

2711.3524.10

Université de Montréal

Rôle des cellules T CD8⁺ dans la pathogenèse de l'hépatite auto-immune :
Développement d'un modèle murin transgénique

Par
Amin Fakhfakh

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en Microbiologie et Immunologie

Août 2006

© Amin Fakhfakh, 2006



W

4

U58

2007

V.092

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle des cellules T CD8+ dans la pathogenèse de l'hépatite auto-immune :
Développement d'un modèle murin transgénique

Présenté par :
Amin Fakhfakh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Sylvie Lesage
Président-rapporteur

Dr Idriss Djilali-Saïah
Directeur de recherche

Dr Fernando Alvarez
Codirecteur de recherche

Dr Elie Haddad
Membre du jury

RÉSUMÉ

Introduction : L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie d'étiologie inconnue, caractérisée par la destruction progressive du parenchyme hépatique, suite à une infiltration lymphocytaire. À ce jour, aucun modèle animal développant une HAI chronique et spontanée telle qu'observée chez l'homme n'est décrit.

Objectif : Nous voulons produire un modèle murin double transgénique (Tg) exprimant la nucléoprotéine (NP) du virus LCMV et un TCR spécifique à l'épitope immunodominant de cette NP, dans le but d'induire une HAI spontanée.

Matériel et Méthodes : La nature des chaînes α et β du TCR du clone CD8⁺ (NP18), spécifique au peptide NP₃₉₆₋₄₀₄, a été génotypé par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits de PCR de l'ADN génomique codant pour ces deux chaînes TCR ont été clonés dans deux vecteurs (cassettes) spécifiques à l'expression des TCR chez les souris Tg. L'expression des transgènes TCR α et TCR β par ces cassettes a été analysée par immunofluorescence, par RT-PCR spécifique et par cytométrie en flux sur des cellules T déficientes en chaînes α et β du TCR (58^{-/-}) transfectées par les deux cassettes. La fonctionnalité de ce TCR a été vérifiée pour la production de l'IL-2 par ELISA.

Résultats : Les chaînes α et β du TCR du clone NP18 ont été déterminés comme étant V α 8.5-J α 6.19 et V β 12-D β 2-J β 2.3 par séquençage des produits de PCR et comparaison dans les banques de données. L'expression de ce TCR par les cellules 58^{-/-} transfectées a été déterminée par cytométrie en flux, puis confirmée par immunofluorescence et RT-PCR. Nos résultats montrent que certains clones des cellules 58^{-/-} transfectées produisent de l'IL-2 après stimulation, avec des cellules spléniques chargées avec le peptide NP₃₉₆₋₄₀₄.

Conclusion : Les deux transgènes TCR α et TCR β ont servi pour produire une souris Tg TCR anti-NP₃₉₆₋₄₀₄ qui sera croisée avec une souris Tg exprimant la NP du LCMV dans le foie. La souris double Tg permettra d'étudier les mécanismes de développement d'une HAI spontanée suite à la destruction des hépatocytes par les lymphocytes T CD8⁺.

Mots clés : Hépatite auto-immune, modèle murin double transgénique (Tg), récepteur de cellule T (TCR) transgénique, LCMV-NP, clone NP18, mimétisme moléculaire.

ABSTRACT

Background: Autoimmune hepatitis (AIH) is a disease of unknown etiology characterized by the progressive destruction of the hepatic parenchyma, following lymphocyte infiltration. Thus far, no animal model developing a spontaneous and chronic AIH as observed in humans has been characterized.

Aim: Our aim is to produce a double transgenic (Tg) murine model expressing the LCMV's nucleoprotein (NP) and a TCR specific to its immunodominant epitope, in order to induce a spontaneous AIH.

Methods: The phenotype of clone NP18 (CD8⁺ specific against NP peptide 396-404) TCR's α and β chains was determined by RT-PCR using specific primers. PCR products of these two TCR chains were cloned into two specific vectors (cassettes) allowing their expression in transgenic mice. Expression of the transgenes by these cassettes was assessed by immunofluorescence, by specific RT-PCR and by flow cytometry on transfected T cells defective for TCR α and TCR β chains (58^{-/-}). The functionality of this TCR was checked for production of the IL-2 by ELISA.

Results: TCR α and TCR β chains of clone NP18 were determined as being V α 8.5-J α 6.19 and V β 12-D β 2-J β 2.3 by sequencing of the PCR products and comparison with sequences in databanks. The expression of the TCR by transfected 58^{-/-} cells was tested by flow cytometry, and then confirmed by immunofluorescence and RT-PCR. Our results show that some of the transfected 58^{-/-} produced IL-2 after stimulation with splenic cells charged with peptide NP₃₉₆₋₄₀₄.

Conclusion: The two TCR α and TCR β transgenes have been used to produce an anti-NP₃₉₆₋₄₀₄ TCR Tg mouse that will be crossed with a Tg mouse expressing NP in the liver. The resultant double Tg mouse will allow the study of mechanisms underlying the development of a spontaneous AIH through the destruction of hepatocytes by CD8⁺ T lymphocytes.

Keywords: Autoimmune Hepatitis (AIH), double transgenic (Tg) murine model, transgenic T cell receptor (TCR), LCMV-NP, NP18 clone, molecular mimicry.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-------------|
| LISTE DES TABLEAUX..... | viii |
| LISTE DES FIGURES..... | ix |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | xi |
| REMERCIEMENTS..... | xvi |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| L'IMMUNITÉ..... | 1 |
| Le système immunitaire inné..... | 1 |
| Le système immunitaire adaptatif..... | 3 |
| Structure du récepteur de cellules T..... | 6 |
| Diversité du TCR..... | 9 |
| Maturation des cellules T..... | 14 |
| TOLÉRANCE..... | 16 |
| La tolérance centrale..... | 17 |
| La tolérance périphérique..... | 18 |
| AUTO-IMMUNITÉ..... | 22 |
| Classification des maladies auto-immunes..... | 22 |
| Étiologie..... | 24 |
| Influence du sexe..... | 27 |
| Les facteurs génétiques..... | 28 |
| Les facteurs environnementaux..... | 29 |
| Rôle des cellules T CD8+ dans l'auto-immunité..... | 32 |
| HÉPATITE AUTO-IMMUNE..... | 36 |
| Historique..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| Définition..... | 37 |
| Classification..... | 38 |
| Diagnostique..... | 39 |
| La réponse humorale spécifique à l’HAI..... | 40 |
| Histologie..... | 41 |
| L’aspect immunogénique de l’HAI..... | 42 |
| Facteurs environnementaux | 43 |
| Le foie comme organe lymphoïde périphérique..... | 44 |
| Modèles animaux d’hépatite auto-immune..... | 46 |
| Modèles d’HAI non-transgéniques..... | 47 |
| Modèles animaux modifiés d’HAI..... | 52 |
| Modèles de souris TCR transgéniques de maladies auto-immunes..... | 56 |
| HYPOTHÈSE..... | 61 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | 63 |
| Génotypage du TCR..... | 64 |
| Clonage..... | 65 |
| Transfection..... | 66 |
| Détection de l’expression du TCR par PCR et RT-PCR..... | 67 |
| Immunocytochimie..... | 68 |
| Fonctionnalité du TCR par test de stimulation pour l’IL-2..... | 69 |
| Cytométrie en flux..... | 70 |
| Anticorps et réactifs..... | 71 |
| RÉSULTATS..... | 72 |
| Génotypage du TCR du clone T CD8+ spécifique à la NP-LCMV..... | 72 |
| Confirmation de l’expression d’une seule chaîne TCR α par le clone NP18. | 74 |
| Analyse des séquences des chaînes α et β du TCR NP18..... | 75 |

| | |
|---|------------|
| Clonage des transgènes α et β du TCR NP18 dans des cassettes d'expression..... | 77 |
| Vérification de l'intégration et de l'expression des transgènes des chaînes α et β à partir de leurs cassettes d'expression après transfection dans les cellules T 58-/-..... | 84 |
| Expression du transgène TCR α NP18 à partir du vecteur pIRESpuro2..... | 90 |
| Fonctionnalité du TCR NP18 exprimé par les cellules T 58-/- transfectées transitoirement avec les cassettes d'expression pIRESpuro2-V α 8.5NP18 et pT β -V β 12NP18..... | 92 |
| Fonctionnalité du TCR NP18 exprimé par les cellules T 58-/- transfectées transitoirement avec les cassettes d'expression pT α -V α 8.5NP18 et pT β -V β 12NP18..... | 93 |
| Génération de souris C57BL/6 exprimant le TCR NP18 Tg à partir des constructions de transgènes..... | 97 |
| DISCUSSION..... | 99 |
| Retour sur les fondements du projet..... | 99 |
| Justification du choix des outils qui ont servi à élaborer notre modèle..... | 101 |
| Génotypage des chaînes du TCR : Lesquelles sont les bonnes ?..... | 102 |
| Les principales difficultés du projet..... | 104 |
| En perspective..... | 106 |
| RÉFÉRENCES..... | 108 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I. Exemples de maladies organes-spécifiques et systémiques et de leurs auto-antigènes cibles connus..... | 26 |
| Tableau II. Mécanismes d'activation des cellules T et B autoréactives par des agents infectieux..... | 31 |
| Tableau III. Rôle suggéré des cellules T CD8+ dans différentes maladies auto-immunes et modèles de maladie auto-immunes..... | 33 |
| Tableau IV. Modèles animaux d'hépatite auto-immune induite par des antigènes du foie..... | 48 |
| Tableau V. Souris transgéniques pour l'étude des réponses immunitaires spécifiques au foie..... | 53 |
| Tableau VI. Résultats de la comparaison des différentes régions des chaînes du TCR NP18 avec la banque de données d'IMGT après séquençage des produits de PCR..... | 77 |
| Tableau VII. Séquences d'ADN génomique publiées correspondantes aux différentes régions du TCR NP18 ayant servi à générer des amorces spécifiques..... | 80 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Composition des sous-unités du complexe TCR-CD3 retrouvées sur la surface des cellules T matures..... | 8 |
| Figure 2 : Génomiques du TCR..... | 13 |
| Figure 3 : Maturation des cellules T : L'expression d'un TCR transgénique précède celle d'un TCR endogène..... | 16 |
| Figure 4 : Mécanismes de tolérance..... | 21 |
| Figure 5 : Le développement de l'HAI chez les individus avec une prédisposition génétique est influencé par au moins un facteur environnemental..... | 46 |
| Figure 6 : Plan des manipulations décrites dans la section Matériel et Méthodes... | 63 |
| Figure 7 : Géotypage du TCR NP18..... | 74 |
| Figure 8 : Alignements des séquences d'ADN génomique du TCR NP18 avec celles publiées par IMGT..... | 76 |
| Figure 9 : Amplification du TCR NP18 à partir de l'ADN des cellules NP18 (région L1 à J)..... | 81 |
| Figure 10 : Clonage des transgènes (TCR α et β NP18) dans leurs cassettes d'expression respectives..... | 83 |
| Figure 11 : Vérification de l'intégration des transgènes TCR α et β NP18 dans leurs cassettes d'expression respectives..... | 84 |

| | |
|---|----|
| Figure 12 : Vérification de l'expression des cassettes pT α -V α 8.5NP18 et pT β -V β 12NP18 après transfection transitoire dans les cellules T 58 TCR-/-..... | 85 |
| Figure 13 : Expression et intégration des transgènes lors des transfactions stables..... | 87 |
| Figure 14 : Expression de la chaîne TCR β NP18..... | 89 |
| Figure 15 : Clonage de la chaîne complète (VJC) TCR α NP18 dans le vecteur d'expression pIRESpuro2 contenant le gène de résistance à la puromycine..... | 91 |
| Figure 16 : Production d'IL-2 par les transfectants transitoires de pIRESpuro2-V α 8.5NP18..... | 93 |
| Figure 17 : Expression des transgènes lors des transfactions transitoires..... | 95 |
| Figure 18 : Test de production d'IL-2..... | 97 |
| Figure 19 : Génotypage des souriceaux TCR NP18 transgéniques..... | 98 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------|---|
| aa | Acide aminé |
| ADCC | « Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity » (Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) |
| ADNc | ADN complémentaire |
| Ag | Antigène |
| AICD | « Activation-Induced Cell Death » (Mort cellulaire induite par l'activation) |
| AIRE | « Auto-immune regulator » (Gène régulateur de l'auto-immunité) |
| ALT | Alanines aminotransférases |
| ANA | « Anti-nuclear antibody » (Anticorps anti-noyaux) |
| ANCA | « Atypical perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies » (Anticorps atypiques anti-neutrophiles de cytoplasme) |
| Anti-ASGP-R | « Anti-asiaglycoprotein receptor » (Anti-récepteur de l'asiaglycoprotéine) |
| Anti-LC-1 | « Anti-liver cytosol type 1 » (Anti-cytosol du foie de type 1) |
| Anti-LKM-1 | « Anti-liver kidney microsomes » (Anticorps anti-microsome du foie et du rein) |
| APS-1 | « Auto-immune polyglandular syndrome type 1 » (Syndrome polyglandulaire auto-immune de type 1) |
| AST | Aspartate aminotransférases |
| BCR | « B cell receptor » (Récepteur de cellules B) |
| BSA | « Bovine serum albumin » (Albumine de sérum bovin) |
| CDs | Cellules dendritiques |
| CDR | « Complementarity-determining region » (Région de détermination de complémentarité) |
| CFA | « Complete Freund's Adjuvant » (Adjuvant complet de Freund) |
| CII | Collagène de type II |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CMV | Cytomégalovirus |
| ConA | Concanavaline A |
| CPA | Cellule présentatrice d'antigènes |
| CTL | « Cytotoxic T lymphocyte » (Lymphocyte T cytotoxique) |

| | |
|---------------|--|
| CYP2D6 | Cytochrome P450 2D6 |
| DEPC | « Diethylpyrocarbonate » (Pyrocarbonate de diéthyle) |
| EAE | Encéphalomyélite animale expérimentale |
| ELISA | « Enzyme-linked immunosorbent assay » (Essai par immunosorbant lié à une enzyme) |
| FasL | Fas ligand |
| FITC | « Fluorescein isothiocyanate » (Isothiocyanate de fluorescéine) |
| FR | « Framework region » (Région de charpente) |
| FTCD | « Formiminotransferase cyclodeaminase » (Formiminotransférase cyclodéaminase) |
| GAD | « Glutamic acid decarboxylase » (Décarboxylase d'acide glutamique) |
| GFAP | « Glial fibrillary acidic protein » (Protéine acide fibrillaire gliale) |
| GP33 | Glycoprotéine 33 |
| HA | Hémagglutinine |
| HAI | Hépatite auto-immune |
| HBV | « Hépatitis B virus » (Virus de l'hépatite B) |
| HF | Homogénat de foie |
| HLA | « Human leukocyte antigen » (Antigène humain de leucocyte) |
| HRP | Horseshoe peroxidase |
| HV | « Hypervariable region » (Région hypervariable) |
| i.m. | Intramusculaire |
| i.p. | Intrapéritonéal |
| i.v. | Intraveineux |
| IAIHG | « International Auto-immune Hepatitis Group » (Groupe International de l'Hépatite Auto-immune) |
| IBD | « Inflammatory bowel disease » (Maladies inflammatoires de l'intestin) |
| ICAM-1 | « Intracellular adhesion molecule-1 » (Molécule d'adhésion intracellulaire-1) |
| IDDM | « Insulin-dependent diabetes mellitus » (Diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1) |
| IFN- γ | Interféron- γ |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL | Interleukine |
| IMGT | « IMGT, the international ImMunoGeneTics information system® http://imgt.cines.fr (Initiator and coordinator : Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France). » |
| kDa | Kilodalton |

| | |
|--------|--|
| KO | « Knock out » (Invalidé) |
| LCMV | « Lymphocytic choriomeningitis virus » (Virus de la chorioméningite lymphocytaire) |
| LFA-1 | « Leukocyte function associated antigen-1 » (Antigène-1 associé à la fonction des leucocytes) |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LSEC | « Liver sinusoidal endothelial cells » (Cellules endothéliales sinusoidales du foie) |
| MAI | Maladie auto-immune |
| MBP | « Myelin basic protein » (Protéine basique de myéline) |
| Met | Metallothioneine |
| mTEC | « Medullary thymic epithelial cells » (Cellule épithéliale thymique de la médulla) |
| neo | Gène de résistance à la néomycine |
| NHEJ | « Nonhomologous DNA end-joining » (Raccordement de bouts d'ADN non-homologues) |
| NK | « Natural Killer Cell » (Cellule tueuse naturelle) |
| NKT | « Natural killer T cell » (Cellule T tueuse naturelle) |
| NOD | Non-obèse diabétique |
| NP | Nucléoprotéine |
| NS | Non-structurelle |
| PBS | « Phosphate-buffered saline » (Solution saline avec tampon phosphate) |
| p:CMH | Complexe peptide:CMH |
| PCR | « Polymerase chain reaction » (Réaction de polymérisation en chaîne) |
| PMA | « Phorbol myristate acetate » (Acétate de phorbol myristate) |
| pPCR | Produit de PCR |
| RAG | « Recombination-activating genes » (Gènes activateurs de recombinaison) |
| RIP | « Rat insulin promoter » (Promoteur de l'insuline du rat) |
| RPM | Rotation par minute |
| RS | « Recombination signals » (Signaux de recombinaisons) |
| RT-PCR | « Reverse transcription PCR » (PCR de transcription inverse) |
| s.c. | Sous-cutané |
| SCID | « Severe combined immunodeficiency » (Syndrome d'immunodéficience combinée sévère) |

| | |
|---------------|--|
| SLA/LP | « Soluble liver antigen / liver-pancreas antigen » (Antigène soluble du foie / antigène du foie et du pancréas) |
| SLE | « Systemic lupus erythematosus » (Lupus systémique érythémateux) |
| SMA | « Anti-smooth muscle antibody » (Anticorps anti-muscles lisses) |
| SNC | Système nerveux central |
| Sp | Cellules spléniques |
| TCR | « T cell receptor » (Récepteur de cellule T) |
| TdT | « Terminal deoxynucleotidyl transferase » (Transférase de deoxynucléotidyles terminaux) |
| Tg | Transgénique |
| TGF- β | « Transforming growth factor β -1 » (Facteur de croissance transformant β -1) |
| Th | « Helper T cell » (Cellule T auxiliaire) |
| TLP | « Thymic lymphoid progenitor » (Progéniteur lymphoïde thymique) |
| TLR | « Toll-like receptor » (Récepteur analogue au récepteur « Toll ») |
| TNFA | Gène du TNF- α |
| TNF- α | « Tumor necrosis factor α » (Facteur de nécrose tumorale α) |
| Treg | Cellule T régulatrice |
| TREC | « TCR rearrangement excision circle » (Cercle d'excision de réarrangement de TCR) |
| TTR | Transthyrétine |
| VCAM | « Vascular cell adhesion molecule » (Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire) |
| VHC | Virus de l'hépatite C |

*« Reste devant la porte si tu veux qu'on te l'ouvre.
Ne quitte pas la voie si tu veux qu'on te guide.
Rien n'est fermé jamais, sinon à tes propres yeux. »*

Farid al-Din Attar

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le Dr. Idriss Djilali-Saïah ainsi que mon codirecteur de recherche, le Dr. Fernando Alvarez, sans qui la réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible. Je leur suis reconnaissant de m'avoir ouvert les portes de leurs laboratoires, de m'avoir inculqué la rigueur et la pensée scientifique, mais aussi et surtout de m'avoir guidé et soutenu pendant l'accomplissement de ma maîtrise, par leur expertise et leurs précieux conseils.

Merci au centre de Recherche du CHU Sainte-Justine, au Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, ainsi qu'au Dr. Idriss Djilali-Saïah et au Dr. Fernando Alvarez pour leur soutien financier.

Je remercie également mes collègues de travail au laboratoire, Pascal Lapierre, Kathie Béland, Chantal Piché, Réginald Renous, Gabriel Marceau, ainsi que Vincent Wellemans, qui ont tous grandement contribué par leur aide inestimable à l'aboutissement de mon projet, ainsi que Gabriel Gaudette et Ahmed Badawy pour avoir soigneusement révisé le texte de ce mémoire.

Finalement, je remercie infiniment ma famille qui m'a soutenu moralement et qui a cru en moi, tout au long de mon parcours académique.

INTRODUCTION

Le système immunitaire est constitué de cellules et d'organes spécialisés agissant en synergie par divers mécanismes complexes, dans le but de nous protéger des envahisseurs externes de notre environnement pouvant menacer l'intégrité de notre organisme, envahisseurs qui sont appelés des pathogènes. Il exerce également une surveillance des cellules cancéreuses, de manière à les éliminer avant leur propagation. Une fonction fondamentale de ce système consiste à différencier les constituants du « soi » et du « non-soi », afin d'initier la réponse appropriée. Toutefois, des dérèglements peuvent survenir, entraînant une réponse immunitaire atténuée et l'immunodéficience comme dans le cas du syndrome d'immunodéficience combinée sévère « *severe combined immunodeficiency* » (SCID), ou à l'opposé, une réponse immunitaire exagérée entraînant des maladies auto-immunes (MAI) telles que le diabète de type 1, la sclérose en plaques et l'arthrite rhumatoïde. Les études des MAI par des modèles animaux ont contribué de manière significative à la compréhension des mécanismes responsables de ces dérèglements, ainsi qu'à l'élaboration de stratégies thérapeutiques. Le présent mémoire décrit la génération d'un nouveau modèle murin double transgénique qui pourrait développer une l'hépatite auto-immune (HAI) chronique et spontanée, telle qu'observée chez l'homme, afin d'en éclaircir les mécanismes et les éléments déclencheurs.

L'IMMUNITÉ :

Le système immunitaire inné

L'invasion de l'organisme par des pathogènes est initialement contrée par le système immunitaire inné, qui commence à agir en quelques minutes après l'infection. Ce n'est que lorsque ce système devient insuffisant que le système immunitaire adaptatif (ou spécifique) prend la relève, environ 4 à 7 jours plus tard. L'immunité innée est non-

spécifique et rapide. Sa première ligne de défense inclut trois types de barrières : premièrement, les barrières mécaniques, telles que la peau et les jonctions serrées; deuxièmement, les barrières chimiques, telles que les enzymes (lysozymes dans la salive, la sueur, les yeux/larmes et la pepsine dans l'intestin), un pH acide dans l'estomac et des peptides antibactériens (défensines et cryptidinins) et finalement, les barrières microbiologiques, qui consistent en la compétition entre la flore normale et les microbes envahisseurs. La seconde ligne de défense comporte les cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles). En effet, lorsqu'un microorganisme envahit un tissu, il rencontre des macrophages qui y sont établis. Lorsqu'ils rencontrent un microorganisme, les macrophages s'activent via des récepteurs qui reconnaissent des constituants propres à l'agent infectieux, tels que les lipopolysaccharides (LPS), via les récepteurs analogues au récepteur « Toll » « *toll-like receptors* » (TLR) situés sur sa membrane. Par ce fait, ils entament la phagocytose de l'intrus puis le dégradent dans les lysosomes. De plus, ils sécrètent des cytokines qui amplifient la réaction inflammatoire, telles que les prostaglandines, les leukotriènes, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et le facteur activateur des plaquettes, et qui, par leur effet chimiotactique et vasodilatateur, attirent les neutrophiles au site de l'infection. La troisième ligne de défense, le système du complément, consiste en une cascade de réactions assumées par des protéines du plasma, qui résulte en l'opsonisation des bactéries, mais qui est aussi capable de les éliminer par trois différentes approches : le mécanisme classique, le mécanisme alternatif, et celui de la lectine liant le mannose, toutes ces méthodes aboutissant ultimement à la formation de pores sur la surface de leur cible. Il exerce aussi un effet chimioattractant, recrutant ainsi les cellules du système immunitaire. Finalement, la quatrième ligne de défense est assurée par les cellules tueuses naturelles « *natural killer* » (NK) qui éliminent par apoptose les cellules cancéreuses et celles infectées par un virus et qui ont ainsi des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I altérées [1, 2].

Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif, aussi appelé spécifique ou acquis, est une forme spécialisée de l'immunité n'ayant évolué que chez les vertébrés. Cette forme d'immunité est acquise par le contact avec l'environnement et est spécifique aux envahisseurs. Elle se distingue par 4 caractéristiques : spécificité, adaptation, discrimination entre le soi et le non-soi, et la mémoire. Ses principaux acteurs sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les cellules B et les cellules T.

L'induction de l'immunité adaptative commence par la phagocytose ou la macropinocytose d'un pathogène par les cellules dendritiques (CDs) immatures dans le tissu infecté. Ce sont ces CPA qui font le lien entre l'immunité innée et acquise. Elles vont ensuite migrer aux ganglions lymphatiques par la lymphe durant un processus de maturation, durant lequel leur phénotype change dans le but d'optimiser leur fonction de présentatrices d'antigènes aux lymphocytes naïfs. De cette présentation découlent alors deux types de réponses : cellulaire et humorale.

La réponse cellulaire est dirigée par les cellules T issues de précurseurs de la moelle osseuse ayant fini leur maturation dans le thymus. Celles-ci repèrent des fragments linéaires de peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH des cellules CPA grâce à leur récepteur de cellule T « *T cell receptor* » (TCR). Les CPA dites « professionnelles » (cellules B, CDs et les macrophages) expriment le CMH de classe II et le CMH de classe I, alors que toutes les autres cellules nucléées (à l'exception des neurones) n'expriment généralement que le CMH de classe I. Les CMH sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires, formant à leur domaine distal une pochette de feuillets β surmontée par deux hélices α latérales, accueillant un court peptide antigénique. Elles sont encodées par le système d'antigène humain de leucocyte « *human leukocyte antigen* » (HLA) chez l'homme (qui contient le groupe de gènes le plus polymorphique du génome), permettant ainsi une présentation hautement diversifiée des déterminants antigéniques selon leurs propriétés biochimiques. Les molécules CMH de classe I (H-2 K, D, L chez la souris et HLA-A, B, C chez l'homme)

présentent classiquement des peptides antigéniques dérivés du milieu intracellulaire de 8-10 acides aminés (aa) tels que des antigènes (Ag) viraux générés par le protéasome cytosolique. Toutefois, à la différence des macrophages et des lymphocytes B, les CD8 sont parfois capables de présenter des peptides extracellulaires via des molécules CMH de classe I : on parle alors de présentation croisée. Les molécules CMH de classe II (I-A et I-E chez la souris et HLA-DQ, DR, DP chez l'homme) présentent des peptides dérivés du milieu extracellulaire de 12-19 aa, après endocytose et apprêtement dans les vésicules endocytiques.

La population de cellules T exprimant la molécule de surface CD4 est appelée « auxiliaire » et se lie par l'intermédiaire de ce co-récepteur au CMH de classe II. La fonction effectrice des cellules T CD4+ consiste à soutenir les cellules B, les cellules T CD8+, l'activation des macrophages et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. La population de cellules T exprimant la molécule de surface CD8 est appelée cytotoxique (CTL) et se lie par ce co-récepteur au CMH de classe I des CPA. Ce sous-type a comme fonction d'induire l'apoptose des cellules tumorales ou infectées par un virus, soit par le mécanisme de perforine/granzyme ou par la voie Fas-Fas ligand (FasL). La reconnaissance du peptide antigénique comme telle est réalisée par le récepteur TCR. Ce dernier confère la spécificité du clone T. Comme nous le verrons plus loin, les mécanismes régissant la variabilité du TCR permettent la reconnaissance de jusqu'à 10^8 différents antigènes spécifiques.

La liaison du complexe de TCR (TCR et corécepteur CD4 ou CD8) n'est pas suffisante à l'activation des cellules T naïves. L'hypothèse des deux signaux stipule qu'un deuxième signal est nécessaire (fourni exclusivement par les CPA professionnelles). Les molécules CD28 et CD40L exprimées au niveau de la synapse immunologie des cellules T délivrent un signal de costimulation lorsqu'elles se lient à leurs ligands B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) et CD40 respectivement, exprimées sur les CPA professionnelles. Une fois qu'un clone de cellules T est activé, il prolifère et la costimulation devient inutile à l'exercice de ses fonctions effectrices. Au bout d'environ 25 jours après l'exposition initiale au pathogène, des cellules de ce clone deviennent des

cellules T mémoires de longue durée de vie et prêtes à une éventuelle réexposition, permettant ainsi une réponse plus rapide et plus efficace à cette occasion.

