

TABLE DES MATIERES

Table des Matières	1
Glossaire et acronymes	4
Introduction	5
1 Etude bibliographique	6
1.1 Le système immunitaire spécifique: tolérance au soi et maladies auto-immunes	6
1.2 Les maladies inflammatoires démyélinisantes chez l'homme, la sclérose en plaques	7
1.3 Les modèles animaux d'affections auto-immunes du système nerveux central	10
1.3.1 L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) par immunisation active	10
1.3.1.1 Description	10
1.3.1.2 Les protéines de la myéline	11
1.3.1.3 L'immunopathologie de l'EAE	11
1.3.2 L'EAE par transfert adoptif de lymphocytes T	13
1.3.3 Les modèles murins transgéniques	14
1.3.3.1 Les lignées de souris transgéniques pour un récepteur à l'antigène des lymphocytes T	14
1.3.3.2 Les lignées de souris transgéniques exprimant un « néo » auto-antigène	15
2 Etude expérimentale	16
2.1 Génération d'un modèle d'étude du potentiel encéphalitogène de lymphocytes T CD8 ⁺ : justification et limites de la stratégie	16
2.2 Matériel et méthodes	18
2.2.1 Les lignées de souris transgéniques	18
2.2.1.1 La lignée GFAP-HA	18
2.2.1.2 La lignée CL4-TCR	18
2.2.1.3 Génération des souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR	19

2.2.1.4 Production et conditions d'élevage de ces lignées	19
2.2.1.5 Identification des animaux transgéniques par génotypage	19 20
2.2.1.5.1 Extraction de l'ADN	20
2.2.1.5.2 Polymerase chain reaction (PCR)	
2.2.2 Génération <i>in vitro</i> de lymphocytes T cytotoxiques de type 1 (Tc1) à partir des lymphocytes T CD8 ⁺ des souris CL4-TCR	21 21
2.2.2.1 Culture des Tc1	22
2.2.2.2 Caractérisation des populations de LT par ELISA et cytométrie en flux	22 22
2.2.2.2.1 ELISA	23
2.2.2.2.2 Cytométrie en flux	
2.2.3 Transfert adoptif des lymphocytes cytotoxiques Tc1	23
2.2.4 Traitement par injection d'anticorps des souriceaux nouveau-nés double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR	23 23
2.2.5 Perfusion des animaux pour les études histologiques	
2.3 Résultats	
2.3.1 Induction chez les souris GFAP-HA adultes d'une atteinte auto-immune dirigée contre les astrocytes par transfert adoptif de lymphocytes T CD8 ⁺ activés spécifiques d'HA	24 24
2.3.1.1 Phénotype des lymphocytes Tc1 injectés	24
2.3.1.2 Contrôle du potentiel pathogène des lymphocytes Tc1 injectés	24
2.3.1.3 Transfert adoptif de 30x10 ⁶ lymphocytes Tc1 chez les souris GFAP-HA adultes	24
2.3.1.3.1 Les Tc1 infiltrent le système nerveux central des souris receveuses GFAP-HA	25
2.3.1.3.2 Les Tc1 induisent la destruction sélective des cellules exprimant l'auto-antigène	26
2.3.2 Etude du phénotype des animaux double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR	26

2.3.2.1 Description	27
2.3.2.2 Origine auto-immune de la maladie développée par les souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR	
2.3.2.3 Traitement au long cours des souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR avec un anticorps monoclonal anti-CD8 déplaçant les lymphocytes CD8 ⁺ pathogènes	28 29 29
3 Discussion et perspectives	
3.1 Potentiel encéphalitique de lymphocytes T CD8 ⁺ spécifiques d'un auto-antigène astrocytaire	32
3.2 Modèle double transgénique GFAP-HA x CL4-TCR : rôle des cellules gliales intestinales dans le maintien de l'intégrité de la paroi intestinale	34 34 37
3.3 Conclusion générale	5
Références	
Figures 1 à 10	

GLOSSAIRE ET ACRONYMES

IMMUNOLOGIE

LT : lymphocyte T

TCR : récepteur à l'antigène des lymphocytes T

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité (locus HLA chez l'homme, locus H-2 chez la souris)

Auto-antigène - « néo » auto-antigène : Toute molécule reconnue par le système immunitaire est un antigène. Les auto-antigènes, ou antigènes du soi, sont exprimés ou produits par les cellules normales de l'organisme. Le terme de « néo » auto-antigène désigne un antigène exogène que l'on fait exprimer par transgénèse chez la souris, de manière ubiquitaire ou spécifique d'un type cellulaire.

SYSTEME NERVEUX

SNC : système nerveux central

SNE : système nerveux entérique

SEP : sclérose en plaques

LCR : liquide céphalo-rachidien

MBP, PLP, MOG : La protéine basique de la myéline (MBP), la protéine protéo-lipidique (PLP) et la glycoprotéine oligodendrogliale de la myéline (MOG) sont des protéines ou glycoprotéines de la myéline utilisées dans des expériences d'induction d'une atteinte auto-immune du SNC ciblant la myéline.

BHE : barrière hémato-encéphalique

MODELES ANIMAUX

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

GFAP-HA : lignée de souris transgénique exprimant l'hémagglutinine (HA) du virus influenza sous le contrôle du promoteur de la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP).

CL4-TCR : lignée de souris transgénique pour un TCR spécifique d'un peptide d'HA et restreint par une molécule du CMH de classe I, K^d.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SCLEROSE EN PLAQUES : UN MODELE MURIN TRANSGENIQUE

INTRODUCTION

Divers états pathologiques sont associés à une destruction de la myéline dans le système nerveux central (SNC). L'étiologie et la physiopathologie de la sclérose en plaques (SEP), une maladie inflammatoire démyélinisante du SNC caractérisée histologiquement par la présence de lésions de démyélinisation disséminées dans l'encéphale et la moelle épinière, sont encore mal connues. Des facteurs génétiques et environnementaux contribuent indiscutablement à la susceptibilité à la maladie, et il est maintenant largement admis qu'une réaction auto-immune est impliquée dans le développement des lésions. De multiples modèles animaux de la maladie ont permis de mieux comprendre comment, alors que le SNC a longtemps été considéré comme un organe immunologiquement privilégié, une réponse immune pathogène spécifique d'un auto-antigène du SNC pouvait être initiée. Ils ont permis, en outre, de caractériser les populations cellulaires et les mécanismes effecteurs pouvant être impliqués dans le développement des lésions et des symptômes neurologiques et de tester diverses stratégies immunothérapeutiques. Cependant, en l'absence d'un modèle animal spontané reproduisant les aspects cliniques et les lésions observés dans la maladie humaine, de nombreuses interrogations persistent, concernant notamment la chronologie des événements conduisant au développement des lésions caractéristiques de démyélinisation, l'identité de la cible primaire de la réponse auto-immune au cours de la SEP et les contributions respectives des différentes sous-populations de lymphocytes T (LT) dans l'initiation et le développement des lésions. Afin d'approfondir ces derniers points, nous avons généré un modèle murin transgénique d'affection auto-immune du SNC. Dans ce modèle, la cible de la réaction auto-immune n'est ni la myéline, ni la cellule de la myélinogénèse, l'oligodendrocyte, mais un type de cellule gliale majoritairement représenté dans le SNC, l'astrocyte; les cellules effectrices de l'auto-réactivité sont des LT cytotoxiques CD8⁺, population lymphocytaire dont le rôle au cours des maladies auto-immunes a probablement été sous-estimé, malgré un récent regain d'intérêt. Ce modèle est basé sur l'utilisation de deux lignées de souris transgéniques. D'une part, la lignée GFAP-HA, exprimant l'hémagglutinine (HA) du virus influenza sous le contrôle du promoteur de la GFAP (glial fibrillary acidic protein), protéine spécifique des astrocytes et, d'autre part, la lignée CL4-TCR, exprimant un récepteur à l'antigène des LT

(TCR) spécifique d'un peptide de la protéine HA et restreint par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, K^d, sur 95% des LT CD8⁺. Ces deux lignées de souris transgéniques nous offrent l'opportunité d'aborder des questions précises concernant la physiopathologie des affections auto-immunes du système nerveux et, en particulier, les conséquences cliniques et histologiques d'une réaction auto-immune dirigée contre les astrocytes, et induite par des LT cytotoxiques CD8⁺.

1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Le système immunitaire spécifique: tolérance au soi et maladies auto-immunes

Le système immunitaire a pour principale fonction de protéger l'organisme des infections par des agents pathogènes. Le système immunitaire non spécifique, ou inné, regroupe différents types cellulaires capables de reconnaître des déterminants antigéniques communs à plusieurs agents pathogènes et/ou de s'activer en réponse à des signaux inflammatoires émis par les cellules de l'organisme infectées ou lésées. Le système immunitaire spécifique, ou acquis, regroupe les lymphocytes T et B, cellules qui expriment à leur surface des récepteurs à l'antigène capables de reconnaître des déterminants antigéniques spécifiques d'un agent pathogène donné. Nous nous intéresserons ici uniquement aux LT qui expriment un récepteur à l'antigène appelé TCR (pour T-cell receptor) et sont distribués en deux sous-populations selon le co-récepteur qu'ils expriment, les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺. Le ligand reconnu spécifiquement par un TCR donné est un complexe formé par une molécule de présentation et un peptide antigénique. Un peptide antigénique est une courte séquence d'acides aminés issue de la dégradation d'une protéine. Toute protéine produite par une cellule de l'organisme et toute molécule phagocytée sera dégradée, découpée en peptides qui seront alors présentés aux lymphocytes T. Les molécules de présentation sont les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (présentation des peptides antigéniques aux LT CD8⁺) et de classe II (présentation des peptides antigéniques aux LT CD4⁺).

Le récepteur à l'antigène des LT (TCR) doit pouvoir reconnaître un nombre infini de séquences peptidiques pouvant être exprimées par des éléments extérieurs à l'organisme (antigènes du non-soi), mais il est pourtant indispensable que les LT ne soient pas capables de développer une réponse immune contre un antigène exprimé constitutivement par une cellule normale de l'organisme (antigènes du soi). Cet état de tolérance immunologique vis-à-vis des antigènes du soi est obtenu et maintenu par le biais de plusieurs mécanismes au cours du

développement des LT dans le thymus (tolérance centrale) mais également alors que les LT circulent dans les organes lymphoïdes secondaires (tolérance périphérique). Il arrive pourtant que des clones de LT échappent à ces mécanismes d'induction de la tolérance. Une réaction immunitaire dirigée contre un ou des antigène(s) du soi (également appelés auto-antigènes) peut alors se développer, entraînant des lésions et une symptomatologie variées, selon la nature et la distribution de(s) l'auto-antigène(s) ciblé(s). On regroupe ces états pathologiques sous le terme de maladies auto-immunes.

1.2 Les maladies inflammatoires démyélinisantes chez l'homme, la sclérose en plaques (SEP)

On regroupe sous le terme d'affections démyélinisantes l'ensemble des états pathologiques au cours desquelles une destruction de la myéline, qui entoure les axones et permet la conduction rapide des potentiels d'action, a lieu. Nous porterons ici un intérêt particulier à la plus fréquente de ces affections en France, la SEP. Dans un second temps, les modèles animaux les plus utilisés pour l'étude de la physiopathologie des affections auto-immunes du SNC seront présentés.

Les affections démyélinisantes du SNC chez l'homme peuvent être schématiquement regroupées en plusieurs catégories selon leur étiologie: inflammatoires et infectieuses (SEP, encéphalomyélites post-infectieuses et post-vaccinales), vasculaires (leucoaraïose), toxiques (alcool, intoxication au monoxyde de carbone) et traumatiques (Cambier *et al.*, 1998).

La SEP est une maladie inflammatoire démyélinisante du SNC caractérisée sur le plan anatomopathologique par la présence de lésions de la substance blanche de l'encéphale et de la moelle épinière. Ces lésions sont dispersées dans l'espace et dans le temps et sont à l'origine de symptômes neurologiques polymorphes. La destruction de la myéline est primitive, et non secondaire à une atteinte des neurones. Seule la myéline du SNC est atteinte, la myéline des nerfs périphériques n'est jamais lésée. La SEP débute chez l'adulte jeune, dans les deux tiers des cas entre 20 et 40 ans, et affecte un peu plus fréquemment la femme que l'homme (trois femmes pour deux hommes). Elle présente une répartition géographique particulière, avec des zones de haute à moyenne prévalence dans les pays tempérés (Europe, Amérique du Nord) et des zones de basse prévalence dans les régions tropicales et subtropicales. C'est en France la maladie neurologique de l'adulte jeune la plus fréquente, touchant actuellement près de 60 000 personnes (deux millions dans le monde). Chaque lésion est un foyer de démyélinisation étendu dans les trois dimensions, de volume variable,

évoluant de manière autonome en deux phases: une phase inflammatoire (avec œdème, infiltrats inflammatoires, notamment périvasculaires et destruction des gaines de myéline) et une phase de cicatrisation / sclérose au cours de laquelle, si l'on peut observer une remyélinisation partielle, la gliose astrocytaire prédomine, envahissant irréversiblement la lésion. La répartition aléatoire des plaques entraîne une symptomatologie variée et le développement autonome de chaque lésion est, schématiquement, responsable de l'évolution généralement discontinue de la maladie. Classiquement, la maladie évolue dans un premier temps par poussées, épisodes d'aggravation brusque, séparées par des périodes de rémission, plus ou moins complète. Cependant, à mesure que les poussées se répètent, de plus en plus de séquelles invalidantes persistent et une aggravation progressive de la maladie commence au bout de quelques années (forme rémittente, secondairement progressive dans environ 55% des cas). La maladie peut aussi présenter un mode d'évolution progressif d'emblée (15% des cas) ou prendre une forme définitivement rémittente (30% des cas). Ainsi, tant sur les plans clinique que lésionnel, la SEP prend des aspects très variables et seules les lésions caractéristiques de démyélinisation sont constamment retrouvées.

Des études génétiques et épidémiologiques ont été menées dans le but d'identifier des facteurs de susceptibilité à la maladie. La plus grande prévalence de la maladie dans certains groupes ethniques, ainsi que les études épidémiologiques, réalisées sur des familles, ayant mis en évidence un plus grand risque de développer la maladie pour les membres de la famille d'un patient, notamment chez les jumeaux monozygotes (30%) comparés aux jumeaux dizygotes de même sexe (4%), ont motivé la recherche des gènes impliqués dans la prédisposition à la SEP. A ce jour, plusieurs gènes ont été suspectés ou identifiés, chacun avec un risque associé faible ; cependant, les résultats des diverses études ne sont pas toujours concordants, suggérant que la prédisposition génétique à la maladie, voire le mode évolutif de la SEP, sont soumis à l'influence de plusieurs gènes. Au sein de la population Caucasienne, seul un allèle du CMH de classe II a constamment été associé avec la SEP (Kalman et Lublin, 1999). De plus, plusieurs observations épidémiologiques suggèrent que des facteurs environnementaux (exposition à un agent infectieux, à un antigène alimentaire...) sont impliqués dans la susceptibilité à la maladie. Par exemple, la migration d'un individu avant l'adolescence d'une zone de haute prévalence vers une zone de basse prévalence réduit le risque de SEP; de même, au sein d'un même groupe ethnique, la prévalence varie en fonction de la zone géographique.

Bien qu'on connaisse la SEP depuis plus d'un siècle, la cause de la maladie est encore inconnue, et il est possible que la SEP regroupe en fait plusieurs entités pathologiques ayant

en commun une atteinte inflammatoire chronique et démyélinisante du SNC, mais avec des étiologies, des facteurs de prédisposition, voire des modes d'évolution et des types lésionnels différents (Lucchinetti *et al.*, 2000).

