

Université de Montréal

Étude préclinique des lymphocytes T doubles-négatifs humains

Par

Ainhoa Olazabal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)
en Microbiologie et immunologie

Août 2021

© Ainhoa Olazabal, 2021

Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Étude préclinique des lymphocytes T doubles-négatifs humains

Présenté par

Ainhoa Olazabal

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Fabien Touzot

Président-rapporteur

Sylvie Lesage

Directrice de recherche

Moutih Rafei

Membre du jury

Résumé

Les lymphocytes T CD4⁻CD8⁻ (DN T, double négatif) sont une population de cellules T immunorégulatrices ayant la particularité d'inhiber les réponses immunitaires de façon spécifique à l'antigène, présentant donc un grand potentiel d'utilisation en immunothérapie. Des résultats précédents du laboratoire ont démontré sur des modèles murins qu'un transfert de cellules T DN contribuait à diminuer l'incidence du diabète de type 1 (T1D). De plus, d'autres groupes ont montré que ces cellules contribueraient également à la suppression de certaines lignées tumorales ainsi qu'à la médiation de la suppression de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). L'étude présentée dans ce mémoire avait donc pour but d'évaluer le potentiel clinique des cellules DN T humaines en tant que thérapie cellulaire pour des pathologies telles que le diabète de type 1, le myélome multiple et la GVHD. Les cellules DN T circulent en très petite proportion dans le sang périphérique (1-5 %). Nous nous sommes donc penchés sur le potentiel de prolifération en culture cellulaire des cellules DN T, en développant un protocole adapté à leurs caractéristiques, qui permettrait de générer un nombre de cellules suffisant pour étudier leur phénotype et leur fonction in vitro et in vivo. Des études de cytométrie en flux ont révélé que les cellules DN T ayant subi le protocole d'activation et de culture cellulaire optimisé avaient un phénotype activé et non épuisé. De plus, des études fonctionnelles in vitro ont montré que les cellules DN T possédaient un pouvoir cytotoxique similaire aux cellules T CD8⁺ envers les lignées cellulaires tumorales Jurkat, NALM et RAJI. Enfin, nous avons tiré profit du modèle de souris NRG (NOD-Rag1^{null}IL2rg^{null}) pour étudier la survie en périphérie des cellules DN T humaines greffées, et leur pouvoir de prévention de la xéno-GVHD et d'un modèle de myélome multiple.

L'ensemble de ces travaux a permis d'élargir les connaissances sur le phénotype et la fonction des cellules DN T chez l'humain, montrant qu'elles possèdent un potentiel thérapeutique intéressant pour certaines pathologies auto-immunes et néoplasiques en tant que thérapie cellulaire.

Mots-clés : Lymphocytes T CD4⁻CD8⁻, cellules immunorégulatrices, thérapie cellulaire, diabète de type 1, maladie du greffon contre l'hôte, myélome multiple, culture cellulaire.

Abstract

CD4⁻CD8⁻ T lymphocytes (DN T, double negative) are a population of immunoregulatory T cells which seem to inhibit immune responses in an antigen-specific manner, and thus represent a great potential for use in immunotherapy. Previous studies in mice have shown that adoptive transfer of DN T cells decreases type 1 diabetes (T1D) incidence in otherwise autoimmune diabetes-prone mice. In addition, DN T cells also suppress the growth of certain tumor lines as well as reduce the severity of graft-versus-host disease (GVHD). The work presented in this thesis aimed to assess the clinical potential of human DN T cells as cell therapy for pathologies such as type 1 diabetes, multiple myeloma and GVHD. DN T cells compose 1 to 5% of lymphocytes in the peripheral blood. To circumvent the challenge of working with low cell numbers, we examined the proliferation potential of DN T cells in culture. Specifically, we adapted a cellular expansion protocol to their characteristics, in order to generate a sufficient number of cells to study their phenotype and their function in vitro and in vivo. Phenotypic characterization by flow cytometry revealed that DN T cells subjected to the optimized cell culture and activation protocol had an activated and not exhausted phenotype. In addition, in functional in vitro studies, DN T cells were shown to exhibit similar cytotoxic activity to CD8⁺ T cells, when the Jurkat, NALM and RAJI tumor cell lines were used as targets. Finally, we took advantage of the NRG mouse model (NOD-Rag1^{null}IL2rg^{null}) to study the peripheral survival of transplanted human DN T cells, and their potential to prevent xeno-GVHD and a model of multiple myeloma. All of this work has enabled us to broaden our knowledge of the phenotype and function of DN T cells in humans, showing that they have an interesting therapeutic potential for certain autoimmune and neoplastic pathologies as cell therapy.

Keywords: CD4⁻CD8⁻ T lymphocytes, immunoregulatory cells, cell therapy, type 1 diabetes, graft-versus-host disease, multiple myeloma, cell culture.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	13
Liste des figures	15
Liste des sigles et abréviations	17
Remerciements	21
Chapitre 1 – Introduction	23
1.1 Immunothérapies et thérapies cellulaires.....	23
1.1.1 Types d’immunothérapies.....	23
1.1.1.1 Anticorps monoclonaux	23
1.1.1.2 Inhibiteurs de points de contrôle.....	24
1.1.1.3 Vaccins.....	24
1.1.1.4 Thérapies cellulaires	24
1.1.2 Thérapie cellulaire	26
1.1.2.1 Thérapies cellulaires à base de cellules non modifiées par ingénierie.....	26
1.1.2.2 Thérapies cellulaires basées sur l’ingénierie et la modification génétique des cellules du système immunitaire	27
1.2 Les cellules immunorégulatrices.....	28
1.2.1 Le soi et le non-soi.....	28
1.2.2 Les types de cellules immunorégulatrices	29
1.2.2.1 Les cellules T régulatrices conventionnelles	29
1.2.2.2 Les cellules immunorégulatrices non conventionnelles	30
1.3 Les cellules T double-négatives.....	30

1.3.1 Phénotype des cellules T double-négatives	30
1.3.2 Ontogénie des cellules T double-négatives.....	33
1.3.3 Cibles et mécanismes des cellules T double-négatives.....	34
1.3.4 Cellules DN T humaines	38
1.3.5 Cellules DN T dans le contexte de diverses pathologies	39
1.3.6 Cellules DN T et immunothérapie	42
1.4 Pathologies et modèles d'études	42
1.4.1 Diabète de type 1	42
1.4.2 Myélome multiple.....	48
1.4.3 Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)	52
1.5 Hypothèses et objectifs de recherche	55
Chapitre 2 – Matériel et méthodes	57
Chapitre 3 – Résultats	65
3.1 Analyse des populations de lymphocytes T double-négatifs chez l'humain, chez des donneurs sains ou des donneurs atteints du diabète de type 1	65
3.2 Analyse phénotypique de l'expression de récepteurs de la chaîne commune gamma par les lymphocytes T double-négatifs chez l'humain	67
3.3 Optimisation des conditions de culture cellulaire in vitro pour les lymphocytes T double-négatifs chez l'humain	71
3.4 Analyse phénotypique des cellules DN T humaines ayant subi le protocole de culture cellulaire permettant une augmentation optimale du nombre de cellules.....	74
3.5 Analyse du potentiel cytotoxique in vitro des lymphocytes T double-négatifs humain ayant subi le protocole de culture cellulaire optimisé envers des lignées tumorales	82
3.6 Analyse de la survie et du potentiel cytotoxique in vivo des lymphocytes T double-négatifs humain ayant subi le protocole de culture cellulaire optimisé.....	91
Chapitre 4 – Discussion	99

Conclusion	110
Références bibliographiques	113
Annexe 1 – Caractéristique des sujets (25).....	131
Annexe 2 – Tableau descriptifs des anticorps utilisés pour les expériences de cytométrie en flux.....	132
Annexe 3 – Formulaire d’information et de consentement (FIC).....	135

Liste des tableaux

Chapitre 1 – Introduction

Tableau 1. – Propriétés des différents sous-types de populations de cellules T CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	31
Tableau 2. – Facteurs contribuant au développement du diabète de type 1	44

Liste des figures

Chapitre 1 – Introduction

Figure 1.1 –	Thérapies cellulaires immunitaires pour le traitement de maladies humaines ..	25
Figure 1.2 –	Le continuum d'immunothérapies cellulaires.....	26
Figure 1.3 –	Les cibles et mécanismes d'action des cellules DN.....	38
Figure 1.4 –	Éléments clés de la pathogenèse auto-immune ciblant les cellules β dans le diabète de type 1.	46
Figure 1.5 –	Interactions entre les plasmocytes et la moelle osseuse dans le myélome multiple.	49
Figure 1.6 –	Aperçu schématique des médiateurs cellulaires et moléculaires, connus et impliqués, contribuant au continuum des pathologies de l'aGVHD et de la cGVHD.	53

Chapitre 3 – Résultats

Figure 3.1 –	Les cellules T double-négatives sont retrouvées en petite proportion dans le sang périphérique chez les diabétiques de type 1 et les donneurs sains et subissent le même taux de prolifération une fois en culture.	67
Figure 3.2 –	Les cellules DN T expriment les chaînes des récepteurs de l'IL-2 après et l'IL-7 lors de l'activation et de la prolifération cellulaire de façon similaire aux cellules T CD8 ⁺	71
Figure 3.3 –	L'augmentation du nombre de cellules DN T humaines est optimale dans un milieu RPMI sans sérum en présence des cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-1 β	74
Figure 3.4 –	Les cellules DN T expriment les marqueurs de mémoire CD45RO et CCR7 de façon différente des cellules T CD8 ⁺ , et leur expression de CD45RO varie selon si elles proviennent de donneurs sains ou diabétiques.	76
Figure 3.5 –	Les cellules DN T expriment davantage le marqueur d'activation CD69 que les cellules T CD8 ⁺ suite à leur activation et leur prolifération in vitro, et expriment faiblement les marqueurs KLRG1 et CD160.	77
Figure 3.6 –	Suite à leur activation et à leur prolifération in vitro, les cellules DN T expriment en faible proportion les marqueurs d'épuisement 2B4, Tim-3 et PD-1, et expriment de façon variable le marqueur Lag3.	79

Figure 3.7 – Les cellules DN T expriment de façon variable le marqueur CD8 α suite à la culture in vitro. 80

Figure 3.8 – La proportion de cellules MAIT parmi les cellules DN T est faible, mais semble présente chez certains donneurs diabétiques..... 81

Figure 3.9 – Les cellules DN T ayant subi un protocole d'activation et de culture cellulaire ont un potentiel cytotoxique in vitro similaire aux cellules T CD8+ envers des cellules T et B de lignées tumorales, passant par la relâche de granzyme B et de perforine. 90

Figure 3.10– Les cellules DN T humaines survivent en périphérie chez la souris humanisée NRG lorsqu'elles sont injectées avec de l'IL-15 humaine, et protègent les souris NRG contre une xéno-GVHD induite par des PBMCs humains. 94

Figure 3.11 – Les cellules T double-négatives humaines ont une activité inhibitrice envers les cellules de la lignée tumorale KMS-11..... 97

Liste des sigles et abréviations

AML : acute myelogenous leukemia (leucémie myéloïde aiguë)

APC : *antigen-presenting cell* (cellule présentatrice d'antigène)

BAFF : *B-cell activating factor* (facteur d'activation de cellule B)

B10 : C57BL/10SnJ

CAR-T cell : *chimeric antigen receptor T cell* (cellule à récepteur antigénique chimérique T)

CFSE : carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CTLA-4 : *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique)

DN : double négative, CD4⁻CD8⁻

DP : double positive, CD4⁺CD8⁺

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

FBS : *fetal bovine serum* (serum de veau fetal)

FITC : fluorescein isothiocyanate

FOXP3 : forkhead box P3

GVHD : *graft-vs-host disease* (maladie du greffon contre l'hôte)

GvT : *graft versus tumour effect* (effet du greffon contre la tumeur)

HbA1c : *haemoglobin A1c* (hémoglobine A1c)

HEL : *hen egg lysozyme* (lysozyme d'œuf de poule)

HLA : *human leukocyte antigen* (antigène de leukocytes humains)

IAA : *insulin autoantibody* (auto-anticorps d'insuline)

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IFN : interféron

IPEX : *immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome* (syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X)

Lpr : lymphoprolifération,

MM : myélome multiple

NK : *natural killer cell* (cellule tueuse naturelle)

NKT : *natural killer T cells* (cellule tueuse naturelle T)

NOD : souche de souris *Non-obese diabetic* (non-obèse diabétique)

NRG : souche de souris *NOD-Rag1^{null}IL2rg^{null}*

OVA : ovalbumine

PBMC : *peripheral blood mononuclear cell* (cellule mononucléée du sang périphérique)

PBS : *phosphate buffer saline* (tampon phosphate salin)

PD-1 : *programmed cell death 1* (mort cellulaire programmée 1)

PE : phycoérythrine

PerCP : peridinin chlorophyll protein

PPI : *preproinsulin* (préproinsuline)

PTPN22 : *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22* (protéine tyrosine phosphatase, non récepteur de type 22)

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium* (milieu Roswell Park Memorial Institute)

Rag : *recombination activating gene* (gène d'activation de recombinaison)

SIRP : *signal regulatory protein* (protéine régulatrice du signal)

TCR : *T cell receptor*, (récepteur de cellules T)

TGF β : *transforming growth factor beta* (facteur de croissance transformant bêta)

Treg : *regulatory T cells*, (cellules T régulatrices)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement ma directrice de recherche, Dre Sylvie Lesage, pour m'avoir offert l'incroyable opportunité de faire ma maîtrise au sein de son laboratoire. Durant mon parcours peu orthodoxe, j'ai été dirigée par une scientifique rigoureuse avec de hautes attentes, mais qui a toujours su s'adapter au type d'étudiant encadré. Je suis vraiment reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée, malgré les circonstances extraordinaires de cette dernière année et demie, ainsi que de la rigueur et de la passion scientifique que tu as su me transmettre. Tu m'as vraiment encouragée à me dépasser.

Je tiens également à remercier les membres présents et passés du laboratoire, qui m'ont fait énormément grandir en tant qu'étudiante, collègue et personne. À Geneviève et Erin, qui ont développé le projet d'étude des cellules DN T humaines : en plus d'avoir développé plusieurs protocoles, vous avez été des personnes ressources incroyables qui ont grandement contribué à ma formation, en m'accordant du temps pour répondre à mes très nombreuses questions. À Cindy, Félix et Adrien, je vous remercie de m'avoir partagé vos connaissances techniques et votre passion pour la science. À Sarah et Maher, je vous remercie d'avoir été de véritables amis tout le long de mon passage au laboratoire, et Sarah, merci d'avoir été une merveilleuse collaboratrice sur le projet. Je remercie également Lise, pour sa disponibilité et son aide généreuse sur le projet. Ce mémoire n'aurait pas été possible sans vous deux.

Je remercie également mes parents, pour avoir été le plus formidable système de soutien durant ces dernières années. Je suis très reconnaissante de votre fierté, qui me motive et me pousse à me dépasser. Merci également à mes amis, du domaine scientifique et non scientifique, pour votre soutien durant ces deux dernières années.

Enfin, j'aimerais remercier les membres du jury pour avoir très gentiment accepté d'évaluer ce mémoire.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 Immunothérapies et thérapies cellulaires

Bien que souvent associé à la défense contre les pathogènes extérieurs, le système immunitaire est composé d'une diversité épatante de cellules et de molécules capables aussi de nous défendre contre toutes sortes d'insultes, dont le développement de cancers. Toutefois, lorsqu'il est suractivé, il contribue à la destruction de nos propres tissus, menant ainsi à l'auto-immunité. Depuis quelques décennies, pour traiter les pathologies complexes, telles que le cancer et l'auto-immunité, les chercheurs se sont intéressés à la modulation de notre propre système immunitaire comme thérapie, développant ainsi le concept d'immunothérapie. Ces stratégies novatrices se basent sur le fait qu'il est possible d'éduquer notre système immunitaire, que ce dernier est plus précis que certaines thérapies peu spécifiques et nocives pour les tissus environnants (p. ex. chimiothérapie, radiothérapie, immunosuppression), qu'il est dynamique et qu'il possède une « mémoire ». Ainsi, la modulation des composantes du système immunitaire est de plus en plus étudiée et semble très prometteuse pour le traitement de différents types de cancers et même de maladies auto-immunes. Ici, divers types d'immunothérapies seront mentionnés brièvement, tels que l'utilisation d'anticorps monoclonaux, d'inhibiteurs de point de contrôle, alors que la thérapie à base de cellules sera traitée de façon plus approfondie. Il est important de noter que d'autres types d'immunothérapies existent, mais ne seront pas traitées ici puisqu'ils dépassent le champ d'application de cette revue de littérature. De plus, bien que seules les immunothérapies reliées au cancer et à l'auto-immunité soient discutées ici, il faut noter que c'est une stratégie thérapeutique pouvant être utilisée dans d'autres contextes, tels que les maladies infectieuses.

1.1.1 Types d'immunothérapies

1.1.1.1 Anticorps monoclonaux

L'utilisation de nombreux anticorps monoclonaux a été approuvée pour le traitement de différentes formes de cancer, particulièrement de nature hématologique comme les lymphomes non hodgkiniens à cellules B, où un anticorps anti-CD20 est donné aux patients. Les anticorps monoclonaux fonctionnent par divers mécanismes. Ils peuvent permettre aux cellules immunitaires d'entraîner la cytotoxicité cellulaire dépendante aux anticorps (ADCC) en se liant aux antigènes présents à la surface des cellules tumorales. Ils peuvent être également impliqués dans la promotion

de la présentation antigénique par les cellules APC (antigen presenting cells), tels que les cellules dendritiques, en ciblant leurs récepteurs Fc. Enfin, ces anticorps pourraient également contribuer à la réponse spécifique à l'antigène contre la tumeur grâce au réseau idiotypique (1).

1.1.1.2 Inhibiteurs de points de contrôle

La croissance d'un cancer nécessite souvent la suppression du système immunitaire dans son microenvironnement, en provoquant entre autres l'augmentation de molécules appelées points de contrôle immunitaires (« immune check-points molecules»), ou marqueurs d'épuisement, qui agissent en tant que frein à la réponse de certains types de cellules immunitaires. Bloquer ces molécules à l'aide également d'anticorps monoclonaux vise à rétablir la fonction des cellules immunitaires. Les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 et de CTLA-4 sont parmi les plus étudiés et utilisés pour le traitement de certains types de cancers (2). Les anticorps envers CTLA-4 agiraient davantage lors de la phase du « immune priming » en entraînant l'activation et la prolifération d'un haut nombre de cellules T effectrices tôt dans la réponse immunitaire. Les anticorps envers PD-1, de leur côté, agiraient plutôt dans la phase effectrice, en restaurant la fonction de cellules T épuisées en périphérie (3).

1.1.1.3 Vaccins

Il existe d'abord des vaccins prophylactiques, qui préviennent certaines infections par des agents infectieux connus pour déclencher des événements génétiques menant au développement de différents cancers (Eg le vaccin du VPH (virus du papillome humain), infection associée au développement du cancer du col de l'utérus) (4). Toutefois, il existe également des vaccins thérapeutiques, comportant une réponse dirigée à des cancers qui ne sont pas d'origine virale. Ces derniers peuvent cibler différents antigènes spécifiques au type de cancer, tels que des protéines oncogéniques ou des protéines exprimées de façon anormale (5). Pour ce faire, les antigènes tumoraux sélectionnés sont administrés de façon exogène soit en combinaison avec des adjuvants stimulant les cellules dendritiques, ou en combinaison directe avec ces dernières, afin de stimuler le système immunitaire adaptatif du patient envers les protéines anormales associées à son cancer (6).

1.1.1.4 Thérapies cellulaires

L'utilisation de nos propres cellules comme thérapie remonte à déjà plusieurs décennies, avec les transfusions d'érythrocytes, puis plus tard de plaquettes et de cellules de la moelle osseuse,

permettant ainsi d'améliorer la survie de patients atteints de diverses pathologies hématologiques. Depuis, avec ou sans l'aide du génie biomédical, les percées en thérapies cellulaires se sont faites nombreuses, servant à traiter une multitude de pathologies, en passant par le cancer, les infections, les maladies auto-immunes ainsi que les complications des transplantations allogéniques (7). Le schéma de la Figure 1.1 résume les applications de différents types de thérapies cellulaires.

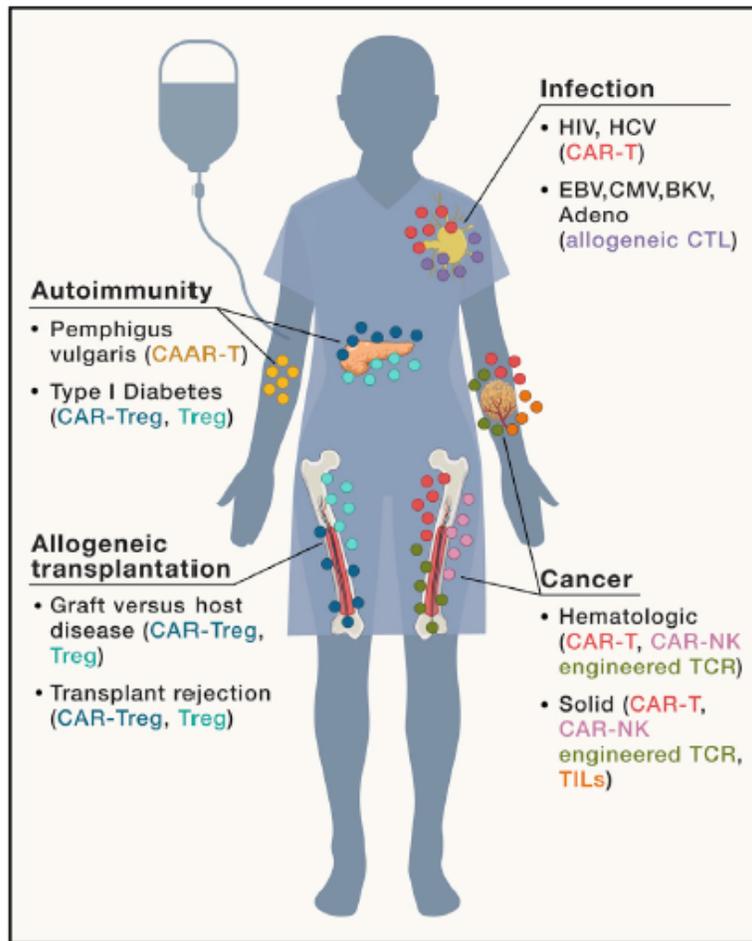


Figure 1.1 – Thérapies cellulaires immunitaires pour le traitement de maladies humaines

(Adapté de Weber *et al.*, 2020)

1.1.2 Thérapie cellulaire

Il existe deux grandes catégories de thérapies cellulaires, soit celles à base de cellules non modifiées par ingénierie (*non-engineered immune cell therapies*) et celles à base de cellules modifiées par ingénierie (*engineered immune cell therapies*) (voir Figure 1.2).

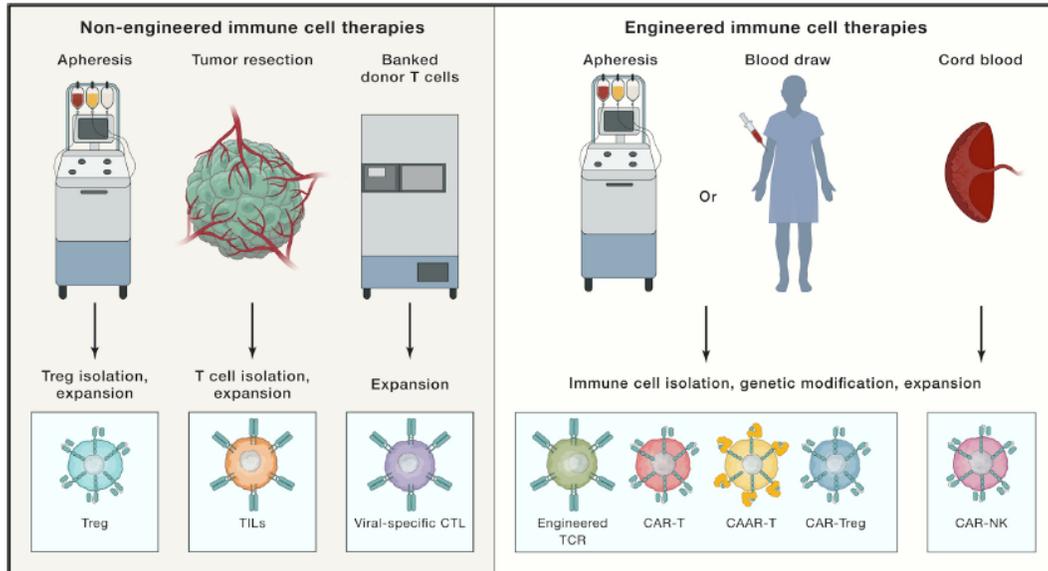


Figure 1.2 – Le continuum d’immunothérapies cellulaires.

Les images de gauche illustrent quelques approches d’immunothérapies où les cellules ne sont pas modifiées génétiquement alors qu’à droite, elles sont modifiées. (Adapté de Weber *et al.*, 2020)

1.1.2.1 Thérapies cellulaires à base de cellules non modifiées par ingénierie

Les cellules qui seront utilisées pour ce genre de thérapie sont normalement isolées grâce au processus d’aphérèse, à partir de la résection d’une tumeur ou à partir d’une biobanque de cellules T. Contrairement aux cellules modifiées génétiquement discutées plus bas, celles-ci, après leur isolation, subiront directement un protocole d’activation et de culture cellulaire avant d’être infusées chez les patients.

Thérapies à base de lymphocytes infiltrants des tumeurs (*Tumor infiltrating lymphocytes, TILs*) :

Des travaux datant des années 1980 et 1990 montraient que réinfuser des cellules T autologues isolées de tumeurs ayant subi un protocole de culture cellulaire en présence d’IL-2 pouvait mener à une rémission complète pour le quart d’un groupe de patients atteints de mélanome métastatique

(8). Par la suite, différentes équipes ont montré que cette forme d'immunothérapie, cette fois-ci où les lymphocytes infiltrant de tumeurs seraient d'abord enrichis pour les néo-antigènes des patients et réinfusés chez ces derniers, posséderait un potentiel thérapeutique pour certains cancers colorectaux métastatiques ainsi que certaines formes de cancer du sein (9, 10).

Thérapies cellulaires à base de lymphocytes cytotoxiques spécifique aux virus :

Cette forme de thérapie cellulaire, utilisant des cellules T allogéniques spécifiques à certains antigènes précis, permet de contrôler des infections virales chez des patients sévèrement immunosupprimés, telles que le virus Epstein-Barr (EBV), le cytomégalovirus, l'adénovirus, le virus BK et l'herpesvirus-6 de l'humain, et pourraient potentiellement servir à traiter certaines formes de cancers associés au virus, tels que ceux médiés par le EBV ou le virus de l'hépatite B (11-13).

Thérapies à base de cellules immunorégulatrices :

Contrairement aux cas de divers cancers, où le microenvironnement tumoral ne permet pas une activation et une fonction adéquate du système immunitaire, les maladies auto-immunes résultent plutôt de la suractivation de certaines cellules immunes. Les cellules immunorégulatrices sont spécialisées dans le contrôle des réponses immunitaires exagérées. C'est pourquoi les thérapies cellulaires à base de cellules immunorégulatrices, passant par un transfert adoptif de ces dernières chez des récipiends, sont prometteuses pour des pathologies comme le diabète de type 1, la maladie du greffon contre l'hôte et dans certains cas de greffes d'organes (14). De nombreux modèles murins ont pu démontrer l'efficacité de cette méthode, qui a été étudiée également chez les humains des essais cliniques pour le diabète de type 1 (15) et pour le GVHD aigu (aGVHD) (16). Les différents types de cellules immunorégulatrices, tel que les cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ et les cellules T double-négatives, ainsi que leurs applications, seront discutés davantage dans les sections 1.2 et 1.3.

1.1.2.2 Thérapies cellulaires basées sur l'ingénierie et la modification génétique des cellules du système immunitaire

Dans le but de produire des thérapies cellulaires à base de cellules modifiées par ingénierie, il faut d'abord isoler des cellules du sang par aphérèse, à partir d'une prise de sang ou à partir de sang de cordon. Par la suite, grâce à des techniques de génie biomédical, les cellules isolées seront

modifiées génétiquement, puis elles subiront un protocole de culture cellulaire avant d'être transfusées chez les patients.

Cellules T comportant un récepteur modifié (*Engineered TCR*) :

Il est parfois difficile de trier des cellules T spécifiques à certains antigènes tumoraux, c'est pourquoi la technique d'édition génétique du récepteur de cellules T (TCR) s'avère très avantageuse. En plus d'assurer la spécificité de reconnaissance de la cellule immunitaire, il est possible d'ajouter divers gènes supplémentaires encodant pour des cytokines assurant la promotion et la survie des cellules greffées (17).

Cellules T à récepteur antigénique chimérique et autres (*CAR T cells*) :

L'utilisation de la thérapie à *CAR-T cells* est de plus en plus reconnue pour certains cancers hématologiques tels que les leucémies lymphoblastiques B aiguës (18, 19). Le récepteur antigénique chimérique est un récepteur recombiné pour pouvoir à la fois lier les antigènes tumoraux et posséder les fonctions d'activation cellulaire. Ce récepteur modifié présent à la surface des cellules T permet de reconnaître davantage de cibles que le récepteur d'origine et n'est pas restreint par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (20-22). On peut souligner également que ces récepteurs antigéniques chimériques peuvent être exprimés à la surface d'autres types cellulaires, tels que sur les cellules NK ou les cellules T régulatrices, pour n'en nommer que quelques-unes (23, 24). Il est important de mentionner que cette forme de thérapie comporte tout de même plusieurs limites, puisqu'il arrive que les cellules cancéreuses perdent l'expression de l'antigène ciblé, de façon partielle ou totale. Ce phénomène de l'échappement de l'antigène est un des divers facteurs limitants pour la thérapie à *CAR-T cells*, tout comme les effets hors cibles ou la difficulté des cellules à persister en périphérie, pour n'en nommer que quelques-uns (25).

1.2 Les cellules immunorégulatrices

1.2.1 Le soi et le non-soi

Le système immunitaire est connu avant tout comme un système de défense contre les pathogènes extérieurs, grâce à la capacité des cellules immunes de reconnaître un très grand nombre d'antigènes. Toutefois, il est important que ces mêmes cellules ne s'attaquent pas aux tissus de son propre organisme, d'où l'importance du concept de tolérance du soi. La tolérance du soi est médiée principalement par deux mécanismes, soit la tolérance centrale et la tolérance périphérique. La

tolérance centrale réfère aux phénomènes qui limitent le développement de clones autoréactifs, grâce à la sélection négative des cellules T au sein du thymus et au processus d'édition du récepteur des cellules B au sein de la moelle osseuse (26, 27). Toutefois, la tolérance centrale n'est pas un mécanisme infailible. Ainsi, pour expliquer le contrôle de clones autoréactifs qui y échapperaient, il avait été proposé que les phénomènes d'anergie des cellules T (28) et de l'ignorance/indifférence des cellules T (29) seraient mis en place. Cependant, ces mécanismes passifs ne seraient pas suffisants, d'où l'importance d'un deuxième mécanisme de tolérance, soit celui de la tolérance périphérique (30). Ainsi, des populations cellulaires immunitaires seraient spécialisées en contrôle des cellules autoréactives qui auraient échappé à la tolérance centrale et qui circulent en périphérie. Au cours des dernières années, de grands progrès ont été effectués dans la compréhension des dynamiques entre ces populations dites immunorégulatrices.

1.2.2 Les types de cellules immunorégulatrices

1.2.2.1 Les cellules T régulatrices conventionnelles

Les cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ sont sans doute les cellules les plus étudiées parmi les cellules médiatrices de la tolérance périphérique. Leur importance a été révélée pour la première fois lorsque des cellules $CD4^+$ co-exprimant $CD25$ ont été déplétées de la population totale de $T CD4^+$, et que ces dernières ont été réinfusées dans des souris récipientes, qui ont subséquemment développé diverses affections auto-immunes (31). L'activité immunorégulatrice des cellules $T CD4^+CD25^+$ fut démontrée in vitro par Thornton et Sevrach, montrant que ces dernières étaient capables de supprimer l'activation polyclonale de cellules T en inhibant la production d'IL-2 (32). Alors que ces travaux ont été effectués dans des modèles murins, des cellules $CD4^+CD25^+$ avec des fonctions d'immunorégulation ont aussi été identifiées chez l'humain. De façon intéressante, les patients atteints du syndrome IPEX (*immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*), caractérisé par une mutation dans le gène FOXP3, développent une auto-immunité agressive pouvant entraîner la mort. Ceci récapitule les observations faites dans les souris mutantes pour FoxP3, qui développent des syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns, et illustre l'importance physiologique des cellules T régulatrices (33). Elles sont connues entre autres pour leur production de cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10, le TGF- β et l'IL35 (34).

1.2.2.2 Les cellules immunorégulatrices non conventionnelles

En plus des cellules Treg classiques $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, qui se développent dans le thymus, il existe de nombreuses populations cellulaires s'occupant de promouvoir la tolérance en périphérie. D'abord, d'autres types de cellules T $CD4^+$ qui ont une activité immunorégulatrice, soit les cellules $CD4^+ Tr1$ produisant de l'IL-10 et les cellules $CD4^+ Th3$ produisant du TGF- β (35, 36). Les cellules $CD8^+$ négatives pour le CD28 ($CD8^+CD28^-$), les cellules T double positives $CD4^+CD8^+$, les cellules T double négatives $CD4^-CD8^-$ ainsi que les cellules *Natural Killer-like T cells* (NKT) font également partie des cellules régulatrices du compartiment T (37-40). Il existe également un type de cellules B possédant des fonctions d'immunorégulation, soit les cellules régulatrices B10 (41).

À la lumière de ces informations, les cellules immunorégulatrices constituent une classe de cellules immunitaires possédant un potentiel thérapeutique important pour le traitement de maladies auto-immunes et de la maladie du greffon contre l'hôte, ou même pour contribuer à la mise en place de la tolérance envers les greffes. Toutefois, plusieurs défis de taille se posent pour l'utilisation de ces cellules comme thérapies cellulaires, soit le manque de compréhension des mécanismes de certains de ces types de cellules, ainsi que leur nombre restreint en périphérie, demandant des protocoles de culture cellulaire adaptés et efficaces qui permettent à ces cellules de maintenir leur potentiel immunorégulateur.

1.3 Les cellules T double-négatives

Les cellules T double-négatives $CD4^-CD8^-$ font également partie de la catégorie des cellules immunorégulatrices non conventionnelles. Dans les prochains paragraphes, l'état des connaissances actuelles sur leur phénotype, leur ontogénie et leur fonction sera décrit.

1.3.1 Phénotype des cellules T double-négatives

Les cellules T double-négatives (double-negative T cells, DN T) sont considérées depuis quelques décennies comme un sous-type de cellules T matures non conventionnelles, possédant le récepteur de cellule T (T-cell receptor, TCR), mais non les corécepteurs classiques CD4 ou CD8. Puisque plusieurs sous-types cellulaires non conventionnels correspondent également à cette description, il est important de distinguer ces derniers des cellules T doubles-négatives qui sont à l'étude dans ce projet. Il est d'abord possible de discriminer les cellules T $\gamma\delta$ des cellules DN T par la composition des chaînes de leur TCR, soit des chaînes $\gamma\delta$ et des chaînes $\alpha\beta$ respectivement (29). Ces deux populations cellulaires seraient donc distinctes, et auraient des origines, un phénotype et des

fonctions différentes. Ensuite, une caractérisation supplémentaire peut s’effectuer en excluant le marqueur NK1.1 chez la souris (ou le marqueur CD56 chez l’humain) du phénotype des cellules DN T, permettant ainsi de distinguer nos cellules d’intérêt des cellules NKT de type I (42). Toutefois, il est présentement impossible de distinguer les cellules DN T des cellules NKT de type II, puisque ces dernières possèdent un répertoire TCR très diversifié et ne possèdent pas de marqueur positif exprimé de façon homogène chez la totalité de cellules (43). Bien qu’il soit possible de contourner le problème de cette distinction chez la souris en utilisant des modèles CD1d⁻, déficient en cellules NKT, puisque leur répertoire est restreint à cette molécule, il est impossible chez l’humain de distinguer ces deux sous-types cellulaires. Ceci illustre le besoin d’identifier un marqueur positif spécifique aux cellules DN T, afin de les distinguer d’autres types cellulaires pouvant potentiellement être identifiés de façon négative. Enfin, il est possible de discriminer les cellules DN T des cellules MAIT (*mucosal-associated invariant T cells*) par la restriction du répertoire de ces dernières à la molécule MR1 (*MHC class I-related protein*) (44).

Il est également important de noter qu’à travers la littérature, différents groupes de recherches utilisent des techniques d’isolation ou des marqueurs phénotypiques différents afin d’identifier les cellules DN T, ce qui peut parfois biaiser les conclusions tirées. Pour ce qui en est de notre groupe, la sélection des cellules DN T se fait chez la souris par l’exclusion des marqueurs apparentés aux autres sous populations mentionnées plus haut (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻NK1.1⁻). Chez l’humain, les cellules DN T humaines seraient TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD56⁻.

Tableau 1. – Propriétés des différents sous-types de populations de cellules T CD3⁺CD4⁻CD8⁻

Table 1
Properties of the various CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T cell populations.

