

Autoimmunité (1)

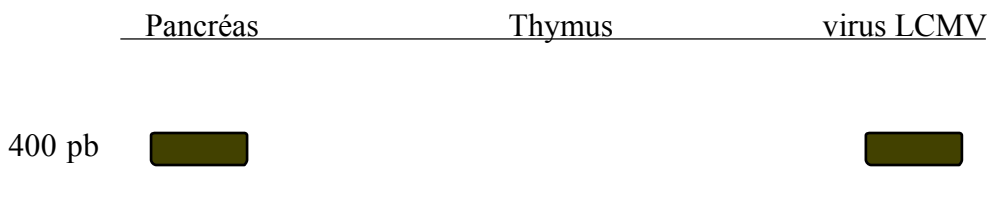
I. Un modèle de diabète auto-immun : la souris double transgénique TCR/GP LCMV

(d'après Ohashi, P.S. *et al.* (1991) *Cell*, 85:305 ; Burkhard, L. *et al.* (1998) *J. Exp. Med.*, 188:1493)

Afin de mieux comprendre les mécanismes de tolérance aux peptides extra thymiques, une souris transgénique 'GP', exprimant une glycoprotéine du virus LCMV¹ (GP LCMV), au niveau des cellules des îlots β du pancréas, a été générée. La spécificité d'expression du transgène est assurée par la présence du promoteur de l'insuline de rat, promoteur tissu spécifique. Cette souris a ensuite été croisée avec une souris transgénique pour le récepteur T spécifique pour le peptide 32-42 de GP LCMV présenté dans le contexte H-2 D^b. Les souris TCR-GP double transgéniques, résultat de ce croisement sont parfaitement normales et ne développent pas de diabètes.

Dans un premier temps, les auteurs ont examiné l'expression du transgène GP LCMV chez ces souris en réalisant des PCR radioactives : l'ARN des cellules du thymus et des cellules du pancréas a été prélevé et rétrotranscrit en ADNc. L'ADNc de la GP LCMV a ensuite été amplifié par PCR et détecté par hybridation avec une sonde radioactive spécifique.

Les résultats suivants ont été obtenus :



Question 1. De quoi les auteurs ont-ils voulu s'assurer ? Pourquoi ?

La présence de lymphocytes T CD8 exprimant le TCR anti-GP LCMV dans le thymus, et les organes lymphoïdes secondaires a été mise en évidence par cytométrie de flux : 70 à 90% des lymphocytes T expriment ce TCR.

Afin de vérifier si ces lymphocytes pouvaient être activés *in vivo*, des souris TCR transgéniques et des souris TCR-GP double transgéniques ont été infectées par le virus LCMV. 4 jours après l'infection, la lyse par les splénocytes de ces souris, de macrophages infectés ou non par le LCMV a été évaluée *in vitro* (Figure 4) :

Question 2. Que concluez-vous de cette expérience ?

Question 3. Comment expliquez-vous que les souris TCR-GP ne développent pas de diabète ?

Question 4. Comment ce phénomène a-t-il été nommé ?

¹ : Lymphocytic choriomeningitis virus

Figure 1

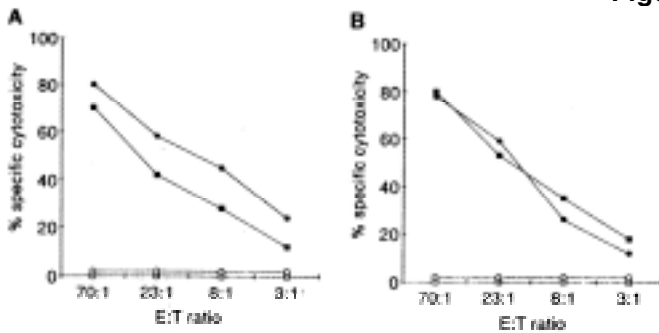


Figure 3. LCMV GP-Specific Cytotoxicity in Transgenic Mice
 (A) Effector cells from spleen cells of TCR-GP transgenic animals (circles) were compared with effector cells from TCR transgenic animals (squares), targets infected with the recombinant vaccinia virus expressing the GP antigen (closed symbols), uninfected targets (open symbols).
 (B) Effector T cells isolated from spleen cells of a single GP transgenic animal (circles) and C57BL/6 control mice (squares) were used in a cytotoxicity assay, as described in (A). Data shown here are representative of five transgenic mice. Spontaneous ⁵¹Cr release from target cells was below 20%.