Les cellules T CD4⁺ initialement activées se différencient tout d'abord en cellules T auxiliaires (« *helper T cell* », Th) Th0 produisant de l'IL-2, l'IL-4 et l'interféron- γ (IFN- γ), puis en sous-types Th1 ou Th2, dépendamment du contexte de milieu inflammatoire installé par la réponse innée. Par exemple, L'IL-4 stimule une réponse Th2 et inhibe la réponse Th1, alors que l'IL-12 exerce l'effet inverse. Ces deux sous-types génèrent un profil différent de cytokines inflammatoires. Les cellules Th1 produisent de l'IFN- γ , IL-2 et le TNF- α , qui orientent vers une réponse cytotoxique orchestrée par les CTL, les macrophages et les cellules NK. Quant à elles, les cellules Th2 secrètent l'IL-4, 5, 6, 10, 13 et le facteur de croissance transformant β -1 « *transforming growth factor β -1* » (TGF- β), favorisant une réponse humorale. Il est important de noter que ces deux types de réponses coexistent lors d'une réponse inflammatoire, qu'elles s'inhibent mutuellement et que la balance entre les deux penche vers celle qui est favorisée par les cytokines de l'environnement inflammatoire.

La réponse humorale est orchestrée par les cellules B ayant mûri dans la moelle osseuse, et est soutenue par un profil de réponse Th2. Contrairement aux cellules T qui reconnaissent des antigènes après apprêtement, les cellules B reconnaissent directement l'antigène sur la surface du pathogène en circulation dans le milieu extracellulaire. Cette reconnaissance spécifique est effectuée par les récepteurs de cellules B « *B cell receptor* » (BCR), générés par des mécanismes similaires à ceux du TCR. Ainsi, le clone ayant été stimulé par le BCR et au moins un autre signal de costimulation dans les organes lymphoïdes prolifère et se différencie en plasmocytes, générant la forme soluble de ce BCR spécifique appelé « anticorps » ou « immunoglobuline » (Ig). Les anticorps, dépendamment de leur isotype, exercent différents rôles, soit : la neutralisation de leur molécule cible (toxines, récepteurs, etc.); l'opsonisation qui incite la phagocytose de la molécule cible ; l'activation du complément qui effectuera par la suite la lyse de la bactérie cible et une cytotoxicité à

médiation cellulaire dépendante des anticorps « *antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity* » (ADCC), assumée par les cellules NK.

Comme pour la réponse à médiation cellulaire, il y a aussi un profil Th1 et Th2 de réponse humorale, Th1 étant caractérisé par l'IgG2a et l'IgG3 alors que la réponse Th2 est caractérisée par l'IgG1, l'IgG2b, l'IgA et l'IgE [1, 2].

Structure du récepteur de cellules T

Le récepteur à la surface des lymphocytes T est composé d'un complexe de plusieurs molécules membranaires appelées CD3 (chaînes γ , δ , ϵ , ζ et $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$), impliquées dans l'initiation d'une cascade de signalisation induisant l'activation des cellules T, suite à l'interaction spécifique entre le TCR et le complexe peptide:CMH (p:CMH). L'ensemble des spécificités des clones T pour les différents antigènes constitue le répertoire des cellules T. Ce répertoire reconnaît les antigènes restreints par le CMH, mais tolère les antigènes du soi, par des mécanismes de tolérance centrale et/ou périphérique. Ainsi, un bris de tolérance envers le soi provoque une réponse immune dirigée contre ses propres antigènes tissulaires, et déclenche des maladies de type auto-immunes. La structure des sous-unités responsables de la reconnaissance spécifique de l'antigène a été décrite par cristallographie à rayons X et consiste en un hétérodimère dont la séquence primaire, l'organisation génétique et les modes de réarrangement ressemblent à ceux des Ig. Il possède deux chaînes de polypeptides transmembranaires (~ 50 kDa), composées de domaines (structures tertiaires) appartenant à la superfamille des Ig. Les deux chaînes sont couplées de façon covalente par des ponts disulfure, chacune ayant une partie variable et une constante. Cependant, contrairement aux Ig des cellules B, le TCR n'interagit spécifiquement qu'avec un complexe constitué d'une molécule CMH présentant un peptide antigénique (le complexe p:CMH) et n'existe que sous la forme attachée à la surface d'une cellule T. On distingue deux types de TCR : d'abord, les hétérodimères $\gamma\delta$, exprimées par 1-10 % des cellules T périphériques. Ces cellules sont prédominantes tôt durant le développement des cellules T et dans certains tissus. Ce TCR ne fait pas l'objet de ce mémoire et ne sera donc plus abordé. Ensuite,

les hétérodimères $\alpha\beta$, qui représentent plus de 95 % des cellules T chez les adultes, la chaîne α étant une glycoprotéine acide de 40-60 kDa, alors que la chaîne β est une glycoprotéine basique de 40-50 kDa. Un TCR est composé de deux domaines, un distal et un proximal. Le domaine distal possède un haut niveau de variabilité, d'où son nom de « domaine variable » ($V\alpha$ et $V\beta$). Il confère la spécificité du TCR et lie le peptide antigénique. Il a été proposé par certaines équipes que le $V\beta$ aurait un rôle prédominant dans la reconnaissance du CMH, alors que le $V\alpha$ s'occupe de la spécificité à l'antigène [3-5]. Toutefois, l'altération du $V\beta$ altère aussi l'affinité à l'antigène, en plus de la restriction du CMH [6]. La portion variable est glycosylée et est encodée par la juxtaposition aléatoire de deux gènes $V\alpha$ et $J\alpha$ pour la chaîne α et de trois gènes $V\beta$, $D\beta$ et $J\beta$ pour la chaîne β . On distingue trois régions hypervariables (HV) dans la portion variable, dénotées HV1, HV2 et HV3, cette dernière étant la plus variable. Ce sont ces régions HV qui sont grandement responsables de la diversité du TCR et qui déterminent majoritairement la spécificité du TCR en formant une surface de complémentarité avec l'antigène, ce pourquoi ils sont communément appelés « *complementarity-determining regions* » ou CDRs (CDR1, CDR2, et CDR3). Entre chacune de ces régions se trouve le reste du domaine V qui lui possède moins de variabilité et se divise en quatre régions agissant comme des cadres de structure des feuilletts β appelées régions de charpente « *framework regions* » (FR1 à 4). Le domaine invariable, proximal à la membrane cellulaire est appelé « domaine constant » ($C\alpha$ et $C\beta$). La portion constante est de 138 à 179 acides aminés de longueur, elle est aussi glycosylée et se divise en quatre régions fonctionnelles (C1 à 4) produites par 4 exons. La région C1 est composée de 90-100 aa et contient deux cystéines liant deux feuilletts β à l'intérieur même de la chaîne, formant ainsi un domaine Ig. Une autre cystéine codée par la région C2 serait impliquée dans la formation d'un pont disulfure entre les deux chaînes. La région C3 est une séquence de 20-24 aa, majoritairement hydrophobe, permettant l'attachement à la membrane cytoplasmique (domaine transmembranaire), et possède en plein milieu un aa chargé conservé (lysine) important pour l'interaction avec les autres molécules du complexe CD3. En effet, le récepteur de cellule T est exprimé à la membrane des cellules T avec un complexe de protéines appelé CD3, aussi appelé « TCR invariant » car chaque TCR exprime ces mêmes sous-unités. Il est composé de trois dimères : γ

epsilon ($\gamma\epsilon$), δ epsilon ($\delta\epsilon$), et ou bien deux zêta ($\zeta\zeta$) ou un homodimère zêta ($\zeta\eta$) (Figure 1). Ce complexe est responsable de la transduction d'une cascade de signalisation intracellulaire, par un mécanisme complexe de phosphorylation, et qui aboutit ultimement au recrutement des facteurs de transcription, NF- κ B, NFAT et AP-1. Ces derniers induisent la transcription spécifique des gènes menant à la prolifération et à la différenciation des cellules T. Finalement, la région C4 du TCR forme une très courte queue intracytoplasmique [7-9].

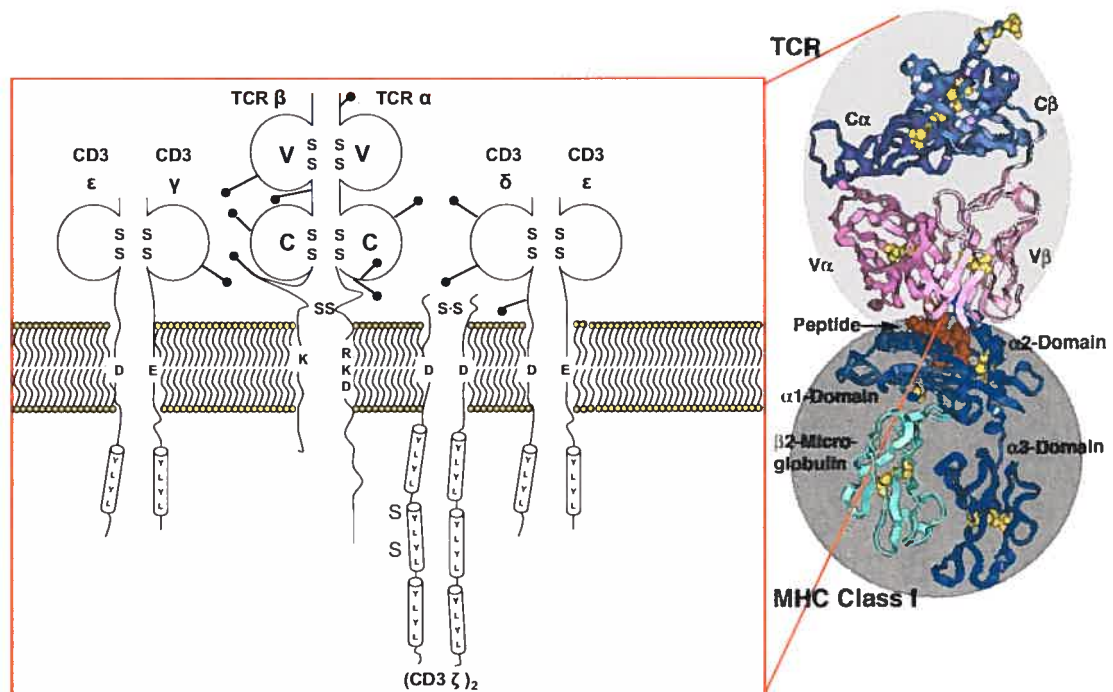


Figure 1 : Composition des sous-unités du complexe TCR-CD3 retrouvées sur la surface des cellules T matures. À gauche : Le complexe TCR-CD3 est le résultat de l'assemblage ordonné du trimère TCR α :CD3 $\delta\epsilon$ combiné au trimère TCR β :CD3 $\gamma\epsilon$ par un pont disulfure (S-S). Ce dernier sous-complexe s'associe finalement à l'homodimère CD3- ζ via une liaison disulfure avant de quitter le réticulum endoplasmique pour rejoindre la surface cellulaire. Les motifs d'activation d'immunorécepteurs à base de tyrosine sont représentés par les cylindres contenant la séquence YLYL. À droite : Le TCR lié au complexe p:CMH. (Figure inspirée de Malissen B, Malissen M. Functions of TCR and pre-TCR subunits : lessons from gene ablation. *Curr Opin Immunol.* 1996. 8:383-93). [8]

Diversité du TCR

Les régions variables du TCR sont encodées par plusieurs éléments distincts d'ADN qui se réarrangent et se rejoignent par recombinaison durant la différenciation des cellules T dans le thymus : les éléments, Variable (V), Diversité (D) et Joint (J) pour le TCR β , et seulement V et J pour le TCR α . Les éléments V sont classifiés en sous-familles dont les membres sont de 70 à 100% identiques. Environ 52 V β et 70 V α ont été identifiés. Certains d'entre eux sont des pseudogènes, contenant des codons-stops prématurés, et ainsi, ne produisent pas de protéines fonctionnelles. Le nombre d'éléments D et J pour les différentes familles des gènes du TCR sont similaires pour l'homme et la souris. On compte actuellement dans le locus α 61 segments J, alors que le locus β comprend deux segments D et 13 segments J. Leur longueur est aussi conservée entre les espèces. Quatre mécanismes ont été décrits pour expliquer la diversité du TCR : la présence de multiples éléments V, D et J au niveau génomique, la juxtaposition combinatoire des éléments V, D et J d'une même famille, la diversité jonctionnelle dans la région hypervariable HV3 due à la soustraction et/ou l'addition aléatoire de nucléotides (N) par l'enzyme transférase de deoxynucléotidyles terminaux « terminal deoxynucleotidyl transferase » (TdT) durant le processus de réarrangement, créant une énorme diversité au niveau de la troisième région hypervariable (HV3, aussi appelée la région de diversité N) et le processus d'association combinatoire, où les chaînes α et β peuvent s'assembler en n'importe quelle combinaison de paires. La recombinaison des différents segments V, D, J, à elle seule génère plus de 1300 variantes de TCR β et plus de 4200 variantes de TCR α . La juxtaposition combinatoire jumelée au potentiel de l'association combinatoire génèrent ensemble plus de 5.8×10^6 différents TCR $\alpha\beta$.

Les gènes des segments TCR V possèdent une importante variabilité au niveau génomique, possiblement due à la sélection naturelle des variantes fonctionnelles. Néanmoins, c'est la région HV3 située à la jonction entre les segments V, (D), et J qui a la plus grande variabilité. Durant le processus de réarrangement, les gènes de ces segments sont modifiés à leurs extrémités par des digestions enzymatiques et par l'addition aléatoire de nucléotides par l'enzyme TdT (région N de variabilité). Environ

2×10^6 variants de TCR sont produits par ce mécanisme. Mis ensemble, tous les mécanismes produisent une diversité maximale théorique de 10^{18} différents TCR $\alpha\beta$. Cependant, le nombre total de lymphocytes T chez une souris est estimé à 10^8 , dont 2×10^7 splénocyte [10]. Donc, seulement une petite fraction du répertoire du TCR potentiel peut être utilisée simultanément. De plus, il a été démontré que la rate de la souris contient approximativement 2×10^6 différents clones de cellules T, et environ 10 cellules de chaque clone à l'état naïf [11].

Le locus du TCR α (chromosome 14) contient environ 70 gènes V α , chacun précédé par un exon codant pour une séquence « *leader* » (L). Cette séquence est à l'origine du codon d'initiation ATG responsable de la transcription du gène V et est séparée du segment V par un intron. Un regroupement de 61 gènes de segments J α est localisé à plusieurs kilobases des gènes V α . Ce regroupement est suivi d'un seul gène C α , qui est composé de 4 exons. Le locus du TCR β (chromosome 7) possède 52 gènes V β , suivi de deux regroupements contenant chacun un gène de segment D, six ou sept gènes de segments J et un seul gène C. Les gènes du segment J sont de 47 à 76 bp, tandis que les éléments D sont très courts (9-16 bp) (Figure 2a). Le mécanisme de recombinaison V(D)J est entamé par les enzymes « *recombination-activating genes* » RAG-1 et RAG-2 et requiert la présence de signaux de recombinaisons (« *recombination signals* », RS) ayant la forme d'un heptamère (5'CACAGTG3') et d'un nanomère (5'ACAAAACCC3') palindromique séparés par des motifs de séquences non-conservées « *spacers* » (espaceurs) de 12 ou 23 pb riches en nucléotides AT, dénotés 12-RS et 23-RS, respectivement. Ces RS se retrouvent à l'extrémité 3' des éléments V (23-RS), à l'extrémité 5' des segments J (12-RS), et aux deux bouts des éléments D (3'12-RS et 5'23-RS) [12-14].

Le mécanisme de recombinaison V(D)J n'a lieu que dans les lymphocytes en développement, entre des segments de gènes ayant des RS conservés et localisés préférentiellement sur le même chromosome. Ce processus est contrôlé de sorte que l'assemblage des gènes du TCR β précède celui des TCR α . De plus, le phénomène d'exclusion allélique (mécanisme qui assure qu'un seul gène et un seul allèle soient exprimés), ne s'applique qu'au TCR β de sorte qu'il soit possible qu'un même clone de

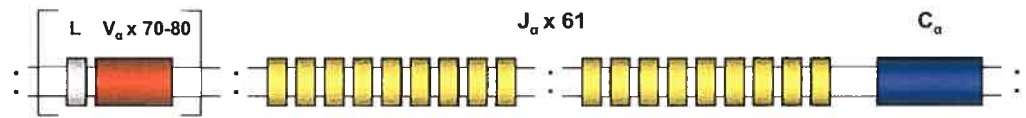
cellule T exprime différents TCR α mais toujours en combinaison avec le même TCR β . Cependant, l'exclusion allélique du TCR β n'opère vraisemblablement que lorsqu'une chaîne pré-Ta et que le complexe CD3 sont exprimés en surface [15].

Tout d'abord a lieu une recombinaison somatique entre un segment de gène V avec un segment J (dans le cas de chaîne α) ou avec un segment J et un segment D (dans le cas de la chaîne β), générant ainsi l'ADN codant pour la région variable du TCR qui comprend une séquence L suivie d'un intron, puis la partie V(D)J. À ce moment, l'ADN codant pour la région constante du TCR n'y est pas encore joint. Ensuite la transcription est réalisée générant un transcrite primaire d'ARN où la portion LV(D)J est présente sur le même brin que la portion C mais n'y est toujours pas jumelée. Ce n'est qu'après épissage entre ces deux portions que l'ARN messager codant pour chacune des protéines des chaînes α et β est généré (Figure 2b).

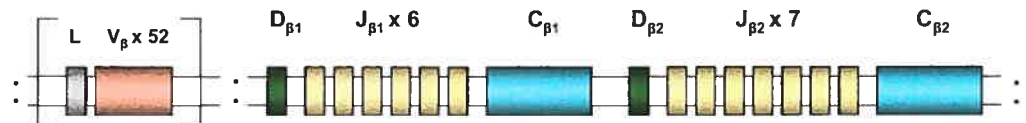
La recombinaison V(D)J ne peut se dérouler qu'entre deux segments de gènes ayant des signaux RS différents (l'un 12-RS et l'autre 23-RS) aux extrémités des segments qui se recombinent. C'est ce qui est appelé la règle 12/23. Les protéines RAG-1 et RAG-2 sont essentielles à l'initiation de ce processus. Cependant, les souris déficientes en RAG-1 et RAG-2 ont un blocage complet du développement des cellules T et B. Il résulte de cette anomalie un syndrome d'immunodéficience combinée sévère [1]. RAG-1 et RAG-2 se lient aux deux signaux RS (12/23), qui ont été apportés à proximité par des mécanismes complexes encore à l'étude, et y introduisent une coupure à double brins. Ensuite, RAG catalyse une réaction de trans-estérification, où le brin codant 3'OH attaque l'ADN du brin opposé, pour former une épingle à cheveux « *hairpin* » à bouts fermés et des bouts francs phosphorylés en 5'. Les quatre bouts ainsi libérés par RAG (deux bouts à signal et deux bouts codants) restent associés par un complexe synaptique stable post-coupure. L'épingle à cheveux doit ensuite être rouverte et traitée avant de compléter le joint. Lorsque cette ouverture a lieu au niveau d'un site différent que celui de la coupure initiale, il se forme des trains d'ADN à simple brin des deux côtés des segments à joindre, formées de quelques nucléotides de la séquence codante et de nucléotides complémentaires de l'autre brin. Cette étape est réalisée par la protéine Artemis qui répare les réticulations inter-brins d'ADN. Des nucléotides sont

subséquentement rajoutés par les enzymes de raccordement de bouts d'ADN non-homologues « *nonhomologous DNA end-joining* » (NHEJ) pour remplir ces bouts cohésifs, ce qui laisse des séquences palindromiques au niveau du joint. De plus, des nucléotides « N-region » peuvent y être ajoutés *de novo* par l'enzyme TdT, ce qui occasionne la variabilité observée à la région HV3 du TCR. Les protéines NHEJ (Artemis, Ku70, Ku80, XRCC4, DNA-PKcs et la DNA Ligase IV) réparent et complètent la formation du joint. À chaque processus de réarrangement, les deux bouts à signaux libérés se referment, créant ainsi un cercle d'excision de réarrangement de TCR fermé « *TCR rearrangement excision circle* » (TREC). Ce sous-produit du réarrangement consiste en un cercle d'ADN extrachromosomal non-répliatif, contenant un signal de joint (formé de deux RS liés) là où il s'est fermé, et sa mesure quantitative permet d'estimer la capacité du thymus de générer des cellules T fonctionnelles [16].

a. **Locus de la chaîne α (non-réarrangé):**



Locus de la chaîne β (non-réarrangé):



b.

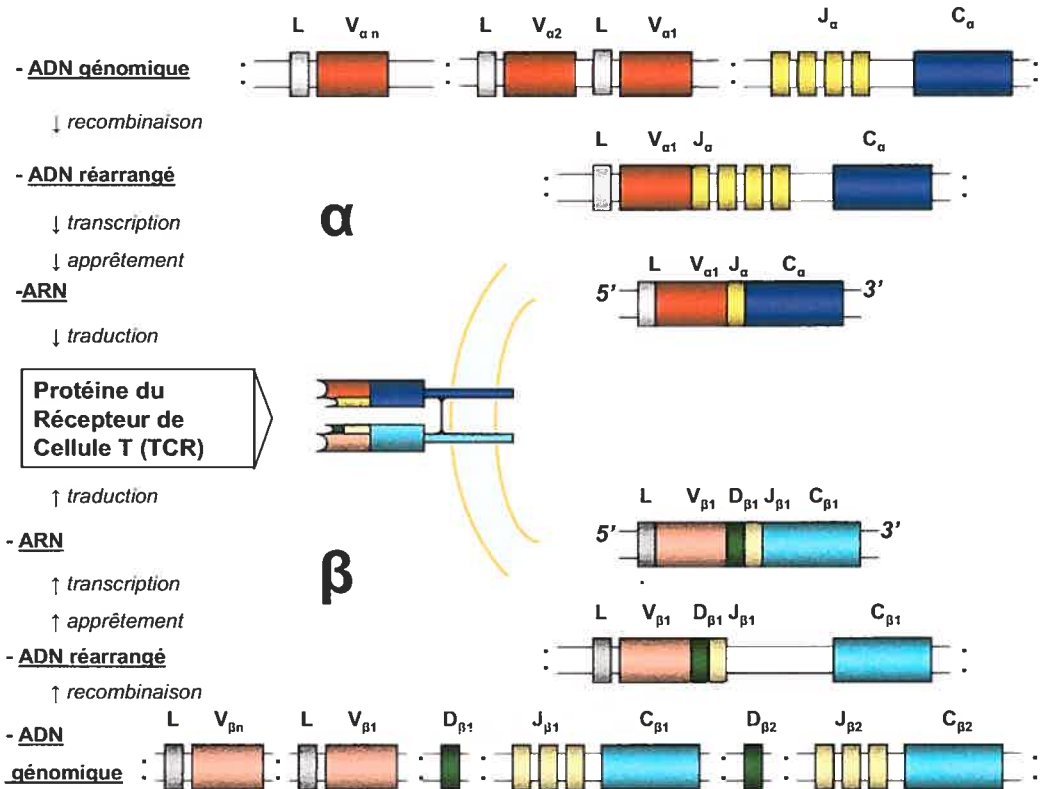


Figure 2 : Génomiques du TCR. a) Organisation génomique du TCR humain : Locus des chaînes α (chromosome 14) et β (chromosome 7) chez l'homme. **b)** Expression et réarrangement des chaînes α et β du TCR. (Adapté de Janeway C. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science; 2005).[1]

Maturation des cellules T

Les progéniteurs lymphoïdes thymiques « *thymic lymphoid progenitors* » (TLPs) sont les thymocytes les plus immatures, et ne sont pas destinés exclusivement à une lignée de cellules T. Ils sont multipotents et peuvent également générer des cellules B, NK et des cellules dendritiques CD8 α +. Ils proviennent des cellules souches hématopoïétiques du foie qui immigrent vers le thymus entre les jours 11 et 12 durant la vie fœtale. Chez l'adulte, ces cellules souches arrivent au thymus à partir de la moelle osseuse. Les TLPs sont CD44+, CD117+CD25-CD4-CD8-. Lorsque stimulés via le récepteur transmembranaire Notch1, principalement, ils sur-régulent l'expression de CD25 (récepteur de l'IL-2) et se différencient en Pro-T CD44+, CD117+, CD25+CD4-CD8-. Les Pro-T, sont les cellules T les plus immatures et ont un phénotype de cellules T activées. À ce stade, elles effectuent plusieurs rondes de prolifération, sous l'action de l'IL-7 et de SCF, avant d'initier le réarrangement du TCR β . Ensuite, elles se différencient en pré-T précoces qui n'expriment plus les marqueurs de cellules souches CD44+ et CD117, prolifèrent moins, mais continuent d'exprimer le CD25. C'est à ce stade que commence le réarrangement du TCR β et l'expression du pré-T α . Elles deviennent des pré-T tardives CD25-CD4-CD8- lorsqu'est exprimé un pré-TCR ayant une chaîne β fonctionnelle et après avoir subi quelques rondes de prolifération. Si le pré-TCR est fonctionnel, le réarrangement du TCR α est initié et les cellules T deviennent double positives (CD4+ CD8+). À partir du moment qu'un TCR $\alpha\beta$ fonctionnel est exprimé, les cellules T deviennent simples positives (CD8+ ou CD4+), CD3+CD25-, selon l'interaction la plus favorable avec le p:CMH de classe I ou de classe II, respectivement, des cellules épithéliales corticales du thymus. Un signal fort via le TCR induirait un phénotype CD4+ par le recrutement des facteurs de transcription Th-POK et GATA-3, alors qu'un signal faible via Notch favoriserait des cellules T CD8+, par le recrutement des facteurs de transcriptions Tox et Runx-3. Les étapes de différenciation de ces lymphocytes dans le thymus et en périphérie sont résumées dans la Figure 3) [17-19].

Pour ce qui est du récepteur des cellules T, ce sont les gènes de la chaîne β du TCR qui se réarrangent toujours avant ceux de la chaîne α . Même au niveau des gènes des segments individuels, l'assemblage se fait dans un ordre particulier : les réarrangements D à J se déroulent en premier, suivis par l'attachement du segment V. Dû aux hauts niveaux de diversité aléatoire, seulement un réarrangement V(D)J sur trois maintient un bon cadre de lecture et est productif. Les cellules T qui produisent un réarrangement non-productif réarrangent leur deuxième allèle du TCR β , de sorte que la majorité (plus que 80 %) des lymphocytes réussit à produire un réarrangement fonctionnel. La chaîne β ainsi produite s'associe tout d'abord par une liaison disulfure avec un substitut de chaîne α (pré-T α) pour former un complexe pré-récepteur (pré-TCR) de 80 kDa au stade des cellules T doubles négatives (CD4-CD8-). La chaîne pré-T α est une glycoprotéine transmembranaire de 33 kDa qui possède une seule structure « *Ig-like* » extracellulaire. Sa portion intracytoplasmique est plus longue que celle de la chaîne α et contient des motifs de signalisation. Le complexe pré-TCR génère un signal via CD3 ϵ et la tyrosine kinase Lck, induisant la prolifération et la différenciation au stade de thymocyte double positif (DP) CD4+CD8+. Cette transition (du double négatif ou double positif) de cellules progéniteurs à précurseurs est aussi accompagnée par l'arrêt du réarrangement des gènes du TCR β et l'activation du réarrangement des gènes du TCR α . Un réarrangement fonctionnel de la chaîne α permet aux lymphocytes T précurseurs de se différencier en lymphocytes immatures exprimant le TCR $\alpha\beta$. Dans le cas où ce dernier réarrangement est non-fonctionnel, un mécanisme de « *receptor editing* » permet le réarrangement successif des gènes du TCR α , jusqu'à ce qu'il y en ait un qui soit fonctionnel, alors que le TCR β réarrangé demeure inchangé [17-19]. Ce mécanisme entraîne également le changement de la spécificité du TCR lorsque les cellules T sont réactives au soi et donc non sélectionnées durant le processus de sélection négative que nous verrons plus loin.

