

TABLE DES MATIERES

LISTE RECAPITULATIVE DES ENSEIGNANTS	2
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	6
TABLE DES MATIERES	15
TABLE DES ILLUSTRATIONS	17
LISTE DES ABRÉVIATIONS EMPLOYEES	18
INTRODUCTION.....	21
PREMIERE PARTIE: LA REPONSE IMMUNITAIRE LORS DE L'ASTHME ALLERGIQUE.....	23
1. La réponse immune adaptative.....	25
1.1. Les acteurs de la réponse immune adaptative : les lymphocytes.....	25
1.2. Les lymphocytes sont subdivisés en deux types : B et T.....	26
1.3. Les lymphocytes T expriment le CD4 ou le CD8.....	27
1.4. Le développement des lymphocytes T CD4 et CD8.....	27
1.5. Le rôle de l'interaction entre le T-Cell Receptor et le Complexe Majeur d'Histocompatibilité dans la réponse immune	28
1.6. La transmission intracellulaire du signal du T-Cell Receptor	29
1.7. Les sous-populations de lymphocytes CD4.....	30
2. L'asthme allergique.....	33
2.1. Les caractéristiques de l'asthme	33
2.2. L'implication de facteurs génétiques et environnementaux	33
2.3. Les acteurs cellulaires et moléculaires.....	35
2.4. Les modèles animaux, indispensables à l'étude de l'asthme.....	39
3. L'étude du contrôle de la réponse IgE	41
3.1. Les modèles de rat LEWIS et Brown Norway.....	41
3.2. Identification d'une région de 117 kb contrôlant la réponse IgE.....	41
3.3. Vav1 comme principal candidat dans le contrôle de la réponse IgE	42
DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA CONSEQUENCE DU POLYMORPHISME DE Vav1 SUR LA REPONSE ALLERGIQUE	43
1. Introduction	45
1.1. Les caractéristiques de la protéine Vav1	45
1.2. Une aide dans l'étude du rôle de Vav1 : la souris Knock-In Vav1 ^{R63W}	47
2. Objectifs du projet de thèse.....	49
3. Matériels et méthodes.....	50
3.1. Modèles Animaux.....	50
3.2. Analyse en cytométrie de flux des populations cellulaires	50
3.3. Purification des lymphocytes T CD4	51
3.4. Mesure de l'activité des lymphocytes T CD4+ naïfs CD62L ^{high} CD44 ^{low}	51
3.4.1. Mesure de la prolifération grâce au marquage au Cell Trace Violet	51
3.4.2. Analyse de la production des cytokines par dosage immunoenzymatique	52
3.5. Mesure de l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs	52
3.6. Modèle d'asthme allergique.....	53
3.7. Modèle de sclérose en plaques.....	53
3.8. Analyse statistique	53
4. Résultats	54
4.1. Impact de la mutation sur les populations lymphocytaires	54

4.2. Caractérisation fonctionnelle des populations de lymphocytes T effecteurs naïfs et de lymphocytes T régulateurs	56
4.3. Etude de la réponse à l'asthme allergique des souris KI Vav1 ^{R63W}	60
4.4. Etude de la réponse à l'Encéphalite Autoimmune Expérimentale des souris KI Vav1 ^{R63W}	64
5. Discussion	65
5.1. Rôles de Vav1 dans le contrôle de la balance Th1/Th2.....	65
5.2. Rôles de Vav1 dans le développement des Treg	66
ANNEXES	77
1. Grille d'évaluation de l'Encéphalite Autoimmune Expérimentale chez la souris	78

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

Fig. 1 : Maturation des lymphocytes dans le thymus.....	28
Fig. 2 : Différenciation en lymphocytes Th1, Th2 et Th17.....	31
Fig. 3 : Prévalence de l'asthme clinique dans le monde	34
Fig. 4 : Mécanismes de l'allergie	38
Fig. 5 : Rôle central des lymphocytes Th2 dans l'asthme.....	39
Fig. 6 : Activité GEF.	45
Fig. 7 : Protéine Vav1	46
Fig. 8 : Impact de la mutation sur les populations lymphocytaires T chez les souris KI Vav1 ^{R63W} comparé aux souris WT.....	55
Fig. 9 : Analyse phénotypique des sous-populations de lymphocytes T.	56
Fig. 10 : Analyse des fonctions des lymphocytes T naïfs.	58
Fig. 11 : Etude de l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs.	59
Fig. 12 : Etude de la réponse inflammatoire dans le cadre d'un modèle d'asthme allergique.	61
Fig. 13 : Etude de la réponse inflammatoire et lymphocytaire dans le cadre d'un modèle d'asthme allergique.	63
Fig. 14 : Etude de la réponse Th1 dans le cadre d'un modèle d'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale.	64
Fig. 15 – annexe 1 : Grille d'évaluation clinique de l'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale classique chez la souris	79

LISTE DES ABREVIATIONS EMPLOYEES

A700 : Alexia 700.
Ac : Acidique.
APC : Allophycocyanine.
CD : Cluster of Differentiation.
Cdc42 : Cell division control protein 42.
CH : Calponin-Homology.
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.
CPTP : Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan.
BCR : B-Cell Receptor.
BN : Brown Norway.
DEREG : Depletion of Regulatory T cell.
DH : DBL-homology.
DMSO : Diméthylsulfoxyde.
DN : Double Négatif.
DP : Double Positif.
EAE : Encéphalite Autoimmune Expérimentale.
FcεRI : Récepteur de haute affinité des IgE.
Foxp3 : Forkhead box p3.
FITC : Fluorescein isothiocyanate.
GAP : GTPase-activating protein.
GATA-3 : Trans-acting T-cell-specific transcription factor.
GDI : Guanine nucleotide-Dissociation Inhibitors.
GDP : Guanosine DiPhosphate.
GEF : Guanine Exchange Factor.
GFP : Green Fluorescent Protein.
GTP : Guanosine TriPhosphate.
GTPase : Guanosine Triphosphatase.
HCP : Hexachlorobenzene.
IL : Interleukine.
IFN : Interféron.
IFR : Institut Fédératif de Recherche.
Ig : Immunoglobuline.
i.n. : intra-nasale.
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.
i.p. : intra-péritonéale.
ITAM : Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif.
KI : Knock-In.
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire.
Lck : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase.
LEW : LEWIS.
LB : Lymphocyte B.
LT : Lymphocyte T.
MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein.
NLS : Nuclear Localization Signal.
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells.
PB : Pacific Blue.
PE-Cy5 : Phycoérythrine-Cyanine 5.
PE-Cy7 : Phycoérythrine-Cyanine 7.

PH : Pleckstrin-Homology.
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase.
PR : Proline-Rich.
R : arginine.
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1.
RhoA : Ras homolog gene family, member A.
ROR γ t : RAR-Related Orphan receptor γ .
SH2 : SRC-homology 2.
SH3 : SRC-homology 3.
SP : Simple Positif.
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription.
SVF : S rum de Veau F tal.
T-bet : T-box expressed in T cells.
TCR : T Cell Receptor.
TGF : Tumor Growth Factor.
Th : lymphocyte T helper.
TNF : Tumor Necrosis Factor.
Treg : lymphocyte T r gulateur.
TSLPR : Thymic Stromal Derived Lymphopoietin Receptor.
VIH : Virus de l'Immunod ficiency Humaine.
W : tryptophane.
WT : Wild Type.
ZAP-70 : ζ -chain-associated protein.
ZF : Zinc-Finger.

INTRODUCTION

Cette thèse vétérinaire a été effectuée dans le cadre d'un Master 2 Recherche « Immunologie et Maladies Infectieuses », au sein de l'équipe « Maladies Inflammatoires du Système Nerveux Central : Mécanismes et Thérapie » du Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan (CPTP) – INSERM U1043.

Le laboratoire dans lequel j'ai été accueillie s'intéresse à l'étude d'une protéine, Vav1, importante dans la régulation de la réponse immunitaire. Pour cette étude, une souris Know-In Vav1^{R63W}, a récemment été générée. L'objectif de mon travail de thèse était la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T (LT) de cette souris et l'étude de son profil de réponse lors d'un asthme allergique.

**PREMIERE PARTIE: LA REPOSE IMMUNITAIRE LORS DE
L'ASTHME ALLERGIQUE**

Le système immunitaire est composé d'effecteurs cellulaires et moléculaires permettant de protéger l'organisme des agents infectieux (virus, bactéries, champignons) et des dommages que ceux-ci causent. Ce système est capable de différencier le soi du non-soi. Il peut ainsi diriger une réponse protectrice innée et adaptative contre le non-soi. D'une part, la réponse innée fait intervenir des barrières physiques et chimiques, le système du complément mais aussi des leucocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles et monocytes), qui permettent au système immunitaire de réagir immédiatement après l'exposition à un organisme pathogène. D'autre part, la réponse adaptative, dirigée par des lymphocytes spécifiques, met plusieurs jours à se mettre en place (Kenneth Murphy et al., 2011). C'est cette réponse immune adaptative qui va nous intéresser ici.

1. La réponse immune adaptative

La réponse immune adaptative est initiée par un antigène, c'est-à-dire une substance capable de se lier spécifiquement à un anticorps ou de générer des fragments reconnus par un T-Cell Receptor (TCR) présent sur les lymphocytes T (LT). L'initiation de la réponse se fait en présence de cellules présentatrices d'antigène, plus particulièrement de cellules dendritiques, au sein d'organes lymphoïdes secondaires que nous allons détailler ultérieurement (Simon et al., 2012).

1.1. Les acteurs de la réponse immune adaptative : les lymphocytes

Le système immunitaire doit être capable de diriger une réponse immunitaire contre une grande variété d'antigènes. Les lymphocytes permettent cette réponse en reconnaissant et en se liant à un antigène qui leur est spécifique. Cette reconnaissance passe par le biais d'une diversité de versions d'un récepteur spécifique d'un antigène à leur surface.

Les lymphocytes sont issus d'un progéniteur lymphoïde commun, présent dans la moelle osseuse. Chaque lymphocyte mature porte un variant unique d'un récepteur d'antigène. Les lymphocytes qui n'ont pas encore été activés par un antigène sont naïfs. Mais dès qu'ils reconnaissent leur antigène spécifique, ils prolifèrent en formant un clone et se différencient pour devenir des lymphocytes fonctionnels, dit lymphocytes effecteurs.

Pour pouvoir être efficace et rencontrer l'antigène qui leur est spécifique, les lymphocytes patrouillent dans l'organisme. Ils circulent dans le sang et la lymphe de tout le corps.

De plus, lors de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative, des lymphocytes sont différenciés en cellules mémoires. Ces cellules permettront une réponse protectrice plus rapide et plus efficace dès la deuxième rencontre avec le même antigène (Yamane and Paul, 2012).

1.2. Les lymphocytes sont subdivisés en deux types : B et T

On distingue deux types de lymphocytes, en fonction du lieu où ils ont été générés : les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB).

Les précurseurs des LT sont générés dans la moelle osseuse. Une fois générés, ces précurseurs migrent et continuent leur maturation et leur prolifération dans l'organe lymphoïde primaire : le thymus. Enfin, les organes lymphoïdes secondaires permettent le maintien des LT naïfs matures ainsi que l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Ces organes sont les nœuds lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

Les LT possèdent un T-Cell Receptor (TCR) qui dirigera la prolifération et la différenciation en cellules effectrices, après la rencontre avec leurs antigènes spécifiques. Les LT coordonnent l'immunité cellulaire en agissant par cytotoxicité directe ou par synthèse de cytokines. Les cytokines sont des petites protéines affectant le comportement des cellules voisines par le biais d'un récepteur de cytokine spécifique. Plus précisément, les cytokines produites par les leucocytes sont appelées interleukines (IL).

Les LB sont, quant à eux, générés et continuent leur maturation dans la moelle osseuse.

Ils sont caractérisés par l'expression d'un B-Cell Receptor (BCR). Ils vont proliférer et se différencier en plasmocytes. Ces cellules matures produiront alors des anticorps, aussi appelés immunoglobulines (Ig), qui sont les formes sécrétées de BCR et qui possèdent la même spécificité antigénique que leur BCR d'origine.

Le rôle des Ig est de neutraliser des virus ou des toxines bactériennes à l'aide des macrophages, de permettre l'opsonisation des agents pathogènes par les macrophages et d'activer la voie du complément permettant de lutter contre les agents pathogènes présents dans le plasma. La structure type des Ig comprend une partie constante et une partie variable, pour la reconnaissance de nombreux antigènes différents. Ces deux parties peuvent être clivées sous l'action de la papaïne et forment alors un fragment constant (Fc) et un fragment variable (Fab). Ils existent plusieurs classes d'Ig qui dépendent de leur fonction effectrice. Ainsi, les IgG1 sont impliqués dans l'opsonisation et la neutralisation tandis que les IgE permettent la sensibilisation des mastocytes. Ils sont également classés en fonction de leur

distribution dans l'organisme. Par exemple, les IgG1 se trouvent dans le plasma et peuvent diffuser en dehors des vaisseaux (Kenneth Murphy et al., 2011).

1.3. Les lymphocytes T expriment le CD4 ou le CD8

A la fin de leur développement thymique, les LT sont divisés en deux classes, différenciées par la présence d'une protéine de surface importante pour leur fonction puisqu'elle détermine le type d'interactions entre les LT et les autres cellules. Cette protéine est un corécepteur : le CD8 ou le CD4. Les cellules qui expriment le CD8 sont cytotoxiques : elles sont capables, une fois activées dans les organes lymphoïdes secondaires, de tuer directement une cellule cible. En revanche, les cellules qui portent le CD4 sont des cellules qui coordonnent la réponse immunitaire. Les CD4 naïfs qui quittent le thymus peuvent devenir des CD4 effecteurs de différents phénotypes, après leur rencontre avec leur antigène spécifique (Hillhouse and Lesage, 2012).

1.4. Le développement des lymphocytes T CD4 et CD8

Lors de la maturation des thymocytes (LT en développement) en LT matures, plusieurs étapes successives sont caractérisées par la présence de marqueurs de surface sur les cellules. La surface des LT reflète donc l'état de maturation de ces cellules. Ces étapes sont également définies par des changements dans le réarrangement des gènes du TCR. Ces réarrangements sont nécessaires pour obtenir une diversité suffisante pour que ce récepteur reconnaisse de nombreux antigènes différents.

Plus précisément, quand les progéniteurs des thymocytes entrent dans le thymus, ils n'expriment aucune molécule de surface des LT matures retrouvés en périphérie et les gènes du TCR ne sont pas réarrangés. En interagissant avec le stroma du thymus, ces progéniteurs se différencient en suivant le lignage des LT.

Les thymocytes sont, tout d'abord, des cellules doubles négatives (DN) parce qu'ils n'expriment ni le CD4 ni le CD8. C'est à ce stade que les gènes du TCR sont réarrangés (stade pré-TCR). Ensuite, vient le stade de thymocytes doubles positifs (DP) où il y a expression de ces deux corécepteurs et d'un TCR mature. Enfin, les thymocytes se différencient en cellules simples positives (SP) exprimant spécifiquement le CD4 ou le CD8 (Sebzda et al., 1999).

Thymocytes totaux

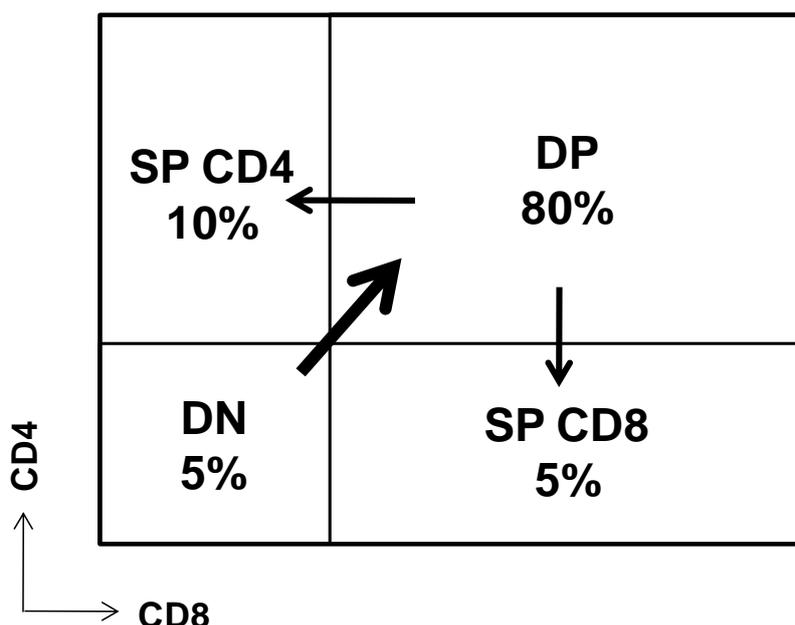


Fig. 1 : **Maturation des lymphocytes dans le thymus.**

Lors de leur maturation dans le thymus, les LT subissent différentes étapes. Ces étapes sont identifiées par la présence de molécules de surface : le CD4 et le CD8. L'analyse en cytométrie en flux des cellules thymiques montre la distribution de ces cellules. Tout d'abord, les cellules sont Doubles Négatives (DN) puis elles expriment les deux protéines de surface : ce sont des cellules Doubles Positives (DP). Enfin, les cellules se différencient en Simples Positives (SP) CD4 ou CD8 (d'après le cours de Joost van-Meerwijk).

De plus, les LT naïfs sont mis en évidence par deux marqueurs. En effet, les LT naïfs expriment fortement la protéine CD62L et faiblement le CD44 (cellules $CD62L^{high} CD44^{low}$) (Godfrey et al., 1993).

Les cellules ayant un CD4 ou un CD8 doivent être contrôlées pour agir uniquement contre des cellules cibles appropriées. La reconnaissance de l'antigène est alors cruciale mais la reconnaissance de la cible passe aussi par d'autres interactions entre les molécules de CD4 et de CD8 sur les LT et les molécules de Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) des cellules cibles (Saito and Watanabe, 1998).