	DN T cells	NKT I cells	NKT II cells	$\gamma\delta$ T cells
T cell receptor	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$
Repertoire	Polyclonal [26,68]	Oligoclonal [92]	Polyclonal [93]	Oligoclonal [94–96]
Restriction	MHC	CD1d [30,38]	CD1d [33]	Rare MHC restriction [94,97]
Antigen recognition	Peptides [77]	Glycolipids [27,32,98,99]	Glycolipids [33,100]	Protein and non-protein [94,101]
NK1.1 expression	+/- ^a	+/- [22]	+/- [31]	+/- [102,103]
CD49b expression	+/- [22]	+/- [22,104]	+/- [3,104]	N/A

^a Manuscript in preparation, Hillhouse, Chabot-Roy, Lesage.

(Adapté de Hillhouse et Lesage, 2012)

Les cellules DN T composent 1 à 5 % de la population lymphocytaire périphérique à la fois chez la souris et chez l'humain (44, 45). Diverses études servant à caractériser cette population cellulaire ont été effectuées dans des modèles de souris TCR transgéniques, révélant généralement chez ces cellules un phénotype naïf (low CD44, CD25⁻, CD28⁻, CD69⁻, CD122⁻, B220⁻, Ly-6A high) (45-50). L'utilisation de divers transgènes $\alpha\beta$ TCR avait comme avantage d'augmenter la proportion des cellules immunorégulatrices DN T au sein des organes lymphoïdes de souris. Ces cellules n'expriment pas non plus le marqueur classique des Tregs, soit le facteur de transcription FoxP3, ni les marqueurs des cellules NKT, soit NK1.1 et CD49b, mais expriment de bas niveaux de CD5, et expriment CD3, CD62L et CD45RB (43).

Les cellules DN T sont bien plus rares en périphérie dans les modèles murins non transgéniques que dans les modèles TCR transgéniques (51, 52). Toutefois, elles partagent tout de même en grande partie la présence et l'absence d'expression des marqueurs exprimés par les cellules DN T isolées de modèles TCR transgéniques, suggérant qu'elles sont bel et bien une population distincte de cellules, et non les artéfacts d'une insertion de transgène. Les cellules DN T ont été étudiées dans le modèle non transgénique déficient pour les quatre marqueurs CD4, CD8, CMH I et CMH II (*quad-deficient mice*), et portaient un phénotype CD5^{hi}CD69⁺CD62L^{low}CD44^{hi}, ressemblant davantage à un phénotype de cellules T activées que naïve (43).

Bien qu'il soit moins décrit dans la littérature, le phénotype des cellules DN T chez l'humain ressemble à celui des cellules DN T retrouvées chez la souris. Celles du sang périphérique présentent un répertoire polyclonal de TCR $\alpha\beta$, n'expriment pas le facteur de transcription FoxP3 et sont négatives pour le marqueur de cellules NK et NKT CD56. Lorsque les cellules DN T humaines sont fraîchement isolées, elles expriment CD27, Fas et perforine, de bas niveau de CD28 et sont négatives pour CD25 (45). Toutefois, après activation in vitro, les cellules augmentent leur expression de CD25 et CD45RO (53). Bien que la souris soit un outil essentiel à l'étude des cellules DN T, une meilleure caractérisation phénotypique des cellules DN T humaines s'avère nécessaire vu le nombre croissant de travaux se penchant sur l'effet protecteur de ces cellules contre diverses pathologies.

Il est également intéressant de mentionner qu'une accumulation de cellules T négatives pour CD4 et CD8 est retrouvée chez les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) (54), soit des patients avec une ou des mutations dans les gènes impliqués dans les

voies de signalisation de Fas. Le rôle que ces cellules jouent dans la pathologie reste toutefois à être éclairci. L'accumulation de cellules T CD4⁻CD8⁻ est également retrouvée chez la souris lpr/lpr, modèle murin possédant également une mutation altérant la voie de signalisation Fas. Toutefois, bien qu'elles soient phénotypiquement similaires aux cellules DN T des autres modèles (absence d'expression des corécepteurs CD4 et CD8, phénotype de cellules activées), les cellules T CD4⁻CD8⁻ de la souris lpr/lpr se distinguent par l'expression du marqueur de surface B220, faisant d'eux une population cellulaire distincte des cellules DN T « classiques » (55).

1.3.2 Ontogénie des cellules T double-négatives

L'origine de la population cellulaire immunorégulatrice DN T reste encore discutée, à savoir si elles ont une origine thymique, ou plutôt un développement en périphérie.

Lors du développement thymique des cellules T conventionnelles, celles-ci passent à travers un stade double-négatif (DN) (sous-divisés en quatre stades DN), où les cellules n'expriment ni le corécepteur CD4 ni le corécepteur CD8 (56). Plusieurs groupes ont donc proposé l'hypothèse que les cellules DN T matures (à ne pas confondre avec le stade de différenciation des thymocytes immatures DN) proviendraient de précurseurs ayant emprunté lors de leur développement thymique une voie alternative, qui les auraient empêchés de se différencier en cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ (57, 58).

D'autres équipes ont proposé que les cellules matures DN T proviendraient de cellules T $\alpha\beta$ primitives qui n'auraient pas passé par le développement thymique (59). En effet, dans une étude de Johansson et Lycke étudiant les populations régulatrices du tractus urogénital, les auteurs ont trouvé que des cellules CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻NK1.1⁻B220^{low} constituaient la majorité du compartiment génitale de souris naïves, gestantes ou infectées par *Chlamydia trachomatis* (60). Ces cellules étaient retrouvées dans des souris nude, mais également dans des souris déficientes pour le CMH de classe II ou pour la B2-microglobuline. Ces auteurs ont tiré comme conclusion que ces cellules DN T seraient d'origine extrathymique. Notre groupe a revisité cette hypothèse avec différents modèles de souris et nos résultats suggèrent plutôt que les cellules DN T subirait une sélection thymique indépendante du CMH (61). En effet, alors que la différenciation des cellules NKT et MAIT (*mucosal associated invariant T cells*) dépend de molécules de CMH I non classiques (CD1d et MR1 respectivement), restreignant ainsi leur répertoire de TCR, les cellules DN T pourraient se différencier au sein du thymus d'une façon indépendante du CMH. Les cellules

DN T matures dériveraient d'un précurseur thymique double-négatif $CD5^{low}$, et seraient sélectionnées grâce à un signal TCR relativement faible. Ces travaux ont également montré que les précurseurs des cellules DN T matures passeraient par le stade immature double-positif $CD4^+CD8^+$. Un autre groupe s'étant penché sur une population de cellules $TCR\alpha\beta$ double-négatives résidentes dans la moelle osseuse (BMDNT) soutient que ces cellules se développeraient dans le thymus de façon dépendante de Notch et l'IL-7, mais indépendante des éléments de restrictions classiques, incluant le CMH de classe I et II, CD1d et MR1 (62).

Certains groupes ont également proposé que les cellules DN T matures seraient en fait à l'origine des cellules T $CD4^+$ ou $CD8^+$ matures qui auraient diminué l'expression de leur corécepteur, et donc qui se développeraient *de novo* en périphérie (63, 64). Zhang *et al.* ont montré qu'il était possible, chez la souris, de convertir des cellules $CD4^+$ en cellules DN T par une stimulation allogénique de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse en présence d'IL-2 ou d'IL-15, et les cellules double-négatives des souris *lpr* proviendraient de précurseurs $CD8^+$ (65, 66).

Il est intéressant de noter que toutes ces hypothèses sont non exclusives et pourraient en effet expliquer le développement de cellules T double-négatives. Comme mentionné plus tôt, le phénotype des cellules DN T semble varier dans la littérature, et l'absence de marqueur positif pour cette population n'exclut pas le fait qu'il pourrait s'agir de différentes sous-populations cellulaires qui auraient des fonctions et une origine différente, malgré un phénotype similaire.

1.3.3 Cibles et mécanismes des cellules T double-négatives

Vers la fin des années 1980, Strober *et al.* ont cloné pour la première fois des cellules T provenant de rates murines qui n'exprimaient ni le corécepteur CD4 ni le corécepteur CD8, mais qui exprimaient CD3, et qui étaient en mesure de supprimer une réaction lymphocytaire mixte allogénique (52). De façon presque concomitante, l'équipe de Bruley-Rosset *et al.* avait montré que dans des expériences de greffe de moelle chez la souris, une immunisation préalable des donneurs avec les splénocytes du récipient contribuait à faire diminuer l'incidence de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (67). La réduction de cette incidence était maintenue même si les splénocytes étaient déplétées de cellules CD4, CD8 et asialo-GM1, et était attribuable selon les auteurs de l'étude à une population exprimant le $TCR\alpha\beta$. Jusque-là, la population des cellules DN T était encore peu caractérisée, mais ces travaux démontraient tout de même l'existence d'une

population cellulaire non conventionnelle avec une activité d'immunorégulation. L'équipe de Zhang fut la première à caractériser des cellules $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{NK1.1}^-$ avec une activité spécifique à l'antigène à la fois dans un contexte *in vivo* et *in vitro* (39).

Avec le temps, l'étude des cellules DN T dans des modèles murins transgéniques et non transgéniques a révélé des cibles et des mécanismes variés pour ces cellules non conventionnelles. Il serait tentant de comparer l'activité d'immunorégulation des cellules DN T à celle des cellules T regs classiques $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$, caractérisée par une production de molécules immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β menant à une diminution de l'expression des signaux de costimulation par les cellules APC. Toutefois, les mécanismes d'activité des cellules DNT recensés dans la littérature semblent s'apparenter davantage à ceux des cellules T ayant un potentiel cytotoxique (Fas-FasL, granzyme/perforine) (43). Les mécanismes immunorégulateur des cellules DN T semblent toutefois varier selon le type de cellule qu'elles ciblent et le modèle d'étude.

Les cellules T comme cible :

Comme mentionné plus haut, le groupe de Zhang *et al.* fut le premier à démontrer que les cellules DN T avaient une activité immunorégulatrice spécifique à l'antigène dans un modèle de souris transgénique 2C TCR. En effet, les cellules DN T de ce modèle étaient en mesure de supprimer la prolifération cellulaire et avaient même une activité cytotoxique envers les cellules T CD8^+ qui possédaient le TCR 2C dans un contexte *in vitro*, mais non envers des cellules T CD8^+ possédant une spécificité antigénique distincte. Trois mécanismes ont été proposés afin d'expliquer ce phénomène de reconnaissance. D'abord, il se pourrait qu'il y ait une reconnaissance directe du CMH allogénique exprimé à la surface de la cellule T CD8^+ , ou à l'inverse, une reconnaissance directe du CMH allogénique exprimé sur la cellule DN T par le TCR exprimé à la surface de la cellule T CD8^+ , qui soit nécessaire pour l'activité cytotoxique de la cellule DN T (68). Autrement, le mécanisme de trogocytose (69), où une cellule est capable d'acquérir la molécule du CMH à partir d'une cellule APC grâce à son TCR afin de pouvoir la présenter elle-même à sa surface, a également été présenté afin d'expliquer l'activité immunorégulatrice des cellules DN T. Les travaux de Ford McIntyre *et al.*, dans un contexte de tolérance de greffe, ont également montré que les cellules DN T possédant une spécificité à un antigène particulière pouvaient capter l'alloantigène à partir des APC du donneur, leur permettant ainsi de se lier et de tuer les cellules T

CD8⁺ possédant la même spécificité à l'alloantigène, afin de promouvoir la tolérance (70). Pour ce qui est du mécanisme de cytotoxicité, peu importe le mode de reconnaissance de la cellule cible, les cellules DN T des modèles transgéniques semblaient passer par le mécanisme de liaison Fas-FasL. Ceci implique donc que les cellules DN T se lieraient aux cellules T CD8⁺ pour leur donner un signal de mort cellulaire.

Ces résultats ont été répliqués dans des modèles murins non transgéniques et chez l'humain (39, 71). Toutefois, dans ces deux types d'étude, les cellules T CD4⁺ s'ajoutent aux cibles potentielles des cellules DN T, en plus des cellules APC et des cellules NK (qui seront traitées plus loin). De plus, des mécanismes alternatifs à celui de Fas-FasL ont été proposés afin de définir l'activité immunorégulatrice cytotoxique des cellules DN T, tels que la dégranulation de perforine et de granzyme, ainsi que l'importance de la molécule Ly-6A, puisque les cellules subissant un traitement avec un anticorps bloquant pour cette molécule semblent perdre leur potentiel cytotoxique envers les cellules T CD8⁺ (49).

Les cellules B comme cibles :

Bien qu'une grande partie de la littérature se consacre à l'activité immunorégulatrice des cellules DN T envers les cellules T activées, il est connu qu'elles ont également une activité similaire envers les cellules B activées. Les études de xénotransplantation (greffe où le donneur et le receveur sont d'espèce biologique différente) ont aidé à mettre en lumière cette activité. Dans un contexte in vitro, les cellules DN T activées par un xénoantigène sont non seulement capables d'induire l'apoptose chez les cellules T activées, mais également les cellules B activées, par un mécanisme dépendant de la perforine et de la granzyme (72). Également dans des expériences de xénotransplantation où des souris B6 recevaient des greffes de cœur provenant de rats Lewis, l'équipe de Ma *et al.* a démontré en 2008 que si les souris étaient traitées avec des cellules DN T, la durée de la survie de la greffe était augmentée (73). De plus, dans ces souris receveuses, une augmentation de la mort apoptotique de cellules B était observée, alors que différents sous-types d'IgG contre le donneur étaient inhibés. Dans des expériences in vitro concomitantes, la même équipe a montré que les cellules DN T pouvaient induire par un mécanisme dépendant de la perforine la mort de cellules B. Notre groupe a profité du modèle transgénique restreint au CMH de classe II TCR 3A9 pour montrer d'abord qu'un transfert autologue de cellules DN T dans une souris susceptible au diabète se traduisait par une réduction dans le sérum des auto-anticorps IgG

antigènes spécifiques, mais non des IgM (46). Ceci suggère donc que les cellules DN T pourraient être en mesure d'éliminer les cellules B autoréactives qui contribuent au développement du diabète auto-immun, du moins dans un modèle transgénique. Notre groupe a subséquentement montré que les cellules DN T transgéniques (TCR 3A9) étaient capables de tuer de façon spécifique à l'antigène les cellules B, mais non les cellules T, par un mécanisme dépendant de la perforine et de la granzyme (74).

Les cellules DN T et les cellules dendritiques :

Les différents travaux illustrant le phénomène de trogocytose effectué entre les cellules DN T et les APCs, tel que les cellules dendritiques, montrent que ces deux types de cellules sont amenées à entrer en contact. Les travaux de Gao *et al.* ont d'abord montré à l'aide du modèle transgénique 2C TCR que les cellules DN T exprimaient de hauts niveaux de CTLA-4, ce qui peut contribuer à faire diminuer les molécules de costimulation CD80 et CD86 exprimées à la surface des cellules dendritiques. Ainsi, en plus de cibler et tuer directement les cellules T effectrices spécifiques à l'antigène, les cellules DN T pourraient également nuire indirectement à l'activation de ces cellules T en diminuant l'expression des molécules de co-stimulation sur les APCs. De plus, la même équipe a également montré que les cellules étaient capables de cibler et tuer directement les cellules dendritiques allogéniques mature et immature en passant par un mécanisme Fas-FasL, diminuant davantage le potentiel de présentation antigénique (75).

Les cellules DN T et les cellules NK :

Peu de travaux se sont penchés sur les interactions que les cellules DN T pourraient avoir avec les cellules NK. Dans une étude de He *et al.* sur la transplantation de moelle osseuse dans un modèle murin non transgénique, l'équipe a montré que les cellules DN T provenant du donneur de la greffe pouvaient entraîner la suppression du rejet de greffe allogénique médiée par les cellules NK. Il semblerait que la suppression de ces cellules soit médiée par Fas-FasL et par un mécanisme de dégranulation de perforine et granzyme (76). Davantage d'études seront nécessaires afin de mieux comprendre la relation entre ces deux types de cellules.

1.3.4 Cellules DN T humaines

La plupart des études sur les cellules DN T ont été effectuées à l'aide de modèles murins, toutefois, Fischer *et al.* ont été en mesure en 2005 d'identifier ces cellules chez l'humain, avec un profil phénotypique et fonctionnel très similaire aux cellules des souris (45).

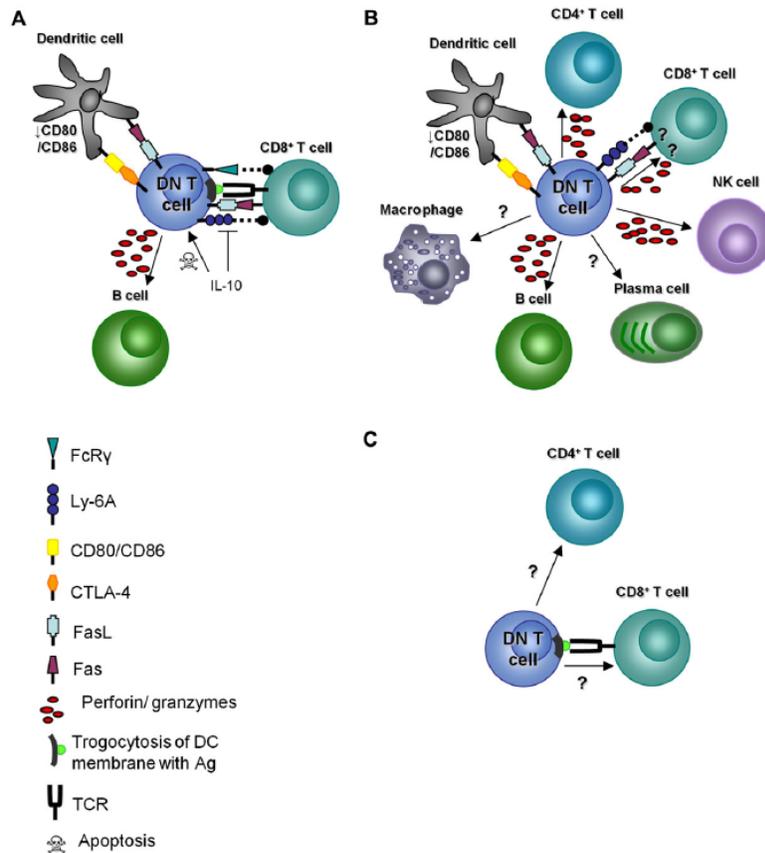


Fig. 1. The targets and mechanism of action of DN T cells. TCR transgenic (A) non-transgenic mouse (B) and human (C) DN T cells target various cell populations using different mechanisms of actions.

Figure 1.3 – Les cibles et mécanismes d'action des cellules DN.

Cette figure illustre les différents mécanismes d'action proposés et les populations cellulaires cibles des cellules DN T murines possédant un TCR transgénique (A), des cellules DN T murines (B), et des cellules DN T humaines. (Adapté de Hillhouse et Lesage, 2012)

La particularité des cellules DN T, soit l'absence de corécepteurs classiques CD4 et CD8, amène à se questionner sur le mode de reconnaissance du CMH sur les cellules avec qui elles interagissent, et conséquemment sur leur mode d'activation. L'utilité des corécepteurs chez les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ classiques permettent de reconnaître le CMH de classe II et I respectivement qui présente

l'antigène, permettant l'engagement du TCR et l'activation de la tyrosine kinase Lck, à la tête d'une cascade de signalisation complexe (77). Bien que le mécanisme de reconnaissance du CMH des cellules DN T reste encore à être élucidé, des travaux effectués dans un modèle murin d'asthme allergique spécifique à l'ovalbumine (OVA) ont révélé que les cellules DN T spécifiques à l'OVA reconnaissent le CMH de classe 2 grâce au récepteur Lag3 (78). Bien que ceci soit montré dans un contexte spécifique, Lag3 semble être une molécule très intéressante à étudier dans le contexte de la mécanistique de reconnaissance du CMH par les cellules DN T, puisque c'est une molécule homologue au corécepteur CD4 (79). Les connaissances actuelles sur l'activité et la fonction des cellules DN T chez l'humain sont peu nombreuses comparées aux connaissances acquises dans les modèles murins. Il est donc impératif de mieux comprendre leurs mécanismes et fonctions afin de pouvoir éventuellement user du pouvoir thérapeutique de ces cellules.

1.3.5 Cellules DN T dans le contexte de diverses pathologies

Les cellules DN T ont été étudiées dans le contexte de nombreuses pathologies et contextes thérapeutiques, soit la transplantation, le cancer, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et certaines maladies auto-immunes comme le diabète de type 1.

Contexte de transplantation :

Le modèle murin transgénique 2C TCR a permis de montrer que l'injection de cellules DN T portant le 2C TCR était en mesure de prolonger la survie de greffe de peau et de greffe cardiaque (39, 80). Ces résultats ont également été répliqués dans un contexte de modèle non transgénique, montrant que lorsque des cellules DN T étaient injectées suite à une greffe de peau, ces dernières étaient préférentiellement localisées près de l'allogreffe et étaient, dans un contexte in vitro, capables d'éliminer les cellules T CD8⁺ de façon spécifique à l'antigène (81). De plus, comme il était mentionné plus haut, les travaux de Ma *et al.* ont montré que dans un contexte de xéngreffe, les cellules DN T étaient importantes pour la promotion de la tolérance à la greffe grâce à leur activité cytotoxique envers les cellules B xénoréactives. Ces données soutiennent que les cellules DN T représentent un potentiel très intéressant dans le contexte de greffe d'organes solide, méritant des études plus approfondies.

Contexte de la maladie du greffon contre l'hôte :

La maladie du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host disease*, GVHD) est une complication de l'allogreffe de cellules souches, thérapie utilisée pour l'éradication de divers cancers hématologiques. Les travaux de Bruley-Rosset mentionnés plus haut suggéraient déjà que les cellules DN T joueraient un rôle protecteur envers le développement de la GVHD. Contrairement aux cellules T allogéniques CD4⁺ et CD8⁺, les cellules DN T ne semblent pas causer de GVHD dans les modèles murins (76). En outre, dans un modèle 2C TCR transgénique, les cellules DN T étaient capables de prévenir le développement de la GVHD en s'attaquant aux cellules allogéniques CD8⁺ (71). Le lien entre les cellules DN T et la GVHD chez l'humain est également étudié depuis quelques années. En effet, selon une étude de Ye *et al.*, chez les patients atteints de la forme aiguë de la GVHD (aGVHD), il semble y avoir une reconstitution plus lente des cellules DN T que chez les patients n'ayant pas développé d'aGVHD (82). L'équipe de McIver *et al.* a également montré qu'il y avait une corrélation négative entre le nombre de cellules DN T et le grade de sévérité de l'aGVHD (83). Notre groupe a montré la même association dans un contexte de la forme chronique de la GVHD, où la proportion de cellules DN T était corrélée de façon négative non seulement avec le degré de sévérité de la maladie, mais également avec le niveau de BAFF, suggérant que les cellules DN T pourraient potentiellement s'attaquer aux cellules B pathogéniques contribuant au développement de la pathologie (84). Bien que les études chez l'humain soient davantage des études de corrélations, des travaux comme ceux de Achita *et al.*, montrant que des infusions de cellules DN T humaines contribuent à la prévention du développement d'une forme de xéno-GVHD chez des souris immunodéficientes NSG (*non-obese diabetic-scid IL2rg^{-/-}*) suggèrent que ces cellules auraient un potentiel thérapeutique à utiliser dans la prévention d'une telle pathologie (85).

Contexte de cancers et tumeurs hématologiques :

Le potentiel cytotoxique des cellules DN T envers certaines lignées cellulaires cancéreuses a également été étudié. L'équipe de Yao *et al.* a montré que des cellules DN T humaines ayant subi un protocole de culture cellulaire étaient capables de lyser diverses lignées cellulaires d'une forme de cancer du poumon NSCLC (*non-small-cell lung cancer*) in vitro et étaient capables d'inhiber la croissance tumorale dans un modèle de xéno greffe (86). Les cellules DN T sembleraient également avoir un potentiel cytotoxique envers des cellules de lymphome A20, puisque quand co-infusées ensemble dans des souris naïves, ces dernières ne développent pas de lymphome, ni de GVHD

(87). Lee *et al.*, du même groupe, ont montré que des cellules DN T humaines isolées du sang périphérique et ayant subi un protocole de culture cellulaire avaient un potentiel cytotoxique envers des cellules primaires de leucémie myéloïde aiguë (AML), et ne causaient pas non plus de xéno-GVHD (88). Ces travaux illustrent non seulement que les cellules DN T ne causent pas de GVHD, mais qu'elles semblent pouvoir entraîner l'effet de greffon contre la tumeur (*GvT*, *graft versus tumor effect*), du moins contre le développement de lymphome et de leucémie chez la souris. L'utilisation de cellules DN T en immunothérapies pour les cancers hématologiques pourrait donc présenter un double avantage, contribuant à la fois à l'éradication de cellules malignes, et la protection de la GVHD suite à une greffe de cellules souches.

Contexte du diabète de type 1 :

Les travaux de Ford *et al.* ont été les premiers à démontrer que les cellules DN T pouvaient avoir un rôle bénéfique dans la protection contre le développement du diabète de type 1 en utilisant un modèle murin transgénique P14/RIP-gp. En effet, l'équipe a montré que le transfert de cellules DN T P14 activées par la gp33 1 journée avant l'induction du diabète pouvait prévenir le développement de ce dernier, par l'élimination de cellules T CD8⁺ (89). Notre groupe, en utilisant le modèle transgénique 3A9 TCR:insHEL, combiné à une déficience de CD47 associée au développement d'une forme de diabète spontané, a montré d'abord que les souris susceptibles de développer la maladie avaient un nombre réduit des cellules DN T en périphérie. De plus, une seule injection de cellules DN T TCR 3A9 provenant de souris non déficientes en CD47 dans des souris déficientes suffisait à les protéger du développement du diabète auto-immun. Notre groupe a également montré que les cellules DN T 3A9 provenant de souris susceptibles au diabète NOD.*H2^k* avaient un potentiel cytotoxique semblable à celui des cellules DN T 3A9 provenant d'une souche résistante au développement du diabète, soit les souris B10.BR (46). Les travaux de Duncan *et al.* ont également contribué à la compréhension du lien entre les cellules DN T et le développement du diabète auto-immun, en montrant que ces cellules avec un potentiel immunorégulateur pouvaient prévenir le développement de la maladie chez les jeunes souris NOD. Toutefois, ils ont aussi rapporté qu'avec l'âge, on observait un déclin progressif dans le nombre de cellules T circulantes (90). Il est intéressant de mentionner que ces travaux ont été effectués dans un modèle de souris non transgénique, et qu'ils ont permis de montrer qu'un transfert de cellules DN T provenant de souris NOD dans des souris NOD.SCID ne provoquait pas le développement du

diabète. De plus, si elles étaient transférées préalablement avant un transfert de cellules diabétogéniques dans la souris NOD-SCID, celles-ci étaient également protégées du diabète. Plus récemment, Liu *et al.* ont montré qu'une combinaison de cellules DN T et de sérum anti-thymocyte pouvait reverser le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD (91). Ces travaux, bien qu'au niveau de la souris, suggèrent fortement que la restauration du nombre de cellules DN T contribue à la protection du diabète auto-immun.

Davantage d'études sur le lien entre les cellules DN T et toutes ces pathologies mentionnées plus haut chez l'humain devront être effectuées afin de pouvoir envisager l'utilisation d'une immunothérapie à base de ces cellules immunorégulatrices.

1.3.6 Cellules DN T et immunothérapie

Bien que présentes en petite proportion chez les humains, les cellules DN T ont comme avantage d'être isolées facilement à partir du sang périphérique de donneurs sains, et peuvent par la suite subir une expansion *ex vivo*. Contrairement à d'autres formes d'immunothérapies, tel que les CAR-T cells, les cellules DN T ne nécessiteraient pas de modifications génétiques. Puisque ce sont des cellules immunorégulatrice avec une activité spécifique à l'antigène, et que lorsqu'elles sont infusées dans les modèles murins, elles ne semblent pas causer de GVHD, il serait possible de penser que leur infusion chez des patients serait accompagnée d'effets secondaires moindrement nocifs comparés à d'autres immunothérapies. Davantage d'études seront nécessaires, particulièrement dans des modèles *in vivo*, afin de voir si une thérapie cellulaire à base de cellules DN T pourrait éventuellement voir le jour.

1.4 Pathologies et modèles d'études

1.4.1 Diabète de type 1

Le diabète représente un groupe de maladie métabolique bien définie dans la littérature, caractérisée par une hyperglycémie suivant un défaut dans la sécrétion ou l'action de l'insuline (92). Seul le diabète de type 1, qui comporte environ 5 à 10 % des patients vivant avec le diabète, est caractérisé par une pathogenèse auto-immune, où lorsqu'une panoplie de conditions génétiques et environnementales est réunie, mènent à la destruction des cellules β du pancréas par les cellules du système immunitaire.

Génétique :

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune classique touchant un organe, soit le pancréas, qui possède des composantes génétiques et environnementales. Comme pour diverses maladies auto-immunes, le HLA (*Human leukocyte antigen*) contribue à la susceptibilité génétique d'une atteinte par la maladie, puisque les gènes de ce locus sont associés avec le phénomène de présentation des antigènes aux cellules T (93). La chaîne β du HLA-DQ, soit une des formes du CMH de classe II humain, présenté sur les APCs (les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les macrophages), serait associé de façon directe avec la susceptibilité d'un individu à développer le diabète de type 1 (94). Alors que certains haplotypes sont associés avec une prédisposition de la maladie (*HLA-DRB1*03-DQAI*05-DQBI*02 et DRB1*04-DQAI*03-DQBI*03:02*), il est à noter qu'il existe aussi des haplotypes associés avec une protection de la maladie (*DRB1*15-DQAI*01-DQBI*06:02, DRB1*14-DQAI*01-DQBI*05:03 and DRB1*07-DQAI*02:01-DQBI*03:03*) (95). Outre les gènes associés aux HLA, le gène de l'insuline (*INS*) (96), la région du promoteur du gène de l'insuline (*Insulin-VNTR*) (97), le gène du cytotoxique T-lymphocyte-associated protein 4 (*CTLA-4*) (98), la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-2 (*IL2RA, CD25*) (99) et la protéine tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (*PTPN22*) (100) seraient également associés avec la susceptibilité au diabète de type 1, pour n'en nommer que quelques-uns.

Facteurs environnementaux :

Bien que le lien entre différents gènes et la susceptibilité de développer le diabète de type 1 est relativement bien caractérisé dans la littérature, le lien avec les facteurs environnementaux reste moins bien compris. Parmi les facteurs les plus étudiés, on retrouve l'infection par certains virus, tels que le virus de la rubéole (101), le virus de Coxsackie B4 (102) ainsi que certains entérovirus (103), qui contribueraient au développement du T1D par l'activation de l'immunité innée ou par mimétisme moléculaire (104). D'autres facteurs incluraient la diète et le microbiote (105), particulièrement l'inclusion du lait de vache (contenant de l'insuline) et de la vitamine D (106, 107). Toutefois, les études portant sur le sujet demeurent controversées.

Les facteurs génétiques et environnementaux principaux sont listés dans le Tableau 2, qui indique également que des facteurs épigénétiques et immunologiques contribueraient au développement de la pathologie.

Tableau 2. – Facteurs contribuant au développement du diabète de type 1

Table 1 Contributing factors in type 1 diabetes mellitus pathogenesis.

A. Genetic factors
1. HLA
2. Insulin-VNTR
3. CTLA-4
4. Other genetic associations (PTPN22, AIRE, FoxP3, STAT3, IFIH1, HIP14, ERBB3)
B. Epigenetic factors
C. Environmental factors
1. Viruses (rubella, enteroviruses)
2. Diet (cow's milk, cereals, omega-3 fatty acids, vitamin D)
3. Gut microbiota
D. Immunologic factors
1. Immune tolerance (central, peripheral, Tregs)
2. Cellular immunity
3. Humoral immunity (GAD65, IA-2, IAA, ZnT8)

(Adapté de Paschou *et al.*, 2018)

Signes et symptômes, diagnostic :

Les symptômes classiques associés au diabète de type 1 sont la polydipsie (la soif excessive), la polyphagie (la faim excessive) et la polyurie (sécrétion excessive d'urine) (108). Le diabète de type 1, comme pour les autres formes de diabète, est une maladie associée avec un haut de sucre dans le sang, phénomène appelé hyperglycémie. En effet, la destruction des cellules β par les cellules du système immunitaire (voir plus bas) amène l'organisme à être en déficit d'insuline, hormone essentielle pour l'absorption de sucre dans les cellules. En absence ou en quantité insuffisante d'insuline, les cellules de l'organisme se voient privées de leur source d'énergie, d'où l'apparition de la fatigue caractéristique et des autres symptômes mentionnés plus haut (109). Il est à noter qu'une des caractéristiques essentielles qui diffère la plupart des diabétiques de type 1 des diabétiques de type 2 est la présence un ou plusieurs auto-anticorps envers les auto-antigènes des cellules β , tels que l'insuline (IAA), le glutamic acid decarboxylase (GADA), l'insulinoma-associated autoantigen 2 (IA2A) ainsi que le zinc transporter 8 (ZnT8A) (110). La présence d'auto-anticorps et la prédisposition génétique permettent de poser un diagnostic lorsqu'environ le deux tiers des îlots de

Langerhans sont privés de cellules β , bien que les symptômes apparaissent souvent après la perte de 90-95 % des cellules β (111).

Pathogenèse :

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par une attaque des cellules immunitaires envers les cellules β , soit les cellules productrices d'insuline situées au niveau des îlots de Langerhans du pancréas, causant ainsi un déficit d'insuline chez l'organisme. Cette atteinte serait médiée en majorité par les lymphocytes T. En effet, au sein des lésions insuliniques, les lymphocytes T CD8+ seraient la population prédominante, suivie des macrophages (CD68+), des lymphocytes T CD4+, des cellules B (CD20+) puis des cellules plasmiques (CD138+). Les cellules T régulatrices et les cellules NK seraient peu présentes au sein des lésions (108). Comme il est illustré à la Figure 1.4, des cellules T autoréactives naïves échappent les mécanismes de tolérance centrale du thymus, voyagent jusque dans les nœuds lymphatiques du pancréas, où elles pourront rencontrer leurs auto-antigènes spécifiques présentés à la surface de cellules APC. Des cellules T mémoires aideront des cellules B autoréactives à se différencier en plasmocytes afin de produire des auto-anticorps envers les antigènes du pancréas. Les cellules T autoréactives pourront circuler en périphérie. Un stress infligé au pancréas, par exemple lors d'un contexte inflammatoire d'infection, peut faciliter l'expression de neoantigènes par les molécules de HLA de classe 1 à la surface des cellules β , qui seront ultimement ciblées par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (112).

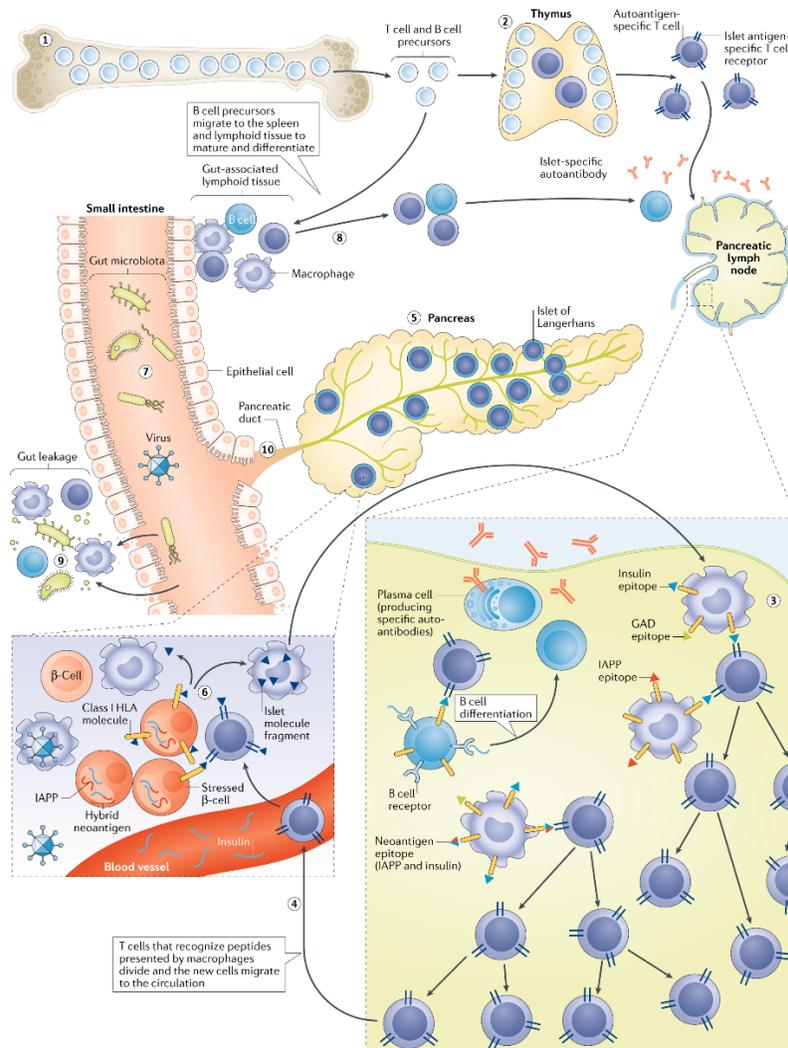


Figure 1.4 – Éléments clés de la pathogenèse auto-immune ciblant les cellules β dans le diabète de type 1.