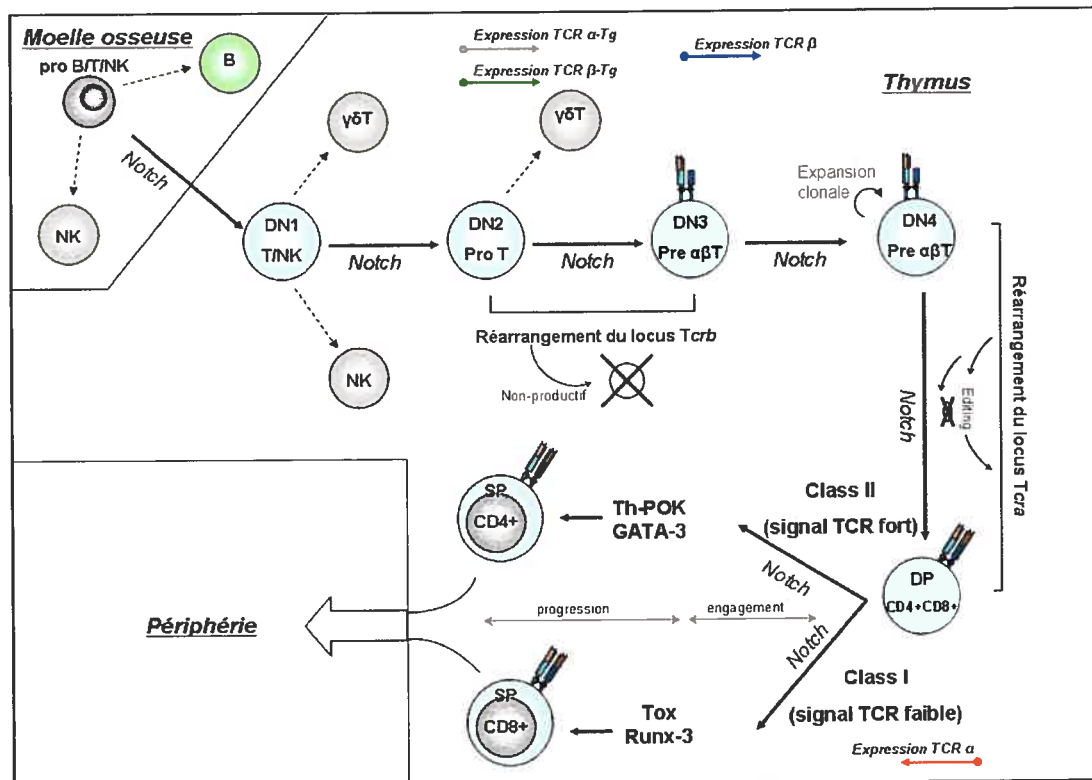


Figure 3 : Maturation des cellules T : L'expression d'un TCR transgénique précède celle d'un TCR endogène. La signalisation par le TCR et Notch permet la différenciation et le développement des lignées des cellules T au niveau du thymus et de la périphérie. Inspiré de *Nature Reviews Immunology* 5, 772-782 (2005); doi:10.1038/nri1707, *current opinion in immunology* 1996, 8:215-224, et *Immunological Reviews* 2006 vol. 209: 274-283.) [17-19]

TOLÉRANCE

Le corps humain produit plus de 10,000 différentes protéines de 300 aa en moyenne, générant après apprêtement environ 3×10^7 différents peptides du soi. Il est donc fondamental de comprendre comment le système immunitaire qui produit un répertoire virtuellement infini est en même temps capable d'éviter la réponse aux antigènes du soi. Les mécanismes empêchant une réponse contre un antigène spécifique du soi (défini comme la tolérance immunologique), peuvent être divisées en deux principales catégories, soit la tolérance centrale qui a lieu dans les organes lymphoïdes

primaires et la tolérance périphérique qui a lieu une fois que les lymphocytes quittent ces organes [1].

La tolérance centrale

La tolérance centrale réfère aux événements tôt dans le développement des lymphocytes qui permettent de concentrer le système immunitaire sur les pathogènes et qui l'empêche de réagir contre les tissus sains. Ce système est induit au site de développement des lymphocytes (la moelle osseuse pour les cellules B et le thymus pour les cellules T) et comprend des mécanismes de sélection (Figure 4a) pour empêcher l'activation des lymphocytes après reconnaissance des antigènes du soi par les récepteurs (TCR ou BCR). Malgré leur efficacité, ces mécanismes ne réussissent pas à éliminer tous les lymphocytes réactifs au soi, c'est pourquoi il existe aussi la tolérance périphérique. Parmi les cellules T en développement, plusieurs produits des réarrangements aléatoires génèrent des récepteurs non fonctionnels, car ces TCR n'arrivent pas à se lier aux complexes p:CMH présents dans le thymus. La sélection positive est donc une étape cruciale que subissent les cellules T au stade double positif (CD4+CD8) et qui permet d'enrichir les cellules T progéniteurs restreints par un CMH, en permettant seulement aux cellules exprimant un TCR interagissant avec un complexe p:CMH de continuer à se différencier. Cette étape a lieu au niveau du cortex thymique, qui est composé d'un dense réseau réticulaire formé de cellules épithéliales corticales thymiques. Conséquemment, les cellules T autoréactives sont également enrichies, augmentant le risque de l'auto-immunité. Heureusement, les progéniteurs les plus autoréactifs sont supprimés par la sélection négative. Durant ce processus, les cellules T ayant un TCR qui se lie avec haute affinité à un auto-antigène sont déléetées par apoptose, de sorte que seuls les progéniteurs possédant une avidité intermédiaire au complexe p:CMH sont aptes pour immigrer aux organes lymphoïdes périphériques et participer aux réponses immunitaires contre les antigènes étrangers. Un facteur important durant la sélection négative est la concentration des antigènes présentés par les cellules épithéliales thymiques de la médulla « *medullary thymic epithelial cells* » (mTECs). Le nombre de chacun des complexes p:CMH sur la surface d'une mTEC varie entre un et 50,000. Donc si un antigène est exprimé faiblement, même si son TCR est de grande

avidité, le clone T ne sera pas éliminé. À l'opposé, une interaction de faible avidité mais en grand nombre résultera en l'élimination du clone T spécifique. Selon l'analyse des transcrits de l'ARN par l'approche des « *microarrays* », les mTECs expriment environ 550 gènes et 28% sont des antigènes tissus-spécifiques du soi, représentant tous les tissus du corps, sauf ceux des sites immunologiques privilégiés. Le gène clé, AIRE, semble être fondamental pour l'expression de ces antigènes tissus-spécifiques dans le thymus, puisqu'une mutation de ce gène engendre un syndrome auto-immun rare chez l'homme appelé « *auto-immune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy* » (APCED). Finalement, seulement 2% des thymocytes doubles positifs survivent après les différents processus de sélection [17, 20, 21].

La tolérance périphérique

La tolérance centrale n'élimine pas toutes les cellules T autoréactives. En effet, une de ses contraintes est que l'auto-antigène doit être exprimé en quantité suffisante dans le thymus pour induire la délétion des clones autoréactifs. D'autre part, une sélection trop rigoureuse risque de diminuer dangereusement le répertoire de cellules T disponibles. Il devient alors plus rentable de laisser échapper quelques clones autoréactifs qui seront ultérieurement neutralisés par des mécanismes de tolérance périphérique. Les mécanismes de la tolérance périphérique seront divisés en ceux qui sont intrinsèques aux cellules T et ceux qui font appel à d'autres sous-types cellulaires (CDs et cellules T régulatrices (Treg)) et que l'on nommera extrinsèques aux cellules T (Figure 4b). Les mécanismes intrinsèques éliminent les clones autoréactifs par l'induction de l'ignorance, l'anergie, la suppression par apoptose et la déviation de phénotype.

L'ignorance survient lorsque l'auto-antigène est séquestré dans des sites immunologiques privilégiés et donc inaccessibles aux cellules T spécifiques. C'est le cas au niveau de la prostate, des cartilages, du placenta, des testicules et l'utérus. L'ignorance peut aussi être due au fait que l'antigène n'est pas présent en quantité suffisante pour atteindre le seuil d'activation des cellules T.

Comme mentionné plus haut, les cellules T naïves ont besoin de signaux de costimulation pour être activées. L'expression de ces molécules de costimulation est restreinte, de sorte que la majorité de cellules de l'organisme n'ont ni les molécules B7.1/B7.2 ou CD40 ou aucun des deux. Ces cellules n'expriment pas non plus les molécules du CMH de classe II à l'état normal. Donc, la majorité des tissus présentent des peptides endogènes uniquement sur les molécules du CMH de classe I sans exprimer des molécules de costimulation ou du CMH de classe II, qui sont induites seulement par des médiateurs de l'inflammation tel que l'IFN- γ . L'interaction de cellules T avec des cellules n'ayant pas de molécules de costimulation provoque un état réfractaire appelé anergie pour ces lymphocytes T.

Même si un clone autoréactif devient activé, la tolérance peut encore être maintenue si la nature de la réponse est de façon telle que les effets pathogéniques sont évités. Ceci peut être accompli par le contrôle de la balance Th1/Th2. En effet, une réponse Th2 a été associée avec l'inhibition du processus auto-immun impliqué dans l'encéphalomyélite animale expérimentale (EAE) [22] et le diabète [23].

Le mécanisme le plus efficace pour prévenir l'auto-immunité est sans doute la délétion des clones autoréactifs par la mort cellulaire induite par l'activation, « *activation-induced cell death* » (AICD). Après qu'un clone T ai été activé (et particulièrement suite à une stimulation antigénique répétitive), il devient susceptible à l'apoptose par l'interaction des molécules Fas-FasL. Cette interaction est critique et joue un rôle majeur dans l'élimination de la majorité des T CD4+ et CD8+ activées suite à la stimulation antigénique [21].

La tolérance périphérique extrinsèque aux cellules T est élaborée tout d'abord par les CD. Il est connu que les CD immatures, n'ayant pas encore développées leur capacité de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, induisent la tolérance spécifique aux antigènes qu'elles présentent [24]. Une des théories expliquant comment les CD régulent la décision entre l'induction de la tolérance et l'immunité suggère que les CD possèdent des récepteurs TLR reconnaissant des patrons définis conservés de pathogènes (LPS, lipoprotéines, peptidoglycans, lipoarabinomannan et des motifs

d'ADN non-méthylés (CpG). La liaison de ces récepteurs stimule l'expression des molécules de costimulations, molécules d'adhésions, récepteurs de chimiokines et de cytokines activatrices de cellules T. De plus, ces motifs stimulent la maturation des CD, favorisant le développement d'une réponse immune au lieu de la tolérance [25]. La deuxième théorie suggère que lors d'une situation particulière causant la destruction de cellules par nécrose, celles-ci libèrent en même temps des molécules intracellulaires du soi incluant les « *heat-shock proteins* ». Ces dernières servent de signaux de danger et, par l'intermédiaire de récepteurs, stimulent la maturation des CD. Dans le cas où ces signaux de danger sont absents, les CD favoriseraient la tolérance [26].

Un autre mécanisme de tolérance périphérique extrinsèque fait appel aux cellules Treg. Il s'agit de deux sous-types différents de cellules T; ceux qui sont continuellement produits par le thymus et ceux qui résultent de rencontres tolérogéniques en périphérie. En réponse à un antigène, les cellules Treg dérivées du thymus (FOXP3+, CD25+, CTLA-4+) inhibent, par contact cellule-cellule, la prolifération des autres clones T se retrouvant dans le même microenvironnement, même ceux qui répondent à d'autres antigènes. D'autre part, une stimulation répétitive des cellules T avec un alloantigène en présence d'IL-10 leur procure une activité suppressive. Ces cellules suppressives ne prolifèrent pas, expriment CD25 et CTLA-4 et agissent entre autres par la production d'IL10 et de TGF- β [21, 27].

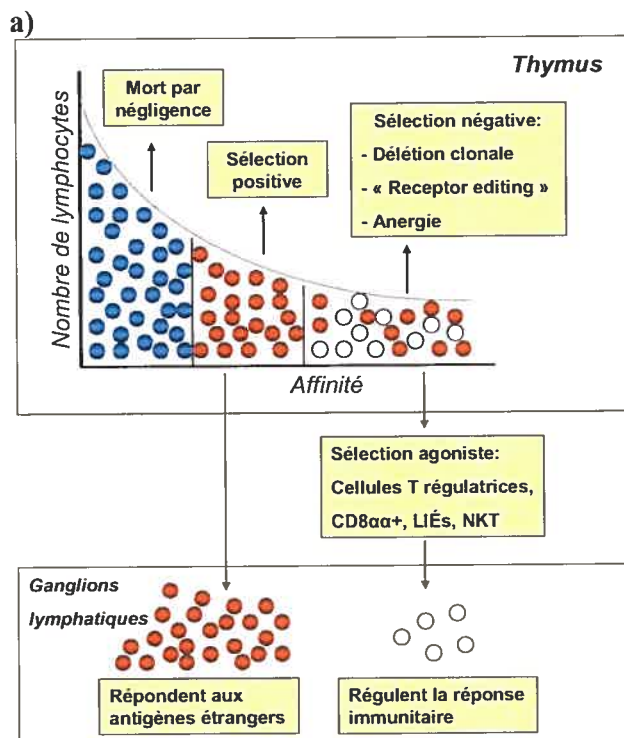
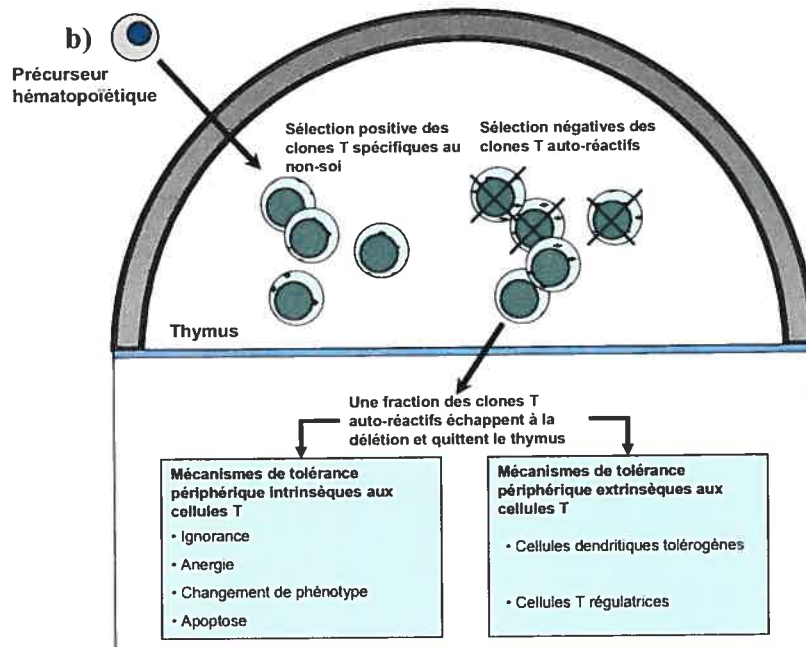


Figure 4 : Mécanismes de tolérance. a) Mécanismes de tolérance centrale. L'avidité du TCR pour le complexe p:CMH et le paramètre crucial qui détermine le sort des thymocytes. Les progéniteurs ayant un TCR sans avidité meurent par négligence (sélection positive). Ceux avec trop d'avidité meurent par sélection négative et ceux ayant une avidité intermédiaire se rendent en périphérie. Certains clones ayant une haute avidité peuvent toutefois se différencier en cellules régulatrices. LIÉs, lymphocytes intestinaux épithéliales; NKT, cellules T natural killer; Cellules T_{Reg} , cellules T $CD4^+CD25^+$ régulatrices. (Adapté de Nature Reviews

Immunology 5, 772-782 (2005); doi:10.1038/nri1707). [17] b) Mécanismes de tolérance périphériques.

Les précurseurs hématopoïétiques migrent au thymus où ils subissent la sélection positive et négative. Les

cellules T qui se rendent en périphérie sont contrôlées par des mécanismes agissant directement sur les cellules T autoréactives (Intrinsèques) ou indirectement via des cellules additionnelles (extrinsèques). (Adapté de Nature Reviews Immunology 2, 11-19 (2002); doi:10.1038/nri701). [21]



AUTO-IMMUNITÉ

Bien que le système immunitaire possède un système élaboré qui assure la tolérance au soi, il n'est toutefois pas infaillible. En 1900, Paul Ehrlich, qui étudiait l'immunité, avait réalisé suite à une expérience où il immunisait des chèvres avec des érythrocytes autologues ou non-autologues, que les puissants mécanismes effecteurs utilisés pour la défense de l'organisme peuvent se retourner contre l'hôte lui-même et causer de sévères dommages tissulaires. Il a nommé ce concept « *horror autotoxicus* », où le système immunitaire initierait une réponse immunitaire contre les tissus du soi. Toute réponse auto-immune était alors perçue comme anormale et devait donc engendrer inévitablement des maladies auto-immunes [28]. Aujourd'hui, il est accepté que certaines réponses auto-immunes soient vitales au développement et au fonctionnement du système immunitaire des vertébrés et crucial au développement de la tolérance immunologique aux autoantigènes. En effet, la persistance des cellules autoréactives dans le répertoire naturel des lymphocytes suggère que l'auto-immunité joue un rôle important dans l'homéostasie de corps [29]. Par exemple, il a été démontré que des auto-anticorps, par l'intermédiaire d'interactions idiopathiques, contribuent à la défense contre des pathogènes, mais aussi à l'élimination des constituants du soi altérés [30]. De plus, Schwartz et al. ont mis en évidence le rôle des cellules T autoréactives dans la maintenance et la guérison des tissus endommagés, et particulièrement le système nerveux [31]. L'auto-immunité ne devient pathogénique que lorsqu'elle est persistante et qu'elle résulte en l'émergence de cellules ou anticorps effecteurs autoagressifs causant des dommages fonctionnels et/ou structurels. Une maladie auto-immune est donc définie comme étant un syndrome clinique causé par l'activation des cellules T ou B ou des deux, dirigées contre les déterminants du soi, en l'absence d'une infection ou d'une cause déterminée. On compte actuellement plus de 70 maladies auto-immunes. Elles affectent environ 8-10% de la population des pays occidentaux.

Classification des maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont regardées d'un point de vue clinique, systémique ou organe-spécifique (Tableau I). Lorsqu'elle est organe-spécifique, la

pathologie ne touche qu'un seul organe, dû aux antigènes spécifiques qui s'y trouvent. Parmi ces pathologies, certaines sont endocrines (tels que le diabète auto-immun, la thyroïdite de Hashimoto et la maladie d'Addison), dermatologiques (pemphigus vulgaris), hématologiques (anémie hémolytique auto-immune) ou neurologiques (sclérose en plaques). Quand plus d'un organe est touché par la pathologie, on la qualifie de systémique. Dans ce cas, les auto-antigènes cibles sont ubiquitaires. Un exemple typique est le lupus systémique érythémateux « *systemic lupus erythematosus* » (SLE), où l'on retrouve des auto-anticorps anti-ADN et anti-noyaux. Le syndrome de Sjörgen, l'arthrite rhumatoïde ainsi que la polymyosite sont également systémiques.

Une classification mécanistique distingue entre les maladies où il y a altération générale de la sélection, de la régulation ou de la mort des cellules T et B, et celles qui résultent d'une réponse aberrante à un antigène particulier. Un exemple de défaut généralisé est l'absence de Fas ou de son récepteur qui sont impliqués dans la mort des lymphocytes activés, alors qu'un désordre dû à un antigène particulier serait le syndrome de démyélination suivant l'infection entérique avec *Campylobacter jejuni*. Une altération du seuil de sélection et d'activation des cellules B autoréactives engendrerait des maladies telles que le SLE. D'autre part, une altération génétique affectant la fonction des cellules Treg et la production des cytokines mène fréquemment au développement des maladies inflammatoires de l'intestin (« *inflammatory bowel disease* », IBD). Ce processus refléterait une sur-activation des cellules T et une réponse exagérée contre la flore gastro-intestinale. Aussi, des changements dans le répertoire des cellules T peuvent causer des maladies systémiques ou organes-spécifiques. Par exemple, une thymectomie des souris néonatales élimine le sous-groupe des cellules régulatrices et entraîne un « *wasting disease* » ou une attaque auto-immune de la thyroïde, des cellules gastriques pariétales ou des ovaires, dépendamment du fond génétique de la souris utilisé. Il est donc évident que la distinction entre les maladies auto-immunes d'un point de vue organe-spécifique et systémique, quoique nécessaire pour les cliniciens, n'est pas toujours pertinente pour la compréhension des mécanismes et des causes responsables des maladies auto-immunes. De même, dans certaines maladies auto-immunes, l'autoréactivité est dirigée contre un antigène ubiquitaire, mais

pourtant, la maladie est restreinte à un organe particulier. Tel est le cas pour le syndrome de Sjörger, où les cibles des auto-anticorps sont les ribonucléoprotéines et pour la polymyosite, où ce sont les synthétases d'ARN de transfert qui servent d'auto-antigènes [32]. Certaines maladies auto-immunes sont causées par les cellules T alors que d'autres sont causées par des auto-anticorps. Parmi les maladies auto-immunes déclenchées par les cellules T CD4+ et/ou CD8+, on retrouve la sclérose en plaques et le diabète de type 1. Dans ces maladies, les auto-anticorps sont aussi produits et servent de marqueurs de la réponse T antigène spécifique, tels que les anti-insulines et les anti-îlots pancréatiques du diabète de type 1. Les maladies initiées par les auto-anticorps, quant à elles, requièrent l'aide des cellules T CD4+ auxiliaires. Les patients avec SLE, par exemple, ont tous des niveaux élevés d'anticorps anti-nucléaires qui, lorsqu'ils forment des complexes immuns, peuvent causer une glomérulonéphrite. Dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, on observe des auto-anticorps dirigés contre des antigènes autres que les articulations, tels que les IgG, la fibrine, la filaggrine, les protéines citrullées et les chaperonines.

Dans tous les cas, il semble que chacune des maladies auto-immunes est tout d'abord initiée par une réponse contre un seul auto-antigène qui est ou n'est pas restreint à un seul organe. Cette hypothèse de « *single initiating antigen* », est supportée par le fait qu'il est possible d'induire expérimentalement une maladie auto-immune par le transfert d'un seul clone T autoréactif. Ensuite, au fur et à mesure que la maladie progresse, la réponse s'élargit par un processus appelé étalement d'épitopes (« *epitope spreading* »), pour inclure les autres molécules et antigènes avoisinants [33].

Étiologie

Bien que l'étiologie des maladies auto-immunes soit inconnue, il est certain que les éléments déclencheurs sont multifactoriels. Les maladies auto-immunes sont contrôlées par des facteurs génétiques et environnementaux. L'incidence plus marquée chez les femmes suggère également une influence contributive par le sexe du patient. Les gènes du patient affectent sa susceptibilité au moins par trois différentes façons. Premièrement, certains gènes affectent la réactivité globale du système immunitaire.

Deuxièmement, cette réactivité altérée est ciblée à certains antigènes ou tissus par l'effet des autres gènes qui contrôlent la reconnaissance spécifique des auto-antigènes. Troisièmement, d'autres gènes agissent sur la capacité des tissus cibles à moduler l'attaque immunitaire. Ces deux derniers groupes de gènes dictent quel antigène/organe sera la cible de l'auto-immunité. De plus, les facteurs environnementaux agissent sur ces mêmes trois groupes de gènes, en affectant la réactivité globale de système immunitaire, la réponse antigène spécifique et l'état du tissu cible potentiel [33].

Tableau I. Exemples de maladies organe-spécifiques et systémiques et de leurs auto-antigènes cibles connus

| <i>Maladie</i> | <i>Organe</i> | <i>Exemples d'auto-antigènes connus</i> | <i>Mécanisme</i> | <i>Prévalence (%)</i> |
|--|--|--|---------------------------------------|-----------------------|
| Maladie auto-immunes organe-spécifiques : | | | | |
| Thyroïdite (auto-immune) | thyroïde | thyroglobuline, thyroïde peroxydase | cellules T/anticorps | 1.0-2.0 |
| Gastrite | estomac | H+/K+ ATPase, facteur intrinsèque | cellules T/anticorps | 1-2% chez > 60 ans |
| Maladie coeliaque | intestin grêle | transglutaminase | cellules T/anticorps | 0.2-1.1 |
| Maladie de Grave | thyroïde | récepteur de l'hormone stimulatrice de la thyroïde | anticorps | 0.2-1.1 |
| Vitiligo | mélanocytes | tyrosinase, protéine-2 reliée à la protéinase | cellules T/anticorps | 0.4 |
| Diabète de type 1 | cellules β du pancréas | insuline, décarboxylase d'acide glutamique | cellules T | 0.2-0.4 |
| Sclérose en plaques | cerveau/colonne vertébrale | protéine basique de la myéline, protéine protéolipide | cellules T | 0.01-0.15 |
| Pemphigus | peau | desmoglénines | anticorps | 0.01 - > 3.0 |
| Hépatite auto-immune | foie | antigènes d'hépatocytes (cytochrome P450) | cellules T/anticorps | <0.01 |
| Myasthénie Gravis | muscle | récepteur de l'acétylcholine | anticorps | <0.01 |
| Cirrhose biliaire primaire | canaux biliaires du foie | complexes de 2-oxacide déshydrogénases | cellules T/anticorps | <0.01 |
| Maladie auto-immunes systémiques : | | | | |
| Arthrite rhumatoïde | joints, poumons, cœur etc. | IgG, fibrine, etc. | cellules T dans les joints?/anticorps | 0.8 |
| Lupus systémique | peau, joints, reins, cerveau, poumons, cœur, autres | antigènes nucléaires (ADN, histones, ribonucléoprotéines), autres | anticorps | 0.1 |
| Polymyosite/dermatomyosite | muscles squelettiques (prédominant), poumons, cœur, joints, autres | antigènes du muscle, aminoacyl-tRNA synthétases, autres antigènes nucléaires | cellules T/anticorps | <0.01 |

(Tiré de *Auto-immune diseases: When and where it occurs. Nature Medicine* 7, 899 - 905 (2001))

doi:10.1038/90935). [33]

Influence du sexe

Depuis plus de 100 ans, il est connu que l'incidence des maladies auto-immunes est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes. Les différences les plus remarquables sont observées dans le syndrome de Sjögren, le lupus systémique, les maladies auto-immunes de la thyroïde (thyroïdite de Hashimoto et la maladie de Basedow) et la sclérodémie, qui représentent un spectre de maladies où les patients sont des femmes dans plus de 80 % des cas [34]. En plus de la différence de prévalence entre les hommes et les femmes, il existe également des différences dans la manifestation de la réponse immunitaire. En effet, suite à une immunisation, les femmes produisent généralement une réponse immunitaire plus forte. Il est à noter que les femmes produisent plus de cytokines de type Th1 et ont un nombre absolu de lymphocytes CD4⁺ plus grand que les hommes. *In vitro*, la production des cytokines IFN- γ , IL-1 et IL-10 augmente significativement en présence d'estrogènes, alors qu'elle diminue (IFN- γ , IL-4 et IL-5) en présence d'androgènes. Ces observations ont porté l'attention sur le rôle des hormones, principalement l'estrogène et la progestérone, en tant que médiateurs des réponses auto-immunes attribuées au sexe. Durant la grossesse, les niveaux d'estrogènes et de progestérones augmentent, spécialement au 3^e trimestre. En concordance avec ces élévations, la sévérité de l'arthrite rhumatoïde, du lupus, de la sclérose en plaques et de la plupart des autres maladies auto-immunes diminue. La fluctuation de la sévérité de la maladie durant la grossesse s'expliquerait par l'environnement hormonal, qui favoriserait une réponse Th2. L'aggravation du SLE durant la grossesse par l'augmentation des auto-anticorps supporte cette idée. De même, les hommes atteints d'arthrite rhumatoïde ont des niveaux de testostérone plus bas. Ainsi, les stéroïdes sexuels peuvent agir directement sur le système immunitaire, en modulant les aspects de la présentation antigénique, l'activation des lymphocytes, l'expression des cytokines et même la migration de cellules immunitaires. L'identification de récepteurs d'estrogène sur les cellules immunitaires explique en partie ces effets. Les hormones peuvent aussi avoir des effets indirects par la modulation de l'axe hypothalamique pituitaire adrénérurgique qui contrôle les niveaux de corticostéroïdes. Les femmes ont habituellement des niveaux plus élevés de

corticostéroïdes que les hommes. Les niveaux d'estrogènes qui diminuent durant la ménopause correspondent à une élévation des corticostéroïdes. D'autre part, les corticostéroïdes inhibent la production des hormones sexuelles. Il y'a donc une interrégulation entre ces deux systèmes hormonaux qui, en collaboration avec les facteurs génétiques et environnementaux, font pencher la balance entre l'auto-immunité et la tolérance [35].

