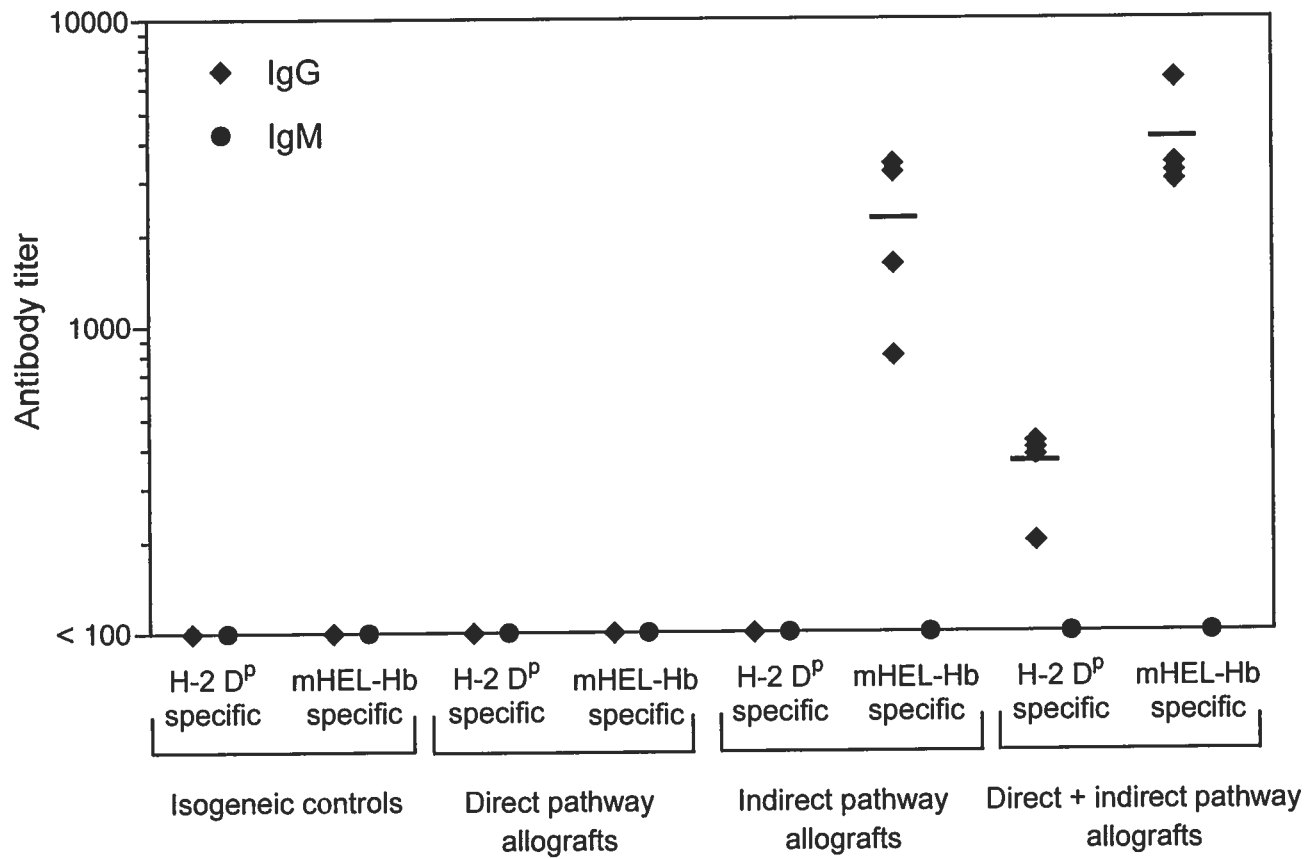


the production of IgG donor-reactive alloantibody (47). These results demonstrated that despite allograft rejection by both pathways, production of donor-reactive IgG antibodies was strictly confined to the indirect alloreactivity pathway.

Production of antibodies against alloantigens of the direct pathway requires help from CD4⁺ T cells activated by the indirect pathway

In order to rule out that the absence of IgG responses against B10.P allografts was due to a lack of immunogenicity of H-2^P antigens, we generated (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 mice expressing H-2^P and mHEL-Hb alloantigens, thus giving us the opportunity to study both pathways of allorecognition together. As shown in Figure 8, recipient mice that had rejected their graft by the indirect pathway produced IgG alloantibodies specific for mHEL-Hb at a mean titer of 1:2200 while no IgG response specific against H-2D^P was observed in mice that had rejected their graft by the direct pathway. Importantly, there was an IgG alloantibody production against both H-2^P and mHEL-Hb alloantigens in TCR α KOK mice grafted with F1 tail-skin donors. Recipient mice that had rejected their graft by direct and indirect pathways produced IgG alloantibodies at a mean titer of 1:350 against H-2D^P direct pathway alloantigens and at a mean titer of 1:4000 against mHEL-Hb alloantigens of the indirect alloreactivity pathway. Thus, these results indicate that the absence of IgG in the direct pathway of alloreactivity was not the result of a lack of immunogenicity of the H-2^P antigens. More importantly, these results suggest that production of alloantibodies against specific alloantigens through the direct pathway requires help from CD4⁺ T cells activated by the indirect pathway of allorecognition. We next assessed the presence of anti-donor IgM antibodies, since it has been demonstrated that MHC class II-deficient mice used to study the direct pathway of allorecognition

Figure 8. Production of alloantibodies against B10.P alloantigens is dependent on the indirect alloreactivity pathway. Sera from TCR α KOK mice that were adoptively transferred with 10×10^6 CD4⁺ T cells and grafted with tail-skin from B10.P (direct), B6(mHEL-Hb) (indirect), (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 (direct + indirect), or B6.AKR (isogenic control) donors were recovered by bleeding from retro-orbital plexus at 18 days post-transplant. Serial dilutions of sera from individual mice were analyzed by flow cytometry against BW5147 T cells expressing H-2D^p or mHEL-Hb using FITC-conjugated goat anti-mouse IgG or FITC-conjugated rat anti-mouse IgM antibodies. The values represent the antibody titers from individual mice, and are representative of three experiments.

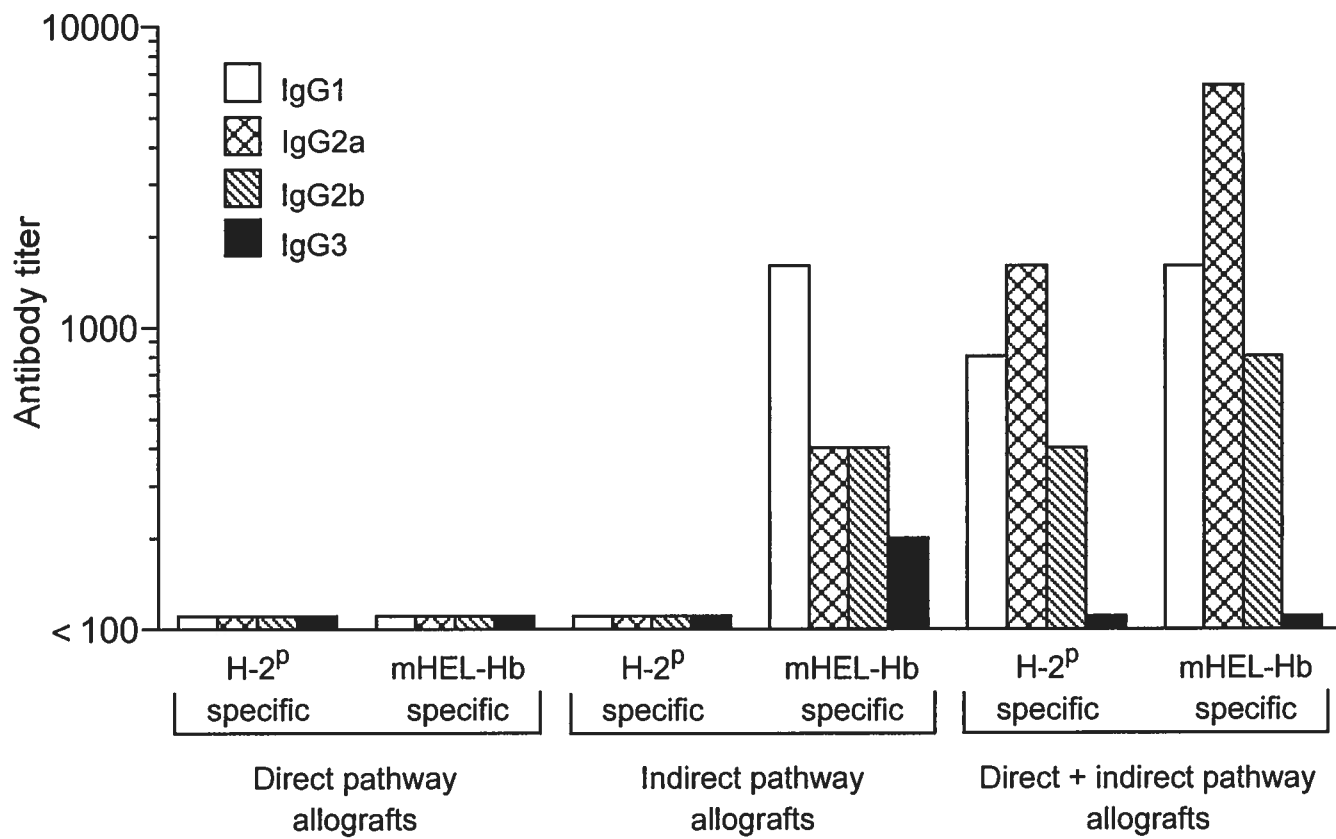


could produce IgM isotype alloantibodies but no IgG (21). No IgM response, even at dilutions as low as 1:25, could be detected in TCR α KOK recipients that had rejected their skin allograft after adoptive transfer of 10×10^6 CD4⁺ T cells, regardless of the tail-skin graft donor (Figure 8).

Similar alloantibody IgG isotypes are produced after sensitization by direct or indirect pathways

In order to highlight potential differences in the differentiation of 2.102Tg T cells activated by the direct and indirect pathways, the IgG alloantibody responses were characterized by determining the distribution of IgG alloantibody isotypes specific for H-2^P and mHEL-Hb alloantigens. Serial dilutions of serum pools from TCR α KOK recipient mice adoptively transferred with 10×10^6 CD4⁺ T cells were incubated with donor strain spleen cells and subsequently stained with FITC-conjugated, isotype-specific antibodies for flow cytometry analyses. No IgG isotypes could be detected on donor splenocytes by flow cytometry using isotype-specific secondary antibodies (data not shown). As shown in Figure 9, B10.P allograft recipients (direct pathway) did not generate any of the IgG isotypes against H-2^P alloantigens, as expected from previous analyses. In contrast, there were strong IgG1, IgG2a, and IgG2b alloantibodies responses against mHEL-Hb alloantigens detected after rejection of B6(mHEL-Hb) tail-skin allografts (indirect pathway), whereas no response was detectable against H-2^P alloantigens. Mice grafted with F1 tail-skin (both pathways of allorecognition) also produced predominant IgG1, IgG2a and IgG2b alloantibodies against H-2^P and mHEL-Hb alloantigens. Moreover, IgG3 response was relatively weak and detected only in mice that had rejected their graft

Figure 9. IgG alloantibody isotypes produced after direct or indirect alloreactivity are comparable. Sera from TCR α KOK mice that were adoptively transferred with 10×10^6 CD4⁺ T cells and grafted with tail-skin from B10.P (direct), B6(mHEL-Hb) (indirect), or (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 (direct + indirect) donors were recovered by bleeding from retro-orbital plexus at 18 days post-transplant. Serum from individual mice were pooled and serial dilutions were analyzed by flow cytometry against spleen cells from B10.P or B6(mHEL-Hb) mice using FITC-conjugated rat anti-mouse IgG isotypes. The values represent the mean antibody titers of triplicate analyses of serum pools, and are representative of three experiments.



by the indirect pathway. Thus, similar alloantibody IgG isotypes are produced after allograft rejection by the indirect pathway, alone or in combination with the direct pathway.

Production of similar antibody responses, despite the absence of tail-skin allograft rejection

In order to evaluate the impact of the precursor frequency of 2.102Tg T cells on the kinetic of rejection and alloantibody production by TCR α KOK recipients, experiments with adoptive transfer of 2.5×10^6 or 15×10^6 effector cells were performed. In particular, the number of T cells transferred in the experiments described previously (10×10^6 CD4⁺ T cells) could have been limiting for the production of alloantibodies against H-2^P antigens. Of note, B10.A(4R)mHEL-Hb mice were used as tail-skin donors for the study of the indirect pathway in these experiments, instead of the B6(mHEL-Hb) mice. The B10.A(4R) mice are H-2^b at the E α locus and do not express a functional I-E molecule. Therefore, recognition of the Hb(64-76) epitope by the 2.102Tg T cells requires the uptake and processing of the mHEL-Hb antigen by recipients APCs, as for B6(mHEL-Hb) donors. Mice transferred with 2.5×10^6 CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice did not show any sign of acute rejection (neither extensive shrinkage nor necrosis of the graft) by the time they were sacrificed, which was 45 days post-transplantation (data not shown). Kinetics of graft rejection were not significantly altered after the adoptive transfer of 15×10^6 CD4⁺ T cells, as compared to 10×10^6 CD4⁺ T cells. The mean survival time of B10.P allografts (direct pathway) after adoptive transfer of 15×10^6 CD4⁺ T cells was 13.5 ± 2.4 days (Table 1). Similarly, recipient mice grafted with B10.A(4R)mHEL-Hb

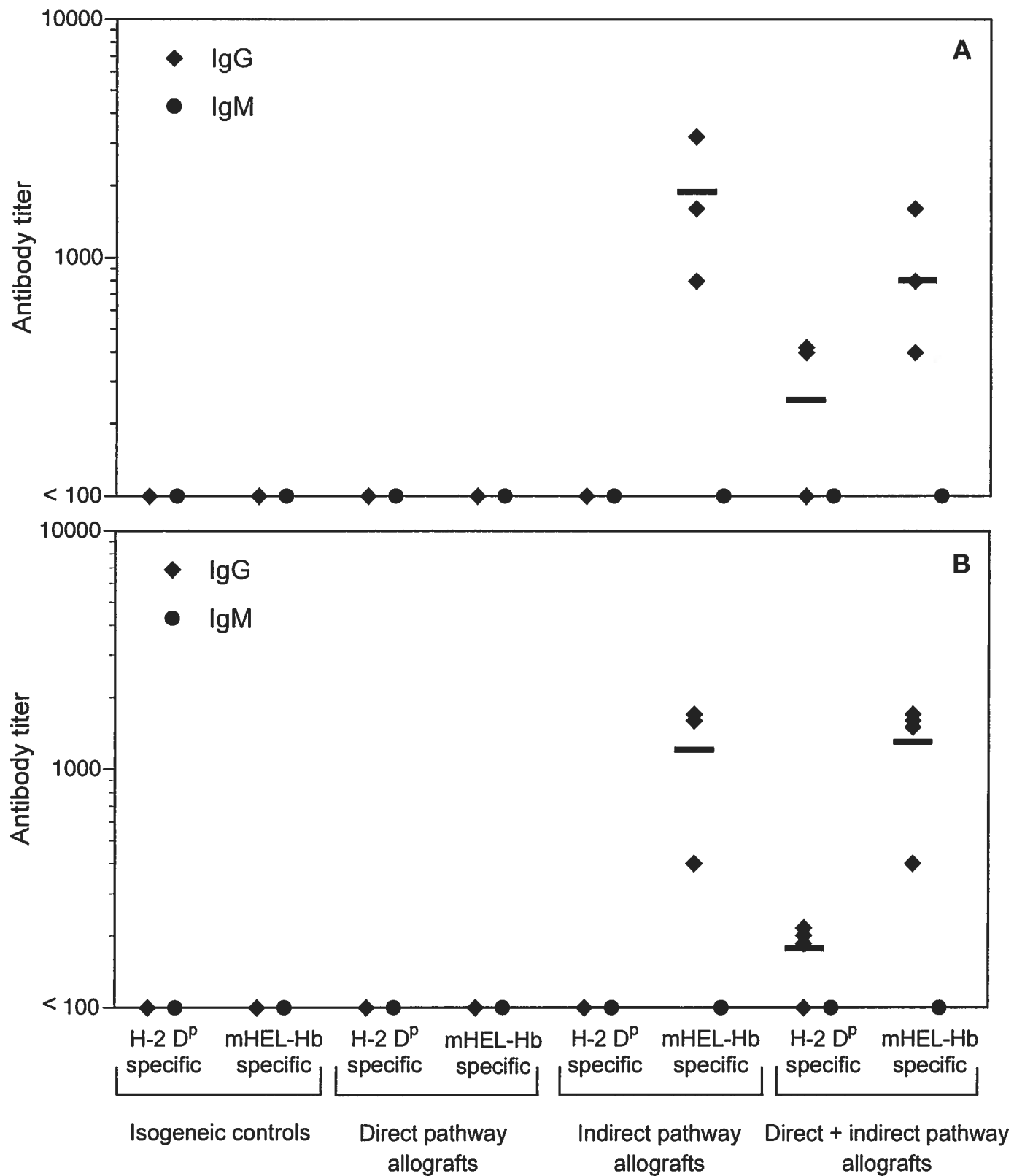
Table 1. Survival of tail-skin grafts on TCR α KOK recipients after adoptive transfer of different numbers of purified CD4⁺ T cells.

	Number of CD4 ⁺ T cells transferred		
	2.5X10 ⁶ MST \pm SD	10X10 ⁶ MST \pm SD	15X10 ⁶ MST \pm SD
B6.AKR grafts isogeneic control	> 21 (n=2)	> 18 (n=3)	> 23 (n=3)
B10.P allografts direct pathway	> 21 (n=3)	15.7 \pm 1.2 (n=3)	13.5 \pm 2.4 (n=4)
B6(mHEL-Hb) allografts indirect pathway		14.8 \pm 1.7 (n=4)	
B10.A(4R)mHEL-Hb allografts indirect pathway	> 21 (n=3)		18.7 \pm 4.2 (n=3)
(B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 allografts direct and indirect pathways	> 21 (n=4)	15.5 \pm 1.9 (n=4)	18.0 \pm 2.7 (n=4)

^a MST = mean survival time

^b Recipient mice were injected with CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice by i.v. injection into the tail vein the day before grafting.

Figure 10. Comparable production of IgG alloantibodies despite different numbers of 2.102Tg CD4⁺ T cells transferred. Sera from TCR α KOK mice that were adoptively transferred with (A) 2.5×10^6 or (B) 15×10^6 CD4⁺ T cells and grafted with tail-skin from B10.P (direct), B10.A(4R)mHEL-Hb (indirect), (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 (direct + indirect), or B6.AKR (isogenic control) donors were recovered by bleeding from retro-orbital plexus at 21 or 18 days post-transplant, respectively. Serial dilutions of sera from individual mice were analyzed by flow cytometry against BW5147 T cells expressing H-2D^P or mHEL-Hb using FITC-conjugated goat anti-mouse IgG or FITC-conjugated rat anti-mouse IgM antibodies. The values represent the antibody titers from individual mice.



tail-skin (indirect pathway) rejected their graft on day 18.7 ± 4.2 while the mean survival time of F1 tail-skin recipient mice (direct and indirect alloreactivity pathways) was 18.0 ± 2.7 days.