Cette figure illustre la contribution de différentes populations cellulaires (cellules T, cellules B, macrophages) au mécanisme global de destruction des cellules β du pancréas, menant au développement du diabète de type 1. (Adapté de Ilonen *et al.*, 2019).

Modèles d'étude (modèles murins) :

Le modèle d'étude le plus utilisé pour l'étude du diabète de type 1 est sans doute la souris NOD (*non-obese diabetic*), responsable d'une bonne partie de la compréhension mécanistique de la maladie (113). La souris NOD est un modèle de développement spontané de diabète auto-immun, prédisposé à la maladie par la présence de polymorphismes partagés par les humains susceptibles au T1D (CMH/HLA de classe II, PTPN2, CTLA-4, pour n'en nommer que quelques-uns) (114). Outre

la souris NOD, diverses souris transgéniques ont également été utilisées pour étudier différentes susceptibilités génétiques de la maladie. Notre groupe, par exemple, s'est penché sur un modèle de souris transgénique déficiente pour CD47, une protéine exprimée de façon ubiquitaire impliquée dans l'activation de cellules T, dans l'apoptose, la phagocytose ainsi que la migration cellulaire. Les ligands de CD47 incluent sans se limiter aux protéines de la famille SIRP (*signal regulation protein*) SIRP α et SIRP γ (115, 116). Les travaux ont démontré que la délétion de CD47 chez les souris suffisait à provoquer un bris de la tolérance immunitaire périphérique, menant à l'apparition d'une forme auto-immune de diabète. La souris transgénique déficiente pour CD47 fait partie des nombreux modèles transgéniques ayant permis l'étude de voies de signalisation biologiques impliquées dans le développement du diabète auto-immun. Il est intéressant de mentionner également que le modèle transgénique déficient en CD47 a également mis en relief l'importance des cellules T doubles-négatives (DN T) dans la prévention du diabète auto-immun (46). Il est également possible de déclencher le T1D chez des modèles animaux (modèles induits) par l'usage de composés chimiques, de procédures chirurgicales ou de modèles d'infections ciblant plus ou moins spécifiquement le pancréas ou les cellules productrices d'insuline (117-119), toutefois, ces modèles ne seront pas détaillés davantage ici.

Traitements :

Sans traitement et prise en charge, le diabète de type 1 est mortel, alors qu'une mauvaise gestion des taux glycémiques peut mener à des complications sévères micro et macrovasculaires (120). La prise exogène d'insuline demeure le traitement standard, toutefois, il est intéressant de mentionner que plusieurs approches thérapeutiques sont en cours d'investigation, à la fois dans des modèles animaux et chez l'humain. Il y a d'abord les transplantations d'îlots de pancréas, dirigée surtout au groupe de patient souffrant d'hypoglycémie réfractaire, aussi appelé le *Edmonton protocol* (121). Ensuite, plusieurs thérapies immunosuppressives ont été étudiées ou testées pour prévenir ou retarder la progression de la maladie, ciblant les cellules T (cyclosporine, anticorps monoclonaux anti-CD3 teplizumab et oteelixumab) (122, 123) ou les cellules B (anticorps monoclonal rituximab anti-CD20, avec ou sans BAFFR-Fc treatment) (123). Toutefois, les effets secondaires des immunothérapies, administrées avec d'îlots de pancréas en tant que thérapie pour le T1D, incluent un risque plus élevé d'infection et une immunosurveillance du cancer diminuée. Ceci démontre un besoin de thérapies permettant plutôt de rétablir un équilibre du système immunitaire, et non une suppression

dommageable de ce dernier. Pour pallier le manque de donneurs potentiels d'îlots et d'un besoin de régime immunosuppresseur, certaines équipes se penchent sur l'utilisation potentielle de cellules souches pour pallier le manque de cellules β (124). De plus, certaines études se penchent sur l'utilisation de cellules immunorégulatrices en tant que thérapie cellulaire pour la prévention ou la protection de maladies auto-immunes, telles que la thérapie cellulaire à base de lymphocytes T régulateurs polyclonaux (15).

1.4.2 Myélome multiple

Physiopathologie :

Le myélome multiple est un trouble néoplasique de lymphocytes B caractérisé par une prolifération de plasmocytes malins au sein de la moelle osseuse, dans un microenvironnement permissif (125). La pathologie est également caractérisée par des immunoglobulines monoclonales (*M protein*) dans le sang ou l'urine, et peut être associé à une perte de fonction de certains organes (126). Plusieurs événements génétiques précèdent la transformation de cellules plasmatiques pré-malignes dérivées de cellules B post-centre germinatif, qui prolifèrent de façon asymptomatique, en un néoplasme malin. Cette transformation est également influencée par des changements au niveau du microenvironnement de la moelle osseuse (voir plus bas). Suite à des anomalies cytogénétiques, causant souvent d'abord une MGUS (*monoclonal gammopathy of undetermined clinical significance*) (127), le myélome multiple peut se développer d'abord de façon asymptomatique, puis symptomatique. Différents événements d'instabilité génétiques peuvent mener à la transformation des plasmocytes.

Les événements génétiques transforment les plasmocytes en provoquant un changement au niveau de leur réponse aux facteurs de croissance du microenvironnement ainsi qu'au niveau de l'expression de molécules d'adhésion (125). Ceci influencera les interactions des cellules malignes avec les cellules de la moelle osseuse et avec certaines protéines de la matrice extracellulaire. Comme il est indiqué dans la Figure 1.5, l'interaction entre VCAM1 (vascular-cell adhesion molecule1) exprimée à la surface de la cellule du myélome et l'intégrine alpha 4 (VLA-4) à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse augmente la production de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (128). Bien que le myélome multiple soit un cancer de nature hématologique, puisque la transformation s'effectue au niveau de plasmocytes, cette pathologie est caractérisée par l'apparition fréquente de lésions ostéolytiques au niveau des os, qui peuvent mener

à des fractures pathologiques débilantes (129), puisque les cytokines et diverses molécules sécrétées dans le microenvironnement participent à la suractivation des ostéoclastes, les cellules responsables de la résorption osseuse. En plus des lésions osseuses, il est à noter que les patients peuvent également souffrir d'hypercalcémie, d'insuffisance rénale et d'anémie (130).

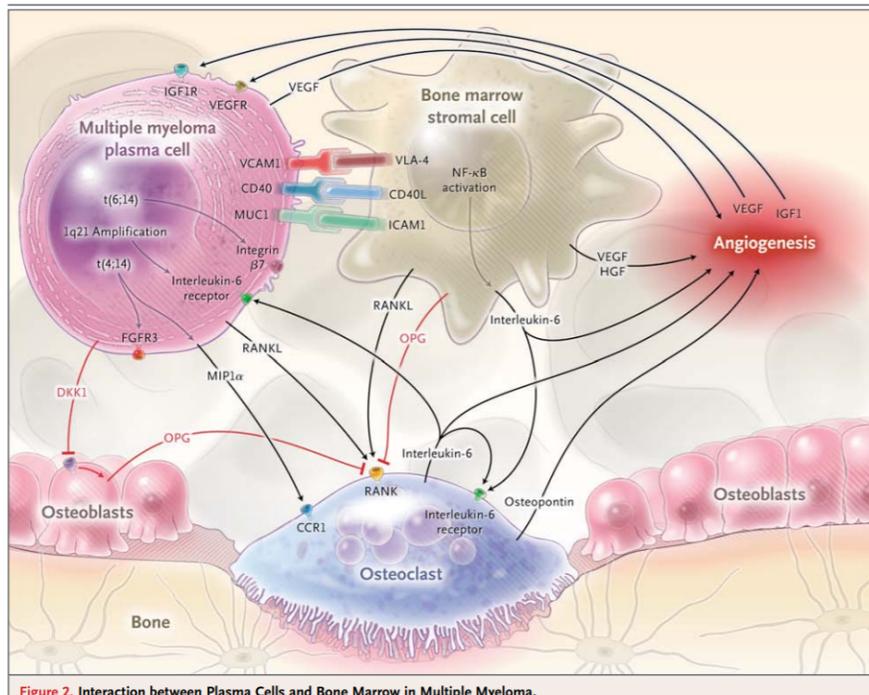


Figure 1.5 – Interactions entre les plasmocytes et la moelle osseuse dans le myélome multiple.

Cette figure illustre les interactions entre les cellules B plasmiques et les cellules stromales de la moelle osseuse dans le contexte du myélome multiple, montrant les diverses molécules et intégrines en jeu. (Adapté de Palumbo *et al.*, 2011).

Modèles expérimentaux :

Le myélome multiple est une pathologie de mieux en mieux comprise, grâce aux divers modèles expérimentaux développés durant les dernières décennies. Particulièrement, divers modèles murins se sont avérés très utiles afin de récapituler la pathologie *in vivo*, afin de mieux comprendre les interactions entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral. Parmi les modèles murins qui développent spontanément la maladie, il existe les souris C57BL/KalwRij, qui sont

enclines à développer des troubles lymphoprolifératifs de cellules B. Bien que seulement 0,5 % des souris progressent réellement vers le MM, la transplantation de la moelle osseuse de ces souris dans des souris récipientes syngéniques permet de reproduire la maladie, et ce modèle spontané permet d'étudier l'étape initiale de la transformation cellulaire (131, 132). Le croisement entre ces souris et des souris RAG2^{-/-} permet également d'étudier la pathogenèse (133). Toutefois, les fonds génétiques spécifiques de ces modèles murins et la provenance des lignées cellulaires peuvent présenter une limitation pour la recherche translationnelle. Ainsi, pour l'étude de traitements du MM, plusieurs équipes utilisent des modèles de souris immunodéficientes (SCID ou NOD/SCID) pour faire des xénogreffes de cellules de MM humaines. Ces souris ont la mutation SCID (*severe combined immunodeficiency*), qui leur empêche de développer un système immunitaire adaptatif, faute de cellules T et B matures. De plus, le fond génétique NOD de la souris NOD/SCID entraînerait une déficience de cellules NK fonctionnelles, en plus d'un défaut dans le développement de cellules de la lignée myéloïde et d'une absence de protéine C5 de la cascade du complément. La présence d'un polymorphisme dans le gène SIRPα chez la lignée NOD lui permet de reconnaître le CD47 humain, participant à l'acceptation de cellules humaines (134). Ces modèles sont donc des modèles adéquats pour la greffe de cellules hématopoïétiques humaines (135, 136). L'évolution de l'hémopathie maligne peut être observée en temps réel par de l'imagerie à résonance magnétique, ou par bioluminescence (137, 138). Afin de pousser encore plus loin le modèle, des groupes de recherche ont pensé à implanter des prélèvements d'os fœtal humain (souris SCID-hu), afin que les cellules de MM humaines puissent se localiser dans l'implant (139). De plus, de nombreuses souris transgéniques ont été développées afin de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans le MM. Entre autres, mentionnons le modèle transgénique de l'IL-6 « IL-6 knock in » (140), où l'induction d'IL-6 humain permet la survie des cellules greffées humaines de MM, le modèle transgénique v-ABL (141), permettant la transformation sélective de plasmocytes, et non de cellules B ou pré-B, ainsi que le modèle transgénique XBP-1 qui entraîne les mêmes événements diagnostiques observés chez les patients atteints de MM (142). Chacun de ces modèles permet d'étudier différentes facettes des mécanismes moléculaires contribuant à la pathologie.

Thérapies :

Pour le traitement du MM, différentes molécules peuvent être prescrites, dépendamment de la stratification de risque attribuée au patient. Celles avec un seul agent actif incluent: Thalidomide (liaison à la protéine cereblon et activation de la cereblon E3 ligase, ubiquitination et dégradation des facteurs de transcriptions IKZF 1 et IKZF3), Bortezomib (inhibition d'une voie catalytique ubiquitine-protéasome), Lenalidomide (ubiquitination médiée par le cereblon, dégradation de IKZF 1 et IKZF3), Pomalidomide (similaire à thalidomide et lenalidomide), Carfilzomib (inhibiteur de protéasome), Daratumumab (anticorps monoclonal ciblant CD38). Les molécules avec des activités en combinaison avec d'autres agents actifs incluent : Elotuzumab (anticorps immunostimulateur ciblant SLAMF7) et Panobinostat (bloqueur de la voie aggresome) (143). Les différentes voies d'administration de ces molécules et les régimes de traitement du MM ne seront pas traités dans cette revue de littérature. Toutefois, malgré la disponibilité de ces thérapies, les données cliniques suggèrent que la greffe de cellules souches (suivant un traitement de conditionnement préalable) est associée à une survie prolongée et sans évènements. Ainsi, pour les patients en dessous de 65 ans dépourvus de dysfonctions rénales, cardiaques, pulmonaires ou hépatiques, en plus des divers régimes de traitements, la greffe de cellules souches hématopoïétiques est recommandée pour le traitement du MM (125, 144). Il existe deux types de greffes de cellules souches. D'abord, la greffe autologue de cellules souches, qui demeure la norme de soins pour le traitement du MM, où les cellules souches hématopoïétiques CD34+ seront récoltées dans le sang périphérique du patient, grâce à une mobilisation avec du G-CSF, ou grâce à l'utilisation d'agent chimiothérapeutique qui serviront pour de la chimiomobilisation (145). Les cellules sont par la suite congelées, entreposées, afin de pouvoir être réinfusées chez les patients suite à un régime de conditionnement.

Ensuite, il existe la greffe allogénique de cellules souches, où les cellules d'un donneur histocompatible ou non histocompatible seront récoltées, afin d'être infusées par la suite chez le patient (146). Bien qu'il existe les traitements de combinaisons, avec les molécules immunomodulatrices, les inhibiteurs de protéasomes ou les anticorps monoclonaux couplés à la greffe de cellules souches autologue, peu de patients maintiennent une rémission complète (147, 148). L'allogreffe de cellules souches est donc graduellement de plus en plus utilisée pour le traitement du MM, parfois en tandem avec la greffe autologue (149). En effet, l'effet du greffon contre le myélome, où les cellules du greffon attaquaient les cellules cancéreuses, mène ainsi à une rémission soutenue chez certains patients. Toutefois, cette forme de greffe n'est pas considérée

comme la norme de soins, et est réservée en majorité à des patients participant à des études cliniques, due aux difficultés de trouver des donneurs, le haut risque de mortalité associé aux traitements, et la maladie du greffon contre l'hôte (150).

1.4.3 Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

La maladie du greffon contre l'hôte (graft-versus-host disease, GVHD) reste une des complications les plus sévères, avec le risque de rechute, suivant une allogreffe de cellules souches (151, 152). Puisque ce type de greffe reste parfois une des seules méthodes curatives pour certains cancers hématologiques (leucémies, lymphomes, myélomes et autres) (146), de plus en plus d'études visent à comprendre le fonctionnement du GVHD, afin d'être éventuellement en mesure de traiter cette complication.

Formes aiguë et chronique :

Il existe deux formes de GVHD, soit la forme aiguë et la forme chronique. La forme aiguë (aGVHD) se développe lorsqu'il existe des différences d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur, que le receveur est incapable de rejeter les cellules du donneur, et que ces dernières, particulièrement les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes, sont immunocompétentes (153). Plusieurs étapes mèneraient à l'installation de l'aGVHD. D'abord, il y a le dommage tissulaire initial, causé par le régime de conditionnement que subit le patient, qui s'accompagne d'une perte d'auto-antigènes et d'alloantigènes et d'une tempête de cytokines recrutant les APC. Ensuite, ces APC vont présenter aux lymphocytes T cytotoxiques du donneur les allo et auto-antigènes en leur fournissant les signaux de costimulation. Finalement, il y aura une migration cellulaire vers divers tissus, qui se verront attaqués par les cellules effectrices (154).

La forme chronique de la GVHD (cGVHD) est plus complexe, et rappelle un peu les mécanismes de maladies auto-immunes classiques qui impliquent à la fois les cellules T et B (155, 156). Bien qu'il y ait un chevauchement entre les mécanismes de la pathophysiologie de l'aGVHD et de celle de la cGVHD, ce dernier se distingue par la contribution à la fois de cellules T alloréactives (polarisées entre autres en Th1 et en Th17), mais également des cellules B ainsi que des médiateurs du système immunitaire innée, tels que les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles (154). Due à l'activité précédente des médiateurs de l'aGVHD, aux potentielles infections et aux médicaments cytotoxiques, de l'inflammation et du dommage tissulaire non spécifique s'installent chez les patients. Ceci provoque la relâche de diverses molécules et signaux

de dommage qui iront déclencher les voies TLR, NOD-like receptor et de l'inflammasome (157). S'en suit une dérégulation du système immunitaire adaptatif, où les dommages infligés au thymus font en sorte que l'hétérogénéité des auto-antigènes spécifiques présents sur la peau, le foie, les poumons, les glandes salivaires, le tractus intestinal et les yeux (organes cibles de la cGVHD) diminue (154). Ceci fait en sorte que les cellules T possédant une spécificité pour ces antigènes, ou ceux capables de réagir de façon croisée, pourront proliférer et s'accumuler (158). Il est important de mentionner la contribution des cellules B à la pathologie. Le destin et la survie de ces dernières sont médiés par leur récepteur de surface (BCR) et le B-cell activating factor (BAFF) (159). Chez les patients post-transplantation, de hauts niveaux de BAFF sont détectés dans le plasma, contribuant à l'échappement des cellules B du donneur aux mécanismes d'élimination périphériques (160), leur permettant ainsi de produire des allo et des auto-anticorps en grande quantité. L'inflammation chronique perpétuée par les nombreux médiateurs mentionnés mène à l'installation de la fibrose pour les organes touchés, et éventuellement jusqu'à la perte de fonction de ces organes (154, 161). La Figure 1.6 illustre comment les différents médiateurs cellulaires participent au développement de la aGVHD ou de la cGVHD (162).

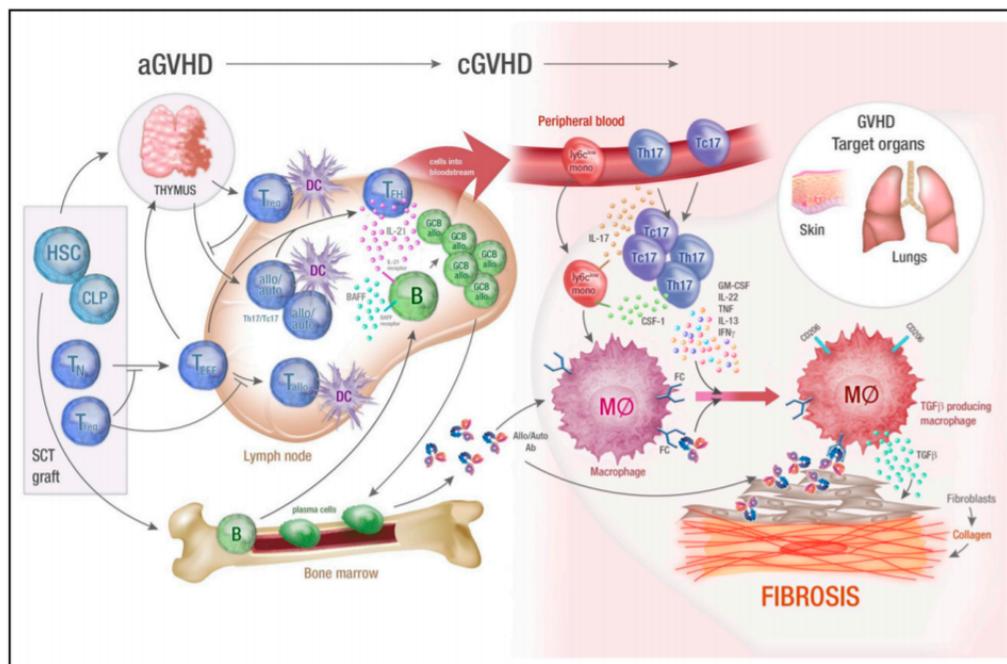


Figure 1.6 – Aperçu schématique des médiateurs cellulaires et moléculaires, connus et impliqués, contribuant au continuum des pathologies de l'aGVHD et de la cGVHD.

Cette figure illustre comment différentes populations cellulaires (cellules T, cellules B, macrophages) contribuent au développement de chaque forme de GVHD, soit la forme aiguë et la forme chronique. Différents médiateurs cellulaires et moléculaires ainsi que des exemples d'organes ciblés par la pathologie sont également montrés. (Adaptée de MacDonald K. *et al.*, 2017).

Modèles d'études du GVHD chronique :

Bien que les modèles murins ne puissent reproduire avec exactitude les multiples complexités et manifestations cliniques de la cGVHD humaine, ces derniers ont quand même été utiles à travers les dernières années afin de mieux comprendre la pathophysiologie de la maladie. Les modèles de cGVHD se différencient souvent de la aGVHD par la présence de fibrose et d'inflammation chronique semblable à celle observée dans des modèles de maladies auto-immunes (163). Il existe des modèles de sclérodémie (profibrotique) (164), des modèles médiés par des anticorps (lupus-like) (165) et de modèles comportant une dysfonction du thymus (166) pour étudier les mécanismes de la cGVHD. De plus, il existe également les modèles de transplantation xénogénique, où des cellules humaines, souvent provenant de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, peripheral blood mononuclear cells), sont greffées dans un modèle murin (163, 167). Il est important de noter qu'une immunosuppression des souris est essentielle afin d'éviter le rejet de la xéno greffe, d'où la fréquente utilisation de souris immunodéficientes, telles que les souris NSG (NOD/SCID IL2 γ -null) ou NRG (NOD-Rag1^{null}IL2rg^{null}), deux modèles de souris déficientes en cellules T, cellules B, et possédant des cellules NK dysfonctionnelles (168, 169). Ce modèle est caractérisé par l'infiltration lymphocytaire des organes et par une perte de poids suivant la xéno greffe.

Traitements contre la maladie du greffon contre l'hôte :

Bien qu'il n'existe aucune option thérapeutique curative pour la GVHD, plusieurs molécules et immunothérapies sont utilisées ou en cours d'investigation en ce moment. Les thérapies standards incluent les inhibiteurs de calcineurine (cyclosporine et tacrolimus), la methotrexate et le mycophenolate mofetil (MMF) (170). Une des premières lignes de traitement pour la cGVHD serait les corticostéroïdes, seuls ou en combinaison avec d'autres agents (171). Toutefois, plusieurs patients finissent par être réfractaires aux stéroïdes. Diverses stratégies thérapeutiques en émergence viseraient directement les cellules impliquées dans la pathologie, telles que les cellules

T (déplétions, anticorps monoclonaux) et les cellules B (Rituximab) (170). De plus en plus d'études précliniques et d'essais cliniques commencent également à être menés dans le but d'inclure se immunothérapies à base de cellules immunorégulatrices, dans le but de prévenir les effets délétères causés par les cellules alloréactives provenant du greffon (172).

Effet du greffon contre la tumeur (*graft-versus-tumor effect*) :

Il est important de mentionner qu'il existe un paradoxe entre les complications potentielles de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et l'éradication de cellules cancéreuse. Bien que la GVHD représente une complication grave, ce qu'on appelle l'effet du greffon contre la tumeur (*graft-vs-leukemia*, *graft-vs-myeloma*) est parfois la seule façon de traiter de façon curative certains cancers hématologiques, puisque les lymphocytes alloréactifs sont parfois capables d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles (173, 174). Bien que ces cellules alloréactives risquent de causer des dommages collatéraux, elles peuvent contribuer à une meilleure survie générale. Dans les cas de myélomes multiples, une étude de Donato *et al.*, se penchant sur la progression de patients ayant reçu une greffe allogénique comme traitement de la maladie, a montré que le développement d'une cGVHD (au contraire d'une aGVHD) chez les patients était associé à une bonne survie générale ou à une survie sans progression (175). Ceci supporte l'idée que l'effet du greffon contre le myélome serait important dans le traitement de la maladie. Un tel phénomène illustre donc l'importance de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, mais également le besoin de thérapies étant capables de modérer les effets néfastes de la cGVHD.

1.5 Hypothèses et objectifs de recherche

Les cellules DN T ont la particularité d'inhiber les réponses immunitaires de façon spécifique à l'antigène, et des résultats précédents du laboratoire ont démontré sur des modèles murins qu'un transfert de ces cellules contribuait à diminuer l'incidence du diabète de type 1. De plus, d'autres groupes ont montré que ces cellules contribueraient également à la suppression de certaines lignées tumorales ainsi qu'à la médiation de la suppression de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Ces cellules présentent donc un grand potentiel d'utilisation en immunothérapie. L'étude présentée dans ce mémoire avait ainsi pour but d'évaluer le potentiel clinique des cellules DN T humaines en tant que thérapie cellulaire pour des pathologies telles que le diabète de type 1, le myélome multiple et la GVHD. Toutefois, puisqu'elles sont retrouvées en très petite proportion dans le sang périphérique (1-5 %), il était impératif de développer un protocole de culture cellulaire permettant

de générer assez de cellules, d'abord pour pouvoir les étudier, mais également pour être en mesure de les utiliser comme thérapie cellulaire. Nous émettons donc comme hypothèses que les cellules DN T humaines triées à partir du sang périphérique ont la capacité de proliférer en grand nombre dans un contexte *in vitro* et qu'elles possèdent une fonction cytotoxique envers des cellules tumorales et des cellules responsables de xeno-GVHD.

Afin de répondre à ces hypothèses, les objectifs principaux de ce mémoire sont :

1. Développer un protocole de culture cellulaire permettant l'activation et la prolifération suffisante des cellules DN T humaines pour des études subséquentes ;
2. Étudier le phénotype des cellules DN T humaines ;
3. Étudier la fonction des cellules DN T humaines dans un contexte *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre 2 – Matériel et méthodes

Isolement de cellules mononuclées du sang périphérique à partir d'un échantillon de sang frais :

Une infirmière de recherche est sollicitée pour le prélèvement d'environ 30 ml de sang frais chez des donneurs sains ou des donneurs atteints du diabète de type 1. Le sang est traité dans les deux heures qui suivent la réception des échantillons. Des tubes SEPMATE™ et un gradient de densité Lymphoprep sont utilisés pour la séparation par gradient des cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Le sang frais est préalablement mélangé avec un volume équivalent de PBS (phosphate buffer saline) + 2 % FBS (*fetal bovine serum*) avant d'être pipeté délicatement au-dessus du gradient de densité. Les tubes sont par la suite centrifugés à 1200 g pour 10 minutes. Le surnageant est par la suite récolté et lavé 2 fois dans du PBS + 2 % FBS (centrifugé à 1000 g pour 5 minutes). Le culot de cellules est resuspendu dans une solution isotonique utilisée pour le marquage de cellules en suspension (PBS + 2 % FBS + EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) (1mM)), et le compte cellulaire final s'effectue à l'aide d'un hématimètre dans une dilution de bleu de Trypan pour exclusion des cellules mortes. L'ensemble des manipulations sont effectuées sous une hotte biologique.

Isolement de cellules T à partir d'un échantillon de sang frais :

Afin d'isoler des cellules T directement à partir d'un échantillon de sang frais, un RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail Protocol a été utilisé (50ul/ml d'échantillon de sang) a été utilisé préalablement au traitement du sang, avec un temps d'incubation de 10 minutes à température pièce. Par la suite, le même protocole utilisé pour isoler les PBMCs a été utilisé (voir la section « Isolement de cellules mononuclées du sang périphérique à partir d'un échantillon de sang frais »).

Tri cellulaire :

Une fois les PBMC isolés et comptés, les cellules sont remises en suspension dans la solution isotonique utilisée pour le marquage de cellules en suspension (voir plus haut) à une concentration de 10^7 cellules/ml dans un tube conique 50 ml. Les cellules sont ensuite marquées avec l'anti-CD8 α PerCP, l'anti-CD4 PE-Cy7, l'anti-TCR $\alpha\beta$ FITC, et l'anti-CD56 PE (les informations sur tous les

anticorps utilisés dans l'entièreté des expériences sont détaillées en annexe), (5 µl d'anticorps pour 10⁶ cellules humaines) avec une incubation à 4⁰C pendant 30 minutes. Par la suite, les cellules sont centrifugées à 1200 RPM pendant 7 minutes, puis lavées deux fois dans du tampon isotonique pour marquage de cellules en suspension. Par la suite, la suspension cellulaire est filtrée sur une membrane de nylon à pores 70 µm stérile, afin d'éliminer les agrégats cellulaires. Les cellules sont mises à une concentration finale de 10⁸ cellules/ml dans des tubes de polypropylène stériles fermés. Des contrôles pour chaque fluorochromes sont également préparés dans une plaque de 96 puits à fond V stérile (voir protocole de marquage de surface). Les cellules sont triées à l'aide d'un cytomètre en flux (BD FACSAria™ II), sélectionnées d'abord selon leur expression du TCRαβ et l'absence d'expression de CD56, puis selon si les cellules expriment CD8α, CD4 ou aucun des 2 corécepteurs. Ainsi, les cellules DN T récoltées seront TCRαβ+CD56-CD4-CD8α-, les cellules T CD8+ récoltées seront TCRαβ+CD56-CD4-CD8α+ et les cellules T CD4+ récoltées seront TCRαβ+CD56-CD4+CD8α-. Le marqueur TCRγδ FITC a également été utilisé pour trier des cellules T γδ pour nécessaires pour certains types d'expériences. Les cellules sont recueillies dans du tampon isotonique pour marquage de cellules en suspension.

Protocole de culture cellulaire pour les expériences d'expression de récepteurs de cytokines :

À la suite de la récolte de cellules PBMC ou PBMC enrichies en cellules T, les cellules primaires récoltées sont mises en culture dans une plaque 96 puits à fonds plat, qui avait préalablement été incubée avec de l'anti-CD3 (HIT3a, 10 µg/ml, Biolegend) et de l'anti-CD28 (CD28.2, 5µg/ml, Biolegend) à 4⁰C, dans du PBS dépourvu de sérum, pendant 24h minimum (maximum de 7 jours d'incubation). Avant de mettre les cellules en culture, les puits sont lavés deux fois avec du PBS stérile. Les cellules sont mises dans les puits à une concentration de 2,5x10⁵ cellules/ml dans du milieu RPMI supplémenté de sérum humain désactivé (10 %) et de streptomycine/pénicilline/glutamine (1 %). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37⁰C 5 % CO₂. Après 24h d'incubation, les cytokines suivantes sont ajoutées dans les puits de culture : IL-2 (3x10⁶ IU/mg, Miltenyi Biotec), IL-4 (1,02x10⁴ IU/µg, Biolegend), et IL-7 (2x10⁷ U/mg, Miltenyi Biotec). Tous les 2 ou 3 jours, selon la confluence des cellules observée au microscope, un passage cellulaire 1/5 est effectué. Les cytokines mentionnées précédemment sont ajoutées à la

même concentration dans le nouveau volume final lors de chaque passage. Le protocole de culture cellulaire dure 7 jours.

Protocole de culture cellulaire pour les expériences de phénotype et cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* :

À la suite du tri cellulaire, les cellules primaires sont mises en culture dans une plaque 96 puits à fonds plats, qui avait préalablement été incubée avec de l'anti-CD3 (OKT3, 1µg/ml ou UCHT1, 0,5 µg/ml) et de l'anti-CD28 (CD28.2, 5µg/ml) à 4°C pendant 24h minimum (maximum de 7 jours d'incubation). Avant de mettre les cellules en culture, les puits sont lavés deux fois avec du PBS stérile. Les cellules sont mises dans les puits à une concentration de 5×10^5 cellules/ml dans du milieu de culture de cellules T ImmunoCult™-XF de STEMCELL Technologies (supplémenté avec 1 % de streptomycine/pénicilline). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C 5 % CO₂. Après 24h d'incubation, les cytokines suivantes sont ajoutées dans les puits de culture : IL-2 (3×10^6 IU/mg, Miltenyi Biotec), IL-7 (2×10^7 U/mg, Miltenyi Biotec), IL-15 (2×10^6 U/mg, Miltenyi Biotec), IL-1β ($5,63 \times 10^4$ IU/µg, Biolegend). Tous les 2 ou 3 jours, selon la confluence des cellules observée au microscope, un passage cellulaire 1/5 est effectué. Les cytokines mentionnées précédemment sont ajoutées à la même concentration dans le nouveau volume final lors de chaque passage. Après 15 jours, les cellules sont comptées à l'aide d'un hématimètre dans une dilution de bleu de Trypan pour exclusion des cellules mortes.

Maintien des lignées cellulaires immortalisées Jurkat, NALM6 et RAJI :

Ces trois lignées cellulaires (NALM6 ATCC CRL-3273, RAJI ATCC CCL-86, Jurkat ATCC TIB-152) sont maintenues dans du milieu RPMI supplémenté (10 % SVF, 1 % HEPES, 0,1 % β-mercaptoéthanol, 100U/ml pénicilline, 100µg streptomycine) dans un incubateur à 37°C 5 % CO₂. À chaque trois jours environ, selon la confluence des cellules observée au microscope, un passage cellulaire 1/10 est effectué.

Culture de lignée cellulaire immortalisée KMS-11 :

Les cellules transformées KMS-11 (cellules de myélome multiple) sont modifiées génétiquement pour exprimer le gène de la luciférase, produisant de la bioluminescence en contact de D-luciférine. Cette lignée cellulaire est maintenue dans du milieu RPMI supplémenté (10 % FBS, 1 % HEPES, 2 mM L-glutamine, 100U/ml pénicilline, 100µg streptomycine, 1 mM pyruvate de sodium, 1 mM

acides aminés) dans un incubateur à 37°C 5 % CO₂. Tous les trois jours environ, selon la confluence des cellules observée au microscope, un passage cellulaire 1/10 est effectué, et 8 µg/ml de puromycine étaient utilisées pour sélectionner les cellules contenant le plasmide avec le gène de la luciférase. Cette lignée cellulaire nous a été aimablement fournie par le laboratoire de Jean-Sébastien Delisle.

Marquage de surface :

Le marquage de surface sur les cellules humaines est effectué dans des plaques 96 puits en fond V non stérile (Marque). Une suspension cellulaire de 5x10⁵ cellules est ajoutée par puits. La concentration utilisée est celle suggérée par le fabricant. Le volume final dans chaque puits avant incubation est de 100 µl (complété avec un tampon de cytométrie). Les cellules sont mises en incubation à 4°C pendant 30 minutes. Après l'incubation, les cellules dans les puits sont lavées deux fois pour retirer l'excédent d'anticorps. Les lavages consistent à centrifuger la plaque pendant 3 minutes à 1200 RPM, retirer le surnageant, puis resuspendre les cellules dans 100µl de tampon de cytométrie. Une deuxième étape de marquage peut s'avérer nécessaire pour certaines expériences, où les volumes, les concentrations d'anticorps utilisés sont les mêmes qu'à la première étape. Suite au dernier lavage, les cellules sont fixées dans 200 µl de tampon de fixation (dilué 1 :1 avec du tampon de cytométrie) pendant 20 minutes, à 4°C. Enfin, les cellules sont lavées une dernière fois, et resuspendues dans 150 µl de tampon de cytométrie. La lecture au cytomètre peut se faire jusqu'à 3 jours après la fixation des cellules.

Marquage intracellulaire intracytoplasmique de perforine et granzyme B :

Suivant un marquage préalable de marqueur de surface (voir section plus haut), au lieu de fixer les cellules dans un tampon de fixation, les cellules sont perméabilisées et fixées selon le protocole de la trousse BD *Cytotox/Cytoperm* pour marquage intracellulaire. Suivant les instructions du fournisseur, les cellules sont incubées dans 100 µl de tampon de fixation eBiosciences *Fix/Perm* (contenant 4 % paraformaldéhyde) par puits, pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans le tampon de lavage de la trousse *Perm/Wash* (contenant du SVF et de la saponine) (dilution 1/10 du stock dans de l'eau distillée). Le marquage intracellulaire de choix peut ensuite être entamé : pour granzyme B PE et perforine APC, 2,5 µl pour 5x10⁵ cellules, incubation de 30 minutes à 4°C, et les puits sont complétés à 100 µl avec le tampon de lavage de la trousse. Les cellules sont ensuite lavées dans le tampon de lavage, puis après avoir jeté le surnageant, les

cellules sont resuspendues dans du tampon de cytométrie. La lecture au cytomètre peut également se faire jusqu'à 3 jours suivants le marquage.

Étude de phénotype des récepteurs de la chaîne commune gamma des cellules en culture :

L'expression des chaînes de récepteurs des cytokines IL-2 (CD132/ γ c, CD122/IL-2R β , CD25/IL-2R α), IL-4 (CD132/ γ c, CD124/IL-4R α) et IL-7 (CD132/ γ c, CD127/IL-7R α) par les cellules primaires humaines récoltées a été évalué par marquage de surface, directement ex vivo, 24 h après activation avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28, et après 7 jours de culture cellulaire. Les anticorps anti-CD4 PeCy7, anti-CD8 α PerCP, anti-CD56 BV421, anti-TCR $\alpha\beta$ APC, anti-CD25 FITC, l'anti-CD127 A700, anti-CD122 PE, anti-CD124 PE, anti-CD132 PE, les contrôles isotypiques IgG2b,k mouse PE, IgG1,k mouse PE, IgG2a,k mouse PE, IgG2b,k rat PE, IgG1,k mouse A700, IgG1,k mouse FITC, ainsi que le marqueur live-dead Cascade yellow ont été utilisées. La lecture en cytométrie a été effectuée sur un appareil BDTM LSRII.