1.5. Le rôle de l'interaction entre le T-Cell Receptor et le Complexe Majeur d'Histocompatibilité dans la réponse immune

Comme nous venons de le voir, chaque LT qui se développe génère un TCR unique par réarrangement des segments de gène de son récepteur lors du stade DN. Ce TCR reconnaît un antigène sous forme de peptide lié au CMH. L'antigène est en fait dégradé à l'intérieur de la cellule infectée et les peptides obtenus sont capturés par les molécules de

CMH. Les complexes ainsi formés par le peptide et le CMH sont exposés à la surface de la cellule, qui devient donc une cible pour les LT.

Deux types de CMH différents existent : le CMH de classe I et le CMH de classe II.

Le CMH de classe I collecte les peptides dérivés de protéines synthétisées dans le cytoplasme et ainsi permet d'exposer des fragments viraux à la surface des cellules. Il est exprimé par la plupart des cellules de l'organisme. Ce sont les cellules CD8 qui sont capables de reconnaître une partie du CMH de classe I et entraînent la mort de la cellule infectée.

Le CMH de classe II est, quant à lui, surtout exprimé par les cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes B). Il se lie à une grande variété de peptides provenant des vésicules intracellulaires de ces cellules. Cela sous-entend que les antigènes ont été phagocytés ou internalisés par endocytose. Les cellules CD4 sont capables de reconnaître un antigène lié au CMH de classe II (Zygmunt and Veldhoen, 2011).

Les TCR et les corécepteurs associés se groupent avec les complexes formés par les peptides antigéniques spécifiques et les CMH au lieu de contact entre le LT et la cellule cible. Ce site de contact s'appelle la synapse immunologique. C'est une structure adaptable, flexible et plastique permettant de regrouper les acteurs impliqués dans la reconnaissance antigène-anticorps (Rodriguez-Fernandez et al., 2010).

1.6. La transmission intracellulaire du signal du T-Cell Receptor

De nombreux récepteurs sont donc présents à la surface des cellules du système immunitaire. Cela leur permet de réagir à l'environnement qui les entoure et de communiquer entre elles. Ces récepteurs cellulaires convertissent une information provenant du milieu extérieur afin de générer des événements intracellulaires biochimiques. Ces événements sont transmis le long d'une voie de signalisation intracellulaire, c'est-à-dire de protéines interagissant les unes avec les autres et formant des complexes multiprotéiques. La propagation de ce signal passe par la conversion régulée en différentes formes biochimiques de toutes ces protéines.

La plupart des enzymes associées à des récepteurs d'activation sont des protéines kinases. Ces protéines catalysent l'attachement réversible d'un groupement phosphate à une protéine : c'est la phosphorylation d'une protéine.

Plus précisément lors de la réponse immune, la signalisation du TCR est initiée par la phosphorylation de motifs ITAM (Immuno-Receptor Tyrosine-based Activation Motif) présents dans la région cytoplasmique de corécepteurs tels que CD3 ϵ . Cette phosphorylation se fait grâce à des kinases de la famille Src. Dans cette famille, il y a, par exemple, la protéine

Lck (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) qui est constitutivement associée au domaine intra-cytoplasmique de CD4 et CD8. Par ailleurs, les motifs ITAM se combinent à des protéines de signalisation telle que ZAP-70 (ζ -chain-associated protein). En fait, lorsque Lck a suffisamment phosphorylé de motifs ITAM au niveau du TCR, elle recrute ZAP-70, ce qui entraîne la phosphorylation et l'activation de Lck (Dai et al., 2012).

Plus loin dans la cascade de signalisation du TCR, l'entrée de calcium (Ca^{2+}) dans la cellule entraîne l'activation d'une famille de facteurs de transcription nommée NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Ces facteurs de transcription peuvent ensuite jouer leur rôle en permettant l'expression de gènes importants dans l'activation des LT, comme le gène de l'IL-2, responsable de leur prolifération et de leur différenciation en cellules effectrices (Kenneth Murphy et al., 2011).

1.7. Les sous-populations de lymphocytes CD4

Au sein des LT CD4 effecteurs, une nouvelle subdivision peut se faire afin de distinguer les fonctions de ces cellules. Il existe des LT CD4 helper (Th) et des LT CD4 régulateurs (Treg).

Les lymphocytes Th fournissent des signaux qui influencent l'activité des autres cellules. Ils dirigent le comportement et la production d'anticorps des LB stimulés par un antigène, par le biais de sécrétion d'interleukines (IL). Initialement, les CD4 Th étaient subdivisés en deux sous-populations : les Th1 et les Th2. Ces différents clones de CD4 étaient principalement différenciés par leur production de cytokines et par leurs molécules de surface. Les cellules Th1 sécrètent principalement de l'IFN γ (interféron γ), de l'IL-2 et du TNF (Tumor Necrosis Factor). A l'inverse, les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-9, de l'IL-10, de l'IL-25 et de l'IL-13.

Maintenant, ces sous-populations de CD4 peuvent également être différenciées par leur facteur de transcription : principalement T-bet pour les Th1 et GATA-3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor) pour les Th2.

Pour ce qui est de leur fonction, les Th1 participent à la défense contre des pathogènes intracellulaires : ils activent les macrophages ayant phagocytés ces pathogènes pour augmenter leur capacité intracellulaire à les détruire. S'ils sont mal régulés, les Th1 peuvent induire des maladies autoimmunes. Les Th2 aident à la réponse contre les pathogènes extracellulaires, en particulier les parasites. Cependant, une réponse Th2 mal contrôlée peut engendrer certaines formes d'allergie, dont l'asthme (Kenneth Murphy et al., 2011).

En 2003, une troisième sous-population de cellules CD4 a été mise en évidence. Ces cellules produisent de l'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22 et ont été nommées Th17 (Steinman, 2007). Le facteur de transcription essentiel de ce sous-type de LT est ROR γ t (RAR-Related Orphan receptor γ). La différenciation en Th17 est induite en présence d'IL-23, d'IL-6 et de TGF- β (Tumor Growth Factor- β). Ces cellules ont un rôle dans l'élimination des pathogènes extracellulaires en permettant le recrutement des neutrophiles et des macrophages dans le tissu infecté. En cas de dérégulation des Th17, ces cellules peuvent être impliquées dans les maladies autoimmunes telles que la sclérose en plaques (Kenneth Murphy et al., 2011).

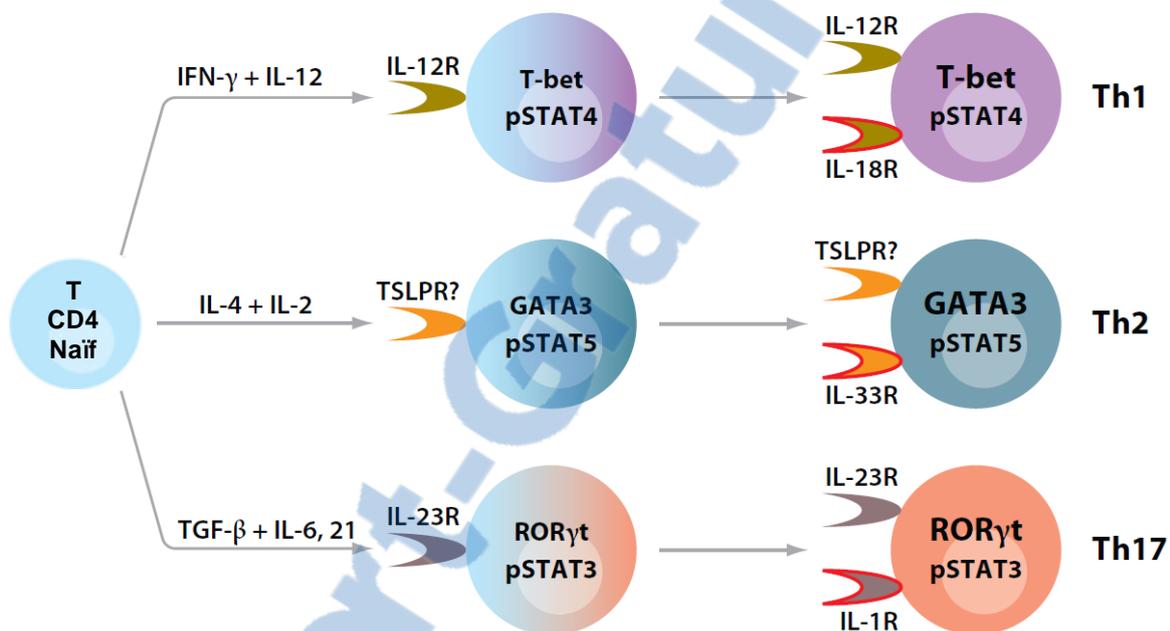


Fig. 2 : Différenciation en lymphocytes Th1, Th2 et Th17

Les cytokines sont des molécules critiques dans la différenciation et la fonction effectrice des Th1, Th2 et Th17. Suite à l'engagement du TCR, les CD4 naïves s'engagent dans différents lignages. Cette différenciation implique l'activation de facteurs de transcription et de protéines STAT. Chaque sous-population de lymphocyte Th exprime un unique récepteur de cytokine. Plus tard dans la différenciation, les cellules expriment plusieurs récepteurs de cytokine. Ainsi, la production de cytokine effectrice induite par les Th finit par se faire de manière indépendante à l'engagement du TCR (Zhu et al., 2010).

Récemment, d'autres sous-populations ont été mises en évidence. C'est le cas des Th22 qui infiltrent le derme des patients atteints de désordres inflammatoires de la peau. Ils sont caractérisés par la sécrétion d'IL-22 et de TNF α .

Pour leur part, les Treg régulent l'activité des lymphocytes et aident au contrôle de la réponse immunitaire. Ce sont des cellules qui permettent donc le maintien de la tolérance immune en contrôlant la balance Th1/Th2 (Sakaguchi et al., 2008). La tolérance immune se définit par un échec dans la réponse à certains antigènes : la tolérance aux antigènes du soi est une caractéristique essentielle du système immunitaire. Si cette tolérance est perdue, c'est-à-dire que la régulation par les Treg n'est plus efficace, le système immunitaire s'attaque aux

constituants de l'organisme et déclenche une maladie auto-immune. Ces Treg sont caractérisés par l'expression du marqueur de surface CD25 et du facteur de transcription Foxp3. Ils sécrètent de l'IL-10 et du TGFβ et sont générés à différents endroits. Dans le thymus, ce sont des Treg naturels tandis qu'en périphérie, à partir de cellules CD4 naïves et suite à l'exposition à un antigène particulier, des Treg dits induits sont générés (Bluestone and Abbas, 2003).

En résumé, les LT CD4 jouent un rôle central dans le système immunitaire. Ils sont capables d'aider les LB à produire des anticorps, d'engager et de maintenir une réponse cytotoxique CD8, de coordonner la réponse immune vis-à-vis d'organismes pathogènes très variés et de réguler voire de supprimer la réponse immune ainsi que l'auto-immunité. Ce sont les CD4 qui ajustent la force et le maintien de cette réponse. Par contre, un nombre insuffisant de ces cellules entraîne le développement de maladies. Par exemple, quand les personnes atteintes du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ont moins de 200 cellules/mm³, des maladies opportunistes se développent (Zhu et al., 2010).

La quantité de CD4 est donc un critère important pour un système immunitaire efficace. Cependant, la qualité de ces cellules est également primordiale. En effet, les cellules Th1 et Th2 ont des fonctions distinctes et une dérégulation de l'une ou de l'autre entraîne différentes maladies, telles que l'asthme (Gomes et al., 2007).

2. L'asthme allergique

2.1. Les caractéristiques de l'asthme

L'asthme allergique représente, aujourd'hui plus que jamais, un enjeu de santé publique. En effet, cette maladie touche 300 millions de personnes, partout à travers le monde et sa prévalence a augmenté, surtout dans les pays développés (Juhn, 2012). C'est la plus fréquente des maladies chroniques chez les enfants. Les traitements actuellement disponibles sont des traitements symptomatiques, comme des inhalations de corticoïdes, d'où l'importance de la recherche de nouvelles voies thérapeutiques pour lutter contre cette maladie.

L'asthme se définit comme une maladie inflammatoire chronique des poumons. Deux formes d'asthme existent : un asthme allergique et un asthme non allergique. Ils se différencient par la présence d'immunoglobuline IgE spécifique d'allergènes dans les poumons dans le cas de l'asthme allergique (Hammad and Lambrecht, 2008). Cependant, ces deux formes se caractérisent par une accumulation des lymphocytes Th2. Dans le cadre de l'asthme, les cellules Th2 produisent principalement de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-13 et du TNF (Hammad and Lambrecht, 2008). Une inflammation se met alors en place par le biais de ces Th2 mais aussi de cellules dendritiques, de macrophages, de cellules Natural Killer, de mastocytes, de basophiles, d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes B (IgE spécifique de l'antigène). Il y a alors une accumulation des cellules inflammatoires : éosinophiles, neutrophiles, mastocytes et macrophages (Joetham et al., 2007).

2.2. L'implication de facteurs génétiques et environnementaux

Le développement d'asthme allergique est dépendant de facteurs génétiques (Cookson, 1999) et environnementaux (Busse and Lemanske, 2001). En effet, chez les sujets génétiquement prédisposés, l'exposition à un stimulus, comme une substance allergène (ex : le pollen, la fumée de cigarette, les infections virales, les stimuli physiques comme de l'exercice ou de l'air froid, des médicaments comme l'aspirine) peut induire ou exacerber la maladie (Hammad and Lambrecht, 2008).

L'atopie se définit comme la prédisposition génétique à devenir sensible et à produire des anticorps de classe IgE en réponse à l'exposition à des allergènes. L'atopie peut se caractériser soit par une réaction cutanée aux allergènes communs, soit par une augmentation de la concentration sérique des IgE, soit par la présence d'IgE spécifiques d'allergènes dans le sang (Gerrard et al., 1978).

Les manifestations cliniques de l'atopie sont variées : asthme allergique, rhinite allergique, conjonctivite allergique, allergies alimentaires, allergies aux piqûres d'insectes, dermatite atopique. Le rôle des facteurs génétiques a été démontré dans ces désordres immunologiques par des études familiales et chez des jumeaux montrant une liaison plus élevée chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux hétérozygotes (Duffy et al., 1990). L'étude de familles atopiques a permis d'identifier de nombreuses régions génétiques associées aux phénotypes allergiques (par exemple : 2q, 5q, 6p, 11q, 12q, 16q, 17q) (Blumenthal, 2005).

Dans les pays développés, 30% de la population est atopique, mais seulement 10-12% de la population souffrent d'asthme. Il est donc crucial d'identifier les facteurs prédisposants, génétiques et environnementaux, qui entraînent le développement de l'asthme chez les individus sensibilisés (Hammad and Lambrecht, 2008).

Les facteurs environnementaux sont rendus responsables de l'augmentation de prévalence de la maladie (Toelle et al., 2004). Pour expliquer cette augmentation, une théorie est communément admise : l'hypothèse hygiéniste. Elle a été émise afin d'essayer d'expliquer les différences de prévalence de l'atopie entre des populations issues de milieux géographiques et socioéconomiques différents, comme on peut le voir sur la carte qui suit (Holt, 2000).

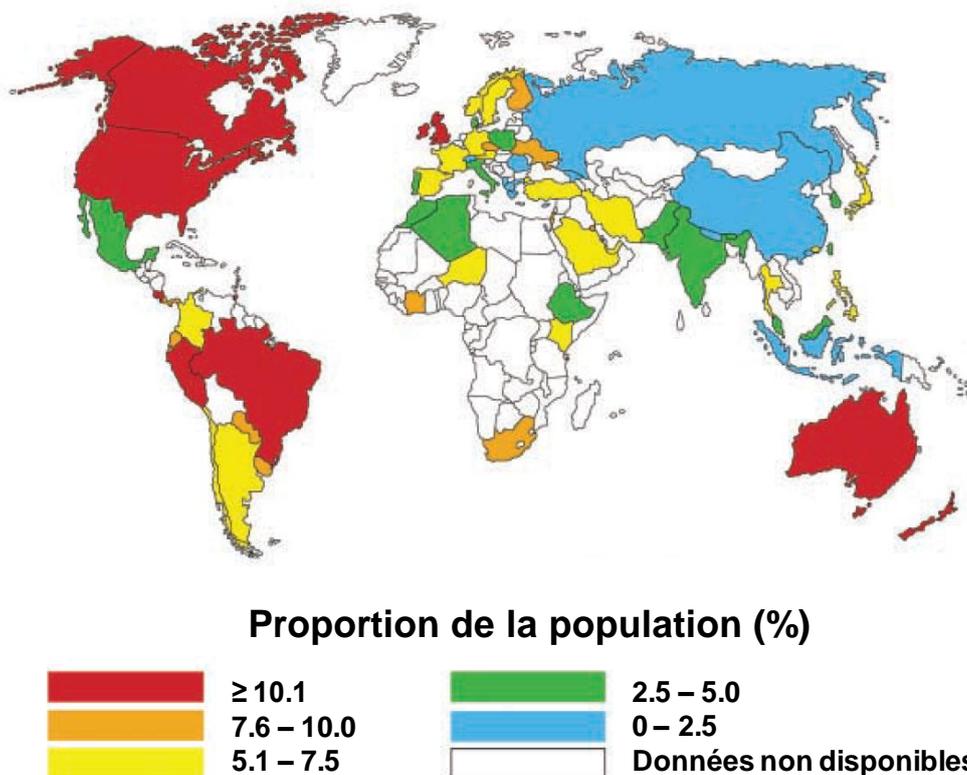


Fig. 3 : Prévalence de l'asthme clinique dans le monde

La carte du monde présentée met en évidence la proportion de population atteinte d'asthme. Un gradient est ainsi mis en évidence : les personnes habitant dans des pays industrialisés sont plus atteintes d'asthme que les autres. De plus, un gradient Nord-Sud semble se dessiner, avec plus de personnes asthmatiques dans le Nord que dans le Sud (Masoli et al., 2004).

Cette hypothèse hygiéniste permet d'expliquer le développement inapproprié des réponses de type Th2 par une diminution de réponse de type Th1 en rapport avec une exposition insuffisante aux microorganismes. Ainsi, des études ont montré que certains agents infectieux pouvaient induire une réponse immunitaire de profil Th1 et que l'absence de ce type d'infections pourrait être responsable d'une déviation immune vers un profil Th2 et donc, plus généralement, d'une augmentation de la prévalence des maladies allergiques, comme l'asthme, dans les pays industrialisés (Holt, 1996).