Sera obtained 18 or 21 days after transplantation were analyzed by flow cytometry for the presence of donor-reactive IgG and IgM alloantibodies. Interestingly, production of alloantigen-specific IgG was shown in mice transferred with 2.5×10^6 CD4⁺ T cells, despite the absence of rejection (Figure 10A). The mice sensitized by the indirect pathway produced IgG alloantibodies against mHEL-Hb alloantigens with a mean antibody titer of 1:1860 while mice grafted with F1 tail-skin had a mean antibody titer of 1:250 and 1:800 against H-2D^p and mHEL-Hb alloantigens, respectively. The antibody titers determined from sera of TCR α KOK mice adoptively transferred with 15×10^6 CD4⁺ T cells were also similar (Figure 10B). No IgM response was observed regardless of the skin graft donor and the number of T cells transferred. As well, no distinct IgG isotypes alloantibody production pattern was observed (data not shown). Our data demonstrated that the transfer of 2.5×10^6 CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice into TCR α KOK recipients was not sufficient to initiate the acute rejection of skin allografts by neither pathways. Nevertheless, these mice had an antibody production equivalent to mice adoptively transferred with 4-times and 6-times more CD4⁺ T cells. Thus, no obvious correlation between alloantibodies level and mean survival time can be drawn, suggesting that humoral effector mechanisms may not play a primary role in the rejection process of skin allografts. These results confirm the weaker role played by antibodies in skin allograft

rejection (48-50). Importantly, our results also suggest that the number of T cells transferred was not limiting for antibody production, within the range used in these experiments.

DISCUSSION

The actual contribution of the direct and indirect pathways of MHC class II allorecognition in graft rejection is still not well defined because experimental models allowing the dissection of the relative roles of each pathway are not readily available. Indeed, the low frequency of responding T cells in the indirect pathway of allorecognition makes it difficult to evaluate the exact contribution of this pathway, in contrast to the direct pathway for which the alloreactive T cells precursor frequency is exceptionally high. Therefore, we sought to establish a model in which T cell responses induced by both pathways of allorecognition could be directly compared, without the inherent potential bias caused by the different precursor frequencies. The direct alloreactivity of the 2.102 CD4⁺ T cell for the allogeneic I-E^P, and its indirect reactivity for the Hb(64-76) peptide as an alloantigen, provided an unique opportunity to study both direct and indirect pathways of allorecognition mediated by a single T cell clonotype. The use of the 2.102 transgenic T cells population enabled us to study both types of alloreactive responses by limiting the diversity of the T cell repertoire and controlling the precursor frequencies, as compared to other models.

The 2.102Tg T cell responses generated from direct and indirect allorecognition were first compared by evaluating the kinetics of graft rejection by direct, indirect and combined alloreactivity pathways. No significant delay in graft rejection between these groups was observed, as rejection of tail-skin allografts on TCR α KOK recipients occurred between 14 and 18 days post-transplant, after the adoptive transfer of 10×10^6 purified CD4⁺ T cells from 2.102Tg mice. This is in contrast with studies showing that rejection of skin grafts by CD4⁺ T cells activated through the indirect pathway, in the absence of CD8⁺ T cells,

was delayed compared to fully allogeneic grafts (15, 51-54). Other investigators have demonstrated that priming of alloreactive T cells for the indirect pathway by immunization with donor class II MHC allopeptides can accelerate the time course of cardiac allograft rejection in Lewis rats (6). The similarity between the kinetics of graft rejection by the direct and indirect pathways observed in our study suggest that there is no major difference in the mechanisms responsible for T cell activation and graft rejection *per se* by one pathway or the other. The difference in skin graft rejection kinetics observed in other models could result from a difference in precursor frequencies of alloreactive T cells between allorecognition pathways. Thus, to our knowledge it was the first time that those questions were assessed with a single T cell clonotype that can be activated independently by the two pathways of allorecognition, allowing us to study graft rejection with a limited T cell repertoire. Moreover, our results indicate that indirect effector mechanisms are sufficient and highly effective to initiate skin allograft rejection when recipient and donor differ at only one immunodominant epitope.

Numerous studies have demonstrated a relationship between allorecognition pathways and production of antibodies to alloantigens by B cells (2, 7, 21). In order to study the humoral response against donor-specific antigens in our model, specific antibody production by recipients' B cells was assayed by flow cytometry using BW5147 T cells expressing H-2D^p or mHEL-Hb alloantigens. Skin grafts on TCR α KOK recipients in the absence of adoptive transfer of CD4⁺ T cells showed no sign of rejection nor antibody response, confirming the requirement of CD4⁺ T cells for the production of IgG donor-reactive alloantibody, as shown by others (47). Furthermore, we have observed an IgG response, specific to the mHEL-Hb alloantigen, in the indirect pathway of

allorecognition. Fangmann *et al.* (26) have shown that the indirect T helper pathway plays a role in antibody production to skin allografts. Moreover, it has been also established in a mouse skin allograft model that CD4⁺ T cells recognizing peptides derived from donor MHC antigens through the indirect pathway can provide help for the production of alloantibodies (21).

One of the most striking observation in our study was the fact that production of H-2D^P-specific IgG alloantibodies was not observed in TCR α KOK recipient mice that had rejected their graft by the direct pathway of allorecognition. Despite similar mean survival time of allografts between direct and indirect pathways, IgG alloantibody production was only observed in the indirect alloreactivity pathway. One possible explanation for the absence of an IgG response in mice that had rejected their graft by the direct pathway was a lack of immunogenicity of the H-2^P antigens. Therefore, we generated mice expressing H-2^P and mHEL-Hb alloantigens (F1 donors) and studied the humoral response in mice that received skin grafts allogeneic for both pathways. Our experiments have shown production of IgG alloantibodies specific to both alloreactivity pathways alloantigens, i.e. H-2D^P and mHEL-Hb, in recipients grafted with F1 tail-skin donor, indicating that the absence of an IgG response in the direct pathway was not due to the absence of immunogenicity of H-2^P antigens. Thus, our results suggest that the direct pathway could not lead to alloantibody production on its own, and requires help from CD4⁺ T cells activated by the indirect pathway of allorecognition. Therefore, the indirect pathway of allorecognition by CD4⁺ T cells is essential for the production of antibodies against alloantigens of both alloreactivity pathways.

It has been shown that stimulation of CD4⁺ T cells by the direct pathway only, using MHC class II antigens deficient mice as recipients, could stimulate production of IgM but not IgG alloantibodies (21). To our surprise, no IgM response could be detected in TCR α KOK recipient mice by day 18 after transplantation, even at serum dilutions as low as 1:25, regardless of the alloreactivity pathway studied. Bishop *et al.* (55) have shown using recipients of cardiac allografts treated with anti-CD4 mAb that IgM alloantibodies decreased by day 11 and were not detectable by day 21 after transplantation. Thus, the IgM antibodies specific for alloantigens in TCR α KOK recipients could have already disappeared from circulation 18 days post-transplantation, although the stronger immunogenicity of skin allograft, as compared to cardiac allografts, would argue against this hypothesis. Furthermore, it should be noted that the IgM antibodies reported by Steele and colleagues (21) had been detected 21 days post-transplant.

Noticeably, the IgG isotypes and titers against mHEL-Hb alloantigens were similar, whether or not there was a contribution from T cells activated by the direct pathway. It is known in mice that the Th1-derived cytokine IFN- γ stimulates IgG2a production while IL-4 secreted by Th2 cells stimulates IgG1 responses (56, 57). Furthermore, it has been demonstrated that Th2 CD4⁺ T cells were more effective than Th1 T cells at providing help for germinal centers formation (58). Preliminary data have suggested that naive 2.102Tg T cells can acquire Th1- or Th2-like phenotypes upon *in vitro* stimulation with splenocytes from CBA (which endogenously express Hb(64-76)/I-E^k complexes) or B10.P mice, respectively (Grakoui *et al.*, unpublished data). Because the production of IgG isotypes specific for mHEL-Hb alloantigens is comparable between the indirect pathway and the direct and indirect pathways together, we are speculating that the

2.102Tg T cell responses were not drastically skewed toward Th1 or Th2 differentiation phenotypes by one pathway or the other. Therefore, the lack of antibody production in the direct pathway would not be attributed to improper differentiation of 2.102Tg T cells. However, this hypothesis remains to be confirmed experimentally.

In summary, we have demonstrated that the production of alloantibodies after skin graft transplantation is different for the direct and indirect alloreactivity pathways. In our experimental model, donor-specific antibodies are not observed in the direct alloreactivity pathway alone suggesting the requirement for help provided by T cells activated by the indirect pathway of allorecognition. These results suggest that there is an absence of B cell activation and alloantibody production following graft rejection by the direct allorecognition pathway, possibly due to an absence of T cell activation in the secondary lymphoid organs. This hypothesis is supported by results obtained in our laboratory demonstrating a strong CD4⁺ T cell expansion and cytokine-producing effectors observed only in draining lymph nodes of 2.102Tg, Rag1-deficient mice that had rejected their graft by the indirect pathway (Bonin *et al.*, manuscript in preparation). The results presented here also support the idea that there are two levels of help for production of alloantibodies by B cells (21). It has been suggested that CD4⁺ T cells can mediate help available for the production of antibodies by B cells specific for alloantigens either by cognate and non cognate interactions. In our model, only the T cells recognizing the Hb(64-76) epitope presented by the recipient's B cells (H-2^k) can provide cognate help to the latter. There is no possible cognate help by the direct pathway alone, as no H-2^P-derived peptide epitopes can be both presented by the recipient's B cells and recognized by the 2.102Tg T cells. In contrast to previous studies, our study suggests that

CD4⁺ T cells that provide help for B cells by a cognate interaction (indirect pathway) are absolutely required for the activation and differentiation of B cells into antibody-producing plasmocytes. Numerous receptor-ligand pairs have been shown or proposed to be important in contact-mediated interactions between B and T lymphocytes, such as CD40-CD154, OX40L-OX40, and CD30-CD153 (59). The model described in this study should be helpful to elucidate the role of these receptor-ligand pairs in B cell maturation and antibody production or the importance of the physical and cellular contexts in which they interact.

Given that current immunosuppressive therapies have a poor effect on blocking the indirect alloresponse, it is crucial to identify new therapeutical strategies. We have developed a model of skin allograft rejection mediated by a single T cell clonotype, that allows us to study the direct and the indirect allorecognition pathways independently, with a limited T cell repertoire. We have demonstrated an essential role for the indirect CD4⁺ T cell allorecognition pathway in the production of antibodies against alloantigens. Thus, the events leading to the initiation of immune responses responsible for graft rejection are clearly different for the two alloreactivity pathways. Our skin allograft rejection model should enable us to further elucidate the mechanisms responsible for graft rejection as well as for the development of novel pathway-specific therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Paul M. Allen for providing most of the mouse strains used in this study. We would also like to thank Calvin B. Williams for providing us with the mHEL-Hb construction and the F10.6.6 antibody, François Denis for providing the H-2D^p cDNA, and Yvon Lamontagne for taking care of the mouse colonies. Finally, we would like to thank Myriam Baratin and François Denis for critical reading of this manuscript.

REFERENCES

1. Auchincloss, H. Jr, and D. H. Sachs. 1993. Transplantation and graft rejection. In *Fundamental immunology*. W. E. Paul, eds. Raven Press, New York, p. 1099.
2. Hall, B. M. 1991. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 51: 1141.
3. Benichou, G. 1999. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front. Biosci.* 4: D476.
4. Shoskes, D. A., and K. J. Wood. 1994. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol. Today* 15: 32.
5. Lechler, R. I., and J. R. Batchelor. 1982. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J. Exp. Med.* 155: 31.
6. Vella, J. P., C. Magee, L. Vos, K. Womer, H. Rennke, C. B. Carpenter, W. Hancock, and M. H. Sayegh. 1999. Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation* 67: 1523.
7. Kelly, C. M., A. M. Benham, G. J. Sawyer, R. Dalchau, and J. Fabre. 1997. A three-cell cluster hypothesis for noncognate T-B cell collaboration via direct recognition of allogeneic dendritic cells. *Transplant. Proc.* 29: 1003.
8. Lechler, R. I., G. Lombardi, J. R. Batchelor, N. Reinsmoen, and F. H. Bach. 1990. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol. Today* 11: 83.
9. Rogers, N. J., and R. I. Lechler. 2001. Allorecognition. *Am. J. Transplant.* 1: 97.
10. Shirwan, H. 1999. Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 68: 715.
11. Sayegh, M. H., and L. A. Turka. 1998. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 338: 1813.
12. Sayegh, M. H., and C. B. Carpenter. 1996. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int. Rev. Immunol.* 13: 221.
13. Bradley, J. A. 1996. Indirect T cell recognition in allograft rejection. *Int. Rev. Immunol.* 13: 245.
14. Krieger, N. R., D. P. Yin, and C. G. Fathman. 1996. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorecognition. *J. Exp. Med.* 184: 2013.

15. Dalloul, A. H., E. Chmouzis, K. Ngo, and W. P. Fung-Leung. 1996. Adoptively transferred CD4⁺ lymphocytes from CD8^{-/-} mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts. *J. Immunol.* 156: 4114.
16. Kalams, S. A., and B. D. Walker. 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 188: 2199.
17. Lee, R. S., M. J. Grusby, L. H. Glimcher, H. J. Winn, and H. Auchincloss Jr. 1994. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 179: 865.
18. Rosenberg, A. S., and A. Singer. 1992. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 333.
19. Pattison, J. M., and A. M. Krensky. 1997. New insights into mechanisms of allograft rejection. *Am. J. Med. Sci.* 313: 257.
20. Morton, A. L., E. B. Bell, E. M. Bolton, H. E. Marshall, C. Roadknight, M. McDonagh, and J. A. Bradley. 1993. CD4⁺ T cell-mediated rejection of major histocompatibility complex class I-disparate grafts: a role for alloantibody. *Eur. J. Immunol.* 23: 2078.
21. Steele, D. J., T. M. Laufer, S. T. Smiley, Y. Ando, M. J. Grusby, L. H. Glimcher, and H. Auchincloss Jr. 1996. Two levels of help for B cell alloantibody production. *J. Exp. Med.* 183: 699.
22. Le Moine, A., M. Surquin, F. X. Demoor, J. C. Noel, M. A. Nahori, M. Pretolani, V. Flamand, M. Y. Braun, M. Goldman, and D. Abramowicz. 1999. IL-5 mediates eosinophilic rejection of MHC class II-disparate skin allografts in mice. *J. Immunol.* 163: 3778.
23. Orosz, C. G., and A. M. VanBuskirk. 1998. Immune mechanisms of acute rejection. *Transplant. Proc.* 30: 859.
24. Burrows, S. R., R. Khanna, S. L. Silins, and D. J. Moss. 1999. The influence of antiviral T-cell responses on the alloreactive repertoire. *Immunol. Today* 20: 203.
25. Sherman, L. A., and S. Chattopadhyay. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 385.
26. Fangmann, J., R. Dalchau, and J. W. Fabre. 1992. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J. Exp. Med.* 175: 1521.
27. Lechler, R. I., R. Batchelor, and G. Lombardi. 1991. The relationship between MHC restricted and allospecific T cell recognition. *Immunol. Lett.* 29: 41.

28. Liu, Z., Y.-K. Sun, Y.-P. Xi, A. Maffei, E. F. Reed, P. Harris, and N. Suci-Foca. 1993. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell reactivity. *J. Exp. Med.* 177: 1643.
29. Benichou, G., E. Fedoseyeva, P. V. Lehmann, C. A. Olson, H. M. Geysen, M. McMillan, and E. E. Sercarz. 1994. Limited T cell response to donor MHC peptides during allograft rejection. Implications for selective immune therapy in transplantation. *J. Immunol.* 153: 938.
30. Benichou, G., A. Valujskikh, and P. S. Heeger. 1999. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J. Immunol.* 162: 352.
31. Grakoui, A., D. L. Donermeyer, O. Kanagawa, K. M. Murphy, and P. M. Allen. 1999. TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J. Immunol.* 162: 1923.
32. Daniel, C., A. Grakoui, and P. M. Allen. 1998. Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J. Immunol.* 160: 3244.
33. Evavold, B. D., S. G. Williams, B. L. Hsu, S. Buus, and P. M. Allen. 1992. Complete dissection of the Hb(64-76) determinant using T helper 1, T helper 2 clones, and T cell hybridomas. *J. Immunol.* 148: 347.
34. Mombaerts, P., A. R. Clarke, M. A. Rudnicki, J. Iacomini, S. Itohara, J. J. Lafaille, L. Wang, Y. Ichikawa, R. Jaenisch, M. L. Hooper, and T. Tonegawa. 1992. Mutations in T-cell antigen receptor genes α and β block thymocyte development at different stages. *Nature* 360: 225.
35. Williams, C. B., K. Vidal, D. L. Donermeyer, D. A. Peterson, J. M. White, and P. M. Allen. 1998. In vivo expression of a TCR antagonist: T cells escape central tolerance but are antagonized in the periphery. *J. Immunol.* 161: 128.
36. Fischmann, T., H. Souchon, M. M. Riottot, D. Tello, and R. J. Poljak. 1988. Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of two new antigen-antibody (lysozyme-Fab) complexes. *J. Mol. Biol.* 203: 527.
37. Köhler, G., K. Fisher Lindahl, and C. Heusser. 1981. Characterization of a monoclonal anti-H-2K^b antibody. *Immune Syst.* 2: 202.
38. Norwich, K. H., S. Ramanathan, and P. Poussier. 1999. Kinetics of T cell turnover following thymectomy. *Cell Prolif.* 32: 195.
39. Rosenberg, A. 1991. Skin allograft rejection. In *Current protocols in immunology*. J. Coligan, A. Kruisbeek, D. Margulies, and E. Shevach, eds. John Wiley & Sons, Inc., Bethesda, pp. 4.4.1-4.4.9.

40. Lorenz, R. G., and P. M. Allen. 1988. Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85: 5220.
41. Nelson, C. A., I. Vidavsky, N. J. Viner, M. L. Gross, and E. R. Unanue. 1997. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 628.
42. Williams, C. B., D. L. Engle, G. J. Kersh, J. Michael White, and P. M. Allen. 1999. A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. *J. Exp. Med.* 189: 1531.
43. Mombaerts, P., E. Mizoguchi, H. G. Ljunggren, J. Iacomini, H. Ishikawa, L. Wang, M. J. Grusby, L. H. Glimcher, H. J. Winn, A. K. Bhan, and S. Tonegawa. 1994. Peripheral lymphoid development and function in TCR mutant mice. *Int. Immunol.* 6: 1061.
44. Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, and C. D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11: 173.
45. Viret, C., F. S. Wong, and C. A. Janeway Jr. 1999. Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* 10: 559.
46. Goldrath, A. W., L. Y. Bogatzki, and M. J. Bevan. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J. Exp. Med.* 192: 557.
47. Auchincloss, H. Jr, R. R. Ghobrial, P. S. Russell, and H. J. Winn. 1988. Prevention of alloantibody formation after skin grafting without prolongation of graft survival by anti-L3T4 in vivo. *Transplantation* 45: 1118.
48. Valujskikh, A., and P. S. Heeger. 2000. CD4+ T cells responsive through the indirect pathway can mediate skin graft rejection in the absence of interferon-gamma. *Transplantation* 69: 1016.
49. MacEachern, M. C., C. Burkhart, P. A. Lowrey, and D. C. Wraith. 1998. Identification of an indirectly presented epitope in a mouse model of skin allograft rejection. *Transplantation* 65: 1357.
50. Zijlstra, M., H. Auchincloss Jr, J. M. Loring, C. M. Chase, P. S. Russell, and R. Jaenisch. 1992. Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice. *J. Exp. Med.* 175: 885.
51. Lee, R. S., M. J. Grusby, T. M. Laufer, R. Colvin, L. H. Glimcher, and H. Auchincloss Jr. 1997. CD8+ effector cells responding to residual class I antigens, with help from CD4+ cells stimulated indirectly, cause rejection of "major histocompatibility complex-deficient" skin grafts. *Transplantation* 63: 1123.