Plusieurs arguments suggèrent cependant qu'une réaction immune au sein du SNC serait impliquée dans la formation des lésions. En effet, les infiltrats inflammatoires sont composés de macrophages et de lymphocytes T et B, et les LT infiltrants présentent des signes d'activation (expression du récepteur à l'interleukine-2 (IL-2) et des molécules du CMH de classe II; production locale d'interféron- γ (IFN- γ), de Tumor necrosis factor- α et - β (TNF- α et - β), et d'IL-2) (Martin et McFarland, 1995). De plus, les effets des traitements immunomodulateurs sur la maladie (effet bénéfique des molécules immunosuppressives, effet délétère de l'IFN- γ) viennent renforcer cette hypothèse. Les cibles de cette réaction immunitaire sont encore inconnues, mais plusieurs arguments suggèrent qu'une réaction auto-immune est à l'origine de la maladie. En effet, on retrouve dans le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les lésions des patients atteints de SEP, des auto-anticorps anti-myéline et des LT spécifiques de composants myéliniques (Genain *et al.*, 1999; Martin et McFarland, 1995). D'autre part, une susceptibilité génétique associée à certains haplotypes HLA a déjà été mise en évidence pour d'autres maladies à composante auto-immune, comme le diabète insulino-dépendant. Enfin, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), une affection présentant des analogies cliniques et histologiques avec la SEP, peut être induite chez de nombreuses espèces animales par immunisation soit avec de la myéline totale, soit avec des protéines purifiées de la myéline, soit encore par transfert adoptif de LT activés spécifiques d'un antigène de la myéline. Ainsi, il est maintenant largement admis qu'une réaction auto-immune vis-à-vis d'un antigène du SNC a lieu au cours de la SEP et est impliquée dans le développement des lésions, mais les cibles cellulaire et moléculaire de cette réaction, ainsi que les cellules et les mécanismes effecteurs impliqués dans l'initiation et le développement des lésions ne sont pas identifiés à l'heure actuelle. D'autre part, il est à noter que le caractère primaire ou secondaire à un événement inflammatoire (maladie neurodégénérative, infection virale...) de cette réaction auto-immune reste à déterminer. Il est en effet envisageable qu'une réaction inflammatoire au sein du SNC, associée à une destruction tissulaire et à la circulation d'auto-antigènes normalement séquestrés dans le SNC vers les organes lymphoïdes secondaires, induise l'activation de clones de LT spécifiques de ces structures et ayant échappé à la sélection négative intrathymique. Un dysfonctionnement des mécanismes de régulation de cette réponse auto-immune ou une sensibilité exacerbée des

cellules cibles à la mort cellulaire pourraient alors être à l'origine de la dérive de cette réponse vers la chronicité.

1.3 Les modèles animaux d'affections auto-immunes du système nerveux central

En l'absence d'un modèle animal spontané reproduisant les aspects clinique et lésionnel de la maladie humaine, plusieurs modèles animaux ont été créés avec l'objectif de mieux appréhender les conditions de développement d'une réaction auto-immune au sein du SNC et les répercussions d'une telle réaction sur la myéline, d'identifier des facteurs de susceptibilité à la maladie et de définir de nouvelles approches thérapeutiques. Différents modèles d'étude de la physiopathologie des affections auto-immunes du SNC seront décrits ici, tels que l'EAE par immunisation active, l'EAE par transfert adoptif de LT auto-réactifs et les modèles murins transgéniques.

1.3.1 L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale par immunisation active

1.3.1.1 Description

Le modèle de l'EAE a initialement été créé dans le cadre de l'étude de l'encéphalomyélite post-vaccinale. En effet, au début du 20^{ème} siècle, des cas d'encéphalomyélite furent décrits suite à des vaccinations antirabiques réalisées avec des souches virales cultivées sur des homogénats de moelle épinière de lapin. En 1933, Rivers et al. (1933) mettaient en évidence que des macaques immunisés avec ce vaccin ou un extrait de moelle épinière seul développaient en quelques jours une encéphalomyélite caractérisée par une inflammation périvasculaire et des lésions de démyélinisation analogues à celles décrites dans la SEP. L'EAE est aujourd'hui couramment utilisée en tant que modèle d'étude de la SEP. Elle est induite chez de nombreuses espèces de mammifères (rongeurs, lapin, primates non humains) par immunisation avec de la myéline totale, des protéines de la myéline purifiées, voire des peptides antigéniques de ces protéines, en présence d'adjuvant. Dix à trente jours après l'immunisation, les animaux développent une maladie le plus souvent aiguë et monophasique, avec des symptômes neurologiques caractéristiques et progressifs. La symptomatologie et l'évolution de l'EAE sont à ce point reproductibles qu'une échelle internationale de gradation de la maladie est aujourd'hui utilisée. La maladie débute par une parésie / paralysie de la queue (stade 1) associée à une perte de poids. Progressivement, la parésie (stade 2) puis la

paralysie (stade 3) affectent les membres postérieurs, puis antérieurs (stade 4). La tétraplégie, enfin, peut être fatale (stade 5).

Le temps de latence entre l'immunisation et les premiers symptômes, la sévérité de la maladie, la nature des lésions (importances respectives de l'inflammation et de la démyélinisation) et le type d'évolution (monophasique ou chronique / rémittente) de la maladie varient, au sein d'une même espèce, d'une souche à l'autre. Certaines souches de rongeurs sont résistantes à l'induction de l'EAE par immunisation. L'étude approfondie des causes génétiques des divergences observées entre différentes souches au sein d'une même espèce a notamment permis d'affirmer que des gènes situés dans le locus du CMH jouent un rôle majeur dans la susceptibilité à l'EAE (Martin et McFarland, 1995). La maladie induite présente également des aspects clinique et lésionnel différents en fonction de l'immunogène utilisé, de la voie d'administration, de la dose administrée, du type d'adjuvant et du sexe des animaux.

1.3.1.2 Les protéines de la myéline

Au cours de la SEP, les lésions sont essentiellement situées dans la substance blanche et la myéline apparaît comme la cible primaire la plus probable de la réaction auto-immune. Pour cette raison et afin d'affiner l'identification des molécules ciblées par la réponse auto-immune, la maladie et les lésions induites après immunisation avec différents antigènes myéliniques ont été extensivement étudiées. La myéline est composée de 70% de lipides et de 30% de protéines. Les protéines de la myéline les plus représentées sont la MBP (myelin basic protein) et la PLP (proteo-lipid protein) qui constituent 80% des protéines de la myéline. Des glycoprotéines de la myéline ont été utilisées dans des expériences d'induction d'EAE, comme la MAG (myelin associated glycoprotein) et la MOG (myelin oligodendroglia glycoprotein), cette dernière ayant la caractéristique d'être spécifiquement exprimée dans le SNC (Baumann et Pham-Dinh, 2001). L'EAE peut être induite par immunisation avec ces différentes protéines purifiées ou avec des peptides antigéniques de ces protéines en présence d'adjuvant, le plus utilisé étant l'adjuvant complet de Freund. La voie d'administration la plus efficace pour l'induction d'une réponse auto-immune dans ce modèle est la voie sous-cutanée.

1.3.1.3 L'immunopathologie de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

Le choix d'induire l'EAE en utilisant des protéines de la myéline purifiées, voire des peptides de ces protéines, a permis de comparer de manière approfondie les réponses immunes dirigées contre différents épitopes de la myéline. L'utilisation de lignées établies d'animaux syngéniques et congéniques permet également l'analyse des facteurs génétiques impliqués dans l'évolution et la sévérité de la maladie. Pour ces raisons, la souris et le rat sont les deux espèces chez lesquelles l'EAE a le plus été étudiée.

L'EAE est un modèle de maladie auto-immune induite par des LT CD4⁺ de type Th1 (sécréteurs de cytokines telles que l'IL-2, l'IFN γ et le TNF α). Après immunisation avec un antigène de la myéline en présence d'adjuvant, des LT CD4⁺ spécifiques de cet antigène sont activés dans les ganglions lymphatiques drainant le site d'injection et se différencient en LT CD4⁺ de type Th1. L'activation entraîne une modification du profil des molécules d'adhésion exprimées par les LT et leur confère la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et de pénétrer dans le parenchyme du SNC (Hickey *et al.*, 1991) où ils rencontrent l'auto-antigène cible.

Les maladies et les lésions développées suite à l'immunisation avec de la myéline totale ou avec diverses protéines de la myéline purifiées ne sont pas identiques. L'immunisation de souches susceptibles de souris avec de la myéline totale induit une maladie clinique accompagnée de lésions du SNC caractérisées par la présence d'infiltrats inflammatoires et de zones de démyélinisation. En revanche, l'immunisation de ces animaux avec de la MBP ou de la PLP purifiées induit une EAE caractérisée par des lésions très inflammatoires et peu de démyélinisation (Martin et McFarland, 1995).

L'utilisation récente de la MOG dans l'induction de l'EAE a permis d'induire un modèle d'EAE où la démyélinisation est importante, associée à des infiltrats inflammatoires, reproduisant des lésions histopathologiques plus proches de la SEP (Linington *et al.*, 1993). Ce modèle a permis de mettre en évidence que la démyélinisation au cours de l'EAE est associée à la présence d'auto-anticorps anti-myéline. En effet, l'injection d'un anticorps monoclonal anti-MOG à des rats susceptibles, immunisés avec de la MBP purifiée, induit une aggravation de la maladie et de l'inflammation, et la formation de lésions de démyélinisation (Schluesener *et al.*, 1987). Ce phénomène a également été démontré chez le primate non humain, dans un récent modèle d'EAE induit chez le marmouset (*Callithrix jacchus*) (Genain et Hauser, 1997). Ainsi, bien que l'EAE soit une maladie essentiellement induite par des LT CD4⁺ auto-réactifs activés qui peuvent à eux seuls être responsables de l'inflammation et des symptômes neurologiques caractéristiques, la démyélinisation pourrait être un phénomène lié à la présence d'auto-anticorps démyélinisants. Cette observation est en accord avec la

présence d'auto-anticorps anti-MBP et anti-MOG dans le LCR des patients atteints de SEP, mais il faut souligner que des auto-anticorps anti-myéline ont également été détectés chez des donneurs sains et que le rôle de ces auto-anticorps dans la démyélinisation n'a pas encore été formellement démontré dans la SEP.

L'implication des LT CD8⁺ dans la physiopathologie de l'EAE induite par immunisation a également été étudiée. Les résultats obtenus, soit chez des souris déficientes en LT CD8⁺ (Koh *et al.*, 1992), soit en traitant les animaux immunisés avec un anticorps anti-CD8 (Jiang *et al.*, 1992), suggèrent que les LT CD8⁺ ont un rôle effecteur mais aussi régulateur au cours de la maladie.

Diverses stratégies immunothérapeutiques ont été testées sur l'EAE par immunisation active. La déplétion en LT CD4⁺, induite par administration d'anticorps anti-CD4, entraîne notamment la guérison de l'EAE. Ce traitement a été mis en œuvre chez l'homme, mais n'a pas eu la même efficacité. D'autres approches ont été testées : inhibition de facteurs sécrétés au cours de l'inflammation (tels que le TNF α et la lymphotoxine) qui pourraient être responsables, par leur effet toxique, de la mort des oligodendrocytes; inhibition des molécules d'adhésion impliquées dans le passage de la BHE par les LT; administration de cytokines immuno-modulatrices ou d'anticorps bloquant l'action de cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IL-1 et l'IL-12); stratégies visant à dévier la réponse immune vers la génération de lymphocytes régulateurs (administration orale de myéline, utilisation de ligands peptidiques altérés). Les traitements testés chez le rongeur n'ont cependant pas systématiquement un effet bénéfique sur la maladie humaine, voire aggravent la maladie, soulignant les limites de l'EAE comme modèle de SEP.

1.3.2 L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale par transfert adoptif de lymphocytes T

L'EAE par transfert adoptif est induite par l'injection d'une population de LT encéphalitogènes à un receveur syngénique sain. Ces LT pathogènes (LT totaux, LT CD4⁺ ou CD8⁺ purifiés) sont généralement prélevés sur un animal chez lequel on a induit une EAE par immunisation active ; ils induisent chez le receveur sain une maladie similaire à celle observée chez le donneur. Ces expériences ont initialement permis de démontrer le rôle central des LT CD4⁺ dans le développement de l'EAE chez les rongeurs. L'utilisation récente du marmouset (Genain et Hauser, 1997) a permis de faire la même observation chez les primates non humains. L'étude des maladies auto-immunes induites par des LT est en effet possible chez ce primate qui présente une caractéristique unique : les placentas des fœtus d'une portée

fusionnent et les animaux échangent leurs cellules hématopoïétiques au cours de la vie foetale. Chaque membre d'une fratrie, bien que génétiquement unique, devient ainsi tolérant vis-à-vis des cellules dérivées de la moelle osseuse de ses frères et sœurs, ce qui rend possible le transfert adoptif de LT d'un individu à l'autre au sein d'une même portée.

Alors que la majorité des modèles utilisent des épitopes de la myéline comme cibles de la réponse auto-immune, le modèle de l'EAE par transfert adoptif a permis de mettre en évidence chez le rat le rôle encéphalitogène de LT CD4⁺ auto-réactifs spécifiques de la protéine S100β, exprimée par les astrocytes, cellules gliales non impliquées dans la myélinisation (Kojima *et al.*, 1994).

Le potentiel pathogène de LT CD8⁺ spécifiques d'antigènes de la myéline a récemment été étudié. Sun *et al.* (2001) et Huseby *et al.* (2001) ont analysé le potentiel encéphalitogène des LT CD8⁺ dans deux modèles de transfert adoptif de LT CD8⁺ prélevés à partir d'animaux immunisés avec MOG et MBP, respectivement, et réinjectés à des receveurs syngéniques sains. Dans les deux cas, les LT CD8⁺ auto-réactifs sont capables d'induire l'apparition de symptômes neurologiques, cependant différents de ceux observés classiquement au cours de l'EAE par immunisation active, et le développement de lésions inflammatoires du SNC.

1.3.3 Les modèles murins transgéniques

1.3.3.1 Les lignées de souris transgéniques pour un récepteur à l'antigène des LT (TCR)

Le développement des techniques de clonage de LT et de transgénèse a permis la génération de lignées de souris exprimant un TCR spécifique d'un peptide d'une protéine de la myéline à la surface d'une large proportion de leurs LT. Ces lignées constituent, d'une part, des sources aisément manipulables de LT auto-réactifs, relativement homogènes et de spécificité connue, qui pourront être utilisés dans des expériences d'induction d'EAE par transfert adoptif. D'autre part, l'activation spontanée ou induite des LT exprimant le TCR transgénique, spécifique d'un auto-antigène myélinique donc auto-réactifs chez ces animaux, génère des modèles de maladie auto-immune ciblant la myéline. Par exemple, Waldner *et al.* (2000) ont généré une lignée de souris transgénique appelée « PLP-TCR », en introduisant par transgénèse les chaînes α et β du TCR d'un clone de LT CD4⁺ spécifique du complexe I-A^s:PLP139-151. Lorsque ces animaux sont élevés dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), environ 40% d'entre eux développent une EAE spontanée sévère dès l'âge de 6 semaines. Ces modèles offrent ainsi l'opportunité d'étudier, sur une population auto-

réactive et encéphalitogène artificiellement amplifiée, les conditions de rupture de la tolérance immune vis-à-vis d'auto-antigènes spécifiques du SNC. En effet, on retrouve dans le sang de patients atteints de SEP et des individus sains, des LT auto-réactifs capables de proliférer et de se différencier en cellules effectrices en réponse à une stimulation par des antigènes de la myéline. Cependant, les contextes génétiques et environnementaux et les états pathologiques, dans lesquels ces LT potentiellement pathogènes peuvent être activés restent à caractériser. Par exemple, Goverman et al. (1993) ont généré une lignée de souris transgéniques pour un TCR spécifique du complexe I-A^u:MBP1-11. Le pourcentage de souris de cette lignée développant une EAE spontanée est faible lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions EOPS, mais augmente très significativement lorsqu'elles sont élevées en animalerie conventionnelle, suggérant un rôle de la charge microbienne environnante dans la rupture de la tolérance au soi.