Ainsi, la présence d'animaux fermiers ou domestiques et la vie au sein d'une grande famille semblent être des éléments jouant un rôle protecteur vis-à-vis de la survenue des maladies allergiques (Ball et al., 2000). Pourtant, un enfant qui naît pendant la saison des pollens ou en contact avec la poussière semble développer des maladies allergiques plus facilement qu'un autre (Cookson, 1999). Le mécanisme par lequel une sous-exposition à des pathogènes favorise une augmentation de la prévalence des maladies allergiques reste controversé (Romagnani, 2004).

Cependant, l'hypothèse hygiéniste permet d'expliquer les réponses allergiques, par le biais soit d'une déviation immune Th1/Th2 soit d'une régulation immune par les Treg ou des deux. En effet, face à cette hypothèse de déviation immune fondée sur le paradigme Th1/Th2, une autre hypothèse a été émise: une régulation immune, dans laquelle le rôle des Treg, agissant à la fois sur les réponses Th1 et Th2, pourrait augmenter les réponses Th2 mises en évidence dans les allergies (Romagnani, 2004).

2.3. Les acteurs cellulaires et moléculaires

L'asthme est un désordre inflammatoire chronique de la muqueuse bronchique, s'étendant de l'épithélium cilié aux tissus sous-jacents et aux muscles lisses. Il peut avoir des manifestations cliniques variées comme les éternuements, les difficultés respiratoires, la toux, le nez et les yeux qui coulent, la dyspnée... avec un degré et une fréquence variables (Kumar and Ghosh, 2009). C'est ici une inflammation des voies respiratoires par défaut de contractibilité des muscles lisses, une oppression thoracique et une hyperréactivité bronchique qui est mise en évidence. Cette hyperréactivité bronchique se traduit par une respiration sifflante avec toux, reflétant un degré variable d'obstruction du débit d'air à travers les bronches (Graham, 2006). Plus précisément, l'asthme allergique résulte d'une réponse

immunitaire Th2 aberrante à des allergènes inhalés. Le rôle des LTh2 dans l'induction et la maintenance de réponse inflammatoire dans les poumons est démontré par la présence de cellules Th2 dans les voies respiratoires de patients asthmatiques. Leur importance a été confirmée dans les modèles animaux (Gomes et al., 2007).

La cascade allergique fait intervenir différents acteurs cellulaires et moléculaires. Les cellules présentatrices d'antigène, plus particulièrement les cellules dendritiques, démarrent le processus pathologique. Les cellules dendritiques des voies respiratoires contrôlent la réponse immunitaire. Ce sont ces cellules qui détectent un nouvel antigène en le captant puis qui migrent, dans les 12 heures qui suivent le contact, vers les nœuds lymphatiques médiastinaux (Vermaelen et al., 2001).

Les lymphocytes Th2 sont responsables de l'induction de la survie et du recrutement des éosinophiles et des mastocytes, de l'induction de l'hyperplasie des cellules de goblet et causent une hyperréactivité bronchique (Hammad and Lambrecht, 2008). Cette hyperréactivité bronchique, induite par l'IL-9 et l'IL-13, est le résultat du changement de l'excitabilité des muscles lisses bronchiques, conduisant à une bronchoconstriction en réponse à divers stimuli non spécifiques, comme l'air froid ou l'activité physique.

Dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et les sera des patients atteints d'asthme, une augmentation d'IL-17 dans les poumons a été décrite (Wong et al., 2001) (Molet et al., 2001). Plus précisément, la quantité d'IL-17 est liée au degré de sévérité de l'hyperréactivité bronchique chez les malades (Barczyk et al., 2003). Les Th17 sont aussi responsables de l'inflammation neutrophilique avec la surexpression d'IL-17A dans les voies respiratoires des asthmatiques (Holgate and Polosa, 2008).

L'IL-4 et l'IL-13 sont responsables d'une commutation isotypique des lymphocytes B (production d'IgE à la place d'IgG) ; l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) de la maturation des éosinophiles ; l'IL-21 favorise la prolifération des LB et des LT principalement ; enfin, l'IL-3 et l'IL-4 permettent la maturation des basophiles (Holgate and Polosa, 2008). Le premier mécanisme, entraînant l'obstruction des voies respiratoires dans l'asthme allergique, est associé à une réponse d'hypersensibilité immédiate de type 1 menée par les IgE.

La réaction d'hypersensibilité de type I qui se met alors en place entraîne la dégranulation des mastocytes, la synthèse de médiateurs lipidiques et, dans une phase plus tardive, le recrutement et l'activation d'éosinophiles et de lymphocytes Th2 caractérisant les infiltrats allergiques.

Les IgE, produites par des lymphocytes B activés par l'IL-4, vont se fixer sur les récepteurs membranaires de forte affinité pour le fragment Fc des IgE (FcεRI) exprimés par les cellules effectrices telles que les mastocytes et les éosinophiles (Daniels and Shirakawa, 1994). Chez un patient déjà immunisé, une rencontre supplémentaire avec l'antigène entraîne une activation cellulaire, une dégranulation des mastocytes et la libération de nombreuses molécules inflammatoires toxiques conduisant à l'obstruction des voies respiratoires (Wills-Karp, 1999). L'IgE est donc le médiateur majeur des réactions allergiques.

Par ailleurs, les études d'asthme réalisés sur des modèles murins ont mis en évidence la capacité des LT CD4 à supprimer la production d'IgE spécifique de l'antigène (Curotto de Lafaille et al., 2001). De plus, les Treg CD4 CD25 provenant de patients atteints de rhinite ont une fonction suppressive diminuée (Ling et al, 2004). Ainsi, chez la souris, le transfert de cellules Th2 après déplétion des Treg CD4 CD25 augmente l'éosinophilie (Jaffar et al., 2004). Enfin, une souris double transgénique DO11.10, exprimant les LT de l'épithélium pulmonaire avec un récepteur spécifique de l'ovalbumine (OVA) a été mise au point. Cette souris a permis de mettre en évidence des infiltrats de cellules Treg CD4 CD25 au niveau des poumons. Ces cellules peuvent inhiber la prolifération de cellules T CD4 CD25- *in vitro*. Le transfert de Treg CD4 CD25 de cette souris à une souris sauvage inhibe l'hyperréactivité respiratoire, l'éosinophilie et la réponse Th2 (Kearley et al., 2005). Cela confirme le rôle des Treg dans la réponse à l'asthme.

Pour être complet, il faut citer une deuxième voie conduisant à l'obstruction des voies respiratoires qui a été identifiée chez des souris déficientes en IgE. Cette voie fait intervenir une réponse d'hypersensibilité de type 4, menée par des cytokines Th2 comme l'IL-4 et l'IL-13 (Corry et al., 1998).

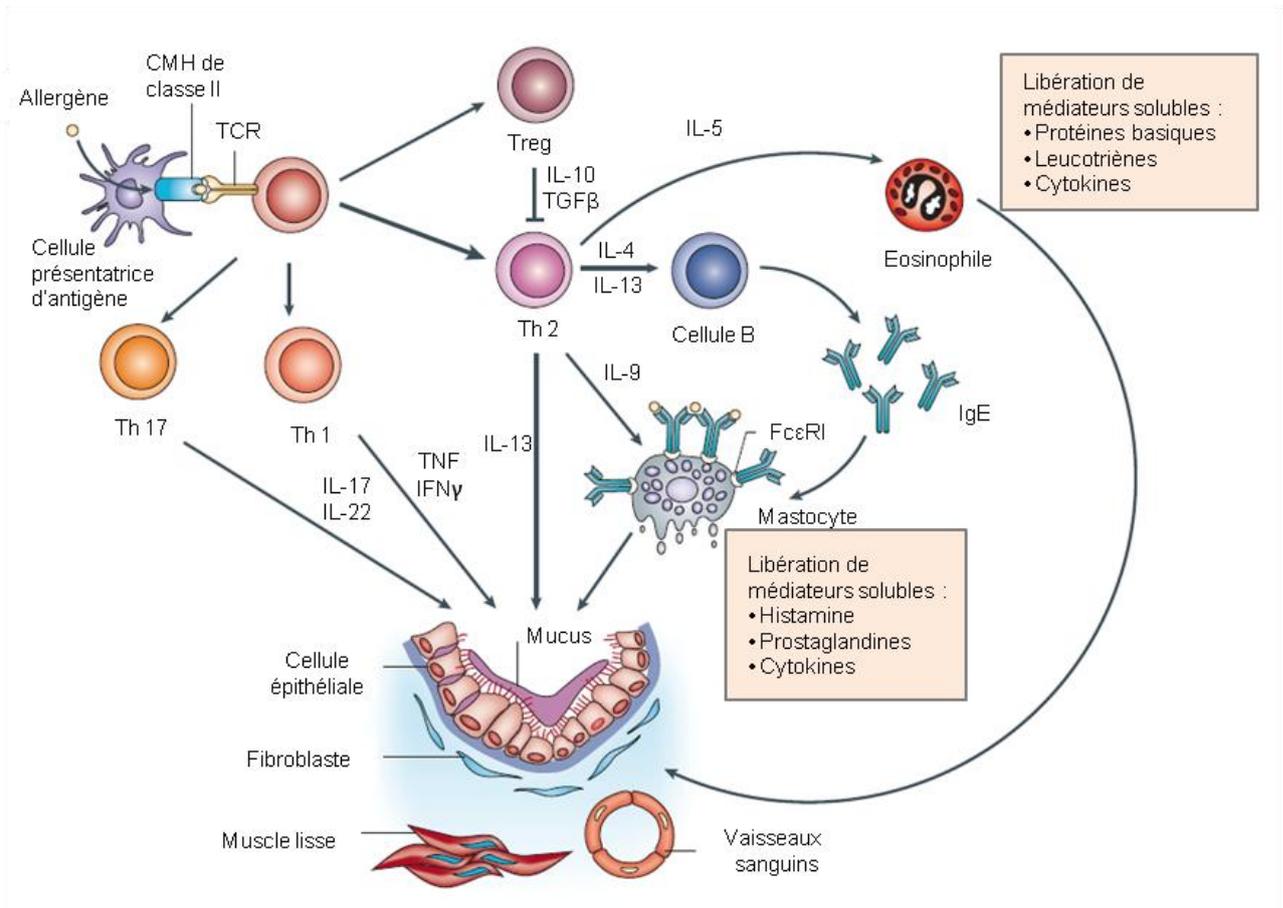


Fig. 4 : Mécanismes de l'allergie

Chez les individus prédisposés, l'exposition d'un allergène à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène entraîne l'activation de cellules Th2 et la production d'IgE, caractéristiques de l'asthme allergique. Il y a alors développement d'une réponse inflammatoire. Dans la phase précoce de l'allergie, la dégranulation des mastocytes, conséquence de la présence d'IgE, entraîne le relargage d'histamine, de leucotriènes et de cytokines. Ces molécules sont responsables de la perméabilité vasculaire, de la contraction des muscles lisses et de la production de mucus. Dans la phase tardive, les cytokines produites par les mastocytes permettent le recrutement des autres cellules inflammatoires : les éosinophiles et les lymphocytes Th2. Les éosinophiles sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires, plus particulièrement, des leucotriènes, des protéines basiques (protéines cationiques, peroxydase, protéine basique majeure et neurotoxine) et d'IL-3, d'IL-5 et d'IL-13 (Holgate and Polosa, 2008).

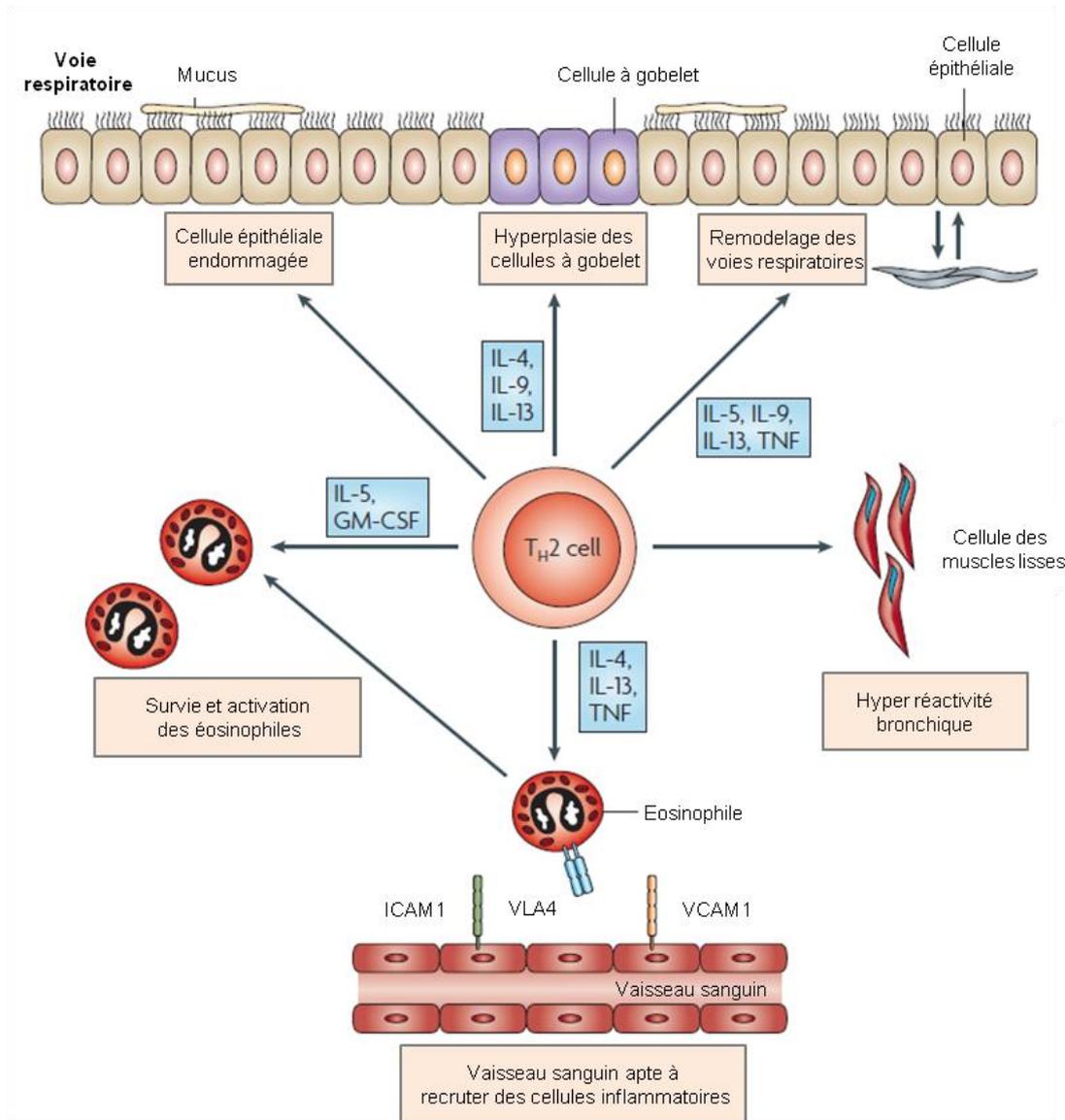


Fig. 5 : Rôle central des lymphocytes Th2 dans l'asthme

Sont ici représentés les différents rôles des lymphocytes Th2. La sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL-9, d'IL-13 et de TNF par ces cellules entraîne différents effets, caractéristiques de l'asthme. Par exemple, l'hyperplasie des cellules à gobelet, le remodelage des voies respiratoires et l'hyperréactivité bronchique. De plus, ces cytokines entraînent des changements au niveau des vaisseaux sanguins : il y a une surexpression d'ICAM1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) et de VCAM1 (Vascular Cell-Adhesion Molecule 1). Ces molécules permettent l'expression de VLA-4 (Very Late Antigen 4) à la surface des éosinophiles. Enfin, l'IL-4 et l'IL-13 sont responsables de la commutation isotypique des LB, qui permettent la production d'IgE. Les cytokines Th2 contrôlent également la stimulation du dépôt de collagène (Hammad and Lambrecht, 2008).

2.4. Les modèles animaux, indispensables à l'étude de l'asthme

L'asthme, et plus généralement l'allergie, font partie des maladies complexes parce qu'elles résultent de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Son étude chez l'Homme est donc difficile, de part la variabilité génétique et environnementale qui existe. Les modèles animaux permettent de contourner ces difficultés par l'utilisation de

lignées pures pour le contrôle des facteurs génétiques, dans des conditions standardisées afin de se placer dans un environnement contrôlé.

Par ailleurs, dans les modèles de l'asthme, des modélisations mathématiques d'analyse du flux d'air sont insuffisantes car elles ne peuvent pas tenir compte de la réponse immunitaire mise en place par l'organisme pour lutter contre la maladie.

Les modèles animaux permettent donc réaliser des études fonctionnelles dans des conditions environnementales définies. Cela permet de mettre en évidence des gènes associés à des maladies et de préciser la pathogenèse.

Pour comprendre le rôle des facteurs génétiques impliqués dans l'asthme allergique, nous allons nous intéresser au contrôle génétique de la réponse IgE.

3. L'étude du contrôle de la réponse IgE

3.1. Les modèles de rat LEWIS et Brown Norway

Mon équipe d'accueil a étudié le contrôle génétique qui influence l'équilibre entre les différents types de réponse immunitaire grâce aux modèles de rats LEWIS (LEW) et Brown Norway (BN). Ces deux lignées de rats diffèrent dans les profils de réponse immunitaire développée suite à une stimulation et représentent donc un bon modèle dans l'étude des réponses immunitaires associées à l'allergie. En effet, les rats BN développent plutôt des réponses de type Th2 tandis que les rats LEW plutôt des réponses de type Th1 (Fournie et al., 2001).