52. Sawada, T., Y. Wu, D. H. Sachs, and J. Iacomini. 1997. CD4+ T cells are able to reject class I disparate allografts. *Transplantation* 64: 335.
53. Wecker, H., M. J. Grusby, and H. Auchincloss Jr. 1995. Effector cells must recognize antigens expressed in the graft to cause efficient skin graft rejection in SCID mice. *Transplantation* 59: 1223.
54. Auchincloss, H. Jr, R. S. Lee, S. Shea, J. S. Markowitz, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher. 1993. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3373.
55. Bishop, D. K., W. Li, S. Y. Chan, R. D. Ensley, J. Shelby, and E. J. Eichwald. 1994. Helper T lymphocyte unresponsiveness to cardiac allografts following transient depletion of CD4-positive cells. Implications for cellular and humoral responses. *Transplantation* 58: 576.
56. Lakkis, F. G. 1998. Cytokines in graft rejection and acceptance: An ever-shifting paradigm. *Graft* 1: 143.
57. Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban Jr, M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and W. E. Paul. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 303.
58. Secord, E. A., L. V. Rizzo, E. W. Barroso, D. T. Umetsu, G. J. Thorbecke, and R. H. DeKruyff. 1996. Reconstitution of germinal center formation in nude mice with Th1 and Th2 clones. *Cell. Immunol.* 174: 173.
59. Bishop, G. A., and B. S. Hostager. 2001. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 278.

FOOTNOTES

- 1- This work was supported by an operating grant (MOP-15674) from the Canadian Institutes of Health Research
- 2- Address for correspondence: Dr. Claude Daniel, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. E-mail: claudedaniel@iaf.quebec.ca
- 3 - Abbreviations used in this paper: HEL, hen-egg lysozyme; BrdU, bromodeoxyuridine; MFI, mean fluorescence intensity; MST, mean survival time.

CHAPITRE II :
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

INTRODUCTION

Les cellules T CD8⁺ cytotoxiques représentent des médiateurs importants impliqués dans le rejet des allogreffes, puisque ces lymphocytes permettent la lyse des cellules cibles du greffon. Généralement, la présence des cellules T CD4⁺ auxiliaires est nécessaire afin de permettre la croissance, la maturation et le maintien des cellules T cytotoxiques même s'il existe des lymphocytes T CD8⁺ indépendants des lymphocytes T CD4⁺ (Shelton *et al.* 1992 ; Deeths *et al.* 1999). Peu de modèles expérimentaux existent afin de mieux connaître la contribution exacte des voies alloréactives directe et indirecte dans le rejet des allogreffes. De plus, la contribution des cellules T CD4⁺ activées par la voie directe et par la voie indirecte dans la modulation de la réponse cytotoxique des cellules T CD8⁺ n'a pas encore été clairement examinée. À partir de notre modèle de greffe de peau, qui utilise des lignées de souris transgéniques et congéniques, nous nous sommes intéressé aux cellules T CD8⁺ cytotoxiques dans le cadre des réponses alloréactives directe et indirecte.

Ce chapitre présente donc les résultats obtenus dans le cadre du second objectif de recherche de ma maîtrise, c'est-à-dire étudier les fonctions auxiliaires des cellules T CD4⁺ au niveau de la modulation des cellules T CD8⁺ cytotoxiques dans le cadre du rejet des allogreffes de peau. Un transfert adoptif de cellules T CD8⁺ purifiées dans des souris TCR α KOK subséquentement greffées a été, à prime abord, effectué afin de voir les réponses des lymphocytes T cytotoxiques en absence de cellules T CD4⁺ auxiliaires. Ensuite, une seconde série de greffe de peau a été effectuée suite à un transfert adoptif de cellules T CD4⁺ et de cellules T CD8⁺ combinées. Enfin, ce chapitre est présenté sous une forme abrégée étant donné que la majorité des éléments techniques apparaissent déjà dans la section « Materials and Methods » du chapitre article scientifique, tout comme quelques éléments se retrouvent dans la section discussion. Certaines des sections de la méthodologie se trouvent reprises dans ce chapitre, en français, pour faciliter la chronologie et le suivi du contexte des manipulations effectuées, où seulement la portion « test de cytotoxicité » et la purification des cellules T CD8⁺ diffèrent.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souris

Les souris C57BL/6J Tcra^{tm1/Mom} ont été achetées de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME USA) et accouplées avec des B6.AKR (H-2^k) pour introduire la mutation dans un haplotype H-2^k (TCRαKOK). Ces souris déficientes pour les cellules T αβ (Mombaerts *et al.* 1992) ont été utilisées en tant que souris receveuses de greffe de peau. Les souris transgéniques pour le clone de cellule T CD4⁺ 2.102 (2.102Tg) (H-2^k) ont été décrites précédemment (Grakoui *et al.* 1999). La lignée de souris transgéniques pour la molécule mHEL-Hb, qui a été générée sur un fond génétique C57BL/6 (H-2^b) (B6(mHEL-Hb)) a également été décrite ailleurs (Williams *et al.* 1998). Le transgène mHEL-Hb a aussi été introduit dans des souris B10.A(4R) (H-2^{h4}) qui ont été obtenues de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME USA). Des souris B10.P (H-2^p) ont été croisées avec des souris B6(mHEL-Hb) ou B10.A(4R)mHEL-Hb afin de générer une progéniture (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 (H-2^{p/b}) ou (B10.PxB10.A(4R)mHEL-Hb)F1. Les lignées de souris transgéniques pour le TCR et pour mHEL-Hb, et les lignées de souris B10.P et B6.AKR ont été généreusement fournies par le Dr. Paul M. Allen (Washington University, St-Louis, MO USA). Enfin, des souris B10.BR (H-2^k) provenant également de The Jackson Laboratory ont été utilisées dans le test de cytotoxicité pour étudier la spécificité des réponses cellulaires.

2. Lignées cellulaires

Le lymphome de cellule T BW5147 (H-2^k) a été transfecté avec un plasmide codant pour la molécule du CMH de classe I H-2 D^p par électroporation en utilisant 3 µg du vecteur SRαpurMCSI contenant H-2 D^p (gracieuseté du Dr. François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC Canada), suite à un choc de 960 µF à 350 V avec un Gene Pulser (Bio Rad, Mississauga, ON Canada). Les cellules ont été mises en culture dans des micro-plaques de 96 puits à fond plat, et les transfectants stables ont été sélectionnés par l'ajout de puromycine (2 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON Canada).

Les clones résistants à la drogue ont été analysés par cytométrie en flux sur un Coulter Epics XL (Hialeah, FL USA) pour l'expression de l'antigène H-2 D^p avec l'anticorps B8.24.3 (anti-H-2^b ayant une réactivité croisée avec H-2^p) (Köhler *et al.* 1981).

3. Purification des cellules T

Des rates ont été prélevées de souris 2.102Tg pour la purification de cellules T CD4⁺, ou de souris B6.AKR pour la purification de cellules T CD8⁺. Les suspensions cellulaires ont été incubées avec des billes magnétiques MicroBeads Macs CD4 (L3T4) ou CD8 (Ly-2) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA USA), en fonction de la population cellulaire voulant être isolée, pendant 15 minutes à 4°C, lavées puis purifiées sur une colonne LS par sélection positive. L'éluat a donné une population positive composée à ~ 90 % de cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ suite à des analyses en cytométrie en flux avec moins de 3 % de cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ selon la population (données non présentées). Les analyses en cytométrie en flux ont été effectuées avec des anticorps monoclonaux anti-souris CD4 conjugués à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (clone H129.19) et avec des anticorps anti-CD8 conjugués à la FITC (clone 53-6.7). Le transfert adoptif de cellules T dans les souris TCR α KOK a été effectué par injection intra-veineuse dans la veine de la queue, un jour avant les greffes de peau. Dans une première expérience, les souris ont été injectées uniquement avec 2x10⁶ cellules T CD8⁺ dans du PBS 1X, puis dans une seconde expérimentation les souris ont été transférées adoptivement avec une solution mixte de 2x10⁶ cellules T CD8⁺ et 10x10⁶ cellules T CD4⁺.

4. Greffes de peau

La peau de queue (1 cm²) de donneurs mâles a été greffée sur le tronc de souris receveuses mâles en utilisant les techniques standards de greffe de peau modifiées (Billingham et Medewar 1951 ; Rosenberg 1991). Les souris ont été anesthésiées avec de la kétamine / xylazine (1/10, v/v ; 0,01 ml/g). Les greffons ont été placés sur le tronc, maintenus en place avec des points de suture 6-0 (CDMV, St-Hyacinthe, QC Canada) et protégés avec un diachylon. Les diachylons ont été enlevés 7 jours après la

transplantation, et les greffes ont été analysées visuellement à tous les jours pour des manifestations du rejet. Les allogreffes ont été considérées complètement rejetées lorsque plus de 90 % de nécrose ou de rétrécissement a été observé.

5. Test de cytotoxicité

L'activité cytotoxique a été mesurée par un test standard de relargage de chrome 51 (^{51}Cr). Les tests de cytotoxicité ont été effectués 14 jours après les greffes de peau. Les concentrations optimales de cellules répondeuses et stimulatrices ont été déterminées préalablement par une expérience de « titration » en testant différents ratios de cellules. Les splénocytes de souris greffées (8×10^6) ont été cultivés avec des cellules stimulatrices (2×10^6), correspondant à des splénocytes irradiés (2000 rad) de même origine que le donneur, dans une plaque de 24 puits pendant 5 jours à $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$. Le milieu de culture utilisé a été du RPMI 1640 (GibcoBRL, Burlington, ON Canada) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (v/v) (FCS) (HyClone, Logan, UT USA), 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicine, 2 mM GlutaMax, 10 mM tampon HEPES, 100 μM MEM non essential amino acids (GibcoBRL, Burlington, ON Canada) et 2×10^{-5} M 2-ME. Les cellules cibles employées ont été les lymphomes T EL4 (H-2^b), les lymphomes de cellules T BW5147 et les cellules BW5147 exprimant H-2 D^p. Les cellules cibles ont été incubées avec 200 μCi de Na_2CrO_4 (^{51}Cr) (ICN, Irvine, CA USA) pendant 1h30 à 37°C avec 5 % CO_2 puis lavées quatre fois avec du RPMI 1640. Différentes concentrations de cellules effectrices ont été incubées avec 1×10^4 cellules cibles pendant 4 heures à $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ dans un volume final de 200 μl . Les surnageants (25 μl) ont été récoltés, transférés dans une plaque flexible et mis en présence de 150 μl de liquide à scintillation Optiphase SuperMix (Wallac, Turku, Finlande). La quantité de chrome relargué dans les surnageants a été déterminée avec un compteur Trilux (Wallac, Turku, Finlande). Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ lyse spécifique} = \frac{\text{relargage expérimental} - \text{relargage spontané}}{\text{relargage maximum} - \text{relargage spontané}}$$

où le relargage spontané a été mesuré en absence de cellules effectrices, remplacées par du milieu de culture, alors que le relargage maximum a été mesuré en présence de 2 % de Triton X-100 au lieu des cellules effectrices. Les valeurs obtenues au dessus de 15 % de lyse spécifique ont été considérées positives.

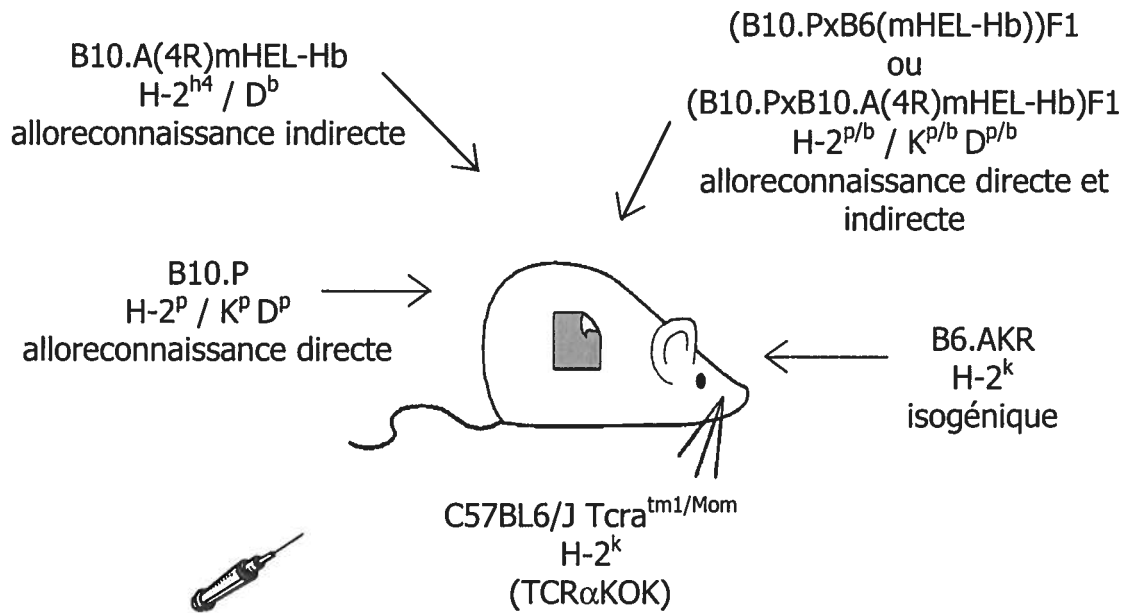
RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les réponses cytotoxiques des cellules T CD8⁺ peuvent être évaluées par un test standard de cytotoxicité avec relargage de chrome 51. Brièvement, ce test consiste à marquer des cellules cibles avec du chrome puis à mettre en présence ces cellules cibles avec des cellules effectrices. S'il y a reconnaissance par les cellules effectrices des cellules cibles, ces dernières vont libérer le chrome dans le surnageant suite à la lyse cellulaire. Les cellules effectrices correspondent à des cellules provenant de la rate de souris greffées (cellules répondeuses) stimulées *in vitro* avec des splénocytes irradiés (cellules stimulatrices) ayant la même origine que le donneur de peau. Le modèle murin de greffe de peau utilisé dans les tests de cytotoxicité avec transfert adoptif de cellules effectrices est illustré à la Figure 11. Les souris TCR α KOK ne peuvent pas induire un rejet de greffe sans transfert adoptif de cellules effectrices, malgré la présence de populations normales de cellules B, de cellules T $\gamma\delta$ et de cellules NK (Mombaerts *et al.* 1994). Les cellules T CD8⁺ injectées dans les souris TCR α KOK vont reconnaître les molécules du CMH de classe I exprimées à la surface des cellules cibles du greffon. Les cellules cibles utilisées dans ces expériences pour étudier la voie indirecte, correspondent aux lymphomes de cellules T EL4, compte tenu que ces cellules possèdent un haplotype H-2^b. Les souris B10.A(4R)mHEL-Hb utilisées pour étudier la voie indirecte expriment la molécule de classe I H-2 D^b. Les cellules T CD8⁺ reconnaissant cet antigène vont lyser les cellules cibles EL4 qui expriment H-2^b. Le lymphome de cellule T BW5147 exprimant H-2 D^p permet, quant à lui, une étude de la voie directe puisque les souris B10.P (voie directe) expriment les molécules de classe I K^pD^p. La lignée cellulaire BW5147 a également été utilisée en tant que contrôle négatif.

1. La spécificité du test de cytotoxicité

La mesure de la lyse cellulaire par un test de cytotoxicité consiste à quantifier le chrome qui se trouve libéré dans le surnageant suite à la destruction des cellules cibles par les cellules effectrices. Au préalable, il y a stimulation des cellules répondeuses

FIGURE 11. Modèle de greffe de peau.

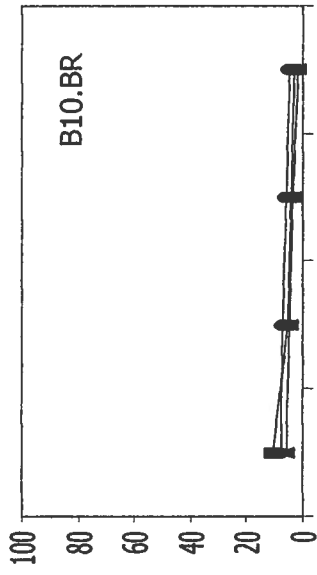


cellules effectrices : cellules T CD8⁺ B6.AKR (H-2^k)
± cellules T CD4⁺ 2.102Tg (H-2^k)

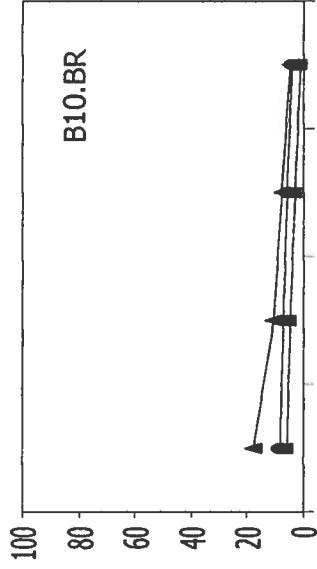
provenant de la rate des souris greffées, afin de les activer et d'augmenter la quantité de cellules effectrices, avec des splénocytes ayant la même origine que celle du donneur (autologue). Par exemple, il y a stimulation des cellules spléniques de souris greffées B10.P avec des splénocytes provenant aussi de souris B10.P. Afin de confirmer que cette stimulation prend place uniquement lorsque les splénocytes provenant des souris greffées se trouvent en présence de splénocytes autologues, nous avons effectué un test de cytotoxicité pour vérifier l'absence de réactions croisées et la spécificité du test lors de la stimulation des cellules effectrices *in vivo*. La réponse cytotoxique des cellules T CD8⁺ a été analysée suite au prélèvement des rates au jour 14 après les greffes de peau sur des souris B10.BR, avec de la peau de queue provenant de trois lignées de souris distinctes : B10.P, B10.A(4R)mHEL-Hb et B10.BR. Le rejet de greffe a été observé, sauf pour les greffes isogéniques, 12 et 13 jours après la transplantation (données non présentées). Ainsi, les rates des souris greffées ont été prélevées au jour 14, une fois les allogreffes de peau rejetées. Pour cette expérience, il y a eu stimulation des cellules répondeuses avec des splénocytes irradiés provenant des trois types de donneur. Par exemple, les splénocytes de souris greffées avec de la peau B10.P ont été stimulés avec des splénocytes irradiés de souris B10.BR, B10.P et B10.A(4R)mHEL-Hb, puis ces cellules effectrices ont été incubées avec les trois lignées cellulaires de cellules cibles (BW5147, BW5147 H-2 D^P et EL4) marquées au ⁵¹Cr. Selon les résultats attendus, une réponse cytotoxique devrait uniquement être observée quand les splénocytes provenant de souris greffées B10.P, préalablement stimulés avec des cellules spléniques B10.P, ont été incubés avec les cellules cibles BW5147 H-2 D^P (Figure 12 – panneau du centre). Les résultats obtenus démontrent effectivement une réponse cytotoxique contre les cellules cibles appropriées (i.e. spécifique) uniquement lorsque les splénocytes des souris greffées ont été stimulés par des splénocytes autologues (Figure 12). De plus, les trois lignées cellulaires (EL4, BW5147 et BW5147 H-2 D^P) ont été utilisées comme cellules cibles, marquées au ⁵¹Cr puis incubées avec les cellules effectrices. À ce niveau également, aucune réaction croisée n'a pu être observée. Ainsi, cette expérience a permis de confirmer que les réponses cytotoxiques obtenues résultent entièrement de la reconnaissance des antigènes spécifiques et non de réactions croisées, validant en conséquence notre test de cytotoxicité.

FIGURE 12. Spécificité des réponses cytotoxiques. La rate de souris B10.BR greffées avec de la peau provenant de souris B10.BR (panneau du haut), B10.P (panneau du centre) ou B10.A(4R)mHEL-Hb (panneau du bas) a été prélevée 14 jours après la transplantation. Les cellules effectrices (mixte des splénocytes des souris) ont été préalablement stimulées *in vitro* avec des splénocytes irradiés provenant de souris B10.BR (carré), B10.P (triangle) ou B10.A(4R)mHEL-Hb (rond). Les cellules effectrices ont ensuite été incubées à différents ratios avec trois lignées de cellules cibles marquées au chrome 51: EL4, BW5147 et BW5147 H-2 D^P.