Les facteurs génétiques

Les études épidémiologiques ont démontré que les facteurs génétiques sont des déterminants cruciaux de la susceptibilité aux maladies auto-immunes. Parmi les gènes impliqués dans le développement des maladies auto-immunes, certains agissent directement sur les cellules immunitaires, altérant l'immunoréactivité globale du patient. Ces gènes sont fréquemment non-spécifiques à la maladie. Par exemple, les patients avec SLE ou polymyosite ont souvent des membres de leur famille avec d'autres maladies auto-immunes [36]. En effet, le taux de concordance des maladies auto-immunes est plus élevé chez les jumeaux monozygotes que dizygotes [37-39]. D'autres associations de maladies entre les membres d'une même famille incluent, dans différentes combinaisons, le diabète de type 1, la maladie d'Addison, les syndromes polyendocriniens auto-immuns, le vitiligo et la maladie coeliaque. La cartographie génétique supporte l'hypothèse que certains gènes de susceptibilité contribuent au développement de différentes maladies auto-immunes. Par exemple, un polymorphisme dans le gène de l'IL-2 est associé au développement du diabète « non-obèse diabétique » (NOD) et aussi de l'EAE. Dans des modèles murins, la déficience en IL-2 provoque l'IBD ou l'anémie hémolytique auto-immune, dépendamment du fond génétique. Également, un polymorphisme dans le gène CTLA-4 (codant une protéine qui sous-régule l'activation des cellules T) est associé à la prédisposition au diabète de type 1, la maladie coeliaque et la thyroïdite auto-immune. Quant à elle, une mutation dans le gène AIRE, mène au syndrome polyendocrine auto-immun de type 1 (APS-1). Aussi, le syndrome de lymphoprolifération auto-immun est dû aux mutations affectant la protéine Fas qui induit l'apoptose et sous-régule les réponses immunitaires [33, 36, 40]. Toutefois, il est important de souligner que les gènes prédisposant à l'auto-immunité par

l'altération de l'immunoréactivité globale n'agissent pas nécessairement en augmentant la réactivité du système immunitaire [41, 42]. Aussi, ce ne sont pas tous les gènes qui affectent l'immunoréactivité qui prédisposent à plus d'une maladie auto-immune [33].

Enfin, la plupart des maladies auto-immunes sont multigéniques, avec plusieurs gènes de susceptibilité qui, lorsque combinés, produisent le phénotype observé. Bien entendu, certains gènes confèrent plus de risque que d'autres. C'est le cas de la région du CMH qui contient des gènes contrôlant la présentation et la reconnaissance antigénique. La majorité des maladies auto-immunes sont associées à un gène codant une molécule de HLA de classe I ou II, mais cette association requiert vraisemblablement d'autres gènes de susceptibilité.

Les facteurs environnementaux

Même chez les individus génétiquement prédisposés, un élément déclencheur est vraisemblablement requis pour déclencher une maladie auto-immune. Les études sur des populations génétiquement similaires exposées à différentes conditions environnementales confirment cette supposition. En effet, l'incidence du diabète de type I et de la sclérose en plaques d'une population change lorsqu'elle migre à différentes régions [43, 44]. Les facteurs environnementaux peuvent être le résultat d'agents infectieux (Tableau II) ou non-infectieux.

Agents infectieux :

Lors d'une infection par un pathogène, les produits de certains microbes comme le LPS, l'ADN bactérien et les protéines virales agissent comme adjuvants aux réponses immunitaires. Ces adjuvants stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui favorise l'établissement d'un milieu inflammatoire propice au déclenchement d'une réponse auto-immune. De plus, leur effet inhibiteur de la mort des lymphocytes met en place un plus grand arsenal de cellules T et B en mesure de répondre à un auto-antigène. D'autre part, les infections microbiennes peuvent causer une activation polyclonale des lymphocytes autoréactifs. En tuant les cellules des tissus qu'elles envahissent, le contenu cellulaire est relâché, générant une diversité de peptides du soi pouvant servir

d'auto-antigènes. Considérant le contexte d'une activation polyclonale des lymphocytes, les risques d'auto-réactivité sont donc augmentés. Dans cette optique, une ischémie cardiaque menant à la nécrose engendre des anticorps spécifiques au cœur et provoque une myocardite. Par ailleurs, les pathogènes affectent aussi l'immunoréactivité des individus en changeant la balance Th1/Th2. Les infections bactériennes et virales favorisent généralement une réponse de type Th1 parce qu'elles induisent la production d'IFN- γ , alors que les infections parasitaires par les helminthes favorisent la production d'IL-4 et IL-5, générant ainsi des réponses inflammatoires de types Th2. Donc, les infections bactériennes et virales, directement ou indirectement, prédisposent et/ou aggravent l'auto-immunité, alors que les helminthes et autres parasites qui infectent les tissus muqueux inhibent généralement le développement des réponses auto-immunes.

Plusieurs études décrivent une association entre le déclenchement de MAI et des infections précédentes. Toutefois, on ne sait toujours pas si l'effet adjuvant est suffisant ou si ces infections doivent en plus initier une réponse auto-immunitaire par réaction croisée. En effet, si un pathogène code pour un peptide semblable ou identique à celui de l'hôte, la réponse qui était initialement dirigée contre l'intrus se retourne contre les tissus du soi. Ce concept de « mimétisme moléculaire » a été démontré avec le virus herpès qui provoque une kérato-conjonctivite chez les souris. Les cellules T spécifiques à la protéine virale UL6 réagissent aussi contre un antigène de la cornée [45]. Il existe aussi une réaction croisée chez l'homme entre certains déterminants antigéniques des streptocoques et la myosine du muscle cardiaque, provoquant la fièvre rhumatoïde [46-48]. Dans le syndrome de Guillain-Barré, on détecte des anticorps contre les gangliosides humains spécifiques aux lipopolysaccharides de *C. jejuni* [49]. Des auto-anticorps dirigés contre la décarboxylase d'acide glutamique (GAD) produits par les diabétiques de type 1 reconnaissent aussi un peptide analogue à la protéine P2-C du virus coxsackie [50]. En ce qui concerne la sclérose en plaques, les cellules T spécifiques à un auto-antigène de la myéline semblent également réagir contre certains peptides des virus Epstein-Barr, influenza de type A et du papillomavirus [51]. Tous ces exemples ont en commun que l'inflammation qui était initialement causée par l'infection se poursuit chroniquement par réaction croisée contre les auto-antigènes, même si le

pathogène est éliminé. Il y a néanmoins des conditions nécessaires au développement de ce processus.

Tableau II. Mécanismes d'activation des cellules T et B autoréactives par des agents infectieux

| | |
|---|--|
| Mimétisme moléculaire | Activation des cellules T autoréactives par des peptides microbiens ayant une similarité structurelle suffisante aux peptides du soi. |
| Super-antigènes bactériens et viraux | Activation des cellules T autoréactives qui expriment un segment V β particulier. |
| Apprêtement et présentation augmentés des auto-antigènes | Présentation augmentée des auto-antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes recrutées au site d'inflammation, menant à la sensibilisation des lymphocytes autoréactives. |
| Activation par effet de proximité | Expansion de cellules T ayant déjà été activée au site inflammatoire. |
| Activation des lymphocytes par des virus lymphotropiques | Infection virale des lymphocytes, telle que l'infection des cellules B par le virus de l'hépatite C, résultant en une production d'anticorps augmentée et la formation de complexes immuns circulants. |

(Tiré de Wucherpfennig, K. W. *J. Clin. Invest.* 2001 ; 108:1097-1104). [52]

Agents non-infectieux :

Les facteurs environnementaux non-infectieux incluent bien sûr les changements hormonaux, comme il a déjà été mentionné, et les causes qui leur sont associées, comme le stress. Certains médicaments peuvent également altérer le répertoire et la réponse immunitaire. Par exemple, le procainamide induit des anticorps anti-noyaux (réactifs contre plusieurs antigènes du noyau cellulaire) et provoque occasionnellement des syndromes semblables au lupus [53]. Les pénicillines et les céphalosporines, quant à eux, se lient à la membrane des érythrocytes générant des néo-antigènes, qui induisent la production d'auto-anticorps causant l'anémie hémolytique [54]. Aussi, la gliadine, un composant du gluten du blé, lorsqu'associée à l'enzyme transglutaminase dont elle est le substrat, forme un complexe qui induit la production d'anticorps et une réponse T spécifique contre la gliadine et la transglutaminase [55]. Ces exemples ne sont qu'un

bref aperçu d'éléments qui semblent négligeables à première vue, mais peuvent pourtant provoquer l'auto-immunité [52].

Rôle des cellules T CD8+ dans l'auto-immunité

Il est de plus en plus évident que les cellules T CD8+ contribuent à l'initiation, la progression et la régulation de l'auto-immunité (Tableau III). Ces cellules tuent de façon directe leurs cellules cibles lorsqu'elles reconnaissent spécifiquement le complexe p:CMH, ou indirectement par la sécrétion de cytokines capables de signaler à travers les récepteurs de mort, « *death receptors* », exprimés sur les cellules cibles. Elles secrètent également de cytokines capables d'augmenter la susceptibilité des cellules cibles à la cytotoxicité et qui attirent d'autres cellules immunes au site de l'auto-immunité. D'autre part, les cellules T CD8+ peuvent aussi sous-réguler des réponses auto-immunes. Les mécanismes menant au recrutement et à l'activation de ces cellules que nous aborderons dans cette section permettront d'apprécier l'importance de leur rôle.

Tableau III. Rôle suggéré des cellules T CD8+ dans différentes maladies auto-immunes et modèles de maladie auto-immunes

| Maladie auto-immune | Rôle suggéré des cellules T CD8+ |
|---|---|
| Alopécie areata | Lyse des follicules des cheveux |
| Anémie aplasique | Lyse des progéniteurs hématopoïétiques |
| Arthrite induite par le collagène | Déficiences en cellules T CD8+ prévient la maladie, régulation |
| Arthrite rhumatoïde | La déplétion cause la désintégration des centres germinaux ectopiques |
| Cirrhose biliaire primaire | Lyse des cellules des canaux biliaires |
| Diabète de Type 1 | Lyse des cellules bêta par les systèmes de perforine/granzyme et Fas-FasL, libération des cytokines et de chimiokines |
| Encéphalomyélite auto-immune expérimentale | Pathogénique et régulation |
| Éruption de drogue fixée | Domage épiderme par la libération d'IFN- γ |
| Glomérulonéphrite auto-immune expérimentale | La déplétion des cellules T CD8+ prévient la maladie |
| Hépatite auto-immune | Lyse des Hépatocytes |
| Hypophysite primaire | Lyse des cellules pituitaires |
| IBD | Pathogénique et régulation |
| Lupus systémique érythémateux | Lyse des cellules cibles |
| Maladie de Grave | Suppression de la production de l'IL-2 par les cellules Th2 |
| Maladie de Hashimoto | Lyse des cellules de la thyroïde |
| Maladie de Vogt-Koyanagi-Harada | Lyse des mélanocytes |
| Myasthénie Gravis auto-immune expérimentale | La déplétion ou déficiences en cellules T CD8+ prévient partiellement la maladie |
| Myocardite auto-immune | Lyse des cardiomyocytes par les systèmes de perforine/granzyme et Fas-FasL, régulation |
| Néphrite de Heymann | Lyse des cellules glomérulaires épithéliales |
| Nérite auto-immune expérimentale | La déplétion des cellules T CD8+ prévient partiellement la maladie |
| Ophtalmopathie de Grave | Lyse des fibroblastes rétrobulbaires et/ou fonctions régulatrices |
| Orchite auto-immune expérimentale | Régulation |
| Polymyosite et myosite à inclusions | Lyse des monocytes possiblement par le mécanisme de perforine |
| Psoriasis vulgaris | Principaux effecteurs de la lymphoprolifération des kératinocytes dépendante de l'IFN- γ |
| Sclérose en plaques | Pathogénique (et régulation ?) |
| Spondyloarthropathie | Lyse des chondrocytes |
| Syndrome de Sjogren | Lyse des cellules épithéliales possiblement par la voie Fas |
| Thyroïdite auto-immune expérimentale | Résolution spontanée |
| Granulomatose | |
| Vitiligo | Lyse des mélanocytes |

(Adapté de Ulrich Walter and Pere Santamaria. CD8+ T cells in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 2005, 17:624–631). [56]

La majorité des études ayant contribué à la compréhension de l'implication des cellules T CD8+ dans les maladies auto-immunes ont été effectuées chez des modèles animaux. Chez les souris NOD, le diabète de type 1 résulte de la destruction des îlots pancréatiques par les cellules T CD4+ et CD8+. L'initiation de la maladie requiert la présentation croisée des auto-antigènes par les CD aux cellules T CD8+ autoréactives. Ce sont la quantité et la qualité de cette présentation qui déterminent si l'activation sera « productive » (entraînant la pathogénie) ou « non-productive » (sans conséquence). Les facteurs déterminants de l'activation des cellules T CD8+ incluent l'état d'activation et de maturation de CD, le milieu de cytokines, la présence d'adjuvants, le nombre de complexes p:CMH et leurs avidités au TCR. En effet, dans les modèles animaux développant un diabète spontané, l'incidence de la maladie corrèle avec l'avidité de l'interaction entre les cellules T et les CD. Supportant ces observations, la délétion de Cbl-b, un régulateur négatif de la signalisation du TCR, augmente la force du signal d'activation des cellules T autoréactives et leur potentiel pathogénique [57].

Lorsque l'avidité de l'interaction p:CMH:TCR est de faible à intermédiaire, l'activation du clone T CD8+ requiert l'assistance des cellules T CD4+. L'expression de CD154 par les T CD4+ induit, via l'engagement de CD40, la maturation des CD qui passent alors de tolérogènes à immunogéniques. S'en suit alors l'activation des cellules T CD8+. Toujours dans le cas du diabète de type 1, il semblerait que la contribution des clones autoréactifs de faible et de forte avidité est régulée selon les stages de la maladie. Durant le stage précoce, ce sont les clones T CD8+ de faible avidité qui initient la pathologie. La contribution des clones T de forte avidité est à ce moment limitée par les mécanismes périphériques de tolérance. Les quelques clones de forte avidité qui échappent sont ceux qui réussissent à « se cacher » dans les tissus enflammés, là où la tolérance n'est plus effective. Ensuite, ces derniers prennent le dessus par compétition avec les clones de faible réactivité, ce qui permet à la pathologie de progresser [58]. Ce mécanisme, bien que documenté uniquement dans le cas du diabète de type 1, pourrait également s'appliquer à d'autres maladies auto-immunes.

On connaît jusqu'à présent deux méthodes majeures par lesquelles les cellules T CD8+ engendrent des dommages tissulaires par leurs fonctions effectrices. La première

est causée par FasL qui est transloqué à la synapse immunologique suite à l'interaction p:CMH:TCR. La deuxième consiste en la libération de granules cytotoxiques contenant des molécules de perforine et de granzyme, au niveau de la zone de contact avec la cellule cible. Le mécanisme effecteur (FasL ou perforine) semble aussi dépendre de l'avidité de l'interaction p:CMH:TCR. Ainsi, c'est tout d'abord par FasL que l'apoptose est provoquée tôt durant la pathologie du diabète de type 1. Puis, lorsque des clones de plus forte avidité émergent, la destruction de la cible par le mécanisme perforine/granzyme devient prédominante [59].

Suite à leur activation, les cellules T CD8⁺ secrètent entre autres les cytokines TNF- α et l'IFN- γ . En combinaison avec l'IL-1, ces cytokines induisent la mort des cellules par nécrose et apoptose. La liaison de TNF- α à son récepteur sur les CD8 en présence de l'IFN- γ augmente la présentation des auto-antigènes, en plus de sur-réguler l'expression de Fas et des molécules du CMH de classe I sur les cellules potentiellement cible [60]. D'autre part, certains clones T CD8⁺ expriment la chemokine chemoattractante CXCL10 lors de l'invasion des îlots pancréatiques, et CCL5 dans le système nerveux central, ce qui entraîne le recrutement d'autres cellules immunes et permet la progression de la maladie auto-immune [61, 62].

Hors de tout doute, il existe aussi d'autres sous-populations de cellules T CD8⁺ qui, contrairement à celles que nous venons de voir, inhibent le développement de l'auto-immunité. Les cellules T CD8⁺ restreintes par la molécule Qa-1, un CMH non-classique de classe Ib, sont activées par des peptides du soi exprimés par les cellules T CD4⁺ et semblent, par un mécanisme encore incompris, lyser les cellules T CD4⁺ pathogéniques [63]. Le rôle de ces cellules T CD8⁺ a été démontré dans la pathogenèse de l'EAE, où elles empêchent la prolifération des cellules T CD4⁺ spécifiques à la protéine basique de myéline « myelin basic protein » (MBP). D'autres sous-types de cellules T CD8⁺ sont aussi des régulateurs négatifs de l'auto-immunité. C'est le cas des CD8⁺CD28⁻ dans l'EAE et l'arthrite rhumatoïde, et des cellules T CD8⁺ restreintes par gp180/Cd1d dans l'épithélium du système gastro-intestinal qui préviennent contre l'IBD [64]. Des altérations affectant le nombre ou la fonction de ces cellules T CD4⁺CD8⁻ V α 24J α Q invariantes contribuent à l'auto-immunité. Par exemple, chez les jumeaux

monozygotes où il y a une discordance pour le diabète, c'est le jumeau qui possède le plus bas niveau de cellules T CD4-CD8- V α 24J α Q restreintes par CD1 qui est touché par la maladie [65]. Enfin, il a été confirmé récemment que les biopsies de foie des patients atteints d'hépatite auto-immune sont également infiltrées par des lymphocytes CD8⁺, ce qui suggère que ces lymphocytes joueraient un rôle important dans la destruction des hépatocytes et dans la sévérité de la maladie [66-68].

HÉPATITE AUTO-IMMUNE

Historique

Avant les années 1940, les connaissances concernant les maladies hépatiques chroniques n'étaient que fragmentaires. On considérait qu'elles étaient principalement dues aux toxines comme l'alcool, aux infections, aux dépôts amyloïdes ou de pigments (fer) dans le parenchyme hépatique, ou alors dues à des désordres nutritionnels [69, 70]. Durant la Deuxième Guerre Mondiale, les médecins du « *Medical Corps and the Sanitary Corps of the United States Army* » observèrent des cas de maladies hépatiques de forme « non-récupérantes » en l'absence d'hépatite virale [69].

Ce n'est qu'en septembre 1950 que le médecin suédois Jan Waldersorm décrit au premier congrès de la « *German society for Digestive and Metabolic Disorders* » à Bad Kissingen, une nouvelle forme d'hépatite chronique qui débute de façon insidieuse, qu'il caractérisa chez six patientes présentant un faible niveau d'albumine sérique, une hyperprotéïnémie, une hypergammaglobulinémie et une aménorrhée prolongée. Il attribua cette maladie d'étiologie inconnue à une persistance virale suite à une infection virale aiguë [70]. Un an plus tard, le Dr. Henry George Kunkel confirma les observations de Waldersorm, en plus de suggérer un lien avec l'arthrite rhumatoïde et le lupus systémique érythémateux [70, 71]. À l'époque, on qualifia alors la maladie d'active ou inactive, selon l'histopathologie hépatique et la présence de symptômes [72]. En 1955, Joske et King observèrent des cellules de lupus érythémateux chez une femme de 34 ans, en connexion avec cette hépatite chronique [73], résultat qui fut confirmé par le Dr. Mackay en 1956. Ce dernier appela alors cette maladie hépatite lupoïde [74].

Dix ans plus tard, son nom fut remplacé par hépatite auto-immune [75] pour ensuite être accepté en 1992 par un groupe international composé de 27 médecins et pathologistes experts, et mis à jour en 1999 par le même groupe, maintenant devenu l'« *International Auto-immune Hepatitis Group* » [76, 77]. En effet, dans le début des années soixante, plusieurs groupes avaient rapporté, la présence d'auto-anticorps anti-noyaux, différents de ceux observés dans le SLE et d'auto-anticorps anti-muscles lisses comme marqueurs de l'HAI, que l'on retrouve en l'absence de cellules de lupus [78-80]. Il devenait ainsi de plus en plus évident que l'HAI et le SLE sont deux maladies distinctes cliniquement, biochimiquement, sérologiquement, histologiquement et génétiquement, l'une organe-spécifique et l'autre systémique, et que leur coexistence n'était qu'un événement rare [81, 82]. L'idée d'un processus auto-immun a été supportée par les études du Dr. Gajduski du laboratoire du Dr. F.M. Brunet et par Mackay en 1958, où ils décrivent une réponse immunitaire contre les antigènes du tissu hépatique, dans l'hépatite chronique et aiguë [83, 84]. L'idée fut confirmée au courant des années 70 et 80, durant lesquelles plusieurs auto-anticorps contre des protéines du réticulum endoplasmique dans le foie et le rein, et aussi contre des antigènes solubles du foie, ont été rapportés [85]. Au fil des ans ont été exclus les autres diagnostics étiologiques tels que l'hépatite chronique virale, la déficience en α_1 -antitrypsine, la maladie de Wilson, l'hépatotoxicité médicamenteuse et la stéatohépatite alcoolique et non alcoolique [76, 77]. La description d'une incidence plus marquée chez les femmes et d'une distribution d'âge bimodale qui plafonne juste avant la puberté, puis durant la ménopause, écarte tout doute que cette maladie est bien distincte et due à un processus auto-immun [70, 77, 86, 87]

Définition

L'hépatite auto-immune est une maladie chronique rare (50-200 cas par million d'habitants aux États-Unis et en Europe), principalement pédiatrique, d'étiologie inconnue et affectant les femmes de façon prédominante (ratio de 3.6 :1), menant à une destruction progressive du parenchyme hépatique. Elle peut spontanément entraîner une cirrhose et une insuffisance hépatique, mais les patients guérissent généralement bien grâce aux traitements immunosuppresseurs. Lorsque non-traitée, une transplantation de

foie peut être nécessaire. Ainsi, l'HAI est responsable de 2.6% des transplantations en Europe et 5.9% aux États-Unis. L'HAI est marquée par une hypergammaglobulinémie, des auto-anticorps circulants, un faible niveau du facteur 4 du complément (C4), et une association avec les gènes HLA de classe II. D'autres manifestations auto-immunes sont fréquemment retrouvées chez les patients atteints d'HAI et chez les proches directs de leurs familles. Ces observations suggèrent que l'HAI est d'étiologie multifactorielle, impliquant à la fois des éléments génétiques et environnementaux. On distingue actuellement deux types d'hépatites auto-immunes, selon la nature des auto-anticorps détectés chez les patients. L'HAI de type 1 est caractérisée par la présence sérique d'anticorps anti-muscles lisses (SMA) ou anti-noyaux (ANA). Quant à eux, les patients avec HAI de type 2, développent des anticorps anti-microsome du foie et du rein (*anti-liver kidney microsomes, anti-LKM-1*) ou anti-cytosol du foie de type 1 (*anti-liver cytosol type 1, anti-LC1*). Le ratio d'incidence de L'HAI de type 1 et de type 2 en Europe et au Canada est de 1.5 à 2 :1, alors qu'ailleurs en Amérique du Nord, du Sud et au Japon, le ratio est de 6 à 7 :1 ou même plus [85, 88, 89].

Classification

Il existe actuellement un débat à savoir si l'HAI représente une maladie hétérogène qui peut être classifiée en plusieurs sous-groupes. Malheureusement, il est impossible de répondre à cette question tant que l'étiologie de l'HAI n'est pas connue. Pour le moment, la classification des différents sous-types de l'HAI est basée sur le profil d'auto-anticorps sériques circulants du patient. Selon cette approche, l'HAI de type 1 est la forme la plus commune de la maladie et est caractérisée par la présence d'auto-anticorps non-spécifiques anti-noyaux (ANA) à un titre d'au moins 1 :80, et/ou d'auto-anticorps anti-muscles lisses (SMA) dirigés contre les filaments d'actines. Également, la détection d'anticorps atypiques anti-neutrophiles de cytoplasme (ANCA) est parfois utile au diagnostic d'une HAI de type 1. L'HAI de type 2 est caractérisée par des auto-anticorps spécifiques anti-«*liver kidney microsome 1*» (anti-LKM-1) dirigées contre le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) et moins fréquemment des anti-«*liver cytosol*» (anti-LC-1) reconnaissant une enzyme métabolique du foie de 58 kDa,

la fermimino-transférase cyclodéaminase (FTCD). Les anti-LKM-1 et les anti-LC1 peuvent être retrouvés seuls ou en combinaison. Même si les anti-LKM-1 sont considérés spécifiques à l'HAI de type 2, on les retrouve aussi chez 10 % des patients infectés chroniquement par le virus de l'hépatite C (VHC) [90]. Malgré une controverse en ce qui concerne l'existence d'un 3^e type, ceux qui défendent cette idée proposent que les auto-anticorps anti-SLA/LP spécifiques à la ribonucléoprotéine associée à l'ARNt^(ser/sec) suppresseur de l'UGA, en sont le principal marqueur. L'HAI de type 3, et plus particulièrement l'HAI de type 2, sont rares chez les adultes et constituent principalement des maladies pédiatriques. Cliniquement, les 3 sous-types ne diffèrent pas fondamentalement. De plus, l'HAI de type 3 ressemble à l'HAI de type 1 en ce qui concerne les caractéristiques cliniques et les marqueurs immunologiques. D'autre part, plusieurs études ont démontré que les patients avec des anti-SLA/LP ont une HAI plus sévère. Toutefois, le type 3 étant controversé, il n'est pas reconnu par l'IAIHG, qui l'inclut avec le l'HAI de type 1. En tant que marqueurs de l'HAI de type 1, les SLA/LP sont ainsi considérés par certains comme les plus spécifiques au diagnostic. Cependant, ils ne sont détectés que dans 10 à 30 % des cas. Les différences entre le type 1 et 2 sont plus évidentes. L'HAI de type 2 a une prévalence de seulement 4 % des HAI aux États-Unis et jusqu'à 20% des HAI en Europe de l'Ouest. Les patients avec HAI de type 2 sont plus jeunes et le cours de la maladie est plus sévère, ce qui fait qu'elle progresse plus fréquemment vers la cirrhose [85]. Aussi, la prédisposition génétique à l'HAI de type 1 est conférée par DR3 pour la forme juvénile et adulte, alors que DR4 ne prédispose que la population adulte. La prédisposition à l'HAI de type 2 semble être, quant à elle, associée à DR7 [86-88, 91, 92].

Diagnostic

Afin de faciliter le diagnostic de l'HAI, l'IAIHG a établi des critères descriptifs pour classer les patients, comme ayant une HAI qualifiée de « certaine » ou une HAI « probable ». La raison en est que plusieurs des manifestations histologiques et cliniques sont aussi retrouvées dans d'autres désordres hépatiques, tels que des maladies biliaires, virales et alcooliques. Cette approche fait donc appel à une grille de score basée sur des paramètres qui sont favorables pour un diagnostic d'HAI,

incluant le sexe, les niveaux des gammaglobulines et des alanines aminotransférases (ALT) / aspartate aminotransférases (AST) sériques, les titres des auto-anticorps (ANA, SMA ou anti-LKM-1), les allèles de prédisposition génétiques HLA DR3 ou DR4, la présence d'autres maladies auto-immunes et l'histologie du foie. De plus, elle tient compte des paramètres défavorables au diagnostic d'une HAI, incluant la présence d'anticorps anti-mitochondries, l'utilisation de médicaments, la consommation exagérée d'alcool et l'absence histologique d'infiltrats lymphocytaires dans le foie. Ainsi, un score de plus de 15, incluant une réponse au traitement, suggère une HAI certaine, alors qu'un score entre 10 et 15 et entre 12 et 17 après traitement suggère une HAI probable.

L'hépatite auto-immune est principalement une maladie pédiatrique, et a été diagnostiquée à un âge aussi bas que 6 mois. De plus, 40% des patients avec HAI de type 1 et 80 % avec HAI de type 2 sont des jeunes. L'âge moyen d'atteinte est de 10 et 6.5 ans pour l'HAI de type 1 et 2 respectivement. Dans les deux types, la proportion de femmes parmi les patients affectés est de 70 et 90 %.

Moins fréquemment, il y a aussi des symptômes extrahépatiques ou la présence d'une autre maladie auto-immune, telle que l'arthrite rhumatoïde, la thyroïdite auto-immune, la colite ulcéreuse et le diabète de type 1 [88, 91, 92].