Pour mettre en évidence ce profil plutôt Th1 du rat LEW et plutôt Th2 du rat BN, des mesures de production d'IFN γ et d'IL-4 par méthode immuno-enzymatique ont été réalisées dans un contexte de maladie Th2, l'injection de composé immunotoxique : l'hexachlorobenzène (HCB). Lors d'exposition au HCB, le rat LEW produit plus d'IFN γ que le rat BN et quand les concentrations d'HCB augmentent, la production d'IFN γ diminue chez le rat LEW et augmente chez le rat BN. Par contre, la quantité d'IL-4 reste stable chez le rat BN mais diminue chez le rat LEW, bien que chez ce dernier, la quantité d'IL-4 est plus élevée sans exposition au HCB (Vandebriel et al., 2000).

Pour étudier la réponse allergique de ces rats, un modèle d'injection de sels de mercure a été utilisé. Chez le rat BN, l'injection de ces sels entraîne une activation polyclonale des lymphocytes B, associée à une augmentation importante des taux d'IgE sériques (Pelletier et al., 1986). La réponse IgE induite est conduite par des cellules T, caractérisées par leur capacité à sécréter des cytokines de type Th2 (Saoudi et al., 1995). Les rats LEW sont, quant à eux, résistants à l'induction d'IgE par les sels de mercure.

3.2. Identification d'une région de 117 kb contrôlant la réponse IgE

Une dissection génétique à l'aide des lignées de rats congéniques BN.LEW a permis d'identifier une région de 117 kilobases (kb) sur le chromosome 9 qui contrôle la réponse IgE aux sels de mercure, nommée *Iresp3*. Cette région contient 4 gènes : *C3*, le gène du précurseur 3 du complément ; *Gpr 108* celui de la protéine G couplée au récepteur 108 ; *Cip4/trip10* le gène de Cdc42-interacting protein 4 et l'exon 1 à 15 de *Vav1*. Deux polymorphismes non synonymes entre les différentes lignées de rats congéniques ont été découverts dans cette région de 117 kb (Colacios et al., 2011). Ces polymorphismes se

trouvent sur l'exon 32 de *C3* et l'exon1 de *Vav1* et font de ces gènes des candidats responsables du contrôle de la réponse IgE.

C3 joue plusieurs rôles dans la fonction des lymphocytes de type Th2, dont la réponse IgE dans l'asthme qui a déjà été décrite (Drouin et al., 2001). En revanche, il a été démontré que la déplétion du complément n'a pas d'effet sur la réponse à l'injection de sels de mercure (Capron et al., 1982). Le polymorphisme de *Vav1* reste donc le candidat le plus pertinent pour le contrôle de la réponse IgE dans le modèle d'injection des sels de mercure.

3.3. Vav1 comme principal candidat dans le contrôle de la réponse IgE

Plus précisément, le polymorphisme découvert sur le gène *Vav1* entre le rat LEW et BN se trouve en position 63. Chez le rat BN, qui est sensible aux maladies de type Th2 et qui développe une réponse IgE exacerbée, le gène *Vav1* possède un tryptophane en position 63 (noté W63). Par contre, le rat LEW, résistant aux maladies de type Th2, possède un variant différent du gène *Vav1* : une arginine en position 63 (noté R63). La protéine Vav1 semble donc jouer un rôle important dans la réponse allergique.

De plus, son rôle clé dans la signalisation du TCR fait que *Vav1* permettrait d'expliquer les différences phénotypiques mises en évidence entre le rat LEW et BN. En effet, en affectant la signalisation du TCR, le polymorphisme de *Vav1* peut modifier l'activation des LT.

Nous allons maintenant détailler les caractéristiques de la protéine Vav1, essentielle à la réponse immunitaire.

**DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA CONSEQUENCE DU
POLYMORPHISME DE Vav1 SUR LA REPONSE ALLERGIQUE**

1. Introduction

1.1. Les caractéristiques de la protéine Vav1

Il existe trois protéines Vav : Vav1, 2 et 3. Vav1 n'est exprimée que par les cellules hématopoïétiques tandis que les protéines Vav2 et 3 sont ubiquitaires. L'expression de Vav1 est inductible par phosphorylation de tyrosine suite à la stimulation des cellules LT et LB. De plus, Vav1 est recrutée après l'engagement du TCR et du BCR (Miletic et al., 2006).

Lors de sa découverte, la protéine VAV1 a été mise en évidence au sein d'adénocarcinomes du pancréas. Elle a été qualifiée d'oncogène à cause de cette expression ectopique. La présence de Vav1 dans ce type de cancer entraîne la suractivation des voies de signalisations pro-mitogéniques et anti-apoptotiques, et est de mauvais pronostic.

Vav1 possède deux fonctions complémentaires puisqu'elle joue le rôle de protéine adaptatrice, ce qui permet d'induire la signalisation du TCR et elle possède une fonction de facteur d'échange nucléotidique (GEF), responsable de l'activation de petites GTPases de la famille de Rho (Turner and Billadeau, 2002).

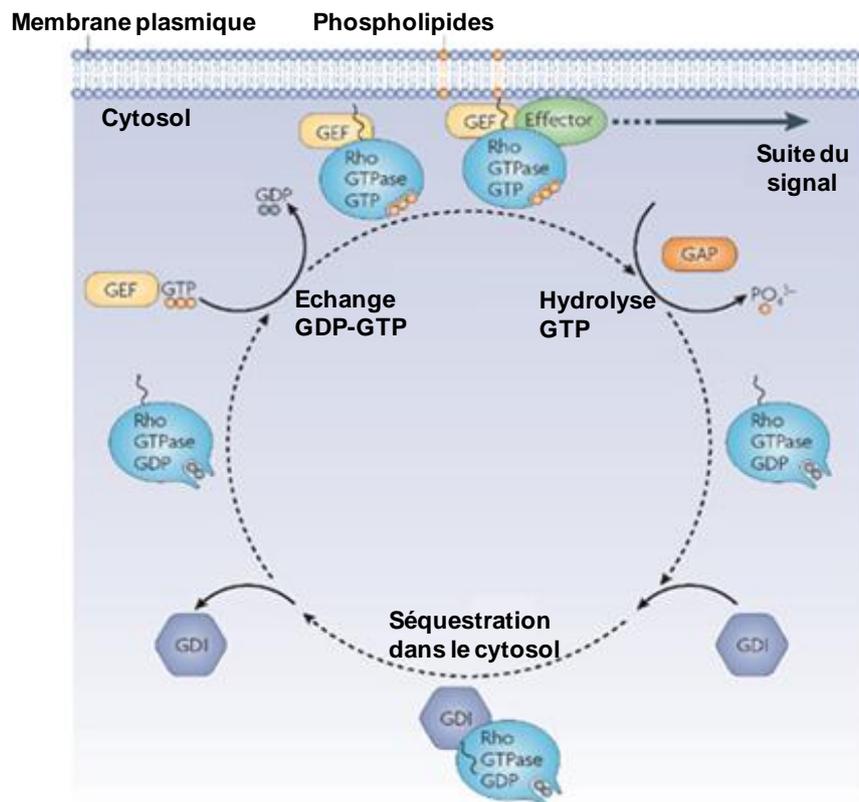


Fig. 6 : **Activité GEF.**

Les molécules de la famille des Rho GTPases peuvent être sous forme actives, liées à un GTP au niveau des membranes plasmiques ou sous forme inactives, liées à un GDP au niveau du cytoplasme. La liaison avec un GTP entraîne un changement de conformation, responsable de l'inactivation de voies de signalisation. L'activité GTPase de ces protéines est régulée à trois niveaux : l'échange du GDP en GTP, l'hydrolyse du GTP et l'inhibition de la dissociation du GDP. L'activation des Rho GTPases passe par l'échange d'un GDP par un

GTP, grâce à des protéines GEFs. Pour revenir à la forme inactive, les GAPs (GTPase-activating protéines) hydrolysent le GTP. Les GDIs (guanine nucleotide-dissociation inhibitors) bloquent le relargage du GDP par les GTPases et préviennent la translocation des GTPases en entraînant leur séquestration dans le cytoplasme. Certaines GEFs sont spécifiques d'une Rho GTPases tandis que d'autres activent plusieurs Rho GTPases différentes. De plus, les GTPases sont restreintes à un tissu ou à un stade du développement. Les régulateurs des GTPases définissent donc les voies de signalisation à inhiber (Iden and Collard, 2008).

Vav1 présente plusieurs domaines afin d'exercer ses fonctions, qui sont :

- le domaine calponin-homology (CH) pour la régulation du domaine DH,
- le domaine acide (Ac) pour l'auto-inhibition de l'activité GEF,
- le domaine DBL-homology (DH) pour l'activité GEF,
- le domaine pleckstrin-homology (PH) pour la localisation membranaire de la protéine,
- le domaine zinc-finger (ZF) pour le contrôle de l'activité GEF,
- le domaine proline-rich (PR) pour la liaison via le domaine SH3,
- les deux domaines SRC-homology 3 (SH3) pour les interactions des domaines riches en proline,
- le domaine SRC-homology 2 (SH2) pour la liaison via les résidus de tyrosine phosphorylés,
- le domaine NLS (Nuclear Localization Signal) pour une localisation nucléaire de Vav1 (Turner and Billadeau, 2002).

La structure schématique de Vav1 est détaillée dans la figure suivante.

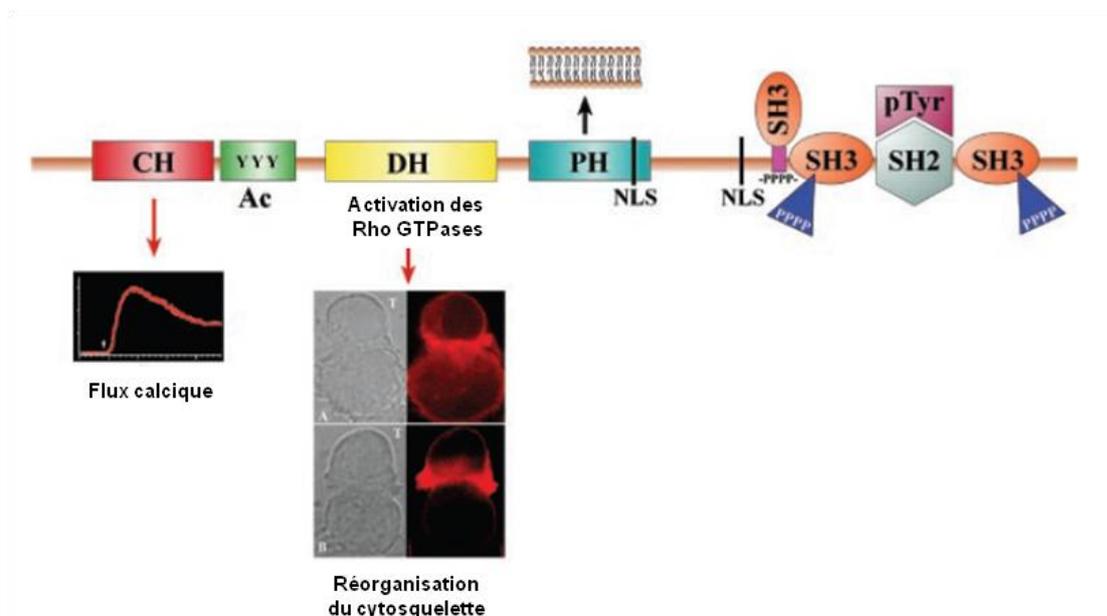


Fig. 7 : Protéine Vav1

La protéine Vav1 joue deux rôles : elle possède une activité GEF et est protéine adaptatrice. Elle est composée de différents domaines afin de jouer ces deux rôles. Le domaine CH est impliqué dans la régulation du flux calcique et du domaine DH. Le domaine Ac régule l'activité GEF par le biais de phosphorylation. Le domaine DH permet la réorganisation du cytosquelette grâce au transfert d'un GTP à la place d'un GDP sur une protéine

de la famille des Rho GTPases, comme on peut le voir sur les images de microscopie confocale. Des cellules de lignée tumorale de lymphocytes T, les cellules Jurkat (T) ont été incubées 15 min à 37°C en présence de cellules présentatrices d'antigène (B : lymphocyte B). Les cellules présentatrices d'antigène ont été pré-incubées avec du milieu seul (panel supérieur) ou avec un super-antigène d'entérotoxine E de *Staphylococcus* (panel inférieur). L'actine-F est marquée en rouge (Alexa546-phalloïdine). Le domaine PH se lie à la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), permettant de générer des lipides aidant à la localisation sur la face interne de la membrane plasmique de la cellule. Le domaine PR est riche en proline, pour permettre à Vav1 de se lier à des protéines portant un domaine SH3. Le domaine SH3 permet l'interaction avec des protéines ayant un domaine riche en proline. Enfin, le domaine SH2 favorise les interactions tyrosines phosphorylées. Le motif NLS permet la translocation au noyau de la protéine (Katzav, 2004).

Pour contrôler la réponse cellulaire, un des mécanismes utilisé par Vav1 est l'activation de GTPases telles que Rac1, RhoA et Cdc42. Ces GTPases, de la famille de Rho, activées par Vav1 ont des fonctions très importantes telles que l'organisation du cytosquelette et la mobilité. Elles sont importantes dans la génération et la maturation de récepteurs et donc pour la régulation de la signalisation des cellules (Turner and Billadeau, 2002). La fonction catalytique de Vav1 comme GEF par les GTPases de la famille de Rho est donc la clé du transfert du signal du TCR activé par Ras jusqu'au cytosquelette (Katzav, 2004).

Par ailleurs, la tyrosine en position 174 (au sein du domaine Ac) est essentielle pour le maintien de l'inhibition des domaines DH dans le développement et la maturation des cellules T. La fonction GEF est constitutivement activée et modifie l'organisation de la synapse immunologique. Elle est responsable du défaut dans le développement et la prolifération des cellules T (Miletic et al., 2006).

Enfin, Vav1 induit le relargage de calcium grâce à son domaine CH et comporte un site de liaison à ZAP70, qui joue un rôle crucial dans la transduction du signal mené par l'antigène (Katzav, 2004). Elle est également capable de se lier à d'autres protéines aux fonctions adaptatrices telles que Grb2 et SLP76. Puisque ZAP70, Grb2, SLP76 appartiennent au même signalosome, Vav1 participerait à un complexe multiprotéique.

Ainsi, les souris déficientes en Vav1 présentent un défaut de flux calcique en réponse à l'engagement du TCR et produisent principalement des cytokines de type Th1. Le développement de leur LT est partiellement bloqué au stade pré-TCR, dans le thymus et fortement bloqué en sélection positive et négative des LT. La délétion de Vav1 est ainsi responsable d'un défaut de LT mature en périphérie (Houlard et al., 2002).

1.2. Une aide dans l'étude du rôle de Vav1 : la souris Knock-In Vav1^{R63W}

Pour apporter la preuve définitive que le polymorphisme de *Vav1* est impliqué dans la différence de sensibilité des rats LEW et BN aux manifestations allergiques, une souris Knock-In (KI) Vav1^{R63W} a été générée grâce à une collaboration avec le Dr. B.Malissen, à

Marseille. Sur un fond génétique C57BL/6, la mutation R63W a été introduite par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires.

La technique du Knock-In a ici été choisie car elle permet le remplacement d'un gène par un autre. En effet, malgré une modification, l'environnement génétique autour du gène d'intérêt est conservé : on étudie donc directement la fonction du gène.

2. Objectifs du projet de thèse

Sur la base des résultats qui viennent d'être présentés, mon projet a eu pour objectif principal d'analyser la susceptibilité des souris KI Vav1^{R63W} à une maladie de type Th2, l'asthme allergique.

Pour cela, plusieurs étapes ont été nécessaires :

1. **La caractérisation phénotypique** de la souris KI Vav1^{R63W} en analysant la distribution des cellules dans le thymus, la rate et les nœuds lymphatiques. Cette étape permet de définir les caractéristiques cellulaires générales de cette souris KI.
2. **L'analyse de l'état d'activation des lymphocytes T** dans la rate et les nœuds lymphatiques des souris KI Vav1^{R63W} pour mettre en évidence la capacité des cellules à répondre aux stimuli.
3. **Le pourcentage de lymphocytes T régulateurs.** Les études chez les rats LEW et BN ont en effet montré que les premiers possèdent moins de Treg dans la rate, les nœuds lymphatiques et le thymus que les rats BN (Colacios et al., 2011). Il est donc important d'étudier le taux de Treg des souris KI Vav1^{R63W}.
4. **L'analyse fonctionnelle des LTCD4 naïves CD62L^{high} CD44^{low} et des Treg.** Après avoir mis en évidence les différentes populations lymphocytaires, il faut étudier leur activité *in vitro*.
5. **L'analyse de la susceptibilité des souris KI Vav1^{R63W} à une maladie de type Th2 par induction d'asthme allergique grâce à une sensibilisation des souris à l'ovalbumine (OVA).** Placer les souris KI Vav1^{R63W} dans un contexte d'asthme allergique permet de préciser le rôle de la mutation dans la réponse à une maladie de type Th2.
6. **L'analyse de la susceptibilité des souris KI Vav1^{R63W} à une maladie de type Th1, la sclérose en plaques.** Il est intéressant d'étudier une maladie de type Th1, pour pouvoir comparer la réponse que les souris KI Vav1^{R63W} ont eut face à une maladie de type Th2.

3. Matériels et méthodes

3.1. Modèles Animaux

Les souris KI $Vav1^{R63W}$ C57Bl/6 sont élevées dans l'animalerie du Precrefre (US06). Les animaux utilisés dans les différentes expériences sont âgés de 6 à 9 semaines. Ces souris proviennent de couples hétérozygotes : les souris « contrôle », notées WT (Wild Type), sont les frères et sœurs des souris KI. Pour les études fonctionnelles des Treg, des souris C57Bl/6 DEREK ont été utilisés. Les souris DEREK sont des souris transgéniques exprimant la GFP sous contrôle du promoteur du gène Foxp3. Les animaux sont élevés dans un cycle de lumière/obscurité de 12h avec un accès libre à l'eau et à une alimentation adaptée. L'élevage est fait dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques. Toutes les expériences impliquant des animaux ont été réalisées dans le respect des lois éthiques en vigueur en France.