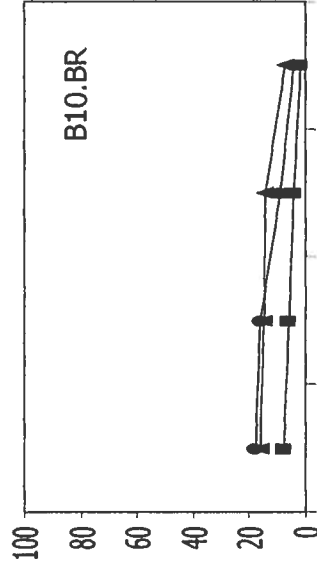
BW5147



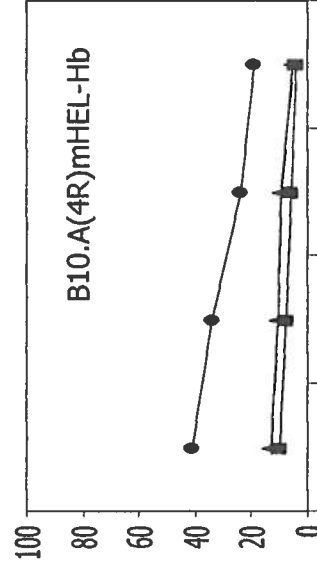
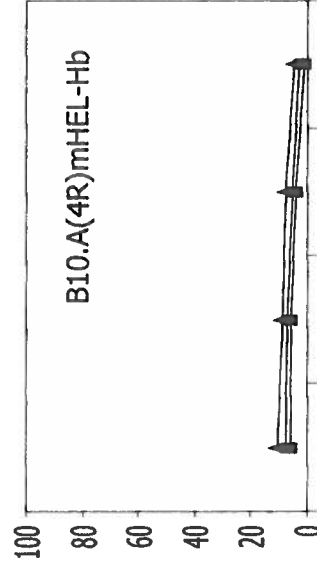
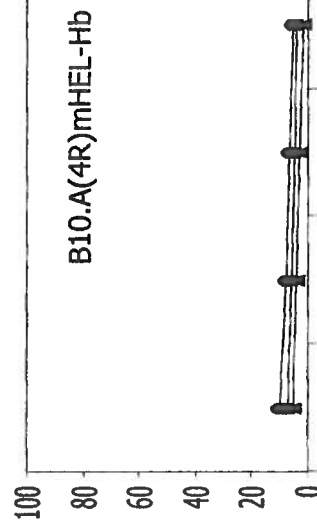
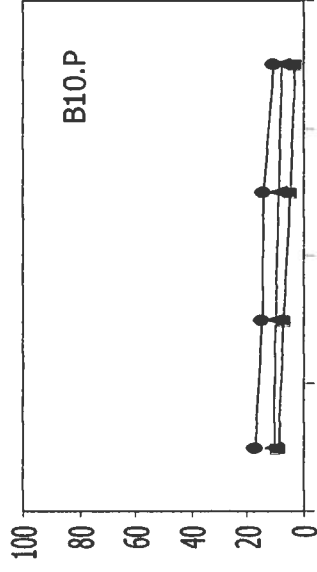
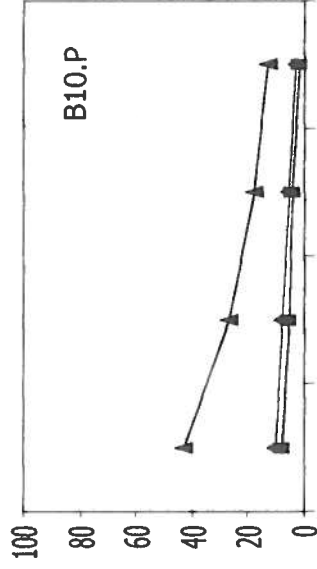
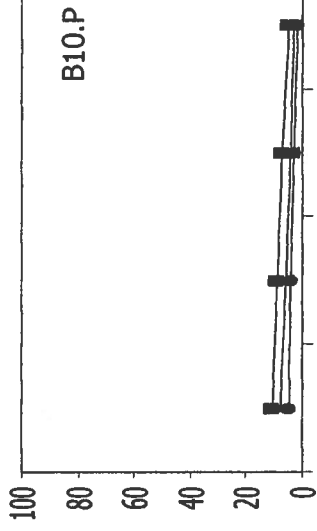
BW5147 H-2 DP



EL4



lyse spécifique (%)

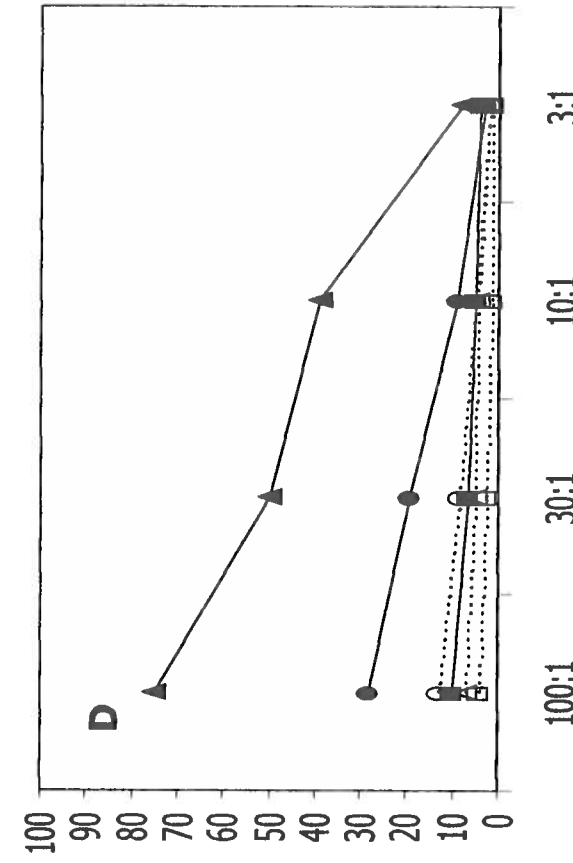
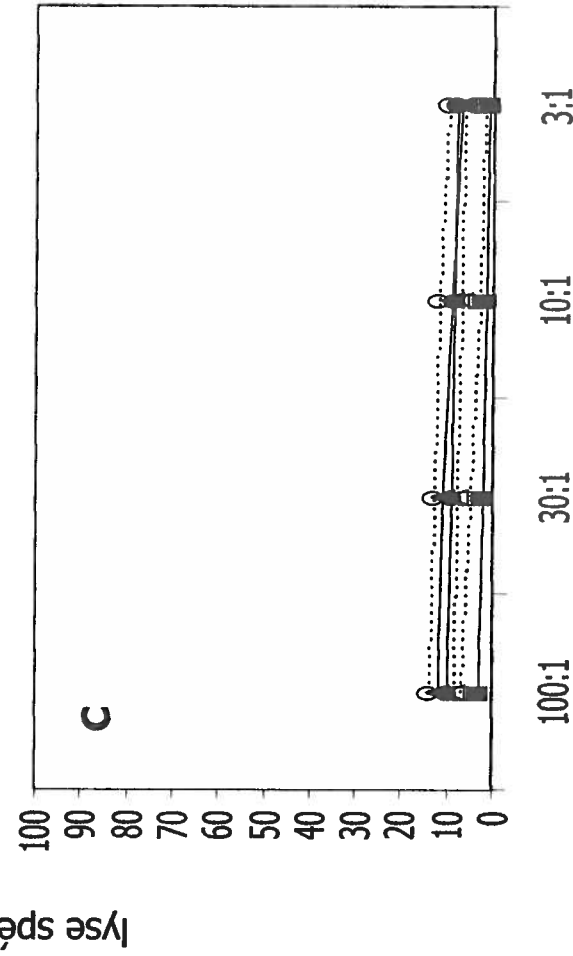
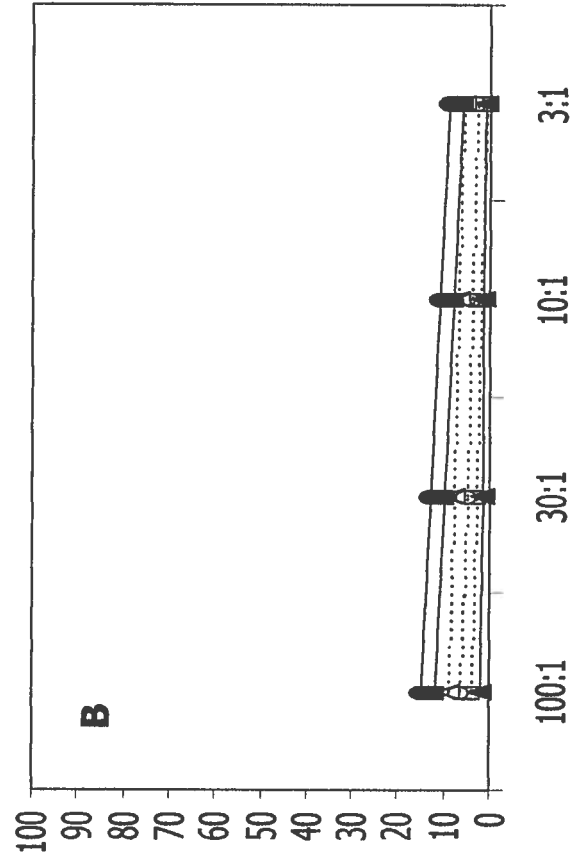
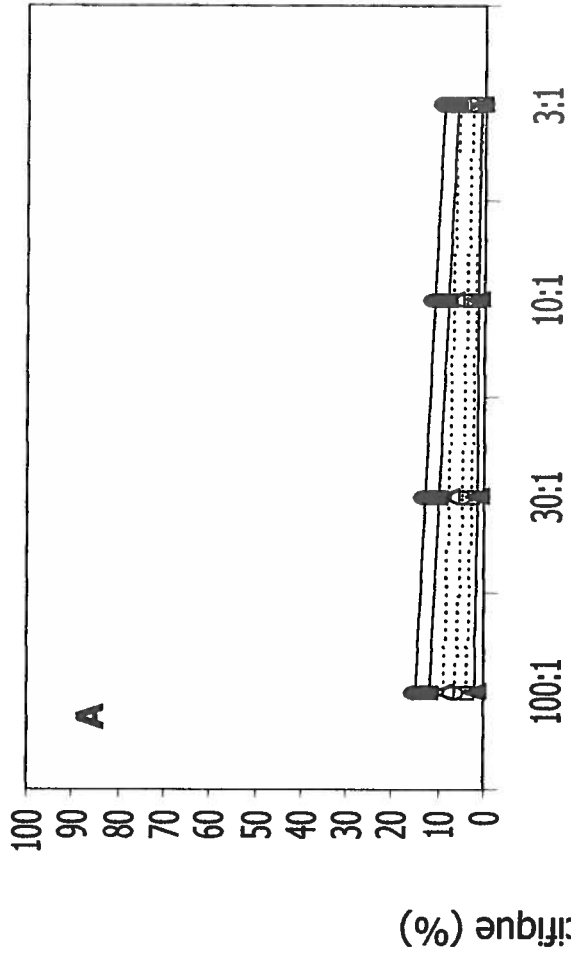


ratio effecteur : cible

2. La réponse des cellules T CD8⁺ est dépendante de la réponse auxiliaire des cellules T CD4⁺

L'expérience suivante a été réalisée afin de voir si les cellules T CD8⁺ peuvent par elles-mêmes induire un rejet des allogreffes de peau et produire une activité cytotoxique sans la présence de cellules T CD4⁺. Effectivement, la littérature souligne qu'il existe des cellules T CD8⁺ indépendantes des cellules T CD4⁺ qui peuvent produire de manière autocrine de l'IL-2 (Shelton *et al.* 1992 ; Deeths *et al.* 1999). Une première série de greffe de peau a été effectuée avec des souris TCR α KOK (H-2^k) suite à un transfert adoptif de 2×10^6 cellules T CD8⁺, provenant de souris B6.AKR (H-2^k), et purifiées avec des billes magnétiques par sélection positive. La quantité de cellules effectrices injectées a été déterminée en fonction des données retrouvées dans la littérature. Suite au transfert adoptif, deux souris TCR α KOK ont été greffées par groupe de donneur. La rate des souris greffées a été prélevée 14 jours après la transplantation. À ce moment, aucune caractéristique du rejet (nécrose ou rétrécissement) n'a été observée (données non présentées). Aucune lyse spécifique n'a été observée pour les souris greffées B6.AKR comme prévu puisqu'il s'agit de greffe isogénique (Figure 13A). Il est également possible de constater dans les panneaux B et C de la Figure 13 l'absence de lyse des cellules cibles par les cellules effectrices autant pour les souris greffées par la voie directe (B10.P) que par la voie indirecte (B10.A(4R)mHEL-Hb). Cette absence de réponse cytotoxique suite au transfert de cellules T CD8⁺ seules tend à confirmer la nécessité des cellules T CD4⁺, qui sécrètent des cytokines essentielles pour une activation des lymphocytes T cytotoxiques. En effet, il a été démontré que des cellules T alloréactives enrichies de CTL étaient incapables d'induire un rejet d'allogreffe (Gurley *et al.* 1983 ; Lowry et Gurley 1983). Par ailleurs, suite à des greffes de peau de type F1, une des deux souris de ce groupe démontre une lyse spécifique contre les cellules EL4 (voie indirecte) et contre les cellules BW5147 H-2 D^p (voie directe) (Figure 13D). Cette cytotoxicité diminue en fonction du ratio effecteur : cible, et aucune réponse cytotoxique n'est détectée lorsque les cellules effectrices se trouvent mises en présence des cellules cibles BW5147. De plus, une stimulation des splénocytes avec des cellules spléniques non homologues au donneur n'a pas induit de réponse cytotoxique confirmant l'absence de

FIGURE 13. Test de cytotoxicité suite à un transfert adoptif de cellules T CD8⁺ seules. Des souris TCR α KOK ont été greffées suite au transfert adoptif de 2x10⁶ cellules T CD8⁺ provenant de souris B6.AKR. Les cellules répondeuses provenant de la rate des souris greffées ont été stimulées *in vitro* avec des splénocytes irradiés. Les cellules effectrices ont ensuite été mises en présence de différentes cellules cibles marquées au ⁵¹Cr : EL4 (rond), BW5147 (carré) ou BW5147 H-2 D^p (triangle). Chaque série de lignes (pleine ou pointillée) représente une souris. (A) souris greffées B6.AKR (greffe isogénique) (B) souris greffées B10.P (voie directe) (C) souris greffées B10.A(4R)mHEL-Hb (voie indirecte) et (D) souris greffées (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 (voie directe et indirecte).



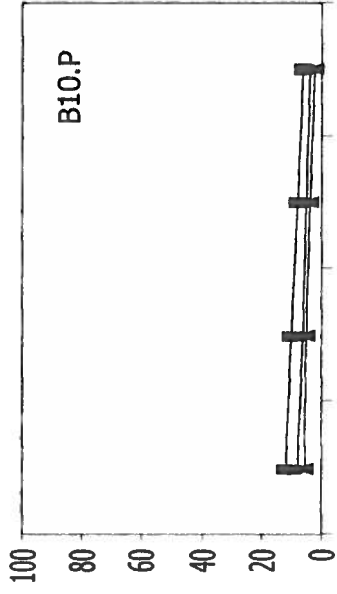
réactions croisées (données non présentées). Étant donné que cette expérience n'a été effectuée qu'à une seule reprise et que seulement deux souris composaient chaque groupe, il est nécessaire de refaire des greffes de peau avec un transfert adoptif de cellules T CD8⁺ seulement. Le prélèvement des rates des souris TCR α KOK au jour 14 peut également influencer les réponses cytotoxiques obtenues, il serait ainsi intéressant de sacrifier les souris à différents temps. Les rates ont été prélevées 14 jours post transplantation, puisque généralement on retrouve une forte réponse cytotoxique deux semaines suivants la greffe. De plus, les souris ont également été sacrifiées 14 jours après la transplantation, au moment du rejet des allogreffes, dans le test de cytotoxicité portant sur la spécificité des réponses décrit précédemment (section 1). En lien avec les résultats obtenus, il est permis de penser compte tenu des données retrouvées dans la littérature, que les cellules T CD8⁺ par elles-mêmes ne peuvent pas induire un rejet des allogreffes de peau en absence de cellules T CD4⁺.

3. Modulation de l'activité cytotoxique de cellules T CD8⁺ par des cellules T CD4⁺

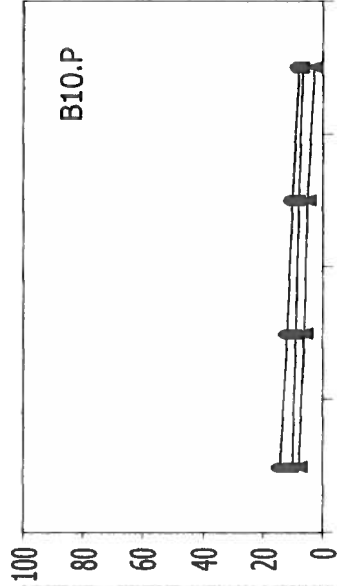
La modulation des cellules T cytotoxiques CD8⁺ par des cellules T auxiliaires CD4⁺ suite à une activation par les voies directe et indirecte n'a pas encore été étudiée. À partir de notre modèle murin de greffe de peau, nous avons effectué un transfert adoptif de 2×10^6 cellules T CD8⁺ provenant de souris B6.AKR et de 10×10^6 cellules T CD4⁺ provenant de souris 2.102Tg. Les souris TCR α KOK ont été greffées le lendemain, et les groupes de souris étaient composés de trois à quatre souris par groupe. Le rejet des allogreffes a été constaté pour trois des quatre souris greffées F1 au moment du prélèvement de la rate, soit 14 jours après les greffes de peau, alors qu'une seule souris avait rejeté par la voie indirecte. Aucun rejet n'a été observé chez les souris greffées avec de la peau B10.P (voie directe) (données non présentées). Suite aux analyses, aucune activité cytotoxique n'a été détectée pour les souris greffées avec de la peau provenant de souris B10.P (voie directe) contre les cellules BW5147 H-2 D^p (Figure 14 – panneau du haut). Une seule des quatre souris greffées par la voie indirecte (B10.A(4R)mHEL-Hb) a présenté une réponse cytotoxique spécifique contre les cellules

FIGURE 14. Modulation de l'activité cytotoxique par des cellules T CD4⁺. Un test de cytotoxicité avec relargage de ⁵¹Cr a été effectué avec des souris TCRαKOK ayant été injectées suite à un transfert adoptif de 2x10⁶ cellules T CD8⁺ provenant de souris B6.AKR et de 10x10⁶ cellules T CD4⁺ provenant de souris 2.102Tg. La rate des souris TCRαKOK greffées avec de la peau provenant de souris B10.P (panneau du haut), B10.A(4R)mHEL-Hb (panneau du centre) ou (B10.PxB10.A(4R)mHEL-Hb)F1 (panneau du bas) a été prélevée 14 jours après la transplantation. Les cellules effectrices préalablement stimulées *in vitro* ont été incubées avec trois lignées de cellules cibles marquées au ⁵¹Cr. Chaque série de lignes représente une souris individuelle.