Ces modèles permettent également d'étudier les mécanismes physiologiques de contrôle des populations de LT auto-réactifs. En utilisant une seconde lignée de souris TCR transgénique exprimant un TCR spécifique du peptide MBP1-11 et restreint par I-A^u, Olivares-Villagomez et al. (1998) ont mis en évidence l'existence d'une population de LT CD4⁺ exprimant des TCR composés de chaînes α et β endogènes (par opposition aux réarrangements imposés par transgénèse) capable de protéger les souris de l'EAE. En effet, une EAE spontanée survient chez 100% de ces souris lorsqu'elles n'expriment que le TCR transgénique auto-réactif, alors que la fréquence d'apparition de la maladie est réduite à 14% lorsque ces souris sont capables de produire des LT CD4⁺ d'autres spécificités.

Enfin, les animaux TCR transgéniques permettent de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques, telles que celles basées sur l'élimination sélective d'une population de LT auto-réactifs de spécificité connue au cours d'une maladie auto-immune.

1.3.3.2 Les lignées de souris transgéniques exprimant un « néo » auto-antigène

Une autre approche consiste à créer des animaux exprimant par transgénèse une protéine exogène sous le contrôle du promoteur d'une protéine spécifique du SNC. Dans les types cellulaires où il est naturellement actif, le promoteur conduit à l'expression du transgène. Ces animaux permettent d'étudier les mécanismes d'induction de la tolérance au soi et les conditions de rupture de cet état de tolérance. Par exemple, des souris exprimant une protéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) sous contrôle du promoteur d'une protéine de la myéline ont été générées. Ces animaux ne développent pas de maladie auto-

immune spontanée bien que des LT spécifiques du « néo » auto-antigène soient retrouvés dans le sang. L'infection de ces animaux avec le LCMV induit une réponse immune qui élimine le virus et, après la clairance du virus, les animaux développent une atteinte inflammatoire asymptomatique du SNC. Une seconde infection avec le LCMV induit l'exacerbation de l'atteinte neurologique avec apparition de symptômes et développement de lésions de démyélinisation. De plus, lorsque la seconde infection est réalisée avec un autre virus exprimant des épitopes capables d'induire l'activation croisée de LT spécifiques du LCMV, les animaux développent également cette maladie neurologique sévère (Evans *et al.*, 1996). Ce modèle a ainsi permis de tester l'hypothèse selon laquelle une atteinte auto-immune du SNC peut être induite à la suite d'une infection par un virus exprimant un épitope présentant des similitudes structurelles avec un épitope du soi (phénomène de mimétisme moléculaire).

2 ETUDE EXPERIMENTALE

2.1 Génération d'un modèle d'étude du potentiel encéphalitogène des lymphocytes T CD8⁺, justification et limites de la stratégie

Dans le modèle animal d'atteinte auto-immune du SNC le plus étudié, l'EAE par immunisation active, les LT CD4⁺ jouent un rôle effecteur central et la grande majorité des études menées ont ciblé cette population. Néanmoins, plusieurs arguments suggèrent que les LT CD8⁺ cytotoxiques pourraient être également impliqués dans la physiopathologie de la SEP. En effet, les gènes du CMH de classe I sont en déséquilibre de liaison avec les gènes du CMH de classe II qui ont été associés à la susceptibilité à la maladie et certains allèles de classe I pourraient avoir une influence sur la susceptibilité à la maladie (Fogdell-Hahn *et al.*, 2000). De plus, des clones CD8⁺ spécifiques d'antigènes de la myéline ont été isolés à partir du sang de patients atteints de SEP ainsi que de donneurs sains, et des lignées de LT CD8⁺ activés spécifiques d'un peptide de la MBP peuvent lyser des oligodendrocytes de même haplotype *in vitro* (Jurewicz *et al.*, 1998). Enfin, des travaux récents ont mis en évidence que les LT CD8⁺ sont plus nombreux que les LT CD4⁺ dans les infiltrats inflammatoires chez les patients atteints de SEP et l'analyse des TCR exprimés par les LT infiltrants indique que les LT CD8⁺ isolés à partir de lésions actives seraient les produits de l'expansion locale d'un nombre restreint de clones (Babbe *et al.*, 2000). Cependant, la spécificité antigénique des LT CD8⁺ présents dans les lésions n'est pas connue et leur rôle pathogène n'est pas avéré.

Au cours de la SEP, les cellules myélinisantes, les oligodendrocytes, sont les principales cibles envisagées, mais ces cellules n'expriment pas les molécules du CMH de classe II et leur niveau d'expression des molécules du CMH de classe I *in vivo* et en l'absence d'inflammation est inférieur au seuil de détection des techniques immunohistochimiques utilisées. De plus, du fait de la sensibilité particulière des oligodendrocytes à la mort cellulaire sous l'action de facteurs pro-inflammatoires sécrétés au cours d'une réponse immune, comme le monoxyde d'azote (Mitrovic *et al.*, 1995) ou le TNF α (Selmaj *et al.*, 1991), on peut envisager qu'une réaction auto-immune dirigée contre un autre type cellulaire puisse induire à proximité une destruction des oligodendrocytes et une altération de la myéline.

Dans le but de tester cette dernière hypothèse et d'évaluer le rôle encéphalitogène de LT CD8⁺, nous avons créé un modèle murin transgénique original d'atteinte auto-immune du SNC. Ce modèle est basé sur l'utilisation de deux lignées de souris transgéniques. D'une part, une lignée exprimant l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe sous le contrôle du promoteur de la GFAP (glial fibrillary acidic protein), une protéine exprimée par les astrocytes dans le SNC (lignée GFAP-HA). Ce transgène peut être considéré comme un "néo" auto-antigène chez ces animaux. D'autre part, une lignée exprimant un TCR spécifique d'un peptide d'HA à la surface de la majorité des LT CD8⁺ (lignée CL4-TCR).

Ces animaux permettent, d'une part, de réaliser des expériences de transfert adoptif de LT CD8⁺ activés spécifiques d'un auto-antigène astrocytaire; d'autre part, le croisement entre ces deux lignées produit des animaux double transgéniques dont une large majorité des LT CD8⁺ sont auto-réactifs, modèle qui offre l'opportunité d'étudier une situation d'auto-réactivité majeure vis-à-vis d'un antigène du système nerveux.

Ce type de modèle permet d'étudier les réactions auto-immunes induites ou spontanées dirigées contre un auto-antigène dont la localisation est contrôlée par transgénèse. Bien que les souris transgéniques GFAP-HA ne présentent pas d'anomalie majeure puisque ces animaux se développent et se reproduisent normalement et qu'aucun trouble neurologique ou comportemental n'a pu être détecté, on ne peut exclure avec certitude que l'expression de la protéine exogène HA entraîne des modifications mineures dans les cellules qui l'expriment. L'utilisation de lignées de souris transgéniques pour un TCR facilite l'étude de l'auto-immunité spécifique d'un auto-antigène donné, mais il est important de souligner que cette technique entraîne un biais majeur de sélection du répertoire T. En effet, la transgénèse impose aux LT en cours de développement l'expression d'un TCR donné, et les possibilités

de génération de TCR endogènes spécifiques d'autres antigènes sont ainsi largement altérées. Ceci est illustré d'une part par l'augmentation nette de la proportion de LT CD8⁺ observée chez les souris CL4-TCR ; et d'autre part par la proportion extrêmement élevée des LT CD8⁺ spécifiques d'HA chez ces animaux (plus de 95%). Ainsi, ces travaux ont été réalisés sur des modèles artificiels, qui présentent un intérêt expérimental certain mais dont les limites ne doivent pas être négligées.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Les lignées de souris transgéniques

2.2.1.1 La lignée GFAP-HA

Les animaux GFAP-HA expriment l'hémagglutinine (HA) du virus influenza du sous-type H1 A/PR/8/34 sous le contrôle du promoteur de la GFAP (ce promoteur avait précédemment été utilisé en transgénèse et conduisait à l'expression de la β -galactosidase dans les astrocytes du SNC (Brenner *et al.*, 1994). Lors de la création de cette lignée, l'expression du transgène dans différents organes a été évaluée par RT-PCR et par des techniques immunohistochimiques (Cornet *et al.*, 2001). HA est exprimé dans le SNC par les astrocytes et dans l'intestin (jéjunum, iléon et colon) par les cellules gliales entériques (figure 1), cellules qui expriment constitutivement la GFAP (Jessen et Mirsky, 1980) et qui sont les analogues des astrocytes du SNC pour le système nerveux intrinsèque du tube digestif. Les animaux transgéniques GFAP-HA ont un développement normal, ne présentent aucun symptôme et l'analyse histologique de leurs systèmes nerveux central et entérique n'a révélé aucune anomalie.

2.2.1.2 La lignée CL4-TCR

Ces animaux expriment un TCR spécifique du peptide HA512-520 (IYSTVASSL) restreint par la molécule du CMH de classe I, K^d, à la surface de plus de 95% de leurs LT CD8⁺. La chaîne β du transgène résulte du réarrangement V β 8.2-D β 1-J β 1.4 et la chaîne α du réarrangement V α 10.3-J α 34. Chez ces souris, le rapport CD4⁺/CD8⁺ est inversé du fait d'une sélection intrathymique biaisée vers la voie CD8⁺, conséquence de l'expression précoce du TCR restreint par une molécule du CMH de classe I. On retrouve en effet 2 à 5 fois plus de

LT CD8⁺ en périphérie que de LT CD4⁺. Cette lignée a été étudiée et les LT CD8⁺ isolés à partir de ces souris présentent une très grande avidité vis-à-vis du peptide HA512-520 (Pardigon *et al.*, 1998). En effet, des LT CD8⁺ issus de souris CL4-TCR mis en présence d'astrocytes pré-incubés avec le peptide HA512-520 développent une forte réponse proliférative (Cornet *et al.*, 2000). Cette réponse est indépendante de la voie de co-stimulation B7/CD28 et semble due à la très grande affinité du TCR pour son ligand, le complexe K^d:HA512-520. En effet, des LT CD8⁺ exprimant un autre TCR, de moindre affinité, ne développent une telle réponse proliférative que si les astrocytes ont préalablement été traités par l'IFN γ , qui induit sur les astrocytes une augmentation du niveau d'expression des molécules du CMH de classe I et l'expression des molécules de co-stimulation B7.1 et B7.2.

2.2.1.3 Génération des souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR

Les souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR sont produites par croisement entre les deux lignées GFAP-HA et CL4-TCR. Les animaux GFAP-HA et CL4-TCR étant toujours hétérozygotes pour le transgène, ce type de croisement produit des portées dans lesquelles 25% des petits sont double transgéniques.

2.2.1.4 Production et conditions d'élevage de ces lignées

Les deux lignées transgéniques sont produites sur un fond génétique homogène, Balb/c, d'haplotype H-2^d.

Ces lignées sont en élevage en conditions EOPS (exemptes d'organismes pathogènes spécifiques) dans la Nouvelle Animalerie Centrale du CHU Pitié-Salpêtrière (lignées GFAP-HA, CL4-TCR et croisement des deux lignées), et dans le Service d'Expérimentation Animale et de Transgénèse (UPS 44, CNRS, Villejuif) (lignée GFAP-HA).

Pour le maintien des lignées, des mâles transgéniques sont accouplés avec une ou deux femelles Balb/c. Pour la production d'animaux double transgéniques, les mâles d'une lignée sont mis en couple ou en trio avec des femelles de l'autre lignée.

2.2.1.5 Identification des animaux transgéniques par génotypage

Le génotypage des animaux est effectué par réaction de polymérase en chaîne (PCR) à partir d'ADN génomique extrait de biopsies de queues, prélevées au sevrage (GFAP-HA x Balb/c et CL4-TCR x Balb/c) ou le jour de la naissance des animaux (GFAP-HA x CL4-TCR).

2.2.1.5.1 Extraction de l'ADN

Les biopsies de queues sont digérées pendant 16 heures à 55°C dans 700 µl de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, SDS 0.5%) contenant 50 µl de Protéinase K à 10 mg/ml.

Les protéines sont précipitées par adjonction de 700 µl d'un mélange de phénol – chloroforme – alcool isoamylique (dans un rapport de 25 - 24 - 1). Après centrifugation, 500 µl de la phase aqueuse supérieure, contenant l'ADN génomique, sont prélevés et transférés dans un autre tube. La précipitation de l'ADN est réalisée par agitation manuelle après ajout de 100 µl d'acétate de sodium (20 mM, pH 5.2) et de 1 ml d'éthanol. Après centrifugation, le culot est séché puis resuspendu dans 50 µl de tampon TE (Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM).

2.2.1.5.2 PCR

Les séquences amplifiées servent à identifier deux génotypes de souris différents :

- Les souris GFAP-HA par leur transgène hémagglutinine :

amorce brin sens : 5'-GTGAGATCATGGTCCTACATT-3'

amorce brin anti-sens : 5'-TCCTGACGTATTTGGGCACT-3'

La taille du fragment attendu est de 710 pb.

- Les souris CL4-TCR :

amorce brin sens : 5'-GCAGGGCTGAAAGAACAGCAA-3'

amorce brin anti-sens : 5'-GCTTCCTCCAGAATTTGAGGC-3'

La taille du fragment attendu est de 480 pb.

Le milieu d'amplification est composé de 0.4 µM de chaque amorce, des quatre dNTP à 1.25 mmol/l, de tampon de Taq polymérase 1X (10 mM Tris-HCl, pH 9, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl), de 2 U de Taq polymérase et d'eau pour un volume final de 50 µl. A chaque PCR, un contrôle positif et un contrôle négatif sont réalisés avec l'ADN génomique d'un animal transgénique déjà identifié et d'un animal non transgénique, respectivement.

Les conditions d'amplification sont les suivantes :

un cycle initial de dénaturation de 5 minutes à 94°C

29 cycles de :

dénaturation 30 s à 95°C

hybridation 30 s à 55°C

élongation 30 s à 72°C

un cycle d'élongation terminale de 10 minutes à 72°C.

Quinze microlitres du produit de la PCR sont mis à migrer avec 4 µl de tampon de charge (0.25% bleu de bromophénol, 0.25% xylène cyanol, 15% Ficoll) sur gel d'agarose 1.5%, contenant 0.1 µg/ml de BET, pendant 20 minutes. Les produits de PCR sont visualisés grâce à une planche à UV.

2.2.2 Génération *in vitro* de LT cytotoxiques de type 1 (Tc1) à partir des LT CD8⁺ de souris CL4-TCR

2.2.2.1 Culture des Tc1

Préparation des cellules :

La rate et les nœuds lymphatiques brachiaux, axillaires, inguinaux et poplités de souris CL4-TCR sont prélevés et dilacérés entre deux lames de verre dépoli dans 20 ml de milieu non complétement Dulbecco's MEM (DMEM). Après lavage, les cellules sont incubées 10 minutes à température ambiante dans une solution de NH₄Cl à 0.83% afin de lyser les hématies.

Purification des LT CD8⁺ par sélection positive :

Les LT CD8⁺ sont purifiés avec le système de tri cellulaire immunomagnétique MACS (Miltenyi Biotec). Les cellules sont incubées 45 minutes à 4°C dans du DMEM avec un anticorps monoclonal (Acm) de rat spécifique du co-récepteur CD8 murin (clone CT-CD8a, Caltag), puis lavées dans un grand volume de tampon MACS (PBS 1X, 0.5% albumine sérique bovine (BSA), 2 mM EDTA) afin d'éviter la formation d'agrégats. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à 4°C dans du tampon MACS avec un Ac de chèvre anti-IgG de rat couplé à des microbilles magnétiques. Après un nouveau lavage, les cellules sont resuspendues dans du tampon MACS et les cellules CD8⁺ sont extraites par passage sur

colonne de séparation (MACS separation columns) fixée sur un aimant. Les cellules retenues sont récupérées, lavées et remises en suspension dans du milieu de culture (DMEM complété avec 10% de sérum de veau fœtal, supplémenté en L-arginine, pénicilline et streptomycine). Le degré de pureté de la population sélectionnée est supérieur à 90%.

Mise en culture des LT CD8⁺ :

Pour la production de Tc1, 0.5×10^6 LT CD8⁺ sont mis en culture sur plaques 24 puits en présence de 5×10^6 splénocytes irradiés de souris Balb/c (5 minutes à 3000 rads) dans un volume de 2 ml de milieu complet contenant 1 µg/ml du peptide HA512-520, 1 ng/ml d'IL-2 et 20 ng/ml d'IL-12 pour promouvoir leur différenciation en Tc1. Après 6 jours de culture, les cellules vivantes sont isolées sur gradient de Ficoll. La pureté des populations de Tc1 obtenues est supérieure à 98% (figure 2a).