3.2. Analyse en cytométrie de flux des populations cellulaires

Après euthanasie des souris sous anesthésie générale (injection intra péritonéale de 150 μ l d'un mélange de 0.6v/1v de xylazine / kétamine), les thymus, les rates et les nœuds lymphatiques mandibulaires, axillaires, brachiaux et inguinaux sont prélevés, broyés et filtrés (avec un filtre de 40 μ m) individuellement.

Pour les marquages de surface, les suspensions cellulaires sont incubées 20 min à 4°C à l'abri de la lumière avec un mélange d'anticorps couplés à des fluorochromes. Les anticorps utilisés sont les suivants : TCR-APCe780, TCRb-PE-Cy5, CD4-PB, CD8 α -PE, CD8 α -A700, CD44-A700, CD62L-FITC (BD pharmingen ou eBiosciences). Pour les marquages intra-nucléaires (Foxp3-PE-Cy7, BD pharmingen), une étape de fixation et de perméabilisation est réalisée afin de permettre l'entrée des anticorps anti-Foxp3 dans la cellule (kit Fixperm, e-Bioscience) : une incubation de 30 min, à l'abri de la lumière, à 4°C avec le tampon de fixation/perméabilisation suivi de deux lavages en solution de perméabilisation sont donc réalisés avant le marquage avec les anticorps couplés aux fluorochromes (30 min, dans le noir, à 4°C). Enfin, un lavage en perm buffer puis un lavage en PBS 2% sérum de veau fœtal (SVF), sont effectués. L'acquisition des différents marquages est réalisée grâce au cytomètre LSRII (BD-Biosciences) ou Fortessa (BD-Biosciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

3.3. Purification des lymphocytes T CD4

Les LT CD4 périphériques sont obtenus à partir de rates et de nœuds lymphatiques prélevés sur les souris WT et KI. Les LT CD4 sont enrichis par sélection négative (Dynabeads, Dynal). Les cellules sont incubées avec un mélange d'anticorps IgG anti-souris dirigé contre toutes les populations cellulaires (anti-CD8, anti-Mac1, anti-B220, anti-Ter-119, anti-CD16/32) à l'exception des LT CD4. Elles sont ensuite incubées avec des billes magnétiques couplées à des anticorps de rats anti-IgG de souris. Après adsorption des complexes billes-cellules sur aimants, les cellules purifiées sont prélevées délicatement. Pour les expériences de prolifération, des LT CD4 naïfs ($CD4^+ CD62L^{high} CD44^{low}$) ont été triés à l'aide du cytomètre FACS ARIA (BD-Biosciences) suite à un marquage de surface classique. La pureté des cellules après tri est d'environ 98%.

3.4. Mesure de l'activité des lymphocytes T CD4+ naïfs $CD62L^{high} CD44^{low}$

Les cultures cellulaires sont effectuées dans du milieu RPMI 1640 complet (Sigma). Ce milieu est supplémenté de 10% de SVF, de L-glutamine (2mmol/L), de pyruvate de sodium (1mmol/L), d'acides aminés non-essentiels (0.1mmol/L), de pénicilline (100U/ml), de streptomycine (100mg/ml) et de béta-mercapto-éthanol ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/L). La stimulation des LT se fait avec de l'anti-CD3 ϵ (2C11-Exbio) coaté en plaque 96 puits et de l'anti-CD28 soluble (H37.51-Exbio). Pour le coating, les plaques sont incubées 4h à 37°C avec l'anti-CD3 ϵ à 3 μ g/ml dans du PBS. Les surnageants sont prélevés après 72h de culture afin de doser les cytokines présentes.

Ainsi, les T CD4 naïfs triés marquées au Cell Trace Violet, stimulées *in vitro* pendant 3 jours pour pouvoir étudier leur état de prolifération et leur production de cytokines.

3.4.1. Mesure de la prolifération grâce au marquage au Cell Trace Violet

Les lymphocytes naïfs, purifiés comme décrit précédemment, sont marqués au Cell Trace Violet (Invitrogen). Le Cell Trace Violet est reconstitué avec du DMSO et dilué dans du PBS à une concentration finale de 4mmol/L. Les cellules sont resuspendues à $10 \cdot 10^6$ cellules/ml dans du PBS à 37°C et incubées pendant 10 min à 37°C avec le même volume de Cell Trace Violet. Les cellules sont ensuite lavées avec du SVF puis du RPMI complet. L'acquisition du marquage est réalisée par le cytomètre Fortessa (BD-Biosciences) et les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

3.4.2. Analyse de la production des cytokines par dosage immunoenzymatique

Pour doser les cytokines présentes dans les surnageants des cultures, le kit Mouse Th1/Th2/Th17/Th22 13plex FlowCytomix Multiplex et le kit Mouse GM-CSF Flowcytomix Simplex (eBioscience) ont été utilisés selon les recommandations du fabricant. Ces kits permettent de doser les cytokines suivantes : l'IL-2, l'IFN γ , l'IL-12, le TNF, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22, l'IL-27 et le GM-CSF. Le dosage se fait à l'aide de billes fluorescentes coatées avec les anticorps dirigés contre chaque cytokine. Ces billes sont de taille et d'intensité de fluorescences différentes en fonction des cytokines à doser. Un anticorps secondaire couplé à la biotine est ajouté et reconnaît également les cytokines de la gamme d'étalonnage et des échantillons. Enfin, la streptavidine-PE reconnaît la biotine et émet des signaux fluorescents. La moyenne d'intensité de fluorescence ainsi émise permet de doser quantitativement les cytokines. La sensibilité s'étend de 0.7pg/ml pour l'IL-4 à 32.7pg/ml pour l'IL-27. Aucune réactivité croisée n'a été mise en évidence par le fabricant.

3.5. Mesure de l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs

Pour mesurer la fonction des lymphocytes Treg, l'activité suppressive de ces cellules est analysée grâce à des co-cultures de Treg-T effecteurs. Afin d'isoler les lymphocytes Treg présents dans les rates et les nœuds lymphatiques des souris WT et KI, il a été nécessaire de croiser les souris KI avec des souris DEREK. Les Treg des souris DEREK exprime la GFP sous contrôle du promoteur de Foxp3. La présence de GFP rend donc possible le triage en cytométrie de flux des Treg des souris DEREK WT et DEREK KI.

Les cultures cellulaires sont effectuées dans du milieu RPMI 1640 complet (Sigma). Les lymphocytes Treg sont mis en culture pendant 3 jours en présence de LT effecteurs CD4⁺CD62L^{high} de souris DEREK WT (triés par cytométrie de flux). Les Treg de souris DEREK KI ou DEREK WT (également triés par cytométrie de flux) sont ajoutés à différents ratios par rapport aux T effecteurs (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32). La stimulation des LT se fait en présence de cellules présentatrices d'antigène irradiées à 35Gy et d'anti-CD3 ϵ soluble.

De plus, les lymphocytes T effecteurs sont marqués au Cell Trace Violet (Invitrogen) avant la mise en culture (voir protocole précédent). L'acquisition du marquage est réalisée par le cytomètre Fortessa (BD-Biosciences) et les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo.

Pour comparer l'activité suppressive des Treg des souris DEREK WT et DEREK KI, le pourcentage d'inhibition a été calculé : pour une prolifération d'effecteurs seuls rapporté à 100, le pourcentage d'inhibition correspond $100 - \frac{\text{pourcentage de T effecteurs en division}}{100} \times 100$.

3.6. Modèle d'asthme allergique

Les souris sont sensibilisées par injection intra-péritonéale de 100µg d'ovalbumine (OVA, Sigma) émulsionné dans 2mg d'alum (aluminium hydroxide, Sigma) dans un volume total de 250µL au jour 0. Les souris sensibilisées reçoivent un challenge par instillation intra-nasale de 50µg d'OVA dans 50µL de PBS, sous anesthésie volatile (Isoflurane) pendant 3 ou 5 jours consécutifs à partir du jour 14. Le poids des souris a été suivi pendant toute la durée de l'expérience.

24 heures après le dernier challenge, les souris sont sacrifiées. Des lavages broncho alvéolaires (LBA) sont alors réalisés : les poumons sont lavés et le liquide de lavage broncho alvéolaire est prélevé et centrifugé. Le nombre total de leucocytes est compté après coloration au bleu trypan. Pour différencier les populations cellulaires caractéristiques de l'allergie (neutrophiles, éosinophiles, macrophages et lymphocytes), $0,4 \cdot 10^6$ cellules du liquide broncho-alvéolaire ont été centrifugées et déposées sur des lames grâce à une cyto centrifugeuse (ThermoShandon Cytospin 4). Les lames sont colorées au May-Grünwald Giemsa et les différentes populations sont reconnues sur des critères morphologiques. De plus, des marquages de surface ont été réalisés sur ces cellules de LBA. Les suspensions cellulaires sont incubées 20 min à 4°C à l'abri de la lumière avec un mélange d'anticorps couplés à des fluorochromes : TCRβ-PeCy5, CD4-PB, CD8α-A700 (BD pharmingen ou eBiosciences).

3.7. Modèle de sclérose en plaques

Pour induire une Encéphalite Autoimmune expérimentale (EAE), les souris ont été immunisée par injection sous cutanée (à la base de la queue) de peptide MOG 35-55 émulsionné dans l'adjuvant complet de Freund (CFA) supplémenté avec de la toxine pertussique (par injection intraveineuse à J0 et J2). Les scores cliniques ont été évalués quotidiennement grâce à une grille d'évaluation, détaillés dans l'annexe 1 (Stromnes and Goverman, 2006).

3.8. Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Prism, en utilisant le test de Mann-Withney.

4. Résultats

4.1. Impact de la mutation sur les populations lymphocytaires

Tout d'abord, il est important de préciser que la mutation $Vav1^{R63W}$ portée par les souris KI n'affecte pas leur développement embryonnaire ni leur viabilité.

Les souris totalement déficientes pour la protéine Vav1 présentent un défaut sévère de développement des LT dans le thymus (Turner et al., 1997). Nous avons donc vérifié le développement des LT grâce à un marquage des cellules thymiques analysé par cytométrie de flux (figure 8 A). Il n'y a pas de différence significative pour le nombre total de cellules entre les souris WT et KI. L'analyse des différents stades de différenciation des LT dans le thymus ne montre aucune différence dans le nombre absolu des populations doubles négatives (CD4-CD8-), doubles positives (CD4+CD8+) et simples positives CD4+ et CD8+. Ces résultats montrent donc que les LT se développent normalement dans le thymus des souris KI.

Nous avons ensuite analysé les populations de LT dans la rate et les nœuds lymphatiques. Dans la rate, le nombre de cellules totales n'est pas modifié chez les souris KI par rapport aux souris WT (figure 8 B). Cependant, la comparaison des nombres absolus des LT montre qu'il y a une diminution significative dans la rate des souris KI et que cette diminution concerne aussi bien les LT CD4 que les LT CD8. On peut donc en déduire qu'au moins une autre population cellulaire est augmentée chez les souris KI. Pour vérifier cela, il faut continuer l'analyse des différentes populations cellulaires chez ces souris (lymphocytes B en particulier). Par contre, dans les nœuds lymphatiques (figure 8 C), il n'y a pas de différence entre les souris WT et KI pour le nombre de cellules totales, de LT et de LT CD4. Cependant, on retrouve significativement moins de LT CD8 chez les souris KI.

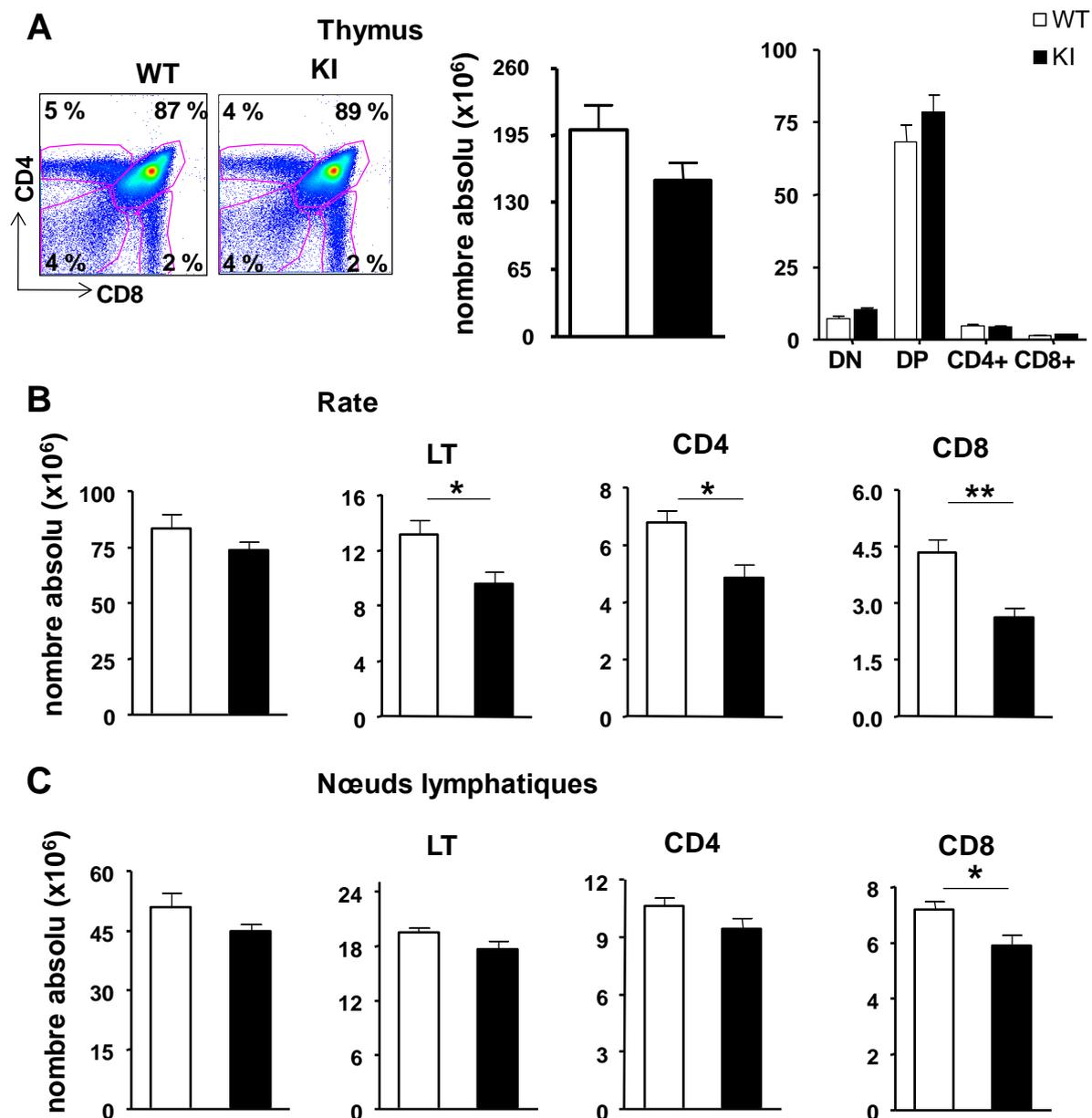


Fig. 8 : Impact de la mutation sur les populations lymphocytaires T chez les souris KI $Vav1^{R63W}$ comparé aux souris WT.

(A) Profils de cytométrie représentatifs des populations CD4 et CD8 dans le thymus. Nombre de cellules totales dans le thymus, nombre absolu des thymocytes doubles négatifs (DN) CD4-CD8-, doubles positifs (DP) CD4+CD8+, simples positifs CD4+ et CD8+, obtenus par cytométrie de flux à partir de souris WT (n=6) et KI (n=6) âgées de 6 à 8 semaines. Nombre de cellules totales et nombre absolu de LT, CD4 et CD8 de la rate (B) et des nœuds lymphatiques (C), obtenus par cytométrie de flux à partir de souris WT (n=6) et KI (n=6). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. Les valeurs représentent les moyennes des nombres absolus des populations totales, TCR+, CD4+ et CD8+ (moyenne \pm SEM, standard error of the mean). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

L'état d'activation des LT CD4 a ensuite été étudié. Pour cela, des marquages ont été réalisés afin de distinguer les cellules CD4⁺ CD62L^{high} CD44^{low} (naïves) dans la rate et les nœuds lymphatiques. Les résultats montrent qu'il y a moins de cellules naïves dans la rate des souris KI, sans qu'il n'y ait de différence entre les souris KI et WT dans les nœuds

lymphatiques (figure 9 A et B). Ainsi, la mutation semble avoir des conséquences uniquement dans la rate pour les LT naïfs. Des études ultérieures devront expliquer ce ciblage tissulaire.

Nous avons également vérifié le pourcentage de Treg Foxp3+ dans le thymus, la rate et les nœuds lymphatiques (figure 9 C). Comme chez les rats LEW et BN, une augmentation significative du pourcentage de Treg Foxp3+ a été observée chez les souris KI par rapport aux souris WT dans les trois organes. La mutation R63W affecte donc le développement des Treg.