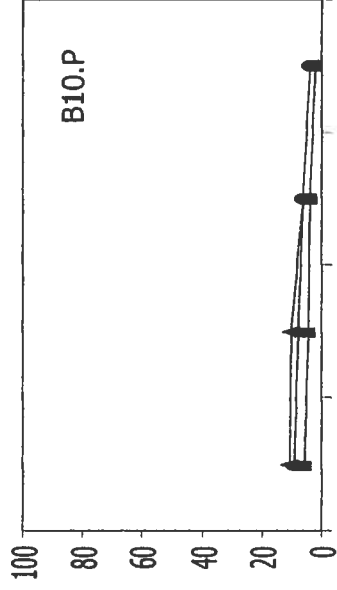
BW5147



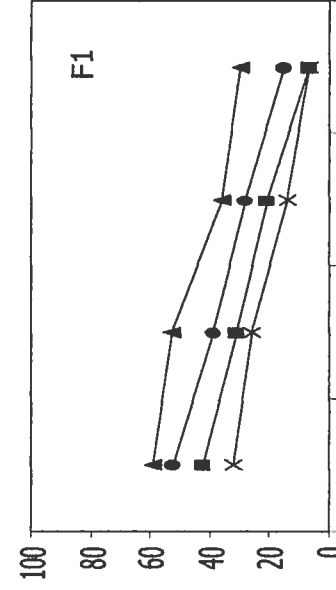
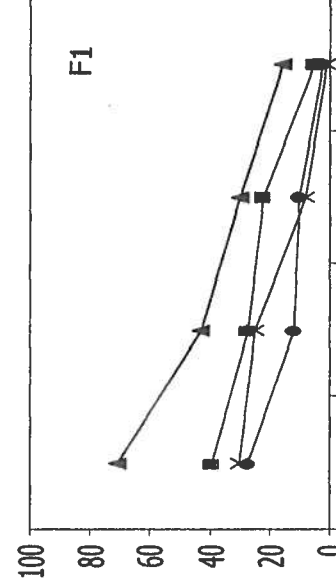
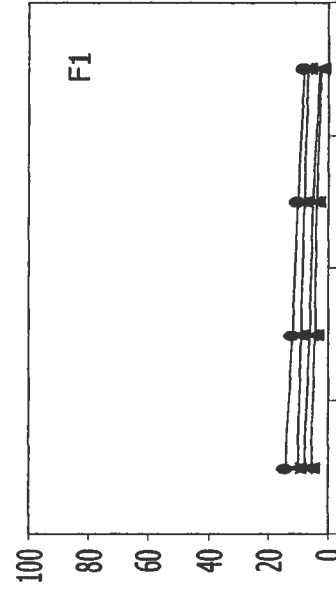
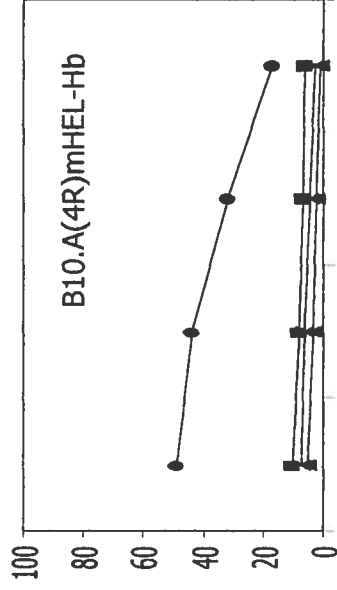
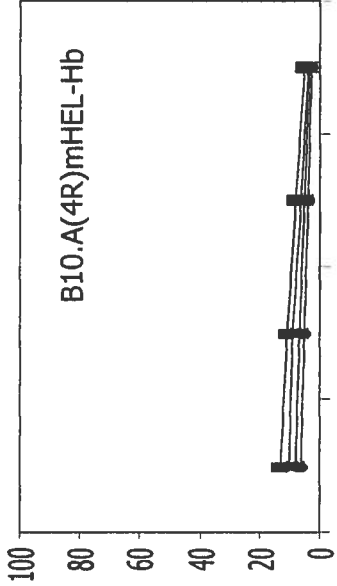
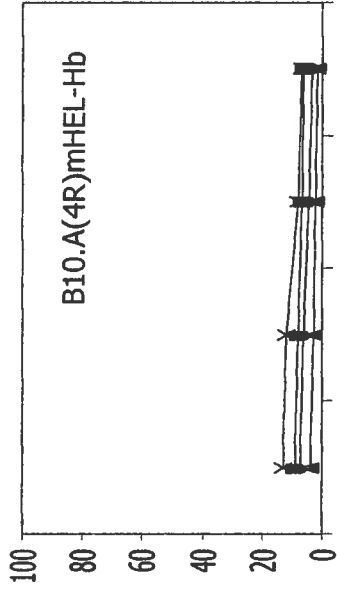
BW5147 H-2 D^p



EL4



lyse spécifique (%)



ratio effecteur : cible

EL4 (Figure 14 – panneau du centre). Des réponses cytotoxiques, suite à une lyse spécifique des cellules cibles BW5147 H-2 D^P pour les souris greffées B10.P (voie directe) ou EL4 pour les souris greffées B10.A(4R)mHEL-Hb (voie indirecte), étaient attendues. Cette absence de cytotoxicité résulte peut-être du fait que le prélèvement de la rate a été effectué 14 jours après les greffes de peau. Effectivement, une seule souris du groupe indirecte avait rejeté son greffon au jour 14. En général, un transfert adoptif de cellules T CD4⁺ seules induit un rejet des allogreffes de peau entre les jours 14 et 18 après la transplantation (voir article scientifique – Figure 6). Une cinétique de rejet plus rapide était attendue compte tenu du transfert de cellules effectrices CD4⁺ et CD8⁺. Toutefois, puisque le sacrifice des souris a été fait au jour 14, il est impossible de tracer une courbe de survie complète et de comparer les temps de rejet adéquatement. Par contre, toutes les souris TCR α KOK greffées avec de la peau F1 démontrent une lyse spécifique contre les cellules cibles BW5147 H-2 D^P utilisées pour étudier les réponses au niveau de la voie directe d'alloréactivité, et démontrent également une réponse spécifique au niveau de la voie indirecte suite à la lyse des cellules EL4 (Figure 14 – panneau du bas). À l'opposé, une seule souris greffées F1 sur deux avait démontré une activité cytotoxique lors du transfert adoptif de cellules T CD8⁺ seules (Figure 13). La combinaison des voies directe et indirecte (F1) semble amener une plus grande immunogénicité, compte tenu que seulement les souris greffées avec de la peau de souris F1 démontrent une activité cytotoxique. Effectivement, au moment du prélèvement de la rate les souris TCR α KOK avaient toutes rejeté leur greffe, contrairement aux autres groupes de souris, ce qui diffère de la cinétique de rejet obtenue suite à un transfert adoptif de cellules T CD4⁺ seules où aucune différence significative n'existe entre les groupes. De plus, malgré le fait que l'activité cytotoxique des souris greffées ayant seulement reçu des cellules T CD4⁺ n'a pas été observée, la lyse cellulaire observée dans ces expériences devrait résulter uniquement des cellules T CD8⁺, puisque les cellules cibles utilisées dans le test de cytotoxicité représentent des cibles spécifiques pour les cellules T CD8⁺ et ne correspondent pas aux mêmes antigènes reconnus par les cellules T CD4⁺. En somme, la réponse cytotoxique semble nécessiter les cellules T CD4⁺ pour une activation des CTL impliquées dans le rejet des allogreffes de peau.

CONCLUSION

Les résultats obtenus tendent à démontrer la nécessité des cellules T CD4⁺ pour une activation de la réponse cytotoxique des cellules T CD8⁺ suite à des allogreffes de peau. Plusieurs études supportent ce fait. La modulation des réponses cytotoxiques par les cellules T auxiliaires CD4⁺ au niveau des voies alloréactives directe et indirecte reste cependant à définir plus clairement. Les résultats obtenus suite au transfert adoptif de cellules T CD8⁺ seules puis de cellules T CD4⁺ et de cellules T CD8⁺ combinées confirment la nécessité des cellules T CD4⁺ pour une induction des réponses cytotoxiques. Les données suggèrent également que la combinaison des deux voies alloréactives amène une plus grande immunogénicité pour une activation des réponses cytotoxiques que lors du rejet uniquement par la voie directe ou la voie indirecte. Il est donc permis de suggérer que les voies alloréactives directe et indirecte puissent toutes deux être impliquées dans les réponses cytotoxiques des cellules T CD8⁺ suite à une activation des cellules T CD4⁺. Ainsi, il est nécessaire de poursuivre les études à ce niveau pour confirmer les résultats obtenus. De plus, la modulation des cellules T CD8⁺ suite à une activation des cellules T CD4⁺ par la voie directe ou par la voie indirecte n'avait pas encore été examinée dans un modèle expérimental adéquat. Des expériences avec un plus grand nombre de souris par groupe devraient être effectuées suite au transfert adoptif de cellules T CD8⁺. Il serait également intéressant de prélever la rate des souris greffées à différents temps pour voir si ce paramètre influence les résultats des tests de cytotoxicité, entre autres, en fonction du type de donneur. La littérature souligne que les cellules T cytotoxiques représentent des médiateurs importants dans les processus impliqués dans le rejet des allogreffes. Une étude des réponses cytotoxiques et de la modulation de ces cellules devient ainsi intéressante tant pour une amélioration des connaissances sur les mécanismes impliqués dans le rejet des greffes mais aussi pour connaître la contribution des voies alloréactives directe et indirecte dans les réponses cytotoxiques.

DISCUSSION / CONCLUSION

Le rejet de greffe représente encore aujourd'hui la principale complication suite à une transplantation, malgré le développement de nouvelles thérapies immunosuppressives. Les connaissances sur la contribution réelle des voies alloréactives directe et indirecte au niveau du rejet de greffe suite à une allorecognition des molécules du CMH allogéniques demeurent incomplètes. La disponibilité de modèles expérimentaux permettant la dissection des rôles exacts de chacune des voies dans le rejet des allogreffes est problématique. Effectivement, la caractérisation des cellules T CD4⁺ activées par la voie indirecte de présentation suite à une allorecognition des peptides antigéniques est limitée. Cette limitation résulte de la faible fréquence des cellules T qui répondent indirectement aux peptides présentés par des CPA, tout comme elle résulte de la multitude des antigènes présents sur les cellules du greffon où ces antigènes correspondent tous à des sources peptidiques pouvant être présentées par des CPA (Smith *et al.* 2001). Il a été en réalité démontré, en se basant sur un modèle de greffe de peau, que les cellules T qui reconnaissent des peptides dérivant du donneur et présentés par la voie indirecte comptent pour moins de 10 % de la population lymphocytaire alloréactive totale (Benichou *et al.* 1999).

Notre laboratoire a développé un modèle murin de rejet de greffe de peau unique qui permet justement une étude des voies alloréactives directe et indirecte à partir de lignées de souris transgéniques. Le clone de cellule T CD4⁺ 2.102 possède une alloréactivité directe contre la molécule de classe II allogénique I-E^p, et possède également une alloréactivité indirecte restreinte à l'épitope immunodominant Hb(64-76) présenté en association avec la molécule de classe II I-E^k. La cellule 2.102 fournit donc une opportunité unique pour étudier les voies directe et indirecte via un seul clonotype de cellule T. L'utilisation d'une telle population cellulaire transgénique permet de limiter la diversité du répertoire de cellules T comparativement aux autres modèles expérimentaux. Nous avons utilisé un système de transfert adoptif avec purification de cellules effectrices puis effectué des greffes de peau sur des souris TCR α KOK. Ces souris TCR α KOK ne possèdent pas de cellules T périphériques CD4⁺ ou CD8⁺ TCR $\alpha\beta$, et se trouvent alors incapables de rejet de greffe malgré la présence de populations normales de cellules B, de cellules T $\gamma\delta$ et de cellules NK (Mombaerts *et al.* 1992 ; Mombaerts *et al.* 1994). Le

transfert adoptif de cellules T CD4⁺ purifiées provenant de souris 2.102Tg, en tant que cellules effectrices, va entièrement être responsable du rejet de greffe observé. Enfin, en plus de permettre une meilleure compréhension des mécanismes responsables du rejet des tissus et des organes greffés, un tel modèle innovateur serait utile pour le développement de nouvelles thérapies immunosuppressives spécifiques aux voies alloréactives.

Préalablement, notre laboratoire a démontré *in vitro* que la cellule T 2.102 reconnaît les alloantigènes H-2^P (splénocytes B10.P) seulement par la voie directe, alors que les antigènes mHEL-Hb sont uniquement reconnus par la voie indirecte (Figure 4). Cette expérience a permis de confirmer la spécificité des réponses de la cellule T 2.102 dans notre modèle murin de greffe de peau. De plus, il a aussi été important de vérifier que les cellules T CD4⁺ ne proliféraient pas suite à la purification des splénocytes provenant des souris 2.102Tg ou encore suite au transfert adoptif dans les souris TCR α KOK. La prolifération des cellules effectrices doit résulter uniquement du rejet de la greffe et non de la préparation ou de la manipulation des cellules T CD4⁺. Des études récentes ont démontré une prolifération homéostatique de cellules T naïves suite au transfert de ces cellules, entre autres, dans des souris hôtes immunosupprimées (Ernst *et al.* 1999 ; Viret *et al.* 1999). En effet, il a été démontré que des cellules T naïves pouvaient subir une prolifération homéostatique et acquérir des fonctions effectrices comme la capacité à produire de l'IFN- γ suite au transfert adoptif (Goldrath *et al.* 2000). Afin de déterminer si le transfert adoptif dans les souris TCR α KOK induisait la prolifération homéostatique des cellules T CD4⁺ 2.102Tg purifiées, nous avons utilisé le bromodeoxyuridine (BrdU) et mesuré son incorporation dans les cellules T CD4⁺. Le BrdU correspond à un analogue de base (thymidine) qui s'incorpore dans l'ADN, et qui permet de mesurer la prolifération cellulaire par cytométrie en flux grâce à un anticorps dirigé contre le BrdU (Gratzner 1982 ; Dolbeare *et al.* 1983).

Aucune population cellulaire positive pour une incorporation au BrdU (CD4⁺BrdU⁺) n'est présente au niveau des cellules de la rate (Figure 5A) et des ganglions à différents temps (jour 0 au jour 18) après le transfert adoptif de 10x10⁶ cellules T CD4⁺ 2.102Tg. Cette absence de population positive pour le BrdU indique donc que les cellules

ne prolifèrent pas suite au transfert adoptif. Afin de confirmer une absence d'activation des cellules suite au transfert adoptif, la régulation à la hausse de CD25, un marqueur d'activation exprimé sur les cellules T activées, a également été analysé. Ainsi, aucune population positive exprimant CD25 ($CD4^+CD25^+$) ne se retrouve dans la rate des souris TCR α KOK suite au transfert adoptif (Figure 5B). Ainsi, il n'y a pas d'activation des cellules T $CD4^+$ suite au transfert dans les souris. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau des ganglions, et suite au marquage avec des anticorps dirigés contre CD62L (données non présentées). Par conséquent, il y a une absence de prolifération homéostatique des cellules T $CD4^+$. En somme, les résultats indiquent que la population de cellules T $CD4^+$ transférée demeure naïve, et que la prolifération et l'activation de ces cellules effectrices résultent entièrement du rejet de la greffe de peau et non de la purification ou du transfert adoptif des cellules T $CD4^+$. Ces données confirment également « la validité » de notre modèle de greffe de peau ainsi que la légitimité des résultats subséquents.

La partie suivante présente la discussion des résultats obtenus dans le cadre du premier objectif de recherche, soit étudier les fonctions des cellules T $CD4^+$ au niveau de la production en anticorps dans un modèle de greffe de peau basé sur la cellule 2.102. La réponse de la cellule T 2.102 engendrée suite à une activation par les voies alloréactives directe et indirecte a premièrement été évaluée avec la cinétique de rejet de greffe, suite à des greffes de peau sur des souris TCR α KOK. Aucun délai significatif n'a été observé dans la cinétique du rejet de greffe entre les différents groupes de donneur de peau (directe, indirecte ou directe et indirecte combinées) suite à un transfert adoptif de 10×10^6 cellules T $CD4^+$ provenant de souris 2.102Tg. Effectivement, le rejet a eu lieu pour les trois groupes entre les jours 14 et 18 après la transplantation (Figure 6). Ce résultat contraste avec des études démontrant que le rejet de greffe de peau par des cellules T $CD4^+$ activées, en absence de cellules T $CD8^+$, par la voie indirecte est retardé comparativement à des greffes complètement allogéniques (Auchincloss *et al.* 1993 ; Lee *et al.* 1997 ; Sawada *et al.* 1997). Wecker *et al.* (1995) et Dalloul *et al.* (1996) ont aussi étudié la voie indirecte en effectuant des greffes sur des souris SCID disparates pour des molécules du CMH de classe I ou sur des souris nues (nude) athymique avec de la peau

provenant de souris déficientes pour les molécules du CMH de classe II. Les expériences dans les deux cas concluent que la voie indirecte peut engendrer un rejet des allogreffes mais que le rejet est retardé, et même parfois non visible au niveau phénotypique, en comparaison avec un rejet qui résulte de cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ répondant à des alloantigènes présentés par la voie directe. Par contre, il a été également démontré que suite à une activation indirecte des cellules T avec des allopeptides du CMH de classe II provenant du donneur, la cinétique du rejet des allogreffes cardiaques chez des rats Lewis pouvait être accélérée (Vella *et al.* 1999).

Ainsi, cette absence de différence significative entre les cinétiques de rejet par les voies directe et indirecte suggère qu'il n'y a pas de différence entre les mécanismes responsables de l'activation des cellules T. À notre connaissance, il s'agit de la première fois que ces questions sont abordées avec une population quasi clonotypique de cellules T pouvant être activées indépendamment par les deux voies alloréactives. Une telle population cellulaire nous permet d'étudier le rejet de greffe avec un répertoire limité de cellules T. Les différences observées au niveau des autres modèles dans la cinétique de rejet peuvent en conséquence résulter de différence dans la fréquence de précurseur entre les voies directe et indirecte. De plus, la similitude dans la cinétique de rejet de greffe entre la voie directe et la voie indirecte suggère que les mécanismes effecteurs de la voie indirecte sont suffisants et hautement efficaces pour initier le rejet des allogreffes de peau, lorsque donneur et receveur diffèrent uniquement au niveau d'un seul épitope immunodominant. Nos résultats confirment les travaux réalisés antérieurement par différentes équipes qui ont montré l'importance de la réactivité des cellules T contre des allopeptides présentés par la voie indirecte dans le rejet des allogreffes (Fangmann *et al.* 1992 ; Liu *et al.* 1993a ; Lee *et al.* 1997). Par exemple, il a été démontré par Valujskikh et collaborateurs (1998) que des cellules T alloréactives contre un unique allopeptide immunodominant restreint au soi (I-A β^k 58-71) induisent le rejet de greffe chez des souris BALB/c SCID greffées avec de la peau B10.A.

La réponse humorale engendrée suite au rejet des allogreffes a été étudiée en analysant la production en anticorps dans les sérums des souris TCR α KOK greffées suite à un transfert adoptif de 10×10^6 cellules T CD4⁺ de souris 2.102Tg. Une relation a été établie dans de nombreuses études entre les voies alloréactives et la production en anticorps par les cellules B contre des alloantigènes (Hall 1991 ; Steele *et al.* 1996 ; Kelly *et al.* 1997). Pour étudier la réponse humorale contre des antigènes spécifiques au donneur, au niveau de notre modèle murin de rejet de greffe, nous avons testé la production en alloanticorps par les cellules B du receveur par cytométrie en flux en utilisant les lignées cellulaires BW5147 exprimant H-2 D^p ou mHEL-Hb. Les greffes de peau effectuées sur des souris TCR α KOK en absence de transfert adoptif de cellules effectrices T CD4⁺ ne présentent pas de signes caractéristiques du rejet ni aucune réponse en anticorps. Cette absence de rejet de greffe confirme le fait que ces souris ne peuvent pas rejeter une allogreffe de peau même en présence de cellules B, de cellules T $\gamma\delta$ et de cellules NK. De plus, la nécessité des cellules T CD4⁺ pour permettre une production en IgG spécifiques au donneur est confirmée par cette incapacité des souris TCR α KOK à produire une réponse en IgG sans transfert adoptif de cellules T CD4⁺. Effectivement, Auchincloss *et al.* (1988) ont démontré que la déplétion des cellules T CD4⁺ inhibe le développement des alloanticorps dans les souris greffées avec de la peau, après avoir testé les titres en anticorps dans les sérums trois semaines après les allogreffes.