Étude de phénotype de récepteurs des cellules DN T humaines après 2 semaines de culture :

L'expression des marqueurs CD8 β , CD8 α , KLRG1, CD127, CD45RO, CD69, CCR7, CD160, CD95, PD-1, 2B4, Tim-3, Lag3 et la liaison au tétramère MR1 ont été étudiés sur les cellules DN T et CD8 préalablement triées et ayant subi un protocole de culture cellulaire de 15 jours. Les anticorps anti- CD8 β BV711, anti- CD8 α PerCP, anti-KLRG1 PeCy7, anti-CD127 A700, anti-CD45RO Pacific blue, anti-CD69 FITC, anti-CCR7 APC, anti-CD160 PE, anti-CD95 APC-Cy7, anti-PD-1 APC, anti-2B4 Pacific blue, anti-Tim-3 FITC, anti-Lag3 PeCy7, le tétramère MR1 PE et le marqueur de viabilité live/dead Cascade yellow ont été utilisés. La lecture en cytométrie a été effectuée sur un appareil BDTM LSRII ou sur un BDTM LSRFortessa.

Essai de cytotoxicité cellulaire pour cytométrie :

Les cellules effectrices (cellules DN T et/ou CD8) sont récoltées deux semaines après leur mise en culture, puis mises dans un tube conique de 15 ml, centrifugées à 1200 RPM pendant 7 minutes, et resuspendues dans 1 ml de milieu RPMI. Un compte cellulaire est effectué, et la solution est remise à 5×10^6 cellules/ml. Par la suite, les cellules sont distribuées dans une plaque de 96 puits à fonds V stérile afin d'avoir des puits 1X (10 μ l de suspension cellulaire, donc 5×10^4 cellules), 5X (50 μ l, $2,5 \times 10^5$ cellules) et 10X (100 μ l donc 5×10^5 cellules). Les cellules mises en plaque sont conservées à 37°C.

Parallèlement, les cellules cibles (lignées tumorales Jurkat (cellules T), NALM-1, RAJI et KMS-11 (cellules B)) sont récoltées chacune dans un tube conique de 15 ml, puis lavées et resuspendues dans du milieu RPMI frais afin d'avoir une concentration de 10^7 cellules/ml (effectuer le compte cellulaire préalablement dans 1 ml de milieu). Seulement 1 ml des nouvelles suspensions est gardé pour la suite de l'essai, le reste est utilisé pour les contrôles, et peut être gardé à 4°C. La suspension contenant les cellules Jurkat est marquée au carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), alors que les cellules Raji, Nalm et KMS-11 sont marquées avec un marqueur de prolifération cellulaire en Pacific Blue, avec une incubation de 10 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans du RPMI complet sans sérum, et mises à une concentration de 10^6 cellules/ml (10 ml de RPMI complet sans sérum). Par la suite, les cellules sont distribuées dans les puits contenant les cellules effectrices, à raison de 5×10^4 (50 µl) cellules cibles par puits (les cellules Jurkat marquées au CFSE seront mises en combinaison avec les différentes autres lignées cellulaires marquées au marqueur de prolifération cellulaire en Pacific blue). Les cellules cibles sont également mises dans des puits contrôles sans cellules effectrices, afin de pouvoir évaluer la mortalité basale des lignées cellulaires, et les cellules de surplus ou des billes de cytométrie sont utilisées pour les contrôles de cytométrie (FSC/SSC, marqueur de viabilité, intensité du CFSE et du marqueur de prolifération cellulaire en Pacific blue). Tous les puits sont complétés à 200 µl de milieu RPMI, et la plaque est incubée pendant 6h à 37°C.

À la suite de la co-culture, la plaque est centrifugée à 1100 RPM pendant 3 minutes, et le surnageant est jeté, et les cellules sont lavées 2 fois dans 150 µl de tampon de cytométrie. Par la suite, un marquage de surface est effectué avec un marqueur de viabilité de type live-dead Cascade Yellow, ainsi qu'avec un anticorps anti-CD3. Enfin, un marquage intracellulaire est effectué pour regarder la production de granzyme B et de perforine par les cellules effectrices.

Souris :

Les souris utilisées pour les xénogreffes de cellules hématopoïétiques humaines et pour la greffe de cellules KMS-11 étaient de souche NOD-*Rag1^{null} IL2rg^{null}* (NRG) étaient maintenues à l'animalerie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. L'utilisation de ces souris a été approuvée par le comité d'éthique de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, ainsi que par le Conseil canadien de protection des animaux.

Injection de cellules hématopoïétiques humaines et suivi de la survie de ces cellules en périphérie chez la souris NRG :

Par injection intraveineuse (dans la veine de la queue), 5×10^6 cellules T ou 2×10^6 cellules DN T sont injectées dans des souris NRG. Les souris contrôle reçoivent uniquement l'injection de cellules hématopoïétiques, alors que les autres reçoivent également une injection de $300 \mu\text{l}$ d'IL-15 humain (2×10^5 U/mg, Stemcell) à tous les 2-3 jours pendant les 3 semaines suivant l'injection initiale. Quatre semaines plus tard, la rate, le sang, les fémurs et les tibias des souris sont récoltés et traités pour isoler les cellules hématopoïétiques. La rate est écrasée sur un filtre de nylon $70 \mu\text{m}$, et les cellules récoltées sont traitées au NH_4Cl afin de lyser les globules rouges, puis sont lavées dans du tampon de cytométrie. La moelle osseuse est extraite des fémurs et tibias en coupant les extrémités des os, puis par centrifugation, et les cellules récoltées sont également traitées au NH_4Cl afin de lyser les globules rouges, puis lavées dans du tampon de cytométrie. Enfin, le sang, qui est récolté avec de l'EDTA afin d'empêcher la coagulation, est d'abord lavé avec du PBS, puis est également traité avec du NH_4Cl et lavé dans du tampon de cytométrie. Afin de voir si les cellules hématopoïétiques humaines ont survécu en périphérie, les cellules récoltées sont marquées avec des anticorps anti-humains : anti-CD45 Pacific Blue, anti-TCR $\alpha\beta$ APC, anti-CD8 PerCP et anti-CD4 PE-Cy7.

Xénogreffe de cellules hématopoïétiques humaines chez les souris NRG (modèle de xéno-GVHD) :

Les souris NRG sont préalablement irradiées à 2 Gy. Par injection intraveineuse, 5×10^6 cellules PBMC humaines fraîches sont injectées. Les souris contrôles reçoivent uniquement les cellules PBMCs, alors que les autres reçoivent également soit des cellules DN T ou CD8^+ humaines ayant subi une prolifération cellulaire de 15 jours, ainsi qu'une injection de $300 \mu\text{l}$ d'IL-15 humain (2×10^5 U/mg, Stemcell) à chaque 2-3 jours pendant les 3 semaines suivant l'injection de cellules humaines. Puisque l'injection de cellules PBMC humaines est connue pour causer des dommages internes chez des souris immunosupprimées, le poids et les signes cliniques sont surveillés tous les 2-3 jours. Si une souris perd 20 % de son poids initial (ou si elle rejoint les autres points limites du protocole expérimental accepté par le comité d'éthique, elle est euthanasiée.

Prélèvement et préparation des organes (Histologie pour les expériences de xéno-GVHD) :

Les souris ayant perdu 20 % ou plus de leur poids initial ou présentant des signes de xéno-GVHD (poil ébouriffé ou autres points limites) sont euthanasiées par dislocation cervicale. La souris est ensuite disséquée, afin de prélever le foie (un lobe), un poumon, et une partie de l'intestin, qui seront placés dans des cassettes d'histologie individuelles, préservées dans de la formaline. Les organes sont par la suite recouverts de paraffine, et des lames histologiques sont coupées au microtome (épaisseur de 5 μm) , et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. L'infiltration lymphocytaire dans les organes peut donc être observée au microscope.

Injection de cellules KMS-11 et suivi de la progression des tumeurs :

Des cellules provenant de la lignée cellulaire immortalisée KMS-11 ont été injectées dans des souris NRG non irradiées, à raison de 5×10^6 cellules par souris, par injection intraveineuse (veine de la queue). Une semaine plus tard, $2-4 \times 10^6$ cellules DN T ayant subi un protocole de culture cellulaire de 15 jours ont été injectées également par voie intraveineuse dans certaines souris (les souris contrôles reçoivent uniquement les cellules KMS-11). Les souris ayant reçu les cellules DN T humaines reçoivent une injection de 300 μl d'IL-15 humain (2×10^5 U/mg, Stemcell) tous les 2-3 jours pendant les 3 semaines qui suivent l'injection initiale. Au jour 7, les souris sont injectées avec de la D-luciférine (150 mg/kg), et endormie à l'isofluorane afin de pouvoir prendre une image en temps réel de l'évolution des tumeurs causées par l'injection de cellules KMS-11, grâce à un appareil IVISS révélant la bioluminescence. Le poids, l'évolution de la tumeur et des signes cliniques (ex. : paralysie des pattes postérieures) sont évalués 2 à 3 fois par semaine. Les souris sont euthanasiées cinq semaines après l'injection initiale de cellules KMS-11.

Chapitre 3 – Résultats

3.1 Analyse des populations de lymphocytes T double-négatifs chez l'humain, chez des donneurs sains ou des donneurs atteints du diabète de type 1

Les souris NOD prédisposées au diabète de type 1 ont un nombre moins élevé de cellules DN T dans les organes lymphoïdes (43). Notre premier objectif était de déterminer si les patients atteints de diabète de type 1 présentent aussi un nombre réduit de cellules DN T. Les cellules DN T ont été étudiées à l'état ex vivo après avoir été isolées à partir du sang périphérique de donneurs sains et de donneurs atteints du diabète de type 1. Pour ce faire, des cellules PBMCs ont été extraites des échantillons de sang (30 ml) grâce à un kit d'isolement SepMate, puis les cellules récoltées ont été marquées avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-TCR $\alpha\beta$ et anti-CD56 (Figure 3.1A), afin de permettre le tri cellulaire de cellules T CD4⁺, T CD8⁺ et DN T. Notons que la proportion de cellules DN T parmi les lymphocytes T totaux est d'environ 1%, tel que précédemment documenté (45). La Figure 3.1B montre la compilation du nombre de DN T obtenu tout de suite après le tri cellulaire, c'est-à-dire avant d'être mis en culture, pour chaque groupe, soit les hommes sains, les femmes saines, les hommes diabétiques et les femmes diabétiques. Au contraire des observations faites chez les souris NOD (46), aucune différence significative n'a été observée entre les nombres obtenus pour chaque catégorie de donneurs. Le ratio de cellules DN T sur le nombre de cellules PBMCs a également été calculé, afin d'illustrer la proportion de cellules DN T circulantes dans le sang périphérique pour chaque catégorie de donneurs. La Figure 3.1B montre un ratio similaire pour les témoins hommes et femmes ainsi que pour les donneurs diabétiques femmes. Le ratio obtenu pour le groupe de donneurs hommes diabétiques se distingue par une différence significative ($p < 0.05$) du ratio obtenu pour le groupe de donneurs hommes sains, étant plus élevé chez les individus atteints du diabète de type 1.

Sachant que les cellules DN T ont un potentiel immunorégulateur, notre deuxième objectif est d'établir un protocole de culture permettant de faire proliférer les cellules DN T pour en obtenir un plus grand nombre. Pour ce faire, les cellules DN T préalablement triées (Figure 3.1A) ont été activées avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 puis mises en culture, auquel ont été ajoutées à chaque passage cellulaire les cytokines suivantes : IL-2, IL-7, IL-15 et IL-1 β . Les détails du protocole de culture sont expliqués dans le chapitre 2 « Matériel et méthodes ». La Figure 3.1C

montre ainsi que l'augmentation du nombre de cellules DN T en culture est similaire, indépendamment du type de groupe de donneur d'origine. Notons qu'une expérience a mené à une augmentation très élevée du nombre de cellules (points orange). Ceci s'explique possiblement par une erreur technique. Le panneau du bas de la Figure 3.1C montre également qu'il n'y a pas de corrélation claire entre le ratio de DN T de départ et la prolifération cellulaire finale.

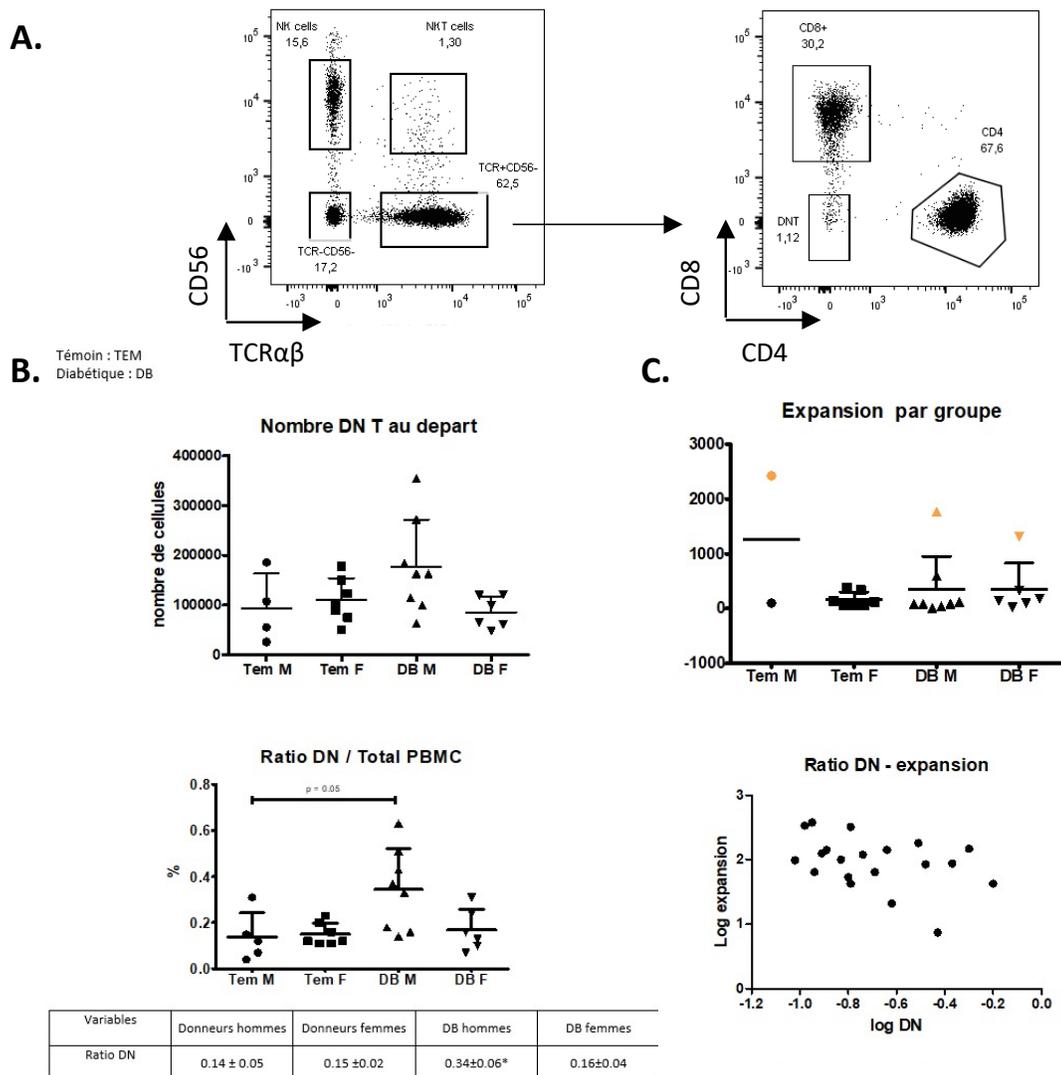


Figure 3.1 – Les cellules T double-négatives sont retrouvées en petite proportion dans le sang périphérique chez les diabétiques de type 1 et les donneurs sains et subissent le même taux de prolifération une fois en culture.

30 mL de sang ont été prélevés chez des donneurs sains ou des donneurs atteints du T1D, et les cellules T CD8⁺, T CD4⁺ et DN T ont été isolées à partir de PBMC récoltés à partir d'échantillons de sang grâce à la stratégie de sélection électronique (A). Le nombre de cellules DN T récoltées au départ (avant d'être mises en culture) ainsi que le ratio de cellules DN T sur le total de PBMCs ont été calculés pour chaque groupe de donneurs, soit les donneurs hommes sains, donneurs hommes diabétiques de type 1, donneuses femmes saines et donneuses femmes diabétiques de type 1 (B). Le nombre de cellules DN T 15 jours après la mise en culture a également été comptabilisé pour chaque groupe de donneur, et le deuxième tableau présente un graphique de corrélation entre le ratio du nombre de cellules DN T au départ et à la fin de la culture (C).

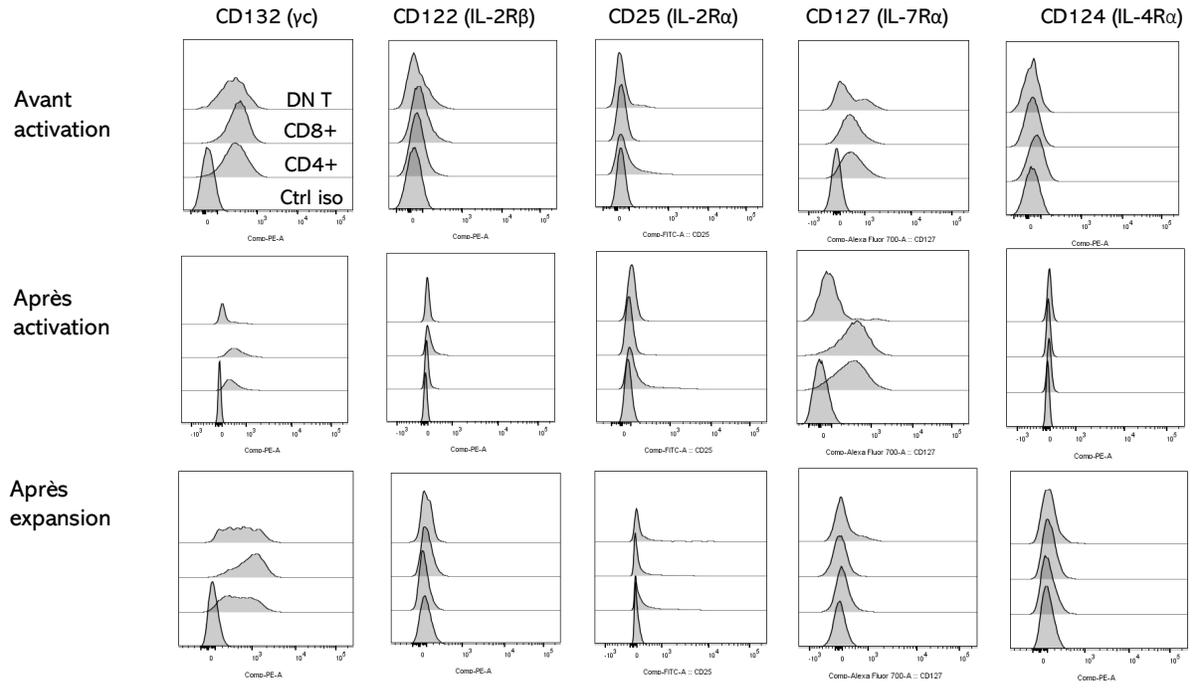
3.2 Analyse phénotypique de l'expression de récepteurs de la chaîne commune gamma par les lymphocytes T double-négatifs chez l'humain

Puisque peu était connu sur l'expression de divers marqueurs exprimés à la surface des cellules DN T humaines, il s'est avéré intéressant d'examiner si ces cellules expriment à leur surface les récepteurs de la chaîne commune gamma, soit les récepteurs de l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-7, cytokines communément utilisées dans la culture cellulaire de lymphocytes T. Ainsi, pour cette expérience, des cellules T ont été sélectionnées à partir de PBMCs isolés d'échantillons de sang provenant de donneurs sains. Grâce aux mêmes marqueurs de sélection utilisés à la Figure 3.1A et à la même stratégie de sélection électronique pour identifier nos populations cellulaires d'intérêt (soit les T CD4⁺, les T CD8⁺ et les DN T) afin d'étudier leur expression des chaînes de récepteurs suivants : CD132 (γ_c), CD122 (IL-2R β), CD25 (IL-2R α), CD127 (IL-7R α) et CD124 (IL-R4 α). L'expression de ceux-ci a été étudiée à l'état ex vivo, 24h après l'activation par de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 et après 7 jours de culture cellulaire. Durant la culture cellulaire, de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IL-7 ont été rajoutés à chaque passage cellulaire/changement de milieu.

La Figure 3.2A montre grâce à des histogrammes l'expression représentative de chacun des marqueurs pour chaque point dans le temps (ex vivo, 24h et 7 jours en culture) et ce pour chaque population cellulaire. Ces résultats montrent les données pour un donneur type. Un contrôle isotypique a été utilisé pour chacun des marqueurs, afin de pouvoir distinguer les signaux impliquant une expression des marqueurs et le bruit de fond. La Figure 3.2B montre la compilation

de l'expression des récepteurs mesurée en *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) obtenue pour les populations cellulaires T CD4⁺, T CD8⁺ et DN T provenant de 8 donneurs sains (5 hommes, 3 femmes). Tout d'abord, en se référant au signal de bruit de fond des contrôles isotypiques, il est possible de voir qu'avant d'être activées, les trois populations cellulaires étudiées expriment CD132 et CD127, alors que seule la population des T CD4⁺ exprime de faibles niveaux de CD124 et CD25, et seule la population des cellules DN T exprime de faibles niveaux de CD122. Par la suite, après avoir été activées par stimulation avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28, il semble que les trois populations cellulaires ont augmenté leur expression de CD132 et de CD25 (à noter que CD25 n'est pas seulement un marqueur de cellules T CD4 Tregs, mais également un marqueur d'activation (176), mais ont diminué leur expression de CD127 par rapport aux niveaux observés avant activation. Toutefois, seules les cellules DN T expriment de faibles niveaux de CD122 et aucune des trois populations cellulaires n'exprimait CD124 de façon significative après activation cellulaire. Enfin, après une culture cellulaire de 7 jours, il est possible d'observer une autre augmentation dans l'expression de CD132 comparés aux niveaux observés précédemment pour les trois populations cellulaires, ainsi qu'un niveau d'expression stable de CD25 comparé à celui observé après activation cellulaire. Après la culture de 7 jours, seules les cellules T CD4⁺ expriment encore de façon significative CD127, mais on observe tout de même une baisse significative de l'expression de ce marqueur pour les trois populations cellulaires par rapport au niveau mesuré à 24h. Ce résultat était attendu puisque l'ajout de la cytokine IL-7 diminue l'expression de son récepteur à la surface des cellules (177). Aucune des trois populations cellulaires à l'étude ne semblait exprimer CD122 ou CD124 suite à leur prolifération cellulaire. À la lumière de ces résultats, les cellules DN T exprimeraient à leur surface les chaînes des récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-7, dépendamment de leur niveau d'activation, ce qui suggère qu'elles répondent à ces 2 cytokines en culture.

A.



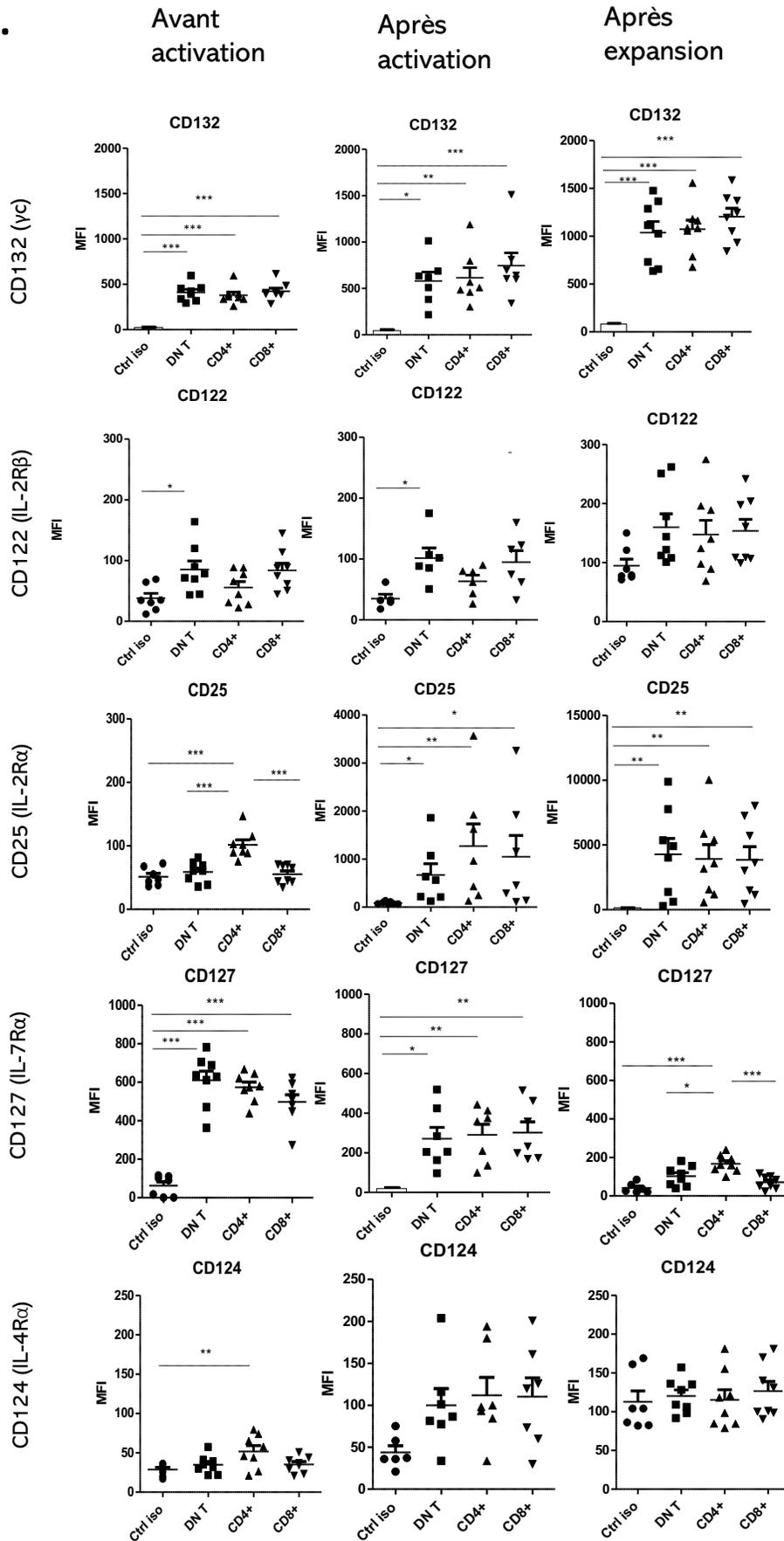
B.

Figure 3.2 – Les cellules DN T expriment les chaînes des récepteurs de l'IL-2 après et l'IL-7 lors de l'activation et de la prolifération cellulaire de façon similaire aux cellules T CD8⁺.

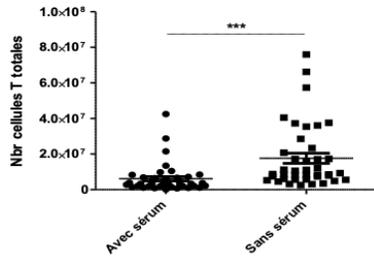
Les cellules ex vivo, provenant de PBMC récoltés la journée même, ont été marquées par un marqueur de viabilité pour identifier les cellules vivantes (non-montré), puis marquées par les marqueurs de surface caractéristiques des cellules T (TCR $\alpha\beta$ +CD56-), et enfin par les marqueurs CD4 et CD8 afin d'isoler les populations d'intérêt, soit les cellules T CD4⁺, T CD8⁺ ou T double-négatives (DN T) par cytométrie en flux. L'expression des marqueurs CD132 (γc), CD25 (IL-2R α), CD122 (IL-2R β), CD127 (IL-7R α), CD124 (IL-4R α) a été évaluée par cytométrie en flux, sur les populations cellulaires T CD4⁺, T CD8⁺ et DN T à l'état ex vivo, après activation avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28, et après avoir été culture cellulaire 7 jours dans un milieu RPMI supplémenté de sérum humain et de cytokines IL-2, IL-4 et IL-7. L'expression des marqueurs est comparée à celle de contrôles isotypiques (A). Les valeurs en MFI d'expression des récepteurs (sur les populations pour les conditions mentionnées en B) ont été compilées à partir des données obtenues de 8 donneurs différents (5 hommes et 3 femmes) (B). Les données ont été analysées avec une ANOVA, exceptées celles dont l'homogénéité était inégale, qui ont été analysées en non paramétrique.

3.3 Optimisation des conditions de culture cellulaire in vitro pour les lymphocytes T double-négatifs chez l'humain

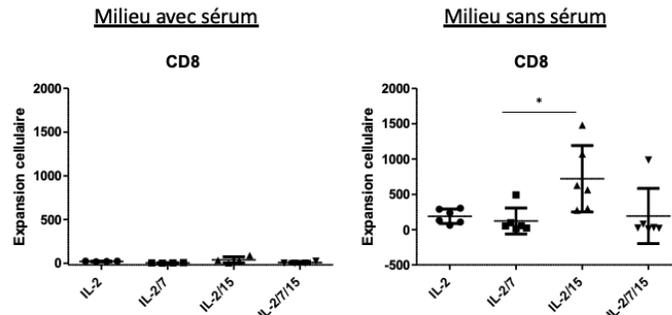
Comme il a été montré dans la Figure 3.1 et dans la littérature, les cellules DN T circulent en très petite proportion dans le sang périphérique chez l'humain. Afin d'être en mesure d'étudier le phénotype et la fonction de cette population cellulaire, il était important d'optimiser un protocole de culture cellulaire adapté à celle-ci. Dans un premier temps, différents milieux de culture cellulaire ont été essayés pour la culture de cellules T totales, soit un milieu RPMI supplémenté de sérum humain désactivé (10%) et un milieu de culture de cellules T ImmunoCultTM-XF de STEMCELL Technologies. Les deux milieux étaient supplémentés avec 1 % de streptomycine/pénicilline. Puisque le but de cette étude est de développer un protocole de culture cellulaire adapté aux besoins cliniques et thérapeutiques, il était important de considérer que l'utilisation du sérum n'est pas adaptée aux protocoles de cultures de thérapies cellulaires. Ainsi, l'utilisation d'un milieu sans sérum pourrait éventuellement favoriser la transition en clinique de notre protocole. Dans la Figure 3.3, le premier milieu est référé en tant que milieu avec sérum, alors que le deuxième est référé en tant que milieu sans sérum. Toutes les cellules ont préalablement été activées avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28. Il est possible de voir à la Figure 3.3A une différence significative entre le nombre de cellules T obtenues à la suite de la prolifération cellulaire dans le milieu sans sérum versus le milieu traditionnel contenant du sérum. En prenant

en considération le fait que les cellules DN T expriment de façon similaire aux cellules T CD8⁺ les récepteurs des cytokines IL-2 et IL-7 en culture cellulaire (voir Figure 3.2), nous avons décidé de tester différentes combinaisons de cytokines pour la culture de cellules T CD8⁺, puisque ces dernières sont retrouvées en bien plus grand nombre dans le sang périphérique des humains. Nous avons choisi également de tester la cytokine IL-15, souvent utilisée dans la littérature pour la culture cellulaire (178). Comme il est possible de voir à la Figure 3.3B, l'ajout de la cytokine IL-15 a permis une prolifération cellulaire plus importante qu'en son absence. De plus, encore une fois, la prolifération cellulaire était grandement supérieure en utilisant le milieu sans sérum. En changeant un peu de stratégie, nous avons décidé de mettre en culture des cellules PBMC totales, qui seraient activées avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28, permettant sélectivement aux cellules T de poursuivre leur prolifération in vitro. Nous avons testé les deux types de milieux avec les combinaisons de cytokines suivantes : IL-2; IL-2 et IL-4; IL-2 et IL-7; IL-2 et IL-15; IL-2, IL4 et IL-7; IL-2, IL-7 et IL-15; IL-2, IL-15, IL-1 β ; IL-2, IL-7, IL-15 et IL1 β . Le but était de mesurer par cytométrie en flux les proportions et nombres absolus des populations cellulaires T CD4⁺, T CD8⁺ et DN T qui seraient générés à la suite de deux semaines de culture cellulaire. Nous avons rajouté l'IL-1 β car cette cytokine était utilisée dans la littérature pour la culture cellulaire de cellules DN T humaines (45, 62). Comme il est possible de voir à la Figure 3.3C, les proportions et nombres absolus obtenus pour les cellules DN T étaient beaucoup plus bas que pour les deux autres populations cellulaires. Puisque les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ étaient plus nombreuses au départ, elles ont probablement eu la possibilité de consommer de façon plus importante les ressources disponibles dans le milieu de culture supplémenté de cytokines. Les différences observées entre les différentes combinaisons de cytokines étaient plus visibles pour les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺. Puisque le but était de développer un protocole de culture cellulaire favorisant la prolifération et la survie des cellules DN T, nous avons choisi de tester quelques-unes des conditions précédentes (IL-2, IL-7, IL-15 et IL-1 β uniquement dans du milieu sans sérum) sur nos cellules d'intérêt triées. Comme il est possible de voir sur les résultats préliminaires de la Figure 3.4D, l'augmentation du nombre de cellules DN T humaines est optimale dans un milieu RPMI sans sérum en présence des cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-1 β . À partir de ces résultats, nous avons poursuivi toutes nos expériences subséquentes en utilisant ce protocole de culture cellulaire optimisé pour étudier les cellules DN T humaines.

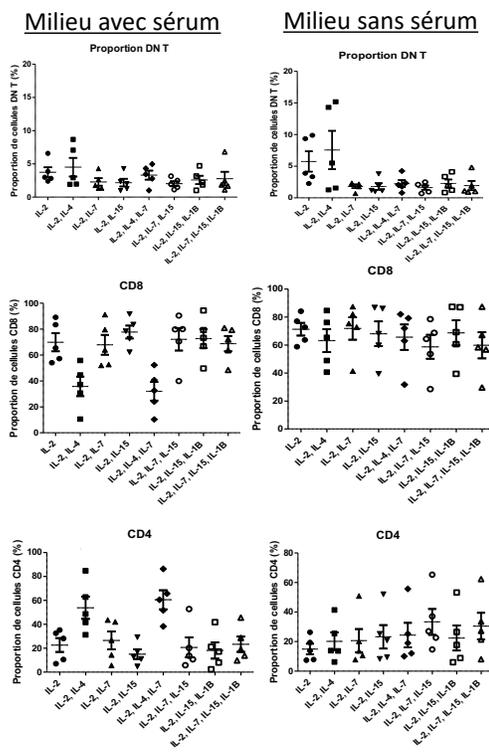
A. Nombre de cellules T totales obtenues selon le milieu de culture



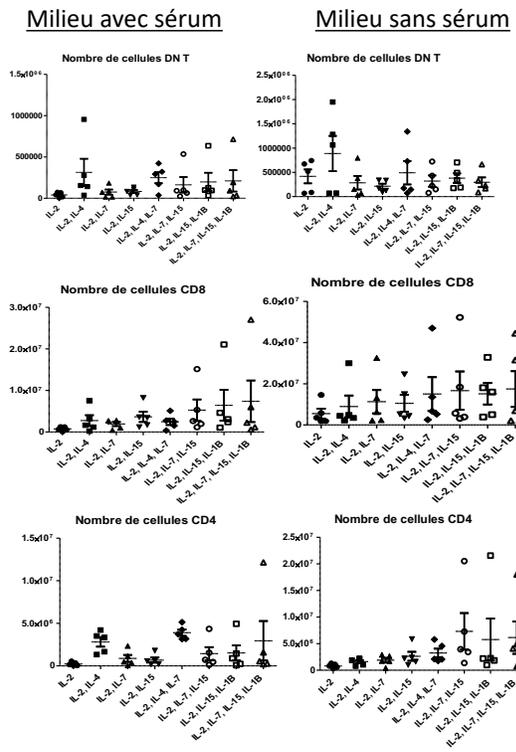
B. Expansion cellulaire chez les cellules T CD8+



C. Proportion



Nombre total



D. Expansion cellulaire chez les cellules DN T

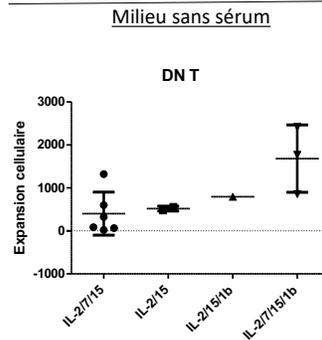


Figure 3.3 – L’augmentation du nombre de cellules DN T humaines est optimale dans un milieu RPMI sans sérum en présence des cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-1 β .

Différentes conditions de culture (milieu RPMI avec et sans sérum, différentes combinaisons des cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 et IL-1 β) ont été étudiées sur des cellules PBMCs totales, des cellules T totales, des cellules T CD8⁺ triées et des cellules DN T triées, afin de pouvoir développer un protocole de culture cellulaire optimisé. Toutes les cellules ont été préalablement activées avec de l’anti-CD3 et de l’anti-CD28. Les nombres de cellules T totales obtenues pour le milieu avec sérum ont été compilés et comparés avec ceux obtenus avec le milieu sans sérum (A). Les combinaisons de cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 ont été testées dans un milieu avec ou sans sérum pour la culture de cellules T CD8⁺ triées (B). Les combinaisons de cytokines IL-2; IL-2 et IL-4; IL-2 et IL-7; IL-2 et IL-15; IL-2, IL4 et IL-7; IL-2, IL-7 et IL-15; IL-2, IL-15, IL-1 β ; IL-2, IL-7, IL-15 et IL1 β ont été testées sur des PBMCs totaux mis en culture, dans un milieu avec sérum ou dans un milieu sans sérum (C). Les combinaisons de cytokines IL-2, IL-7, IL-15 et IL-1 β ont été testées sur des cellules DN T triées dans du milieu sans sérum.