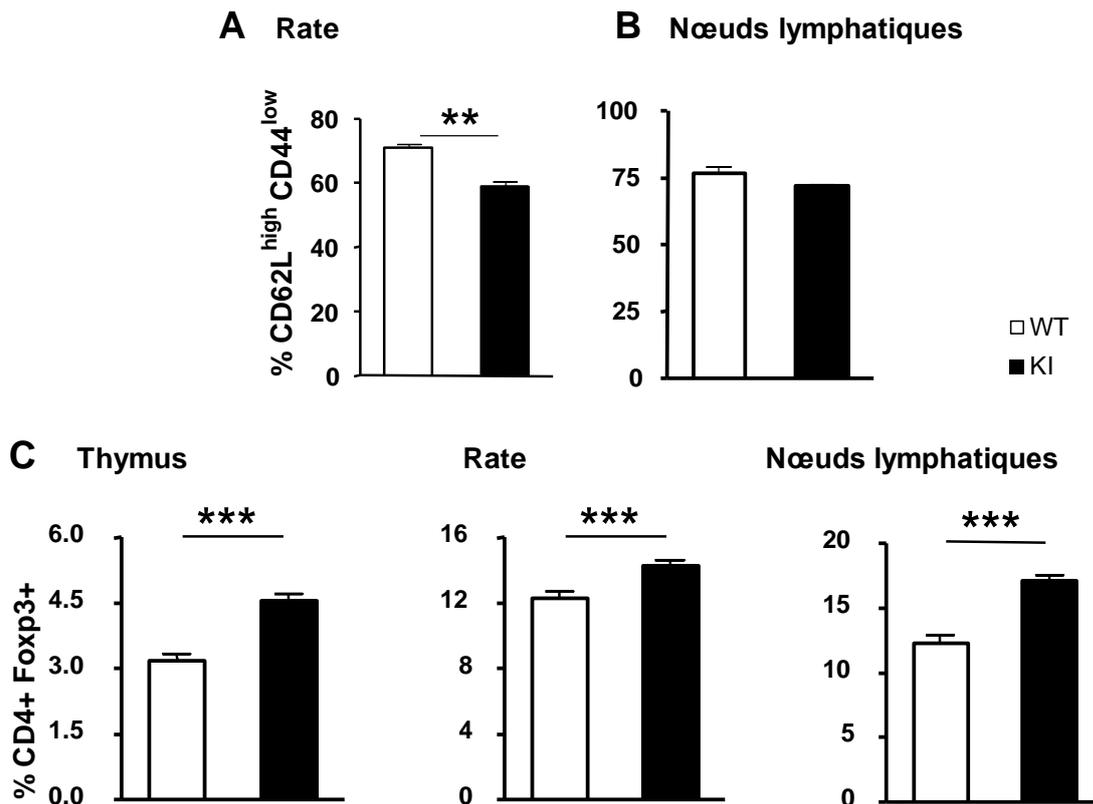


Fig. 9 : Analyse phénotypique des sous-populations de lymphocytes T.

Pourcentage de cellules CD4+ CD62L^{high} CD44^{low} dans la rate (A) et les nœuds lymphatiques (B). (C) Pourcentage des Treg Foxp3+ dans le thymus, la rate et les nœuds lymphatiques. Ces résultats ont été obtenus par cytométrie en flux à partir de souris WT (n=6) et KI (n=6) âgées de 7 à 9 semaines et représentatifs de 3 expériences indépendantes. Les valeurs représentent les moyennes des pourcentages des populations cellulaires marquées (moyenne ± SEM). **, p<0,01, ***, p<0,005.

4.2. Caractérisation fonctionnelle des populations de lymphocytes T effecteurs naïfs et de lymphocytes T régulateurs

Après la caractérisation phénotypique des LT qui vient d'être présentée, il est important de vérifier la fonction de ces cellules. Tout d'abord, pour tester les capacités de prolifération des LT CD4+ naïfs (CD4+ CD62L^{high} CD44^{low}), ces cellules ont été triées et stimulées *in vitro* avec de l'anti-CD3ε et de l'anti-CD28, comme décrit dans la partie

« matériels et méthodes ». L'analyse des résultats montre que les cellules CD62L^{high} CD44^{low} des souris KI prolifèrent moins que les cellules des souris WT. Ceci est illustré par une augmentation significative du nombre de cellules non divisées et une diminution du nombre de cellules s'étant divisées au moins 3 fois chez les souris KI (figure 10 A). La mutation modifie donc les capacités prolifératives des LT naïfs.

Les profils cytokiniques ont ensuite été déterminés par la technologie de Flowcytomix (eBiosciences). Parmi toutes les cytokines dosées, seules l'IL-4 et l'IFN γ présentent des différences significatives entre les deux types de souris. En effet, les LT naïfs de la rate des souris KI produisent plus d'IL-4 et moins d'IFN γ que les LT des souris WT (figure 10 B). Les cellules des souris KI semblent donc présenter un profil plutôt Th2 après stimulation *in vitro*.

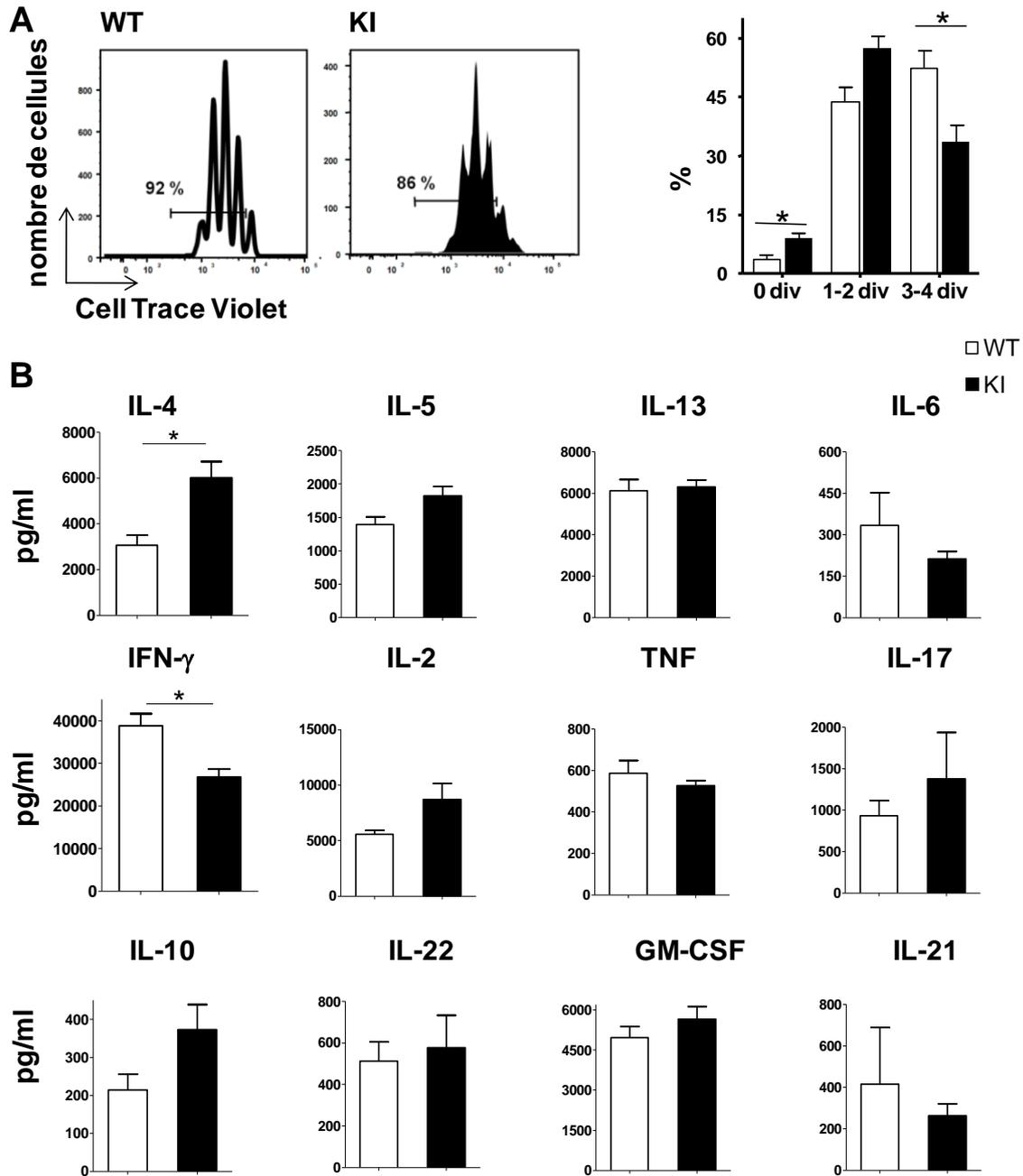


Fig. 10 : Analyse des fonctions des lymphocytes T naïfs.

(A) Profil de prolifération *in vitro* des lymphocytes T naïfs CD62L^{high} CD44^{low} de souris WT (n=5) et KI (n=5), âgées de 7 à 9 semaines, enrichis par sélection négative en CD4 puis triés en cytométrie de flux. Les LT CD62L^{high} CD44^{low} marqués au Cell Trace Violet ont été stimulés pendant 3 jours avec de l'anti-CD3 ϵ et de l'anti-CD28. (B) Analyse de la production de cytokines dans les cultures de LT naïfs par la technique Flowcytomix. Les valeurs représentent les moyennes des cellules en division et de la production de cytokines (moyenne \pm SEM) obtenu pour une seule expérience. *, p<0,05. div, division.

En ce qui concerne la fonction des Treg, d'après une expérience préliminaire, les Treg des souris DEREG KI semblent réguler la prolifération des T effecteurs de la même manière que les cellules des souris DEREG WT (figure 11 A et B). Donc, malgré un nombre plus

important de Treg chez les souris KI, ces cellules ont une fonction suppressive de même efficacité que les Treg des souris WT.

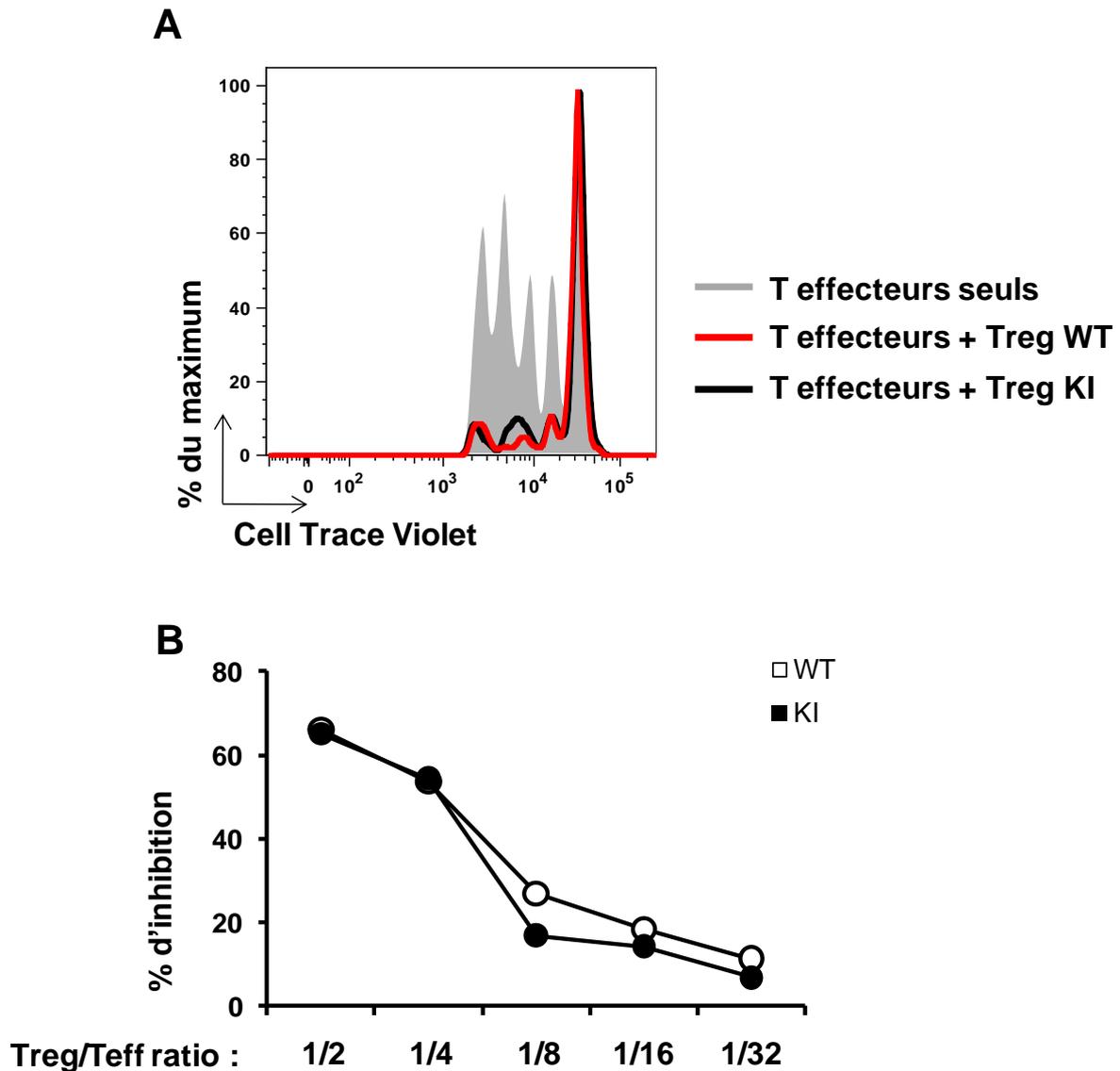


Fig. 11 : Etude de l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs.

(A) Profil de prolifération *in vitro* des lymphocytes T effecteurs CD62L^{high} de souris DEREG WT. Les lymphocytes T effecteurs de souris WT (n=2), âgées de 7 à 9 semaines, ont été triés en cytométrie de flux sur l'expression de CD62L^{high}. Ces LT CD62L^{high} ont ensuite été marqués au Cell Trace Violet puis mis en culture pendant 3 jours, en présence de cellules présentatrices d'antigène irradiées, d'anti-CD3 ϵ et de Treg, au ratio de 1 Treg pour 2 T effecteurs. Les Treg de souris DEREG WT (n=2) et de souris DEREG KI (n=3) ont été obtenus après tri en cytométrie en flux sur la base de leur expression de GFP. (B) Capacité suppressive des Treg des souris DEREG WT (n=2) et DEREG KI (n=3). Les Treg et les T effecteurs ont été mis en culture à différents ratio. Les résultats représentent la valeur obtenue pour le pools des cellules des souris DEREG WT et DEREG KI lors d'une seule expérience.

4.3. Etude de la réponse à l'asthme allergique des souris KI Vav1^{R63W}

Les cellules des souris KI présenteraient un profil plutôt Th2. Nous avons donc analysé la susceptibilité des souris KI à un modèle de maladie inflammatoire de type Th2, l'asthme allergique. Notre hypothèse est que les souris KI seront plus sensibles à la maladie.

Pour induire l'asthme allergique, les souris KI et WT ont été sensibilisées avec de l'OVA émulsionné dans de l'alum à J0. 14 jours après, un challenge avec des instillations intra-nasales d'OVA a été réalisé. Ce challenge a été répété 3 jours consécutifs, du jour 14 au jour 16. Enfin, 24h après le dernier challenge, les souris ont été sacrifiées. Des lavages broncho alvéolaires (LBA) ont été réalisés (figure 12 A).

Le suivi du poids des souris pendant l'expérience ne montre pas de différence significative entre les souris WT et KI (figure 12 B) même si les souris KI semblent avoir tendance à perdre plus de poids que les souris WT.

De plus, il n'y a pas de différence significative entre les souris WT et KI pour le nombre de cellules totales et le pourcentage d'éosinophiles, de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages dans le LBA (figure 12 C).

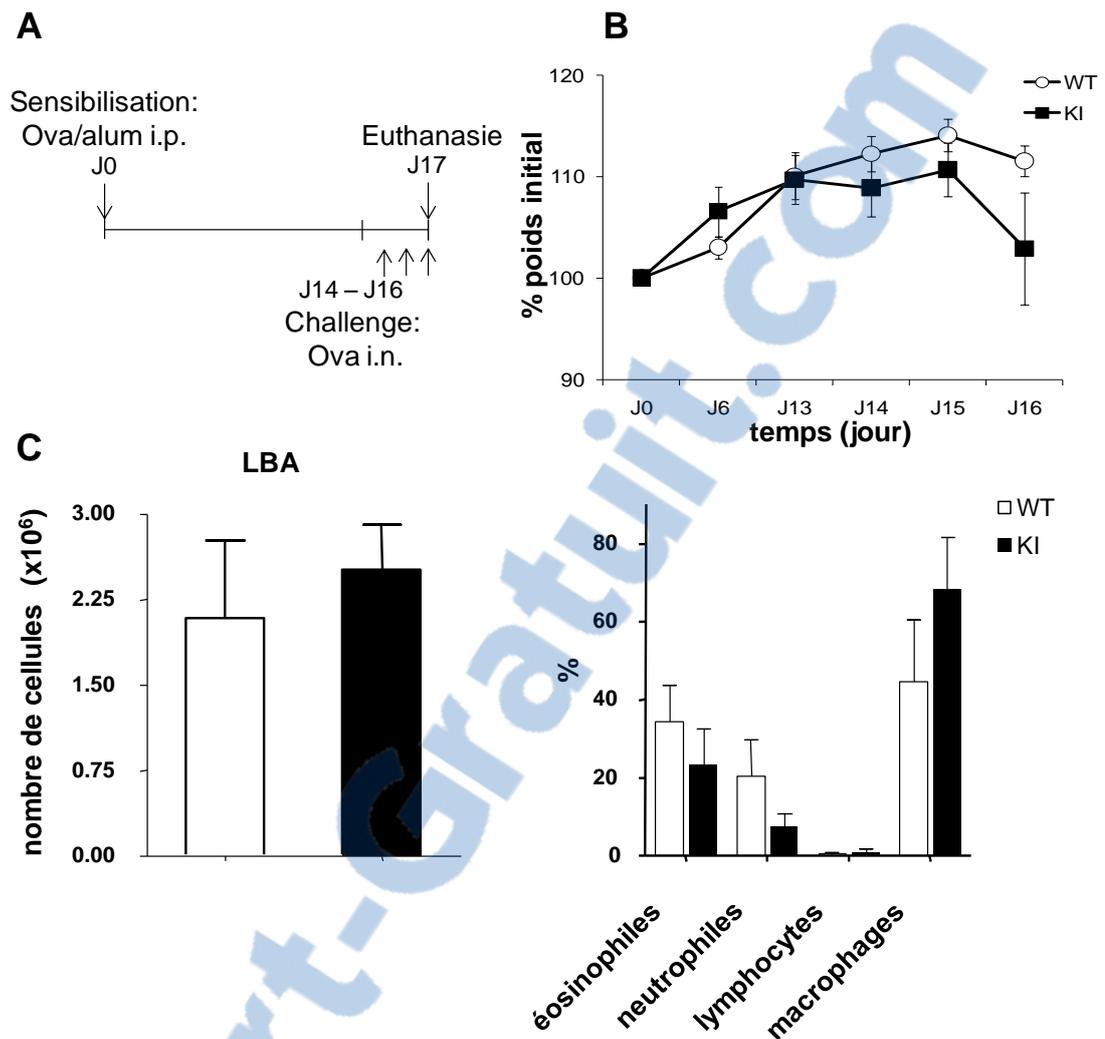


Fig. 12 : Etude de la réponse inflammatoire dans le cadre d'un modèle d'asthme allergique.