À la vue des précédents résultats, les auteurs ont voulu savoir si l'infection par le LCMV favorisait le développement de diabète chez les souris GP et TCR-GP : des souris GP ou TCR-GP ont été infectées soit par le virus LCMV, soit par le virus de la vaccine (contrôle), soit par un variant du LCMV contenant une substitution d'un acide aminé au niveau du peptide 32-42 de la GP. Puis le taux de glucose dans le sang et les urines a été évalué régulièrement (Figure 2)

Figure 2

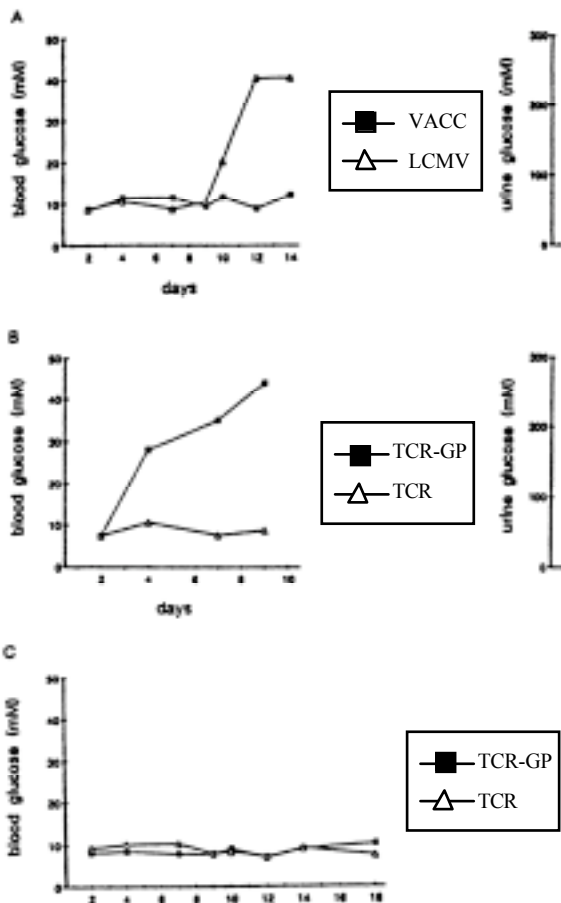


Figure 4. Onset of Diabetes in Treated Transgenic Mice

(A) GP transgenic mice were infected with either LCMV or control vaccinia virus (VACC), and glucose levels in the blood and the urine were monitored regularly. These results represent six transgenic mice. The increase in glucose levels varied from 1–2 days in the animals studied. The glucose level in the blood of normal, LCMV, or vaccinia virus-infected C57BL/6 mice varied from 8–12 mM. The glucose level in the urine from these normal and infected control animals remained negative (data not shown).
 (B) TCR-GP double transgenic mice (TCR-GP) and control TCR transgenic mice (TCR) were immunized with LCMV. Glucose levels in the blood and urine were monitored. The figure shown here is representative of four double TCR-GP transgenic mice. The onset of diabetes varied in these experiments by 1 day.
 (C) Double TCR-GP transgenic (TCR-GP) and TCR transgenic mice (TCR) were immunized with the 8.7 variant LCMV, which has an altered p32-42 epitope that is no longer recognized by the transgenic TCR. Glucose levels in the blood and urine (data not shown) were monitored and remained normal over a period of more than 3 weeks. These studies were done with two double TCR-GP transgenic animals.