2.2.2.2 Caractérisation des populations de LT par ELISA et cytométrie en flux

2.2.2.2.1 ELISA

Afin de déterminer le profil des cytokines sécrétées par les LT, 2×10^6 cellules sont mises en incubation à 37°C sur plaque 24 puits dans 2 ml de milieu complet en présence du peptide HA512-520, d'un mitogène (0.5 µg/ml Acm anti-CD3ε, clone 145-2C11 (Pharmingen)) ou, pour mesurer le bruit de fond, sans stimulation. Après 72h de culture, les surnageants sont prélevés et conservés à -20°C. Les ELISA "sandwich" sont réalisés en utilisant les kits Cytosets IFN γ et IL-4 selon les recommandations du fournisseur (Biosource). Les résultats sont quantifiés par mesure de la densité optique. Des gammes étalons sont réalisées à chaque expérience pour chaque cytokine mesurée.

2.2.2.2.2. Cytométrie en flux

Cette technique est utilisée pour déterminer le phénotype des LT (CD4⁺, CD8⁺) et leur état d'activation en fonction de leur niveau d'expression de marqueurs d'activation des LT (CD25, CD69) et de marqueurs de LT naïfs (CD62L). Cinq cent mille cellules sont incubées dans du tampon FACS (PBS 1X, 1% BSA, 0.02% azide de sodium), 30 minutes à 4°C en présence de l'Acm primaire marqué, puis lavées et resuspendues dans du PBS 1X, 1% PFA pour les fixer.

Afin de révéler les Ac biotinylés, les cellules sont de nouveau incubées 30 minutes à 4°C en présence de streptavidine couplée à un fluorochrome avant d'être fixées. Les réactifs suivants ont été utilisés : anti-CD8 FITC ou -PE (clone 53-6.7), anti-Vβ8 FITC (clone F23.1), anti-CD25 biotinylé (clone 7D4), anti-CD69 biotinylé (clone H1.2F3), anti-CD62L biotinylé (clone MEL-14) (Pharmingen); streptavidine tri-color (Caltag).

Le cytomètre utilisé est un FACScan (Beckton Dickinson), les résultats sont analysés avec le logiciel Cellquest.

2.2.3 Transfert adoptif de Tc1

Ces expériences sont réalisées sur des animaux GFAP-HA adultes et sur des animaux non transgéniques témoins provenant de la même portée. La quantité de Tc1 à administrer est mise en suspension dans 0.3 ml de DMEM. La suspension est injectée par voie intraveineuse (i.v.), dans le sinus veineux rétro-orbitaire.

2.2.4 Traitement par injection d'anticorps des souriceaux nouveau-nés double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR

Ces expériences sont réalisées sur des souriceaux nouveau-nés et débutent dès le jour de la naissance. Cinquante microgrammes d'un Acm anti-CD8 (clone YTS 169) dans un volume de 50 µl sont injectés par voie intra péritonéale (i.p.).

2.2.5 Perfusion des animaux pour les études histologiques

Les animaux sont anesthésiés par injection i.p. de 50 µl d'un mélange de Vétranquil ND (acépromazine) et d'Imalgène 500 ND (kétamine) dans un rapport 1 :1; puis euthanasiés par injection i.v. de 50 µl d'Imalgène 500. Les souris sont perfusées par voie intracardiaque avec 150 à 200 ml de PFA 4% à l'aide d'une pompe péristaltique ou manuellement. Les animaux perfusés sont maintenus dans du PFA 4% pendant 24h puis conservés dans du PBS 1X 0.02% azide de sodium.

2.3 Résultats

Afin d'améliorer la clarté de l'exposé, les résultats seront commentés dans ce chapitre.

2.3.1 Induction chez les souris GFAP-HA adultes d'une atteinte auto-immune dirigée contre les astrocytes par transfert adoptif de LT CD8⁺ activés spécifiques d'HA

2.3.1.1 Phénotype des LT injectés

La préparation de Tc1 à partir de LT CD8⁺ des souris CL4-TCR est détaillée dans le chapitre Matériel et Méthodes, section 2.2.1. Nous avons vérifié leur état d'activation et leur phénotype Tc1 (lymphocyte T cytotoxique de type 1) par cytométrie de flux en évaluant leur niveau d'expression de marqueurs d'activation et de marqueurs de LT naïfs, et en déterminant le profil des cytokines sécrétées par ces cellules après une re-stimulation par le peptide HA512-520. Leur phénotype Tc1 est confirmé par le fait que ces cellules produisent dans ces conditions de larges quantités d'IFN γ (figure 2b) et peu ou pas d'IL-4. Leur état activé est confirmé par l'expression de marqueurs d'activation (CD25, CD69) et la down-régulation du marqueur CD62L (figure 3).

2.3.1.2 Contrôle du potentiel pathogène des Tc1 injectés

Un modèle d'induction de diabète auto-immun par transfert adoptif de Tc1 provenant de souris CL4-TCR avait auparavant été mis au point au laboratoire, utilisant comme animaux receveurs des souris exprimant HA sous le contrôle du promoteur de l'insuline (lignée INS-HA). Chez ces animaux, le transfert adoptif de 2.5×10^6 Tc1 induit en 5 jours un diabète rapidement létal (Vizler *et al.*, 2000). Nous avons utilisé ce modèle comme témoin du caractère pathogène des Tc1, et à chaque expérience de transfert adoptif réalisée chez les souris GFAP-HA, au moins une souris INS-HA a été injectée avec des Tc1 provenant de la même culture. La survenue du diabète chez les animaux INS-HA est détectée par évaluation de la glycosurie à l'aide de bandelettes urinaires.

2.3.1.3 Transfert adoptif de 30×10^6 Tc1 chez les souris GFAP-HA adultes

2.3.1.3.1 Les Tc1 infiltrent le SNC des souris receveuses GFAP-HA

Dans une première série d'expériences, nous avons évalué les conséquences de l'injection i.v. de 30×10^6 Tc1. L'injection de cette dose n'a pas entraîné l'apparition de symptômes cliniques chez les animaux receveurs GFAP-HA, ni chez les souris non transgéniques témoins, pendant une durée d'observation de 15 jours. Dans quelques cas, cependant, lors de la perfusion des animaux en fin d'expérience, un épanchement pleural assez important a été constaté.

Malgré l'absence de symptômes, l'examen histologique d'un groupe expérimental sacrifié 7 jours (à J7) après transfert adoptif révèle une infiltration de l'encéphale et de la moelle épinière par des LT (figure 4a et b). L'infiltration a lieu au niveau des méninges, des espaces périvasculaires et dans le parenchyme. Ces lésions sont accompagnées d'une activation locale des cellules microgliales, mise en évidence par l'augmentation du niveau d'expression de l'antigène Mac-3 (figure 4c) et par leur aspect morphologique. Une infiltration modérée des plexus nerveux entériques est aussi présente.

Afin d'étudier la cinétique d'infiltration du SNC par les Tc1, une série d'expériences de transfert adoptif a été réalisée. Les animaux ont été sacrifiés à différents temps, soit 1, 3, 5, 7 ou 15 jours après transfert adoptif. Pour chaque temps, trois paires d'animaux (transgéniques / non transgéniques issus de la même portée) ont été traitées. L'analyse quantitative du niveau d'infiltration de différentes régions du SNC révèle que dès J1 après transfert, des LT sont retrouvés dans les méninges, les espaces périvasculaires et le parenchyme. Le nombre de LT infiltrants augmente ensuite progressivement au cours du temps et atteint un pic à J5 au niveau des méninges et à J7 dans le parenchyme. Cette infiltration est transitoire et à J15 très peu de LT sont détectés dans le SNC. L'infiltration affecte le SNC des animaux GFAP-HA et des témoins non transgéniques qui n'expriment pas HA, mais le nombre de LT infiltrant les différents tissus est très supérieur chez les receveurs GFAP-HA (figure 5).

Cette infiltration est accompagnée d'une réaction inflammatoire, révélée par l'activation locale de la microglie, en l'absence de recrutement de macrophages circulants. Au niveau des zones infiltrées, les cellules microgliales activées forment des nodules microgliaux comparables à ceux décrits au cours de certaines affections inflammatoires du SNC chez l'homme. Ces nodules sont détectables dès J1 et leur fréquence et leur importance augmentent au pic de l'infiltration.

2.3.1.3.2 Les Tc1 induisent la destruction sélective des cellules exprimant l'auto-antigène

Au pic de l'inflammation, à J7 après transfert, on observe de nombreuses lésions, caractérisées par la disparition des astrocytes exprimant la GFAP (figure 4d). Ce défaut est mis en

évidence en immunohistochimie par un marquage anti-GFAP et l'hybridation *in situ* de l'ARNm de la GFAP sur des coupes de SNC. Ces zones où le marqueur astrocytaire n'est plus détecté se superposent aux zones infiltrées par les LT (figure 4). En périphérie des lésions, le niveau d'expression de la GFAP est augmenté, signe d'une gliose astrocytaire réactionnelle (figure 4d, 8a). L'analyse en microscopie confocale révèle, en périphérie des lésions, des astrocytes co-exprimant la GFAP et la β 2-microglobuline (protéine associée aux molécules du CMH de classe I) en contact avec des LT CD3⁺ (figure 6). Un double marquage révèle également la présence, en périphérie des lésions, d'astrocytes co-exprimant la GFAP et une forme active de la caspase 3 (figure 7), indiquant que la perte du marquage GFAP dans les lésions n'est pas le reflet d'une diminution d'expression de la protéine, mais est due à la mort des astrocytes par apoptose.

La destruction des astrocytes est extrêmement sélective. En effet, différents marquages ont été réalisés pour évaluer la viabilité des autres types cellulaires du SNC ; ils révèlent qu'aucune autre structure n'est altérée : gaines de myéline, oligodendrocytes ou neurones (figure 8).

Chez les témoins non transgéniques ayant reçu la même dose de Tc1, les astrocytes ne sont pas détruits, même dans les zones modérément infiltrées par des LT. Le transfert adoptif de LT CD8⁺ naïfs provenant de souris CL4-TCR a été effectué et n'induit ni infiltration, ni inflammation, ni lésions dans le SNC des animaux receveurs, GFAP-HA ou non transgéniques.

2.3.2 Etude du phénotype des animaux double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR

2.3.2.1 Description

Chez les souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR la situation d'auto-réactivité est majeure, puisque le "néo" auto-antigène HA est exprimé dans les astrocytes du SNC et les cellules gliales entériques du système nerveux entérique, et que plus de 95% des LT CD8⁺ sont spécifiques d'HA. Ces animaux ne présentent pas d'anomalie macroscopique à la naissance, mais accusent très rapidement un retard de croissance important par rapport aux autres petits de la portée (figure 9a), et 100% d'entre eux meurent en 6 à 8 jours (figure 9b) (Cornet *et al.*, 2001).

L'examen nécropsique révèle que le tube digestif est principalement affecté. Il est en effet distendu sur toute sa longueur et congestionné. Dans certains cas, du lait est répandu dans la cavité abdominale, indiquant une perforation de la paroi intestinale. L'analyse histologique

révèle la présence de lésions intestinales chez 100% des petits double transgéniques et de lésions du SNC chez 30% d'entre eux. Aucun autre organe vital n'est affecté.

Lésions intestinales : les lésions sont distribuées de l'intestin grêle au colon proximal et sont plus sévères au niveau de l'iléon. L'examen microscopique révèle un épaissement et une désorganisation complète de la paroi intestinale, y compris des couches musculaires, ainsi que la présence d'hémorragies et d'œdème au niveau de la sous-muqueuse, voire de la muqueuse intestinale. Les villosités et les cryptes ont un aspect normal. Aux stades précoces, la maladie affecte principalement les vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse, ce qui se traduit par une vasodilatation et une érythrocytose. La progression de l'atteinte vasculaire est caractérisée par l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules endothéliales vasculaires, la transmigration de leucocytes, la formation de microthrombi intravasculaires et la présence locale d'œdème. Aux stades tardifs, l'hémorragie et l'œdème affectent également la muqueuse, la musculaire-muqueuse et la musculature externe (figure 10a et b). Une infiltration inflammatoire modérée débutant dès le deuxième jour de vie s'associe à ces lésions. L'analyse immunohistochimique révèle en effet la présence de LT, en particulier CD8⁺, dispersés dans la muqueuse, la sous-muqueuse et la musculature (figure 10c et d), ainsi que dans le mésentère. L'utilisation d'un double marquage, anti-CD3 (marqueur pan-T) et anti-GFAP, met en évidence des LT situés à proximité de cellules gliales entériques. Le niveau d'expression de GFAP est significativement réduit chez les animaux double transgéniques et les cellules GFAP⁺ résiduelles présentent dans une grande proportion des signes d'apoptose. Ces modifications sont plus prononcées au niveau du plexus sous-muqueux. L'utilisation d'un marqueur neuronal (PGP9.5) révèle que le nombre de neurones du système nerveux entérique n'est pas affecté chez les animaux double transgéniques par rapport aux contrôles non transgéniques.

Lésions du SNC : chez 30% des nouveau-nés double transgéniques, on note la présence de lésions du SNC qui affectent principalement le cortex cérébral. Il s'agit de zones de nécrose. Au sein des lésions on observe des astrocytes et de rares LT en apoptose, ainsi que des cellules marquées positivement par l'Ac anti-Mac3 qui sont des cellules microgliales ou des macrophages infiltrant le SNC. En périphérie de ces lésions, le niveau d'expression de GFAP par les astrocytes est augmenté, témoin d'une gliose réactionnelle.

2.3.2.2 Origine auto-immune de la maladie développée par les souriceaux double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR

Nous avons démontré l'origine auto-immune de la maladie développée par les souriceaux double transgéniques de deux façons. D'une part, les nouveau-nés double transgéniques ont été traités pendant une courte durée par un Acm déplétant anti-CD8 afin de prévenir l'interaction entre les LT CD8⁺ spécifiques d'HA et les cellules exprimant ou présentant HA. Le traitement, administré à J2, J4 et J6 après la naissance, protège les individus traités pendant plus de deux semaines, alors que les animaux double transgéniques traités avec un Ac contrôle de même isotype meurent en 6 à 8 jours.

Dans une deuxième approche, le fond génétique des souris a été modifié. Les deux lignées transgéniques, GFAP-HA et CL4-TCR ont été croisées avec la lignée C57Bl/6, d'haplotype H-2^b, afin de générer des animaux GFAP-HA et CL4-TCR hétérozygotes H-2^{d/b}. Le croisement entre ces deux types de souris génère des animaux double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR H-2^{b/b}, chez lesquels le peptide HA512-520 ne peut pas être présenté aux LT CD8⁺ spécifique d'HA puisque ces animaux n'expriment pas la molécule de présentation du CMH de classe I K^d. Ces animaux présentent une croissance et une survie normales, et l'analyse histologique de leur intestin et de leur SNC n'a révélé aucune anomalie.

2.3.2.3 Traitement au long cours des souriceaux double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR avec un anticorps monoclonal anti-CD8 déplétant les LT CD8⁺ pathogènes

Ces expériences ont été mises en œuvre afin d'évaluer l'impact du stade de maturité du système immunitaire et de la paroi intestinale sur le développement de la maladie intestinale, qui débute dès le deuxième jour de vie. Plusieurs observations tendent à montrer que chez le nouveau-né les LT naïfs ont la capacité de circuler dans le parenchyme de différents organes (Alferink *et al.*, 1999), alors que chez l'adulte la circulation des LT naïfs est largement restreinte aux organes lymphoïdes secondaires. Ce phénomène serait impliqué dans l'instauration de la tolérance au soi pour des LT auto-réactifs ayant échappé à la sélection négative intrathymique ou spécifiques d'auto-antigènes non exprimés dans le thymus. Dans le cas des nouveau-nés double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR, étant donnée la très grande avidité des LT CD8⁺ TCR-transgéniques pour le peptide HA512-520 et leur aptitude à s'activer en l'absence de co-stimulation, cette accessibilité accrue des LT aux tissus pendant la période néonatale pourrait être un des facteurs déclenchant de la maladie. D'autre part, il existe des mécanismes de contrôle des réactions immunes (sous-populations de LT régulateurs, nature et stade de maturité des cellules présentatrices d'antigène,...) qui

pourraient être encore insuffisants au deuxième jour de vie. Enfin, l'organisation du système nerveux entérique (SNE) présente des analogies avec celle du SNC et il est envisageable qu'une barrière entre le SNE et la circulation générale, comparable à la BHE, existe (Cabarrocas *et al.*, 2003a). L'immaturité, en période néonatale, de cette barrière pourrait faciliter l'accès des LT CD8⁺ auto-réactifs aux cellules exprimant HA au sein du SNE.