(A) Protocole de sensibilisation à l'asthme. Des souris WT (n=5) et KI (n=5) âgées de 7 à 8 semaines ont reçu, à J0, une première injection intra-péritonéale (i.p.) d'OVA émulsionnée dans de l'alum. Puis, de J14 à J16, elles ont reçu des instillations intra-nasales (i.n.) d'OVA. 24h après la dernière instillation, les souris ont été euthanasiées. (B) Evolution du poids en pourcentage et (C) accumulation de cellules dans les LBA. (D) Caractérisation de ces cellules par coloration au May-Grünwald Giemsa, en pourcentage. Les valeurs représentent les moyennes des souris WT et KI (moyenne ± SEM). *, p<0,05.

La réponse inflammatoire n'est donc pas différente entre les souris WT et KI après 3 jours de challenge. Nous avons donc essayé un protocole d'induction de l'asthme plus intense, avec 5 jours d'instillations intra-nasales d'OVA (figure 13 A).

L'évolution du poids a également été mesurée et ne montre pas de différence significative entre les souris WT et les souris KI (figure 13 B). Malgré cela, la tendance de perte de poids chez les souris KI mise en évidence avec le protocole précédent est confirmée ici puisque les souris KI ont un poids moyen inférieur aux souris WT à J17.

Dans les lavages broncho alvéolaires, le nombre de cellules totales chez les souris KI est significativement plus élevé que chez les WT (figure 13 C). Le protocole utilisé dans cette expérience entraîne donc une atteinte plus sévère, avec plus de recrutement cellulaire, chez les

souris KI. Après coloration des cellules au May-Grünwald Giemsa, on note une nette augmentation du pourcentage d'éosinophiles dans les LBA des souris KI. Il n'y a pas de différence significative entre les souris WT et KI dans les pourcentages de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages. Ces résultats mettent en évidence un asthme plus sévère chez les souris KI que chez les souris WT.

Pour aller plus loin dans l'analyse, la caractérisation des lymphocytes présents dans les LBA montre que le nombre de LT CD8⁺ est significativement plus élevé chez les souris KI par rapport aux souris WT (figure 13 D). Cela peut être le signe d'une inflammation générale plus importante chez ces souris.

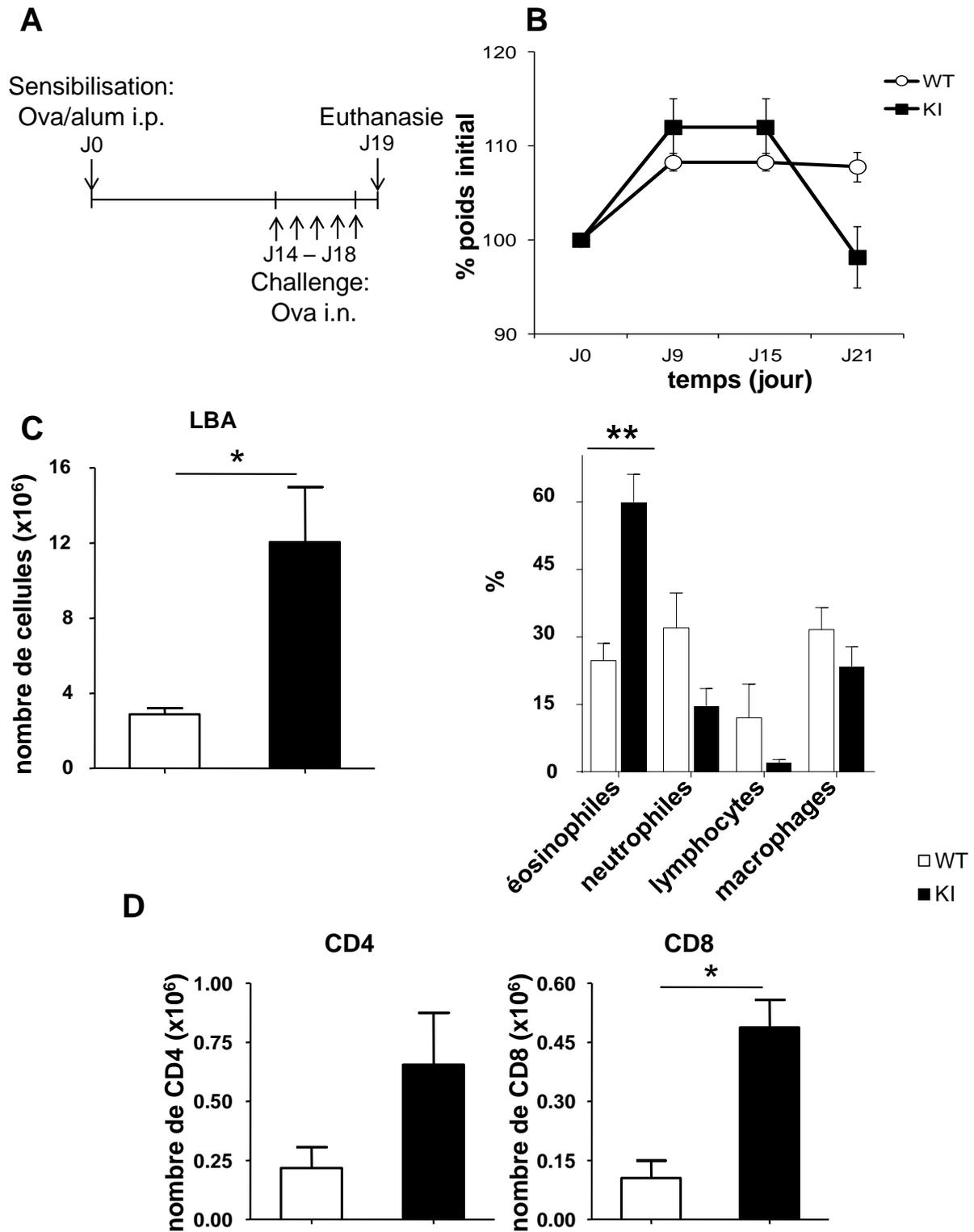


Fig. 13 : Etude de la réponse inflammatoire et lymphocytaire dans le cadre d'un modèle d'asthme allergique.

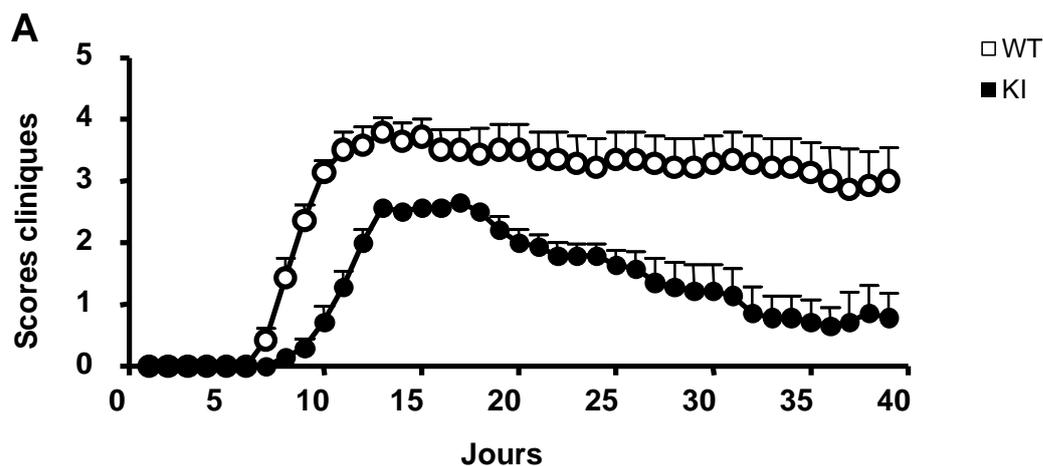
(A) Protocole de sensibilisation à l'asthme. Des souris WT (n=5) et KI (n=5) âgées de 7 à 8 semaines ont reçu, à J0, une première injection intra-péritonéale (i.p.) d'OVA émulsionnée dans de l'alum. Puis, de J14 à J18, elles ont reçu des instillations intra-nasales (i.n.) d'OVA. 24h après la dernière instillation, les souris ont été euthanasiées. (B) Evolution du poids en pourcentage. (C) Accumulation de cellules dans les LBA et caractérisation de ces cellules par coloration au Rapport-Grünwald Giemsa, en pourcentage. (D) Caractérisation des lymphocytes par

cytométrie de flux. Les valeurs représentent les moyennes des souris WT et KI (moyenne \pm SEM). *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

4.4. Etude de la réponse à l'Encéphalite Autoimmune Expérimentale des souris KI *Vav1*^{R63W}

Les souris KI ont ensuite été caractérisées dans un contexte de maladie de type Th1. Pour cela, nous avons induit l'Encéphalite Autoimmune Expérimentale (EAE), qui est un modèle de sclérose en plaques chez la souris.

Les souris KI développent une maladie plus tardivement et d'intensité plus faible que les souris WT (figure 14 A et B). En effet, deux souris WT sont mortes tandis que toutes les souris KI sont restées en vie jusqu'à la fin de l'expérience. De plus, le score maximal et le score cumulatif sont plus faibles chez les souris KI. Donc, contrairement au modèle d'asthme allergique, les souris KI sont plus résistantes à une maladie de type Th1 que les souris WT.



B

Souche	Incidence	Début de la maladie (jour)	Score maximal	Score cumulatif	Mortalité
WT	7/7	7,6 \pm 0.3	3.9 \pm 0.2	104 \pm 12.4	2/7
KI	7/7	9,3 \pm 0.5**	2.8 \pm 0.1***	47.1 \pm 9.3***	0/7

Fig. 14 : Etude de la réponse Th1 dans le cadre d'un modèle d'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale.

Des souris WT (n=7) et KI (n=7) ont été immunisées avec le peptide MOG 35-55 émulsionné dans l'adjuvant complet de Freund (CFA) supplémenté avec de la toxine pertussique. Les scores cliniques ont été évalués quotidiennement. Les valeurs représentent les moyennes obtenues pour les souris WT et KI (moyenne \pm SEM). **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,005$.

5. Discussion

Pour fonctionner correctement, une bonne coopération entre le système immunitaire inné et acquis est nécessaire et passe par le biais d'une cascade de signalisation complexe. Nous nous intéressons ici à la protéine de signalisation multidomaines Vav1, dont l'expression est restreinte aux cellules hématopoïétiques. Dans les lymphocytes T, Vav1 est recrutée suite à l'engagement du TCR et possède deux fonctions importantes. Elle agit comme protéine adaptatrice dans la cascade de signalisation du TCR, et possède aussi une fonction de facteur d'échange nucléotidique (GEF) permettant l'activation des petites GTPases comme Rac1, RhoA et Cdc42. Les Rho GTPases activées par Vav1 sont vitales à la mise en place d'une synapse immunologique. Vav1 joue donc un rôle central au niveau du signalosome T, dans la traduction du signal du TCR et l'activation des LT.

Mon équipe d'accueil a montré que la mutation Vav1 R63W avait surtout un impact sur les fonctions adaptatrices de Vav1, dû à une forte diminution de l'expression protéique du variant Vav1 W63 (Colacios et al., 2011). Des analyses sont en cours pour caractériser plus précisément les fonctions adaptatrices de Vav1 à l'aide de souris KI Vav1 Strep-Tag qui permettent de purifier l'interactome de Vav1.

5.1. Rôles de Vav1 dans le contrôle de la balance Th1/Th2

Nous avons montré que le polymorphisme R63W est associé à un déséquilibre de la balance Th1/Th2. En effet, les LT exprimant le variant Vav1 W63 produisent plus d'IL-4 et moins d'IFN γ .

En accord avec nos résultats, une étude sur des souris déficientes en Vav1 a montré que la protéine Vav1 est impliquée dans le contrôle de la balance Th1/Th2 et ceci en favorisant l'activation de c-Maf et la production d'IL-4 (Tanaka et al., 2005). De plus, il a été prouvé que, chez l'Homme, une déficience de Vav1 provoque un syndrome d'immunodéficience et un défaut de différenciation Th2 (Capitani et al., 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine Vav1 joue un rôle majeur dans la différenciation Th1/Th2.

Les études réalisées chez les rats LEWIS (LEW) - Brown Norway (BN), portant sur la réponse allergique induite par les sels de mercure, confirment le rôle de Vav1 dans la régulation des réponses Th1 et Th2. Ainsi, le rat BN, sensible aux maladies de type Th2, possède un tryptophane en position 63 (W63) de la protéine Vav1. Par contre, le rat LEW est résistant aux maladies de type Th2 et possède une arginine en position 63 (R63).

De plus, contrairement aux rats LEW résistants, les rats BN développent une réponse IgE exagérée associée à une activation des Th2 (Saoudi et al., 1995). L'équivalent de cette maladie n'existant pas chez la souris, nous avons donc choisi d'induire l'asthme allergique chez les souris KI. L'induction de cette maladie se fait en plusieurs étapes. Il y a une première sensibilisation à l'allergène, l'OVA. Cette sensibilisation permet de sélectionner des cellules spécifiques dirigées contre l'OVA. Dans le deuxième temps de l'induction de l'asthme, un challenge intra-nasal entraîne le recrutement de ces cellules dans les poumons avec une augmentation des IgE allergènes spécifiques, des éosinophiles, de l'inflammation des voies respiratoires, de la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Joetham et al., 2007).

Une première expérience a été réalisée avec 3 jours de challenge intra-nasal, 15 jours après sensibilisation. Cette expérience suggère une atteinte plus importante chez les souris KI que chez les souris WT. Pour confirmer cette réponse des souris KI, une méthode d'induction plus sévère a été choisie, avec 5 jours de challenge. Les souris KI développent alors une maladie plus sévère que les souris WT comme en témoigne le recrutement massif de cellules immunitaires dans le LBA et plus particulièrement, d'éosinophiles. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés et des analyses supplémentaires doivent être réalisées comme les dosages des IgE et des IgG1 présentes dans les séras des souris WT et KI. Il sera également important de stimuler les cellules des nœuds lymphatiques péribronchiques *in vitro* avec de l'OVA afin d'analyser leur capacité à proliférer et à produire des cytokines, en particulier, les cytokines de type Th2.

De façon intéressante, ces souris KI ont un comportement opposé vis-à-vis des maladies impliquant des réponses de type Th1 comme l'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale (EAE). En effet, les souris KI développent une maladie moins sévère par rapport aux souris WT. Ainsi ces travaux suggèrent que les souris KI sont sensibles à des manifestations allergiques impliquant des réponses de type Th2 mais résistantes à des maladies autoimmunes impliquant les réponses immunes de type Th1.

5.2. Rôles de Vav1 dans le développement des Treg

Nous avons montré que la présence du tryptophane à la place d'une arginine en position 63 de la protéine Vav1 entraîne une augmentation du pourcentage des Treg naturels. De plus, ces Treg semblent avoir la même capacité suppressive, quelque soit le variant de Vav1.

Vav1 aurait donc un rôle dans le développement des Treg, sans pour autant avoir d'impact sur leurs fonctions régulatrices. Cependant, nous n'avons testé que la capacité des

Treg à contrôler la prolifération de LT effecteurs. Il serait intéressant de tester les capacités à contrôler des réponses Th1 ou Th2 spécifiques *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, des dosages de cytokines peuvent être réalisés à partir des co-cultures Treg/Teffecteurs. De plus, d'autres tests de co-cultures de Treg avec des LT déjà différenciés en Th1 ou Th2 devront être envisagés.

En plus de leur expression de Foxp3, l'expression de différents facteurs de transcriptions par les Treg est importante pour leur capacité à contrôler la mise en place de réponses immunitaires Th1, Th2 et Th17. Les Treg exprimant T-bet (facteur de transcription important pour la réponse Th1) sont capables de réguler une réponse Th1 mais pas une réponse Th2 ou Th17 (Koch et al., 2009). De façon similaire, l'expression d'IRF4 (facteur de transcription impliqué pour les Th2) par les Treg est importante pour le contrôle des inflammations de type Th2 (Zheng et al., 2009). Enfin, l'expression de STAT3 (facteur de transcription impliqué pour les Th17) dans les Treg permet de contrôler spécifiquement une réponse Th17 exacerbée (Chaudhry et al., 2009).

Pour mieux comprendre l'impact de la mutation sur la différenciation Th1 versus Th2 et sur les Treg, des expériences d'analyses par des profils d'activation des protéines STAT (STAT1, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6) et d'expression des facteurs de transcriptions (T-bet, Gata3, c-Maf, IRF4, ROR γ t) sont envisagées par mon équipe d'accueil.

Enfin, dans le but de tester la capacité suppressive des Treg *in vivo*, les souris KI ont été croisées avec des souris DEREK, dont les Treg expriment la GFP et le récepteur à la diphtéria toxine (DTR) sous contrôle du promoteur Foxp3. Ceci permettra d'éliminer les Treg par injection de toxine diphtérique et ainsi, d'analyser la fonction de ces cellules au cours du développement de l'asthme allergique. De plus, il serait important d'étudier l'impact de la mutation sur le développement de Treg induit, en purifiant des LT CD4⁺ Foxp3⁻ et en les mettant en culture en présence d'IL-2 et du TGF β .

Pour aller plus loin, nous pouvons mettre en relation la plus grande susceptibilité des souris KI à l'asthme avec les analyses *in vitro*. En effet, les Treg induits, c'est-à-dire les Treg activés en périphérie, jouent un rôle dans le contrôle des inflammations chroniques allergiques (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Dans l'avenir, de nouvelles voies thérapeutiques pourraient voir le jour, grâce à l'utilisation de Treg (Sakaguchi et al., 2008) : ces cellules permettraient de contrôler et de limiter le développement de la maladie.