Question 5. Quelles conclusions tirez-vous de ces résultats ? Vous permettent-ils de formuler des hypothèses sur les mécanismes déclenchant de l'auto-immunité dans ce modèle ?

Par la suite, des expériences de transfert adoptif furent réalisées : des cellules dendritiques sont pulsées avec le peptide 32-42 de la GP du LCMV. Ces cellules présentatrices d'antigènes, ainsi traitées, sont injectées en une seule fois ou de façon répétée à des souris simples transgéniques GP-LCMV.

La glycémie est ensuite mesurée régulièrement chez les animaux (Figure 3)

Figure 3

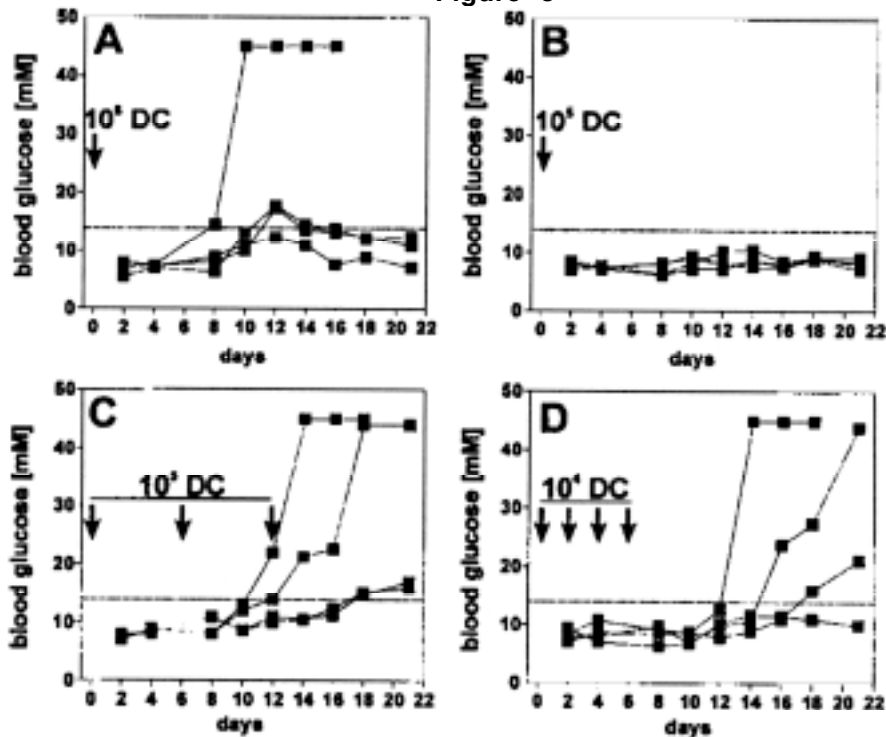


Figure 1. Blood glucose levels in RIP-GP mice after single or repetitive intravenous immunization with H8-DC. Mice were immunized with either a single dose of (A) 10^6 DC ($n = 8$) on day 0 or (B) 10^5 DC ($n = 4$) on day 0, or repetitive doses of (C) 10^5 DC ($n = 8$) on days 0, 6, and 12 or (D) 10^4 DC ($n = 8$) on days 0, 2, 4, and 6. Arrows, Day of DC injection. Values of four representative mice per group are shown.

Question 6. Que pensez-vous de ces résultats ? Peut-on préciser les hypothèses envisagées précédemment ?

II. Évolution de la réponse T chez la souris $NOD_{[AS1]}$

N.B. : Cet exercice ne sera probablement pas traité en séance de TD mais sert de base à la compréhension de l'exercice suivant ; votre enseignant se tiendra néanmoins à votre disposition pour répondre à vos questions éventuelles.