Toutefois, une réponse en anticorps IgG spécifiques aux cellules BW5147 exprimant mHEL-Hb a été observée au niveau des souris ayant rejeté leur greffe par la voie indirecte (B6(mHEL-Hb)) suite au transfert adoptif de 10×10^6 cellules T CD4⁺ 2.102Tg (Figures 7A et 8). De plus, aucune production (non spécifique) contre les cellules contrôles BW5147 ou les cellules BW5147 H-2 D^p n'a été observée. Il a été démontré dans des études précédentes que la voie indirecte de présentation joue un rôle majeur dans la production en alloanticorps suite à des allogreffes de peau (Fangmann *et al.* 1992). De plus, il a été également établi que les cellules T CD4⁺ reconnaissant des peptides provenant du donneur via la voie indirecte, pouvaient fournir efficacement une aide pour la production en alloanticorps dans le rejet de greffe de peau chez la souris (Steele *et al.* 1996). Cependant, une des observations intéressantes de notre étude est le

fait qu'aucune production en anticorps IgG spécifiques à H-2 D^P n'a été observée chez les souris TCR α KOK ayant rejeté leur allogreffe de peau par la voie directe (B10.P) (Figures 7B et 8). Par conséquent, malgré des cinétiques de rejet des allogreffes similaires entre la voie directe et la voie indirecte, la production en alloanticorps IgG spécifiques au donneur est strictement confinée à la voie alloréactive indirecte. Il y a une absence de réponse en anticorps dans la voie directe même si les souris B10.P utilisées pour étudier la voie directe expriment des molécules de classe II I-E^P que la cellule T 2.102 reconnaît directement. Tel que mentionné auparavant, la fréquence de précurseurs des cellules T qui reconnaissent directement des molécules du CMH allogéniques est extrêmement élevée avec 1 % à 10 % des cellules T périphériques qui répondent à un alloantigène particulier. Ainsi, avec une telle fréquence de précurseur, l'absence de réponses en anticorps IgG par la voie directe peut étonner. Toutefois, les cellules T CD4⁺ ne se trouvent pas restreintes par les mêmes molécules du CMH dans la voie directe et dans la voie indirecte, ce qui pourrait expliquer possiblement cette différence dans la réponse en anticorps.

Une explication également possible de cette absence de réponse en IgG au niveau de la voie directe est une absence d'immunogénicité des antigènes H-2^P. Par conséquent, nous avons généré des souris exprimant les alloantigènes H-2^P et mHEL-Hb (souris F1). Les résultats obtenus démontrent une production en alloanticorps IgG chez les souris TCR α KOK greffées avec de la peau provenant des souris F1. Cette réponse en anticorps IgG est spécifique aux alloantigènes des deux voies, c'est-à-dire H-2 D^P et mHEL-Hb (Figure 8). Ces résultats indiquent que l'absence de production en IgG dans la voie directe ne résulte pas d'une absence d'immunogénicité des antigènes H-2^P. Par conséquent, il y a une absence de production en alloanticorps par les cellules B uniquement dans la voie directe. De plus, ces résultats suggèrent que la production en alloanticorps contre des alloantigènes spécifiques via la voie directe requiert une aide des cellules T CD4⁺ activées par la voie indirecte d'allorecognition. En général, ces données confirment le rôle important des cellules T CD4⁺ activées par la voie indirecte dans la production en alloanticorps par les cellules B.

Par ailleurs, il a été montré avec des souris hôtes déficientes pour les molécules de classe II du CMH que la stimulation des cellules T CD4⁺ par la voie directe pouvait engendrer uniquement une production en alloanticorps de type IgM mais pas de réponse en IgG (Steele *et al.* 1996). À notre grande surprise, aucune réponse en anticorps IgM n'a été détectée 18 jours après les greffes de peau, et ce peu importe la voie alloréactive étudiée, même à des dilutions de sérums aussi faible que 1/25 (Figure 8). En fait, les titres en alloanticorps IgM équivalaient aux titres obtenus lors des greffes de peau isogéniques (B6.AKR). La littérature a démontré qu'il y a au préalable une production en anticorps de type IgM par les cellules B du receveur puis une commutation isotypique en IgG qui requiert la présence des cellules T CD4⁺ (Steele *et al.* 1996). Par exemple, Bishop *et al.* (1994) ont démontré, en utilisant des souris hôtes pour des allogreffes cardiaques préalablement traitées avec un AcMo anti-CD4 GK1.5, la nécessité des cellules T CD4⁺ pour la commutation isotypique de IgM à IgG mais pas pour l'induction des réponses primaires en IgM. Toutefois, ce groupe de chercheurs a également démontré que les titres en alloanticorps IgM ne pouvaient plus être détectés 21 jours après la transplantation. Par conséquent, il est possible que la présence des anticorps IgM n'est pas été détectable dans les sérums 18 jours après la transplantation au moment où les souris ont été sacrifiées. Il serait donc intéressant de saigner les souris TCR α KOK greffées à différents temps (jour 7 et jour 11) pour voir s'il est possible de détecter une réponse spécifique en alloanticorps IgM comme attendu, puisque les IgM représentent les premiers anticorps produits par les cellules B en réponse à des alloantigènes, et voir s'il y a une production en IgM dans la voie directe tel que mentionné dans la littérature.

La caractérisation de la réponse en alloanticorps IgG a subséquentement été étudiée en déterminant le profil de distribution des isotypes spécifiques au donneur. Les différents isotypes IgG produits par les cellules B des souris TCR α KOK greffées, suite à un transfert adoptif de 10×10^6 cellules T CD4⁺, ont été analysés par cytométrie en flux contre des splénocytes exprimant H-2^P ou mHEL-Hb. Les sérums provenant des souris greffées B10.P (voie directe) ne contiennent pas d'isotypes IgG spécifiques à H-2^P, tel qu'attendu en fonction des résultats précédemment obtenus. Les souris TCR α KOK ayant rejeté leur allogreffe par la voie indirecte (B6(mHEL-Hb)) produisent des alloisotypes

spécifiques à mHEL-Hb de type IgG1, IgG2a, IgG2b et une faible quantité de IgG3, mais ne produisent aucun anticorps contre les splénocytes exprimant H-2^P. Quant aux souris TCR α KOK ayant rejeté leur allogreffe de peau par les deux voies alloréactives (F1), ces dernières produisent des alloisotypes IgG1, IgG2a et IgG2b spécifiques à H-2^P et à mHEL-Hb (Figure 9). Ainsi, aucun patron isotypique distinct ne ressort entre les groupes de souris produisant des anticorps. Les réponses en anticorps se comparent donc suite à une alloreconnaissance par la voie indirecte seulement (B6(mHEL-Hb)) ou suite à une combinaison de la voie alloréactive directe et indirecte (F1).

Il est reconnu chez les souris que l'IFN- γ , une cytokine de type Th1, stimule une production de IgG2a alors que l'IL-4 sécrétée par les cellules Th2 stimule la réponse en isotype IgG1 (Finkelman *et al.* 1990 ; Thai *et al.* 1995). Tel que mentionné précédemment nos résultats démontrent une production similaire en isotypes IgG spécifiques à mHEL-Hb après une sensibilisation par les voies directe et indirecte combinées ou par la voie indirecte seule. Nous aurions pu conclure que les cellules T CD4⁺ activées par la voie directe se différenciaient vers un phénotype distinct et modulaient ainsi la différenciation des cellules T CD4⁺ spécifiques à mHEL-Hb, si une différence dans les isotypes avait été observée entre la voie indirecte et les deux voies ensemble. Par contre, compte tenu des résultats obtenus il est alors possible de spéculer que dans notre modèle murin, il ne semble pas y avoir de tendance en ce qui concerne la différenciation en réponses Th1 et Th2 entre les deux voies. Effectivement, les patrons isotypiques sont comparables suite à une sensibilisation par la voie directe et par la voie indirecte.

Par ailleurs, il est possible que l'absence de réponse humorale dans les souris greffées avec de la peau B10.P (voie directe) puisse résulter du nombre limitant de cellules T CD4⁺, alors que les réponses spécifiques à mHEL-Hb (voie indirecte) nécessiteraient un moins grand nombre de cellules effectrices. Par conséquent, nous avons testé si le transfert adoptif de différentes quantités de cellules T CD4⁺ provenant de souris 2.102Tg pouvait affecter la cinétique de rejet et la production en alloanticorps. Or, les expériences effectuées avec un nombre variable de cellules effectrices ont révélé

une absence de rejet aigu des allogreffes de peau après un transfert adoptif de $2,5 \times 10^6$ cellules T CD4⁺ (Tableau I). Néanmoins, ces souris ont produit des titres en anticorps équivalents à ceux détectés dans les sérums des souris injectées avec 10×10^6 ou 15×10^6 cellules T CD4⁺ (Figure 10). Il n'y a pas de différence significative entre les réponses en IgG suite à un transfert adoptif de $2,5 \times 10^6$ cellules T CD4⁺, malgré une absence de rejet aigu des allogreffes 45 jours après la transplantation.

Nous avons observé, dans les souris TCR α KOK injectées avec $2,5 \times 10^6$ cellules T CD4⁺, une production d'anticorps dans la voie indirecte. Ainsi, aucune corrélation évidente n'a pu être tirée entre les titres des alloanticorps présents dans les sérums et le temps moyen de survie des allogreffes de peau. Ces résultats suggèrent donc que les mécanismes effecteurs de la réponse humorale ne semblent pas jouer un rôle primaire dans les processus de rejet des allogreffes de peau. Enfin, ces données confirment le faible rôle joué par les anticorps dans le rejet des allogreffes de peau (Hall 1991 ; Zijlstra *et al.* 1992 ; MacEachern *et al.* 1998). Effectivement, il a été démontré chez des souris SCID greffées avec de la peau provenant de souris CMH^{-/-}, suite à un transfert adoptif de cellules T CD4⁺ IFN^{-/-}, une absence d'immunoglobulines dans les sérums. Cette absence de réponse en anticorps permet d'éliminer le rôle des alloanticorps dans le rejet de greffe (Valujskikh et Heeger 2000).

Les réponses en anticorps IgG étaient similaires entre la voie directe et la voie indirecte chez les souris greffées avec de la peau F1, suite au transfert adoptif d'un nombre variable de cellules effectrices. En fait, il n'existe aucune variation dans les titres en anticorps suite au transfert adoptif de $2,5 \times 10^6$, 10×10^6 et 15×10^6 cellules T CD4⁺. Ces résultats indiquent également que la quantité de cellules T CD4⁺ transférées ne semble pas être un facteur limitant pour permettre l'activation des cellules B de la souris receveuse. Les titres en anticorps (IgG et IgM) ne varient également pas entre les souris greffées avec de la peau B10.A(4R)mHEL-Hb (voie indirecte) ou avec de la peau F1 (deux voies ensemble). De plus, il n'y a pas de variation dans la production en alloisotypes IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3) en fonction de la quantité de cellules transférées ou selon le type de peau greffée (Figure 15 - annexe). Il n'y a toujours pas de

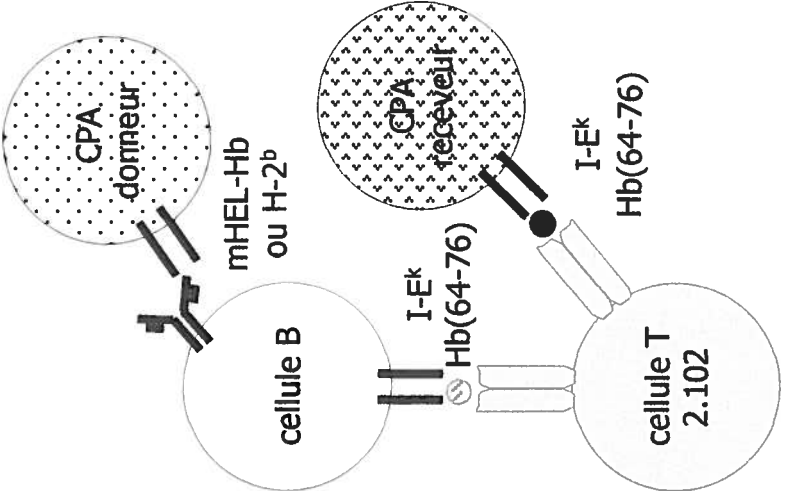
réponse en anticorps au niveau de la voie directe suite à une injection de 15×10^6 cellules T CD4⁺, indiquant que la quantité de cellules effectrices ne semblent pas être un facteur limitant dans les réponses spécifiques à H-2^P.

En conséquence, cette absence de production en alloanticorps dans la voie directe suggère une absence d'activation des cellules B par les cellules T CD4⁺ dans cette voie d'alloréactivité. Les résultats obtenus peuvent supporter l'hypothèse suivante où une activation des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires serait déficiente ou sous-optimale dans le contexte de la voie directe d'alloréactivité. Effectivement, des résultats obtenus dans notre laboratoire avec un modèle de greffe de peau utilisant des souris 2.102Tg RAG-déficientes démontrent une augmentation du nombre total de cellules dans les ganglions ainsi qu'une production en IFN- γ , uniquement chez les souris ayant rejeté leur allogreffe par la voie indirecte (Karina Bonin – manuscrit en préparation). Cette expansion clonale et cette différenciation des précurseurs de cellules T en cellules effectrices seulement dans la voie indirecte permettent de poser l'hypothèse précédemment mentionnée. Une expansion clonale et la différenciation en effecteurs n'ont pu être mises en évidence dans les souris TCR α KOK avec transfert adoptif sacrifiées 18 ou 21 jours après la transplantation. Or, il est connu que les réponses cellulaires surviennent principalement entre les jours 7 et 15. Il serait donc particulièrement intéressant de vérifier et de comparer les réponses effectrices des cellules T CD4⁺ chez les souris TCR α KOK avec transfert adoptif de cellules effectrices, en sacrifiant ces souris 7, 11 ou 15 jours après la transplantation. Ainsi, la caractérisation des fonctions effectrices des lymphocytes T CD4⁺ (expansion clonale et production de cytokines) chez les souris TCR α KOK est essentielle pour appuyer cette hypothèse dans le contexte de la production en alloanticorps par les cellules B.

Les résultats obtenus concernant la production en alloanticorps peuvent également valider partiellement un modèle déjà existant établi par Steele *et al.* (1996), mais cette fois-ci en se basant sur notre modèle murin de greffe de peau qui utilise une population clonotypique de cellules T naïves. Ce modèle (Figure 16) suggère qu'il y a deux niveaux d'aide apportée à la cellule B pour la production en alloanticorps. La stimulation de la

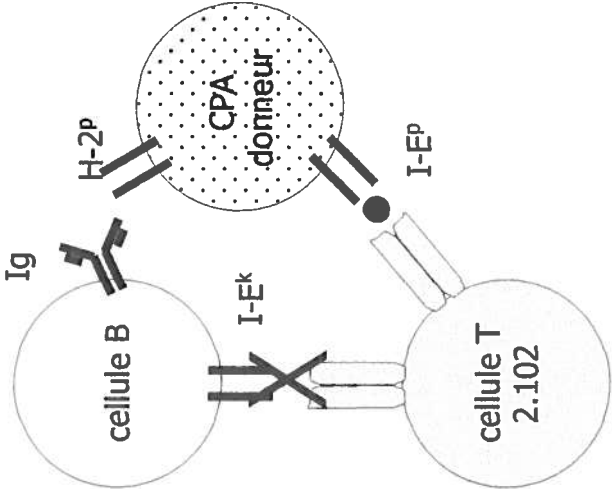
FIGURE 16. Interactions cognitive et non cognitive dans notre modèle murin de greffe de peau : aide apportée par la cellule T CD4⁺ 2.102 pour la production en alloanticorps spécifiques par les cellules B.

voie indirecte



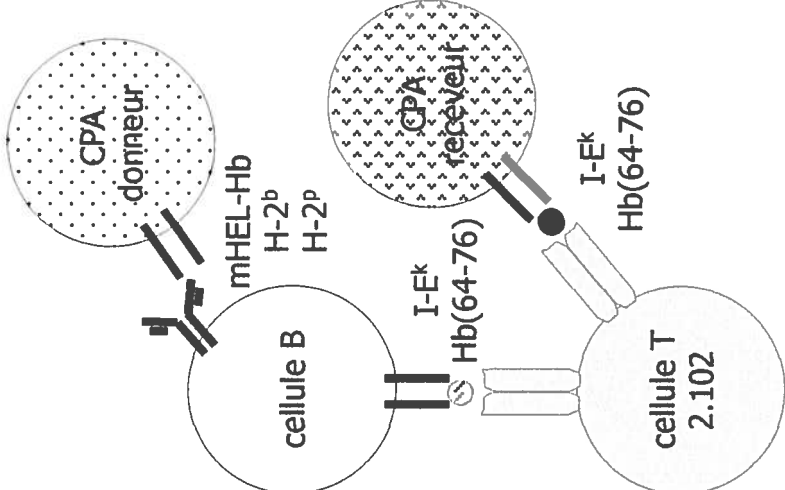
interaction cognitive

voie directe



interaction non cognitive

voie directe et indirecte



interaction cognitive

cellule T par des peptides présentés par la cellule B correspond à une interaction cognitive car il y a un contact physique entre les deux cellules. Mais, la proximité entre la cellule B et la cellule T, sans interaction entre le TCR et la molécule du CMH II de la cellule B entraîne une interaction non cognitive. En lien avec notre modèle de rejet greffe de peau, la cellule B est stimulée au niveau de la voie indirecte via son immunoglobuline de surface par H-2^b (CMH I) présenté sur une CPA du donneur. La cellule T 2.102, préalablement activée par une cellule du receveur, va interagir de manière cognitive via son TCR avec le peptide Hb(64-76) / I-E^k présenté sur la cellule B (interaction cognitive). Au niveau de la voie directe, la cellule B est stimulée via son immunoglobuline de surface par les antigènes de classe I (H-2^P) ou de classe II exprimés sur une CPA du donneur. La cellule T 2.102 interagit directement avec la molécule de classe II I-E^P présentée sur cette même CPA du donneur. Il n'y a donc pas d'interaction cognitive entre le TCR de la cellule T 2.102 et le CMH II de la cellule B, puisqu'il n'y a pas dans cette voie de peptide présenté par les cellules B. À la lumière des résultats obtenus, une activation de la voie non cognitive (voie directe) ne semble pas suffisante par elle-même pour amener une réponse en alloanticorps. Sans une activation des cellules T par la voie indirecte, il y a une absence de réponse en anticorps due à une absence d'activation des cellules B. Ainsi, la voie directe requiert une aide apportée par les cellules T CD4⁺ activées par la voie indirecte (interaction cognitive) afin que la cellule B produise des alloanticorps.

En ce qui concerne le second objectif de recherche, soit étudier la modulation des cellules T cytotoxiques CD8⁺ par les cellules T CD4⁺, les résultats obtenus ont été décrits et discutés dans le Chapitre II de ce document. Brièvement, les réponses cytotoxiques des cellules T CD8⁺ ont été évaluées par un test de cytotoxicité avec relargage de chrome 51. Une première expérience a été effectuée afin de vérifier les réponses cytotoxiques indépendantes des cellules T CD4⁺ dans le rejet des allogreffes de peau (deux souris par groupe). Les résultats obtenus suggèrent que les cellules T CD4⁺ sont nécessaires pour induire une activation des cellules T CD8⁺, et du même coup engendrer les réponses cytotoxiques ainsi que la lyse des cellules cibles du greffon (Figure 13). La littérature a démontré que malgré des cellules T CD8⁺ indépendantes des cellules T CD4⁺ (Shelton *et*

al. 1992 ; Manning *et al.* 1997 ; Deeths *et al.* 1999), les cellules T cytotoxiques CD8⁺ ne peuvent pas induire par elles-mêmes un rejet des allogreffes (Gurley *et al.* 1983 ; Lowry et Gurley 1983). Il semble que les cellules T CD8⁺ peuvent être activées par la voie indirecte, et représentées des composantes de la population alloréactive de cellules T induites suite à des allogreffes de peau chez la souris (Valujskikh *et al.* 2001).