3.4 Analyse phénotypique des cellules DN T humaines ayant subi le protocole de culture cellulaire permettant une augmentation optimale du nombre de cellules

Puisque cette étude préclinique des cellules DN T vise éventuellement la possibilité de développer une thérapie cellulaire à base de ces dernières, il était important d’effectuer une analyse phénotypique à la suite de leur prolifération cellulaire. Nous nous sommes donc penchés sur différents types de marqueurs cellulaires afin de mieux évaluer leur statut fonctionnel. Ces analyses ont donc été effectuées sur des cellules DN T et des cellules T CD8⁺ qui avaient préalablement été triées puis mises en culture pendant 2 semaines suivant notre protocole de culture optimisé. Nous avons d’abord voulu étudier comment le phénotype de ces deux populations cellulaires provenant de donneurs sains se comparait au phénotype des cellules provenant de donneurs diabétiques. Par la suite, nous avons voulu comparer le phénotype des cellules DN T à celui des cellules T CD8⁺ au sein de chaque catégorie de donneurs, puisque ce sont deux types cellulaires qui se ressemblent au niveau phénotypique et fonctionnel.

Dans un premier temps, les marqueurs de mémoire cellulaire CCR7, CD45RO et CD127 ont été étudiés. Les histogrammes de cytométrie en flux sur la Figure 3.4A montrent l’expression représentative de chacun des marqueurs, ainsi que la stratégie de sélection électronique permettant d’identifier les cellules positives pour le marqueur. Ainsi, il a été possible de faire une compilation

des proportions de cellules DN T ou T CD8⁺ étant positives pour le marqueur étudié suite à une prolifération in vitro de deux semaines. La Figure 3.4B montre la comparaison entre l'expression des marqueurs de mémoire cellulaire par les cellules provenant de donneurs sains et celles provenant des donneurs diabétiques (à gauche pour les cellules DN T et à droite pour les cellules T CD8⁺). D'abord, les cellules DN T expriment de façon faible à moyenne CCR7 (marqueur de cellule T mémoire centrale), peu importe si elles proviennent de donneurs sains ou de donneurs diabétiques. Les cellules T CD8⁺ semblent exprimer davantage CCR7 lorsqu'elles proviennent de donneurs diabétiques bien que cette différence ne soit pas significative. Ensuite, pour ce qui en est du marqueur CD45RO (marqueur associé aux cellules T effectrices mémoire), les cellules DN T provenant de donneurs diabétiques semblent exprimer davantage ce dernier que les cellules provenant de donneurs sains, alors qu'il ne semble pas vraiment y avoir de différence entre les cellules T CD8⁺ des deux groupes de donneurs. Enfin, les cellules DN T n'expriment pas ou faiblement le marqueur CD127, qui est associé aux cellules T mémoire centrale, peu importe la provenance des cellules. Ce marqueur, vu également à la Figure 3.2, est également connu comme la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7, et sa faible expression à la suite de deux semaines de culture cellulaire in vitro concorde avec les résultats montrés plus tôt dans ce chapitre. Les cellules T CD8⁺ expriment également faiblement ce marqueur, peu importe le type de donneur.

La Figure 3.4C montre les mêmes compilations de données qu'à la Figure 3.4B, mais cette fois-ci, en comparant l'expression des marqueurs entre les cellules DN T et T CD8⁺ au sein d'un même groupe de donneur, soit les donneurs sains ou les donneurs diabétiques. En premier lieu, il est possible de voir que chez les donneurs diabétiques, les cellules T CD8⁺ expriment davantage le marqueur CCR7 que les cellules DN T, alors que chez les donneurs sains, les deux types cellulaires expriment de façon similaire le marqueur. En deuxième lieu, encore chez les donneurs diabétiques, il est possible de voir que les cellules DN T expriment davantage CD45RO que les cellules T CD8⁺. Cette différence d'expression entre les deux populations cellulaires n'est pas représentée chez les donneurs sains. En dernier lieu, aucune différence significative n'est observable entre les deux populations cellulaires pour l'expression de CD127, peu importe le groupe de donneurs.

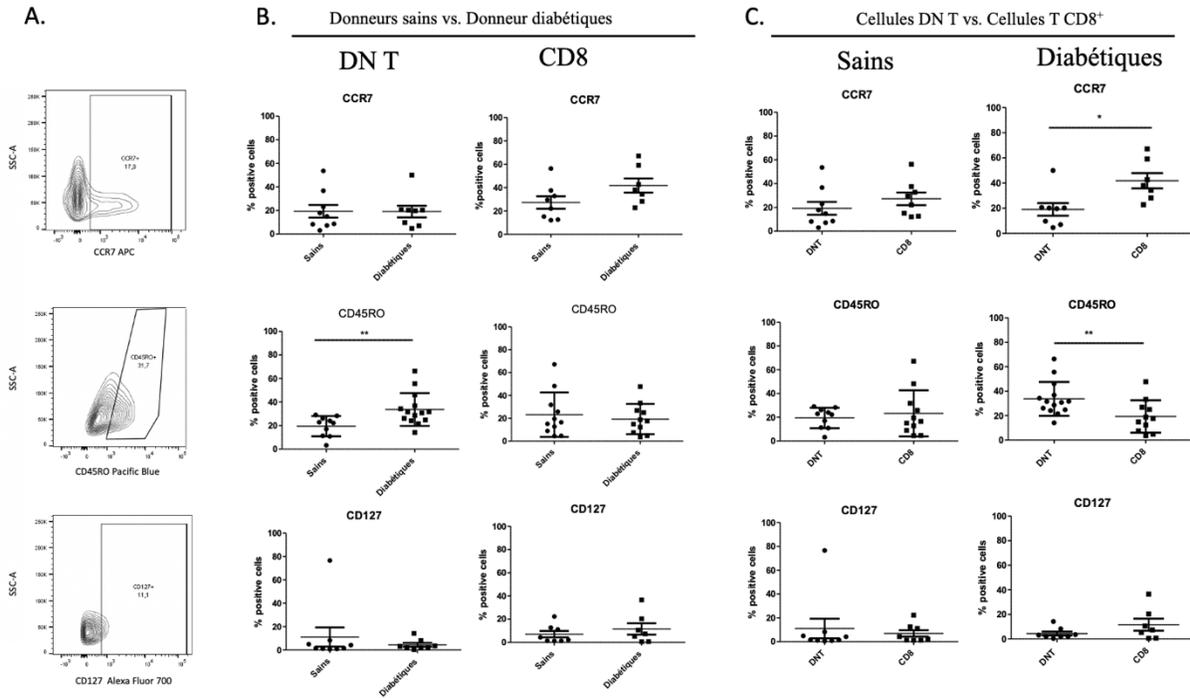


Figure 3.4 – Les cellules DN T expriment les marqueurs de mémoire CD45RO et CCR7 de façon différente des cellules T CD8⁺, et leur expression de CD45RO varie selon si elles proviennent de donneurs sains ou diabétiques.

L'expression représentative des marqueurs cellulaires de mémoire CCR7, CD45RO et CD127 sur histogramme de cytométrie en flux permet de montrer la stratégie de sélection électronique des cellules positives pour chaque marqueur (A). La compilation de la proportion de cellules positives pour chaque marqueur provenant de donneurs sains est comparée à celles provenant des donneurs diabétiques, pour les cellules DN T et pour les cellules T CD8⁺ qui ont été mises en culture pendant 2 semaines (B). La compilation de la proportion de cellules DN positives pour chaque marqueur est comparée à celles des cellules T CD8⁺, et ces résultats sont montrés pour les cellules provenant de donneurs sains, puis de donneurs diabétiques (C). Les données ont été analysées avec une analyse Mann-Whitney pour le panneau B et par un t-test païré pour le panneau C.

Nous avons par la suite choisi d'étudier l'expression des marqueurs d'activation CD69, KLRG1 et CD160 sur les mêmes populations cellulaires qu'à la Figure 3.4, toujours provenant soit de donneurs sains ou diabétiques. La Figure 3.5A montre l'expression représentative de chacun des marqueurs, ainsi que la stratégie de sélection électronique permettant d'identifier les cellules positives pour le marqueur. Les compilations sont montrées dans les deux panneaux suivants. La Figure 3.5B montre donc la comparaison de l'expression des marqueurs entre les cellules provenant

de donneurs sains et diabétiques. Ainsi, il est possible de voir que les cellules DN T provenant des deux types de donneurs expriment CD69, un marqueur d'activation cellulaire, suite à notre protocole de culture. Les cellules DN T expriment plus faiblement KLRG1 (marqueur associé aux cellules T effectrices de courte vie) et CD160 (marqueur associé à certaines cellules T CD8⁺ cytotoxiques). L'expression de ces trois marqueurs d'activation ne varie pas selon l'état de santé du donneur. L'expression de ces marqueurs ne varie pas non plus pour les cellules T CD8⁺ selon si elles proviennent de donneurs sains ou diabétiques. La Figure 3.5C montre que les cellules DN T expriment davantage le marqueur d'activation CD69 que les cellules T CD8⁺ lorsqu'on regarde au sein des deux groupes de donneurs. Les cellules DN T provenant des donneurs diabétiques expriment davantage le marqueur KLRG1 que les cellules T CD8⁺ du même groupe, mais cette différence n'est pas observée chez les donneurs sains. Il n'y a pas de différence significative entre l'expression de CD160 entre les deux populations cellulaires, peu importe le groupe étudié.

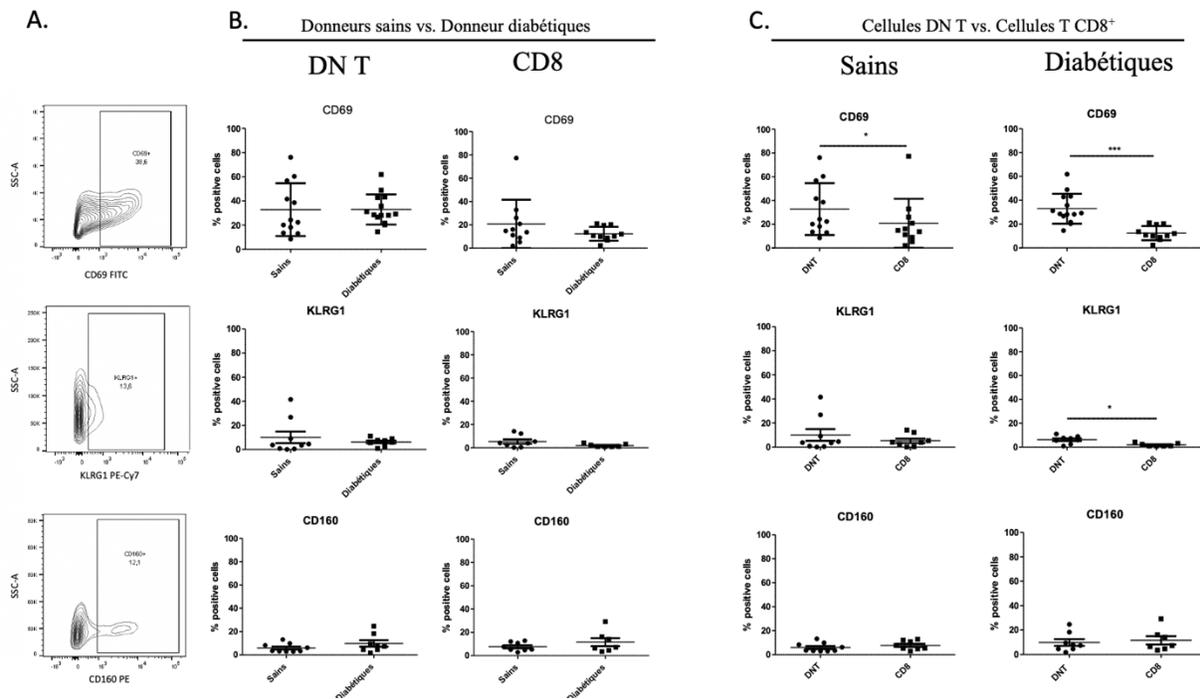


Figure 3.5 – Les cellules DN T expriment davantage le marqueur d'activation CD69 que les cellules T CD8⁺ suite à leur activation et leur prolifération in vitro, et expriment faiblement les marqueurs KLRG1 et CD160.

L'expression représentative des marqueurs d'activation cellulaire CD69, KLRG1 et CD160 sur histogramme de cytométrie en flux permet de montrer la stratégie de sélection électronique des cellules positives pour chaque marqueur (A). La compilation de la proportion de cellules positives pour chaque marqueur provenant de donneurs sains est comparée à celles provenant des donneurs diabétiques, pour les cellules DN T et pour les cellules T CD8⁺ qui ont été mises en culture pendant 2 semaines (B). La compilation de la proportion de cellules DN positives pour chaque marqueur est comparée à celles des cellules T CD8⁺, et ces résultats sont montrés pour les cellules provenant de donneurs sains, puis de donneurs diabétiques (C). Les données ont été analysées avec une analyse Mann-Whitney pour le panneau B et par un t-test pairé pour le panneau C.

Nous avons par la suite choisi d'étudier l'expression des marqueurs d'épuisement 2B4, Tim-3, PD-1 et Lag3, toujours sur les mêmes populations cellulaires étudiées dans les deux figures précédentes, et toujours provenant soit de donneurs sains ou diabétiques. La Figure 3.6A montre l'expression représentative de chacun des marqueurs, ainsi que la stratégie de sélection électronique permettant d'identifier les cellules positives pour le marqueur. Les compilations sont montrées dans les deux panneaux suivants. La Figure 3.6B montre donc la comparaison de l'expression des marqueurs entre les cellules provenant de donneurs sains et diabétiques. Ainsi, il est possible de voir qu'après avoir suivi notre protocole d'activation et de culture cellulaire, les cellules DN T provenant des deux types de donneurs expriment faiblement les marqueurs d'épuisement 2B4, Tim-3 et PD-1. Davantage de variabilité au sein de chacun des deux groupes de donneurs peut être observée pour les niveaux d'expression de Lag3, à la fois pour les cellules DN T et les cellules T CD8⁺. Toutefois, aucune différence significative entre les niveaux d'expression des marqueurs n'est observée lorsqu'on compare les cellules provenant des donneurs sains ou diabétiques, et ce à la fois pour les cellules DN T et pour les cellules T CD8⁺. La Figure 3.6C montre que pour le groupe de donneurs sains, les cellules T CD8⁺ expriment davantage les marqueurs 2B4 et Lag3 que les cellules DN T. Cette différence d'expression entre les deux types de cellules n'est pas observée dans le groupe de donneurs diabétiques. Dans le groupe des donneurs diabétiques, une expression plus élevée de PD-1 est observée chez les cellules DN T par rapport aux cellules T CD8⁺. Ceci n'est pas observé au sein du groupe des donneurs sains. Aucune différence d'expression significative de Tim-3 n'est observée pour les deux populations cellulaires, peu importe le groupe étudié.

À la lumière des résultats illustrés aux Figures 3.5 et 3.6, il est possible de voir que les cellules DN T triées et ayant subi notre protocole de culture cellulaire expriment à leur surface des molécules classiques d'activation telles que CD69. De plus, bien qu'elles expriment également, de façon plus faible, certains marqueurs associés dans la littérature à l'épuisement cellulaire, il est important de mentionner qu'un certain niveau d'expression de molécules telles que Lag3 ou PD-1 est attendue chez des cellules activées (179), et n'indique pas que les cellules DN T seraient moins fonctionnelles après notre protocole de culture.

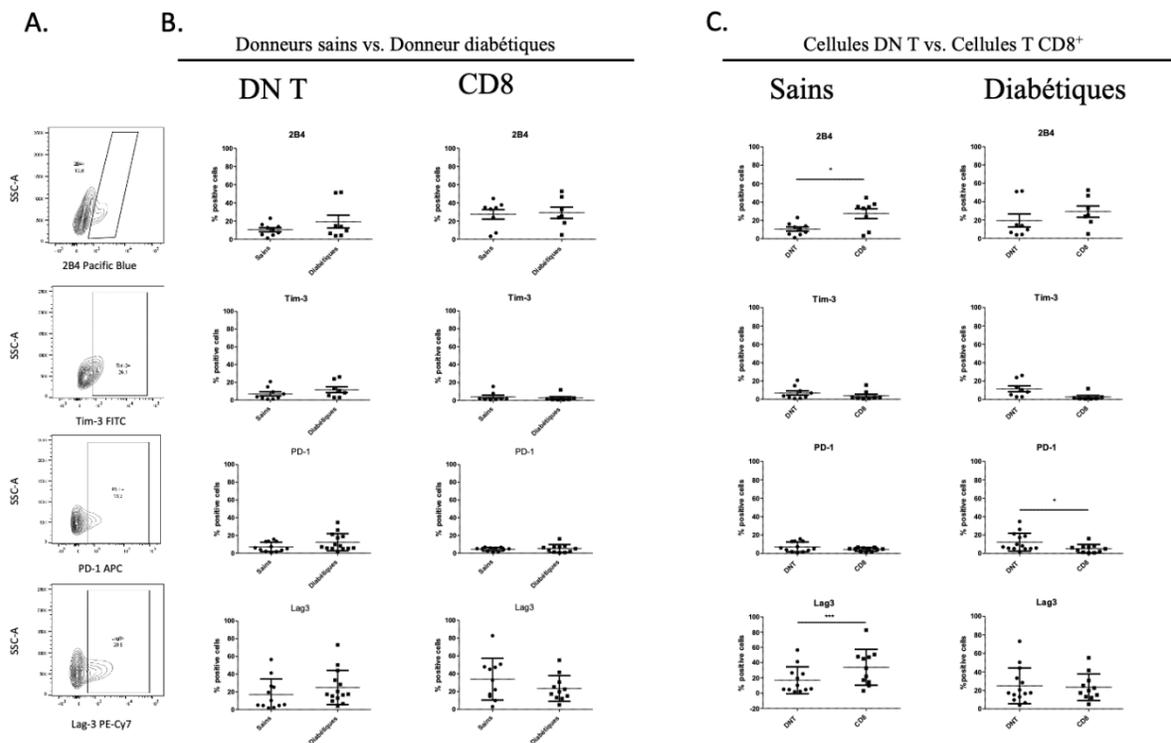


Figure 3.6 – Suite à leur activation et à leur prolifération in vitro, les cellules DN T expriment en faible proportion les marqueurs d'épuisement 2B4, Tim-3 et PD-1, et expriment de façon variable le marqueur Lag3.

L'expression représentative des marqueurs d'épuisement cellulaire 2B4, Tim-3, PD-1 et Lag3 sur histogramme de cytométrie en flux permet de montrer la stratégie de sélection électronique des cellules positives pour chaque marqueur (A). La compilation de la proportion de cellules positives pour chaque marqueur provenant de donneurs sains est comparée à celles provenant des donneurs diabétiques, pour les cellules DN T et pour les cellules T CD8⁺ qui ont été

prises en culture pendant 2 semaines (B). La compilation de la proportion de cellules DN positives pour chaque marqueur est comparée à celles des cellules T CD8+, et ces résultats sont montrés pour les cellules provenant de donneurs sains, puis de donneurs diabétiques (C). Les données ont été analysées avec une analyse Mann-Whitney pour le panneau B et par un t-test païré pour le panneau C.

Toujours dans le but de mieux caractériser le phénotype des cellules DN T chez l'humain, nous avons également étudié l'expression du marqueur CD8 α sur les cellules ayant subi le protocole d'activation et de culture cellulaire. La Figure 3.7A montre l'expression représentative de chacun des marqueurs, ainsi que la stratégie de sélection électronique permettant d'identifier les cellules positives pour le marqueur. Les compilations sont montrées dans les deux panneaux suivants. La Figure 3.7B montre donc la comparaison de l'expression des marqueurs entre les cellules provenant de donneurs sains et diabétiques. Ainsi, il est possible de voir qu'après avoir suivi notre protocole de culture, les cellules DN T expriment de façon variable le marqueur CD8 α , et ce peu importe le groupe de donneur. Les cellules T CD8+ expriment de façon très élevée le marqueur CD8 α peu importe le type donneur, ce qui était attendu. La Figure 3.7C montre qu'au sein de chacun des deux groupes, les cellules T CD8+ ont des niveaux significativement plus élevés du marqueur CD8 α comparé aux cellules DN T, ce qui était également attendu. Il est important de mentionner que le marqueur CD8 α , associé de façon justifiée à la population des lymphocytes T cytotoxique CD8+, est également exprimé par d'autres populations cellulaires avec une fonction cytolytique, telles que les cellules NK et les cellules T non-restreintes au CMH (180).

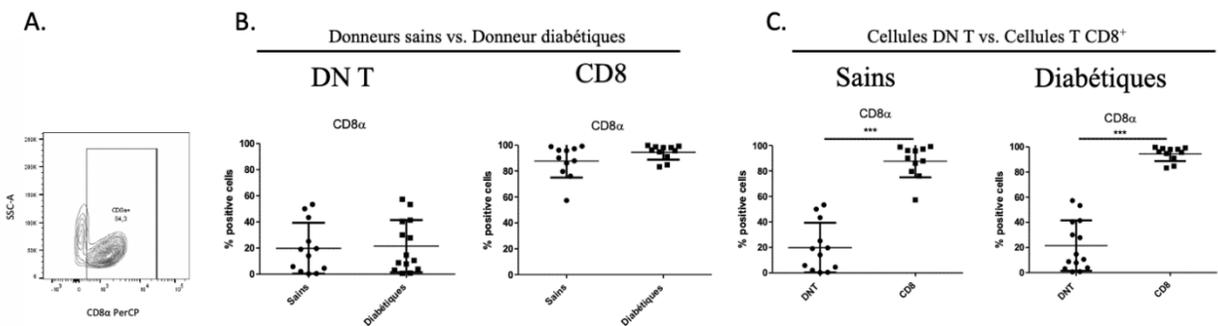


Figure 3.7 – Les cellules DN T expriment de façon variable le marqueur CD8 α suite à la culture in vitro.

L'expression représentative du marqueur CD8 α sur histogramme de cytométrie en flux permet de montrer la stratégie de sélection électronique des cellules positives pour le marqueur (A). La compilation de la proportion de cellules positives pour chaque marqueur provenant de donneurs sains est comparée à celles provenant des donneurs diabétiques, pour les cellules DN T et pour les cellules T CD8 $^{+}$ qui ont été mises en culture pendant 2 semaines (B). La compilation de la proportion de cellules DN positives pour chaque marqueur est comparée à celles des cellules T CD8 $^{+}$, et ces résultats sont montrés pour les cellules provenant de donneurs sains, puis de donneurs diabétiques (C). Les données ont été analysées avec une analyse Mann-Whitney pour le panneau B et par un t-test païré pour le panneau C.

Finalement, puisque les cellules DN T sont un sous-type de lymphocytes T non conventionnels, qui ne peuvent être pour l'instant sélectionnés de façon positive, nous avons voulu nous assurer que nous n'étions pas en train d'étudier une autre population cellulaire non conventionnelle déjà caractérisée, soit les *Mucosal Associated Invariant (MAIT) cells*. Ces cellules sont définies entre autres par leur reconnaissance de la molécule de CMH de classe 1 non polymorphique MR1, qui est hautement conservée chez les mammifères (181). Comme il est possible de voir à la Figure 3.8B, les niveaux de la reconnaissance du marqueur MR1 sont très bas pour les cellules DN T et pour les cellules T CD8 $^{+}$, peu importe l'état de santé du donneur. Il est possible de noter qu'une expression plus élevée de reconnaissance du marqueur MR1 est observée pour les cellules DN T comparé aux cellules T CD8 $^{+}$ chez les donneurs diabétiques. Cette différence semble être due à deux valeurs approchant les 20 % pour deux donneurs diabétiques. Il est possible que certains patients présentent un nombre plus élevé de cellules MAIT. Ceci devra être pris en considération dans la suite des travaux.

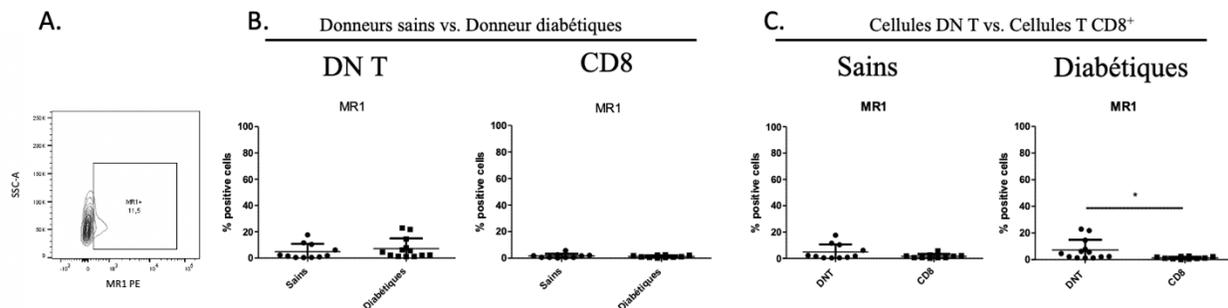


Figure 3.8 –La proportion de cellules MAIT parmi les cellules DN T est faible, mais semble présente chez certains donneurs diabétiques.

L'expression représentative du marqueur MR1 sur histogramme de cytométrie en flux permet de montrer la stratégie de sélection électronique des cellules positives pour le marqueur (A). La compilation de la proportion de cellules positives pour chaque marqueur provenant de donneurs sains est comparée à celles provenant des donneurs diabétiques, pour les cellules DN T et pour les cellules T CD8⁺ qui ont été mises en culture pendant 2 semaines (B). La compilation de la proportion de cellules DN positives pour chaque marqueur est comparée à celles des cellules T CD8⁺, et ces résultats sont montrés pour les cellules provenant de donneurs sains, puis de donneurs diabétiques (C). Les données ont été analysées avec une analyse Mann-Whitney pour le panneau B et par un t-test païré pour le panneau C.

3.5 Analyse du potentiel cytotoxique in vitro des lymphocytes T double-négatifs humain ayant subi le protocole de culture cellulaire optimisé envers des lignées tumorales

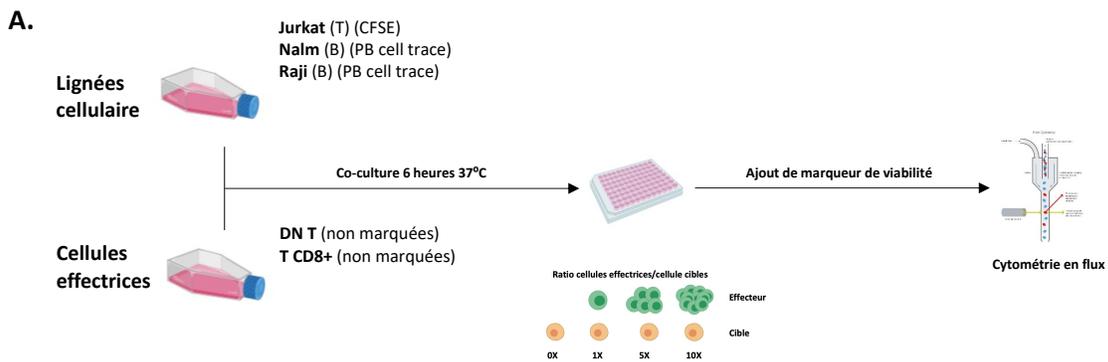
Après avoir déterminé par analyse phénotypique que les cellules DN T triées et ayant subi notre protocole de culture étaient bel et bien activées (positives pour CD69) et ne montraient pas de phénotype significatif d'épuisement, nous nous sommes penchés sur leur fonction. Selon la littérature, les cellules DN T, murines ou humaines, ciblent différents types cellulaires. Ainsi, nous avons voulu évaluer le potentiel cytotoxique in vitro des cellules DN T humaines activées et ayant subi un protocole de culture cellulaire en utilisant comme cibles des lignées cellulaires tumorales : la lignée Jurkat (lymphocyte T de leucémie aiguë), la lignée Nalm (lymphocytes B précurseurs de leucémie) et la lignée Raji (lymphocytes B du lymphome de Burkitt). La méthodologie de l'expérience est détaillée dans la Figure 3.9A. Les cellules de lignées cellulaires ont préalablement été marquées soit au CFSE pour les Jurkat, ou au cell trace en Pacific Blue pour les cellules Nalm ou Raji. Ces cellules ont été mises en co-culture à 37°C avec des cellules effectrices, soit nos cellules DN T d'intérêt ou des cellules T CD8⁺ servant de contrôle cellulaire cytotoxique, en différents ratios cellules effectrices sur cellules cibles; 0X (aucune cellule effectrice), 1X (ratio égal), 5X (5 fois plus de cellules effectrices) ou 10X (10 fois plus de cellules effectrices). Après 6 heures d'incubation, l'ajout d'un marqueur de viabilité en cascade yellow a permis de déterminer le ratio de cellules vivantes et mortes dans chaque puits par cytométrie en flux, et l'ajout de marqueurs intracellulaires anti-granzyme et anti-perforine a permis d'évaluer le niveau de production de ces granules cytotoxiques par les cellules effectrices. La Figure 3.9B montre la stratégie de sélection électronique ayant permis de déterminer les ratios de cellules mortes pour chaque lignée tumorale, selon le ratio de cellules effectrices sur cellules cibles mises en co-culture. Dans cet exemple représentatif, où les cellules effectrices étaient des cellules DN T ciblant des

cellules de la lignée Raji, il est possible de voir le ratio de mortalité des cellules cibles augmenter au fur et à mesure que la proportion de cellules DN T augmente. La compilation des ratios de mortalité des cibles obtenue pour chacune des combinaisons de cellules effectrice et de cellules cibles est montrée dans la Figure 3.9C et en 3.9D. Puisque les cellules effectrices provenaient soit de donneurs sains ou de donneurs diabétiques, il était intéressant de comparer les compilations obtenues selon l'origine des cellules (Figure 3.9C). Il est possible d'observer une tendance à l'augmentation du ratio de mortalité des cellules cibles, peu importe le type d'effecteur ou l'état de santé du donneur, suggérant que les cellules DN T sont capables de cibler ces trois lignées tumorales. Il faut toutefois noter qu'il y a des points dans le graphique montrant un très faible taux de mortalité, même lorsque le puits de co-culture contenait jusqu'à 10 fois davantage de cellules effectrices que de cellules cibles, et même lorsque des cellules T CD8⁺, soit nos contrôles cytotoxiques, ont été utilisées. Il n'y a pas de différence significative entre les ratios obtenus selon si les cellules effectrices provenaient d'un donneur sain ou diabétique, ce qui indique que le T1D ne semble pas affecter la fonction des cellules DN T ayant subi notre protocole de culture. La Figure 3.9D montre les mêmes compilations, mais cette fois en comparant l'activité cytotoxique des cellules DN T à celle des cellules T CD8⁺, au sein de chaque groupe de donneur. Aucune différence significative n'a été notée entre les compilations de ratios de mortalité, suggérant que dans nos conditions in vitro, les cellules DN T ont un potentiel cytotoxique similaire aux cellules T CD8⁺ envers les cellules des lignées Jurkat, Nalm et Raji.

Des analyses supplémentaires corrélant la croissance cellulaire, le phénotype cellulaire et les caractéristiques biologiques des donneurs devront être effectuées afin de mieux comprendre les variations de pouvoir cytotoxique observées entre les donneurs, à la fois pour les cellules DN T et les cellules T CD8⁺.

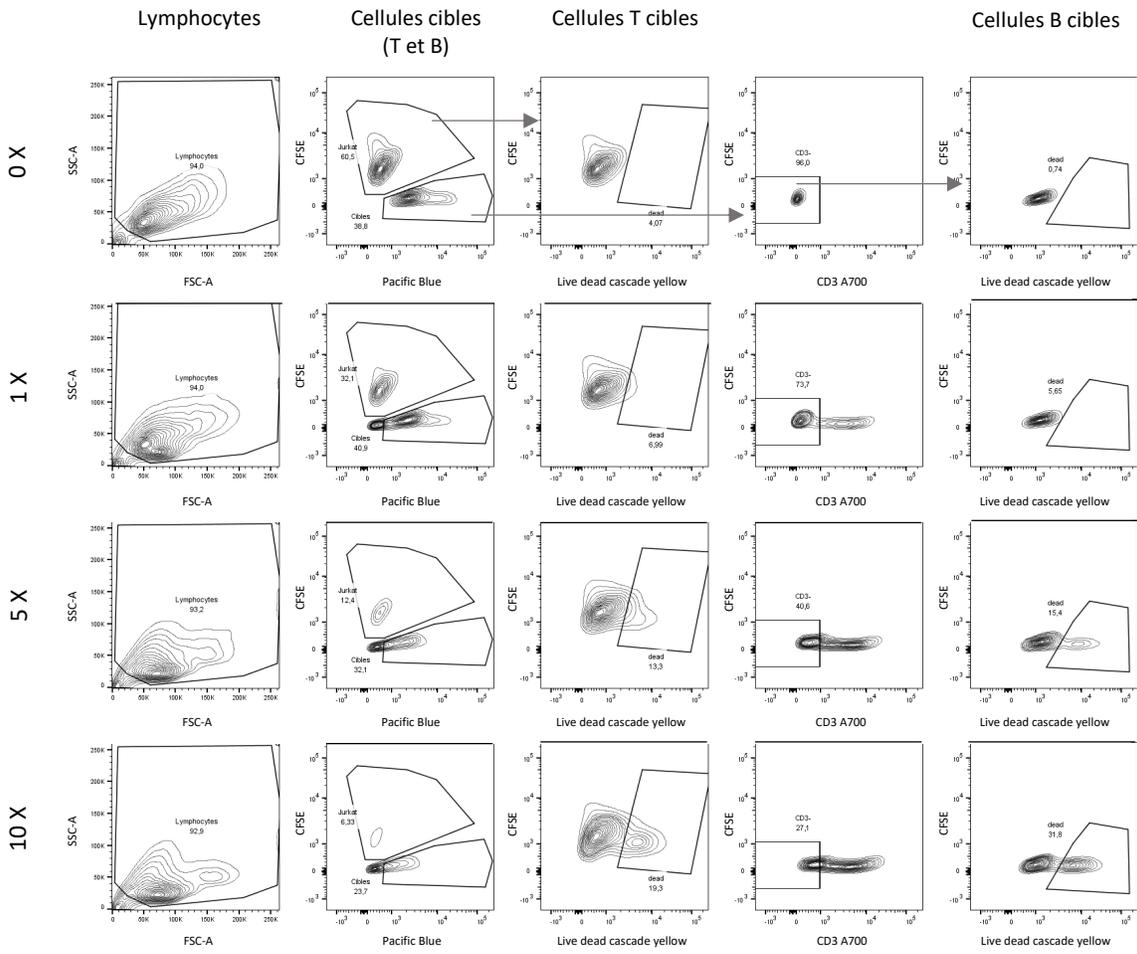
La Figure 3.9E montre la stratégie de sélection électronique ayant permis de déterminer le niveau de production de ces granules cytotoxiques par les cellules effectrices, toujours selon le ratio de cellules effectrice sur cellules cibles mise en co-culture. La compilation des niveaux d'expression de perforine et de granzyme pour chacune des combinaisons de cellules effectrice et de cellules cibles sont montrées dans la Figure 3.9F et en 3.9G, qui comparent respectivement les niveaux exprimés par les deux types cellulaires selon l'état de santé du donneur, puis les niveaux exprimés par les cellules DN T versus les cellules T CD8⁺ au sein de chaque groupe de donneurs.

Dans ces panneaux, il est possible de voir que les données se regroupent en trois niveaux différents, soit niveau nul, faible ou élevé, et ce peu importe le type cellulaire et l'état de santé du donneur. À partir de ces résultats, il est possible de dire que les cellules DN T peuvent exprimer les molécules de perforine et granzyme lorsqu'elles sont en contact avec des cellules cibles. Cependant, comme mentionné plus haut, il faudra effectuer des analyses supplémentaires afin de mieux comprendre pourquoi certains niveaux nuls ont été relevés, même chez nos cellules T CD8⁺, qui agissent aussi en tant que contrôles.



B.