La réponse humorale spécifique à l'HAI

La détermination des auto-anticorps sériques est importante pour le diagnostic et le suivi de l'HAI. Des SMA de titre 1 :100 à 1 :500,000 sont associés à une présence positive d'ANA de titre 1 :10 à 1 :100,000 chez 40 à 60% des patients avec HAI de type 1. Les SMA du sérum des patients avec HAI de type 1 sont dirigés contre les filaments d'actine, mais, dans les autres cas, ils reconnaissent principalement les filaments intermédiaires. Les ANA reconnaissent une diversité d'antigènes du noyau, tels que l'ADN bicaténaire, les lamines A, B et C, les protéines associées à la chromatine, les ribonucléoprotéines, les protéines de la matrice du noyau et aussi d'autres antigènes encore non-identifiés. Les anti-LKM-1 sont détectés dans le sérum des patients avec

HAI de type 2 avec une dilution de 1 :10 à 1 :100000. Ces auto-anticorps sont dirigés contre le CYP2D6, une protéine du réticulum endoplasmique exprimée essentiellement dans le foie et les reins. Des épitopes linéaires et conformationnels ont été identifiés comme étant la cible des anti-LKM-1. Les auto-anticorps anti-LC1 sont aussi retrouvés chez 50 % des sérums de patients avec HAI de type 2 positifs pour les anti-LKM-1. Actuellement, la méthode la plus utilisée pour la détection de ces auto-anticorps est l'immunofluorescence indirecte sur des sections de cryostats et des cellules en culture. La détection des anti-LKM-1 et des anti-LC1 par la technique d'essai par immunosorbant lié à une enzyme « *enzyme-linked immunosorbent assay* » ELISA a récemment été développée en utilisant des protéines recombinantes spécifiques ou des peptides synthétiques représentant des épitopes linéaires. Les anticorps anti-récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGP-R) semblent jouer un rôle dans la pathogenèse de l'HAI. Ils sont dirigés contre une protéine exposée aux anticorps circulants, exprimée sur la membrane des hépatocytes sinusoidaux. Chez les enfants atteints par l'HAI, les titres des anti-ASGP-R corrélaient avec le niveau d'hypergammaglobulinémie, suggérant que ces auto-anticorps sont de bons indicateurs de l'activité inflammatoire. On retrouve les anti-ASGP-R plus fréquemment chez les enfants avec HAI de type 1 (75% des cas) que ceux avec HAI de type 2 (40 % des cas), lorsque testés par ELISA en utilisant comme antigène l'ASGP-R purifié du foie humain.

En utilisant des techniques sensibles telles que l'ELISA et le dosage radioimmunologique, la proportion des patients enfants soupçonnés d'être atteints par l'HAI, cliniquement, histologiquement et selon les tests du laboratoire, mais qui n'ont aucun auto-anticorps sérique détectable, est de moins de 5% [88, 91, 92].

Histologie

Le système d'analyse histologique utilisé est basé sur le niveau de nécroinflammation et tient compte de la présence ou l'absence de nécrose périportale avec ou sans nécrose en pont, de dégénération intralobulaire ou de nécrose focale, d'inflammation portale et de fibrose. Le signe qui caractérise le mieux l'HAI est la présence d'un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes B et T au niveau de la

région portale, envahissant le lobule et produisant ainsi une hépatite d'interface. Dix à vingt pour cent des biopsies du foie avant le traitement révèlent la présence d'hépatocytes géants multinucléés. La détection de particules virales par microscopie électronique sur certains de ces échantillons est négative. Environ 50 % des spécimens de biopsies montrent également un certain niveau de nécrose en pont et des rosettes hépatiques [87]. La fluctuation du cours de la maladie est aussi reflétée histologiquement en termes d'agressivité de l'activité inflammatoire. Chez les enfants avec HAI, 60 à 80 % des biopsies du foie montrent une inflammation portale et lobulaire modérée à sévère en plus d'une hépatite d'interface [88]. Toutefois, chez plusieurs séries de patients, particulièrement ceux qui sont un peu plus âgés et les adolescents, l'activité inflammatoire et le degré d'agressivité histologique sont absents ou faibles dans 10 à 40 % des biopsies. Une absence ou un faible niveau d'inflammation est observé chez les adolescents avec HAI de type 2 [91]. Aussi, des lésions du canal biliaire sont détectées dans 30 % des cas, mais sans qu'il n'y ait de cholangite sclérosante. Même si la biopsie est extrêmement utile au diagnostic définitif de l'HAI, la présence d'une coagulation anormale causée par une défaillance hépatique empêche souvent l'emploi de cette technique. Un facteur clé dans le pronostic de l'HAI est la présence de cirrhose au moment du diagnostic. L'incidence de cette complication varie largement entre 38 % à 89 % des cas pédiatriques. Une explication de cet écart est la méthodologie utilisée pour le diagnostic de la cirrhose. En effet, une analyse basée exclusivement sur la biopsie du foie tend à sous-estimer la présence de cirrhose qui n'est alors observée que dans 50% des cas avec HAI. En ajoutant un examen laparoscopique, des nodules sur la surface du foie sont observés chez 90% des patients similaires. Finalement, chez les patients qui répondent bien aux traitements immunosuppresseurs, la fibrose hépatique est réversible [87, 88, 91, 92].

L'aspect immunogénique de l'HAI

Les allèles HLA-A1-B8-DR3 et HLA-DR4 représentent les facteurs de risque de prédisposition génétique à l'HAI de type 1 chez les populations caucasiennes de l'Europe du nord [93-95]. Chez les populations japonaises, argentines et mexicaines, le

principal allèle de susceptibilité à l'HAI de type 1 est DRB1*0405 [96], alors que les brésiliens sont prédisposés à l'HAI par les allèles DRB1*13 et DRB1*03 [97, 98]. Dans la population pédiatrique atteinte d'HAI de type 1, les allèles DRB1*03 et DRB1*1301 sont fréquemment retrouvés. Il a également été observé qu'il existe une transmission de ces allèles avec un déséquilibre de liaison par les parents hétérozygotes aux patients atteints d'HAI de type 1 [99, 100]. Mis à part le CMH, un polymorphisme dans la protéine CTLA-4 empêcherait celle-ci d'exercer son rôle d'inhibition de l'activation des lymphocytes, menant à une accumulation de cellules T CD4+ effectrices. En effet, il a été démontré que ce polymorphisme est associé chez les patients avec HAI de type 1. Le génotype AG au lieu d'AA à la position 49 est retrouvé avec une haute fréquence. [101, 102]. D'autre part, la délétion du facteur 4 du complément (C4AQ0) représente également un élément de prédisposition aux maladies auto-immunes. Cette délétion est en déséquilibre de liaison avec les allèles HLA A1, B8 et DR3 et est fréquemment retrouvée chez des patients atteints d'HAI qui tendent à développer la maladie à un plus jeune âge [103]. Finalement, un polymorphisme affectant le promoteur de la cytokine pléiotropique TNF- α semble aussi être un facteur prédisposant. L'allèle *2 du gène facteur de nécrose tumorale α (TNFA) code pour une adénine au lieu d'une guanine. En conséquence, ceci entraînant des niveaux plus élevés de TNF- α circulant et a pour effet d'exacerber la progression de l'HAI et de provoquer une résistance au traitement, surtout lorsque les patients sont homozygotes pour cet allèle [104]. En conclusion, la prédisposition génétique à l'HAI de type 1 est conférée par le locus DR avec les allèles DR3 pour la forme juvénile et adulte et DR4 uniquement chez les patients adultes. Par contre, la prédisposition à l'HAI de type 2 est plutôt conférée par l'allèle DQB1*0201 du locus DQ chez les familles avec un enfant atteint de HAI de type 2, tel que confirmé récemment par notre groupe dans une étude de cas-contrôles [92, 100, 105].

Facteurs environnementaux

Chez l'homme, très peu est connu en ce qui concerne les facteurs environnementaux pour l'HAI. Il a cependant été suggéré qu'une infection virale pourrait constituer un élément déclencheur chez les sujets prédisposés génétiquement.

En effet, il existerait un mimétisme moléculaire entre les protéines non-structurales (NS) NS5a et NS3 du VHC et le CYP2D6 [106]. De plus, une infection virale ou bactérienne, des toxines et certains médicaments favoriseraient l'établissement d'un milieu inflammatoire dans le foie [107].

Le foie comme organe lymphoïde périphérique

En tant qu'organe immunitaire, le foie possède un endothélium unique, composé de cellules endothéliales fenestrées formant des sinusoides hépatiques. Cette configuration permet un contact direct entre les hépatocytes et les cellules immunitaires. Les sinusoides contiennent des cellules endothéliales, des cellules de Kupffers (macrophages résidants), des cellules stellates (importantes pour le remodelage et la fibrose) et des lymphocytes intrahépatiques. Le foie agit comme première ligne de défense contre les antigènes provenant du système gastro-intestinal et qui passent par la veine porte. Il est donc crucial que le foie établisse une tolérance à ces antigènes pour éviter les allergies alimentaires, tout en étant capable de monter une réponse immunitaire efficace contre des envahisseurs bactériens ou viraux. En effet, la constitution immunitaire de cet organe est distincte des autres sites. Les lymphocytes intrahépatiques comptent pour 25% des cellules non-parenchymateuses dans le foie normal. Contrairement au sang périphérique, les populations lymphoïdes prédominantes dans le foie sont les NKT (30%), puis les cellules T (20 % TCR $\alpha\beta$, 10% TCR $\gamma\delta$), les cellules NK (20%), les cellules T CD8 $\alpha\beta$ - (15%) et très peu de cellules B (5%) [108-110]. Les cellules NKT représentent une population particulière qui exprime le marqueur CD3 autant que les marqueurs de cellules NK, secrète l'IL-2, l'IL-4, l'IFN- γ et reconnaît les antigènes associés à la molécule du CMH non classique CD1. L'abondance inhabituelle des cellules NKT connues pour leur rôle immunomodulateur suggère que, dans le foie, la réponse immunitaire est a priori orientée vers la tolérance [111-113]. Après les NKT, la population prédominante est formée des cellules T CD8+, contrairement à la prédominance des cellules T CD4+ dans le sang périphérique et dans la rate. Les cellules T CD8+, de même que les NKT, possèdent une activité cytotoxique. Il y a également un excès de cellules T $\gamma\delta$ CD3+ potentiellement cytotoxiques, comparé

au sang périphérique. Des évidences pointent vers l'existence d'une maturation extrathymique de certains lymphocytes intrahépatiques, principalement des cellules T doubles négatives (CD4-CD8-), des cellules T CD8+ homodimériques et des cellules T $\gamma\delta$ [114]. Ce site de maturation pourrait être le foie lui-même, étant donné que des progéniteurs lymphoïdes sont retrouvés dans le foie d'adultes qui retiennent la capacité de faire de l'hématopoïèse extramédullaire [115]. De plus, les cellules immunes du foie ont un état d'activation différent par rapport aux ganglions lymphatiques et à la rate. En effet, les cellules endothéliales sinusoidales du foie (LSEC) expriment constitutivement CD54 (la molécule-1 d'adhésion intracellulaire, ICAM-1) et CD58 (antigène associé à la fonction des leucocytes, LFA-1). Elles peuvent aussi être induites à exprimer la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire, VCAM. Ceci fait en sorte que les cellules T CD8+ activées, sont retenues par l'endothélium hépatique via l'interaction ICAM-1:LFA-1. Ainsi, plusieurs investigateurs ont proposé que le foie agit comme une trappe pour les cellules T activées circulantes, pour ensuite les induire en apoptose [116, 117]. Alternativement, ces cellules retenues non-spécifiquement pourraient être activées dans le foie par les cellules de Kupffer ou par les hépatocytes et entreraient en apoptose par le mécanisme d'AICD (« *activation-induced cell death* »). Le foie est donc essentiellement composé d'une population lymphocytaire naïve. Lorsqu'en état pathologique, le foie atteint d'HAI montre une infiltration de cellules mononucléées, de cellules plasmiques, de cellules T CD4+ (en prédominance) et de cellules T CD8+. On observe également de l'activité cytotoxique et une sur-régulation des molécules du CMH de classe I sur les hépatocytes. Des cellules T CD4+ et CD8+ ont aussi été décrites dans la région portale. Il semblerait que ce sont principalement ces populations lymphocytaires effectrices qui sont responsables des dommages hépatiques, tel que suggéré par la présence de nécrose, la formation de rosettes par les cellules hépatique et, ultimement, le développement de la fibrose [118-120]. D'autre part, les hépatocytes, en présence d'IL-12 et d'IL-2 dans un contexte inflammatoire Th1, ont le potentiel d'exprimer des molécules du CMH de classe II et de sur-exprimer les molécules du CMH de classe I, augmentant ainsi la présentation de leurs propres déterminants antigéniques. Il en résulte alors qu'une présentation plus accrue aux cellules T autoréactives contribue à la perpétuité de l'HAI [88, 121-123].

Dans ce contexte, il est important de ne pas perdre de vue que l'HAI est une maladie multifactorielle qui se développe chez les individus ayant des prédispositions génétiques sous l'influence de certains facteurs environnementaux (Figure 5) [107, 124].

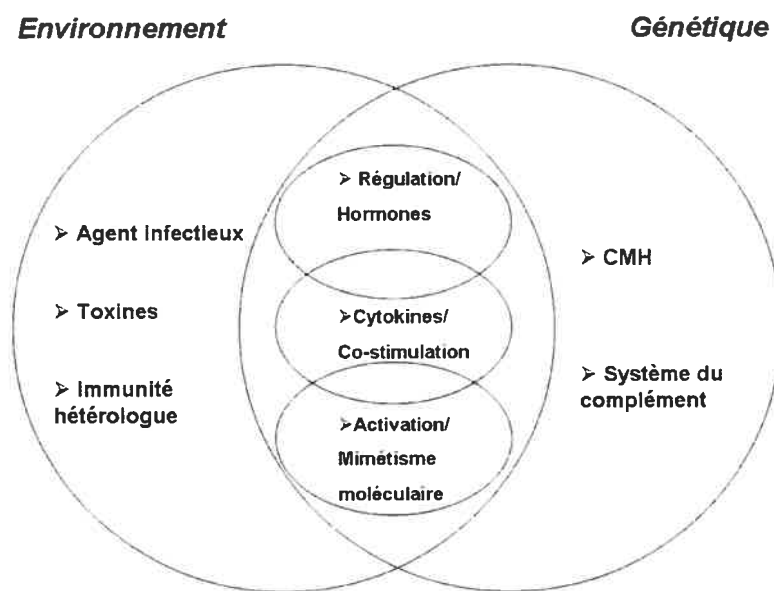


Figure 5 : Le développement de l'HAI chez les individus avec une prédisposition génétique est influencé par au moins un facteur environnemental. (Adapté d'Elmar Jaeckel. *Animal Models of Autoimmune Hepatitis. Seminars In Liver Disease/Volume 22, Number 4 2002*). [107]

Modèles animaux d'hépatite auto-immune

L'HAI est difficile à étudier chez l'homme, en raison de son diagnostic qui se fait généralement tardivement, de l'hétérogénéité clinique des patients et du manque de spécimens. C'est pour ces raisons que depuis maintenant plus de 90 ans, plusieurs modèles animaux d'HAI ont été élaborés dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui mènent à l'inflammation du foie et à la chronicité de la maladie, tels qu'observés chez l'homme, afin d'élaborer d'éventuelles thérapies plus efficaces et préventives. Ces modèles peuvent être classés en modèles transgéniques et modèles non-transgéniques. Évidemment, il existe des limitations avec ces modèles, incluant le fait que le degré de complexité augmente avec le nombre de variables considérées pour

l'étude. En effet, la majorité des études ne se sont contentées à examiner l'effet que d'un ou deux paramètres simultanément. Également, un autre ennui vient du fait que les modèles murins développent beaucoup moins facilement de la fibrose, l'indicateur déterminant de l'HAI chez l'homme. Malheureusement, jusqu'à maintenant, aucun modèle d'HAI n'est reconnu comme un standard, dû aux difficultés à établir un modèle fiable et reproductible tel qu'on les retrouve pour d'autres maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques et le diabète [107]. Avant de décrire les différents modèles d'HAI, nous commencerons par définir l'immunité naturelle dans le foie et récapituler le fondement du développement de l'auto-immunité dans cet organe.

Modèles d'HAI non-transgéniques

Les premières tentatives d'induction d'une hépatite auto-immune expérimentale ont été réalisées avant que l'HAI ne soit définie en tant que maladie chez l'homme. L'objectif était de produire une pathologie hépatique avec des infiltrats cellulaires, de la nécrose et de la fibrose ou de la cirrhose telle qu'observée dans l'hépatite infectieuse. Bien que les connaissances de l'époque n'étaient pas assez approfondies pour expliquer les mécanismes des phénomènes observés (et plus particulièrement en ce qui concerne la restriction au CMH et l'alloréactivité), de ces études découlèrent plusieurs constatations intéressantes. En effet, la majorité des études étaient basées sur l'injection d'homogénats de foie, et les réactivités observées étaient expliquées par une allogénicité et non pas par une réaction immunologique contre les antigènes du foie (Tableau IV).

Tableau IV. Modèles animaux d'hépatite auto-immune induite par des antigènes du foie

| Année | Auteur(s) | Espèce | Antigène | Adjuvant | Dose | Résultats |
|-------|--------------------|---------------------------|----------------------|------------|------------------|--|
| 1908 | Fiessinger | Lapin | Protéines nucléaires | - | 3-8x i.p. | Cirrhose biliaire chez 3 des 7 animaux ; pas d'effets chez les porcs de Guinée et les chiens |
| 1946 | Casals, Olitsky | Souris | HF de souris | - | 10x i.p. | Fibrose hépatique et nécrose focale ; infiltrats cellulaires chez 4 souris sur 10 |
| 1959 | Behar, Tal | Hamster Porc de Guinée | HF homologue | CFA | 1x i.m. | Nécrose focale chez 11 des 31 animaux |
| 1962 | Dodd et al. | Lapin | HF de Rat | CFA | 1x i.m. | Infiltration périportale |
| 1964 | Coppo, Tedeshi | Rat | HF syngénique | CFA | 12x et plus s.c. | Inflammation focale, nécrose |
| 1965 | Scheiffarth et al. | Lapin | HF de lapin | CFA | 9x s.c. | Infiltration périportale et nécrose chez quelques animaux/Fraction cytosolique la plus agressive |
| 1967 | Scheiffarth et al. | Souris | HF de souris | CFA | 7x i.p. | Infiltration périportale et nécrose, transfert adoptif |
| 1968 | Kossling et al. | Lapin | Humain | CFA | 10-40x i.p. | Hépatite chronique ; pas d'effets après utilisation de d'anti-LSP de lapin |
| 1983 | Kuriki et al. | Souris | HF syngénique | Klebsiella | 3-11x i.m. | Infiltration périportale et nécrose, transfert adoptif |
| 1984 | Mori et al. | Souris | S-100 syngénique | CFA | 6x i.m. | Infiltration périportale et nécrose, transfert adoptif, maladie élaborée par les cellules T |
| 1987 | Akari et al. | Souris | HF syngénique | CFA | 6-8x i.m. | Infiltration périportale et nécrose. Transfert adoptif, maladie élaborée par les |

| | | | | | | |
|------|-----------------|--------|------------------|-----|-----------|--|
| 1987 | Watanabe et al. | Souris | S-100 syngénique | CFA | 8x i.m. | cellules T Thymectomie facilite l'induction et prolonge la durée de la maladie, auto-anticorps contre la LSP |
| 1990 | Lohse | Souris | S-100 syngénique | CFA | 1-3x i.p. | Maladie élaborée par les cellules T, auto-anticorps suivent la maladie, régulation immunitaire traitable avec vaccination aux cellules T |

(Tiré de Elmar Jaeckel. *Animal Models of Autoimmune Hepatitis. Seminars In Liver Disease/Volume 22, Number 4 2002*) [107]. CFA : Adjuvant complet de Freund, HF : Homogénat de foie., LSP: « liver specific lipoprotein », i.m. : intra-musculaire, i.p. : intrapéritonéal. i.v. : intraveineux, s.c. : sous-cutané.

Behar et al. [125] ont démontré que la combinaison d'antigènes homologues du foie avec de l'adjuvant complet de Freund (CFA) (un extrait mycobactérien émulsifié dans l'huile) était beaucoup plus efficace à induire une lésion hépatique que les antigènes seuls. C'était la première expérience qui avait démontré l'importance du « signal de danger » en tant que déclencheur des réactions immunitaires. D'autre part, une autre équipe avait réussi à démontrer dans un modèle de lapin que les auto-anticorps induits par immunisation avec un homogénat de foie homologue ne peuvent pas transférer la maladie directement contre les antigènes du tissu hépatique [126]. Scheiffarth et al. [127] ont induit des nécroses hépatiques avec des infiltrations périportales transitoires chez des lapins par immunisation avec des homogénats de foie homologue dans du CFA. Toutefois, plusieurs immunisations mensuelles étaient nécessaires. Ils ont également été les premiers à caractériser la nature des antigènes responsables des infiltrats mononucléaires et à démontrer que la fraction cytoplasmique de l'homogénat du foie était plus efficace que la fraction microsomale, alors que la fraction nucléaire n'induisait aucune pathologie. En fait, cette découverte décrivait une réaction immunitaire contre les antigènes solubles du foie (SLA). Ce n'est que 35 ans plus tard que l'antigène SLA fut identifié comme étant le suppresseur UGA « *tRNA associated antigene* » [128-130]. Meyer Zum Buschfeld et al. ont développé un modèle d'hépatite chez des souris C57BL/6 et BALB/c immunisées avec des antigènes du foie

de souris syngéniques dans du CFA [131]. L'inflammation transitoire était élaborée par les cellules T et transférable par les splénocytes à des souris naïves. Cette expérience a permis de démontrer qu'il est possible d'induire une inflammation du foie contre des antigènes hépatiques du soi. D'ailleurs, la même équipe a identifié un antigène cytosolique et un antigène situé à la membrane des hépatocytes en utilisant le sérum auto-immun de modèles de lapins avec une hépatite expérimentale [132]. De plus, ils ont montré que la présence d'auto-anticorps dans leur modèle ne correspondait pas avec l'activité histologique de la maladie. Ces résultats suggèrent qu'en plus du fait que le transfert des auto-anticorps n'est pas suffisant à induire la maladie, les fonctions effectrices dans l'HAI expérimentale sont surtout causées par des mécanismes d'immunité cellulaires [115, 133]. Kohda et al. ont ensuite démontré chez les rats que les protéines du foie peuvent activer des cellules T CD8+ provenant d'un modèle d'hépatite expérimentale et ayant préalablement exhibé une réponse cytotoxique contre des hépatocytes syngéniques. La déplétion des cellules T CD8+ diminue l'inflammation hépatique, tel qu'observé par histologie [134]. Mori et al. ont induit une HAI expérimentale par six injections intramusculaires consécutives de la fraction S-100 de l'homogénat du foie dans du CFA. Ils ont démontré que les souris C57BL/6 sont beaucoup plus susceptibles que les souris BALB/c et les souris C3H/He. La maladie était transférable par les splénocytes, mais pas si les cellules T sont préalablement retirées. Ainsi, ces données soulignent l'importance des cellules T dans la pathologie [135-137]. Lohse et al. ont réussi à produire un modèle expérimental d'HAI chez les souris par une seule injection péritonéale de la fraction S-100 avec du CFA. Les signes histologiques de l'hépatite étaient encore détectables jusqu'à 6 mois après l'injection. L'hépatite était toujours plus prononcée chez les souris C57BL/6, confirmant l'importance du fond génétique dans le bris de la tolérance au foie, et il était possible de transférer la maladie par des splénocytes de souris activés avec la Concanavaleine A (ConA). Cette réactivité des cellules T précédait tout juste l'élévation des ALT, confirmant encore une fois le rôle des cellules T autoréactives dans la destruction des hépatocytes [131, 138]. En effet, il est possible de provoquer une hépatite aiguë (nécrose et apoptose des hépatocytes, infiltrats de lymphocytes, neutrophiles et macrophages) en injectant les souris uniquement avec de la ConA. Cette dernière active non-

spécifiquement les cellules T systémiques. Ainsi, il semblerait que la ConA se lie préférentiellement aux cellules endothéliales sinusoidales qui sont détruites par les cellules T CD4⁺ activées. Ceci rend les hépatocytes sous-jacents susceptibles aux attaques par les lymphocytes. Dans ce modèle, les cellules T CD4⁺ sont requises et les cellules Th1 sont prédominantes, avec l'implication de l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-4 et l'IL-12. Les cellules NKT sécrétant l'IL-4 sont essentielles au développement de l'hépatite induite par la ConA. Ainsi, les souris SCID, déficientes en CD1, perforine/granzyme-B ou en FasL ne développent pas non plus de pathologie. Les cellules T seraient donc essentielles à produire les dommages initiaux, suivis par les NKT qui augmentent l'expression de Fas-L, induisant ainsi l'apoptose des hépatocytes [139-142].

D'autres stimulateurs polyclonaux des cellules T, tels que les anticorps activateurs anti-CD3 ou le superantigène staphylococcale (enterotoxine B) provoquent une apoptose massive des hépatocytes chez les souris prétraitées avec l'inhibiteur transcriptionnel de la D-galactosamine. La cytokine effectrice principale dans ces modèles semble être le TNF- α . Effectivement, l'administration de TNF- α seul à des souris sensibilisées avec la D-galactosamine entraîne une lésion hépatique [143, 144].

Récemment, l'équipe du Dr. Alvarez a produit un modèle murin d'HAI où la pathologie était induite par xéno-immunisation avec de l'ADN codant pour des antigènes humains, montrant une réactivité contre les auto-antigènes connus de l'HAI de type de 2, le CYP2D6 et l'FTCD [145]. Un plasmide pCMV contenant la région N-terminale du CTLA-4 murin, la région antigénique du CYP2D6 humain et la FTCD humaine a été utilisé pour vacciner des souris femelles C57BL/6. Ces souris ont démontré une élévation des transaminases qui plafonne à 4 et 7 mois après l'injection. Des infiltrats inflammatoires périportales, portales et intralobulaires ont été observés par histologie. Ces infiltrats étaient constitués principalement de lymphocytes T CD4⁺, mais aussi de lymphocytes T CD8⁺ et B. Des CTL ont été détectées dans foie et la rate, alors que l'augmentation des anticorps anti-LKM-1 et anti-LC1 de sous-classe IgG2 corrélait avec celle des ALT et de la nécroinflammation hépatique. Ce modèle intéressant, où l'immunisation par ADN de souris contre des auto-antigènes engendre un bris de

tolérance et induit l'auto-immunité dans le foie, supporte l'hypothèse du mimétisme moléculaire et démontre que des antigènes étrangers peuvent exploiter ce même mécanisme pour déclencher un processus auto-immun.

Bref, tous ces résultats ont donné des informations de taille sur les cellules effectrices, les mécanismes de la pathologie et certaines conditions nécessaires au bris de la tolérance dans le foie. Toutefois, aucun des modèles n'a induit d'HAI chronique et spontanée.

Modèles animaux modifiés d'HAI

Les modèles transgéniques et d'inactivation « *knock out* » (KO) ont permis un examen plus détaillé des réponses immunitaires spécifiques au foie et des percées majeures dans l'étude de l'auto-immunité. Nous aborderons ici certains modèles Tg parmi ceux exposés au Tableau V. Un désavantage considérable avec tous ces modèles est que le système immunitaire est tolérant aux transgènes qu'il perçoit comme étant du soi, suite à l'expression du néo-antigène dans le thymus. Ceci est dû au fait que durant leur développement, les lymphocytes T qui sont spécifiques aux néo-antigènes du soi sont éliminés dans le thymus durant le processus de sélection négative. Une façon de contourner ce problème consiste à générer des transgènes qui ne sont exprimés que dans certaines conditions, sous le contrôle de promoteurs exprimés dans l'organe cible mais non au niveau du thymus. Cependant, jusqu'à maintenant presque tous les promoteurs connus sont hypomorphes (« *leaky* »), de sorte que le transgène s'exprime dans le thymus, ne serait-ce qu'en infime quantité. Malheureusement, cette faible expression du transgène dans le thymus est bien souvent suffisante pour établir la tolérance immunitaire [120].