(d'après Amrani, A. *et al.* (2000) *Nature*, 406:739)

Les souris NOD (Non Obese Diabetic) développent une insulite (Inflammation des îlots pancréatiques) à l'âge de trois semaines, mais le diabète n'apparaît chez elles que dix semaines après au minimum. Il a été montré que des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) sont responsables de la destruction des cellules β du pancréas, mais les mécanismes qui contrôlent la progression de l'insulite vers le diabète restent inconnus. Ces CTL sont cytotoxiques pour les cellules β dans le contexte de la molécule de classe I du CMH H-2K^d. L'analyse de banques peptidiques combinatoires a permis d'identifier deux peptides ligands de ces CTL : NRP (KYNKANWFL) et NRP-A7 (KYNKANAFLL), qui possède des propriétés agonistes supérieures à NRP. La plupart des CTL dérivés des îlots pancréatiques de souris NOD diabétiques reconnaissent ces peptides et les souris NOD transgéniques pour un TcR reconnaissant NRP/NRP-A7 associé à H-2K^d deviennent diabétiques très rapidement après l'apparition de l'insulite.

Question 1. Que suggèrent ces informations ?

Les îlots provenant de souris NOD non diabétiques de 5, 9, 15, et 20 semaines sont cultivés en présence d'IL-2 pendant 7 jours puis marqués avec des tétramères de H-2K^d associés aux peptides NRP, NRP-A7, TUM (KYQAVTTTL, contrôle négatif), et INS (LYLVCGERG, dérivé de l'insuline, reconnu par les cellules T d'îlots de jeunes souris NOD). Le résultat de cette expérience vous est montré en **Figure 4**.

Question 2. Que peut-on conclure de cette expérience ?

Les constantes de dissociation (K_d) et les demi-vies de fixation ($t_{1/2}$) entre les tétramères NRP-A7 et les CTL dérivées des îlots, ont été mesurées chez des souris de différents âges. Le résultat vous est montré en **Figure 5**.

Figure 4

a : pourcentage de cellules CD8⁺ tétramère⁺.
 b : nombre absolu de cellules CD8⁺ tétramère⁺.

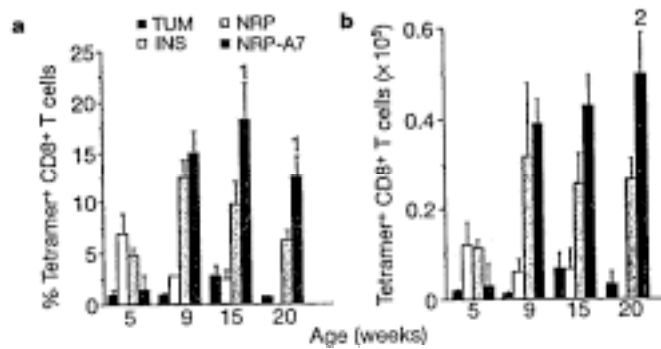
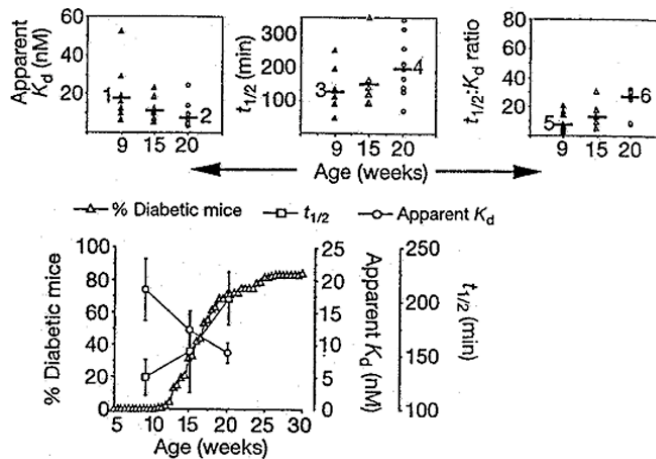


Figure 5



Question 3. Commentez ce résultat, sachant que les niveaux d'expression de TcR et de CD8 ne varient pas.