Ratio effecteur : cible

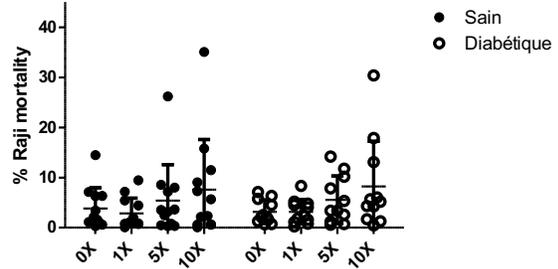
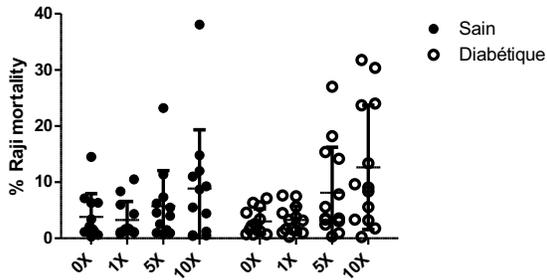
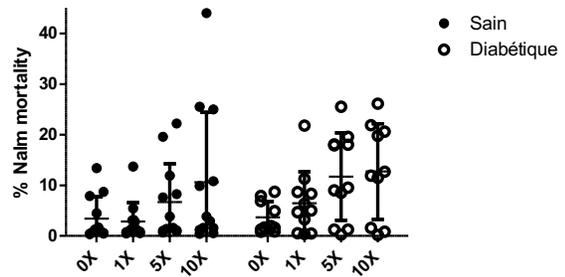
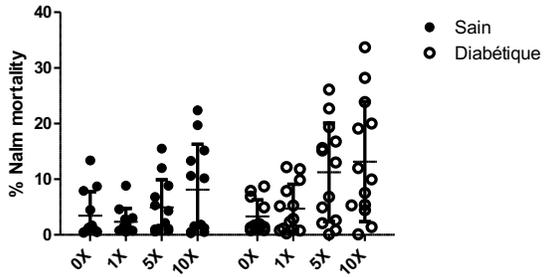
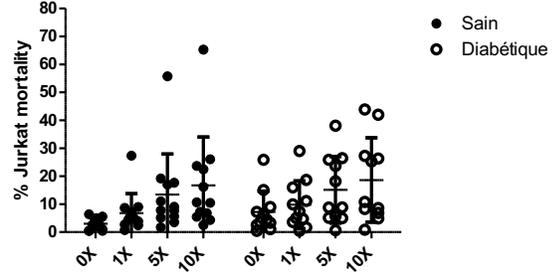
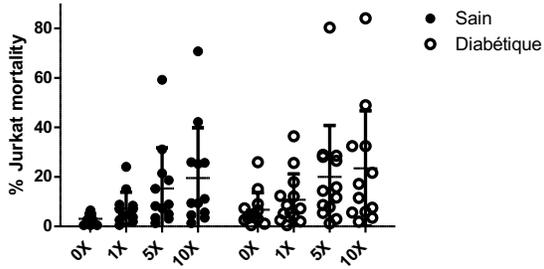


C.

Donneurs sains vs. Donneur diabétiques

DN T

CD8

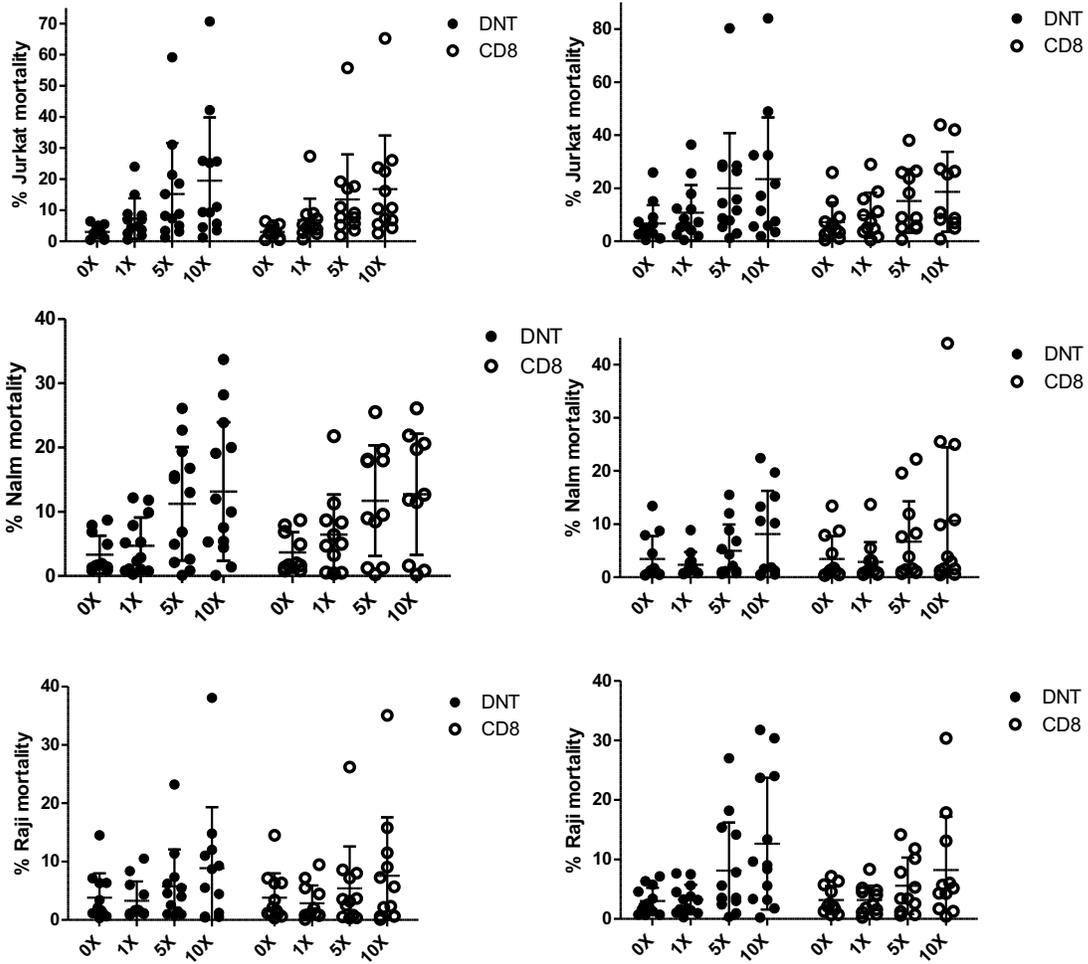


D.

Cellules DN T vs. Cellules T CD8⁺

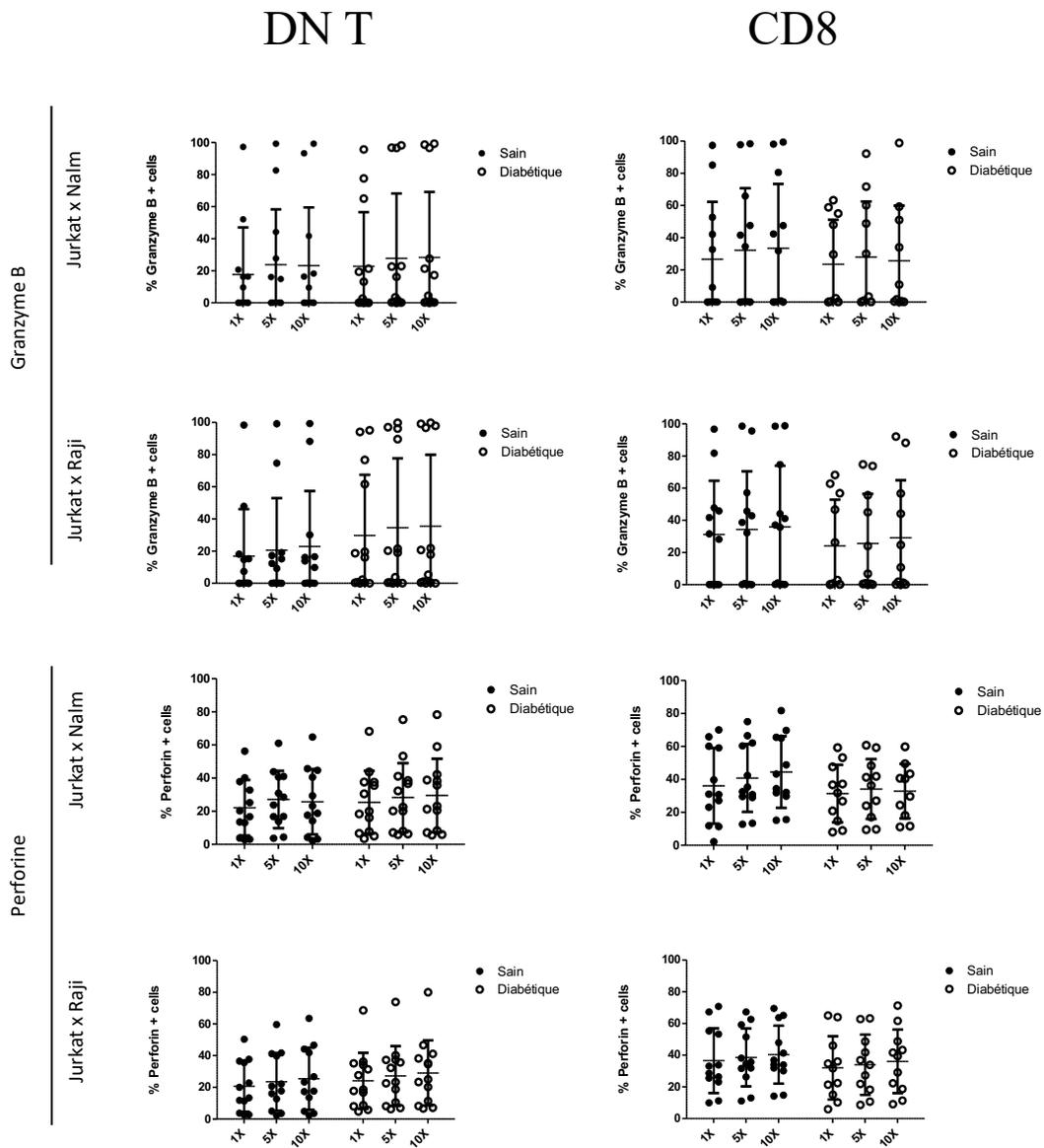
Sains

Diabétiques



F.

Donneurs sains vs. Donneur diabétiques



G.

Cellules DN T vs. Cellules T CD8⁺

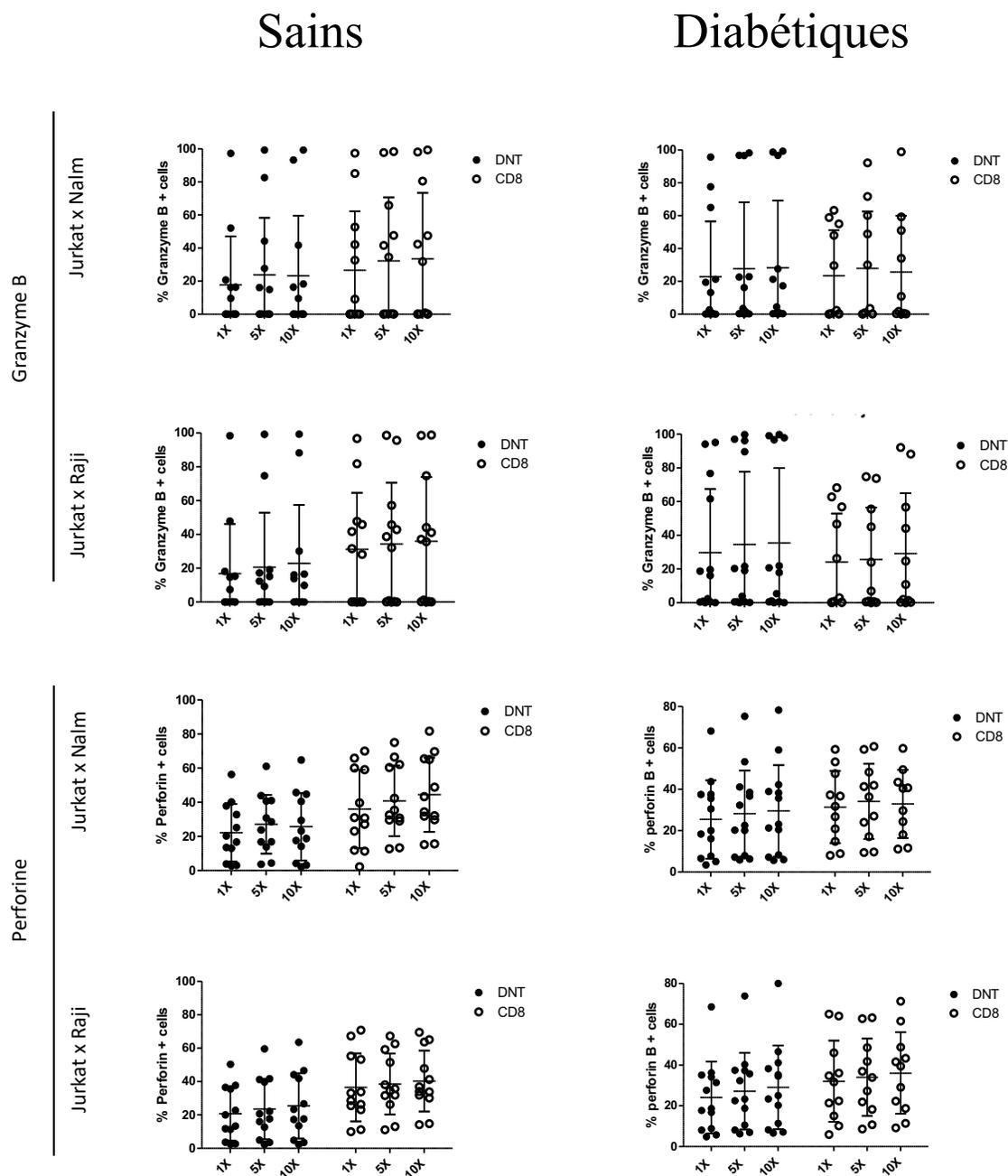


Figure 3.9 – Les cellules DN T ayant subi un protocole d’activation et de culture cellulaire ont un potentiel cytotoxique in vitro similaire aux cellules T CD8⁺ envers des cellules T et B de lignées tumorales, passant par la relâche de granzyme B et de perforine.

Après avoir été triées, activées et mises en culture pendant deux semaines, les cellules DN T et T CD8⁺ (cellules effectrices) ont été mises en co-culture pendant 6h à 37°C avec des cellules de lignées tumorales (Jurkat, Nalm et Raji) avec un ratio croissant d'effecteur : cible (0X, 1X, 5X et 10X). La viabilité des cellules cibles et la production de granules cytotoxiques produites par les cellules effectrices est ensuite évaluée par cytométrie en flux. Un schéma expérimental illustre le protocole utilisé pour évaluer l'activité cytotoxique in vitro des cellules effectrices (cellules DN T et T CD8⁺) (A). La stratégie de sélection électronique montre un exemple représentatif des pourcentages de mortalité obtenus pour les cellules cibles T (Jurkat) ou B (Nalm ou Raji), et ce pour chaque ratio de cellules effectrices sur cellules cibles (B). La compilation des pourcentages de mortalité obtenus pour chaque lignée tumorale cibles est montrée selon le type de cellules effectrices (DN T ou T CD8⁺), en comparant les données selon si ces dernières proviennent de donneurs sains ou de donneurs diabétiques (C). La compilation des pourcentages de mortalité obtenus pour chaque lignée tumorale cible est montrée selon si les cellules effectrices proviennent de donneurs sains ou de donneurs diabétiques, en comparant les données selon le type de cellules effectrices (DN T ou T CD8⁺) (D). La stratégie de sélection électronique montre un exemple représentatif de la sélection de cellules effectrices qui ont produit du granzyme B et de la perforine suite au contact avec les cellules de lignée tumorales (E). La compilation du pourcentage de cellules effectrices positives pour la production de granzyme B et de perforine est montrée pour les cellules DN T ou T CD8⁺ selon si elles ont été mises en contact avec des cellules Jurkat et Nalm, ou avec des cellules Jurkat et Raji. Les données sont comparées en fonction du type de donneur (sain ou diabétique) (F). La compilation du pourcentage de cellules effectrices positives pour la production de granzyme B et de perforine est montrée selon si les cellules effectrices proviennent de donneurs sains ou de donneurs diabétiques, en comparant les données selon le type de cellules effectrices (DN T ou T CD8⁺) (G).

3.6 Analyse de la survie et du potentiel cytotoxique in vivo des lymphocytes T double-négatifs humain ayant subi le protocole de culture cellulaire optimisé

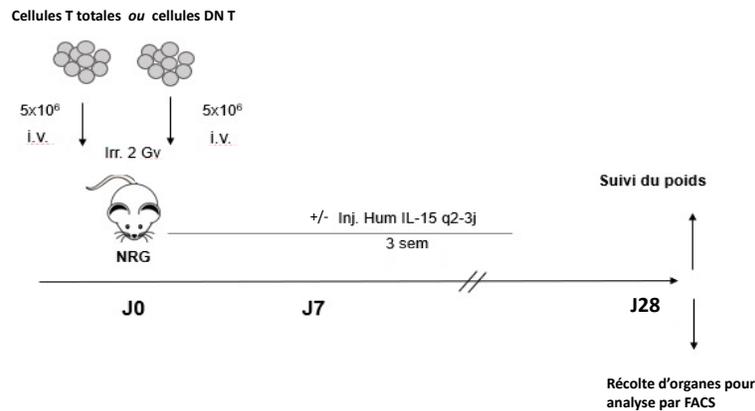
Après avoir déterminé grâce à des essais fonctionnels que les cellules DN T triées et ayant subi notre protocole d'activation et de culture cellulaire démontraient un potentiel cytotoxique comparable à celui des cellules T CD8⁺ envers des cellules de lignées tumorales, nous avons voulu étudier si ce potentiel pouvait être observé dans un contexte in vivo. Nous avons donc utilisé le modèle de la souris humanisée NRG (NOD-Rag1^{null}IL2rg^{null}), déficientes en cellules T, cellules B, et possédant des cellules NK dysfonctionnelles, permettant la greffe de cellules immunitaires humaines. Afin de poursuivre nos expériences fonctionnelles, nous avons voulu déterminer si les cellules DN T humaines ayant suivi notre protocole d'activation et de culture cellulaire survivraient à la suite d'une greffe chez les souris NRG. Le schéma à la Figure 3.10A montre un résumé de la méthodologie utilisée pour les expériences avec les souris NRG et la survie des cellules DN T. Les

souris ont été injectées avec des cellules humaines qui avaient été triées et qui avaient subi un protocole de culture cellulaire au préalable (soit des cellules T totales, ou des cellules DN T) par voie intraveineuse. Les souris contrôles étaient injectées avec du PBS. Au cours des trois premières semaines suivant la greffe de cellules, certaines souris ont été injectées avec la cytokine humaine IL-15, afin de voir si celle-ci aiderait à promouvoir la survie des cellules humaines en périphérie. Le poids des souris était mesuré hebdomadairement, et les souris étaient sacrifiées après une, deux ou quatre semaines, afin de récolter la moelle osseuse et la rate, pour en extraire les cellules et pouvoir en faire l'analyse par cytométrie en flux. La Figure 3.10B montre la stratégie de sélection électronique permettant d'évaluer si les cellules humaines, positives pour le marqueur CD45 humain et pour le marqueur TCR $\alpha\beta$, ont survécu en périphérie. La compilation des pourcentages de cellules humaines retrouvées dans la rate est montrée dans la Figure 3.10C. Bien que les données soient peu nombreuses et que l'expérience aurait eu avantage à être répétée, les résultats obtenus dans les panneaux B et C de la Figure 3.10 illustrent l'importance de l'injection des souris avec l'IL-15 humain pour favoriser la survie des cellules en périphérie, ce qui concorde avec la littérature. Ainsi, pour les expériences subséquentes de greffes de cellules DN T humaines dans des souris humanisées NRG, nous avons continué d'injecter cette cytokine pour les trois premières semaines suivant la greffe.

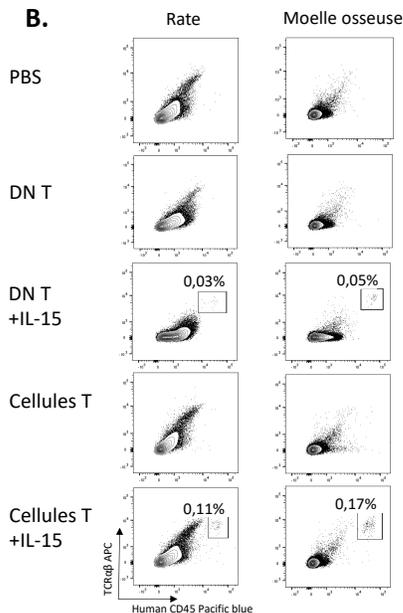
Nous avons par la suite voulu évaluer si les cellules DN T humaines ayant subi notre protocole d'activation et de culture cellulaire avaient un pouvoir protecteur contre la xéno-GVHD. La Figure 3.10D montre la méthodologie utilisée afin de provoquer une xéno-GVHD chez les souris NRG, où ces dernières, d'abord irradiées à 2 Gy, étaient injectées avec des cellules PBMCs par voie intraveineuse. Cette méthode entraîne normalement une perte de poids chez les souris, ainsi qu'une infiltration lymphocytaire dans des organes tels que le foie et les poumons. Certaines souris ont également été injectées avec des cellules DN T humaines, ou avec du PBS (pour les souris contrôles). De l'IL-15 était injecté pendant 3 semaines suivant la greffe, et un suivi du poids des souris a été effectué 2 fois par semaine. Lorsque les souris perdaient 20 % de leur poids initial, elles étaient sacrifiées, et le foie, les poumons et les intestins étaient récoltés afin de pouvoir être analysés par histologie. La Figure 3.10E montre une courbe de poids obtenue pour une cohorte d'expérience, et il est possible de voir que les souris ayant été injectées avec des PBMCs et des cellules DN T humaines ont maintenu un meilleur poids, et par conséquent une meilleure survie, que les souris ayant été injectées avec des cellules PBMCs et du PBS. La Figure 3.10F montre des

images d'histologie de foie et de poumons de souris d'expérience, avec ou sans infiltration lymphocytaire, signe de xéno-GVHD. Il est important de mentionner que ces résultats sont des résultats préliminaires, et qu'il sera important de répéter l'expérience afin de pouvoir tirer la conclusion que les cellules DN T ont un effet protecteur contre une xéno-GVHD induite chez des souris humanisées NRG, en augmentant l'échantillon et en effectuant davantage de corrélation entre les courbes de poids et l'infiltration lymphocytaires des organes atteints par histologie.

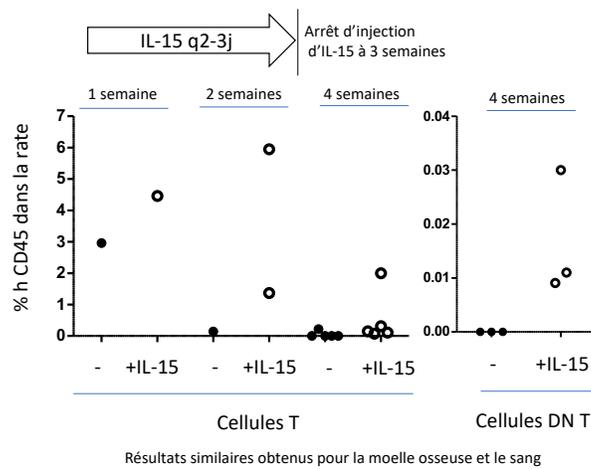
A.



B.



C.



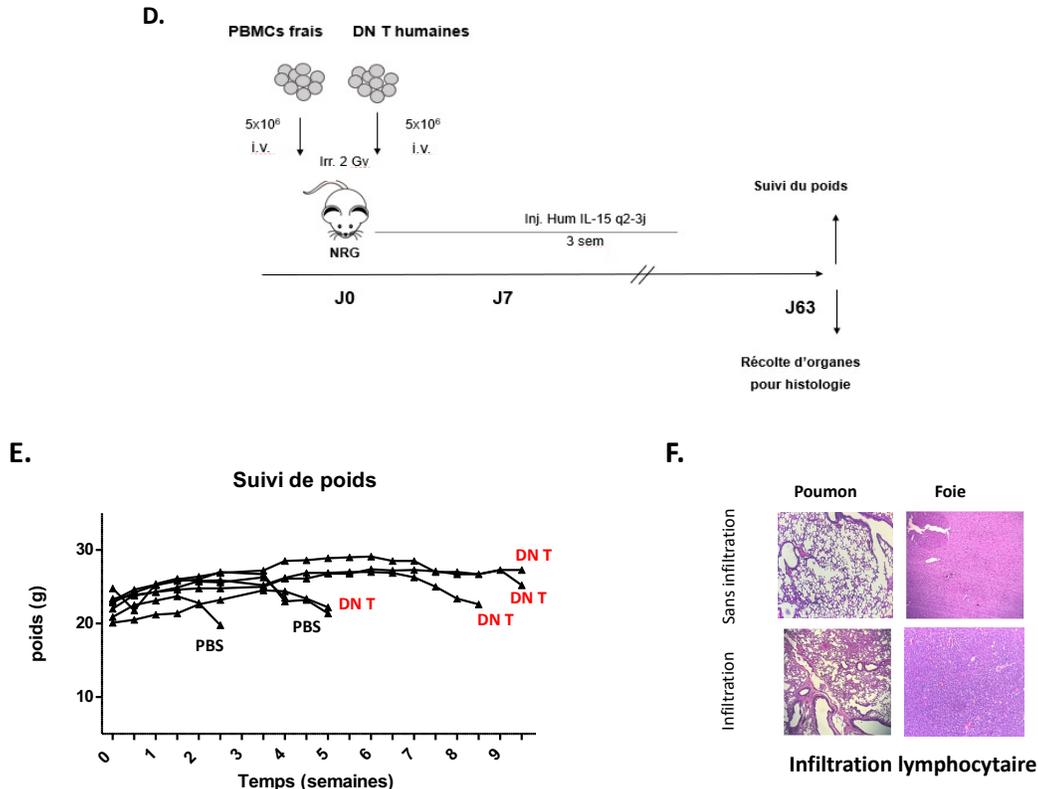
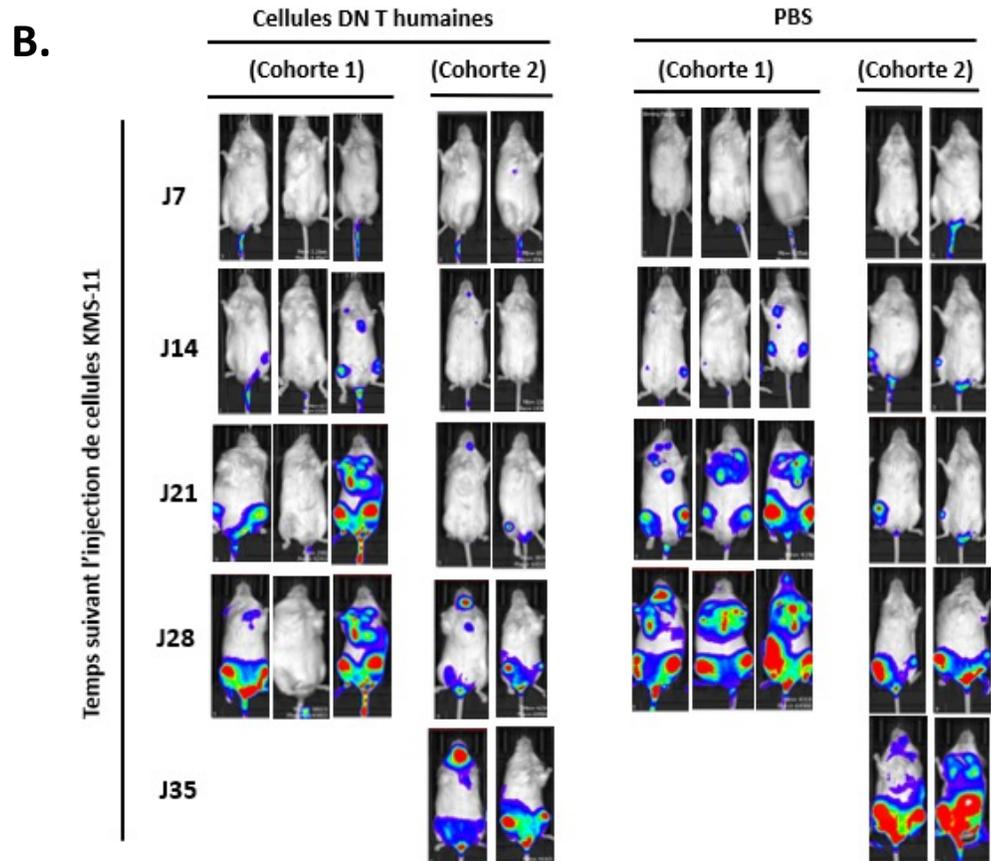
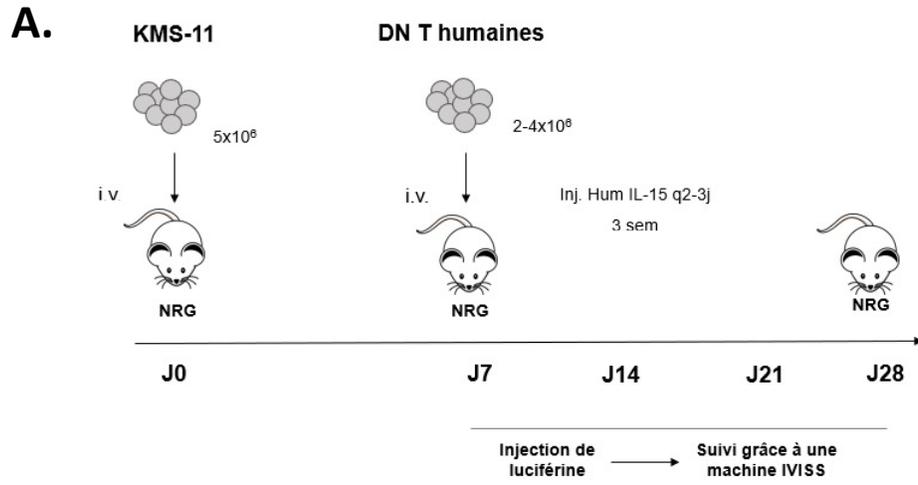


Figure 3.10 – Les cellules DN T humaines survivent en périphérie chez la souris humanisée NRG lorsqu’elles sont injectées avec de l’IL-15 humaine, et protègent les souris NRG contre une xéno-GVHD induite par des PBMCs humains.

Des cellules T humaines (2×10^6 cellules DN T ou 5×10^6 cellules T totales) ont été injectées par voie intraveineuse chez des souris NRG à jour 0, avec ou sans IL-15 humaine donnée aux 3 jours pendant 3 semaines. À une, deux et quatre semaines, les souris ont été sacrifiées afin d’évaluer la survie des cellules T humaines en circulation. Par la suite, les souris NRG ont été injectées avec des cellules PBMCs, afin d’induire une xéno-GVHD, en plus d’être injectées avec soit des cellules DNT humaines, ou du PBS comme contrôle. Le poids a été surveillé, et les souris ayant perdu 20% ont été sacrifiées, et leurs organes récoltés. Le schéma expérimental de la greffe de cellules DN T est montré, où à jour 0, des souris NRG irradiées (2 Gy) reçoivent par voie intraveineuse $2-5 \times 10^6$ cellules T totales ou cellules DN T, avec ou sans injection d’IL-15 humain 3 semaines suivant la greffe (A). Des histogrammes de cytométrie en flux permettent de montrer la stratégie de sélection électronique des cellules T humaines (positives TCR $\alpha\beta$ et CD45 humain) en circulation chez la souris NRG. Les données obtenues pour la rate et la moelle osseuse sont montrées pour les souris injectées avec des cellules DN T humaines ou des cellules T humaines (B). La compilation des pourcentages de cellules positives pour le marqueur CD45 humain retrouvées dans la rate à la semaine 1, 2 et 4 est montrée sur le graphique (pour les cellules T totales et pour les cellules DN T) (C). Le schéma expérimental de l’induction d’une xéno-GVHD est montré, où à jour 0, des souris NRG irradiées (2 Gy) reçoivent par voie intraveineuse 5×10^6 cellules PBMCs, avec soit 5×10^6 cellules ou 100 μ l de PBS. Les souris sont suivies pendant les semaines suivantes pour signes de xéno-GVHD (D). Une courbe de poids représentative au cours des semaines est montrée, selon si les souris ont été injectées

avec des cellules DN T ou du PBS (E). Le poumon, le foie et les intestins des souris sont récoltés lors de leur sacrifice afin de regarder l'infiltration lymphocytaire par histologie (F).

Par la suite, nous avons voulu étudier si les cellules DN T humaines avaient un pouvoir cytotoxique envers des cellules de la lignée cellulaire KMS-11 modifiées avec un transgène exprimant l'enzyme de la luciférase. Les cellules avec le transgène étaient sélectionnées en culture grâce à l'antibiotique puromycine (cellules aimablement fournies par le laboratoire du Dr. Jean-Sébastien Delisle). Les cellules KMS-11 sont des plasmocytes de myélome multiple immortalisés, servant à répliquer une forme de la maladie chez les souris humanisées, telles que les souris NRG. Le fait que ces cellules expriment l'enzyme de la luciférase permet le suivi en temps réel du devenir des cellules KMS-11 chez la souris lorsqu'on leur injecte la luciférine, sans avoir à sacrifier les animaux. La Figure 3.11A illustre la méthodologie utilisée, où à jour 0, les souris NRG ont été injectées par voie intraveineuse avec 5×10^6 cellules KMS-11. À jour 7, les souris étaient soit injectées avec $2-4 \times 10^6$ cellules DN T ou avec du PBS comme contrôle, et étaient injectées avec de l'IL-15 humain à chaque deux à trois jours durant les trois semaines suivant la greffe de cellules humaines. À partir du jour 7, les souris étaient injectées hebdomadairement avec de la D-luciférine, et la bioluminescence émise par les cellules était révélée par la machine IVIS Spectrum (IVIS100 IVIS Lumina System, Caliper LifeSciences), afin de voir suivre la progression des cellules tumorales. Le poids des souris, ainsi que d'autres signes cliniques, tels que l'ébouriffement et la paralysie, étaient également surveillés. La Figure 3.11B montre en photo l'évolution des cellules tumorales KMS-11 chez les souris, selon si elles ont reçu par la suite une greffe de cellules DN T humaines ou non (PBS). En comparant les images des deux cohortes, il est possible de voir une plus grande intensité dans la bioluminescence captée chez les souris n'ayant pas reçu de cellules DN T humaines comparées à celles en ayant reçu. Les cellules KMS-11 semblent se loger progressivement dans les pattes postérieures, puis dans les pattes antérieures, concordant avec le fait que certaines finissaient par être paralysées (résultats de signes cliniques non montrés). Ces résultats préliminaires suggèrent donc un effet protecteur des cellules DN T envers les cellules tumorales KMS-11. En utilisant la même méthodologie qu'à la Figure 9, nous avons voulu voir si les cellules DN T humaines pouvaient entraîner la mortalité des cellules KMS-3.11 dans un contexte in vitro. La Figure 3.11C montre qu'en augmentant le ratio de cellules DN T humaines en co-culture avec les cellules tumorales, le pourcentage de mortalité de ces dernières augmentaient, suggérant un effet cytotoxique direct.



C.

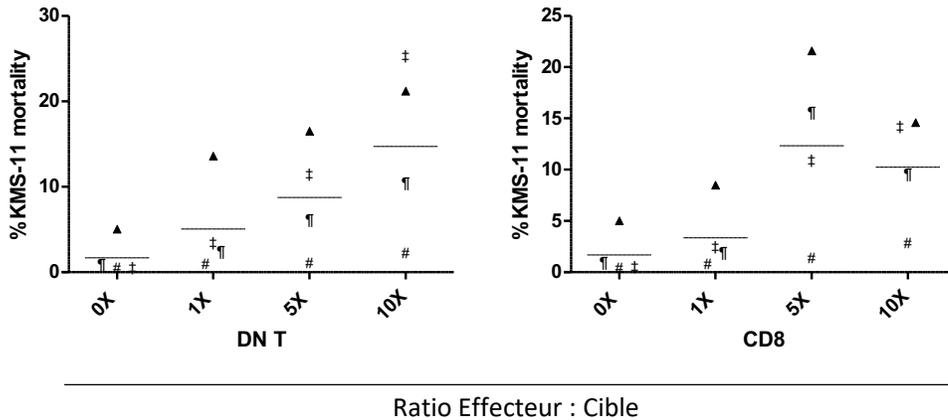


Figure 3.11 – Les cellules T double-négatives humaines ont une activité inhibitrice envers les cellules de la lignée tumorale KMS-11.

5×10^6 cellules KMS-11 ont été injectées i.v. dans des souris NRG à J0. 2 à 4×10^6 cellules DN T humaines (les contrôles ont reçu du PBS), ayant préalablement subi un protocole de culture cellulaire de deux semaines, ont été injectées à J7. La prolifération des cellules tumorales KMS-11 a été suivie grâce à une injection hebdomadaire de luciférase chez les souris, et grâce à une machine IVISS qui révèle luminescence produite. Les souris ayant reçu des cellules DN T ont été injectées 2-3 fois par semaine avec de l'IL-15 humain pendant les 3 premières semaines. (A). Série d'imagerie de bioluminescence (vue ventrale) des cellules KMS-11 exprimant la luciférase, au cours des semaines suivant leur injection. Deux cohortes (injectées avec 2 ou 4 millions de cellules DN T humaines, composées respectivement de 6 et 4 souris) sont montrées, selon si elles ont reçu une injection de cellules DN T humaines ou de PBS (B). La compilation des pourcentages de mortalité obtenus envers les cellules KMS-11 par essai cytotoxique in vitro (voir Figure 3.9) est montrée (C).

Chapitre 4 – Discussion

L'objectif de cette étude préclinique des cellules T double-négatives humaines (DN T) était d'approfondir les connaissances sur le phénotype et la fonction de ces dernières, afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique en tant que thérapie cellulaire pour des maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 ou pour certains cancers, tels que le myélome multiple. Les cellules DN T sont une population de lymphocyte T non conventionnelle, et bien qu'elles soient de plus en plus décrites dans la littérature lorsqu'elles proviennent de modèles murins, il en reste beaucoup à découvrir chez l'humain.