Toutefois, il est nécessaire de reprendre cette étude concernant la réponse cytotoxique des cellules T CD8⁺ indépendantes des cellules T CD4⁺ afin de confirmer les résultats obtenus avec un plus grand nombre de souris par groupe. La modulation des réponses cytotoxiques par les cellules T CD4⁺ activées par les voies directe et indirecte a ensuite été étudiée dans une seconde expérimentation. Une activité cytotoxique spécifique a été détectée uniquement pour les souris ayant rejeté leur allogreffe au moment du prélèvement de la rate (jour 14) (Figure 14). À partir de ces résultats, il est possible de dire que les cellules T CD4⁺ semblent nécessaires pour induire les réponses cytotoxiques par la voie directe et par la voie indirecte dans le rejet de greffe de peau, du moins chez les souris TCR α KOK ayant rejeté leur allogreffe au moment du sacrifice. Néanmoins, il est important de refaire cette expérience en prélevant la rate des souris TCR α KOK à différents temps pour observer si les réponses cytotoxiques surviennent plus tard chez les souris greffées uniquement par la voie directe ou indirecte. Il semble aussi que la combinaison des deux voies alloréactives amène une plus grande immunogénicité, puisque seulement les souris greffées F1 ont rejeté leur greffe et démontré une réponse cytotoxique au jour 14.

En somme, nous avons démontré que la production en alloanticorps dans le rejet de greffe de peau est différente dans les deux voies alloréactives directe et indirecte. Dans notre modèle expérimental, aucune production en anticorps spécifiques (IgG ou IgM) n'est observée dans la voie directe. Ces données suggèrent que l'aide apportée par les cellules T CD4⁺ activées par la voie indirecte est essentielle pour induire une réponse en anticorps. Cette absence de production en alloanticorps dans la voie directe suggère également une absence d'activation des cellules B en réponse à des alloantigènes. Il est possible que l'activation des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires soit

déficiente ou sous-optimale dans le contexte de la voie directe d'alloréactivité. Les résultats obtenus peuvent aussi supporter l'idée qu'il existe deux niveaux d'aide fournie par la cellule T CD4⁺ pour une production en alloanticorps par les cellules B, soit par une interaction non cognitive ou encore par une interaction cognitive. Nous avons démontré principalement que la voie alloréactive indirecte est essentielle pour la production en alloanticorps spécifiques. Notre modèle murin de greffe de peau représente un outil unique pour nous permettre de poursuivre les études sur les fonctions auxiliaires remplies par les lymphocytes T CD4⁺. Il serait intéressant de caractériser *in vivo* les interactions moléculaires ligand-récepteur nécessaires pour la pleine maturation des lymphocytes B en plasmocytes et ce, à l'aide de molécules possédant des activités agonistes ou antagonistes comme CD40. Pour ce qui est des résultats obtenus au niveau de la modulation des réponses cytotoxiques des cellules T CD8⁺, les cellules T CD4⁺ semblent nécessaires pour amener une réponse cytotoxique et la lyse des cellules cibles du greffon. Étant donné l'importance de la voie directe dans la reconnaissance des molécules du CMH de classe I allogéniques et l'implication de cette voie principalement dans les réponses cytotoxiques, il est possible d'émettre l'hypothèse que la voie directe et la voie indirecte seraient toutes deux impliquées dans une activation des cellules T CD4⁺ nécessaires pour une induction des réponses cytotoxiques des cellules T CD8⁺. Il est donc nécessaire de poursuivre la caractérisation de la réponse T auxiliaire responsable de l'activation et de la maturation des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. L'importance de la fréquence des précurseurs de cellules T auxiliaires et la cinétique de maturation de la réponse cytotoxique représentent également des paramètres intéressants à analyser.

Somme toute, les thérapies immunosuppressives présentement utilisées ne semblent pas affecter la voie indirecte étant donné que le rejet chronique demeure problématique. Afin de prévenir le rejet chronique, il est impératif de trouver de meilleurs médicaments immunosuppresseurs spécifiques possédant, entre autres, une action au niveau de la voie indirecte. Nos résultats peuvent suggérer une différence au niveau de certaines fonctions auxiliaires des lymphocytes T CD4⁺ entre les deux voies alloréactives. Par ailleurs, notre modèle murin de rejet de greffe de peau procure des avantages importants comparativement aux autres modèles expérimentaux. Un tel

modèle permet une étude des voies alloréactives directe et indirecte avec une population transgénique de cellules effectrices, quasi clonotypique, où la diversité du répertoire des cellules T est limitée. Bref, un tel modèle innovateur nous permet de pousser les connaissances et la compréhension des mécanismes impliqués dans le rejet des allogreffes, entre autres, au niveau du rôle des cellules T auxiliaires CD4⁺ dans la production en alloanticorps et dans la modulation des cellules T cytotoxiques CD8⁺, pour arriver ultimement au développement de meilleures thérapies immunosuppressives possédant une action spécifique.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je désire remercier le docteur Claude Daniel pour avoir accepté la direction de mes études de maîtrise, et pour la qualité de la formation scientifique reçue.

Je tiens à remercier Yvon Lamontagne pour son assistance technique, pour le travail accompli avec les souris et pour avoir répondu à mes mille et une questions. Un merci particulier à Yvette Lusignan pour son aide et son expertise sur le test de cytotoxicité. Merci aussi à Doris Legault pour les injections intra-veineuse dans les souris.

Je remercie également ma collègue Karina Bonin pour son aide, pour les expériences réalisées en commun et aussi pour avoir répondu à mes mille et une autre questions. Merci également à Sylvie Larocque pour le clonage des molécules du CMH de classe I, puisque sans elle je me serais encore plus longuement égarée dans les dédales de la biologie moléculaire.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements à mes parents qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes études, et qui se sont toujours souciés du bien-être de mes « petites filles ».

Un gros merci à Geneviève, Isabelle et Mélanie pour tous ces moments agréables (de rire et de folie) passés en votre compagnie, et plus particulièrement pour votre support dans les moments un peu plus difficiles...

Enfin, je remercie la Fondation Armand-Frappier pour son soutien financier durant toute la durée de mes études de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

- ARAKELOV, A., et LAKKIS, F.G. 2000. The alloimmune response and effector mechanisms of allograft rejection. *Semin Nephrol* **20** : 95-102.
- ASCHER, N.L., HOFFMAN, R.A., HANTO, D.W., et SIMMONS, R.L. 1984. Cellular basis of allograft rejection. *Immunol Rev* **77** : 217-232.
- AUCHINCLOSS, H.J., GHOBRIAL, R.R.M., RUSSEL, P.S., et WINN, H.J. 1988. Anti-L3T4 *in vivo* prevents alloantibody formation after skin grafting without prolonging graft survival. *Transplantation* **45** : 1118-1123.
- AUCHINCLOSS, H. JR., LEE, R., SHEA, S., MARKOWITZ, J.S., GRUSBY, M.J., et GLIMCHER, L.H. 1993. The role of indirect recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** : 3373-3377.
- AUCHINCLOSS, H. JR., et SACHS, D.H. 1993. *Transplantation and graft rejection in Fundamental Immunology*. PAUL, W.E. Éditeur. New York, Raven Press : 1099-1141.
- BANCHEREAU, J., et STEINMAN, R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392** : 245-252.
- BENICHO, G., FEDOSEYEVA, E., LEHMANN, P.V., OLSON, C.A., GEYSEN, H.M., MCMILLAN, M., et SERCARZ, E.E. 1994. Limited T cell response to donor MHC peptides during allograft rejection. *J Immunol* **153** : 938-945.
- BENICHO, G. 1999. Direct and indirect antigen recognition : the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci* **4** : D476-480.
- BENICHO, G., VALUJSKIKH, A., et HEEGER, P.S. 1999. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol* **162** : 352-358.
- BERNABEU, M. 1998. Meeting the challenges of transplantation in the 21st century. *Transplant Proc* **30** : 1619-1623.
- BEVAN, M.J. 1984. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* **5** : 128-130.
- BILLINGHAM, R.E., et MEDAWAR, P.B. 1951. The technique of free skin grafting in mammals. *J Exp Biol* **28** : 385-402.
- BISHOP, D.K., LI, W., CHAN, S.Y., ENSLEY, R.D., SHELBY, J., et EICHWALD, E.J. 1994. Helper T lymphocyte unresponsiveness to cardiac allografts following transient depletion of CD4-positive cells : Implications for cellular and humoral responses. *Transplantation* **58** : 576-584.

- BISHOP, G. A., et B. S. HOSTAGER. 2001. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **13**: 278-285.
- BJORKMAN, P.J., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W.S., STROMINGER, J.L., et WILEY, D.C. 1987. The foreign antigen-binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329** : 512-518.
- BRADLEY, J.A. 1996. Indirect T cell recognition in allograft rejection. *Intern Rev Immunol* **13** : 245-255.
- BRAUN, M.Y., MCCORMACK, A., WEBB, G., et BATCHELOR, J.R. 1993. Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation* **55** : 177-182.
- BRISCOE, D.M., ALEXANDER, S.I., et LICHTMAN, A.H. 1998. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* **10** : 525-531.
- BURROWS, S.R., KHANNA, R., SILINS, S.L., et MOSS, D.J. 1999. The influence of antiviral T-cell responses on the alloreactive repertoire. *Immunol Today* **20** : 203-207.
- BUSHELL, A., et WOOD, K.J. 1999. Permanent survival of organ transplants without immunosuppression : experimental approaches and possibilities for tolerance induction in clinical transplantation. *Expert Review in Molecular Medicine* Cambridge University Press : 1-31.
- CORLEY, R.B., et KINDRED, B. 1977. In vivo responses of alloreactive lymphocytes stimulated in vitro : helper cell activity of MLR-primed lymphocytes. *Scand J Immunol* **6** : 923-932.
- DALLOUL, A.H., CHMOUZIS, E., NGO, K., et FUNG-LEUNG, W.P. 1996. Adoptively transferred CD4⁺ lymphocytes from CD8^{-/-} mice are sufficient to mediate the rejection of MHC class II or class I disparate skin grafts. *J Immunol* **156** : 4114-4119.
- DANIEL, C., HORVATH, S., et ALLEN, P.M. 1998a. A basis for alloreactivity : MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* **8** : 543-552.
- DANIEL, C., GRAKOU, A., et ALLEN, P.M. 1998b. Inhibition of an in vitro CD4⁺ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J Immunol* **160** : 3244-325.
- DANTAL, J., HOURMANT, M., CANTAROVICH, D., GIRAL, M., BLANCHO, G., DRENO, B., et SOULILLOU, J-P. 1998. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence : randomized comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* **351** : 623-628.

- DAVIES, D.R., et METZGER, H. 1983. Structural basis of antibody function. *Ann Rev Immunol* **1** : 87-117.
- DEETHS, M.J., KEDL, R.M., et MESCHER, M.F. 1999. CD8⁺ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation. *J Immunol* **163** : 102-110.
- DEFRANCO, A.L., ASHWELL, J.D., SCHWARTZ, R.H., et PAUL, W.E. 1984. Polyclonal stimulation of resting B lymphocytes by activated T lymphocytes. *J Exp Med* **159** : 861-880.
- DENTON, M.D., MAGGE, C.C., et SAYEGH, M.H. 1999. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* **353** : 1083-1091.
- DOLBEARE, F., GRATZNER, H., PALLAVICINI, M.G., et GRAY, J.W. 1983. Flow cytometry measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* **80** : 5573-5577.
- DOUILLARD, P., CUTURI, M.C., BROUARD, S., JOSEIN, R., et SOULILLOU, J.P. 1999. T cell receptor repertoire usage in allotransplantation: an overview. *Transplantation* **68** : 913-921.
- DUMONT, F.J., STARUCH, M.J., KOPRAK, S.L., MELINO, M.R., et SIGAL, N.H. 1990. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol* **144** : 251-258.
- ERNST, B., D. S. LEE, J. M. CHANG, J. SPRENT, et C. D. SURH. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* **11**: 173-181.
- EVAVOLD, B.D., WILLIAMS, S.G., HSU, B.L., BUUS, S., et ALLEN, P.M. 1992. Complete dissection of the Hb(64-76) determinant using T helper 1, T helper 2 clones, and T cell hybridomas. *J Immunol* **148** : 347-353.
- FANGMANN, J., DALCHAU, R., et FABRE, J.W. 1992. Rejection of skin allograft by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med* **175** : 1521-1529.
- FINKELMAN, F.D., HOLMES, J., KATONA, I.M., URBAN JR, J.F., BECKMANN, M.P., PARK, L.S., SCHOOLEY, K.A., COFFMAN, R.L., MOSMANN, T.R., et PAUL, W.E. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* **8** : 303-333.
- FISCHMANN, T., H. SOUCHON, M. M. RIOTTOT, D. TELLO, et R. J. POLJAK. 1988. Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of two new antigen-antibody (lysozyme-Fab) complexes. *J Mol Biol* **203**: 527-529.

- GALLON, L., WATSCHINGER, B., MURPHY, B., AKALIN, E., SAYEGH, M.H., et CARPENTER, C.B. 1995. The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation* **59** : 612-616.
- GOLDRATH, A.W., BOGATZKI, L.Y., et BEVAN, M.J. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* **192** : 557-564.
- GOULD, D.S., et AUCHINCLOSS, H.JR. 1999. Direct and indirect recognition : the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* **20** : 77-82.
- GRAKOU, A., DONERMAYER, D., KANAGAWA, O., MURPHY, K.M., et ALLEN, P.M. 1999. TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J Immunol* **162** : 1923-1930.
- GRATZNER, H.G. 1982. Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-iododeoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218** : 474-475.
- GURLEY, K.E., LOWRY, R.P., et FORBES, R.D.C. 1983. Immune mechanisms in organ allograft rejection. II. T helper cells, delayed-type hypersensitivity, and rejection of renal allografts. *Transplantation* **36** : 401-405.
- HALL, B.M. 1991. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* **51** : 1141-1151.
- HANCOCK, G.E., COHN, A.A., et KAPLAN, G. 1989. The generation of antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes of the CD4⁺ phenotype. Enhancement by the cutaneous administration of interleukin 2. *J Exp Med* **169** : 909-919.
- HÄYRY, P., ISONIEMI, H., YILMAZ, S., MENNANDER, A., LEMSTRÖM, K., RÄISÄNEN-SOKOLOWSKI, A., KOSKINEN, P., USTINOV, J., LAUTENSCHLAGER, I., TASKINEN, E., KROGERUS, L., AHO, P., et PAAVONEN, T. 1993. Chronic allograft rejection. *Immunol Rev* **134** : 33-81.
- HONJO, T., et KATAOKA, T. 1978. Organization of immunoglobulin heavy-chain genes and allelic deletion model. *Proc Natl Acad Sci USA* **75** : 2140-2144.
- ITO, A., MINAGAWA, M., TOMIYAMA, K., ITO, M., et KAWAI, K. 1999. Cytotoxic pathways in the skin allograft rejection by CD4⁺ T cells. *Transplantation* **68** : 97-100.
- JANEWAY, C.A., et TRAVERS, P. 1997. *Immunobiologie*. DeBoeck & Larcier s.a., Paris.
- JEANNET, M., PINN, V., FLAX, M., WINN, H.J., et RUSSELL, P.S. 1970. Humoral antibodies in renal allotransplantation in mice. *N Engl J Med* **282** : 111-117.

- JONES, E.Y. 1997. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* **9** : 75-79.
- KAHAN, B.D. 1989. Cyclosporine. *N Engl J Med* **321** : 1725-1738.
- KALAMS, S.A., et WALKER, B.D. 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* **188** : 2199-2204.
- KELLY, C.M., BENHAM, A.M., SAWYER, G.J., DALCHAU, R., et FABRE, J. 1997. A three-cell cluster hypothesis for noncognate T-B cell collaboration via direct recognition of allogeneic dendritic cells. *Transplant Proc* **29** : 1003-1004.
- KÖHLER, G., FISHER LINDAHL, K., et HEUSSER, C. 1981. Characterization of a monoclonal anti H-2 K^b antibody. *Immune Syst* **2** : 202-208.
- KRENSKY, A.M., WEISS, A., CRABTREE, G., DAVIS, M.M., et PARHAM, P. 1990. Mechanisms of disease : T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *New Eng J Med* **322** : 510-517.
- KRIEGER, N.R., YIN, D.P., et FATHMAN, C.G. 1996. CD4⁺ but not CD8⁺ cells are essential for allorejection. *J Exp Med* **184** : 2013-2018.
- LAKKIS, F.G. 1998. Cytokines in graft rejection and acceptance : an ever-shifting paradigm. *Graft* **1** : 143-146.
- LAKKIS, F.G., ARAKELOV, A., KONIECZNY, R.T., et INOUE, Y. 2000. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nature medicine* **6** : 686-688.
- LANING, J.C., DELUCA, J.E., ISAACS, C.M., et HARDIN-YOUNG, J. 2001. In vitro analysis of CD40-CD154 and CD28-CD80/86 interactions in the primary T-cell response to allogeneic "nonprofessional" antigen presenting cells. *Transplantation* **71** : 1467-1474.
- LARSEN, C.P., STEINMAN, R.M., WITMER-PACK, M., HANKINS, D.F., MORRIS, P.J., et AUSTYN, J.M. 1990a. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* **172** : 1483-1493.
- LARSEN, C.P., MORRIS, P.J., et AUSTYN, J.M. 1990b. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allograft into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* **171** : 307-314.
- LECHLER, R.I., et BATCHELOR, J.R. 1982. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* **155** : 31-41.
- LECHLER, R., BATCHELOR, R., et LOMBARDI, G. 1991. The relationship between MHC restricted and allospecific T cell recognition. *Immunol Lett* **29** : 41-50.

- LEDERMAN, S., et SUCIU-FOCA, N. 1999. Antigen presenting cells integrate opposing signals from CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T lymphocytes to arbitrate the outcomes of immune responses. *Hum Immunol* **60** : 553-561.
- LEE, R.S., GRUSBY, M.J., GLIMCHER, L.H., WINN, H.J., et AUCHINCLOSS, H. JR. 1994. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocyte *in vivo*. *J Exp Med* **179** : 865-872.
- LEE, R.S., GRUSBY, M.J., LAUFER, T.M., COLVIN, R., L.H., et AUCHINCLOSS, H. JR. 1997. CD8⁺ effectors cells responding to residual class I antigens, with help from CD4⁺ cells stimulated indirectly, cause rejection of major histocompatibility complex deficient skin grafts. *Transplantation* **63** : 1123-1133.
- LE MOINE, A., SURQUIN, M., DEMUOR, F.X., NOEL, J.C., NAHORI, M.A., PRETOLANI, M., FLAMAND, V., BRAUN, M.Y., GOLDMAN, M., et ABRAMOWICZ, D. 1999. IL-5 mediates eosinophilic rejection of MHC class II-disparate skin allografts in mice. *J Immunol* **163** : 3778-3784.
- LE MOINE, A., GOLDMAN, M., et ABRAMOWICZ, D. 2002. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* **73** : 1373-1381.
- LITTLE, A-M., et PARHAM, P. 1999. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenetics* **1** : 105-123.
- LIU, Z., BRAUNSTEIN, N.S., et SUCIU-FOCA, N. 1992. T cell recognition of allopeptides in context of syngeneic MHC. *J Immunol* **148** : 35-40.
- LIU, K., SUN, Y-K., XI, Y-P., MAFFEI, A., REED, E., HARRIS, P., et SUCIU-FOCA, N. 1993a. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J Exp Med* **177** : 1643-1650.
- LIU, Z., SUN, Y.K., et XI, Y.P. 1993b. Limited usage of T cell receptor V beta genes by allopeptide-specific T cells. *J Immunol* **150** : 3180-3186.
- LIU, Z., COLOVA, A.I., TUGULEA, S., REED, E.F., FISHER, P.E., MANCINI, D., ROSE, E.A., CORTESINI, R., MICHLER, R.E. et SUCIU-FOCA, N. 1996. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest* **98** : 1150-1157.
- LIU, Z., COLOVAI, A.I., TUGULEA, S., REED, E.F., HARRIS, P.E., MAFFEI, A., MOLAJONI, E.R., GARGONO, R., CORTESINI, R., HARDY, M.A., et SUCIU-FOCA, N. 1997. Mapping of dominant HLA-DR determinants recognized via the indirect pathway. *Transplant Proc* **29** : 1014-1015.