Des souris NOD reçoivent des injections intra-péritonéales répétées de 100 µg peptide TUM, NRP ou NRP-A7. Les résultats de l'analyse de ces souris sont montrés en **Figure 6**.

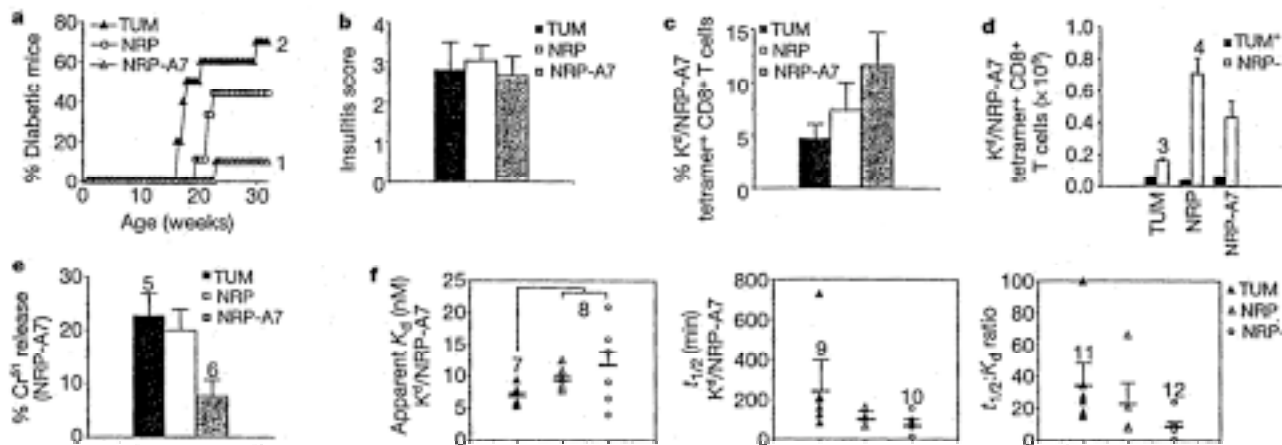


Figure 6

a : Incidence de diabète au sein de groupes de 10 souris femelles traitées avec les peptides TUM, NRP ou NRP-A7. b : Evaluation de l'insulite dans les souris non diabétiques de chaque groupe. c,d : pourcentages et nombres absolus de cellules CD8+ tétramères NRP-A7⁺. e : Potentiel cytotoxique des LT CD8 vis-à-vis de cellules cibles chargées en peptide NRP-A7 des souris traitées avec les différents peptides. f : Constantes cinétiques de dissociation (K_d) et demi-vie de fixation (t_{1/2}) entre les tétramères NRP-A7 et les LT CD8 des souris traitées avec les différents peptides.

Question 4. Commentez l'ensemble de ces résultats. Que peut-on en conclure ?

III. L'origine du diabète des souris NOD...

(d'après Thomas-Vaslin, V. *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4598 ; Salaün, J. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:874)

On a longtemps pensé que le diabète de la souris NOD n'était dû qu'à l'expression, au niveau des îlots β du pancréas, de complexes du CMH particuliers (I-A^{NOD}) qui favoriseraient localement l'activation des lymphocytes T CD4 et T CD8. Néanmoins, voulant en savoir plus sur le rôle de la sélection du répertoire primaire des lymphocytes T dans la pathogenèse du diabète auto-immun, une équipe française a réalisé l'expérience suivante :

des fragments d'épithélium thymique d'embryon de souris ont été greffés chez des souris nouveau-nés C57Bl/6 athymiques (nu/nu) ne développant habituellement pas de maladies auto-immunes.

Les fragments d'épithélium thymique provenaient :

- Soit d'embryons NOD de 10 jours (NOD E10)². Ces ébauches d'épithélium thymique n'étant pas encore colonisées par des cellules hématopoïétiques.
- Soit d'embryons C57Bl/6 de 10 jours (B6 E10).
- Soit d'embryons BalB/C de 10 jours (BALB E10).
- Soit d'embryons NOD de 17 jours (NOD E17). L'épithélium étant alors colonisé par des cellules hématopoïétiques.