Bien que d'autres équipes de recherche se penchent également sur le potentiel thérapeutique de cellules régulatrices telles que les cellules DN T, notre laboratoire s'intéressait d'abord au lien entre ces cellules et le diabète de type 1. En effet, les travaux précédents de Dugas *et al.* ont montré que la proportion de cellules DN T retrouvées dans les organes lymphoïdes de la souris NOD, modèle murin prédisposé à développer le diabète de type 1 de façon spontanée, était plus faible que celle retrouvée dans la souris B10.BR (46). Nous étions donc intéressés à savoir si ces résultats seraient récapitulés chez les patients humains atteints du diabète de type 1. Afin de précisément identifier les cellules DN T chez l'humain, nous avons effectué nos analyses sur des cellules T positives pour le marqueur TCR $\alpha\beta$ permettant de sélectionner les lymphocytes T, et négatives pour le marqueur CD56, pour exclure les cellules NKT. Nous avons aussi exclu les cellules T exprimant les marqueurs CD4 et CD8. Au final, ces sélections nous permettent d'identifier les cellules T portant le TCR $\alpha\beta$ et n'exprimant pas les corécepteurs CD4 et CD8, ce qui définit les cellules DN T. Tel que documenté (45), nous retrouvons de 1 à 5 % des cellules DN T parmi les cellules T totales provenant de PBMCs. Afin de déterminer si le nombre ou la proportion de cellules DN T était diminué chez les patients atteints du diabète de type 1, nous avons recruté 25 donneurs, soit 14 diabétiques de type 1 et 11 témoins (voir Annexe 1 pour les caractéristiques des donneurs). Il est intéressant de noter que contrairement aux résultats retrouvés chez la souris, la proportion des cellules DN T retrouvée dans le sang périphérique des donneurs diabétiques de type 1 n'était pas plus basse que celle retrouvée dans le sang périphérique des donneurs sains. De plus, en séparant les données non seulement par l'état de santé du donneur (diabétique de type 1 ou témoin), mais également par le sexe du donneur, la proportion des cellules DN T retrouvée chez les donneurs hommes diabétiques était plus élevée que celle retrouvée chez les donneurs hommes témoins. Les

nombres de cellules DN T récoltées à la suite de tris cellulaires effectués sur les PBMCs obtenus pour 30 ml de sang ne variaient pas non plus de façon significative entre les quatre groupes (Figure 3.1B).

Plusieurs raisons pourraient expliquer le fait que les résultats observés dans la souris NOD n'ont pas été récapitulés chez l'humain. Entre autres, le diabète de type 1 est une maladie multifactorielle et il existe bien sûr beaucoup de différences sur plan physiologique lorsqu'on compare l'humain au modèle murin. Notamment, les études effectuées en comparant deux lignées de souris isogéniques sont équivalentes à étudier deux individus génétiquement différents. La variabilité génétique humaine représente donc une différence notable entre les deux espèces. Aussi, il est important de mentionner que l'âge moyen des donneurs diabétiques était de $33,9 \pm 14,1$. Le diabète de type 1 est une maladie qui est diagnostiquée à l'enfance ou à l'adolescence (Maahs). L'âge moyen au diagnostic des donneurs était de $15,9 \pm 12,0$, ce qui signifie que les sujets étaient déjà bien avancés dans la maladie au moment où on a effectué les analyses. Ceci fait contraste aux études effectuées chez les souris des expériences précédentes, où on avait évalué la proportion de DN T au stade prédiabétique. Il serait donc intéressant de pouvoir analyser la proportion de cellules dans des cohortes de sujets récemment diagnostiqués avec le diabète de type 1, ou même chez les sujets à risque, pour voir si une différence serait observée comparée aux proportions obtenues chez des sujets sains du même âge.

Bien que nos résultats n'aient pas identifié de différence entre la proportion et le nombre de cellules DN T circulantes chez les donneurs diabétiques comparés aux témoins, à la visée d'une approche thérapeutique autologue, il était important de déterminer si le phénotype, mais, surtout, si la fonction des cellules DN T provenant des patients atteints du diabète de type 1 étaient maintenus (discutés plus loin dans ce chapitre). Aussi, considérant le faible nombre de cellules DN T présentes dans le sang, il est évident qu'une approche thérapeutique nécessitera un protocole de culture permettant d'augmenter leur nombre. Un résultat important de ce mémoire est la démonstration que les cellules recueillies chez chaque groupe de donneurs ont une capacité de prolifération cellulaire comparable en culture cellulaire (Figure 3.1C), indépendamment du ratio de cellules DN T de départ. L'état diabétique du patient ne semble donc pas affecter le potentiel de prolifération en culture. Cette observation pourrait faciliter la mise en place de protocole clinique autologue.

Un autre résultat intéressant provenant des travaux de Dugas *et al.* illustre qu'une injection de cellules DN T était suffisante pour diminuer l'incidence de diabète dans des modèles transgéniques et non transgéniques, en plus d'entraîner une baisse dans les niveaux d'anticorps dans le modèle transgénique. Des travaux de Liu *et al.* ont également montré que la combinaison de cellules DN T et de sérum anti-thymocyte pouvait renverser le diabète de type 1 chez la souris NOD (91). Mis ensemble, ces résultats ouvraient la voie sur la possibilité d'un usage thérapeutique des cellules DN T chez l'humain pour traiter le diabète de type 1. Bien qu'à ce jour, la maladie peut être contrôlée par l'usage de l'insuline exogène, cette régulation est imparfaite et les excursions glycémiques ont des conséquences vasculaires graves à long terme, causant entre autres la cécité, le besoin d'amputation de membres, des événements cardio-vasculaires, et réduisant considérablement l'espérance de vie. De plus, certains patients souffrent de maladie non contrôlée, soit l'hypoglycémie réfractaire. Shapiro *et al.*, un groupe d'Edmonton, ont développé dans les dernières années le « Protocole d'Edmonton pour la transplantation d'îlots » (*Edmonton Protocol for Islet Transplantation*) (121), où les patients reçoivent une greffe d'îlots de pancréas provenant de donneurs décédés, visant l'indépendance d'insuline et un contrôle glycémique adéquat un an après la transplantation. En plus du pouvoir protecteur des cellules DN T envers le diabète de type 1, les cellules DN T pourraient protéger des rejets de greffe (182). Il serait donc intéressant dans le futur d'investiguer le pouvoir thérapeutique d'une greffe autologue de cellules DN T en parallèle avec la greffe d'îlot chez ces patients.

Tel que mentionné plus haut, afin de développer une approche de thérapie cellulaire exploitant les cellules DN T, une approche permettant d'obtenir un plus grand nombre de cellules doit être développée. La deuxième étape de cette étude était donc d'optimiser un protocole de culture cellulaire adapté aux cellules DN T humaines, dans le but d'obtenir un rendement cellulaire satisfaisant pour un protocole de thérapie cellulaire, demandant en moyenne 10 à 100 millions de cellules par kg (183). En se basant sur les protocoles de cultures cellulaires déjà établis et utilisés pour les cellules T ainsi que sur le fait que certains facteurs de croissance sont définis par leur habilité de promouvoir la prolifération cellulaire chez les cellules exprimant les récepteurs opportuns, nous avons choisi de caractériser l'expression des récepteurs de cytokines IL-2, IL-4 et IL-7 chez les cellules DN T avant leur activation cellulaire (*ex vivo*, T0), après leur activation cellulaire *in vitro* avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 (T24h) et après leur prolifération cellulaire en culture (T7jours) dans un milieu de culture supplémenté d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-7. Pour cette

caractérisation, nous avons étudié les cellules provenant du sang prélevé sur 9 donneurs sains. L'IL-2 est un important facteur de croissance pour les cellules T (184), il était donc attendu que les cellules DN T exprimeraient les trois chaînes du récepteur de cette cytokine, soit la chaîne commune gamma (γ c, CD132), l'IL-2R α (CD25) et l'IL-2R β (CD122) (Figure 3.2A et 3.2B). D'ailleurs, les cellules doivent exprimer la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) afin de pouvoir répondre à la cytokine (185), et nos résultats ont montré qu'après activation (T24h), les cellules DN T, tout comme les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺, ont augmenté l'expression de ce marqueur. L'IL-7 est aussi une cytokine essentielle pour la prolifération homéostatique et la survie à la fois de cellules T naïves et T mémoires (186). Il était donc également attendu que les cellules DN T expriment à leur surface les chaînes du récepteur de cette cytokine, soit l'IL-7R α (CD127) et la chaîne commune gamma (γ c, CD132). Les cellules DN T exprimaient à l'état ex vivo (avant activation, T0) les deux chaînes, et l'expression de l'IL-7R α s'est vue diminuée à la suite de l'activation cellulaire, puis diminuée davantage suite à la prolifération cellulaire suite à sept jours en culture, ce qui était également attendu. En effet, l'ajout d'IL-7 dans le milieu cellulaire diminue l'expression de l'IL-7R α (177), puisque c'est une cytokine essentielle et non redondante, demandant une fine régulation de l'expression de son récepteur. Un résultat qui s'est avéré surprenant fut le fait que nos trois populations cellulaires, excepté les cellules T CD4⁺ à l'état ex vivo, n'exprimaient pas significativement l'IL-4R α (CD124), même après activation et ajout d'IL-4 en culture. Bien qu'utilisée en culture cellulaire pour les cellules T, cette cytokine est principalement nécessaire pour la différenciation de cellules T CD4⁺ en Th2 et pour la différenciation de cellules B (187) (le récepteur était d'ailleurs exprimé par les cellules B, résultats non montrés). Ceci suggérait donc que l'IL-4 ne serait pas une cytokine essentielle pour le protocole de culture cellulaire des cellules DN T.

Avant de poursuivre notre optimisation de l'utilisation de diverses cytokines dans le milieu de culture, nous avons également testé un nouveau milieu de culture sans sérum et sans composés xénobiologiques. En plus de donner un meilleur rendement cellulaire que le milieu classique supplémenté de sérum humain, les milieux sans sérum conviennent davantage aux protocoles de culture de thérapies cellulaires (188).

Ainsi, après avoir déterminé que les cellules DN T bénéficieraient probablement de l'ajout d'IL-2 et d'IL-7 en culture, mais probablement pas de l'IL-4, nous avons également voulu savoir

si ces cellules bénéficieraient de l'ajout d'IL-15. L'IL-15, tout comme l'IL-7, est une cytokine nécessaire à la survie et la capacité de prolifération des cellules T (189). De plus, l'IL-15 augmente l'activité cytotoxique des cellules DN T par la régulation à la hausse de molécules effectrices dans un contexte de tumeurs aux poumons (86). L'ajout d'IL-15 dans notre milieu de culture cellulaire semblait également donner un meilleur rendement de culture cellulaire. Enfin, nous avons choisi de tester l'ajout de la cytokine IL-1 β dans notre milieu de culture cellulaire, à la suite d'une revue de littérature sur les différents protocoles de culture cellulaire utilisés pour les cellules DN T (45, 62). Nous avons tenté les différentes combinaisons de cytokines sur des PBMC totales, pour évaluer laquelle serait la plus avantageuse pour la culture de cellules DN T. Toutefois, les résultats étaient difficiles à analyser, dû au fait que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ consommaient probablement davantage de ressources vu leur plus grand nombre de départ. Nous avons donc testé différentes combinaisons de cytokines sur les cellules DN T triées, et à partir de nos résultats et de ce qui avait été précédemment documenté dans la littérature, avons conclu que l'IL-2, IL-7, l'IL-15 et l'IL-1 β dans un milieu sans sérum seraient les conditions de culture les plus avantageuses pour les cellules DN T.

Pour la troisième étape de cette étude, nous avons voulu étudier le phénotype des cellules DN T ayant subi notre protocole de culture cellulaire optimisé, afin de pouvoir évaluer leur statut fonctionnel. De plus, comme mentionné plus haut, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre la proportion de cellules DN T circulantes dans le sang périphérique des sujets diabétiques de type comparé aux sujets sains. Nous étions donc intéressés à savoir si les cellules DN T provenant de sujets diabétiques auraient un phénotype différent des cellules provenant de donneurs sains, puisque le contrôle de la glycémie peut moduler certains paramètres du système immunitaire (190). Nous avons d'abord choisi de regarder des marqueurs de mémoire cellulaire, soit CCR7, CD45RO et CD127. Puisque le phénotype et la fonction des cellules DN T s'apparentent davantage à celle des cellules T CD8⁺, nous avons choisi de les utiliser à des fins de comparaison. La molécule CCR7 est un récepteur de chimiokine exprimé entre autres par certaines sous-populations de cellules T naïves, régulatrices et mémoire centrale, servant à diverses fonctions, telles que le retour des lymphocytes T dans les nœuds lymphatiques et les plaques de Peyer (191). Nos résultats (Figure 3.4) montrent que les cellules DN T expriment de façon hétérogène le marqueur CCR7, de façon similaire aux cellules T CD8⁺ chez les donneurs sains, mais en plus faible proportion chez les donneurs diabétiques. La molécule CD45RO est un

isoforme de la tyrosine phosphatase transmembranaire CD45 humaine, présente sur toutes les cellules d'origine hématopoïétique (excluant les érythrocytes) (192). CD45RO, tout comme CCR7, est associé aux cellules T mémoire, soit un stade post-activation et après ou pendant le stade de cellules effectrices, au contraire de CD45RA, associé à un phénotype naïf (193). Les cellules DN T provenant de donneurs diabétiques exprimaient davantage CD45RO que les cellules T CD8+ de leur groupe, ainsi que les cellules DN T provenant des donneurs diabétiques. Nous étions également intéressés par ce marqueur, puisque dans les travaux précédents du laboratoire, Hillhouse *et al.* ont montré que chez les patients atteints de GVHD chronique, une corrélation négative était observée entre le degré de sévérité de la maladie, mesurée entre autres par les niveaux de BAFF (B cell activating factor) circulant, et la proportion circulante de cellules DN T positives pour CD45RO (84). La molécule CD127, discutée également plus haut en tant que chaîne alpha du récepteur à l'IL-7, représente également un marqueur de cellules mémoires pour les cellules T CD8+, particulièrement lorsqu'on évalue la co-expression de cette dernière avec CD62L (marqueur non évalué dans cette étude). Il est possible de voir à partir des résultats que la majorité des cellules étudiées, peu importe la population et le groupe de donneur, n'expriment pas ou très faiblement CD127. Ceci concorde avec le fait que les cellules avaient été exposées à de l'IL-7 en culture. En résumé, la faible expression de CCR7 et le manque d'expression de CD127 suggèrent un phénotype de cellules T effectrices pour la majorité des cellules étudiées, sans exclure la possibilité qu'une partie des cellules DN T soient de cellules mémoires. L'expression variable de cellules positives pour CD45RO suggère un phénotype soit de cellules T mémoires centrales (CD45RA⁻CD45RO⁺CCR7⁺CD62L⁺) ou un phénotype de cellules T mémoire effectrices (CD45RA⁻CD45RO⁺CCR7⁻CD62L⁻).

Nous avons par la suite voulu évaluer l'expression de marqueurs d'activation, soit CD69, KLRG1 et CD160, puis d'épuisement, soit 2B4, Tim-3, PD-1 et Lag3. Puisqu'un des buts ultérieurs de cette étude est de pouvoir développer une thérapie cellulaire à partir des cellules DN T récolées à partir du sang périphérique, il était important pour nous que notre protocole d'activation et de culture cellulaire puisse nous donner des cellules activées, mais non épuisées. Il faut d'abord mentionner que les marqueurs d'épuisement « classiques » peuvent également suggérer plutôt un phénotype d'activation lorsque peu exprimé. Des marqueurs comme PD-1, qualifiés de freins immunitaires, sont essentiels pour prévenir l'auto-immunité, et sont exprimés chez des cellules T activées (179). À partir des résultats (Figure 3.5), il est possible de voir que les cellules DN T

expriment davantage le marqueur CD69 que les cellules T CD8⁺, à la fois pour les donneurs diabétiques et pour les donneurs sains. CD69 est un marqueur exprimé rapidement après activation, et bien que sa fonction ne soit pas entièrement élucidée, est associé entre autres avec différentes activités métaboliques, la différenciation des cellules Tregs, et à la rétention dans les organes lymphoïdes (194, 195). Il aurait été intéressant ainsi d'évaluer l'expression de CD69 après l'activation *in vitro* de cellules, pour comparer avec son expression après 2 semaines de culture cellulaire. Nous avons également évalué si les cellules exprimaient KLRG1, un marqueur à la fois documenté comme marqueur de sénescence par certaines équipes, mais également comme marqueur d'activation récente pour les cellules T (196). Ni les cellules T CD8⁺ ni les cellules DN T, peu importe les groupes de donneurs, ne semblaient exprimer ce marqueur. Elles ne semblaient pas exprimer non plus le dernier marqueur d'activation à l'étude, CD160, normalement exprimé sur des cellules effectrices telles que les cellules NK et certaines sous-populations de cellules T CD8⁺, ainsi que sur des populations non conventionnelles, telles que les lymphocytes intraépithéliaux (*intraepithelial lymphocytes*, IELs) (197). À noter que dans la littérature, CD160 est parfois également associé à un phénotype d'épuisement (198).

Pour ce qui en est des marqueurs d'épuisement classique montrés à la Figure 3.6, les cellules DN T et les cellules T CD8⁺ exprimaient de faibles niveaux du marqueur 2B4 (aussi appelé CD244). Un peu comme pour les autres marqueurs, c'est le niveau d'expression du récepteur qui semble dicter si la fonction est d'activation ou d'inhibition (199). Dans le groupe des donneurs sains, les cellules T CD8⁺ exprimaient davantage 2B4 que les cellules DN T. Cela pourrait s'expliquer par le fait c'est également un marqueur exprimé par les cellules T CD8⁺ à phénotype mémoire (200). Tim-3 était peu ou pas exprimé par nos populations cellulaires à l'étude, peu importe l'état de santé du donneur. Ce récepteur, associé à un phénotype de cellules T épuisées et dysfonctionnelles, est beaucoup étudié dans le cadre de thérapie contre le cancer, par l'inhibition des points de contrôle (201). Sa faible expression par nos cellules ayant subi notre protocole d'activation et de culture cellulaire est donc encourageante, ne suggérant pas de phénotype dysfonctionnel. PD-1 était également exprimé en faibles niveaux, légèrement plus élevés chez les cellules DN T comparées aux cellules T CD8⁺ dans le groupe des donneurs diabétiques. Comme mentionné plus haut, un faible niveau d'expression de ce récepteur peut se rapporter davantage au fait que les cellules soient activées, et non épuisées. Finalement, le récepteur Lag-3 est exprimé de façon variable pour les deux populations cellulaires d'intérêt, peu importe le groupe de donneur.

Lag-3 (Lymphocyte Activation Gene-3) est une molécule intéressante, homologue du corécepteur CD4, et peut également lier le CMH de classe II, ainsi que divers autres ligands. L'expression de Lag-3 sur des cellules T peut être associée à une réduction dans la production de cytokines et de granzyme, une réduction dans la prolifération, ainsi qu'un biais de différenciation vers un phénotype régulateur (202). Plusieurs études cliniques se penchent aussi actuellement sur les bénéfices du blocage de récepteur dans le contexte de cancers tels que le mélanome (203). Toutefois, peu est encore connu sur le mécanisme d'action de Lag-3. Il est intéressant de noter que chez des souris NOD déficientes pour la molécule Lag-3 (*Lag3^{-/-}*), une accélération du diabète auto-immun était observée, caractérisé par une plus grande infiltration lymphocytaire des îlots pancréatiques par des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ (204). L'équipe de Tian *et al.*, qui étudie également les cellules DN T, ont rapporté dans un modèle murin transgénique que ces cellules permettaient une protection spécifique à l'antigène dépendant de Lag3 contre l'asthme allergique (78). Ainsi, le fait que les cellules de certains donneurs semblent exprimer davantage ce marqueur ne suggère pas nécessairement pour autant un phénotype d'épuisement. Il est également intéressant de noter qu'à la suite du protocole de culture cellulaire, les cellules DN T exprimaient de façon variable le marqueur CD8 α (Figure 3.7), un marqueur associé à un pouvoir cytotoxique non restreint par le CMH chez des cellules qui ne co-expriment pas CD8 β , telles que les cellules NK ou les cellules DN T (180). Enfin, grâce au marqueur MR1, nous avons noté qu'il y avait parfois des cellules MAIT, soit une autre population de cellules non conventionnelles déjà bien définies dans la littérature (205), qui contaminaient nos échantillons cellulaires, ce qui sera important de prendre en compte dans la suite des analyses.

Ainsi, l'étude de différents marqueurs phénotypiques sur les cellules DN T des donneurs sains et des donneurs atteints du T1D a pu nous éclairer davantage sur leur phénotype et le statut fonctionnel. Toutefois, il serait important de refaire cette étude phénotypique sur des cellules DN T humaines à l'état *ex vivo*, afin de pouvoir évaluer le changement d'expression de différents marqueurs suite à notre protocole d'activation et de culture cellulaire. Puisque les cellules DN T circulent en très faible proportion dans le sang périphérique des humains, un volume de sang plus élevé devra être prélevé chez les donneurs. Les études phénotypiques sont essentielles à notre compréhension des cellules DN T, mais il était également important d'effectuer des analyses fonctionnelles afin de mieux comprendre leur mode d'action.

Nous avons donc choisi d'évaluer si les cellules DN T humaines, toujours provenant des mêmes donneurs sains et diabétiques, avaient un potentiel cytotoxique envers des lignées cellulaires immortalisées. Un débat dans la littérature existe à savoir quelles sont les cibles des cellules DN T. En effet, plusieurs cibles cellulaires ont été identifiées (43). Nous avons donc choisi d'effectuer nos essais in vitro sur des cellules Jurkat (lymphocyte T de leucémie aiguë), puis sur des cellules de la lignée Nalm (lymphocytes B précurseurs de leucémie) et de la lignée Raji (lymphocytes B du lymphome de Burkitt). Nos résultats ont illustré que les cellules DN T avaient un potentiel cytotoxique comparable à celui des cellules T CD8⁺ envers les cellules immortalisées T et B, peu importe l'état de santé du donneur (Figure 3.9). Toutefois, ce ne sont pas les cellules de tous les donneurs qui étaient capables d'entraîner la mortalité chez les lignées cellulaires. Nous avons également observé une grande variabilité dans les niveaux de perforine et de granzyme relâchées par les cellules DN T et les cellules T CD8⁺ au contact des cellules immortalisées, avec des niveaux élevés, moyens et très faibles. Bien qu'il existe de la variabilité biologique entre les différents donneurs, il était surprenant que les cellules T CD8⁺ de certains donneurs n'aient pas ou presque pas relâché de granules cytotoxiques, puisqu'elles sont reconnues dans la littérature pour ce mode d'action. Il serait donc intéressant d'effectuer des corrélations entre le rendement cellulaire généré par notre protocole d'activation et de culture cellulaire, entre les marqueurs d'activation et d'épuisement tels que CD69 et Lag3 et les niveaux de cytotoxicité observés pour les cellules de chaque donneur. Nous soupçonnons qu'une perte d'efficacité d'un des lots de la cytokine IL-15, utilisée dans notre protocole de culture cellulaire, aurait pu contribuer à la variabilité observée chez les cellules de certains donneurs. Ceci est sous investigation. Nos résultats ont tout de même montré que les cellules DN T, au contact de cellules de lignées immortalisées, pouvaient relâcher de la perforine et de la granzyme. Nos résultats suggèrent également que les cellules DN T peuvent cibler des cellules T et des cellules B transformées. Il serait également intéressant d'évaluer si les cellules DN T utilisent d'autres modes d'action associés à un pouvoir cytotoxique, tels que le mécanisme Fas-FasL. Il est important de mentionner également une limite de la technique d'évaluation de cytotoxicité in vitro, soit le fait que nous avons utilisé un marqueur de viabilité (cascade yellow) pour évaluer la mortalité des lignées cellulaires. En utilisant cette technique, il est possible que la mortalité soit sous-évaluée, puisque la stratégie de sélection électronique n'évalue que les cellules en cours de mortalité, et non des débris cellulaires.

Pour la suite de l'étude des cellules DN T humaines, nous avons voulu voir si le pouvoir cytotoxique observé in vitro pourrait se traduire dans un contexte in vivo, à l'aide du modèle murin NRG. Puisque notre but est de développer une thérapie cellulaire à base de cellules DN T humaines, il est essentiel que ces dernières puissent survivre en périphérie chez les patients, et qu'elles puissent agir sur leurs cellules cibles sans causer de dommage aux autres organes. Ainsi, nous avons voulu savoir si les cellules DN T humaines ayant subi notre protocole d'activation et de culture cellulaire étaient capables de survivre en périphérie chez la souris NRG, et si cette survie était améliorée par l'injection d'IL-15 humain. Il s'est avéré en effet que les cellules T totales et les cellules DN T injectées par voie intraveineuse dans les souris étaient retrouvées dans les organes lymphoïdes de ces dernières, soit la rate et la moelle osseuse, et ce jusqu'à 4 semaines après l'injection si de l'IL-15 humain était également injecté pendant les 3 premières semaines (Figure 3.10). Ces résultats étaient attendus, puisque l'IL-15 est une cytokine importante pour la reconstitution in vivo des cellules T (206). Nous avons par la suite voulu évaluer si l'injection de cellules DN T humaines pouvait protéger les souris NRG d'une xéno-GVHD déclenchée par l'injection de PBMCs humains, méthode documentée dans la littérature (207). Bien qu'une réaction de GVHD soit normalement dépendante de l'incompatibilité entre les complexes majeurs d'histocompatibilité de l'hôte et du donneur, dans ce modèle, les cellules humaines PBMCs sont en mesure de reconnaître les xénoantigènes murins, et s'ensuit ainsi l'infiltration cellulaire d'organes. Une façon de d'évaluer si les souris développent une xéno-GVHD et de suivre leur courbe de poids. Afin de déterminer si les cellules DN T humaines pouvaient inhiber la xéno-GVHD induite par les PMBCs totaux, nous avons comparé la perte de poids dans deux groupes de souris NRG; un groupe a reçu des PBMCs et des cellules DN T humaines et l'autre groupe a reçu des PBMCs et du PBS. Il est possible de voir à partir des résultats que les souris injectées avec cellules DN T humaines maintenaient leur poids pendant plus longtemps que les souris injectées avec du PBS, qui ont dû être sacrifiées plus tôt dû à la perte de 20 % de leur poids initial. Des images d'histologies préliminaires sont présentées dans la section résultats, afin d'illustrer que la xéno-GVHD peut également être évaluée au niveau cellulaire, représentée par une infiltration lymphocytaire dans des organes essentiels tels que le foie, les poumons et les intestins. Toutefois, il est essentiel que cette expérience soit répétée davantage afin de pouvoir corréler le suivi du poids des souris et l'infiltration lymphocytaire observée au microscope, avant de tirer comme conclusion que les cellules DN T protègent de la xéno-GVHD. Il est intéressant de mentionner qu'une

expérience similaire a été documentée par l'équipe de Achita *et al.*, où le pouvoir protecteur des cellules DN T envers une xéno-GVHD était également évalué (85). Toutefois, la méthode de tri et de culture cellulaire utilisée pour obtenir leur rendement cellulaire DN T différait beaucoup de nos méthodes. De plus, des rappels d'injection de cellules DN T ont également été effectués dans leur expérience, ce qui n'était pas le cas dans notre méthodologie. Il est important aussi de mentionner que nos résultats préliminaires indiquent également que les cellules DN T ne causent pas de xéno-GVHD chez les souris NRG, ce qui est une condition essentielle pour le développement d'une nouvelle thérapie cellulaire. Toutefois, il faudrait refaire l'expérience en incluant des souris uniquement injectées avec des cellules DN T. À la lumière de ces résultats préliminaires, il est toutefois intéressant de faire le lien avec la corrélation négative observée entre la proportion de cellules DN T et le degré de sévérité de GVHD chronique chez des patients ayant subi une greffe de cellules souches (84). Ceci illustre donc l'importance des travaux sur le potentiel effet protecteur des cellules DN T envers des pathologies comme la GVHD chronique.

Puisque les cellules DN T sont en mesure de s'attaquer à certains types de cellules tumorales (86, 208-210), nous avons voulu évaluer si elles étaient capables des cibler la lignée cellulaire tumorale de myélome multiple KMS-11 (211). Grâce à la technologie de bioluminescence employée, nous avons pu effectuer un suivi de la progression des tumeurs chez les souris NRG injectées avec des cellules KMS-11 au fil des semaines (Figure 3.11). Il est possible de voir que la bioluminescence captée sur les photos se situait d'abord au niveau des pattes postérieures, puis des pattes antérieures, suggérant que les cellules KMS-11 allaient se loger dans les moelles osseuses des souris. Il était intéressant de noter que lorsque les souris avaient été injectées avec des cellules DN T humaines et de l'IL-15 humain, la bioluminescence captée, et donc la progression de la tumeur, était atténuée lorsqu'on les compare avec les souris injectées avec du PBS pour chaque cohorte respective. Nos résultats précédents ont montré que les cellules DN T humaines injectées dans les souris NRG circulaient dans la moelle osseuse, ce qui pourrait expliquer qu'elles sont en mesure de cibler les cellules KMS-11 dans un contexte *in vivo*. En utilisant la méthodologie de nos essais de cytotoxicité *in vitro*, nous avons également pu montrer que les cellules DN T ciblaient directement les cellules KMS-11. Bien que ces résultats soient encore préliminaires, et qu'il faudra répéter l'expérience avant d'en tirer des conclusions définitives, ceci suggère que les cellules DN T ont bel et bien un potentiel en tant que thérapie cellulaire, particulièrement pour des patients atteints du myélome multiple et candidats à la greffe de cellule souche.

Lorsqu'on regarde un portrait global des derniers résultats discutés jusqu'à maintenant, soit les expériences *in vitro* et *in vivo* de cytotoxicité, il est intéressant de souligner que les cellules DN T ont pu cibler 3 types de cellules B différentes, soit les cellules Nalm, les cellules Raji et les cellules KMS-11. Bien que dans deux des trois pathologies d'intérêt de cette étude, soit le diabète de type 1 et la GVHD, les cellules T sont mises de l'avant comme étant les principales médiatrices des pathologies, il est important de souligner que les cellules B contribuent également à ces dernières, en tant que cellules présentatrices d'auto-antigènes et d'alloantigènes respectivement, ainsi que productrices d'auto-anticorps. Les cellules B représentent donc des cibles intéressantes pour une thérapie cellulaire à base de cellules DN T humaines, et cela justifie les études futures faites sur la question.

Conclusion

Les lymphocytes DN T sont une population de cellules T immunorégulatrices circulant en petite proportion dans le sang périphérique (1-5 %) et ayant la particularité d'inhiber les réponses immunitaires de façon spécifique à l'antigène. Des résultats précédents du laboratoire ont démontré sur des modèles murins qu'un transfert de cellules T DN contribuait à diminuer l'incidence du diabète de type 1 (T1D). De plus, d'autres groupes ont montré que ces cellules contribueraient également à la suppression de certaines lignées tumorales ainsi qu'à la médiation de la suppression de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Ces cellules présentent donc un grand potentiel d'utilisation en immunothérapie. L'étude présentée dans ce mémoire avait donc pour but d'évaluer le potentiel clinique des cellules DN T humaines en tant que thérapie cellulaire pour des pathologies telles que le diabète de type 1, le myélome multiple et la GVHD. Nous nous sommes donc penchés d'abord sur le potentiel de prolifération en culture cellulaire des cellules DN T, en développant un protocole adapté à leurs caractéristiques, qui permettrait de générer un nombre de cellules suffisant pour étudier leur phénotype et leur fonction *in vitro* et *in vivo*. Ensuite, nous avons effectué des études de cytométrie en flux nous permettant de voir que les cellules DN T ayant subi le protocole d'activation et de culture cellulaire optimisé avaient un phénotype activé et non épuisé. Puis, nous avons effectué des études fonctionnelles *in vitro*, révélant que les cellules DN T possédaient un pouvoir cytotoxique similaire aux cellules T CD8⁺ envers les lignées cellulaires tumorales Jurkat, NALM et RAJI. Enfin, des nous avons tiré profit du modèle de souris NRG (NOD-

Rag1^{null}IL2rg^{null}) pour étudier la survie en périphérie des cellules DN T humaines greffées, et leur pouvoir de prévention de la xéno-GVHD et d'un modèle de myélome multiple.

L'ensemble de ces travaux a permis d'élargir les connaissances sur le phénotype et la fonction des cellules DN T chez l'humain, montrant qu'elles possèdent un potentiel thérapeutique intéressant en tant que thérapie cellulaire. Avec l'intégration des traitements médicaux personnalisés dans la médecine moderne, il est important de comprendre comment la modulation des cellules de notre propre système immunitaire pourrait nous aider à traiter certaines pathologies auto-immunes et néoplasiques.

Références bibliographiques

1. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *The Lancet*. 2009;373(9668):1033-40.
2. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental & Molecular Medicine*. 2018;50(12):1-11.
3. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106.
4. Lowy DR. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. *J Clin Invest*. 2016;126(1):5-11.
5. Melief CJM, van Hall T, Arens R, Ossendorp F, van der Burg SH. Therapeutic cancer vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(9):3401-12.
6. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(6):360-78.
7. Weber EW, Maus MV, Mackall CL. The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell*. 2020;181(1):46-62.
8. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(15):1159-66.
9. Tran E, Robbins PF, Lu YC, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, et al. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(23):2255-62.
10. Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, Xu H, Lu YC, Zheng Z, et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med*. 2018;24(6):724-30.
11. Heslop HE, Ng CY, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med*. 1996;2(5):551-5.
12. McLaughlin LP, Rouce R, Gottschalk S, Torrano V, Carrum G, Wu MF, et al. EBV/LMP-specific T cells maintain remissions of T- and B-cell EBV lymphomas after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2018;132(22):2351-61.

13. Melenhorst JJ, Leen AM, Bollard CM, Quigley MF, Price DA, Rooney CM, et al. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood*. 2010;116(22):4700-2.
14. Perdigoto AL, Chatenoud L, Bluestone JA, Herold KC. Inducing and Administering Tregs to Treat Human Disease. *Front Immunol*. 2015;6:654.
15. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*. 2015;7(315):315ra189.
16. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011;117(3):1061-70.
17. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature*. 2017;545(7655):423-31.
18. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(5):439-48.
19. Mullard A. FDA approves first CAR T therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(10):669.
20. Zhao L, Cao YJ. Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(2250).
21. Wang Z, Guo Y, Han W. Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment. *Protein Cell*. 2017;8(12):896-925.
22. Maus MV, June CH. Making Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T-cell Therapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1875-84.
23. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine*. 2020;59:102975.
24. Zhang Q, Lu W, Liang CL, Chen Y, Liu H, Qiu F, et al. Chimeric Antigen Receptor (CAR) Treg: A Promising Approach to Inducing Immunological Tolerance. *Front Immunol*. 2018;9:2359.
25. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*. 2021;11(4):69.
26. Mathis D, Benoist C. Back to central tolerance. *Immunity*. 2004;20(5):509-16.

27. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(5):281-94.
28. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:305-34.
29. Lew AM, Pardoll DM, Maloy WL, Fowlkes BJ, Kruisbeek A, Cheng SF, et al. Characterization of T cell receptor gamma chain expression in a subset of murine thymocytes. *Science.* 1986;234(4782):1401-5.
30. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2010;11(1):21-7.
31. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
32. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287-96.
33. Bluestone JA. FOXP3, the Transcription Factor at the Heart of the Rebirth of Immune Tolerance. *J Immunol.* 2017;198(3):979-80.
34. Wei X, Zhang J, Gu Q, Huang M, Zhang W, Guo J, et al. Reciprocal Expression of IL-35 and IL-10 Defines Two Distinct Effector Treg Subsets that Are Required for Maintenance of Immune Tolerance. *Cell Rep.* 2017;21(7):1853-69.
35. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 2004;10(8):801-5.
36. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol.* 2007;178(1):179-85.
37. Yang N, Li Z, Jiao Z, Gu P, Zhou Y, Lu L, et al. A Trichosanthin-derived peptide suppresses type 1 immune responses by TLR2-dependent activation of CD8(+)CD28(-) Tregs. *Clin Immunol.* 2014;153(2):277-87.
38. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):31-8.

39. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000;6(7):782-9.
40. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today.* 2000;21(11):573-83.
41. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol.* 2006;176(2):705-10.
42. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:535-62.
43. Hillhouse EE, Lesage S. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J Autoimmun.* 2013;40:58-65.
44. Le Bourhis L, Martin E, Péguillet I, Guihot A, Froux N, Coré M, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol.* 2010;11(8):701-8.
45. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2005;105(7):2828-35.
46. Dugas V, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Hillhouse EE, Lesage S. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun.* 2010;35(1):23-32.
47. Viret C, Janeway CA, Jr. Self-specific MHC class II-restricted CD4-CD8- T cells that escape deletion and lack regulatory activity. *J Immunol.* 2003;170(1):201-9.
48. Leng Q, Ge Q, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Stage-dependent reactivity of thymocytes to self-peptide--MHC complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(12):5038-43.
49. Zhang ZX, Stanford WL, Zhang L. Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2002;32(6):1584-92.
50. Caveno J, Zhang Y, Motyka B, Teh SJ, Teh HS. Functional similarity and differences between selection-independent CD4-CD8- alphabeta T cells and positively selected CD8 T cells expressing the same TCR and the induction of anergy in CD4-CD8- alphabeta T cells in antigen-expressing mice. *J Immunol.* 1999;163(3):1222-9.
51. Abraham VS, Sachs DH, Sykes M. Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3+CD4-CD8- cell population. *J Immunol.* 1992;148(12):3746-52.