Tableau V. Souris transgéniques pour l'étude des réponses immunitaires spécifiques au foie

| Année | Auteur(s) | Neo-Antigène | | Cellule T | | | Expression Thymique | Résultats |
|-------|------------------------|--------------------|----------------------|------------|---------|-------------|--|--|
| | | Promoteur | Antigène | CD4/8 | Nom | Restriction | | |
| 1989 | Morahan et al | Metallothionein | Alloantigène H-2Kb | | | | Probable | Pas d'hépatite spontanée hépatite agressive après transfert de splénocytes post-thymiques mais diminuée après 12 semaines |
| 1990 | Jones Youngblood et al | Q10 minimal | Alloantigène Q10d/Ld | | | | Négative par Northern | Tolérance des cellules T Infiltrats portoaux après transfert de splénocytes sensibilisés de souris non-Tg |
| 1990 | Chisari et al | Albumine | HBsAg | Lignée CD8 | | H-2Dd | Non regradée mais antigène circulant | Tolérance des cellules B et T hépatite après transfert de T CD8-antigène-spécifiques (IFN- γ et cellules T sont les effectrices) |
| 1992 | Schönrich | Albumine | Alloantigène H-2Kb | CD8 | Des-TCR | H-2Kb | Expression thymique probable | Tolérance des cellules T TCR-Tg |
| 1994 | Feiber et al | CRP | Alloantigène H-2Kb | CD8 | Des-TCR | H-2Kb | Positive mais génération de chimeres thymiques | Tolérance des cellules T TCR-Tg par délétion et sous-régulation du récepteur; différents niveaux de sous-régulations du récepteur |
| 1998 | Limmer et al | Albumine | Alloantigène H-2Kb | CD8 | Des-TCR | H-2Kb | Expression thymique probable | Tolérance pour les Kb hépatite brève qui survient après transfert de cellules T TCR-Tg activées |
| 1995 | Bertoline et al | Metallothionein | Alloantigène H-2Kb | CD8 | Des-TCR | H-2Kb | Expression thymique probable | Hépatite spontanée qui s'auto-résout si Kb est exprimé seulement sur les hépatocytes Les hépatocytes sensibilisent directement les cellules T CD8+ entraînant leur mort par négligence |
| 2000 | Voehninger et al | Albumine | LCMVgp33 | CD8 | P14TCR | H-2Db | Expression thymique | Ignorance des cellules T post-thymiques contre l'antigène hépatique bris de tolérance et hépatite qui s'auto résout après infection au LCMV |
| 2000 | Knotte et al | Pulsé sur les LSEC | Ovaalbumine | CD4/8 | OTI | H-2Kb | Transferts adoptifs | Les LSEC font de la présentation croisée des antigènes solubles circulants et tolèrent les cellules T CD8+ |

(Tiré de Elmar Jaeckel. *Animal Models of Autoimmune Hepatitis. Seminars In Liver Disease/Volume 22, Number 4 2002*). [107]

Chisari et al. ont développé un modèle de souris Tg exprimant l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBV), HBsAg, sous le contrôle du promoteur de l'albumine (Alb1-HBV). Ces souris Tg sont tolérantes à la protéine HBsAg, mais une inflammation peut être induite par le transfert adoptif de cellules T cytolytiques spécifiques avec de l'IFN- γ ou du LPS, menant au développement d'une hépatite aiguë [146-148]. À partir de ces résultats, les auteurs ont proposé un modèle de lésion

hépatique induit par des CTL spécifiques en trois étapes. Premièrement, les CTL s'attachent aux hépatocytes exprimant la protéine HBsAg et les induits en apoptose. Entre quatre à douze heures après le transfert, les CTL recrutent plusieurs cellules inflammatoires non-spécifiques (cellules NKT, macrophages, CD8), ce qui résulte en la formation de foyers de nécroinflammation et de nécrose hépatocellulaire qui s'étend à la périphérie des foyers, suggérant que les hépatocytes peuvent être tués par d'autres cellules que les CTL antigène-spécifiques. Lorsque le potentiel antigénique des hépatocytes devient assez élevé, la réaction immunitaire cause une apoptose massive des hépatocytes, entraînant une hépatite fulminante et une défaillance hépatique qui est probablement cytokine-dépendante, parce qu'elle peut être bloquée par des anticorps neutralisants anti-IFN- γ [149, 150].

Un autre modèle a été développé par Voehringer et al., où l'épitope glycoprotéine 33 (GP33) du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) est exprimé sous le contrôle du promoteur de l'albumine. Contrairement aux autres modèles, ces souris ont une délétion incomplète des cellules T GP33-spécifiques avec une évidence d'ignorance périphérique, puisqu'aucune inflammation hépatique n'a été observée, même après transfert de CTL spécifiques. Toutefois, l'activation des CTL par infection avec le LCMV avant de transfert adoptif induit une hépatite chez la souris GP33-Tg. Donc, l'expression de l'antigène dans le foie n'a pas entraîné l'activation des CTL, possiblement car la GP33 n'était pas exprimée à la surface des hépatocytes. Il a donc fallu une cytolys virale préalable pour initier l'inflammation [151].

Bertolino et al. ont établi un modèle différent pour étudier l'activation des cellules T CD8⁺ dans le foie, en utilisant des souris Tg Met-K^b exprimant le gène H-2 K^b dans les hépatocytes sous le contrôle du promoteur de la metallothioneine (Met) du mouton [152]. Ils ont retrouvé des cellules T CD8⁺ H-2 K^b-spécifiques (Des-TCR-Tg) dans le foie de ces souris deux heures après leur transfert adoptif. Ces cellules T CD8⁺ ont subi plusieurs séries de divisions et une inflammation hépatique est apparue en l'espace de 24h, puis s'est estompée rapidement. Pour expliquer ces résultats, il a été démontré que les hépatocytes exprimant le H-2K^b sont capables de présensibiliser les

cellules T CD8⁺ naïves, malgré le manque de molécules de costimulation. Néanmoins, les hépatocytes ne sont pas en mesure de promouvoir des signaux de survie (IL-2 et bcl₂ induits par l'interaction avec CD28), de sorte que les cellules T activées meurent par négligence et non pas par AICD élaborée par le mécanisme Fas-FasL ou par le TNF- α [153, 154].

Limmer et al. et Knolle et al. ont ensuite effectué deux études sur l'importance des cellules endothéliales sinusoidales du foie (LSEC) dans l'induction de la tolérance aux antigènes solubles circulants. Ils ont démontré que les LSEC expriment de hauts niveaux de CMH de classe I et II et de molécules de costimulation comme les CPA professionnelles. Les LSEC en présence avec de l'ovalbumine sont capables de prendre efficacement les antigènes solubles du milieu extracellulaire et d'activer les cellules T CD4⁺ OVA-spécifiques par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe II. Toutefois, l'activation des cellules T CD4⁺ produisait un phénotype de production de cytokine Th0 ou Th2, mais pas Th1 tel que le font les CPA. Les LSEC ont également un potentiel de présentation croisée des antigènes restreints par le CMH de classe I plus grand que celui des hépatocytes, ou même des CD. Cependant, cette présentation croisée entraîne plutôt la tolérance des cellules T CD8⁺ *in vitro* et *in vivo*. Le rôle unique des LSEC expliquerait ainsi les difficultés à briser la tolérance contre les antigènes spécifiques du foie [139, 155, 156].

Un modèle intéressant testant l'effet de l'absence de cytokines anti-inflammatoires a été exploré avec des souris invalidées pour le gène TGF- β -/- . Ces souris, sur un fond génétique BALB/c, développent une hépatite aiguë spontanée. Évidemment, ceci n'est pas un modèle typique d'une hépatite chronique et spontanée puisque les souris meurent à l'âge de deux semaines, mais il démontre quand même comment la génétique peut prédisposer à l'auto-immunité [157]. Dans le même contexte, 10 à 15 % des patients avec des mutations dans le gène « *autoimmune regulator* » (AIRE) développent une HAI, caractérisée par la présence d'auto-anticorps contre les cytochromes P450 2A6 et P450 1A2 [158-160]. En effet, dans le modèle de

souris ayant une mutation au niveau du gène AIRE, on observe aussi des infiltrats hépatiques de cellules mononuclées et des auto-anticorps spécifiques au foie.

En conclusion, les cellules immunitaires du foie sont différentes en termes de composition, d'état d'activation et de réponse aux antigènes, comparées à celles qui se trouvent dans les autres organes. L'approfondissement des connaissances concernant ces différences est nécessaire pour mieux comprendre la pathologie de l'HAI. Malheureusement, la compréhension de l'HAI est décalée relativement à d'autres maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques et le diabète de type 1, principalement dû à l'absence d'un modèle animal développant une HAI chronique et spontanée. Les défis qui restent à relever par ce modèle consistent à déterminer quels mécanismes sont cruciaux dans l'induction et la perpétuation de lésions hépatiques.

Modèles de souris TCR transgéniques de maladies auto-immunes

Comme nous venons de le voir, les modèles animaux transgéniques (et particulièrement les modèles de TCR transgéniques dans le cas des maladies auto-immunes), représentent un outil indispensable dans la compréhension des mécanismes qui les déclenchent et les perpétuent. Nous ferons donc ressortir certains concepts clés relatifs à ces modèles.

Les premiers modèles des souris TCR Tg ont été produits dans le but d'étudier le développement des cellules T et de leur sélection dans le thymus. Nous porterons ici une attention aux souris TCR Tg reconnaissant des auto-antigènes impliqués dans les maladies auto-immunes, telles que la sclérose en plaques, le diabète de type 1 et l'arthrite rhumatoïde [161].

La sclérose en plaques chez l'homme, partage plusieurs éléments pathogéniques en commun avec l'EAE chez la souris, ce qui fait que cette dernière en a été le modèle par excellence. Des souris TCR Tg (172.10) ayant un TCR spécifique à l'épitope MBP Ac-1-II/I-A^u ont été produites par l'équipe de Goverman et al. [162]. Les cellules T de ces souris ne sont pas supprimées dans le thymus. Elles sont normales en périphérie et

non-anergiques. Une constatation initiale était que ces souris ne développaient pas d'EAE spontanée dans des conditions sans pathogènes spécifiques, alors que 14 à 44 % des ces souris développaient la maladie dans des conditions où le virus de l'hépatite de souris, les vers trichomonas et *Syphacia obvelata* ont été détectés. Malheureusement, la contribution des facteurs environnementaux n'a pu être élucidée. De plus, l'incidence était plus fréquente chez les mâles que chez les femelles [163].

En 1994, une souris Tg exprimant un autre TCR provenant d'un clone T spécifique au même épitope a été générée [164]. Le résultat le plus frappant de cette étude était la haute fréquence d'incidence (100%) d'EAE spontanée après que les lymphocytes T $\alpha\beta$ endogènes aient été évités suite au croisement avec des souris RAG-/- [165]. Ce phénomène a été expliqué par le fait que le répertoire des cellules T était dépourvu des cellules T CD4+ régulatrices. En effet, le transfert d'un petit nombre de cellules T CD4+ polyclonales syngéniques prévient le développement de l'EAE spontanée [166].

Un point important concernant l'utilisation des souris TCR Tg concerne l'exclusion allélique de la chaîne TCR β . Puisque l'expression de la chaîne β réarrangée transgénique supprime le réarrangement des gènes TCR β , croiser des souris TCR Tg avec des souris invalidées pour le TCR β est donc inutile. Toutefois, dans le cas de l'EAE, des résultats contraires ont été rapportés. Alors que moins de 1% des souris TCR Tg qui possèdent un TCR β endogène intact développent une EAE spontanée, 15 des 21 souris TCR Tg où l'expression du TCR β endogène a été empêchée ont développé la maladie. Donc dans ce cas, la modeste contribution des cellules T exprimant le TCR β endogène s'est avérée importante [165].

Comme modèle de diabète de type 1, Katz et al. [167] ont décrit une souris NOD exprimant un TCR BDC 2.5 reconnaissant un antigène des cellules β -pancréatiques présenté par I-A^{b7}. Une différence avec les modèles précédents est que ces souris sont à l'origine prédisposées à développer un diabète spontané. On s'attendait donc à ce que le modèle TCR Tg enclenche la maladie plus tôt. Contrairement aux attentes, le diabète survenait plus rapidement et avec plus de pénétrance lorsque les souris BDC 2.5 TCR

Tg étaient croisées avec des souris ayant un CMH congénique B6.H-2^{g7} qu'avec les souris NOD [168]. Il demeurerait néanmoins vrai que la réduction du répertoire de cellules T exprimant des TCR endogènes réalisée en croissant avec des souris SCID, RAG^{-/-} ou TCR α ^{-/-} accélérât et exacerbât la maladie [169-171]. Toutefois, dans un autre modèle de diabète de type I où des souris NOD exprimaient un TCR $\alpha\beta$ Tg d'un clone CD8⁺ (NY8.3) spécifique à protéine apparentée à la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase spécifique aux îlots pancréatiques, seulement 33% des femelles et 27% des mâles ont développé le diabète lorsque croisés sur un fond RAG^{-/-}, renforçant la notion que les cellules T CD4⁺ jouent un rôle primordial dans le développement de cette maladie [172]. De plus, supportant cette idée, l'injection de cellules spléniques de souris NOD déplétées en cellules CD8⁺ provoque rapidement un diabète sévère.

Il arrive aussi qu'un modèle TCR Tg ne développe pas la maladie attendue avant l'injection de l'antigène. Tel est le cas pour le modèle d'Osman et al. ayant un TCR $\alpha\beta$ Tg spécifique au collagène de type II (CII) sous un fond DBA/1 (H-2^d). Ces cellules T Tg ne sont pas délétées dans le thymus et ne sont pas anergiques. Toutefois, les souris ne développent pas d'arthrite rhumatoïde tel qu'attendu. Cependant, l'arthrite peut être induite par immunisation avec du CII et un adjuvant (les deux étant requis) [173].

McHugh et al. ont généré des souris TCR Tg à partir d'un clone T CD4⁺ (TxA23) spécifique à la sous-unité α de l'ATPase H/K gastrique. Ces cellules T Tg ne sont pas supprimées dans le thymus et sont retrouvées en nombre normal en périphérie. Toutes ces souris TCR Tg (BALB/c, H-2^d) ont développé la maladie spontanément, sans avoir besoin de réduire le répertoire de cellules T endogènes. D'autre part, les auteurs ont démontré que les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ étaient présentes et fonctionnelles chez ces souris. Ils ont donc conclu qu'un délai dans le développement des Treg, couplé à une initiation hâtive de la maladie, pourraient expliquer la progression de la maladie chez les souris génétiquement capables de générer des cellules Treg. En effet, de larges infiltrats dans la muqueuse gastrique ont été observés à l'âge de 10 jours seulement [174].

Au fil du temps, plusieurs modèles ont été générés, où des souris TCR Tg reconnaissent des antigènes qui sont exprimés comme faisant partie du soi (néo-soi).

Ces modèles doubles transgéniques ont initialement servi à démontrer l'importance d'une présentation antigénique adéquate dans les réponses des cellules T, le rôle de la présentation des antigènes du néo-soi dans les ganglions lymphatiques périphériques, l'importance du nombre des cellules T autoréactives dans la délétion clonale, l'influence de la quantité d'antigène exprimée, ainsi que la contribution du fond génétique. Les modèles de souris doubles transgéniques ont également été utilisés pour étudier la contribution du développement des cellules Treg dans le thymus et en périphérie [161].

La question de l'importance du moment de l'expression de l'auto-antigène concernant l'établissement de la tolérance a été adressée par Forster et al. chez des souris où le large antigène T (Tag) du virus simien 40 est exprimé comme transgène. L'expression embryonique de Tag a été observée chez les souris TCR Tg tolérantes, mais il n'y avait pas de tolérance chez les souris où l'expression de Tag débutait après la naissance [175].

L'étude des modèles où des lignées de souris TCR Tg ont été croisées avec un antigène du néo-soi sous différents promoteurs a permis d'observer différents niveaux de tolérances périphériques et centrales, dépendamment du niveau d'expression du néo auto-antigène dans le thymus et dans le tissu cible lui-même, ainsi que de son accessibilité au niveau du sang périphérique. Un exemple du dernier cas est illustré par les souris exprimant l'antigène hémagglutinine (HA) de virus de l'influenza sous le contrôle du promoteur de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) qui dirige l'expression de l'HA aux astrocytes et, à un moindre degré, aux cellules gliales entériques. Malgré le fait que l'antigène était exprimé en plus grande concentration dans le système nerveux central (SNC) que dans l'intestin, lorsque les souris GFAP-HA ont été croisées avec des souris exprimant un TCR Tg spécifiques à l'HA, toute la progéniture des souris doubles transgéniques a développé une vasculite et une jéjuno-ileocolite fulminante pour mourir à l'âge de huit jours, alors que le SNC n'était aucunement affecté [176].

Différents modèles doubles transgéniques où les antigènes du néo-soi sont exprimés sous le contrôle du promoteur de l'insuline du rat (RIP) et exprimant en même temps le

TCR Tg spécifique correspondant par des cellules T CD8⁺ ont donné des résultats variables. À un extrême, les souris ont développé un diabète spontané fulminant et à l'autre extrême, une tolérance a été observée. Il existe également une série de résultats intermédiaires, telle que l'ignorance, qui peut être transformée en diabète fulminant par injection d'un virus exprimant le néo-antigène. Les explications qui ont été avancées pour expliquer ces dissimilitudes incluent les différences de la fréquence des cellules T antigène-spécifiques, le degré d'exclusion allélique dans différentes lignées de souris TCR Tg, l'affinité/avidité de la reconnaissance de l'antigène, le niveau et le moment d'expression de l'antigène dans le thymus et dans l'organe cible et enfin, le degré de présentation croisée par les CPA [161].

Bref, malgré le fait que plusieurs modèles animaux développant une HAI ont été décrits, aucun n'est similaire à l'HAI chronique et spontanée telle qu'observée chez l'homme. De plus, les études que nous venons d'examiner suggèrent une implication évidente des cellules CD8⁺ dans la pathogenèse des maladies auto-immunes spécifiques d'organes. Ainsi, dans le but de comprendre les mécanismes responsables de la réponse auto-immune dans la pathogenèse de l'HAI, nous voulons produire un nouveau modèle murin double Tg exprimant le récepteur de cellule T (TCR) spécifique à l'épitope immunodominant NP₃₉₆₋₄₀₄ de la nucléoprotéine (NP) du virus LCMV qui à son tour est transgéniquement exprimée dans le foie comme néo-auto-antigène, ce qui pourrait mener au déclenchement d'une HAI spontanée et chronique.

HYPOTHÈSE

Les MAI se caractérisent par la destruction d'un organe cible suite à l'activation des réponses auto-immunes élaborées par les lymphocytes T et B, ou les deux. Les causes déclenchant cette réponse auto-immune sont toujours inconnues. Toutefois, des études épidémiologiques ont démontré que les facteurs génétiques et environnementaux sont des éléments déterminants dans la susceptibilité à l'auto-immunité [32]. L'hépatite auto-immune est une maladie d'étiologie inconnue, caractérisée par la destruction progressive du parenchyme hépatique suite à une infiltration lymphocytaire [177]. Cette maladie necroinflammatoire chronique se caractérise aussi par la production exagérée d'anticorps dans le sérum (>2.5 mg/dl) et une prédisposition génétique associée aux gènes HLA de classe II [76, 100]. Les modèles animaux développant une MAI ayant des caractéristiques semblables aux MAI chez l'homme représentent un outil indispensable à la compréhension des mécanismes pathogénique et à la mise au point des stratégies thérapeutiques spécifiques aux MAI. Malgré le fait que plusieurs modèles animaux développant une HAI ont été décrits, aucun n'est similaire à l'HAI chronique et spontanée telle qu'observée chez l'homme. Récemment, nous avons produit des souris Tg exprimant la NP du LCMV sous le promoteur de la transthyréine (TTR) comme un néo-antigène du soi dans le foie [178]. Ces souris Tg (TTR-NP) développent une HAI, 4 à 5 mois après immunisation par des plasmides codant pour cette NP à l'âge de 6 à 8 semaines. Basé sur ces résultats et sur les modèles précédents de MAI que nous avons abordé, nous pensons qu'il existe des arguments convaincants soutenant l'implication des cellules T CD8⁺ autoréactives dans la pathogenèse de l'HAI. Nous proposons que le développement d'un modèle où l'expression du peptide cible de ces cellules T CD8⁺ autoréactives est confinée exclusivement au foie, étant sous le contrôle du promoteur-amplificateur minimal TTR [179, 180], aurait comme avantage de prévenir la délétion des clones T CD8⁺ au niveau du thymus durant le processus de sélection négative. Ainsi, dans le but de comprendre les mécanismes responsables de la réponse auto-immune dans la pathogenèse de l'HAI, notre objectif consiste à produire un nouveau

modèle murin double transgénique possédant à la fois des cellules T CD8⁺ pourvues d'un TCR Tg spécifique à la NP₃₉₆₋₄₀₄ du virus LCMV et co-exprimant cette NP-LCMV comme néo-antigène dans le foie sous le contrôle du promoteur TTR spécifique à cet organe. le but étant que les cellules T CD8⁺ TCR NP18 Tg s'attaquent spécifiquement aux tissus hépatiques, initiant ainsi une HAI spontanée et chronique. Ce modèle permettrait de mettre en évidence le rôle des acteurs potentiels, dont les cellules T CD8⁺, impliqués dans la destruction du parenchyme hépatique, et de développer de nouvelles stratégies pour inhiber la réponse immune pathologique sans altérer la réponse immune protectrice.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

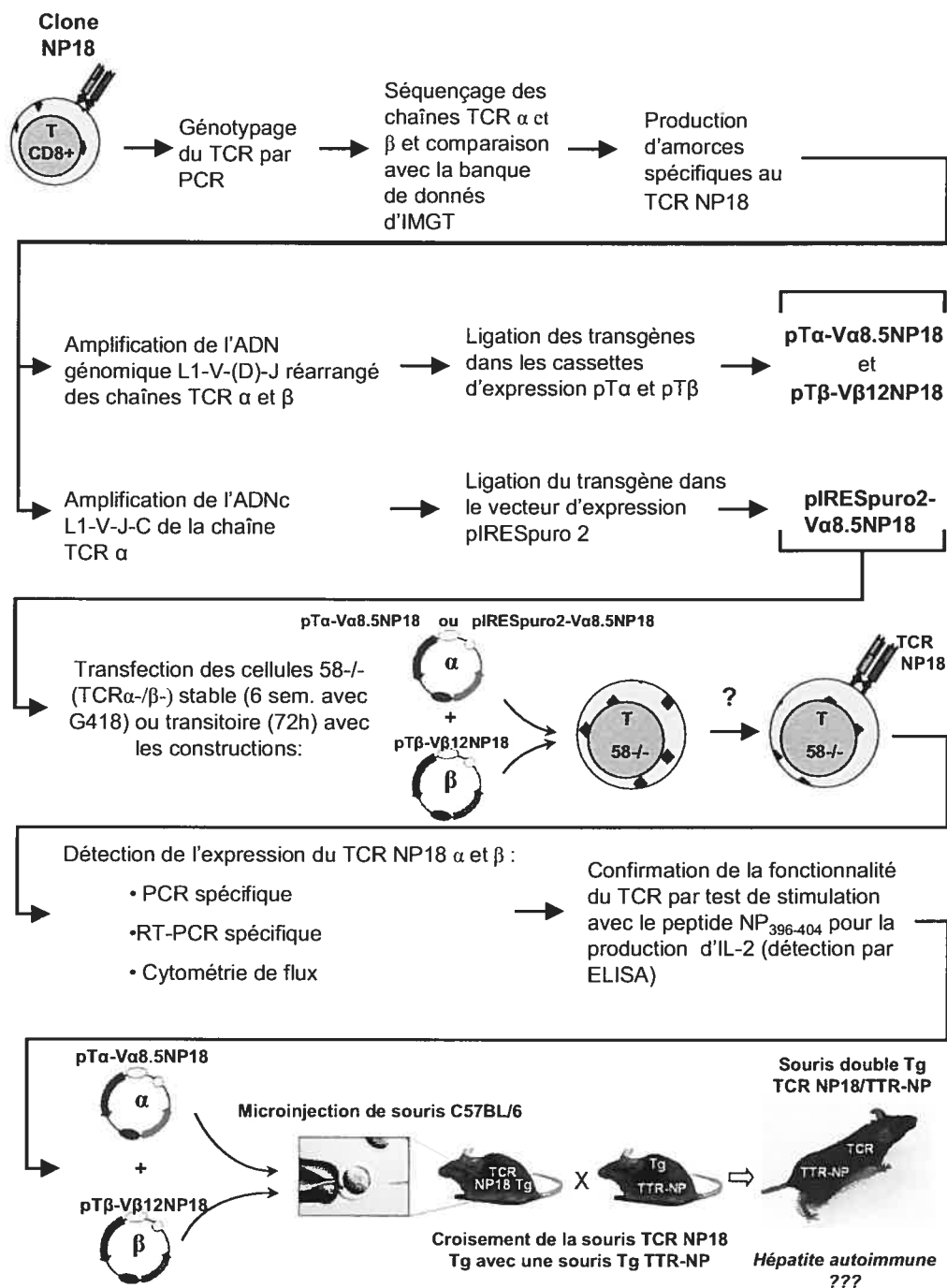


Figure 6 : Plan des manipulations décrites dans la section Matériel et Méthodes

Les manipulations qui sont détaillées dans les prochaines sections du Matériel et Méthodes sont sommairement illustrées ci-dessus, à la Figure 6, dans l'ordre qu'elles ont été accomplies.

Génotypage du TCR

L'ARN total de 10^6 cellules NP18 [181] et EL-4.IL-2 (ATCC TIB-181) a été extrait au TRIZOL (Invitrogen) ou avec le Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les directives du manufacturier et récupéré dans 20 μ L H₂O traités avec 0.1% de pyrocarbonate de diéthyle (DEPC), puis conservé à -80°C. L'ADN complémentaire (ADNc) des cellules NP18 et EL-4.IL-2 a ensuite été généré avec la transcriptase inverse SuperScript II (Invitrogen) sur 1 μ g d'ARN et récupéré dans 20 μ L H₂O DEPC. La nature des chaînes α et β du TCR de ces clones a été déterminé par réaction de polymérisation en chaîne « *polymerase chain reaction* » (PCR) sur l'ADNc à l'aide d'amorces spécifiques à toutes les régions variables et constantes des TCR α et β murins connus, tel que décrit par Baker et al. [182] et les produits de PCR ont été vérifiés sur un gel TBE d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium. Tous les oligonucléotides ont été synthétisés par Integrated DNA Technologies. Comme contrôle de la qualité de l'ARN, la β -actine a été amplifiée à partir de chaque ADNc avec les amorces PAB1 5' GTT TGA GAC CTT CAA CAC C 3' et PAB2 5' CTC TTTGAT GTC ACG CAC G 3'. La détection du TCR connu (V α 10, V β 12) [183] des cellules EL-4 ou des cellules T CD8+ CTLL-2 a servi comme contrôle de la technique. Les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pCR 2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) et les plasmides obtenus ont été amplifiés par transformation des bactéries électrocompétentes E. coli DH5 α avec le kit One Shot MAX Efficiency™ DH5-T1R E. coli (Invitrogen). L'ADN plasmidique généré a ensuite été purifié avec des colonnes QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), puis séquencé de façon bidirectionnelle avec les amorces du kit TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Les séquences des chaînes α et β du TCR ont été comparées et alignées avec la base de données de l'« *international ImmunoGeneTics (IMGT) information System* » (<http://imgt.cines.fr>).

Clonage

Des amorces spécifiques aux régions L1 et de jonctions (introns) de chacune des deux chaînes du TCR (V α 8.5NP18LINEW : 5'GAC CCC GGG TCA TTT CTT CCA TGA ACA TGC GTC 3' et J α NP18 : 5'GCA GCG GCC GCA GAA AAT ACA CCA GTA AGC 3'; V β 12NP18LINEW : 5'ACA TCA GCT CGA GTC CCA CTA TGG GCA TCC 3' et J β NP18 : 5'CCT TAG CCG CGG AAA TGC TCC CTC C 3') ont été générées selon l'analyse du séquençage pour amplifier la séquence au niveau de l'ADN génomique réarrangé englobant les régions V(D)J. Aux fins de sous-clonage, des sites de restrictions ont été rajoutés aux extrémités des amorces (5'-XmaI et 3'-NotI pour α ; 5'-XhoI et 3'-SacII pour β). Après amplification par PCR, les bandes d'ADN obtenues ont été purifiées sur les colonnes du kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), et clonées dans le vecteur pCR 2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). L'ADN de ces deux nouvelles constructions a été amplifié par culture bactérienne à l'aide du kit Plasmid Midi Kit (Qiagen) et récupéré dans 50 μ L d'eau. L'ADN de ces constructions fut ensuite digéré 18h à 37°C avec les endonucléases XmaI/NotI (double digestion) pour le TCR α et XhoI/SacII (double digestion) pour le TCR β , puis les bandes correspondantes à chacune des deux chaînes du TCR (inserts) ont été isolées sur un gel d'agarose 1% (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen), et reclonees par la Ligase T4 DNA (Invitrogen) à 16°C durant 18 heures dans leurs cassettes d'expressions de TCR transgéniques respectives, pT α et pT β [184], après confirmation de l'intégrité des séquences par séquençage bidirectionnel et alignement avec les séquences de références (voir section génotypage). L'ADN des deux vecteurs pT α et pT β avait été préalablement amplifié à partir d'une culture bactérienne de 500 mL (Plasmid Midi Kit, Qiagen), récupéré dans 100 μ L d'eau, puis 10 μ g de chaque ADN a été digéré par double digestion, comme pour l'insert. Le produit de la digestion a été migré sur un gel d'agarose 1% (Low Melting Gel Agarose, Sigma). Les bandes correspondantes aux vecteurs ont été isolées du gel, dissoutes à 65 °C, et l'ADN extrait par phénol/chloroforme et récupéré dans 20 μ L d'H₂O. Ainsi, deux constructions ont été

obtenues : pT α -V α 8.5NP18 et pT β -V β 12NP18. La présence et le sens d'intégration du transgène TCR α ont ensuite été vérifiés selon une carte de restriction établie avec les enzymes Sall et PstI, alors que le transgène TCR β a été vérifié par la carte de restriction établie avec l'enzyme PvuII. Ensuite, les résultats ont été comparés dans les deux cas au vecteur vide correspondant. La présence de chacun des deux transgènes a également été confirmée par PCR sur les constructions à l'aide de combinaisons d'amorces internes.