L'objectif de ces expériences est de bloquer la maladie développée par les souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR en déplaçant les LT CD8⁺. Le traitement est levé au sevrage (21 jours après la naissance) et les animaux sont observés quotidiennement jusqu'à l'apparition de symptômes neurologiques ou digestifs. A ce jour, 5 animaux ont été traités avec l'Ac déplaçant anti-CD8 dès le jour de leur naissance, puis un jour sur deux jusqu'au sevrage. Tous ces animaux sont morts 8 à 39 jours après arrêt du traitement sans présenter de symptômes digestifs ou neurologiques francs. L'analyse anatomopathologique de ces souris est en cours.

3 DISCUSSION - PERSPECTIVES

3.1 Potentiel encéphalitogène de LT CD8⁺ spécifiques d'un auto-antigène astrocytaire

Le modèle de transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques d'un auto-antigène astrocytaire et polarisés *in vitro* vers la production de cytokines pro-inflammatoires met en évidence le potentiel encéphalitogène de cette population de LT. L'injection de Tc1 chez les animaux exprimant l'auto-antigène HA dans les astrocytes induit en effet une réaction inflammatoire monophasique dans le cerveau et la moelle épinière. L'infiltration modérée du SNC des animaux contrôles n'exprimant pas HA montre que les LT CD8⁺ activés sont capables de traverser la BHE et de circuler dans le SNC, mais ne s'accumulent dans ce site que si leur antigène cible est présent.

Les expériences de transfert adoptifs de lymphocytes CD8⁺ de type Tc1, spécifiques d'un auto-antigène astrocytaire, ont permis de mettre en évidence l'extrême spécificité de la réponse cytotoxique induite par ces cellules. En effet, en l'absence d'expression du transgène HA, aucune destruction cellulaire n'a pu être mise en évidence au sein du SNC et, en présence du « néo » auto-antigène, seules les cellules exprimant HA dans le SNC sont lésées, en l'absence de lésions de voisinage malgré une réponse inflammatoire locale marquée. L'inflammation induite par les LT CD8⁺ infiltrant le SNC des souris GFAP-HA ne s'accompagne pas d'un afflux de macrophages, ce qui contraste fortement avec ce qui est

observé après le transfert adoptif de LT CD4⁺ de type Th1. En effet, trois à quatre jours après le transfert adoptif de Th1 spécifiques d'un antigène du SNC, un afflux massif des cellules injectées a lieu dans le SNC, suivi par le recrutement de LT non spécifiques d'antigènes du SNC et de macrophages (Flugel *et al.*, 2001). La réaction inflammatoire locale induite par ces derniers, notamment la sécrétion de facteurs toxiques (NO, TNF α) semble être alors en grande partie responsable de la mort des cellules avoisinantes, d'une manière non spécifique d'antigène. Ceci a été confirmé par l'étude en parallèle de l'EAE induite par le transfert adoptifs de LT CD4⁺ activés spécifiques de divers antigènes du SNC, qui a révélé que la sévérité de la maladie est particulièrement corrélée à l'intensité de l'afflux de macrophages périphériques (Berger *et al.*, 1997). Ainsi, l'absence de recrutement de macrophages dans notre modèle pourrait expliquer l'absence de lésions de voisinage affectant les oligodendrocytes ou les neurones. Cette différence dans le type de réponse inflammatoire induite par des LT CD4⁺ ou CD8⁺ activés spécifiques d'un antigène du SNC pourrait résider en partie dans les profils des cytokines et chimiokines produites par ces deux populations de lymphocytes. Cet aspect est en cours d'investigation dans le laboratoire.

Il est intéressant de constater que les animaux ayant reçu 30x10⁶ Tc1 ne développent pas de symptômes neurologiques malgré la présence de lésions parfois très étendues au sein desquelles les astrocytes sont totalement détruits. Les manifestations cliniques d'atteintes du SNC sont le plus souvent liées à des atteintes des neurones ou des oligodendrocytes et des gaines de myéline, qui entraînent des dysfonctionnements de la conduction nerveuse. Or, dans notre modèle, l'atteinte auto-immune est spécifique des cellules exprimant l'antigène HA et épargne les autres types cellulaires. Ainsi, la destruction aiguë et sélective des astrocytes ne se traduirait par aucune manifestation clinique décelable chez la souris. Il faut cependant noter que la destruction des astrocytes exprimant HA est focale et transitoire ce qui pourrait expliquer en partie l'absence de symptômes. En effet, 15 jours après le transfert, la repopulation astrocytaire est complète et le nombre de LT présents dans le SNC est comparable au niveau détecté dans le SNC de souris non transgéniques non injectées. La disparition des lésions peut s'expliquer par la forte capacité des astrocytes à proliférer en réponse à l'inflammation (gliose astrocytaire, suggérée en périphérie des lésions par l'augmentation du niveau d'expression de la GFAP par ces cellules, fig. 3d et 7a). L'absence, à J15 post-transfert, de LT infiltrants le SNC pourrait être consécutive à la mort des Tc1 injectés ou à leur redistribution dans d'autres compartiments de l'organisme et à la mise en œuvre de mécanismes de contrôle des réponses immunes intrinsèques au SNC.

Dans notre modèle, la lyse spécifique des astrocytes exprimant l'auto-antigène HA semble être le résultat de l'action directe des LT cytotoxiques injectés, comme l'indiquent la présence de LT en contact avec des astrocytes exprimant les molécules du CMH de classe I, et l'expression de la forme active de la caspase 3, marqueur d'apoptose, par les astrocytes GFAP⁺ en périphérie des lésions.

La présence dans le SNC de LT CD8⁺ au cours de maladies inflammatoires du SNC humaines est fréquente. Ils sont directement impliqués, au cours des encéphalites virales, dans la clairance du virus via la destruction sélective des cellules infectées. Il est intéressant de constater que ces infections se caractérisent histologiquement par la formation de nodules microgliaux, similairement à ce qui est observé dans notre modèle. Aux cours des encéphalites paranéoplasiques et de la maladie de Rasmussen, la présence de LT CD8⁺ infiltrants le SNC, associée à la lyse de neurones, pourrait suggérer un rôle pathogène de LT CD8⁺ auto-réactifs, bien que ce phénomène n'ait pas encore été pas formellement démontré. Cependant, au cours de la maladie de Rasmussen, des LT CD8⁺ activés et en contact avec des neurones exprimant la β 2-microglobuline ont récemment été mis en évidence (Bien *et al.*, 2002). L'analyse histologique, lors de ces syndromes, révèle également l'absence de macrophages infiltrant le SNC et l'absence de lésions des autres types cellulaires résidents du SNC. D'une manière plus générale, on note que lors de la plupart des affections caractérisées par une infiltration par des leucocytes du SNC, les LT CD8⁺ dominent numériquement par rapport aux LT CD4⁺. Ceci pourrait refléter des différences fondamentales dans les capacités de migration à travers la BHE entre ces deux populations, peut-être liées à des profils d'expression de récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion distincts et suggère que les LT CD8⁺ jouent un rôle majeur dans la surveillance immune au sein du SNC (Cabarrocas *et al.*, 2003b).

L'ensemble de ces observations et les travaux récents ayant mis en évidence le caractère oligoclonal de l'expansion des LT CD8⁺ présents dans les lésions de patients atteints de SEP, indiquent que les LT CD8⁺ pourraient être directement impliqués dans la physiopathologie de plusieurs affections inflammatoires du SNC et pourraient ouvrir de nouvelles voies immunothérapeutiques ciblant cette population.

Nos perspectives sur ce modèle sont d'étudier la migration des LT CD8⁺ activés spécifiques d'un auto-antigène astrocytaire. Pour cela, des LT CD8⁺ spécifiques d'HA seront différenciés *in vitro* en Tc1 et infectés par un virus transformé qui induit l'expression par les cellules d'une protéine fluorescente, la GFP (green fluorescent protein). L'expression stable de ce

marqueur fluorescent dans les cellules injectées et leurs cellules filles permettra d'étudier les voies de migration et les sites d'accumulation des cellules transférées. Nous avons ainsi pour objectif de comparer la migration des Tc1 spécifiques d'HA lorsque ces cellules sont injectées à une souris receveuse exprimant ou non le " néo " auto-antigène HA. De plus, ce système nous permettra de comparer la cinétique de migration et d'accumulation des Tc1 spécifiques d'HA dans les différents organes où la protéine HA est exprimées chez les receveurs GFAP-HA, en particulier les systèmes nerveux central et entérique.

3.2 Modèle double transgénique GFAP-HA x CL4-TCR : rôle des cellules gliales entériques dans le maintien de l'intégrité de la paroi intestinale

Les souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR développent une jéjuno-iléo-colite fulminante consécutive à la destruction de leurs cellules gliales entériques par des LT CD8⁺ auto-réactifs. Plusieurs mécanismes physiopathologiques pourraient expliquer le développement de ces lésions. Les cellules gliales entériques sont les cellules de soutien du SNE. Elles émettent des prolongements qui entourent les corps neuronaux et des groupes d'axones dans les plexus nerveux entériques. Ces prolongements sont en contact avec les vaisseaux sanguins via leurs terminaisons. Le rôle des cellules gliales entériques dans le contrôle de la perméabilité et de l'intégrité du système vasculaire intestinal n'a pas encore été démontré avec certitude. Cependant, les cellules gliales entériques partagent de nombreuses caractéristiques morphologiques et phénotypiques avec les astrocytes du SNC, ce qui suggère que ces deux types cellulaires remplissent également des fonctions similaires, et le rôle des astrocytes dans l'établissement de la BHE a été mis en évidence (Janzer et Raff, 1987). Dans notre modèle, aux stades précoces de la maladie, on observe principalement des anomalies de la microcirculation au niveau des vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse, suggérant qu'une altération du réseau des cellules gliales entériques a des conséquences directes sur l'intégrité du système vasculaire de la paroi intestinale. De plus, les prolongements des cellules gliales entériques pénètrent, avec les axones qu'elles engainent, la muqueuse intestinale et ces cellules pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'intégrité de l'épithélium intestinal. L'inflammation observée chez les souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR pourrait ainsi être consécutive à une rupture du revêtement épithélial intestinal. Enfin, la production locale de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ ,...) par les LT CD8⁺ activés stimulés par leur antigène spécifique pourrait également induire des altérations de la barrière épithéliale. Ces hypothèses sont renforcées par les résultats publiés par Bush et al. (1998).

Dans leur modèle, les cellules gliales entériques sont également détruites et cette atteinte conduit au développement d'une pathologie et de lésions similaires.

La maladie intestinale développée par les animaux double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR présente des analogies histopathologiques avec la maladie de Crohn. La maladie de Crohn est une affection inflammatoire chronique de l'intestin qui affecte l'adulte jeune (environ 50 000 personnes atteintes en France) et dont l'étiologie est inconnue. La maladie se caractérise par des lésions (congestion, ulcération, fistule, sténose) qui affectent toute l'épaisseur de la paroi intestinale, principalement au niveau de l'iléon et du colon. A l'examen microscopique on observe classiquement des infiltrats lympho-plasmocytaires et des granulomes. La physiopathologie de la maladie est inconnue et il est probable que des facteurs de susceptibilité génétique, un dysfonctionnement du système immunitaire et des facteurs environnementaux (alimentation, infection) soient impliqués. Notre modèle suggère qu'une altération, d'origine auto-immune ou consécutive par exemple à une infection virale, du réseau de cellules gliales entériques pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la maladie de Crohn (Cornet *et al.*, 2001).

Par analogie avec ce qui a été décrit pour les astrocytes du SNC et comme le suggèrent plusieurs travaux récents, les cellules gliales entériques semblent remplir de nombreuses fonctions dans le SNE (Cabarrocas *et al.*, 2003a): contrôle du métabolisme neuronal, sécrétion de facteurs trophiques, communication bidirectionnelle avec les neurones, réponse à l'inflammation par la prolifération et la sécrétion de cytokines, expression des molécules du CMH de classe I et II et présentation antigénique. Il est envisageable qu'elles remplissent également un rôle dans le contrôle de la perméabilité vasculaire et de l'intégrité de l'épithélium intestinal.

Nos perspectives sont d'utiliser ce modèle de pathologie auto-immune spontanée afin de tester le potentiel suppresseur d'une sous-population de LT régulateurs. En effet, nous avons créé au laboratoire modèle murin transgénique chez lequel on observe le développement spontané de LT spécifiques d'HA ayant des propriétés régulatrices des réponses immunes. Notre objectif est d'évaluer les possibilités d'utilisation de ces LT régulateurs dans le cadre du traitement par thérapie cellulaire de maladies auto-immunes spécifiques d'organe chez l'homme. Ainsi, dans un premier temps nous nous proposons de tester le potentiel suppresseur de l'auto-immunité de ces LT régulateurs en utilisant le modèle d'entérite fulminante auto-immune développé par les animaux double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR. Au cours de ces expériences, des populations purifiées de LT régulateurs spécifiques d'HA seront injectées par voie intrapéritonéale à des nouveau-nés double transgéniques GFAP-HA x CL4-

TCR. Nous évaluerons la capacité de ces LT régulateurs à différer ou inhiber le développement de la maladie auto-immune.

3.3 Conclusion générale

Nous avons développé un modèle d'étude de l'auto-réactivité dirigée contre les cellules gliales des systèmes nerveux central et entérique et induite par des LT cytotoxiques CD8⁺, basé sur l'utilisation de deux lignées de souris transgéniques. En induisant une atteinte auto-immune dans un système de transfert adoptif, nous avons mis en évidence le potentiel encéphalitogène de LT CD8⁺ spécifiques d'un auto-antigène astrocytaire. Cette étude a révélé que des LT CD8⁺ activés spécifiques d'un antigène astrocytaire induisent une réaction inflammatoire monophasique et transitoire dans le SNC, associée à la destruction extrêmement sélective des cellules exprimant l'antigène cible, en l'absence de lésions non spécifiques des types cellulaires voisins. Cette observation contraste fortement avec le profil de lésions induites par des LT CD4⁺, et suggère que les LT CD8⁺ pourraient jouer un rôle central dans la surveillance immune au sein du SNC, en éliminant sélectivement les cellules infectées. De plus, nos résultats ont indiqué qu'une destruction sélective des astrocytes du SNC n'est pas associée au développement de symptômes neurologiques décelables chez la souris.

D'autre part, les résultats obtenus avec le modèle spontané d'affection auto-immune chez les animaux double transgénique GFAP-HA x CL4-TCR viennent renforcer l'hypothèse selon laquelle les cellules gliales entériques rempliraient un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de la paroi intestinale. En effet, la destruction de ces cellules entraîne le développement d'une jéjuno-iléo-colite fulminante, létale en quelques jours de vie. Ce résultat suggère également qu'une atteinte des cellules gliales entériques pourrait participer à la physiopathologie de la maladie de Crohn.

REFERENCES

- Alferink, J., Aigner, S., Reibke, R., Hammerling, G. J. & Arnold, B. (1999) *Immunol Rev* **169**, 255-61.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R. & Rajewsky, K. (2000) *J Exp Med* **192**, 393-404.
- Baumann, N. & Pham-Dinh, D. (2001) *Physiol Rev* **81**, 871-927.