Précédemment l'équipe avait déjà montré que les greffes d'épithélium thymique syngéniques ont pour effet de rétablir un compartiment T pratiquement normal³ chez les souris C57Bl/6^{nu/nu}, la présence de lésions inflammatoires des îlots du pancréas (insulite et péri-insulite) a été évaluée et mesurée chez les souris greffées devenues adultes (10 à 20 mois). Les résultats sont présentés sur la **Figure 7** :

² : E10 signifie "embryonic day 10"

³ : le nombre de cellules T en périphérie est juste un peu inférieur à celui d'une souris C57Bl/6 normale, mais le système immunitaire reste parfaitement fonctionnel (activation, vaccination, rejet de greffes de peau d'haplotype H-2 différent, etc...)

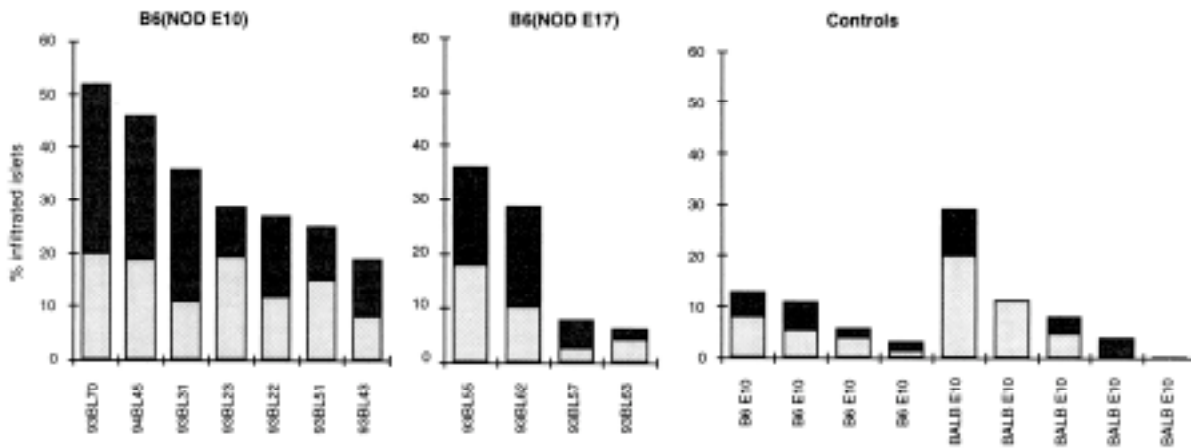


Figure 7

Infiltration in the pancreas of B6 nude mice restored by the graft of NOD E10, NOD E17, or B6 E10 and BALB/c E10 thymic rudiments as controls. The percentage of periinsulinitis (■) and insulinitis (▨) is indicated for individual chimeras, as determined by observation of classical paraffin histological sections.

Question 1. Pourquoi avoir réalisé des greffes d'ébauches thymiques d'embryon NOD de 10 jours ou de 17 jours ?

Question 2. Quelles conclusions tirez-vous de cette expérience ? Cette expérience vous permet-elle d'envisager une (des) hypothèse(s) quant au déclenchement des processus auto-immuns chez la souris NOD ?