Pour vérifier l'expression de la chaîne TCR α NP18, l'ADNc de cette chaîne a été amplifié avec les amorces spécifiques à la région L1 et C α . Puis, le produit de la PCR a été cloné dans le vecteur pCR 2.1-TOPO et la présence, le sens d'intégration, ainsi que l'intégrité de la séquence ont été vérifiés par séquençage bidirectionnel et par PCR. Le fragment contenant la région codante a été retiré par digestion avec des enzymes de restrictions BamHI et NotI, et la bande d'intérêt a été excisée du gel d'agarose pour ensuite y extraire, avec le kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), l'ADNc de la chaîne TCR α qui fut immédiatement cloné au niveau du site de clonage multiple du vecteur contenant la résistance à la puromycine, pIRESpuro2 (Clontech), générant ainsi la construction pIRESpuro2-V α 8.5NP18.

Transfection

La lignée cellulaire (hybridomes de cellules T) 58 α - β - déficiente en chaînes α et β du TCR [185] nous a été fournie par le Dr. Hugo Soudeyns (CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada). Ces cellules ont été d'abord transfectées par électroporation avec 10 μ g de la construction de la cassette pT β -V β 12.NP18 circulaire ou linéarisée (avec l'enzyme de restriction KpnI (Fermentas) puis purifiée par précipitation à l'acétate d'ammonium) et 5 μ g du vecteur pRc/CMV contenant le gène de résistance à la généticine (neo). Les cellules (1×10^7) ont été lavées 2 fois au « *phosphate-buffered saline* » (PBS) 1X, puis resuspendues dans 0.8 mL de PBS 1X et placées dans des cuvettes d'électroporation (0.4 cm d'ouverture). L'ADN fut ajouté et mixé doucement par inversion. Les cellules ont été gardées 5 min sur la glace, puis pulsées dans l'appareil Bio-Rad Gene Pulsar à 0.35 kV et une capacitance de 960 μ F. Ensuite, les

cellules ont immédiatement été placées 10 min sur la glace et diluées dans un volume final de 16 mL de milieu de culture non-sélectif de RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Invitrogen), 5×10^{-5} M 2-ME, 100U/mL de pénicilline G et 100 μ g/mL de streptomycine. Les transfectants ont été incubés à 37°C dans des plaques de 6 puits, 5 mL/puits. Deux jours plus tard, l'agent de sélection Généticine G418 (Invitrogen) fut ajouté aux cellules pour une concentration finale de 1 mg/mL et les cellules furent placées dans des plaques de 96 puits, 200 μ L/puits. Au bout de 6 semaines de sélection, les transfectants stables furent analysés par PCR de transcription inverse « *reverse transcription PCR* » (RT-PCR), PCR et immunocytochimie contre la chaîne V β pour la présence et l'expression du transgène. Un clone exprimant de manière stable V β 12.NP18 a ensuite été identifié (58 α -/V β 12.NP18) et transfecté d'abord similairement avec 10 μ g de la construction pIREspuro2-V α 8.5NP18 linéarisé avec NruI ou circulaire. La moitié des transfectants a servi de transfection transitoire (72h) et l'autre moitié a été sélectionnée sur une durée de 6 semaines à 0.5 μ g/mL de puromycine pour générer des transfectants stables. Le clone 58 α -/V β 12.NP18 a également été transfecté transitoirement en utilisant l'agent de transfection DOTAP (Roche) avec 2 μ g de pIREspuro2-V α 8.5NP18 circulaire. Après confirmation de l'expression de la chaîne V α 8.5NP18 du TCR par cytométrie en flux, immunocytochimie et RT-PCR/PCR, le clone 58 α -/V β 12.NP18 a été transfecté par électroporation avec 20 μ g ou 10 μ g d'ADN circulaire de la cassette pT α -V α 8.5NP18 et 5 μ g du vecteur pIREspuro2 vide. La puromycine à 0.5 μ g/mL a été ajoutée 48h plus tard et les cellules ont été placées dans des plaques de 96 puits, 200 μ L/puits. 72h après l'électroporation, la moitié a servi pour les tests d'expression et de fonctionnalité du TCR en tant que transfection transitoire et l'autre moitié a été maintenue sous sélection durant 6 semaines pour générer des transfectants stables qui furent subséquemment préservés à -80°C.

Détection de l'expression du TCR par PCR et RT-PCR

L'ADN génomique des cellules (10^6 /clone) a été obtenu par extraction standard. Brièvement, les cellules ont été lavées 3 fois au PBS 1X, puis resuspendues dans 380 μ L

de SLB (100 mM de Tris HCl pH 7.6, 200 mM de NaCl, 5mM d'EDTA, 0.2% de SDS) et 20 μ L de protéinase K (Invitrogen) et incubées avec agitation 2h à 65 °C. Ensuite, 240 μ L d'NaCl 5 M ont été ajoutés et le tube vigoureusement agité pendant 2 min, avant d'être centrifugé pendant 15 min à 13000 rotation par minute (RPM). Le surnageant a été récupéré et l'ADN précipité par ajout d'éthanol 100 % (-20 °C) volume à volume et agitation par inversion jusqu'à l'apparition d'une « méduse ». L'ADN a ensuite été lavé à l'éthanol 70 % et récupéré dans 50-100 μ L d'H₂O. Les PCR permettant d'analyser l'efficacité des transfections ont été accomplies avec 100 ng de cet ADN pour chaque clone, avec les combinaisons d'amorces spécifiées dans les résultats.

L'ARN total des cellules transfectées de transitoirement (72h) ou de façon stable a été extrait avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) à partir de 10⁶ cellules et récupéré dans 20 μ L d'H₂O. L'ADNc a été obtenu par une RT-PCR classique avec la SuperScript II (Invitrogen) à partir de 10 μ L d'ARN et récupéré dans un volume final de 20 μ L d'H₂O. Différentes combinaisons d'amorces spécifiques aux régions 5'-L1 (leader) et 3'C (constante) du ADNc, tel qu'indiqué dans les résultats, ont permis de distinguer l'expression des chaînes V α 8 et V β 12 au niveau de l'ARN par rapport à l'ADN génomique réarrangé correspondant. Alternativement, les réactions d'amplification avec ces amorces ont été accomplies directement sur 10 μ L l'ARN total à l'aide du kit OneStep RT-PCR (Qiagen).

Immunocytochimie

Avant l'immunocytochimie, chacune des populations de cellules à analyser a été fixée sur des lames (Shandon Coated Double Cytoslides, Thermo Électron Corp.) par Cytospin. Premièrement, les cellules ont été lavées 2x au PBS 1X, puis leurs concentrations furent ajustées à 1.5x10⁶ cellules par mL. Les réservoirs (Shandon Double Cytofunnel, Thermo Électron Corp.) du Cytospin ont été chargés avec 100 μ L de cellules par lame et les cellules ont ensuite été centrifugées à 800 tours/min durant 5 min, pour obtenir 150x10³ cellules par lame. Immédiatement après, chaque lame fut fixée par immersion dans de l'acétone 100 % durant 5 min. Les lames ont été séchées 10

min à la température de la pièce et conservées à -80°C jusqu'à utilisation. L'immunocytochimie a été effectuée dans une chambre humide. Les cellules fixées sur les lames ont été rincées une fois au PBS 1X 5 min, puis traitées au H_2O_2 0.3% 10 min à la température de la pièce et lavées 2x au PBS 1X. Les lames ont ensuite été bloquées avec du BSA 1%/PBS 1X/ 0.1% Triton X-100 (pour la perméabilisation) 15min avant d'être incubées 1h avec le premier anticorps. Les anticorps ont tous été préalablement dilués dans du BSA 1%/PBS 1X/ 0.1% Triton X-100 et utilisés aux concentrations indiquées dans les résultats, alors que les lavages subséquents ont été effectués dans du PBS 1X/ 0.1% Triton X-100. Après le premier anticorps, les lames ont été lavées 2x 10 min. Le cas échéant, un 2^e anticorps-horseradish peroxidase (HRP) a également été incubé 1h de plus et 2 lavages de 10 min ont été effectués. Lorsque le premier anticorps était biotinylé, les lames ont été incubées 30 min en présence de streptavidine-peroxydase diluée au 1/1000 dans du PBS 1X/ 0.1% Triton X-100 et lavées 2x 10 min. En tant que substrat, un comprimé de DAB et un d'urée (Sigma FastTM 3,3'-Diaminobenzidine Tablet sets, Sigma) ont été dissous dans 1 mL de H_2O et le mélange a été ajouté aux lames pour 5 min dans une chambre humide à obscurité. La réaction a été arrêtée par immersion des lames dans l' H_2O 10 min puis les lames ont été colorées 2 min à l'hématoxyline, avant d'être relavées 10 min avec l' H_2O . Les lames ont été montées avec du VectaShield (Vector) et observées au microscope confocal.

Fonctionnalité du TCR par test de stimulation pour l'IL-2

Des splénocytes de la rate de souris C57BL/6 non-transgéniques ont été prélevés. Brièvement, la rate a été morcelée et écrasée dans 5 mL de RPMI 1640 et le tout a été passé par une seringue munie d'une aiguille no. 26. Puis, 5 mL de RPMI 1640 ont été rajoutés avant d'effectuer un lavage par centrifugation de 5 min à 1500 RPM. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 5 mL de solution de lyse des érythrocytes (NH_4Cl , pH 7.2) et incubé sur glace 10 min. Ensuite, 5 mL de RPMI 1640 ont été ajoutés et 2 lavages ont été effectués. Les splénocytes isolées ont été incubés à 37°C dans du RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec 5% de SVF (Invitrogen), 5×10^{-5} M 2-ME, 100U/mL de pénicilline G et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine.

Pour tester la fonctionnalité du TCR transgénique, un test de stimulation pour la production de l'IL-2 a été réalisé. Les splénocytes qui ont été chargés avec le peptide cible du TCR NP18 ont été incubés 2h avec 10 μ M du fragment peptidique NP₃₉₆₋₄₀₄ (FQPQNGFI) décrit par l'équipe d'Oldstone et al. [186]. Les splénocytes ont été irradiés à 3000 rad. Ensuite, 100 μ L (200×10^3 cellules) de splénocytes irradiés chargés avec le peptide ou non-chargés ont été incubés à 37°C en présence de 100 μ L (200×10^3 cellules) de cellules transfectées TCR α et TCR β (voir ci-dessus), de cellules 58-/- ou seuls dans des plaques de 96 puits pour un volume final de 200 μ L par puits. Pour chaque combinaison d'incubation, 10 puits identiques ont été réalisés. Après 48h, les plaques ont été centrifugées 5 min à 1500 RPM, le surnageant a été conservé à -20°C pour le test d'ELISA et les cellules conservées à -80°C pour le test de détection de l'ADNc du TCR α et TCR β sur l'ARN total à l'aide du kit OneStep RT-PCR (Qiagen), et de l'ADN incorporé dans les cellules transfectées, avec les combinaisons d'amorces spécifiées dans les résultats.

Pour l'ELISA, les surnageants des puits identiques ont été réunis ensemble pour ensuite être concentrés à l'aide des colonnes Microcon YM-10 (Millipore) de 2 mL à 400 μ L par centrifugation. Comme contrôle positif additionnel, des cellules EL-4.IL-2 ont été incubées en présence d'acétate de phorbol myristate « *phorbol myristate acetate* » (PMA) à 10 ng/mL et le surnageant contenant l'IL-2 a été ajouté au test. La détection de l'IL-2 par ELISA a été réalisée en duplicata (200 μ L par puits) avec le kit READY-SET-GO! Mouse Interleukin-2 (IL-2) (eBioscience) selon les directives du manufacturier, et une détection a été considérée positive si la densité optique était au moins deux fois la valeur des contrôles négatifs.

Cytométrie en flux

L'expression des chaînes V α 8 et V β 12 à la surface des cellules transfectées a été testée par coloration avec les anticorps anti-V α 8-biotine et anti-V β -isothiocyanate de fluorescéine (FITC) décrits dans la section Anticorps et Réactifs. Brièvement, 10^6

cellules ont été lavées 2x au PBS 1X puis incubées sur glace 1h dans une solution de PBS 1X/BSA 0.5%/SVF 2.5% avec un sérum de lapin immunisé à saturation pour bloquer les récepteurs Fc. Les cellules ont ensuite été resuspendues avec le premier anticorps dilué à la concentration indiquée dans les résultats dans du PBS 1X/BSA 0.5%/SVF 5% et incubées 1h sur glace. Dans le cas d'un premier anticorps biotinylé, les cellules ont ensuite été incubées 30 min sur glace avec l'avidine-FITC (Fluorokine, R&D Systems) diluées au 1/1000. Puis, les cellules ont été lavées 3x au PBS 1X et analysées avec l'appareil FACScalibur™.

Anticorps et réactifs

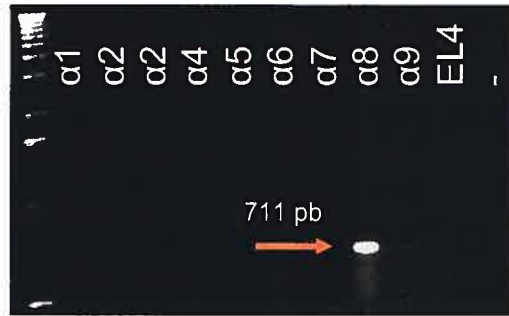
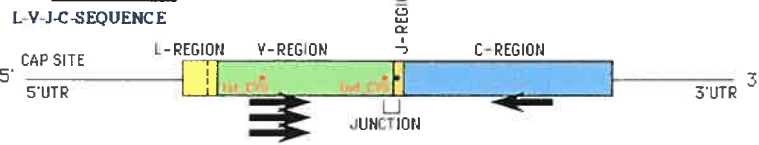
Les amorces générées, ainsi que celles publiées par Baker et al. PNAS USA 99: 9374–9379 (Supplemental Data), ont toutes été commandées chez Integrated DNA Technologies, Inc. (www.idtdna.com) et diluées à 50 pmol/μL pour leur utilisation; Vα8.5NP18LINEW : 5'GAC CCC GGG TCA TTT CTT CCA TGA ACA TGC GTC 3'; JαNP18 : 5'GCA GCG GCC GCA GAA AAT ACA CCA GTA AGC 3'; Jα NP18 interne : 5' GAG GGA CTT ACT TGC ATA AAC 3'; Vβ12NP18LINEW : 5'ACA TCA GCT CGA GTC CCA CTA TGG GCA TCC 3'; JβNP18 : 5'CCT TAG CCG CGG AAA TGC TCC CTC C 3') 3'; Jβ NP18 interne : 5'CTC CGC GGC AAC TTA CCG AGA ACA GTC AGT C 3'; pIRESpuro2IRESReverse 5'CGG CTT CGG CCA GTA ACG 3'; Vα8extReverse 5'GGT GCA GTT CAG CAT CAC AG 3'; β-actine PAB1 5' : GTT TGA GAC CTT CAA CAC C 3' et PAB2 : 5'CTC TTTGAT GTC ACG CAC G 3' Anticorps : Anti-mouse TCR bêta FITC-Conjugated clone H57-597, eBioscience; Armenian Hamster IgG Isotype Control FITC-Conjugated clone 8C1, eBioscience; TCRα (H-142) sc-9100 rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology; TCRβ (H-197) sc-9101 rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology; Rat Mab Anti-mouse Vα8 clone KT50, BIOSOURCE; ; Rat Mab Anti-mouse Vα8-Biotin clone KT50, BIOSOURCE; Avidine-Fluorescein (Fluorokine, R&D Systems); Horseradish Peroxidase Streptavidine, Vector Laboratories Inc.).

RÉSULTATS

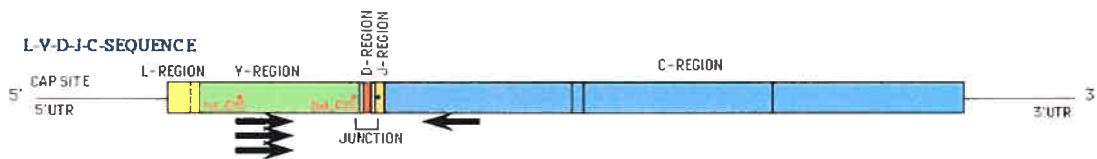
Génotypage du TCR du clone T CD8+ spécifique à la NP-LCMV

Le clone murin de cellules T CD8+ NP18 nous a été offert par Dr. M. Oldstone. Ce clone est spécifique au peptide (FQPQNGFI)₃₉₆₋₄₀₄ de la NP-LCMV restreint par la molécule CMH de classe I H-2D^b. Il a été sélectionné pour notre modèle, car il démontrait le plus de réactivité vis-à-vis du peptide NP₃₉₆₋₄₀₄ dans une étude relative à la réponse immune anti-LCMV en utilisant des tests de cytotoxicité, de production d'IFN- γ et de prolifération [181]. Pour déterminer le phénotype du TCR exprimé par le clone NP18, l'ARN total a été extrait de ces cellules, puis transcrit en ADNc par une réaction de transcription inverse. Le génotypage à partir de cet ADNc a été effectué par des réactions de PCR en utilisant une batterie d'amorces spécifiques à toutes les combinaisons de TCR α et TCR β murins connus, tel que décrit par Baker et al. [182]. Dans chaque réaction, l'amorce 5' est spécifique à la région variable (V) du TCR alors que l'amorce 3' est spécifique à la région constante (C) du TCR. (Figures 7a et 7b). Ainsi, seules les PCR sur l'ADNc du clone NP18 avec les combinaisons d'amorces V α 8-C α et V β 12-C β ont permis de détecter des bandes spécifiques. Comme contrôle de la technique, le clone T CD4+ EL-4 dont le TCR est connu (V α 10, V β 12) [183] a été utilisé, tel que décrit dans la Figure 7. Pour la spécificité du génotypage des chaînes TCR α et TCR β , le contrôle positif a été généré par la stimulation de splénocytes de souris avec la ConA, ce qui permet d'amplifier l'expression aléatoire de toutes les combinaisons de TCR. De plus, pour tester l'intégrité de l'ARN utilisé, des réactions de PCR avec des amorces spécifiques à la β -actine ont été réalisées (Figure 7c). La Figure 7d résume nos résultats indiquant que la chaîne TCR α du clone NP18 est V α 8 alors que la chaîne TCR β est V β 12. Il est intéressant de noter que le clone cellulaire EL-4 possède la même chaîne TCR β variable (V β 12) que celle détectée au niveau du clone NP18. En effet, ceci nous a permis, dans les manipulations subséquentes, d'utiliser ce clone comme contrôle positif technique pour la détection de la chaîne V β 12 de notre clone NP18 et comme contrôle négatif pour la chaîne TCR α .

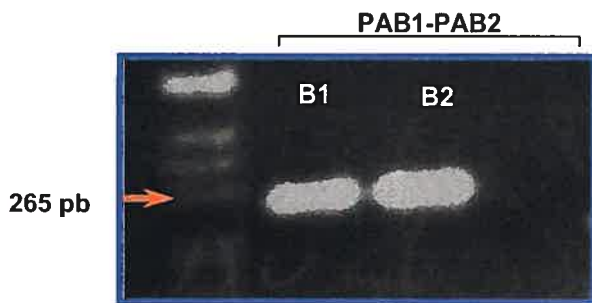
a) TCR α :



b) TCR β :



c) β -actine :



d)

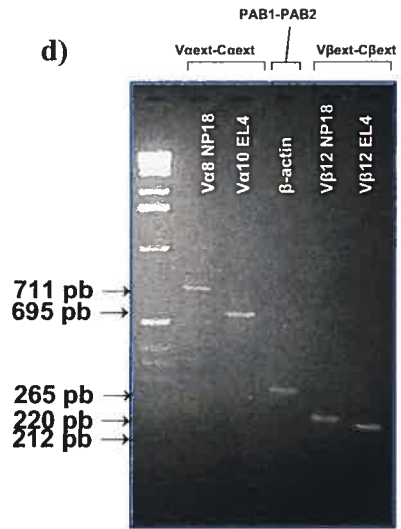


Figure 7 : Génotypage du TCR NP18. a) Résultat du génotypage par PCR de la chaîne TCR α du clone NP18 à l'aide des amorces indiquées par les flèches au haut de la figure. L'ARN des cellules NP18 a été extrait et transcrit en ADNc par une réaction de RT-PCR, ensuite cet ADNc a servi de matrice pour le génotypage par PCR de la chaîne TCR α du clone NP18 en utilisant une batterie d'amorces spécifiques à toutes les combinaisons des TCR α . Dans ces réactions de PCR, l'amorce 5' est variable et sert à tester la nature de la chaîne (V α 1, V α 2, V α 3, etc.) alors que l'amorce 3' Ca est invariable. Les différents puits du gel (en partant de la gauche) montrent les résultats de chacune des combinaisons d'amorce utilisée (seules les réactions de PCR V α 1 à V α 9 sont montrées). L'ADNc des cellules EL-4 (TCR V α 10 V β 12) a été utilisé comme contrôle négatif et a été testé avec l'amorce V α 8. Comme contrôle positif, l'ADNc de cellules spléniques stimulées avec la ConA a été testé avec l'amorce V α 8 (non-montré). Le signe (-) indique une réaction avec les l'amorce V α 8 sans l'ajout d'ADNc, afin de confirmer l'absence de contaminations. b) La même procédure a été appliquée pour le génotypage de la chaîne TCR β sur l'ARN des cellules NP18 (seules les réactions de PCR V β 10 à V β 18 sont montrées). L'ADNc des cellules EL-4 (TCR V α 10 V β 12) ainsi que celui des cellules spléniques stimulées avec la ConA ont été utilisés comme contrôles positifs et ont été testés tous les deux avec l'amorce V β 12). c) Pour contrôler la qualité de l'ARN extrait des cellules NP18 (deux différentes extractions, B1 et B2), l'ADNc de ces cellules a servi de matrice pour détecter par PCR l'expression de la β -actine en utilisant les amorces spécifiques 5' PAB1-PAB2 3' d) Récapitulation des résultats montrant les bandes qui correspondent à la nature des chaînes α et β du TCR des cellules T NP18 et EL-4 (déposition de 10 μ l des produits de PCR sur un gel d'agarose).

Confirmation de l'expression d'une seule chaîne TCR α par le clone NP18

Suite aux résultats du génotypage du TCR du clone NP18, nous avons constaté par PCR que ce clone n'exprime qu'une seule chaîne TCR α . Pour confirmer ce résultat, nous avons répété le génotypage de cette chaîne en utilisant différentes méthodes d'extraction d'ARN, au TRIZOL (Invitrogen) et avec le Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) et de RT-PCR avec la SuperScript II (Invitrogen) et avec le Kit OneStep RT-PCR (Qiagen), ayant différents niveaux de sensibilité de détection. Ainsi, les résultats (non-montrés) ont clairement indiqué qu'aucune autre chaîne TCR α n'est exprimée par le clone NP18, éliminant tout doute que ce clone possède une double spécificité conférée par une deuxième chaîne TCR α .

Analyse des séquences des chaînes α et β du TCR NP18

Afin de caractériser les séquences des TCR α et TCR β du clone NP18, le produit de PCR (pPCR) correspondant à chacune des chaînes obtenues durant le génotypage a été cloné dans le vecteur TOPO et l'ADN plasmidique de ces constructions a été séquencé dans les deux sens (séquençage bidirectionnel). Les séquences ont été alignées et comparées à celles disponibles dans la banque de données spécialisée pour les TCR murins, IMGT, sur le site web <http://imgt.cines.fr>. Cette analyse a permis de disséquer les différentes parties de chaque chaîne du TCR. Pour la chaîne TCR α (Figure 8a), les séquences ayant les numéros d'accèsion X06306 et AC005402 sont celles qui correspondent par alignement à la séquence de la région V α obtenue pour le clone NP18, alors que la région J α s'aligne avec les séquences numéro M38105 et M64238. Pour la chaîne TCR β (Figure 8b), la séquence de la région V β du clone NP18 s'aligne avec celle dont le numéro est AE000664, la région D β correspond à la séquence numéro X00934, alors que la région J β concorde avec la séquence numéro K02802 (voir Tableau VI). D'après la nomenclature de ces séquences, le clone T NP18 possède donc un TCR composé d'une chaîne α V α 8.5-J α 5.1 et une chaîne β V β 12-D β 2-J β 2.3. Il est intéressant de noter que nous avons observé quelques différences dans les séquences nucléotidique de clone NP18 et celles publiées. Ces différences situées principalement aux jonctions entre les segments V, (D), et J, au niveau de la région HV3 du TCR, seraient attribuées à la diversité jonctionnelle et contribueraient vraisemblablement à spécificité du clones NP18. Pour vérifier que ces différences ne sont pas dues à des mutations qui auraient pu survenir durant les réactions de PCR, nous avons analysé les séquences peptidiques des TCR α et TCR β du clone NP18 (montrées au bas de la Figure 8a et 8b) et confirmé qu'aucun codon-stop n'y est présent.

a) Séquençage et analyse des pPCR du TCR α NP18

Alignment for V-GENE **V α 8.5**

| input | score | GGAGACTCAGTGAACCCAGACAGAAAGCCTGGTCACTCTCACCAAGGGGTTCCTGTGATGCTGAACCTGACCTATCAGACTACTTACTCACCTTTC... |
|----------------------|-------|---|
| X05306 TRAV12D-2*02 | 1935 | |
| AC003927 TRAV12-2*01 | 1263 |G.....G.....A..... |
| Z04332 TRAV12D-2*01 | 1245 |T.....G.....G.....G..... |
| Z04350 TRAV12D-2*03 | 1236 |T.....G.....G.....G..... |

Alignment for J-GENE **J α 5.1**

| input | score | CCACAGGTTGTGGGGCAGCTCACTTTCGGGAGGGGGACAAGACTCCAAGTTTATGCAA |
|-----------------|-------|--|
| M18105 TRAJ5*01 | 277 | GA----- |

Translation of the JUNCTION

| input | 104 | C A L S A P Q V V G Q L T F G R G | 118 |
|-------|---|-----------------------------------|-----|
| input | TGT GCT TTG AGT GCC CCA CAG GTT GTG GGG CAG CTC ACT TTC GGG AGG GGG | | |

PROTÉINE TCR α NP18:

Met **RPDTC SVLVLLMLRSN** GDSVTQTEGLVTLTKGLPVM LNCTYQTTYS PFLFWYVQHL
 NEAPKLL LKSS TDN
 KRTEHQGFYATLHKSSSS FHLQKSSVQLSDSALYFCALS

b) Séquençage et analyse des pPCR du TCR β NP18

Alignment for V-GENE **V β 12**

| input | score | GATCTGGAGTTACCCAGACACCCAGCAATGAGGTGGCAGAGAAAGGACAAACAATATCTCTGAAGTGTGAGCCAGTTTCAGGCCACAAATGAC... |
|--------------------|-------|--|
| A6000564 TRBV15*01 | 1365 | |
| M13132 TRBV10*01 | 672 | A-----T--C-T--A-----T--G--CA-----A--G--G-----GA-GC--CT--TG-----A-----A--T-G--CT... |
| L29434 TRBV16*01 | 672 | A-----T--C-T--A-----T--G--CA-----A--G--G-----GA-GC--CT--TG-----A-----A--T-G--CT... |
| M15459 TRBV16*01 | 663 | A-----T--C-T--A-----T--G--CA-----A--G--G-----GA-GC--CT--TG-----A-----A--T-G--CT... |
| M13670 TRBV16*01 | 663 | A-----T--C-T--A-----T--G--CA-----A--G--G-----GA-GC--CT--TG-----A-----A--T-G--CT... |

Alignment for D-GENE **D β 2**

| input | score | GGGGGGCGCT |
|-----------------|-------|------------|
| X00934 TRBD2*01 | 35 | ----- |

Alignment for J-GENE **J β 2.3**

| input | score | GGGGGGCGCTGATGCAGAAACCGTGTATTTTGGCTCAGGAACCGACTGACTGTCTTCG |
|-------------------|-------|--|
| K02002 TRBJ2-3*01 | 227 |AG----- |

Translation of the JUNCTION

| input | 104 | C A S R D W G G A D A E T L Y F G S G | 118 |
|-------|---|---------------------------------------|-----|
| input | TGT GTC AGC AGG GAC TGG GGG GGC GCT GAT GCA GAA ACG CTG TAT TTT GGC TCA GGA | | |

PROTÉINE TCR β NP18:

Met **GIQTLCC VIFYVLI** AHT DAGVTQTPRHEVAEKGQTIILKCEPVSGHNDLFWYRQTKIQ
 GLELLSYFRSKSLMEDGGAFKDRFKAEMLNSSFSTLKIQTPEPKDSAVYLCASRD WGG A

Figure 8 : Alignements des séquences d'ADN génomique du TCR NP18 avec celles publiées par IMGT. a) Alignement de la séquence TCR α du clone NP18. b) Alignement de la séquence TCR β du clone NP18. Les séquences nucléotidiques déterminées du TCR du clone NP18 ont été entrées dans le site d'IMGT pour effectuer une analyse d'alignement avec les séquences de la banque de données. La section « input » montre nos résultats du séquençage de chacune des régions codantes du TCR, et en

dessous est indiquée la séquence qui correspond le mieux selon le site d'IMGT. La séquence peptidique de chacune des deux chaînes a été générée afin de vérifier que la protéine est complète et qu'aucun codon-stop n'y est présent. Les cystéines impliquées dans la formation de liaisons disulfures sont soulignées.

| Région de la Chaîne | Numéro d'accèsion | Nom de la Région |
|-----------------------------|-------------------|------------------|
| Vα | AC005402 / X06306 | V α 8.5 |
| Ja | M64239 / M38105 | Ja5.1 |
| Vβ | AE000664 | V β 12 |
| Dβ | X00934 | D β 2 |
| Jβ | K02802 | J β 2.3 |

Tableau VI : Résultats de la comparaison des différentes régions des chaînes du TCR NP18 avec la banque de données d'IMGT après séquençage des produits de PCR. Le numéro d'accèsion indique la séquence publiée sur IMGT similaire à celle obtenue par séquençage et le nom de la région correspondante.