Cette étude a permis de mettre en évidence un meilleur contrôle de l'asthme allergique lorsque Vav1 porte un tryptophane en position 63. Pour pouvoir utiliser les Treg dans la lutte contre l'asthme chez l'Homme, le rôle des variants de VAV1 dans la susceptibilité à l'allergie reste à démontrer. Pour déterminer ce rôle, des études de Genome-Wide Association Studies (GWAS) chez l'Homme pourront être réalisées. Ces études permettent d'examiner les variants génétiques de nombreux individus afin de mettre en évidence une éventuelle association entre un variant et une maladie particulière. Dans notre cas, il s'agirait de comparer le génome entier de deux groupes de patients : un groupe de personnes allergiques et un groupe de témoins non-allergiques. Si un variant est rencontré plus fréquemment chez les malades, celui-ci sera dit « associé » à l'allergie et la région du génome où se situe ce variant sera considérée comme un marqueur qui influence le risque de développer une allergie.

Agreement



AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **BOULLIER Séverine**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **BAYOL Camille** intitulée « *Rôle de la mutation VAV1^{R63W} dans la sensibilité à l'asthme allergique.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 2 Novembre 2012
Docteur Séverine BOULLIER
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Antoine BLANCHER

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT

Mlle BAYOL Camille
a été admis(e) sur concours en : 2007
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 30/06/2011
a validé son année d'approfondissement le : 25/09/2012
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



REFERENCES

- Ball, T.M., Castro-Rodriguez, J.A., Griffith, K.A., Holberg, C.J., Martinez, F.D., and Wright, A.L. (2000). Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *The New England journal of medicine* 343, 538-543.
- Barczyk, A., Pierzchala, W., and Sozanska, E. (2003). Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respiratory medicine* 97, 726-733.
- Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature reviews Immunology* 3, 253-257.
- Blumenthal, M.N. (2005). The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 5, 141-145.
- Busse, W.W., and Lemanske, R.F., Jr. (2001). Asthma. *The New England journal of medicine* 344, 350-362.
- Capitani, N., Amedei, A., Paccani, S.R., Matucci, A., Vultaggio, A., Del Prete, G., Baldari, C.T., and D'Elios, M.M. (2010). Impaired TH2 response in patients with Vav1-deficient common variable immunodeficiency with T-cell defects. *The Journal of allergy and clinical immunology* 126, 671-675.
- Capron, M., Bascou, C., Vial, M.C., Grossetete, J., Hinglais, N., Girard, J.F., and Druet, P. (1982). Effects of deplementation on mercuric chloride-induced glomerulonephritis in Brown-Norway rats. *Clinical and experimental immunology* 49, 611-617.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326, 986-991.
- Colacios, C., Casemayou, A., Dejean, A.S., Gaits-Iacovoni, F., Pedros, C., Bernard, I., Lagrange, D., Deckert, M., Lamouroux, L., Jagodic, M., *et al.* (2011). The p.Arg63Trp polymorphism controls Vav1 functions and Foxp3 regulatory T cell development. *The Journal of experimental medicine* 208, 2183-2191.
- Cookson, W. (1999). The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402, B5-11.
- Cookson, W. (2002). Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunological reviews* 190, 195-206.
- Corry, D.B., Grunig, G., Hadeiba, H., Kurup, V.P., Warnock, M.L., Sheppard, D., Rennick, D.M., and Locksley, R.M. (1998). Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell-deficient mice. *Mol Med* 4, 344-355.
- Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30, 626-635.
- Curotto de Lafaille, M.A., Muriglan, S., Sunshine, M.J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G.C., Wensky, A.K., Olivares-Villagomez, D., and Lafaille, J.J. (2001). Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 194, 1349-1359.
- Dai, P., Liu, X., and Li, Q.W. (2012). [Function of the Lck and Fyn in T cell development]. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* 34, 289-295.

- Daniels, S.E., and Shirakawa, T. (1994). A dinucleotide repeat polymorphism in the FCER1B gene. *Human molecular genetics* 3, 213.
- de Vries, J.E., Gauchat, J.F., Aversa, G.G., Punnonen, J., Gascan, H., and Yssel, H. (1991). Regulation of IgE synthesis by cytokines. *Current opinion in immunology* 3, 851-858.
- Drouin, S.M., Corry, D.B., Kildsgaard, J., and Wetsel, R.A. (2001). Cutting edge: the absence of C3 demonstrates a role for complement in Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *J Immunol* 167, 4141-4145.
- Duffy, D.L., Martin, N.G., Battistutta, D., Hopper, J.L., and Mathews, J.D. (1990). Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *The American review of respiratory disease* 142, 1351-1358.
- Fournie, G.J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D., Bernard, I., Subra, J.F., Pelletier, L., Druet, P., *et al.* (2001). Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunological reviews* 184, 145-160.
- Gerrard, J.W., Rao, D.C., and Morton, N.E. (1978). A genetic study of immunoglobulin E. *American journal of human genetics* 30, 46-58.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.
- Gomes, B., Cabral, M.D., Gallard, A., Savignac, M., Paulet, P., Druet, P., Mariame, B., Moreau, M., Leclerc, C., Guery, J.C., *et al.* (2007). Calcium channel blocker prevents T helper type 2 cell-mediated airway inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175, 1117-1124.
- Graham, L.M. (2006). Classifying asthma. *Chest* 130, 13S-20S.
- Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature reviews Immunology* 8, 193-204.
- Hillhouse, E.E., and Lesage, S. (2012). A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *Journal of autoimmunity*.
- Holgate, S.T., and Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature reviews Immunology* 8, 218-230.
- Holt, P.G. (1996). Infections and the development of allergy. *Toxicology letters* 86, 205-210.
- Holt, P.G. (2000). Parasites, atopy, and the hygiene hypothesis: resolution of a paradox? *Lancet* 356, 1699-1701.
- Houlard, M., Arudchandran, R., Regnier-Ricard, F., Germani, A., Gisselbrecht, S., Blank, U., Iden, S., and Collard, J.G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 846-859.
- Jaffar, Z., Sivakuru, T., and Roberts, K. (2004). CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J Immunol* 172, 3842-3849.
- Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.H., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. (2007). Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell

regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 178, 1433-1442.

Juhn, Y.J. (2012). Influence of asthma epidemiology on the risk for other diseases. *Allergy, asthma & immunology research* 4, 122-131.

Katzav, S. (2004). Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood* 103, 2443-2451.

Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S., and Lloyd, C.M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *The Journal of experimental medicine* 202, 1539-1547.

Kenneth Murphy, Paul Travers, and Walport, M. (2011). *Janeway's immunobiology*, Vol 1 (New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC).

Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology* 10, 595-602.

Kumar, A., and Ghosh, B. (2009). Genetics of asthma: a molecular biologist perspective. *Clinical and molecular allergy : CMA* 7, 7.

Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., and Beasley, R. (2004). The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59, 469-478.

Miletic, A.V., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Hamann, M.J., Gomez, T.S., Ota, N., Kloeppel, T., Kanagawa, O., Tokunaga, M., Billadeau, D.D., *et al.* (2006). Vav1 acidic region tyrosine 174 is required for the formation of T cell receptor-induced microclusters and is essential in T cell development and activation. *The Journal of biological chemistry* 281, 38257-38265.

Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Page, N., Olivenstein, R., Elias, J., and Chakir, J. (2001). IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108, 430-438.

Pelletier, L., Pasquier, R., Hirsch, F., Sapin, C., and Druet, P. (1986). Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmune disease: in vitro demonstration. *J Immunol* 137, 2548-2554.

Pelletier, L., Rossert, J., Pasquier, R., Villarroya, H., Belair, M.F., Vial, M.C., Oriol, R., and Druet, P. (1988). Effect of HgCl₂ on experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. HgCl₂-induced down-modulation of the disease. *European journal of immunology* 18, 243-247.

Prescott, S.L., Macaubas, C., Holt, B.J., Smallacombe, T.B., Loh, R., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 160, 4730-4737.

Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., and von Mutius, E. (2001). Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358, 1129-1133.

Rodriguez-Fernandez, J.L., Riolo-Blanco, L., and Delgado-Martin, C. (2010). What is an

Rivera, J., and Varin-Blank, N. (2002). Vav1 is a component of transcriptionally active complexes. *The Journal of experimental medicine* 195, 1115-1127.

immunological synapse? *Microbes and infection / Institut Pasteur* 12, 438-445.

Romagnani, S. (2004). The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112, 352-363.

Saito, T., and Watanabe, N. (1998). Positive and negative thymocyte selection. *Critical reviews in immunology* 18, 359-370.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.

Saoudi, A., Castedo, M., Nochy, D., Mandet, C., Pasquier, R., Druet, P., and Pelletier, L. (1995). Self-reactive anti-class II T helper type 2 cell lines derived from gold salt-injected rats trigger B cell polyclonal activation and transfer autoimmunity in CD8-depleted normal syngeneic recipients. *European journal of immunology* 25, 1972-1979.

Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F., and Ohashi, P.S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annual review of immunology* 17, 829-874.

Simon, T., Tanguy-Royer, S., Royer, P.J., Boisgerault, N., Frikeche, J., Fonteneau, J.F., and Gregoire, M. (2012). Human dendritic cells sequentially matured with CD4(+) T cells as a secondary signal favor CTL and long-term T memory cell responses. *Biological research* 45, 33-43.

Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature medicine* 13, 139-145.

Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols* 1, 1810-1819.

Tanaka, Y., So, T., Lebedeva, S., Croft, M., and Altman, A. (2005). Impaired IL-4 and c-Maf expression and enhanced Th1-cell development in Vav1-deficient mice. *Blood* 106, 1286-1295.

Toelle, B.G., Ng, K., Belousova, E., Salome, C.M., Peat, J.K., and Marks, G.B. (2004). Prevalence of asthma and allergy in schoolchildren in Belmont, Australia: three cross sectional surveys over 20 years. *BMJ* 328, 386-387.

Turner, M., and Billadeau, D.D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nature reviews Immunology* 2, 476-486.

Turner, M., Mee, P.J., Walters, A.E., Quinn, M.E., Mellor, A.L., Zamoyska, R., and Tybulewicz, V.L. (1997). A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity* 7, 451-460.

Vandebriel, R.J., Meredith, C., Scott, M.P., van Dijk, M., and van Loveren, H. (2000). Interleukin-10 is an unequivocal Th2 parameter in the rat, whereas interleukin-4 is not. *Scandinavian journal of immunology* 52, 519-524.

Vermaelen, K.Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B.N., and Pauwels, R.A. (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 193, 51-60.

Wills-Karp, M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual review of immunology* 17, 255-281.

Wong, C.K., Ho, C.Y., Ko, F.W., Chan, C.H., Ho, A.S., Hui, D.S., and Lam, C.W. (2001). Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-

4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical and experimental immunology* 125, 177-183.

Yamane, H., and Paul, W.E. (2012). Memory CD4⁺ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 1577-1583.

Zhang, R., Alt, F.W., Davidson, L., Orkin, S.H., and Swat, W. (1995). Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature* 374, 470-473.

Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351-356.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* 28, 445-489.

Zygmunt, B., and Veldhoen, M. (2011). T helper cell differentiation more than just cytokines. *Advances in immunology* 109, 159-196.

ANNEXES

1. Grille d'évaluation de l'Encéphalite Autoimmune Expérimentale chez la souris

Scores	Signes cliniques	Méthodes de détection	Observations
0	Absence de signe clinique	<ul style="list-style-type: none"> Tenir la souris par la base de la queue Toucher le bout de la queue avec un objet cylindrique Observer la démarche 	<ul style="list-style-type: none"> Les membres arrières sont étendus La queue bouge et s'enroule sur l'objet cylindrique La démarche est normale
0.5	Perte du tonus musculaire de la queue	<ul style="list-style-type: none"> Tenir la souris par la base de la queue Toucher la queue avec un objet cylindrique Observer la démarche 	<ul style="list-style-type: none"> Les membres arrières sont étendus Le bout de la queue ne s'enroule pas autour de l'objet et /ou tombe sur un côté La démarche est normale
1	Paralysie de la queue	<ul style="list-style-type: none"> Tenir la souris par la base de la queue Toucher le bout de la queue avec un objet cylindrique Observer la démarche 	<ul style="list-style-type: none"> Les membres arrières sont étendus La queue ne s'enroule pas autour de l'objet et / ou tombe sur un côté La démarche est normale
2	Perte de la coordination des mouvements Parésie des membres postérieurs	<ul style="list-style-type: none"> Tenir la souris à la base de la queue Observer la démarche Pincer les doigts 	<ul style="list-style-type: none"> Les membres postérieurs se contractent La démarche présente des incoordinations de mouvement Les doigts des membres postérieurs répondent au pincement La queue n'a pas de tonus musculaire
2.5	Paralysie d'un membre postérieur	<ul style="list-style-type: none"> Tenir la souris à la base de la queue Observer la démarche Pincer les doigts 	<ul style="list-style-type: none"> La souris traîne un membre postérieur Les doigts d'un membre postérieur ne répondent pas au pincement La queue n'a pas de tonus musculaire
3	Paralysie des deux membres postérieurs	<ul style="list-style-type: none"> Tenir la souris à la base de la queue Observer la démarche Pincer les doigts 	<ul style="list-style-type: none"> La souris traîne les membres postérieurs Les doigts des membres postérieurs ne répondent pas au pincement La queue n'a pas de tonus musculaire
3.5	Paralysie des membres arrières Faiblesse des membres antérieurs	<ul style="list-style-type: none"> Tenir la souris à la base de la queue Observer la démarche Pincer les doigts 	<ul style="list-style-type: none"> La souris se traîne sur les membres antérieurs mais a des difficultés à soulever son avant-main Les doigts des membres antérieurs répondent au pincement La queue n'a pas de tonus musculaire
4	Paralysie des membres antérieurs	<ul style="list-style-type: none"> Tenir la souris à la base de la queue Observer la démarche Pincer les doigts 	<ul style="list-style-type: none"> La souris ne peut pas bouger Les doigts des membres avant ne répondent pas au pincement La queue n'a pas de tonus musculaire

5	Animal moribond	Observer et toucher la souris	<ul style="list-style-type: none">• Absence de mouvement• Animal froid• Respiration anormale
---	-----------------	-------------------------------	--

Fig. 15 – annexe 1 : **Grille d'évaluation clinique de l'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale classique chez la souris**
(Stromnes and Goverman, 2006).

Rapport-Gratuit.com

Toulouse, 2012

NOM : BAYOL

Prénom : Camille

TITRE : Rôle de la mutation Vav1^{R63W} dans la sensibilité à l'asthme allergique

RESUME :

Dans mon équipe d'accueil, une dissection génétique à l'aide des lignées de rats congéniques BN.LEW a permis d'identifier un polymorphisme sur le gène *Vav1*. Ce polymorphisme se caractérise par la substitution d'une arginine (R) chez le rat LEW en tryptophane (W) chez le rat BN, en position 63 de la protéine Vav1 et pourrait être impliqué dans la différence de sensibilité des rats LEW (résistants) et BN (sensibles) aux manifestations allergiques. Pour tester cette hypothèse, une souris Knock-In (KI) Vav1^{R63W}, sur fond génétique C57BL/6, a été générée et, dans cette étude, elle est comparée à une souris sauvage (Wild-Type, WT) portant une R.

Ma thèse a eu pour premier objectif d'étudier l'impact de ce polymorphisme sur le développement et sur la fonction des lymphocytes T. J'ai démontré que les souris KI présentent un développement thymique normal mais possèdent plus de lymphocytes T régulateurs (Treg) que les souris WT. De plus, les lymphocytes T CD4+ de ces souris KI présentent un déséquilibre de la balance Th1/Th2, caractérisé par une augmentation de la production d'IL-4 (Th2) et une diminution de la production d'IFN γ (Th1).

Le deuxième but de ma thèse a été d'analyser la susceptibilité de ces souris KI à un modèle d'asthme allergique. L'étude de cette maladie est importante puisqu'elle représente un enjeu de santé publique. L'asthme résulte d'une réponse immunitaire aberrante de type Th2 à des allergènes inhalés. Chez les souris KI, un protocole d'induction de l'asthme a entraîné une réaction inflammatoire plus importante que chez les souris WT.

Cette étude préliminaire tend à montrer que les souris KI sont plus sensibles à une maladie de type Th2 et qu'elles possèdent plus de Treg. Elle confirme le rôle important de Vav1 dans la réponse immunitaire, et particulièrement dans la balance Th1/Th2.

MOTS CLES : IMMUNOLOGIE, ASTHME, VAV1, KI.

ENGLISH TITLE : Role of the Vav1^{R63W} mutation in susceptibility to allergic asthma

ABSTRACT:

Previous genetic studies of the inbred rat strains BN and LEW identified a polymorphism in the *Vav1* gene resulting in an arginine (R) in the LEW strain and a tryptophan (W) in the BN strain at residue 63 in the protein. This could contribute to the different susceptibilities of LEW (resistant) and BN (sensible) rats to allergic diseases. Indeed, Vav1 seems to have an important role in the T cells immune response related to allergic diseases. To test this hypothesis, we compared a generated Knock-In (KI) mouse mutant expressing the Vav1^{R63W} variant on the C57BL/6 genetic background and a Wild-Type (WT) mouse expressing a R.

The first objective of my thesis was to investigate the impact of this polymorphism on the development and function of T lymphocytes. I found that the thymus in KI mice develops normally but they have more of the immunosuppressive regulatory T lymphocytes (Tregs) than WT mice. Furthermore, CD4+ T lymphocytes of these KI mice have an imbalance in their Th1/Th2 functions, characterised by increased IL-4 (Th2) production and decreased IFN γ (Th1) production when compared to WT mice.

The second objective of my study was to analyse the susceptibility of these KI mice to allergic asthma, a disease that is an important public health concern. Asthma results from an abnormal Th2-type immune response to inhaled allergens. In an experimental model of allergic asthma, I found that the KI mice had a greater inflammatory response than did the WT mice.

This preliminary study suggests that expression of the Vav1^{R63W} variant makes KI mice more sensitive to type Th2 disease than WT mice and modifies the development of Tregs. It indicates an important role for Vav1 in the immune response, and particularly in the Th1/Th2 balance.

KEYWORDS : Immunology, ASTHMA, VAV1, KI.