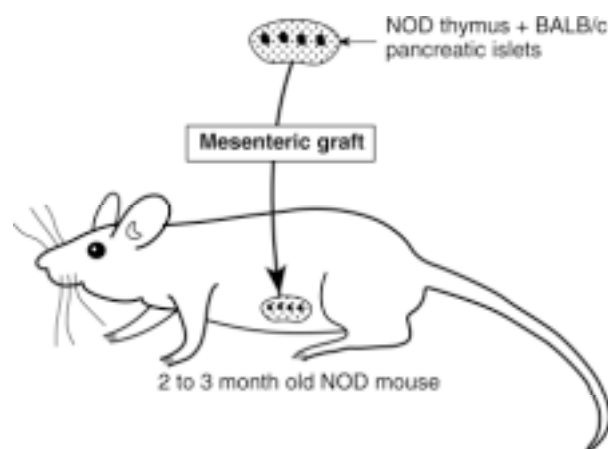
L'équipe a également montré que ces souris greffées sont capables de tolérer des greffes de peau d'haplotype du donneur bien qu'in vitro les splénocytes de ces animaux soient capables de proliférer face à des CPA d'haplotype du donneur. Dans d'autres expériences, des transplantations intrathymiques de cellules d'îlots du pancréas ont été réalisées sur des souris NOD. Chez ces souris, dont le thymus contient des cellules d'îlots, on observe que la fréquence des diabètes est très diminuée par rapport aux animaux non manipulés.

Question 3. Comment interprétez-vous ce dernier résultat ?

Très récemment, l'équipe a réalisé, sur des souris NOD âgées de 2 à 3 mois, des greffes de thymus eux-mêmes greffés d'îlots du pancréas (Figure 8) :

Figure 8

Thirty to 50 BALB/c pancreatic islets were inoculated with a micropipette into thymuses from newborn NOD mice. These thymuses were thereafter grafted in the mesentery of female NOD mice.



Question 4. Quelle est la différence principale entre cette expérience et la précédente ?

Question 5. Que peut-on attendre de cette expérience ?

Les résultats sont présentés en **Figure 9**. Le pourcentage de souris chez lesquelles un diabète se déclenche a été évalué mois par mois.

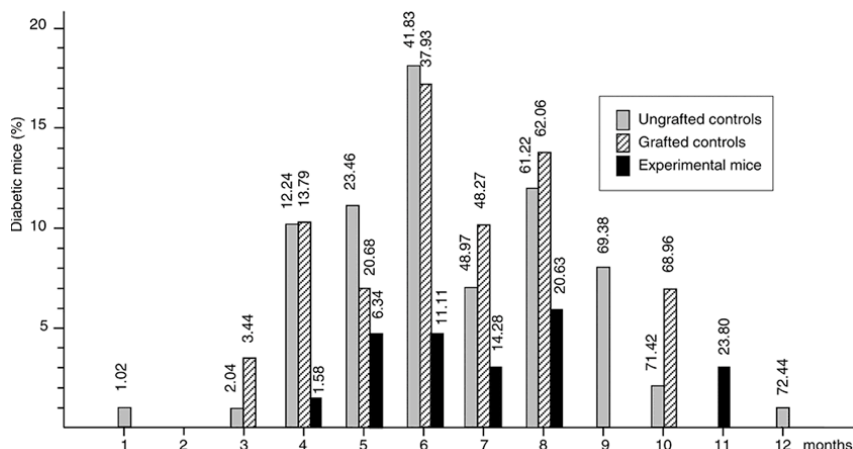


Figure 9

Effect of the transplantation of a newborn NOD thymus with BALB/c pancreatic islets on diabetes incidence in female NOD mice. \square , ungrafted control - unmanipulated NOD mice (n = 98); incidence of the disease at 12 months = 72.44%. \square , grafted controls - NOD mice grafted with newborn thymuses only (n = 29); incidence of the disease at 12 months = 68.96%. \blacksquare , experimental mice - NOD mice grafted with newborn NOD mice thymuses containing BALB/c pancreatic islets (n = 63); incidence of the disease at 12 months = 23.80%.

Question 6. Pouvez-vous donner la conclusion de cette expérience ?