- Berger, T., Weerth, S., Kojima, K., Linington, C., Wekerle, H. & Lassmann, H. (1997) *Lab Invest* **76**, 355-64.
- Bien, C. G., Bauer, J., Deckwerth, T. L., Wiendl, H., Deckert, M., Wiestler, O. D., Schramm, J., Elger, C. E. & Lassmann, H. (2002) *Ann Neurol* **51**, 311-8.
- Brenner, M., Kisseberth, W. C., Su, Y., Besnard, F. & Messing, A. (1994) *J Neurosci* **14**, 1030-7.
- Bush, T. G., Savidge, T. C., Freeman, T. C., Cox, H. J., Campbell, E. A., Mucke, L., Johnson, M. H. & Sofroniew, M. V. (1998) *Cell* **93**, 189-201.
- Cabarrocas, J., Savidge, T. C. & Liblau, R. S. (2003a) *Glia* **41**, 81-93.
- Cabarrocas, J., Bauer, J., Piaggio, E., Liblau, R. S., Lassmann, H. (2003b) *Eur J Immunol* **33**, 1174-82.
- Cambier, J., Masson, M. & Dehen, H. (1998) *Neurologie*. 9^{ème} édition. Paris: Masson. 595 p.
- Cornet, A., Bettelli, E., Oukka, M., Cambouris, C., Avellana-Adalid, V., Kosmatopoulos, K. & Liblau, R. S. (2000) *J Neuroimmunol* **106**, 69-77.
- Cornet, A., Savidge, T. C., Cabarrocas, J., Deng, W. L., Colombel, J. F., Lassmann, H., Desreumaux, P. & Liblau, R. S. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13306-11.
- Evans, C. F., Horwitz, M. S., Hobbs, M. V. & Oldstone, M. B. (1996) *J Exp Med* **184**, 2371-84.
- Flugel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D. E., Li, Z., Ellwart, J. W., Willem, M., Lassmann, H. & Wekerle, H. (2001) *Immunity* **14**, 547-60.
- Fogdell-Hahn, A., Ligers, A., Gronning, M., Hillert, J. & Olerup, O. (2000) *Tissue Antigens* **55**, 140-8.
- Genain, C. P. & Hauser, S. L. (1997) *J Mol Med* **75**, 187-97.
- Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L. & Raine, C. S. (1999) *Nat Med* **5**, 170-5.
- Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L. P., Hood, L. & Zaller, D. M. (1993) *Cell* **72**, 551-60.
- Hickey, W. F., Hsu, B. L. & Kimura, H. (1991) *J Neurosci Res* **28**, 254-60.
- Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C. & Goverman, J. (2001) *J Exp Med* **194**, 669-76.
- Janzer, R. C. & Raff, M. C. (1987) *Nature* **325**, 253-7.
- Jessen, K. R. & Mirsky, R. (1980) *Nature* **286**, 736-7.
- Jiang, H., Zhang, S. I. & Pernis, B. (1992) *Science* **256**, 1213-5.
- Jurewicz, A., Biddison, W. E. & Antel, J. P. (1998) *J Immunol* **160**, 3056-9.
- Kalman, B. & Lublin, F. D. (1999) *Biomed Pharmacother* **53**, 358-70.
- Koh, D. R., Fung-Leung, W. P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H. & Mak, T. W. (1992) *Science* **256**, 1210-3.
- Kojima, K., Berger, T., Lassmann, H., Hinze-Selch, D., Zhang, Y., Gehrman, J., Reske, K., Wekerle, H. & Linington, C. (1994) *J Exp Med* **180**, 817-29.
- Linington, C., Berger, T., Perry, L., Weerth, S., Hinze-Selch, D., Zhang, Y., Lu, H. C., Lassmann, H. & Wekerle, H. (1993) *Eur J Immunol* **23**, 1364-72.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. & Lassmann, H. (2000) *Ann Neurol* **47**, 707-17.

- Martin, R. & McFarland, H. F. (1995) *Crit Rev Clin Lab Sci* **32**, 121-82.
- Mitrovic, B., Ignarro, L. J., Vinters, H. V., Akers, M. A., Schmid, I., Uittenbogaart, C. & Merrill, J. E. (1995) *Neuroscience* **65**, 531-9.
- Olivares-Villagomez, D., Wang, Y. & Lafaille, J. J. (1998) *J Exp Med* **188**, 1883-94.
- Pardigon, N., Bercovici, N., Calbo, S., Santos-Lima, E. C., Liblau, R., Kourilsky, P. & Abastado, J. P. (1998) *Int Immunol* **10**, 619-30.
- Rivers, T., Sprunt, D. & Berry, G. (1933) *Journal of experimental medicine* **58**, 39-53.
- Schluesener, H. J., Sobel, R. A., Linington, C. & Weiner, H. L. (1987) *J Immunol* **139**, 4016-21.
- Selmaj, K., Cross, A. H., Farooq, M., Brosnan, C. F. & Raine, C. S. (1991) *J Neuroimmunol* **35**, 261-71.
- Sun, D., Whitaker, J. N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H. & Raine, C. S. (2001) *J Immunol* **166**, 7579-87.
- Vizler, C., Bercovici, N., Heurtier, A., Pardigon, N., Goude, K., Bailly, K., Combadiere, C. & Liblau, R. S. (2000) *J Immunol* **165**, 6314-21.
- Waldner, H., Whitters, M. J., Sobel, R. A., Collins, M. & Kuchroo, V. K. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3412-7.

figure 1

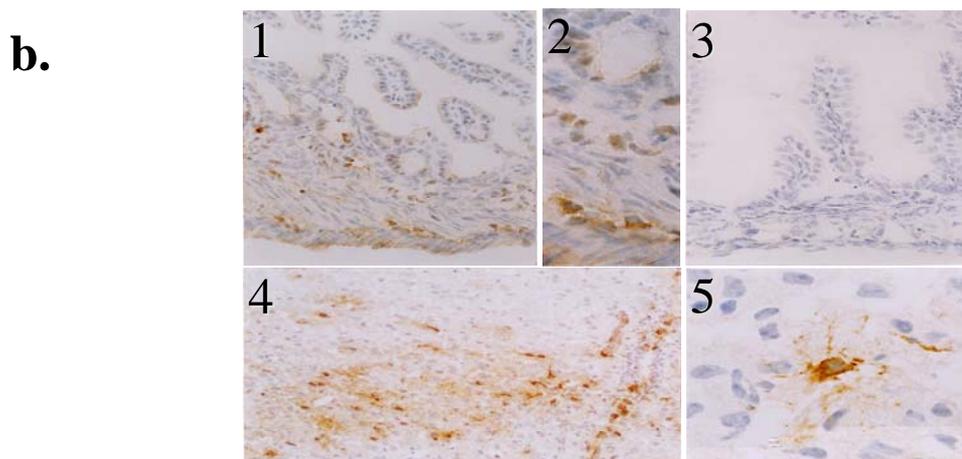
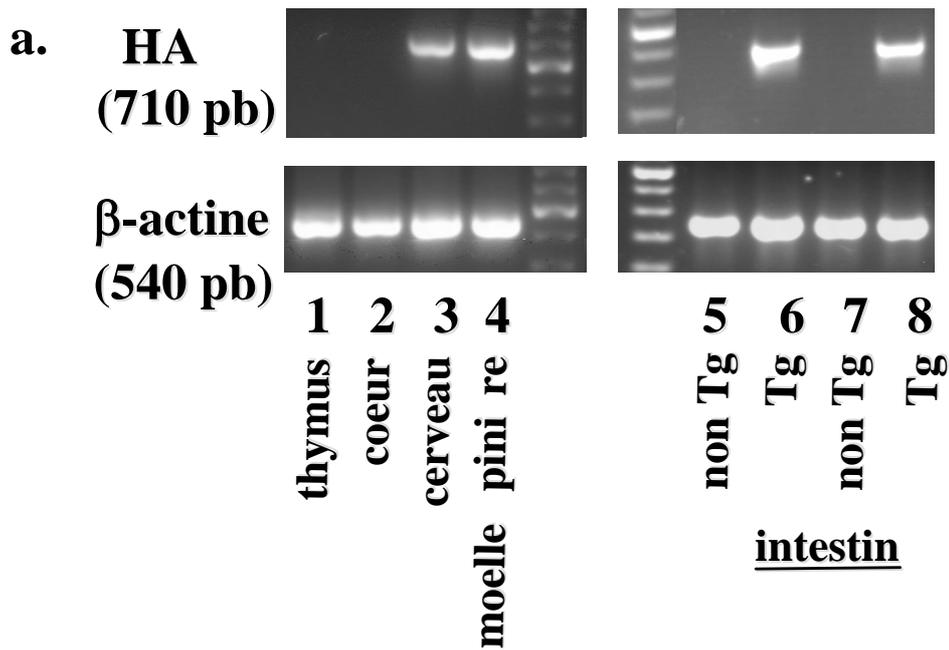


Figure 1: expression tissulaire du transgène et de la protéine HA chez les souris GFAP-HA

a. Au niveau transcriptionnel: les ARNm de HA (*haut*) et de la β-actine (contrôle positif; *bas*) ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADNc isolé du thymus (1), du cœur (2), du cerveau (3) et de la moelle pinarière (4) d'une souris GFAP-HA, et à partir de l'intestin grêle de souris transgéniques (Tg) GFAP-HA (6 et 8) et non Tg (5 et 7).

b. Au niveau protéique: détection de l'expression tissulaire de la protéine HA par marquage de coupes congelées en immunohistochimie. 1 et 2: expression de HA dans les plexus sous-muqueux et myentérique d'une souris GFAP-HA (grossissements x450 (1) et x1000 (2)); 3: absence d'expression de HA dans les plexus entériques d'un animal non Tg (x450); 4 et 5: expression de HA dans les astrocytes de la moelle pinarière (4, x450) et du cerveau (5, x1300) d'un animal GFAP-HA.

figure 2

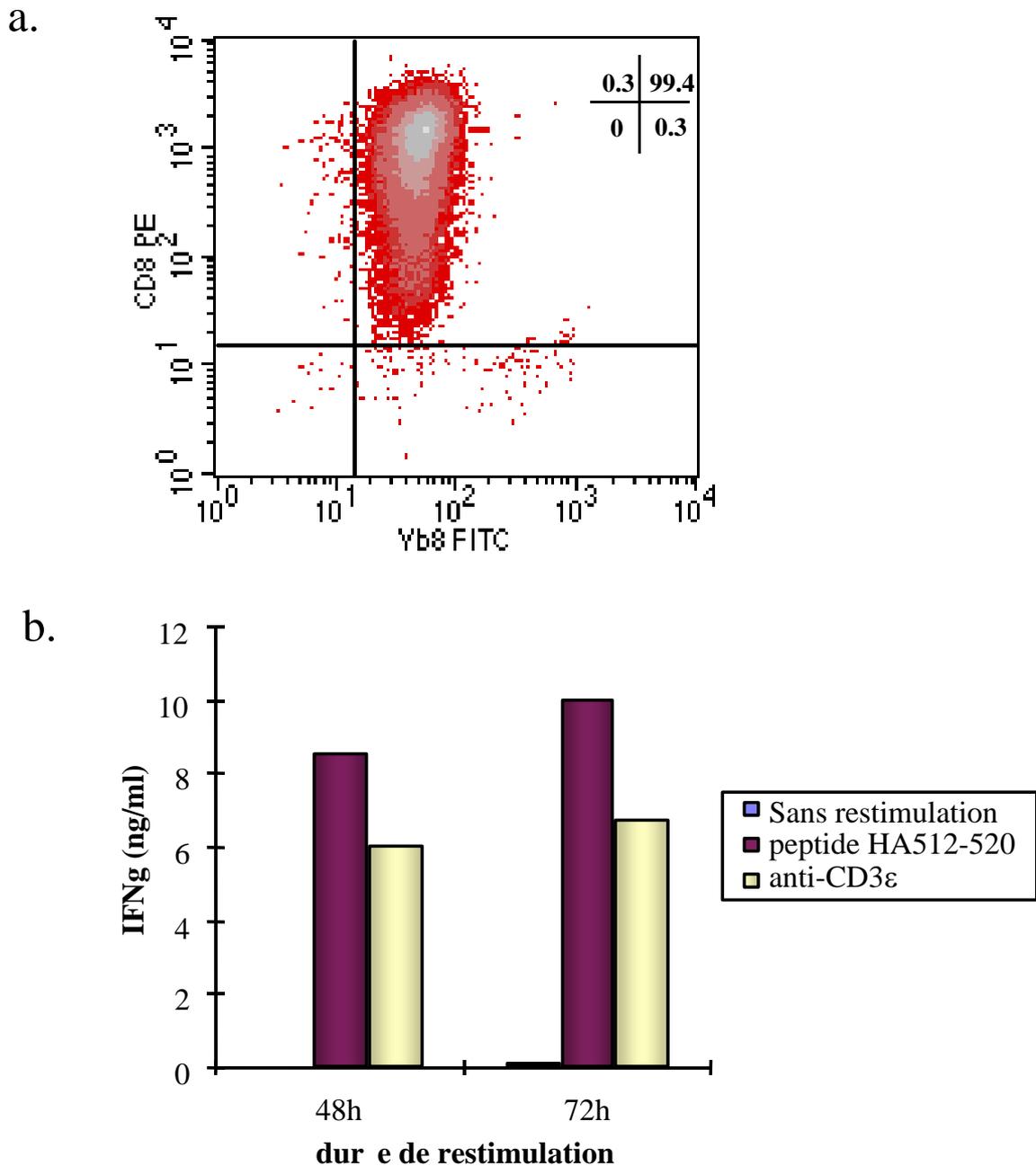


Figure 2: tude du ph notype des Tc1 injectés au cours des expériences de transferts adoptifs

a. valuation en cytométrie de flux de la pureté de la culture

b. mesure de la quantité d'IFN γ produite par les Tc1 après restimulation pendant 48 ou 72 h, dans diverses conditions: sans restimulation, en présence de 1 μ g/ml du peptide HA512-520 ou d'un mitogène (0,5 μ g/ml d'anti-CD3 ϵ).

figure 3

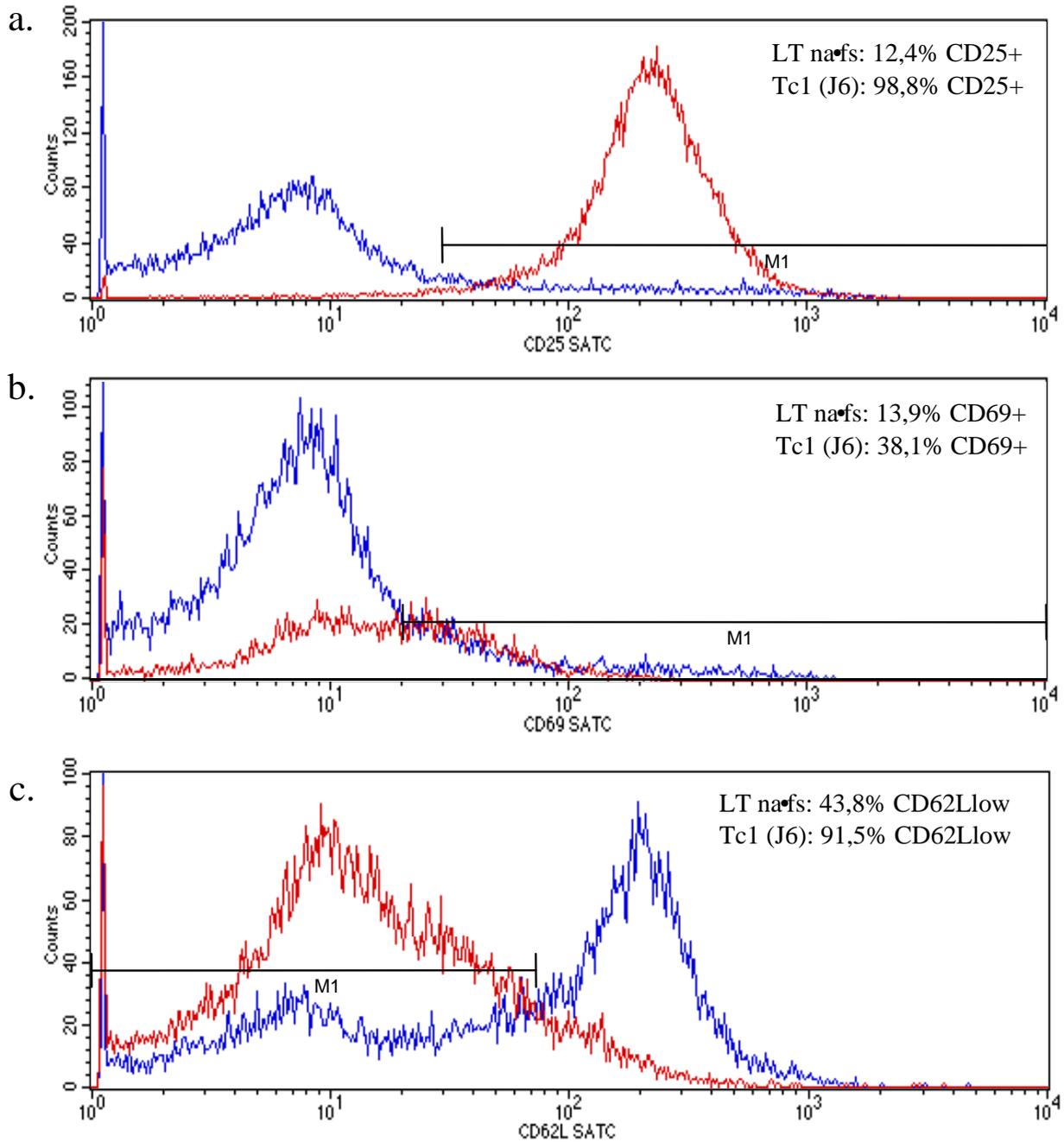


Figure 3: expression de marqueurs d'activation / de LT naïfs par les Tc1 injectés au cours des expériences de transfert adoptif