- LOHSE, A.W., KNOLLE, P.A., BILO, K., UHRIC, C., WALDMAN, C., IBE, M., SCHMITT, C., GERKEN, G., et BUSCHENFELDE, M.Z. 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* **110** : 1175-1181.
- LORENZ, G., et ALLEN, P.M. 1988. Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** : 5220-5223.
- LOWRY, R.P., et GURLEY, K.E. 1983. Immune mechanisms in organ allograft rejection. III. Cellular and humoral immunity in rejection of organ allografts transplanted across MHC subregion disparity RT1.B (RT1.D) *Transplantation* **36** : 405-411.
- LOWRY, R.P., et FORBES, R.D. 1984. The nonessential role of a humoral antibody response in acute rat cardiac allograft rejection. An ultrastructural tracer study in an adoptive transfer model. *Transplantation* **37** : 182-187.
- MACEACHERN, M.C., BURKHART, C., LOWREY, P.A., et WRAITH, D.C. 1998. Identification of an indirectly presented epitope in a mouse model of skin allograft rejection. *Transplantation* **65** : 1357-1364.
- MAIER, S., TERTILT, C., CHAMBRON, N., GERAUER, K., HUSER, N., HEIDECKE, C.D., et PFEKKER, K. 2001. Inhibition of natural killer cells in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. *Nat Med* **7** : 557-562.
- MANNING, T.C., RUND, L.A., GRUBER, M.M., FALLARINO, F., GAJEWSKI, T.F., et KRANZ, D.M. 1997. Antigen recognition and allogeneic tumor rejection in CD8⁺ TCR transgenic / RAG^{-/-} mice. *J Immunol* **159** : 4665-4675.
- MATESIC, D., VALUJSKIKH, A., PEARLMAN, E., HIGGINS, A.W., GILLIAM, A.C., et HEEGER, P.S. 1998. Type 2 immune deviation has differential effects on alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* **161** : 5236-5244.
- MATZINGER, P., et BEVAN, M.J. 1977. Hypothesis : why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* **29** : 1-5.
- MCKENNA, R.M., TAKEMOTO, S.K., et TERASAKI, P.I. 2000. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* **69** : 319-326.
- MILLER, J.F.A.P. 1962. Role of thymus in transplantation tolerance and immunity *dans* *Transplantation*. Wolstenholme, G.E.W., et Cameron, M.P. Éditeurs. Churchill, London p.397.
- MOLAJONI, E.R., CINTI, P., ORLANDINI, A., MOLAJONI, J., TUGULEA, S., HO, E., LIU, Z., SUCIU-FOCA, N., et CORTESINI, R. 1997. Mechanism of liver allograft rejection : the indirect recognition pathway. *Hum Immunol* **53** : 57-63.

- MOMBAERTS, P., CLARKE, A.R., RUDNICKI, M.A., IACOMINI, J., ITOHARA, S., LAFAILLE, J.J., WANG, L., ICHIKAWA, Y., JAENISOH, R., HOOPER, M.L., et TONEGAWA, S. 1992. Mutations in T-cell antigen receptor genes α and β block thymocyte development at different stages. *Nature* **360** : 225-231.
- MOMBAERTS, P., MIZOGUCHI, E., LJUNGGREN, H.G., IACOMINI, J., ISHIKAWA, H., WANG, L., GRUSBY, M.J., GLIMCHER, L.H., WINN, H.J., BHAN, A.K., et TONEGAWA, S. 1994. Peripheral lymphoid development and function in TCR mutant mice. *Int Immunol* **6** : 1061-1070.
- MORTON, A.L., BELL, E.B., BOLTON, E.M., MARSHALL, H.E., ROADKNIGHT, C., MCDONAGH, M., et BRADLEY, J.A. 1993. CD4⁺ T cell mediated rejection of major histocompatibility complex class I-disparate grafts : a role for alloantibody. *Eur J Immunol* **23** : 2078-2084.
- NELSON, C.A., VIDAUSKY, I., VINER, J.J., GROSS, M.L., et UHANUE, E.R. 1997. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 628-633.
- NEMLANDER, A., LESZCZYNSKI, D., PAAVONEN, T., SOOTS, A., et HAYRY, P. 1985. In situ effector pathways of allograft destruction. *Transplant Proc* **17** : 612-613.
- NEWSTEAD, C.G. 1998. Assessment of risk of cancer after renal transplantation. *Lancet* **351** : 610-611.
- NICKOLOFF, B.J., et TURKA, L.A. 1994. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells : new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* **15** : 464-469.
- NORWICH, K.H., RAMANATHAN, S., et POUSSIER, P. 1999. Kinetics of T cell turnover following thymectomy. *Cell Prolif* **32** : 195-201.
- ONODERA, K., HANCOCK, W.W., GRASER, E., LEHMANN, M., SAYEGH, M.H., STROM, T.B., VOLK, H.D., et KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. 1997. Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients. *J Immunol* **158** : 1572-1581.
- OPELZ, G. 1992. Collaborative transplant study – 10 year report. *Transplant Proc* **24** : 2342-2355.
- ORLOFF, M.S., DEMARA, E.M., COPPAGE, M.L., LEONG, N., FALLON, M.A., SICKEL, J., ZUO, X.J., PREHN, J., et JORDAN, S.C. 1995. Prevention of chronic rejection and graft arteriosclerosis by tolerance induction. *Transplantation* **59** : 282-288.
- OROSZ, C.G., et VAN BUSKIRK, A.M. 1998. Immune mechanisms of acute rejection. *Transplant Proc* **30** : 859-861.

- PATTISON, J.M., et KRENSKY, A.M. 1997. New insights into mechanisms of allograft rejection. *Am J Med Sci* **313** : 257-263.
- PIETRA, B.A., WISEMAN, A., BOLWERK, A., RIZEQ, M., et GILL, R.G. 2000. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest* **106** : 1003-1010.
- QUÉBEC – TRANSPLANT 2001. Données statistiques sur www.quebec-transplant.qc.ca
- RHODES, D.A., et TROWSDALE, J. 1999. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenetics* **1** : 21-31.
- RICHTERS, C.D., VAN GELDEROP, E., DU PONT, J.S., HOEKSTRA, M.J., KREIS, R.W., et KAMPERDIJK, E.W. 1999. Migration of dendritic cells to the draining lymph node after allogeneic or congenic rat skin transplantation. *Transplantation* **67** : 828-832.
- ROGERS, N.J., et LECHLER, R.I. 2001. Allorecognition. *Am J Transplant* **1** : 97-102.
- ROOPENIAN, D.C., WIDMER, M.B., OROSZ, C.G., et BACH, F.H. 1983. Helper cell independent cytolytic T lymphocytes specific for a minor histocompatibility antigen. *J Immunol* **130** : 542-545.
- ROSE, M.L. 1998. Endothelial cells as antigen-presenting cells : role in human transplant rejection. *Cell Mol Life Sci* **54** : 965-978.
- ROSENBERG, A.S., MIZUOCHI, T., SHARROW, S.O., et SINGER, A. 1987. Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection. *J Exp Med* **165** : 1296-1315.
- ROSENBERG, A. 1991. Skin allograft rejection. *In Current Protocols in Immunology*. Vol. 1. COLIGAN, J., KRUISBEEK, A., MARGULIES, D., SHEVACH, E., et STROBER, W. Éditeurs. John Wiley & Sons Inc., Bethesda. p. 4.4.1-4.4.9.
- ROSENBERG, A.S., et SINGER, A. 1992. Cellular basis of skin allograft rejection : an in vivo model of immune-mediated tissues destruction. *Annu Rev Immunol* **10** : 333-358.
- ROSSINI, A.A., GREINER, D.L., et MORDES, J.P. 1999. Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiol Rev* **79** : 99-141.
- SABLINSKI, T., HANCOCK, W.W., TILNEY, N.L., et KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. 1991. CD4 monoclonal antibodies in organ transplantation : a review of progress. *Transplantation* **52** : 579-589.

- SAWADA, T., WU, Y., SACHS, D.H., et IACOMINI, J. 1997. CD4⁺ T cells are able to reject class I disparate allografts. *Transplantation* **64** : 335-340.
- SAYEGH, M.H., et CARPENTER, C.B. 1996. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Intern Rev Immunol* **13** : 221-229.
- SAYEGH, M.H., et TURKA, L.A. 1998. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* **338** : 1813-1821.
- SECORD, E. A., L. V. RIZZO, E. W. BARROSO, D. T. UMETSU, G. J. THORBECKE, et R. H. DEKRUYFF. 1996. Reconstitution of germinal center formation in nude mice with Th1 and Th2 clones. *Cell Immunol* **174**: 173-179.
- SEKINE, Y., BOWEN, L.K., HEIDLER, K.M., VAN ROOIJEN, N., BROWN, J.W., CUMMINGS, O.W., et WILKES, D.S. 1997. Role of passenger leukocytes in allograft rejection. *J Immunol* **159** : 4084-4093.
- SENA, J., WACHTEL, S.S., et MURPHY, G. 1976. A comparison of the survival H-Y incompatible ear, tail, and body skin grafts. *Transplantation* **21** : 412-416.
- SETUM, C., HEGRE, O.D., SERIE, J.R., et MOORE, W.V. 1990. The potency of splenic dendritic cells as alloantigen presenters in vivo. Quantitation of the number of cells required to achieve graft rejection. *Transplantation* **49** : 1175-1177.
- SHELTON, M.W., WALP, L.A., BASLER, J.T., UCHIYAMA, K., et HANTO, D.W. 1992. Mediation of skin allograft rejection in scid mice by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Transplantation* **54** : 278-286.
- SHERMAN, L.A., et CHATTOPADHYAY, S. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Ann Rev Immunol* **11** : 385-402.
- SHERWOOD, R.A., BRENT, L., et RAYFIELD, L.S. 1986. Presentation of alloantigens by host cells. *Eur J Immunol* **16** : 569-574.
- SHEVACH, E.M. 1985. The effects of cyclosporin A on the immune system. *Annu Rev Immunol* **3** : 397-423.
- SHIRWAN, H. 1999. Chronic allograft rejection. *Transplantation* **68** : 715-726.
- SHOSKES, D.A., et WOOD, K.J. 1994. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunology Today* **15** : 32-38.
- SIRAK, J., OROSZ, C.G., WAKELY, E., et VANVUSKIRK, A.M. 1997. Alloreactive delayed-type hypersensitivity in graft recipients. *Transplantation* **63** : 1300-1307.
- SIRINEK, L.P., ZINN, N.E., FERGUSON, R.M., et OROSZ, C.G. 1986. In vivo mechanisms of alloreactivity. *Transplantation* **41** : 349-356.

- SIVASAI, K.S., SMITH, M.A., POINDEXTER, N.J., SUNDARESAN, S.R., TRULOCK, E.P., LYNCH, J.P., COOPER, J.D., PATTERSON, G.A., et MOHANAKUMAR, T. 1999. Indirect recognition of donor HLA class I peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* **67** : 1094-1098.
- SMITH, C.R., JARAMILLO, A., LIU, W., TU, Y., KALEEM, Z., SWANSON, C.J., et MOHANAKUMAR, T. 2001. CD4⁺ T cell recognition of a single discordant HLA-A2-transgenic molecule through the indirect antigen presentation pathway induces acute rejection of murine cardiac allografts. *Transplantation* **71** : 1640-1648.
- STEELE, D.J.R., LAUFER, T.M., SMILEY, S.T., ANDO, Y., GRUSBY, M.J., GLIMCHER, L.H., et AUCHINCLOSS JR, H. 1996. Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med* **183** : 699-703.
- SUCIU-FOCA, N., REED, E., D'ARGATI, V.D., HO, E., COHEN, D.J., BENENISTY, A.I., McCABE, R., BRENSILVER, J.M., KING, D.W., et HARDY, M.A. 1991a. Soluble HLA-antigens, anti-HLA antibodies and anti-idiotypic antibodies in the circulation of renal transplant recipients. *Transplantation* **51** : 593-601.
- SUCIU-FOCA, N., REED, E., MARBOE, C., XI, Y.P., SUN, Y.K., HO, E., ROSE, E., REEMTSMA, K., et KING, D.W. 1991b. Role of anti-HLA antibodies in heart transplantation. *Transplantation* **51** : 716-724.
- SUCIU-FOCA, N., CIUBORARIU, R., ITESCU, S., ROSE, E.A., et CORTESINI, R. 1998. Indirect allorecognition of donor HLA-DR peptides in chronic rejection of heart allografts. *Transplant Proc* **30** : 3999-4000.
- THAI, N.L., FU, F., QIAN, S., SUN, H., GAO, L., WANG, S.C., DEMETRIS, A.J., WOO, J., THOMSON, A.W., DUQUESNOY, R.J., et FUNG, J.J. 1995. Cytokine mRNA profiles in mouse orthotopic liver transplantation. *Transplantation* **59** : 274-281.
- TILNEY, N.L., STROM, T.B., MACPHERSON, S.G., et CARPENTER, C.B. 1975. Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats. *Transplantation* **20** : 323-330.
- TILNEY, N.L., GAROVOY, M.R., BUSCH, G.J., STROM, T.B., GRAVES, M.J., et CARPENTER, C.B. 1979. Rejected human renal allograft : recovery and characteristics of infiltrating cells and antibody. *Transplantation* **28** : 421-426.
- VALUJSKIKH, A., MATESIC, D., GILLIAM, A., ANTHONY, D., HAQQI, T.M., et HEEGER, P.S. 1998. T cells reactive to a single immunodominant self-restricted allopeptide induce skin graft rejection in mice. *J Clin Invest* **15** : 1398-1407.

- VALUJSKIKH, A., et HEEGER, P.S. 2000. CD4⁺ T cells responsive through the indirect pathway can mediate skin graft rejection in the absence on interferon-gamma. *Transplantation* **69** : 1016-1019.
- VALUJSKIKH, A., HARTIG, C., et HEEGER, P.S. 2001. Indirectly primed CD8⁺ T cells are a prominent component of the allogeneic T-cell repertoire after skin graft rejection in mice. *Transplantation* **71** : 418-421.
- VANBUSKIRK, A.M., WAKELY, M.E., SIRAK, J.H., et OROSZ, C.G. 1998. Patterns of allosensitization in allograft recipients : Long-term cardiac allograft acceptance is associated with active alloantibody production in conjunction with active inhibition of alloreactive delayed-type hypersensitivity. *Transplantation* **65** : 1115-1123.
- VAN DEN EERTWEGH, A.J.M., BOERSMA, W.J.A., et CLAASSEN, E. 1992. Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen. *Crit Rev Immunol* **11** : 337-380.
- VAN KOOTEN, C., et BANCHEREAU, J. 1997. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* **9** : 330-337.
- VELLA, J.P., VOS, L., CARPENTER, C.B., et SAYEGH, M.H. 1997a. Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. *Transplantation* **64** : 1825-1828.
- VELLA, J.P., SPADAFORA-FERREIRA, M., MURPHY, B., ALEXANDER, S.O., HARMON, W., CARPENTER, C.B., et SAYEGH, M.H. 1997b. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* **64** : 795-800.
- VELLA, J.P., MAGEE, C., VOS, L., WOMER, K., RENNKE, H., CARPENTER, C.B., HANCOCK, W., et SAYEGH, M.H. 1999. Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation* **67** : 1523-1532.
- VIRET, C., F. S. WONG, et C. A. JANEWAY JR. 1999. Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* **10**: 559-568.
- WAAGA, A.M., CHANDRAKER, A., SPADAFORA-FERREIRA, M., IYENGAR, A.R., KHOURY, S.J., CARPENTER, C.B., et SAYEGH, M.H. 1998. Mechanisms of indirect allorecognition. *Transplantation* **65** : 876-883.
- WARRENS, A.N. LOMBARDI, G., et LECHLER, R.I. 1994. MHC and alloreactivity : presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol* **2** : 103-107.
- WECKER, H., et AUCHINCLOSS JR, H. 1992. Cellular mechanisms of rejection. *Curr Opin Immunol* **4** : 561-566.

- WECKER, H., GRUSBY, M., et AUCHINCLOSS, H. JR. 1995. Effector cells must recognize antigens expressed in the graft to cause efficient skin graft rejection in SCID mice. *Transplantation* **59** : 1223-1227.
- WIDMER, M.B., et BACH, F.H. 1981. Antigen driven helper cell independent cloned cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **294** : 750-752.
- WILLIAMS, C.B., VIDAL, K., DONERMAYER, D., PETERSON, D.A., WHITE, J.M., et ALLEN, P.M. 1998. *In vivo* expression of a TCR antagonist : T cells escape central tolerance but are antagonized in the periphery. *J Immunol* **161** : 128-137.
- WILLIAMS, C.B., ENGLE, D.L., KERSH, G.J., WHITE, J.M., et ALLEN, P.M. 1999. A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. *J Exp Med* **189** : 1531-1544.
- WOLF, L.A., COULOMBE, M., et GILL, R.G. 1995. Donor antigen-presenting cell-independent rejection of islet xenograft. *Transplantation* **60** : 1164-1170.
- YAMAMOTO, N., EINAGA-NAITO, K., KURIYAMA, M., KAWADA, Y., et YOSHIDA, R. 1998. Cellular basis of skin allograft rejection in mice : specific lysis of allogeneic skin components by non-T cells. *Transplantation* **65** : 818-825.
- ZAVAZAVA, N., et KABELITZ, D. 2000. Alloreactivity and apoptosis in graft rejection and transplantation tolerance. *J Leukoc Biol* **68** : 167-174.
- ZEHR, K.J., HERSKOWITZ, A., LEE, P.C., POSTON, R.S., GILLINOV, A.M., et BAUMGARTNER, W.A. 1993. Neutrophil adhesion inhibition prolongs survival of cardiac allografts with hyperacute rejection. *J Heart Lung Transplant* **12** : 837-844.
- ZIJLSTRA, M., AUCHINCLOSS, H. JR., LORING, J., CHASE, C.M., RUSSEL, P.S., et JAENISH, R. 1992. Skin graft rejection by β 2 microglobulin deficient mice. *J Exp Med* **17** : 885-893.

ANNEXE

FIGURE 15. La production en alloanticorps isotypiques IgG est similaire suite au transfert adoptif de différentes quantités de cellules T CD4⁺ 2.102Tg. Les sérums des souris TCR α KOK greffées avec de la peau de queue de souris B10.P (directe), B10.A(4R)mHEL-Hb (indirecte) ou (B10.PxB6(mHEL-Hb))F1 (directe + indirecte) suite à un transfert adoptif de (A) 2,5x10⁶ ou (B) 15x10⁶ cellules T CD4⁺, ont été obtenus par saignée dans le sinus rétro-orbital 21 ou 18 jours post-transplantation, respectivement. Les sérums de souris individuelle ont été mixés, et des dilutions en série ont été analysées par cytométrie en flux contre des splénocytes de B10.P ou B10.A(4R)mHEL-Hb en utilisant des anticorps anti-souris isotypiques IgG de rat conjugués au FITC. Les valeurs représentent la moyenne des titres en anticorps des mixtes des sérums analysés en triplicata.