IV. La thyroïdite auto-immune et sa régulation

(d'après Seddon, B. *et al.* (1999) *J. Exp. Med.* 189)

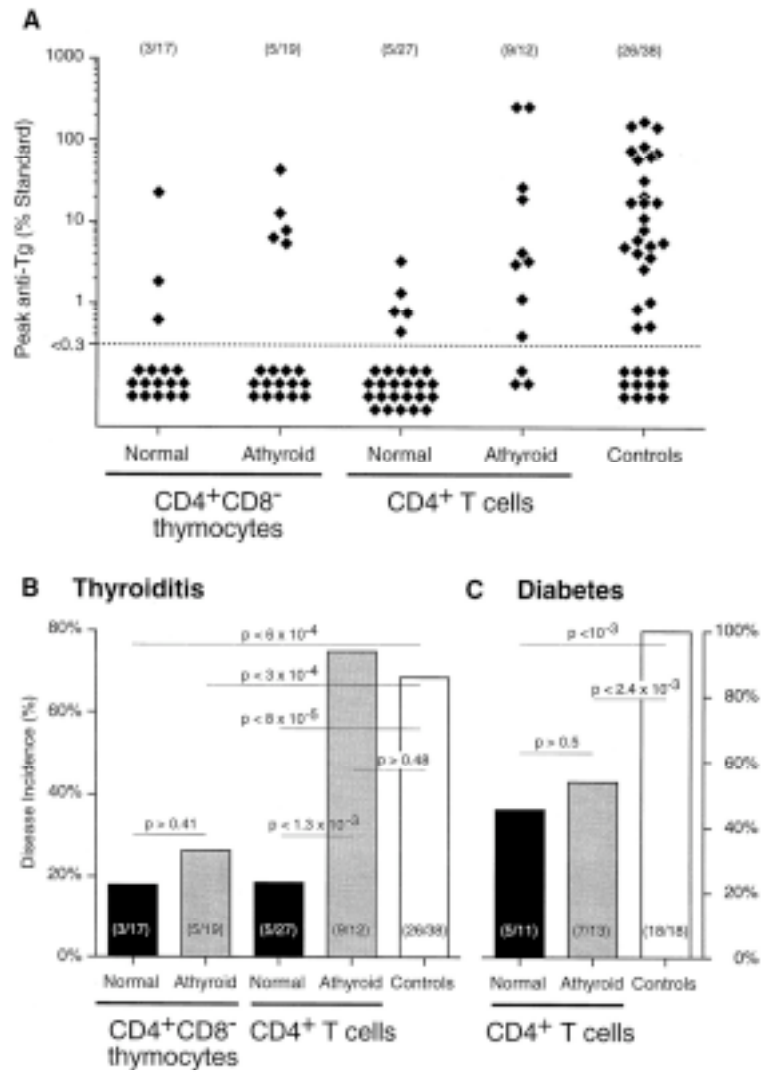
Les rats de souche PVG et PVG.RT1, qui diffèrent uniquement par leur haplotype du CMH, développent après traitement une thyroïdite auto-immune ou un diabète auto-immun, respectivement. Le traitement induisant ces maladies auto-immunes consiste en une thymectomie à l'âge de trois semaines suivie par une série de quatre irradiations à 1000 rads.

Des transferts adoptifs de lymphocytes provenant de rats autologues normaux ou athyroïdes sont réalisés (les rats athyroïdes sont obtenus par injection d'iode radioactive dans la thyroïde d'embryon en gestation) : $5 \cdot 10^6$ thymocytes $CD4^-CD8^-$ ou $7 \cdot 10^4$ lymphocytes T $CD4^+$ sont transférés aux rats PVG et PVG.RT1 peu de temps après la fin du traitement induisant les pathologies auto-immunes.

L'apparition de thyroïdites chez les rats PVG et l'apparition de diabète chez les rats PVG.RT1 est alors évaluée (**Figure 10**).

Figure 10

- A. Pourcentage d'Ac anti thyroglobuline dans le sérum sanguin
- B. Incidence de la maladie – évaluation histologique



Question 1. Quel est l'effet des différents transferts adoptifs sur le développement de la thyroïdite et du diabète ?

Question 2. Comment expliquez-vous ces résultats ?