Expression de CD25 (a), CD69 (b), CD62L (c)

Le marquage des Tc1 après 6 jours de culture est représenté en rouge, le marquage de la population contrôlée (LT naïfs) est représenté en bleu.

figure 4

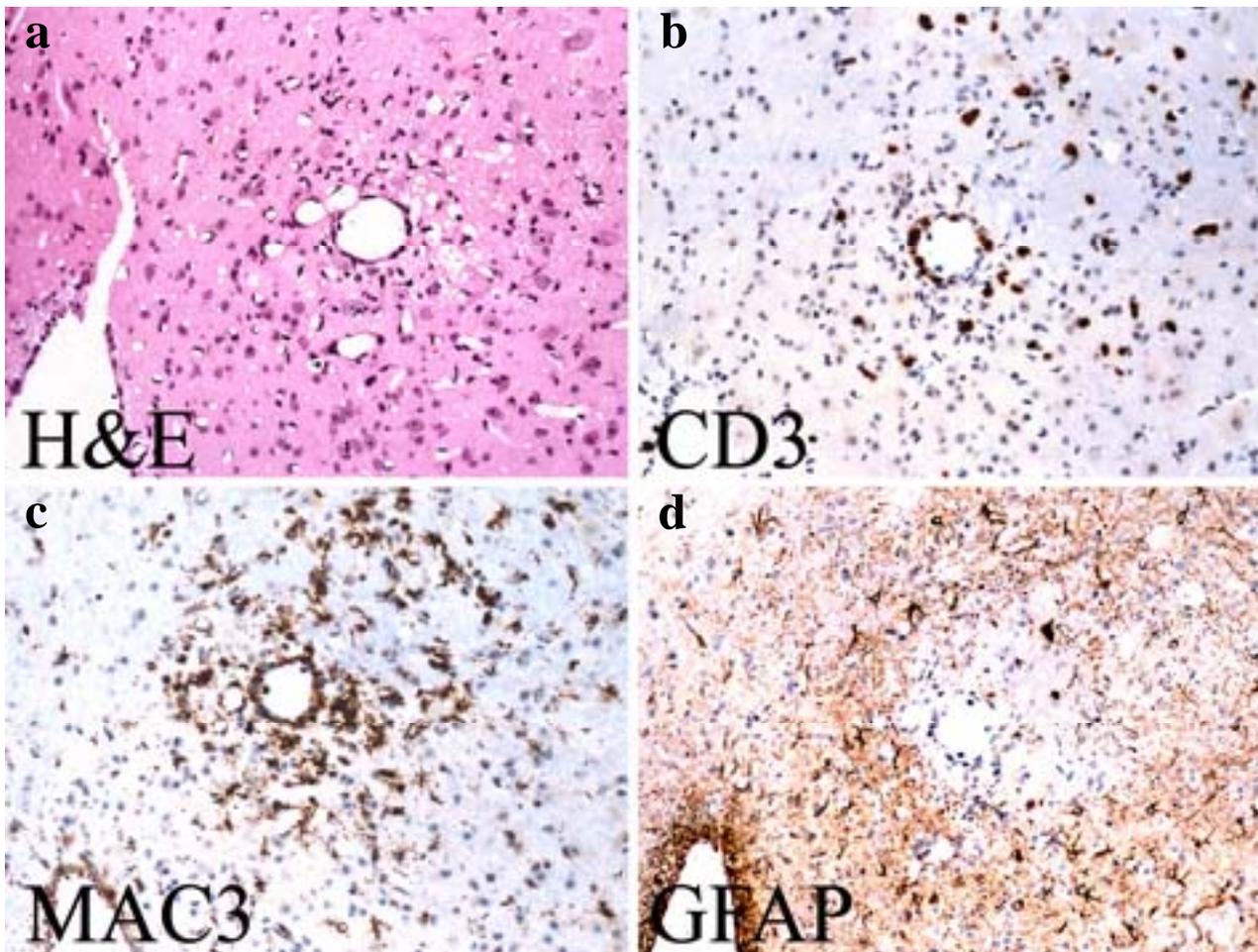


Figure 4: Lésion périvasculaire chez un receveur GFAP-HA

les marquages ont été réalisés au pic de l'inflammation, soit 7 jours après le transfert adoptif de 30×10^6 Tc1, sur des coupes séquentielles (x 500) :

- a. infiltrat inflammatoire périvasculaire; coloration hématoxyline / éosine;
- b. marquages anti-CD3 de la même lésion qu'en (a), mettant en évidence l'infiltration par des LT;
- c. marquage anti-MAC-3 de la même lésion qu'en (a), mettant en évidence l'activation locale de la microglie
- d. marquage anti-GFAP. La perte du marquage GFAP est superposable à la zone infiltrée par les LT.

figure 5

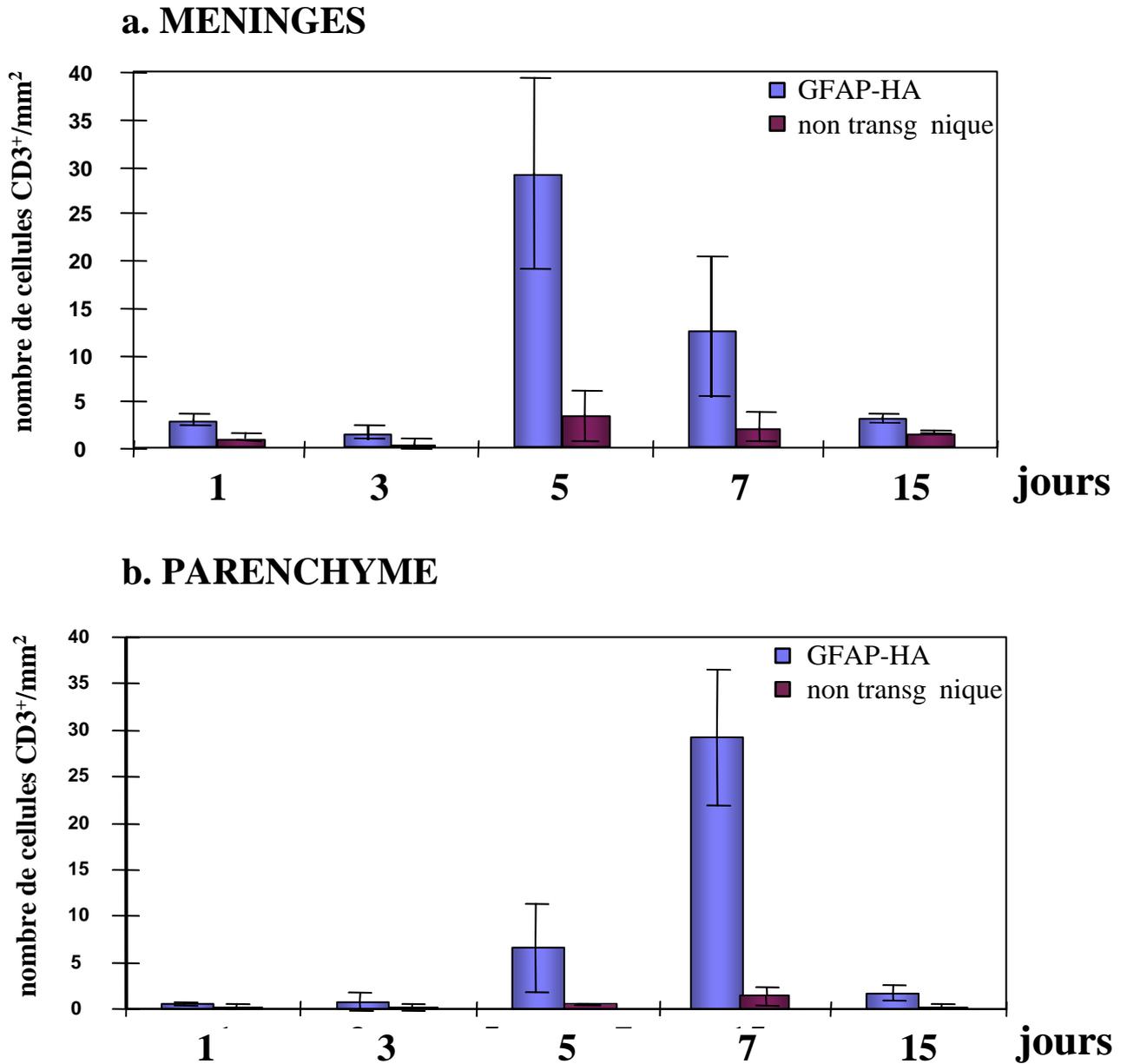


Figure 5: valuation cin tique et quantitative de l'infiltration du SNC par les lymphocytes injectés

Infiltration par des cellules CD3⁺ au niveau des mninges (a) et du parenchyme (b) du SNC de souris receveuses GFAP-HA (bleu) et non transg niques (rouge) apr s transfert adoptif de Tc1 sp cifiques d'HA. L'infiltration est significativement plus importante dans le SNC des receveurs GFAP-HA.

figure 6

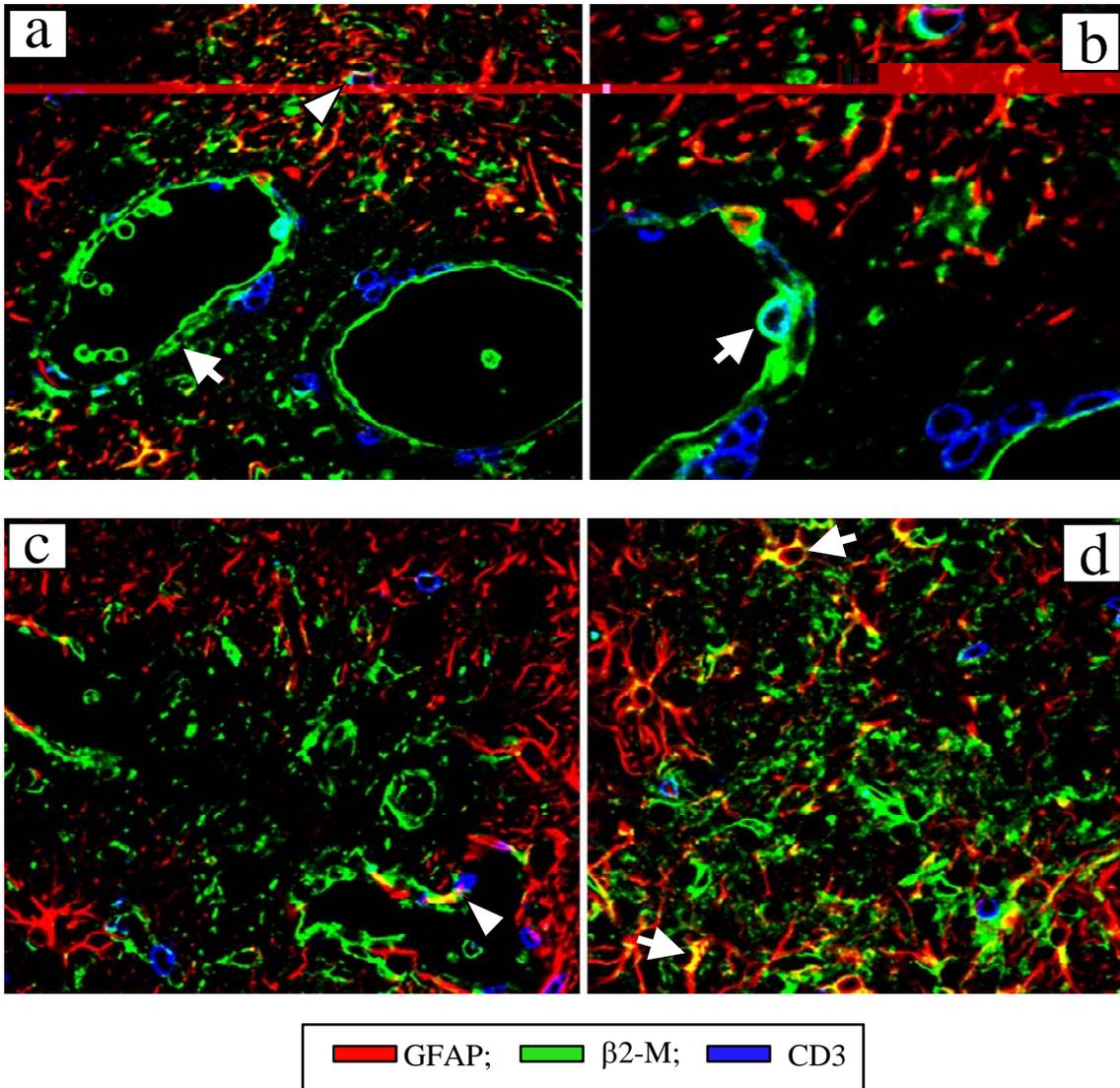


Figure 6: Analyse en microscopie confocale des lésions inflammatoires du SNC chez les receveurs GFAP-HA

Marquages réalisés 7 jours après transfert adoptif:

Triple marquage anti-CD3 (bleu), anti-GFAP (rouge) et anti- β 2-microglobuline (vert). La β 2-microglobuline est exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins dans les zones inflammées et par des LT infiltrants (a et b, flèches). Les lésions sont caractérisées par une infiltration par des LT et une perte du marquage GFAP. En périphérie des lésions on observe des astrocytes co-exprimant la GFAP et la β 2-microglobuline (le double marquage apparaît en jaune) (d, flèches). On note également la co-localisation entre des astrocytes GFAP⁺ β 2-microglobuline⁺ et des LT CD3⁺ (a et c, têtes de flèche). (x 450)

figure 7

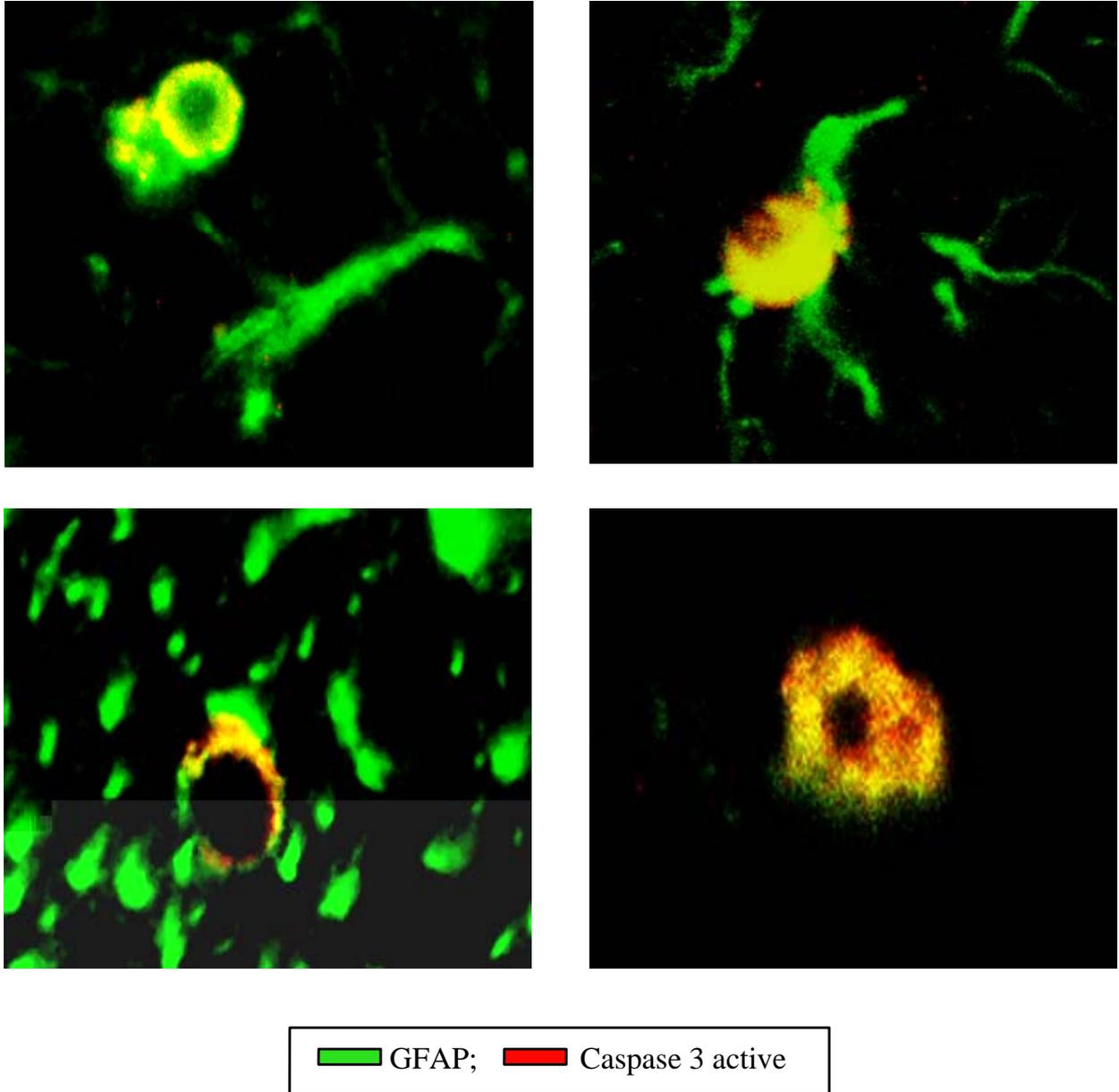


Figure 7: Expression d'un marqueur d'apoptose par les astrocytes en périphérie des lésions chez les receveurs GFAP-HA

Marquages réalisés 7 jours après transfert adoptif et analyses au microscope confocal révélant la présence d'astrocytes co-exprimant la GFAP (en vert) et la forme active de la caspase 3 (en rouge) (le double marquage apparaît en jaune). Ces cellules montrent d'autres signes d'apoptose: condensation nucléaire et raccourcissement des processus. (x 1575)

figure 8

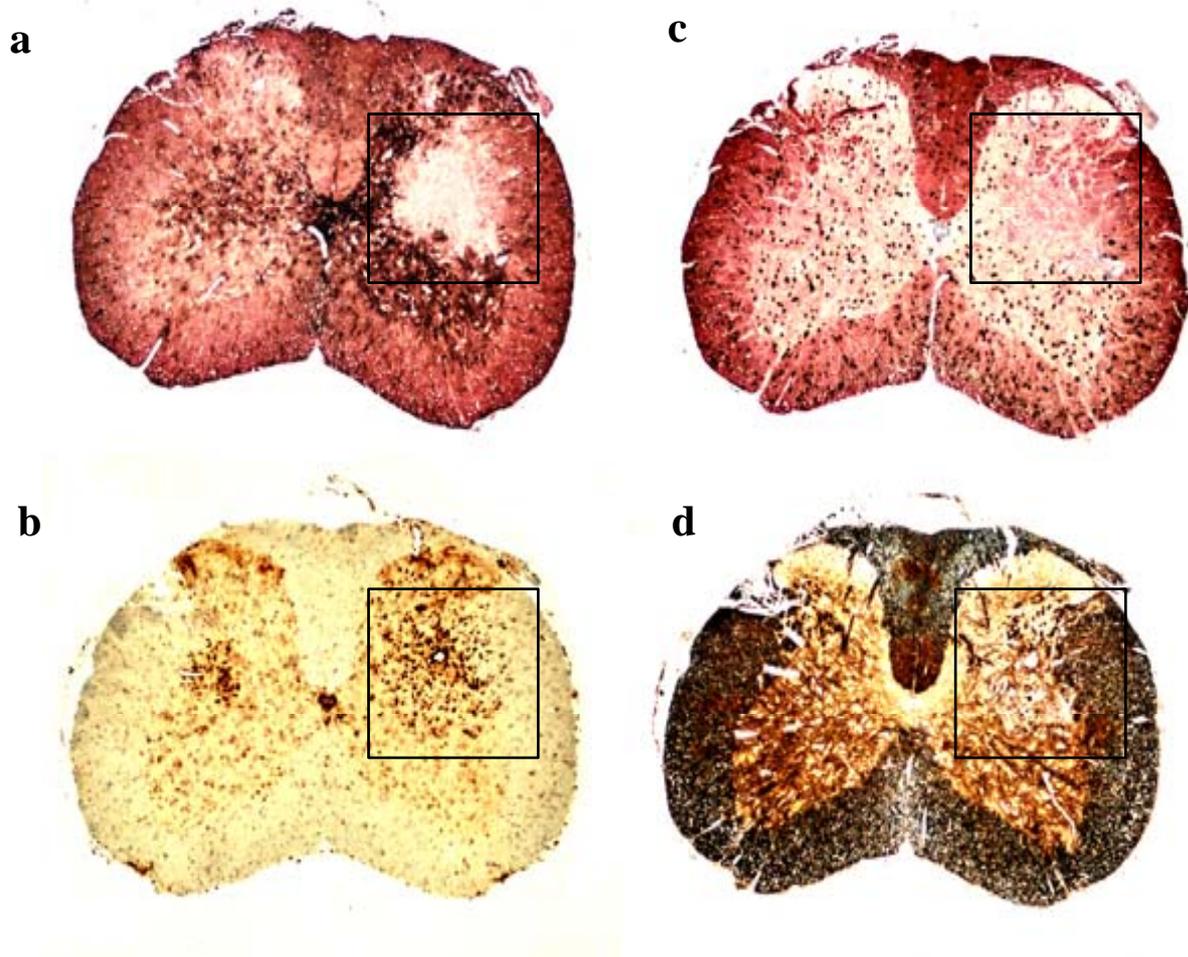


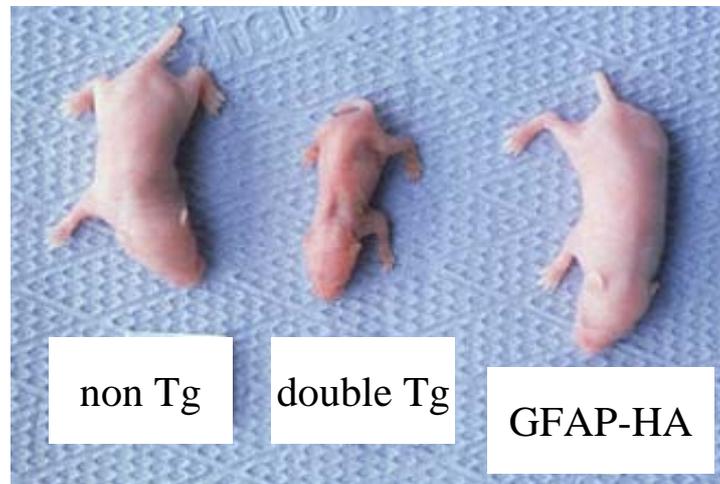
Figure 8: Evaluation de la viabilité des différentes populations de cellules gliales et des neurones dans une lésion inflammatoire du SNC chez un receveur GFAP-HA

Marquages réalisés 7 jours après transfert adoptif sur des coupes séquentielles de moelle pinacière. (x 24)

- a. marquage anti-GFAP et hybridation *in situ* de l'ARNm de la GFAP; la lésion, encadrée, est caractérisée par une perte de l'expression de la GFAP et de l'ARNm de la GFAP
- b. marquage anti-MAC 3, montrant l'activation locale des cellules microgliales;
- c. marquage anti-PLP et hybridation *in situ* de l'ARNm de la PLP; on observe une diminution modeste de l'expression de l'ARNm de la PLP, mais pas de perte du marquage de la protéine PLP;
- d. marquage des axones par imprégnation argentique de Bielschowsky révélant l'absence de lésion de ces structures.

figure 9

a.



b.

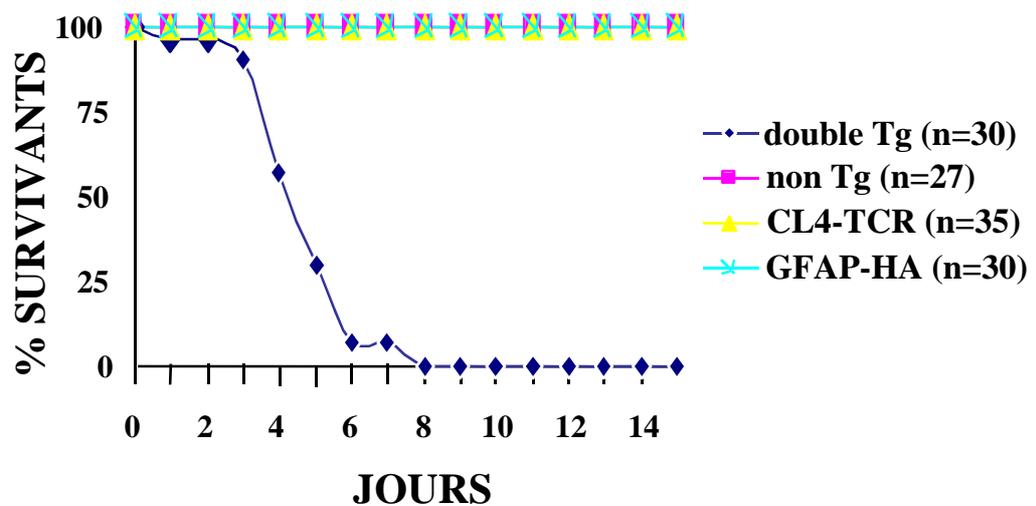


Figure 9: Ph notype et courbe de survie des souris double transg niques GFAP-HA x CL4-TCR

a. trois souriceaux d'one m me port e issus du croisement GFAP-HA x CL4-TCR: non transg nique (non Tg), double transg nique GFAP-HA x CL4-TCR (double Tg), simple transg nique GFAP-HA. Photographie prise le 5^{me} jour post-natal.

b. courbes de survie des animaux des 4 g notypes obtenus par le croisement GFAP-HA x CL4-TCR

figure 10

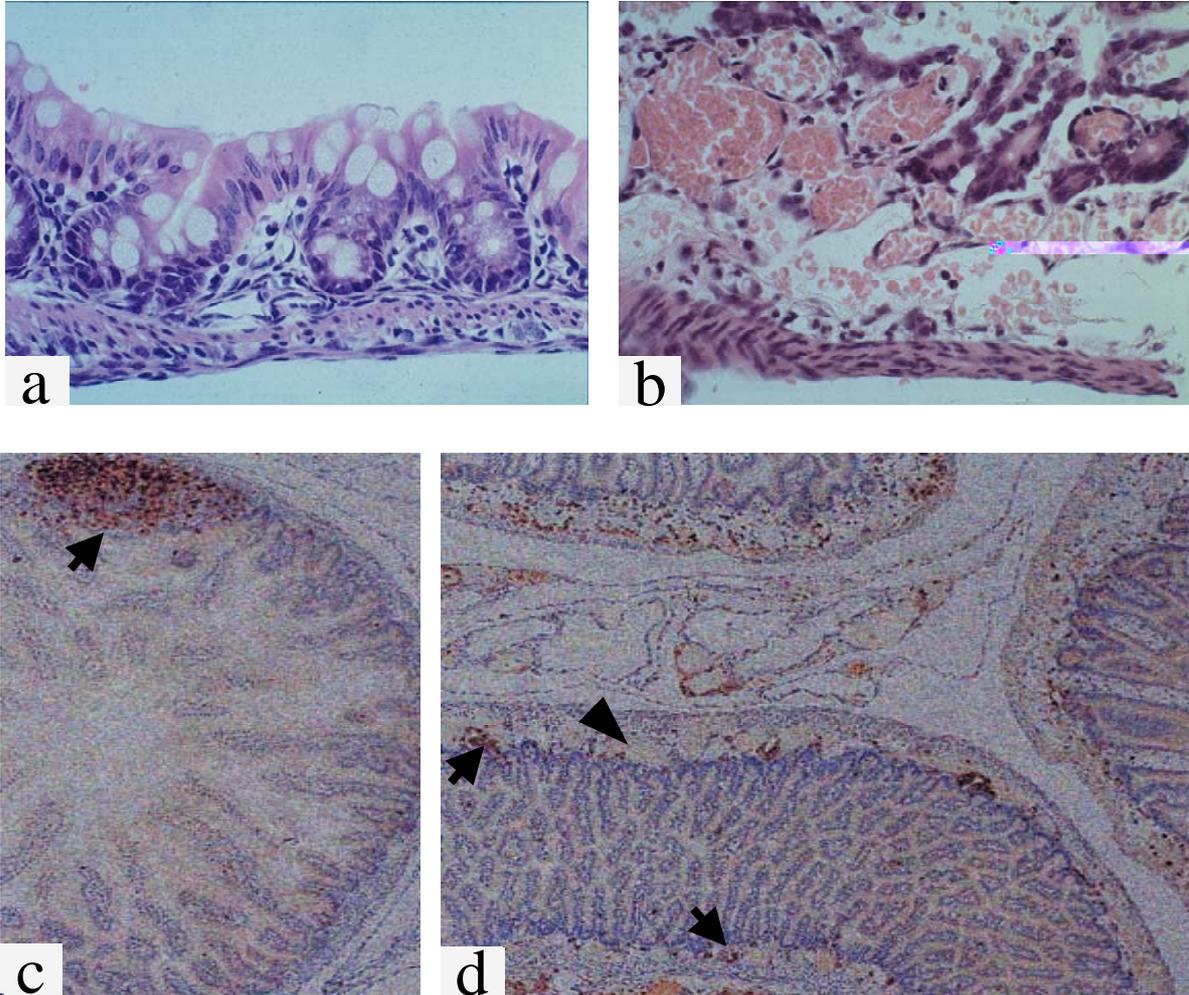


Figure 10: Lésions intestinales observées chez les souris double transgéniques GFAP-HA x CL4-TCR

- a. aspect histologique normal de la paroi du colon d'une souris non transgénique; coloration hématoxyline-éosine;
- b. Lésions de colite chez un animal double transgénique. On note la désorganisation et l'inflammation sévères de la paroi du colon, avec œdème, vasodilatation, cryptostase et hémorragie; coloration hématoxyline-éosine;
- c. aspect histologique normal du jéjunum d'une souris non transgénique, un marquage anti-CD3 (brun) met en évidence les LT localisés au niveau d'une plaque de Peyer (flèche); (x 90)
- d. coupe tangentielle du jéjunum d'une souris double transgénique: les vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse sont dilatés (tête de flèche). Un marquage anti-CD3 (brun) révèle l'infiltration lymphocytaire de la paroi intestinale (flèche).