52. Strober S, Dejbachsh-Jones S, Van Vlasselaer P, Duwe G, Salimi S, Allison JP. Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol.* 1989;143(4):1118-22.
53. Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- double-negative T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):739-48.
54. Rensing-Ehl A, Völkl S, Speckmann C, Lorenz MR, Ritter J, Janda A, et al. Abnormally differentiated CD4+ or CD8+ T cells with phenotypic and genetic features of double negative T cells in human Fas deficiency. *Blood.* 2014;124(6):851-60.
55. Giese T, Allison JP, Davidson WF. Functionally anergic lpr and gld B220+ T cell receptor (TCR)-alpha/beta+ double-negative T cells express CD28 and respond to costimulation with phorbol myristate acetate and antibodies to CD28 and the TCR. *J Immunol.* 1993;151(2):597-609.
56. Spits H. Development of $\alpha\beta$ T cells in the human thymus. *Nature Reviews Immunology.* 2002;2(10):760-72.
57. Egerton M, Scollay R. Intrathymic selection of murine TCR alpha beta+CD4-CD8- thymocytes. *Int Immunol.* 1990;2(2):157-63.
58. Takahama Y, Kosugi A, Singer A. Phenotype, ontogeny, and repertoire of CD4-CD8- T cell receptor alpha beta + thymocytes. Variable influence of self-antigens on T cell receptor V beta usage. *J Immunol.* 1991;146(4):1134-41.
59. Halder RC, Kawamura T, Bannai M, Watanabe H, Kawamura H, Mannoor MK, et al. Intensive generation of NK1.1- extrathymic T cells in the liver by injection of bone marrow cells isolated from mice with a mutation of polymorphic major histocompatibility complex antigens. *Immunology.* 2001;102(4):450-9.
60. Johansson M, Lycke N. A unique population of extrathymically derived alpha beta TCR+CD4-CD8- T cells with regulatory functions dominates the mouse female genital tract. *J Immunol.* 2003;170(4):1659-66.
61. Collin R, Lombard-Vadnais F, Hillhouse EE, Lebel M, Chabot-Roy G, Melichar HJ, et al. MHC-Independent Thymic Selection of CD4 and CD8 Coreceptor Negative $\alpha\beta$ T Cells. *J Immunol.* 2020;205(1):133-42.
62. Yamamoto R, Xu Y, Ikeda S, Sumida K, Tanaka H, Hozumi K, et al. Thymic Development of a Unique Bone Marrow-Resident Innate-like T Cell Subset with a Potent Innate Immune Function. *J Immunol.* 2019;203(1):167-77.

63. Mehal WZ, Crispe IN. TCR ligation on CD8⁺ T cells creates double-negative cells in vivo. *J Immunol.* 1998;161(4):1686-93.
64. Merino R, Fossati L, Iwamoto M, Takahashi S, Lemoine R, Ibnou-Zekri N, et al. Effect of long-term anti-CD4 or anti-CD8 treatment on the development of lpr CD4⁻ CD8⁻ double negative T cells and of the autoimmune syndrome in MRL-lpr/lpr mice. *J Autoimmun.* 1995;8(1):33-45.
65. Zhang D, Yang W, Degauque N, Tian Y, Mikita A, Zheng XX. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood.* 2007;109(9):4071-9.
66. Maldonado MA, Eisenberg RA, Roper E, Cohen PL, Kotzin BL. Greatly reduced lymphoproliferation in lpr mice lacking major histocompatibility complex class I. *J Exp Med.* 1995;181(2):641-8.
67. Bruley-Rosset M, Miconnet I, Canon C, Halle-Pannenko O. Mlsa generated suppressor cells. I. Suppression is mediated by double-negative (CD3⁺CD5⁺CD4⁻CD8⁻) alpha/beta T cell receptor-bearing cells. *J Immunol.* 1990;145(12):4046-52.
68. Juvet SC, Zhang L. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol.* 2012;4(1):48-58.
69. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol.* 2003;4(9):815.
70. Ford McIntyre MS, Young KJ, Gao J, Joe B, Zhang L. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J Immunol.* 2008;181(4):2271-5.
71. Young KJ, Zhang L. The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression. *Hum Immunol.* 2002;63(10):926-34.
72. Zhang ZX, Ma Y, Wang H, Arp J, Jiang J, Huang X, et al. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J Immunol.* 2006;177(10):6920-9.
73. Ma Y, He KM, Garcia B, Min W, Jevnikar A, Zhang ZX. Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation.* 2008;15(1):56-63.

74. Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Lesage S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(8):771-80.
75. Gao JF, McIntyre MS, Juvet SC, Diao J, Li X, Vanama RB, et al. Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(9):2699-708.
76. He KM, Ma Y, Wang S, Min WP, Zhong R, Jevnikar A, et al. Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur J Immunol.* 2007;37(12):3455-66.
77. Hwang JR, Byeon Y, Kim D, Park SG. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med.* 2020;52(5):750-61.
78. Tian D, Yang L, Wang S, Zhu Y, Shi W, Zhang C, et al. Double negative T cells mediate Lag3-dependent antigen-specific protection in allergic asthma. *Nature Communications.* 2019;10(1):4246.
79. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med.* 1990;171(5):1393-405.
80. Chen W, Ford MS, Young KJ, Cybulsky MI, Zhang L. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J Immunol.* 2003;170(4):1846-53.
81. Young KJ, Yang L, Phillips MJ, Zhang L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2002;100(9):3408-14.
82. Ye H, Chang Y, Zhao X, Huang X. Characterization of CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells reconstitution in patients following hematopoietic stem-cell transplantation. *Transpl Immunol.* 2011;25(4):180-6.
83. McIver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, Wlodarski M, et al. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2008;141(2):170-8.
84. Hillhouse EE, Thiant S, Moutouou MM, Lombard-Vadnais F, Parat R, Delisle JS, et al. Double-Negative T Cell Levels Correlate with Chronic Graft-versus-Host Disease Severity. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(1):19-25.

85. Achita P, Dervovic D, Ly D, Lee JB, Haug T, Joe B, et al. Infusion of ex-vivo expanded human TCR- $\alpha\beta$ (+) double-negative regulatory T cells delays onset of xenogeneic graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*. 2018;193(3):386-99.
86. Yao J, Ly D, Dervovic D, Fang L, Lee JB, Kang H, et al. Human double negative T cells target lung cancer via ligand-dependent mechanisms that can be enhanced by IL-15. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):17.
87. Young KJ, Kay LS, Phillips MJ, Zhang L. Antitumor activity mediated by double-negative T cells. *Cancer Res*. 2003;63(22):8014-21.
88. Lee J, Minden MD, Chen WC, Streck E, Chen B, Kang H, et al. Allogeneic Human Double Negative T Cells as a Novel Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia and Its Underlying Mechanisms. *Clin Cancer Res*. 2018;24(2):370-82.
89. Ford MS, Chen W, Wong S, Li C, Vanama R, Elford AR, et al. Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur J Immunol*. 2007;37(8):2234-41.
90. Duncan B, Nazarov-Stoica C, Surls J, Kehl M, Bona C, Casares S, et al. Double negative (CD3+ 4- 8-) TCR alphabeta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes. *PLoS One*. 2010;5(7):e11427.
91. Liu T, Cong M, Sun G, Wang P, Tian Y, Shi W, et al. Combination of double negative T cells and anti-thymocyte serum reverses type 1 diabetes in NOD mice. *J Transl Med*. 2016;14:57.
92. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33 Suppl 1(Suppl 1):S62-9.
93. Paschou SA, Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocr Connect*. 2018;7(1):R38-r46.
94. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007;39(7):857-64.
95. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 2008;57(4):1084-92.
96. Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984;33(2):176-83.

97. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Jr., Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDMM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet.* 1997;15(3):293-7.
98. Kavvoura FK, Ioannidis JP. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2005;162(1):3-16.
99. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447(7145):661-78.
100. Bottini N, Vang T, Cucca F, Mustelin T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin Immunol.* 2006;18(4):207-13.
101. Menser MA, Forrest JM, Bransby RD. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet.* 1978;1(8055):57-60.
102. Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(12):5115-20.
103. Hober D, Sane F. Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov Med.* 2010;10(51):151-60.
104. Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW. Diabetes mellitus due to viruses--some recent developments. *Diabetologia.* 1993;36(8):687-95.
105. Hu C, Wong FS, Wen L. Type 1 diabetes and gut microbiota: Friend or foe? *Pharmacol Res.* 2015;98:9-15.
106. Virtanen SM, Saukkonen T, Savilahti E, Ylönen K, Räsänen L, Aro A, et al. Diet, cow's milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia.* 1994;37(4):381-7.
107. Raab J, Giannopoulou EZ, Schneider S, Warncke K, Krasmann M, Winkler C, et al. Prevalence of vitamin D deficiency in pre-type 1 diabetes and its association with disease progression. *Diabetologia.* 2014;57(5):902-8.
108. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2014;383(9911):69-82.
109. Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development.* 1995;121(6):1569-80.

110. Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32(4):468-78.
111. Foulis AK, Stewart JA. The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia*. 1984;26(6):456-61.
112. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(11):635-50.
113. Chen YG, Mathews CE, Driver JP. The Role of NOD Mice in Type 1 Diabetes Research: Lessons from the Past and Recommendations for the Future. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:51.
114. Driver JP, Chen YG, Mathews CE. Comparative genetics: synergizing human and NOD mouse studies for identifying genetic causation of type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2012;9(4):169-87.
115. Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*. 2001;11(3):130-5.
116. Barclay AN. Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(1):47-52.
117. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
118. Hawthorne WJ, Simond DM, Stokes R, Patel AT, Walters S, Burgess J, et al. Subcapsular fetal pig pancreas fragment transplantation provides normal blood glucose control in a preclinical model of diabetes. *Transplantation*. 2011;91(5):515-21.
119. Ellerman KE, Richards CA, Guberski DL, Shek WR, Like AA. Kilham rat triggers T-cell-dependent autoimmune diabetes in multiple strains of rat. *Diabetes*. 1996;45(5):557-62.
120. Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(3):625-40.
121. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355(13):1318-30.

122. Stiller CR, Dupré J, Gent M, Jenner MR, Keown PA, Laupacis A, et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science*. 1984;223(4643):1362-7.
123. Keymeulen B, Walter M, Mathieu C, Kaufman L, Gorus F, Hilbrands R, et al. Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. *Diabetologia*. 2010;53(4):614-23.
124. Pathak V, Pathak NM, O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Medina RJ. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2019;12:1179551419844521.
125. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;364(11):1046-60.
126. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2004;351(18):1860-73.
127. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):689-707.
128. Podar K, Tai YT, Lin BK, Narsimhan RP, Sattler M, Kijima T, et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. *J Biol Chem*. 2002;277(10):7875-81.
129. Lentzsch S, Ehrlich LA, Roodman GD. Pathophysiology of multiple myeloma bone disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21(6):1035-49, viii.
130. Kuo VC, Fenves AZ, Mehta AN. Multiple myeloma presenting as acute renal failure. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2011;24(4):302-5.
131. Rossi M, Botta C, Arbitrio M, Grembiale RD, Tagliaferri P, Tassone P. Mouse models of multiple myeloma: technologic platforms and perspectives. *Oncotarget*. 2018;9(28):20119-33.
132. Radl J, De Glopper ED, Schuit HR, Zurcher C. Idiopathic paraproteinemia. II. Transplantation of the paraprotein-producing clone from old to young C57BL/KaLwRij mice. *J Immunol*. 1979;122(2):609-13.
133. Fowler JA, Mundy GR, Lwin ST, Lynch CC, Edwards CM. A murine model of myeloma that allows genetic manipulation of the host microenvironment. *Dis Model Mech*. 2009;2(11-12):604-11.

134. Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Khalouei S, Gan OI, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1313-23.
135. Mitsiades CS, Mitsiades NS, Bronson RT, Chauhan D, Munshi N, Treon SP, et al. Fluorescence imaging of multiple myeloma cells in a clinically relevant SCID/NOD in vivo model: biologic and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(20):6689-96.
136. Huang YW, Richardson JA, Tong AW, Zhang BQ, Stone MJ, Vitetta ES. Disseminated growth of a human multiple myeloma cell line in mice with severe combined immunodeficiency disease. *Cancer Res.* 1993;53(6):1392-6.
137. Lwin ST, Edwards CM, Silbermann R. Preclinical animal models of multiple myeloma. *Bonekey Rep.* 2016;5:772.
138. Xin X, Abrams TJ, Hollenbach PW, Rendahl KG, Tang Y, Oei YA, et al. CHIR-258 is efficacious in a newly developed fibroblast growth factor receptor 3-expressing orthotopic multiple myeloma model in mice. *Clin Cancer Res.* 2006;12(16):4908-15.
139. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):585-98.
140. Das R, Strowig T, Verma R, Koduru S, Hafemann A, Hopf S, et al. Microenvironment-dependent growth of preneoplastic and malignant plasma cells in humanized mice. *Nat Med.* 2016;22(11):1351-7.
141. Rosenbaum H, Harris AW, Bath ML, McNeill J, Webb E, Adams JM, et al. An E mu-v-abl transgene elicits plasmacytomas in concert with an activated myc gene. *Embo j.* 1990;9(3):897-905.
142. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell.* 2007;11(4):349-60.
143. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(1):101-19.
144. Stewart AK, Richardson PG, San-Miguel JF. How I treat multiple myeloma in younger patients. *Blood.* 2009;114(27):5436-43.

145. Al Hamed R, Bazarbachi AH, Malard F, Harousseau JL, Mohty M. Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2019;9(4):44.
146. Bosi A, Bartolozzi B, Guidi S. Allogeneic stem cell transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(6):2667-9.
147. Bladé J, Rosiñol L. Refining "total therapy" for myeloma. *Blood.* 2010;115(21):4152-3.
148. Yin X, Tang L, Fan F, Jiang Q, Sun C, Hu Y. Allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis from 2007 to 2017. *Cancer Cell Int.* 2018;18:62.
149. Freytes CO, Vesole DH, LeRademacher J, Zhong X, Gale RP, Kyle RA, et al. Second transplants for multiple myeloma relapsing after a previous autotransplant-reduced-intensity allogeneic vs autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(3):416-21.
150. Bashir Q, Qazilbash MH. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Myeloma: When and in Whom Does It Work. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017;12(2):126-35.
151. Raiola AM, Van Lint MT, Valbonesi M, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, et al. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(8):687-93.
152. Martin PJ, Counts GW, Jr., Appelbaum FR, Lee SJ, Sanders JE, Deeg HJ, et al. Life expectancy in patients surviving more than 5 years after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2010;28(6):1011-6.
153. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966;62:21-78.
154. Kuba A, Raida L. Graft versus Host Disease: From Basic Pathogenic Principles to DNA Damage Response and Cellular Senescence. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:9451950.
155. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(2):211-34.
156. Sarantopoulos S, Ritz J. Aberrant B-cell homeostasis in chronic GVHD. *Blood.* 2015;125(11):1703-7.
157. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol.* 2014;15(8):738-48.

158. Dertschnig S, Nusspaumer G, Ivanek R, Hauri-Hohl MM, Holländer GA, Krenger W. Epithelial cytoprotection sustains ectopic expression of tissue-restricted antigens in the thymus during murine acute GVHD. *Blood*. 2013;122(5):837-41.
159. Harless Smith S, Cancro MP. BLyS: the pivotal determinant of peripheral B cell selection and lifespan. *Curr Pharm Des*. 2003;9(23):1833-47.
160. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Cutler CS, Bhuiya NS, Schowalter M, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113(16):3865-74.
161. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012;18(7):1028-40.
162. MacDonald KP, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood*. 2017;129(1):13-21.
163. Schroeder MA, DiPersio JF. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech*. 2011;4(3):318-33.
164. Jaffe BD, Claman HN. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol*. 1983;77(1):1-12.
165. Morris SC, Cheek RL, Cohen PL, Eisenberg RA. Allotype-specific immunoregulation of autoantibody production by host B cells in chronic graft-versus host disease. *J Immunol*. 1990;144(3):916-22.
166. Fukushi N, Arase H, Wang B, Ogasawara K, Gotohda T, Good RA, et al. Thymus: a direct target tissue in graft-versus-host reaction after allogeneic bone marrow transplantation that results in abrogation of induction of self-tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(16):6301-5.
167. Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T, et al. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation*. 2009;87(11):1654-8.
168. van Rijn RS, Simonetti ER, Hagenbeek A, Hogenes MC, de Weger RA, Canninga-van Dijk MR, et al. A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2^{-/-} gammac^{-/-} double-mutant mice. *Blood*. 2003;102(7):2522-31.
169. Pearson T, Shultz LD, Miller D, King M, Laning J, Fodor W, et al. Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma

chain (IL2r gamma null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment. *Clin Exp Immunol.* 2008;154(2):270-84.

170. Choi SW, Reddy P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(9):536-47.

171. Garnett C, Apperley JF, Pavlů J. Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival. *Ther Adv Hematol.* 2013;4(6):366-78.

172. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(6):443-58.

173. Falkenburg JH, Jedema I. Allo-reactive T cells for the treatment of hematological malignancies. *Mol Oncol.* 2015;9(10):1894-903.

174. Falkenburg JHF, Jedema I. Graft versus tumor effects and why people relapse. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017;2017(1):693-8.

175. Donato ML, Siegel DS, Vesole DH, McKiernan P, Nyirenda T, Pecora AL, et al. The graft-versus-myeloma effect: chronic graft-versus-host disease but not acute graft-versus-host disease prolongs survival in patients with multiple myeloma receiving allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(8):1211-6.

176. Poulton TA, Gallagher A, Potts RC, Beck JS. Changes in activation markers and cell membrane receptors on human peripheral blood T lymphocytes during cell cycle progression after PHA stimulation. *Immunology.* 1988;64(3):419-25.

177. Ghazawi FM, Faller EM, Sugden SM, Kakal JA, MacPherson PA. IL-7 downregulates IL-7R α expression in human CD8 T cells by two independent mechanisms. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(2):149-58.

178. Mueller K, Schweier O, Pircher H. Efficacy of IL-2- versus IL-15-stimulated CD8 T cells in adoptive immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2008;38(10):2874-85.

179. Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;410:75-97.

180. Baume DM, Caligiuri MA, Manley TJ, Daley JF, Ritz J. Differential expression of CD8 alpha and CD8 beta associated with MHC-restricted and non-MHC-restricted cytolytic effector cells. *Cell Immunol.* 1990;131(2):352-65.

181. Corbett AJ, Awad W, Wang H, Chen Z. Antigen Recognition by MR1-Reactive T Cells; MAIT Cells, Metabolites, and Remaining Mysteries. *Front Immunol.* 2020;11:1961.

182. Hillhouse EE, Delisle JS, Lesage S. Immunoregulatory CD4(-)CD8(-) T cells as a potential therapeutic tool for transplantation, autoimmunity, and cancer. *Front Immunol.* 2013;4:6.
183. Kirouac DC, Zandstra PW. The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell.* 2008;3(4):369-81.
184. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:411-33.
185. Boise LH, Minn AJ, June CH, Lindsten T, Thompson CB. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5491-5.
186. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(15):8732-7.
187. Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol.* 2012;189(9):4213-9.
188. Chase LG, Yang S, Zachar V, Yang Z, Lakshmiopathy U, Bradford J, et al. Development and characterization of a clinically compliant xeno-free culture medium in good manufacturing practice for human multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(10):750-8.
189. Drake A, Kaur M, Iliopoulou BP, Phennicie R, Hanson A, Chen J. Interleukins 7 and 15 Maintain Human T Cell Proliferative Capacity through STAT5 Signaling. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166280.
190. Nekoua MP, Fachinan R, Fagninou A, Alidjinou EK, Moutairou K, Hober D, et al. Does control of glycemia regulate immunological parameters in insulin-treated persons with type 1 diabetes? *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107868.
191. Förster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):362-71.
192. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett.* 2018;196:22-32.
193. Berard M, Tough DF. Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology.* 2002;106(2):127-38.

194. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.* 2017;47(6):946-53.
195. Bankovich AJ, Shiow LR, Cyster JG. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem.* 2010;285(29):22328-37.
196. Tata A, Brossay L. Role of the KLRG1 pathway in the immune response. *The Journal of Immunology.* 2018;200(1 Supplement):49.9-.9.
197. Tan CL, Peluso MJ, Drijvers JM, Mera CM, Grande SM, Brown KE, et al. CD160 Stimulates CD8(+) T Cell Responses and Is Required for Optimal Protective Immunity to *Listeria monocytogenes*. *Immunohorizons.* 2018;2(7):238-50.
198. Chibueze CE, Yoshimitsu M, Arima N. CD160 expression defines a uniquely exhausted subset of T lymphocytes in HTLV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;453(3):379-84.
199. Agresta L, Hoebe KHN, Janssen EM. The Emerging Role of CD244 Signaling in Immune Cells of the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2018;9:2809.
200. McNERNEY ME, Lee KM, Kumar V. 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8+ T cells. *Mol Immunol.* 2005;42(4):489-94.
201. Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nature Reviews Immunology.* 2020;20(3):173-85.
202. Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, et al. Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T-cells to be suppressed in vivo. *PLoS One.* 2014;9(11):e109080.
203. Ruffo E, Wu RC, Bruno TC, Workman CJ, Vignali DAA. Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3): The next immune checkpoint receptor. *Semin Immunol.* 2019;42:101305.
204. Bettini M, Szymczak-Workman AL, Forbes K, Castellaw AH, Selby M, Pan X, et al. Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3. *J Immunol.* 2011;187(7):3493-8.
205. Hinks TSC, Zhang XW. MAIT Cell Activation and Functions. *Front Immunol.* 2020;11:1014.

206. Huntington ND, Alves NL, Legrand N, Lim A, Strick-Marchand H, Mention JJ, et al. IL-15 transpresentation promotes both human T-cell reconstitution and T-cell-dependent antibody responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(15):6217-22.
207. King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J, et al. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(1):104-18.
208. Xu H, Zhu XX, Chen J. DNT cell inhibits the growth of pancreatic carcinoma via abnormal expressions of NKG2D and MICA in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469(2):145-50.
209. Chen B, Lee JB, Kang H, Minden MD, Zhang L. Targeting chemotherapy-resistant leukemia by combining DNT cellular therapy with conventional chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):88.
210. Lu Y, Hu P, Zhou H, Yang Z, Sun YU, Hoffman RM, et al. Double-negative T Cells Inhibit Proliferation and Invasion of Human Pancreatic Cancer Cells in Co-culture. *Anticancer Res*. 2019;39(11):5911-8.
211. Namba M, Ohtsuki T, Mori M, Togawa A, Wada H, Sugihara T, et al. Establishment of five human myeloma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1989;25(8):723-9.

Annexe 1 – Caractéristique des sujets (25)

	Témoins (n = 11)	Diabétiques (n = 14)
Âge	41.9 ± 10.2	33.9±14.1
Sexe (% hommes)	36 %	57 %
Âge au diagnostic D1T	NA	15.9±12.0
A1C	NA	8.1±1.3
Autres maladies auto-immunes %	NA	N=5 (36 %)

Témoins : 4 hommes + 7 femmes

Diabétiques :8 hommes + 6 femmes

Annexe 2 – Tableau descriptifs des anticorps utilisés pour les expériences de cytométrie en flux

Antigen	Clone	Company	Lot	Isotype	Fluorochrome
CD4	RPA-T4	biolegend	B246615	Mouse IgG1 k	PE-Cy7
CD8a	RPA-T8	Biolegend	B265633	Mouse IgG1 k	PerCP
CD8b	2ST8.5H7	BD Biosciences	280368		BV711
CD25	BC96	Biolegend	B253407	Mouse IgG1 k	FITC
CD45	HI30	Biolegend	B256106	Mouse IgG1 k	Pacific Blue
CD45RO	UCHL1	Biolegend	B274303	Mouse IgG2a k	Pacific Blue
CD56	5.1H11	Biolegend	B278014	Mouse IgG1 k	BV421
CD56	QA17A16	Biolegend	B274952	Mouse IgG1 k	PE
CD69	FN50	Biolegend	B290844	Mouse IgG1 k	FITC
CD95	DX2	Biolegend	B289529	Mouse IgG1 k	APC-Cy7
CD122	TU27	Biolegend	B244461		PE
CD124	G077F6	Biolegend	B261386	Mouse IgG2a k	PE
CD127	A019D5	Biolegend	B316751	Mouse IgG1 k	AF700
CD132	TUGh4	Biolegend	B254266	Mouse IgG2b k	PE

CD160	BY55	Biolegend	B259304	Mouse IgM k	PE
CCR7	G043 H7	Biolegend	B280710	Mouse IgG2a k	PE/Dazzle 594
Lag3	11C3C65	Biolegend	B263715	Mouse IgG1 k	PE-Cy7
2B4	C1.7	BioLegend	B249462	Mouse IgG1 k	Pacific Blue
PD-1	EH12.2H7	Biolegend	B254072	Mouse IgG1 k	APC
Tim-3	F38-2E2	Biolegend	B288654	Mouse IgG1 k	FITC
KLRG1	14C2A07	Biolegend	B281728	Mouse IgG2a k	PE-Cy7
Granzyme B	QA16A02	Biolegend	B272321	Mouse IgG1 k	PE
Perforin	dG9	eBioscience	2151489	Mouse IgG2b k	APC
TCRab	IP26	Biolegend	B259839	Mouse IgG1 k	APC
TCRgd	B1	Biolegend	B241664	Mouse IgG1 k	FITC
Isotype ctrl (for CD124)	MOPC- 173	Biolegend	B250384	Mouse IgG2a k	PE
Isotype ctrl (for CD122)	MOPC-21	Biolegend	B260912	Mouse IgG1 k	PE
Isotype ctrl (for CD127)	MOPC-21	Biolegend	B288791	Mouse IgG1 k	AF700
Isotype ctrl (for CD132)	RTK4530	Biolegend	B231746	Rat IgG2b k	PE

Isotype ctrl (for CD25)	MOPC-21	Biolegend	B131461	Mouse IgG1 k	FITC
-------------------------------	---------	-----------	---------	-----------------	------

Annexe 3 – Formulaire d’information et de consentement (FIC)

FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT (FIC)

Titre de l'étude: Étude de la fonction des lymphocytes prélevés à partir de sang humain de donneurs sains et diabétiques

Numéro du protocole: 10106

Organisme subventionnaire: Fondation Liana's Dream

Chercheur principal: Sylvie Lesage, PhD

Co-chercheur : Aucun

Installation: Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415, boul. de l'Assomption

Montréal, Québec, H1T 2M4

Veillez noter que le terme «FIC» est utilisé pour désigner «Formulaire d'information et de consentement» dans ce document.

INTRODUCTION

Nous vous invitons à participer à un projet de recherche. Cependant, avant d'accepter de participer à ce projet et de signer ce FIC, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent. Vous pouvez apporter une copie non signée du FIC à la maison pour y penser ou pour en discuter avec votre famille ou vos amis avant de prendre une décision.

Ce formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugerez utiles au chercheur responsable du projet ou aux autres membres du personnel affectés au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

BUT(S) DE L'ÉTUDE

L'objectif de ce projet pilote consiste à optimiser les conditions expérimentales de prélèvements et de manutentions de sang humain de donneurs sains et diabétiques afin de caractériser la fonction de différents types de globules blancs et de protéines dans le sang. Dans cette étude, nous étudierons les lymphocytes et plus spécifiquement un nouveau type cellulaire, dénommé cellules DN, ou « doubles négatives ». Nous avons démontré que les cellules DN pourraient être d'intérêt thérapeutique pour le diabète de type 1. En effet, une seule injection de cellules DN est suffisante pour prévenir le diabète de type 1 dans un modèle de souris.

Le but spécifique de ce projet est d'étudier la fonction de différents globules blancs chez les donneurs sains et de les comparer à ceux des patients vivant avec le diabète de type 1. Dans ce but, nous quantifierons l'expression de certaines protéines dans ces cellules et dans le sang pour mesurer l'activité des lymphocytes.

Après cette étude pilote, nous prévoyons déterminer, dans des modèles animaux, s'il serait sécuritaire d'injecter des cellules DN chez les patients diabétiques avant d'entamer une étude clinique. Il est à noter que ces futures études d'intervention ne font pas partie de la présente étude d'observation.

MODALITÉS ET PROCÉDURES DE L'ÉTUDE

Si vous décidez de participer à la présente étude, vous devrez remplir, au cours de la visite de sélection, un questionnaire destiné à déterminer si vous y êtes admissible. On vous questionnera sur vos problèmes de santé passés et actuels ainsi que sur les médicaments que vous prenez.

Après signature du consentement, un seul prélèvement sanguin de 4 tubes de sang de 10 ml et un tube de 5 ml (pour un volume total de sang de moins de 3 cuillères à table) sera effectué le jour même. Ce prélèvement sera acheminé au laboratoire de Sylvie Lesage dans les meilleurs délais afin d'évaluer la fonction des globules blancs et des cellules DN.

Afin d'optimiser la compréhension des analyses faites et permettre une utilisation subséquente judicieuse des données obtenues pendant cette étude pilote, les données suivantes seront collectées :

Sexe

Age

Poids et taille

Antécédent de diabète dans la famille

Condition médicale associée

(Pour le groupe de diabétiques)

Date du diagnostic de diabète.

Date des premiers symptômes de diabète

Perte de poids (nombre de kilos ; associée à polyphagie, ingesta stables ou diminution des ingesta.

Date du début de l'insulinothérapie.

Doses d'insuline

Laboratoires :

Anticorps anti-GAD, C-peptide, HLA DR 3 et DR 4

Hémoglobine glyquée

Toutes les données seront anonymisées et conservées pour utilisation ultérieure dans le cadre d'études qui feront l'objet de soumissions subséquentes au comité d'éthique de la recherche de l'installation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont du CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal.

En aucun moment vous n'aurez à subir de questionnaire, d'intervention ou de visite liés à votre participation à l'étude après le prélèvement.

AVANTAGES

Il se peut que vous retiriez un bénéfice personnel de votre participation à ce projet de recherche, mais on ne peut vous l'assurer. Par ailleurs, les résultats obtenus contribueront à l'avancement des connaissances dans ce domaine.

RISQUES ET DÉSAGRÉMENTS

Il n'y a aucun risque si vous participez à cette étude, sauf ceux associés au prélèvement de sang.

Les risques associés au prélèvement de sang comprennent une douleur légère au point de piqûre, une ecchymose (un bleu), le saignement, l'infection et l'évanouissement.

Risques liés à la grossesse / Contraception

Il n'y a aucun risque lié à la grossesse.

COMPENSATION FINANCIÈRE

Vous ne recevrez aucune compensation financière pour votre participation à cette étude. Les frais de stationnement seront couverts.

INDEMNISATION

Si vous deviez subir quelque préjudice que ce soit par suite de l'administration d'un médicament ou de toute procédure reliée à ce projet de recherche, vous recevrez tous les soins et services requis par votre état de santé, sans frais de votre part.

En acceptant de participer à ce projet, vous ne renoncez à aucun de vos droits ni ne libérez les chercheurs ou l'établissement de leur responsabilité civile et professionnelle.

PARTICIPATION VOLONTAIRE / DROIT DE RETRAIT DE L'ÉTUDE

Votre participation à ce projet de recherche est volontaire. Vous êtes donc libre de refuser d'y participer. Vous pouvez également vous retirer de ce projet à n'importe quel moment, sans avoir à donner de raisons, en faisant connaître votre décision au chercheur responsable du projet ou à l'un des membres du personnel affectés au projet.

Votre décision de ne pas participer à ce projet de recherche ou de vous en retirer n'aura aucune conséquence sur la qualité des soins et des services auxquels vous avez droit ou sur votre relation avec le chercheur responsable du projet et les autres intervenants.

Le chercheur responsable du projet de recherche et le comité d'éthique de la recherche de l'installation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont du CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal, peuvent mettre fin à votre participation, sans votre consentement, si de nouvelles découvertes ou informations indiquent que votre participation au projet n'est plus dans votre intérêt, si vous ne respectez pas les consignes du projet de recherche ou s'il existe des raisons administratives d'abandonner le projet.

Si vous vous retirez ou si vous êtes retiré du projet, l'information déjà obtenue dans le cadre de ce projet sera conservée aussi longtemps que nécessaire pour assurer votre sécurité et aussi celles des

autres sujets de recherche et de rencontrer les exigences réglementaires. Toutefois, aucune nouvelle donnée ne sera prélevée de vos dossiers.

Toute nouvelle connaissance acquise durant le déroulement du projet qui pourrait affecter votre décision de continuer d'y participer vous sera communiquée sans délai verbalement et par écrit.

CONFIDENTIALITÉ

Durant votre participation à ce projet, le chercheur responsable ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements vous concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de ce projet seront recueillis.

Ces renseignements peuvent comprendre les informations contenues dans vos dossiers médicaux concernant votre état de santé passé et présent, vos habitudes de vie ainsi que les résultats de tous les résultats obtenus avec vos échantillons sanguins. Votre dossier peut aussi comprendre d'autres renseignements tels que votre nom, votre sexe, votre date de naissance et votre origine ethnique.

Tous les renseignements recueillis demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi. Afin de préserver votre identité et la confidentialité des renseignements, vous ne serez identifié que par un numéro de code. La clé du code reliant votre nom à votre dossier de recherche sera conservé par le chercheur responsable.

Le chercheur responsable du projet utilisera les données à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques du projet décrits dans le FIC. Ces données seront conservées pendant 25 ans par le chercheur responsable.

Les données pourront être publiées dans des revues spécialisées ou faire l'objet de discussions scientifiques, mais il ne sera pas possible de vous identifier.

À des fins de surveillance et de contrôle, votre dossier de recherche ainsi que vos dossiers médicaux, s'il y a lieu, pourront être consultés par une personne mandatée par le Comité d'éthique de la recherche de l'installation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont du CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal, par l'établissement, ou par une personne mandatée par l'organisme subventionnaire. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

À des fins de protection, notamment afin de pouvoir communiquer avec vous rapidement, vos noms et prénoms, vos coordonnées et la date de début et de fin de votre participation au projet seront conservés pendant un an après la fin du projet dans un répertoire à part maintenu par le chercheur responsable.

Vous avez le droit de consulter votre dossier de recherche pour vérifier les renseignements recueillis, et les faire rectifier au besoin, et ce, aussi longtemps que le chercheur responsable du projet ou l'établissement détiennent ces informations. Cependant, afin de préserver l'intégrité scientifique du projet, vous pourriez n'avoir accès à certaines de ces informations qu'une fois votre participation terminée.

Les résultats de la recherche pourront vous être fournis sur demande lorsque l'étude sera complétée et que les résultats seront publiés.

POSSIBILITÉ DE COMMERCIALISATION

Votre participation au projet de recherche pourrait mener à la création de produits commerciaux. Cependant, vous ne pourrez en retirer aucun avantage financier.

FINANCEMENT DU PROJET DE RECHERCHE

Le chercheur responsable du projet a reçu un financement du Fondation Liana's Dream pour mener à bien ce projet de recherche.

PERSONNES RESSOURCES

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche ou si vous éprouvez un problème ou un effet secondaire que vous croyez relier à votre participation au projet de recherche, vous pouvez communiquer avec **Sylvie Lesage**, chercheure principale, au **(514) 252-3400 poste 4649**.

SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES

Le comité d'éthique de la recherche de l'installation de l'Hôpital Maisonneuve Rosemont du CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal a approuvé ce projet de recherche et en assure le suivi. De plus, il approuvera au préalable toute révision et toute modification apportée au FIC ainsi qu'au protocole de recherche. Vous pouvez joindre ce comité au 514-252-3400, poste 5708.

Pour toute question concernant vos droits à titre de participant à ce projet de recherche ou si vous avez une plainte ou un commentaire à formuler, vous pouvez contacter le commissaire local aux plaintes et à la qualité des services de l'installation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont du CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal au 514-252-3400, poste 3510.

CONSENTEMENT ET SIGNATURES

Numéro et titre de l'étude : 10106 : Étude de la fonction des lymphocytes DN prélevés à partir de sang humain de donneurs sains et diabétiques

Participant de recherche

J'ai pris connaissance du présent FIC. Je reconnais qu'on m'a expliqué le projet, qu'on a répondu à mes questions et qu'on m'a laissé le temps voulu pour prendre une décision.

Je consens à participer à ce projet de recherche aux conditions qui y sont énoncées. Une copie signée et datée du présent FIC me sera remise. Il n'y aura pas de copie supplémentaire de ce document déposée à mon dossier médical; seul l'original sera conservé dans mon dossier de la clinique de recherche.

J'autorise le chercheur à informer mon médecin traitant de ma participation à ce projet :

Oui Non

Nom et adresse du médecin traitant : _____

Nom Signature Date

(lettres moulées)

Personne qui a obtenu le consentement

J'ai expliqué au participant les termes du présent FIC et j'ai répondu aux questions qu'il m'a posées.

Nom Signature Date

(lettres moulées)

Engagement du chercheur principal

Je certifie qu'on a expliqué au participant les termes du présent FIC, que l'on a répondu aux questions que le participant avait à cet égard et qu'on lui a clairement indiqué qu'il demeure libre de mettre un terme à sa participation, et ce, sans préjudice. Je m'engage avec l'équipe de recherche à respecter ce qui a été convenu au FIC et en remettre copie signée au participant.

Nom Signature Date

(lettres moulées)