Clonage des transgènes α et β du TCR NP18 dans des cassettes d'expression

Dans le but d'amplifier l'ADN des TCR α et TCR β du clone NP18 directement sur l'ADN génomique réarrangé (les régions L1 α -V α -Ja et L1 β -V β -D β -J β , respectivement), une amorce spécifique à la région « leader » (L1), couplée à une autre amorce dirigée contre l'intron de la région de jonction (J), ont été générées pour chacune des deux chaînes, d'après les séquences d'ADN correspondantes publiées dans la banque de données d'IMGT et illustrées dans la Figure 8. Ces amorces permettent l'amplification des régions codantes complètes entre la région V et J du TCR en incluant le codon de départ de transcription, ATG. Des sites de restrictions ont été rajoutés aux extrémités des amorces (5'-XmaI et 3'-NotI pour α ; 5'-XhoI et 3'-SacII pour β), afin de pouvoir subséquemment liguer chacun des deux pPCR constituant les transgènes dans une cassette d'expression spécifique permettant l'expression du TCR chez des souris transgéniques. Ces cassettes d'expression sont montrées dans la Figure 10. Le tableau

VII illustre les différentes régions des séquences de TCR publiées (<http://imgt.cines.fr>) qui ont servi à concevoir les amorces. Les zones où les amorces générées s'apparient sont indiquées en bleu, le nom attribué à chacune d'entre elles est indiqué en bleu en bas à droite et le sens de l'élongation est indiqué par la flèche. Les sites de restrictions sont soulignés en rouge et les séquences codantes sont représentées entre crochets. Ainsi, l'amorce spécifique à la région L1 α du TCR NP18 V α 8.5 a été nommée V α 8.5NP18L1NEW, celle spécifique à l'intron du segment J α 5.1 NP18 a été nommée J α NP18. De même, les amorces spécifiques aux régions L1 β et J β 2.3 (intron) ont été appelées V β 12NP18L1NEW et J β NP18, respectivement.

TCR V α 8.5 : Numéro d'accension: AC005402

V-GENE [71401..75000]

/allele TRAV12D-2*02

/gene TRAV12D-2

- 5'UTR [71401..72098]

- L-PART1 [72099..72144]

- atgcgctcctgacacctgctcagttcttgtgctcctcttaatgctca

M R P D T C S V L V L L L M L

Séquence V α 8.5 (leader 1) :

actcgaggaccaagtgtcatttcttccatgaac[ATGcgtcctgacactgctcagttcttqt 72058

5'gaccccggtcatttctccaTgaacATGcgtc 3' →

(xmaI)

(Amorce: V α 8.5NP18L1NEW)

TCR Ja5.1 : Numéro d'accèsion : M64239

| | | |
|--------------|-------------------------------------|-----------------|
| J-GENE | 78901..80600 | |
| | /allele="TRAJ5*01" | |
| | /gene="TRAJ5" | |
| 5'UTR | 78901..79367 | |
| J-NONAMER | 79340..79348 | |
| J-SPACER | 79349..79360 | |
| J-HEPTAMER | 79361..79367 | |
| J-REGION | 79368..79429 | |
| | /allele="TRAJ5*01" | |
| | /protein_id="AAA40390.1" | |
| | /gene="TRAJ5" | |
| | /codon_start=2 | |
| | /translation="GTQVVGQLTFGRGTRLQVYA" | |
| J-PHE | 79396..79398 | |
| DONOR-SPLICE | 79429..79431 | } INTRON |
| 3'UTR | 79430..80600 | |
| DONOR-SPLICE | 79429..79431 | |
| 3'UTR | 79430..80600 | |

Séquence Ja5.1 :

tgctcttacacgctgaaccagtgattcagattctaaattcccagccattggcttgctt **79500**

actggtgtatcttaaggcagttgccaag ggaattaatctcttcatcatcatagatcc **79560**

cgqccqcagaaaatacaccagtaagc 3'

(NotI)

(Amorce: JaNP18)

TCR Vβ12: Numéro d'accèsion: AE000664

- **L-PART1** [12886..12934]
- atgggcatccagaccctctgttgtgtgatcttttatgttctgatagcaa
M G I Q T L C C V I F Y V L I A

Séquence Vβ12 (leader 1) :

gtacaagtcctagttggatgtgtcacatcagtgctcatcccact[ATGggcatccagacc **12900**

5'acatcagctcqaqtcccactATGggcatcc 3' →

(XhoI)

ctctgttgtgtgatcttttatgttctgatagcaa]gtaagtcctgaggatacttaacatga **12960**

(Amorce: Vβ12NP18L1NEW)

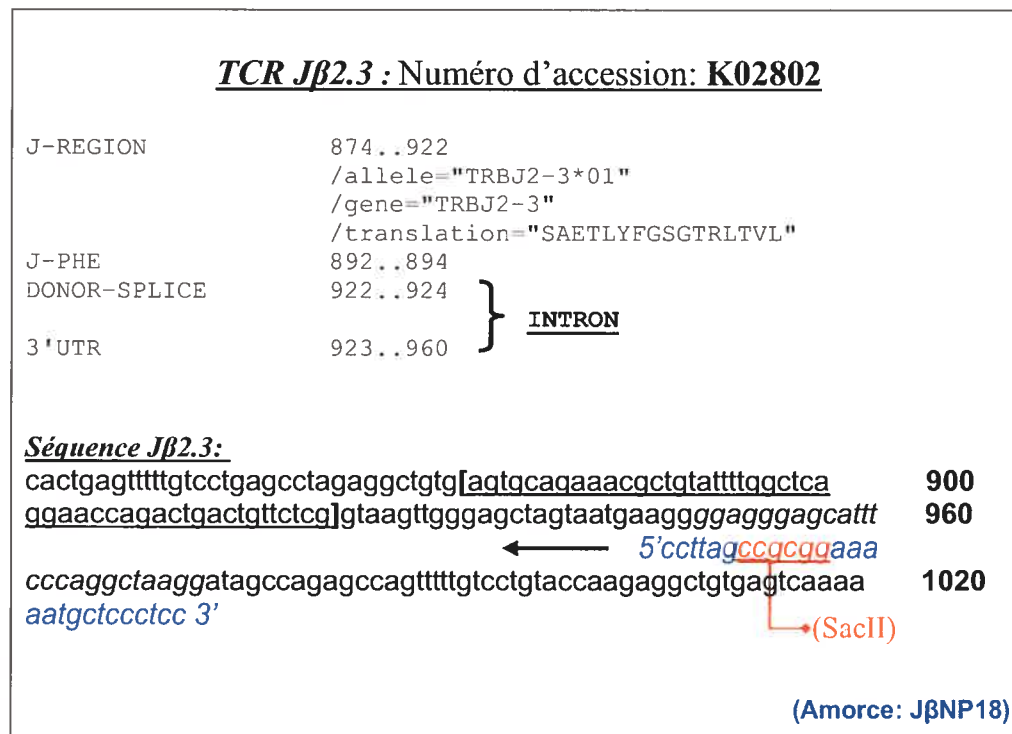


Tableau VII : Séquences d'ADN génomique publiées correspondantes aux différentes régions du TCR NP18 ayant servi à générer des amorces spécifiques. Les différentes régions des séquences publiées (<http://imgt.cines.fr>) correspondantes aux régions L1 α , J α , L1 β et J β du TCR NP18 ayant servi à générer des amorces spécifiques sont illustrées ci-dessus. Les séquences codantes sont représentées entre crochets. Les amorces illustrées en bleu sont indiquées en dessous de leurs zones d'appariement et le sens de l'élongation est indiqué par la flèche. Les séquences des sites de restrictions rajoutés au niveau des amorces sont soulignées en rouge et le nom attribué à chacune des amorces est indiqué en bleu en bas à droite.

Les produits de PCR amplifiés par ces amorces sont montrés dans la Figure 9. Ainsi, ces deux paires d'amorces ont permis d'amplifier spécifiquement l'ADN des cellules NP18, générant les bandes attendues de 697 pb pour le TCR α NP18 et de 581 pb pour TCR β NP18 (α NP18 et β NP18 respectivement). Tel qu'attendu, les amorces du TCR α NP18 n'ont pas permis d'amplifier le TCR α du clone cellulaire EL-4 (α EL-4). Toutefois, les amorces du TCR β NP18 ont réussi à amplifier une bande spécifique qui correspond à la chaîne TCR β du clone EL-4 (β EL-4). Cette bande était néanmoins légèrement plus petite de taille que celle amplifiée avec l'ADN du clone NP18, ce qui permet de la distinguer et qui indique qu'elle n'est pas le résultat d'une contamination. En effet, après avoir analysé la séquence nucléotidique du TCR β du clone EL-4, il était évident qu'il y a un appariement complet entre cette séquence et l'amorce

V β 12NP18L1NEW. Par contre, l'appariement de l'amorce J β NP18 à l'intron de la région J du TCR β du clone EL-4 n'est que partiel (non-montré). Notre paire d'amorces V β 12NP18L1NEW- J β NP18 permet donc d'amplifier aussi la chaîne TCR β du clone EL-4. Le produit de PCR de cette amplification est cependant différent de celui réalisé avec l'ADN du clone NP18 et peut être identifié par la différence de la taille de chacun. Afin d'avoir un contrôle négatif pour cette PCR, l'ADN des cellules T CD8⁺ cytotoxiques CTLL-2 a été utilisé. Ce contrôle n'a généré aucune bande lorsque testé avec nos amorces spécifiques aux chaînes TCR α NP18 et TCR β NP18 (α CTLL-2 et β CTLL-2, respectivement).

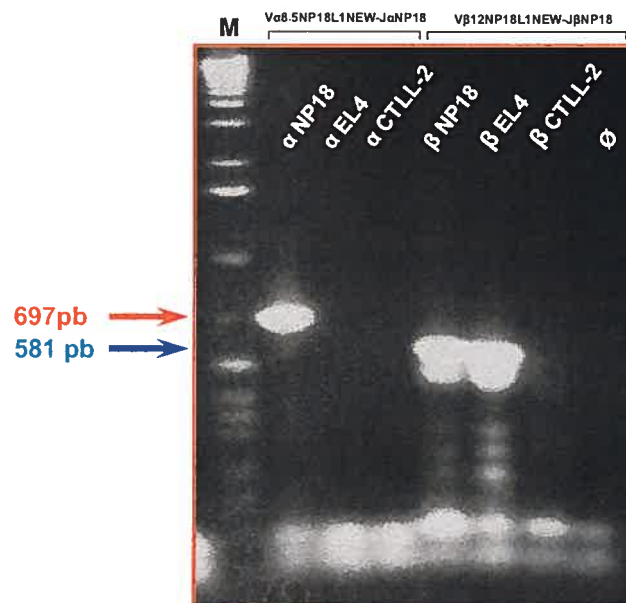
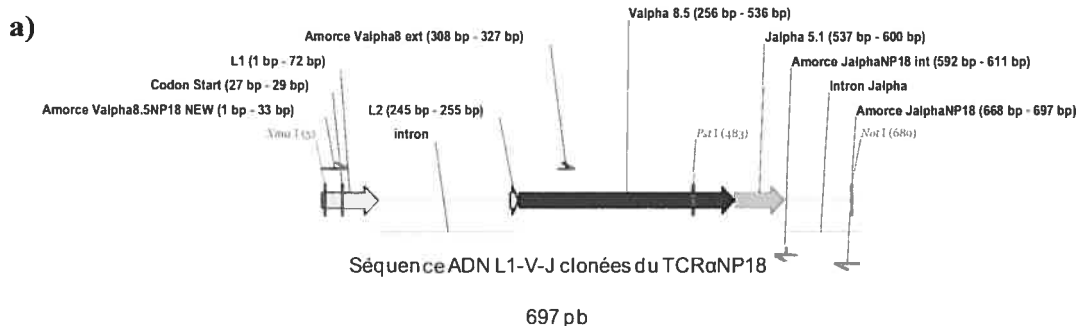
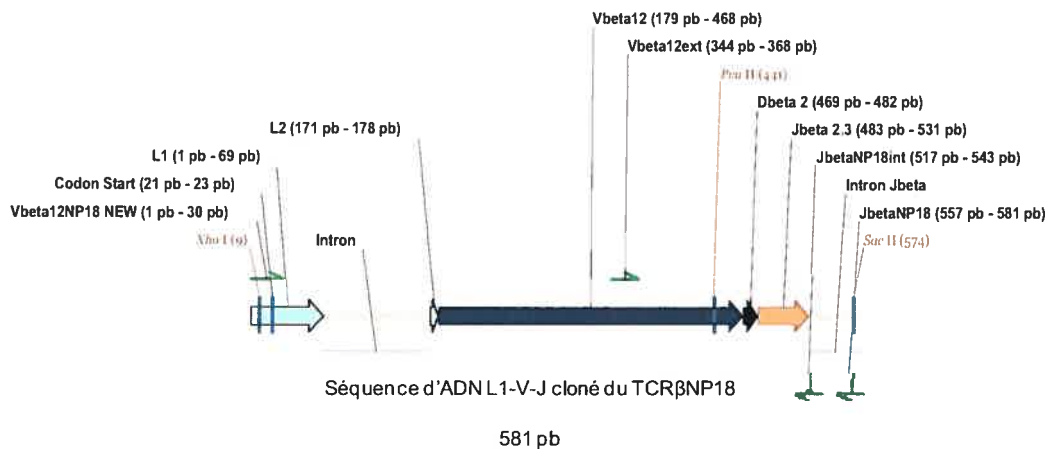


Figure 9 : Amplification du TCR NP18 à partir de l'ADN des cellules NP18 (région L1 à J). Les trois premiers puits après le marqueur (M) montrent le résultat des PCR effectuées avec les amorces Va8.5NP18L1NEW-JaNP18 sur l'ADN des cellules NP18 (α NP18), des cellules EL-4 (α EL-4) et des cellules CTLL-2 (α CTLL-2). Les 3 puits suivants (β NP18, β EL-4 et β CTLL-2) montrent les résultats des PCR effectuées avec les amorces V β 12NP18L1NEW-J β NP18 avec les mêmes ADN correspondants. Ces deux paires d'amorces permettent ainsi d'amplifier la région L1 à J (intron) de l'ADN réarrangé de chacune des chaînes du TCR NP18 à partir de l'ADN génomique. Les bandes (TCR α = rouge, TCR β = bleue) correspondant à la taille des bandes attendues, soit 697 pb pour le TCR α NP18 et 581 pb pour TCR β NP18. L'ADN des cellules CTLL-2 a servi comme contrôle négatif et celui des cellules EL-4 comme contrôle négatif pour la chaîne α et mais comme contrôle positif pour la chaîne β .

Après amplification des deux transgènes (illustrés dans la Figure 10a) par PCR, ces derniers ont été clonés dans le vecteur TOPO puis séquencés pour assurer l'intégrité des séquences. Ensuite, ils ont été sous-clonés par ligation dans leurs cassettes d'expression respectives (Figure 10b). Ces cassettes contiennent les promoteurs permettant l'expression des transgènes chez les souris transgéniques, en plus d'inclure la région constante (C) pour chacune des deux chaînes du TCR [184]. L'intégration des transgènes dans leurs cassettes respectives a été vérifiée par digestion enzymatique (selon une carte de restriction), des deux constructions obtenues, pT α -Va8.5NP18 et pT β -V β 12NP18. La double digestion de pT α -Va8.5NP18 avec les enzymes de restrictions XmaI et NotI a permis de détecter la présence du transgène TCR α NP18 (bande de 685 pb) intégré dans sa cassette pT α (Figure 11a). De même, le vecteur pT β -V β 12.NP18 a subi une double digestion avec les endonucleases XhoI et SacII, permettant d'observer une bande de 562 pb qui correspond au transgène TCR β NP18 intégré dans sa cassette d'expression (Figure 11c). De plus, ces résultats ont été confirmés par PCR avec des amorces spécifiques à chacune des chaînes du TCR NP18 (Figures 11b et 11d pour les transgènes TCR α NP18 et TCR β NP18, respectivement).

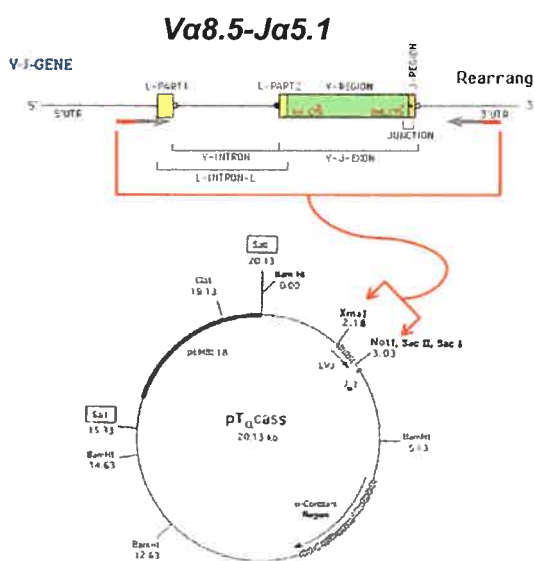
Le bon sens de l'intégration des transgènes est assuré par les différents bouts cohésifs à l'extrémité de chacun des deux transgènes, mais par précaution d'autres digestions ont été accomplies selon la carte de restriction qui a été établie pour chacune des constructions avec l'enzyme PstI pour la cassette α et PvuII pour la cassette β (non-monté).





b)

pT α -V α 8.5NP18



pT β -V β 12NP18

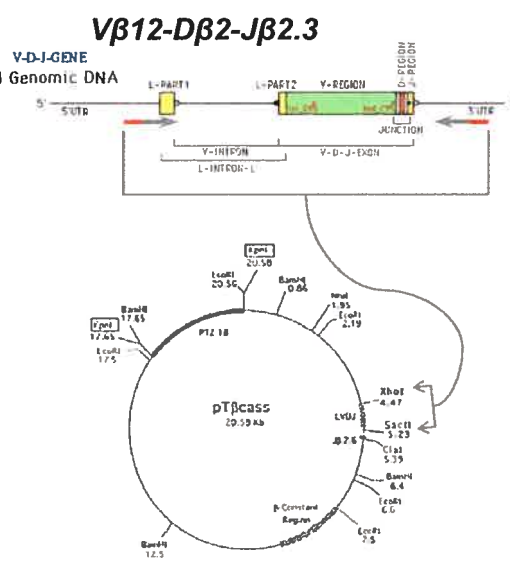


Figure 10 : Clonage des transgènes (TCR α et β NP18) dans leurs cassettes d'expression respectives.

a) Schéma des transgènes (ADN réarrangé) du TCR α et β NP18 obtenus par PCR avec les amorces générées tel que décrit plus haut, ainsi que la position des sites de restrictions et des amorces pertinentes au clonage. b) Position de la ligation des transgènes dans leurs cassettes d'expression respectives [184]. Le transgène TCR α possède les bouts cohésifs 5'-XmaI et NotI-3', alors que le transgène TCR β contient les bouts cohésifs 5'-XhoI et SacII-3', ce qui permet une intégration unidirectionnelle des transgènes. Le vecteur procaréyotique est représenté par une ligne noir foncé.

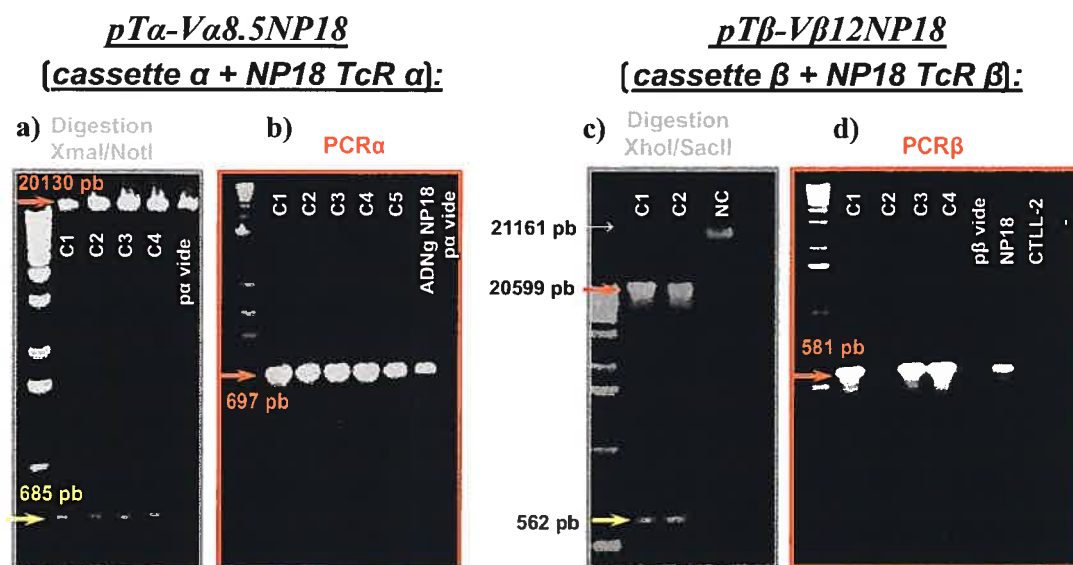


Figure 11 : Vérification de l'intégration des transgènes TCR α et β NP18 dans leurs cassettes d'expression respectives. L'ADN plasmidique de chacun des clones bactériens (C1, C2, C3, etc.) extrait à partir des colonies bactériennes transformées par les produits de ligation, a été digéré avec les enzymes de restrictions ayant servi à liguer les transgènes pour vérifier leur intégration dans leurs cassettes respectives (11a et 11c). La bande du bas indique la présence du transgène alors que la bande du haut représente la cassette. Contrôles négatifs de la digestion : cassette vide (*pT α* ou *pT β*) et/ou construction complète non-digérée (NC) afin de confirmer que la bande du bas n'est pas un artefact. Une PCR a aussi été effectuée sur cet ADN plasmidique à l'aide des amorces spécifiques à chacune des chaînes du TCR $\alpha\beta$ NP18 (PCR α : *V α 8.5NP18LINEW-J α NP18*, PCR β : *V β 12NP18LINEW-J β NP18*). L'ADN génomique des cellules NP18 (indiqué ADNg NP18 ou NP18 sur les gels), a été utilisé comme contrôle positif, alors que l'ADN plasmidique des cassettes vides (sans insert) a servi comme contrôle négatif et l'ADN des cellules CTLL-2 dans le cas de la PCR TCR β comme contrôle négatif (11b et 11d).

Vérification de l'intégration et de l'expression des transgènes des chaînes α et β à partir de leurs cassettes d'expression après transfection dans les cellules T 58-/-

Afin de tester l'expression du TCR transgénique NP18, les deux constructions, *pT α -V α 8.5NP18* et *pT β -V β 12NP18* ont été transfectées dans des hybridomes de cellules T TCR α - β -, 58 α - β -. Cette lignée lymphocytaire murine est déficiente en l'expression du TCR endogène, mais possède un complexe CD3-TCR ζ fonctionnel qui peut être exprimé à la surface avec un TCR transfecté [185]. En premier lieu, les deux chaînes ont été transfectées de façon transitoire dans ces cellules (voir légende de la Figure 12).

Après 72h d'incubation, quelques clones (C1 à C6) ont été isolés et l'ADN ainsi que l'ARN ont été extraits de ces cellules pour analyser par PCR la présence des transgènes ainsi que leurs expressions, respectivement. La détection de la chaîne TCR α NP18 est illustrée aux Figures 12A et 12B (PCR sur l'ADN et RT-PCR sur l'ADNc, respectivement), alors que la détection de la chaîne TCR β NP18 est illustrée aux Figures 12C et 12D (PCR sur l'ADN et RT-PCR sur l'ADNc, respectivement). Cette méthodologie nous a permis de confirmer que certains clones, et plus particulièrement le clone C4, contiennent l'ADN plasmidique et expriment simultanément l'ARN transcrit des deux transgènes, TCR α NP18 et TCR β NP18. Il est à noter que la détection par RT-PCR était plus sensible que celle effectuée par PCR sur l'ADN génomique des cellules. Ceci expliquerait pourquoi, pour certains clones, il était possible de détecter les transcrits d'ADNc mais pas l'ADN génomique. Ce phénomène serait dû au fait que les amorces utilisées pour les RT-PCR ont une meilleure spécificité ainsi qu'un appariement plus exact avec les séquences nucléiques de la matrice. En effet, les sites de restrictions qui ont été ajoutés aux extrémités des amorces que nous avons générées (comme décrit précédemment) nous ont souvent causé des ennuis relatifs à l'intensité de détection.

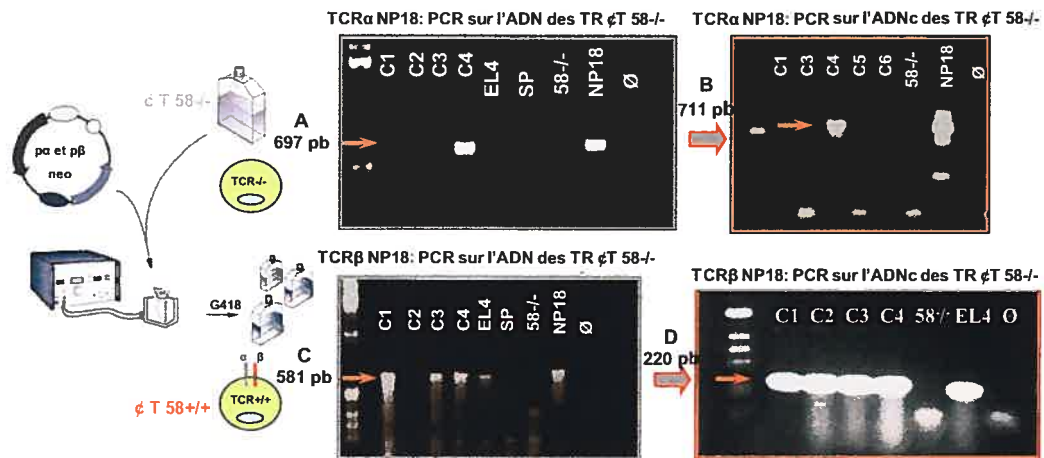


Figure 12 : Vérification de l'expression des cassettes *pT α -V α 8.5NP18* et *pT β -V β 12NP18* après transfection transitoire dans les cellules T 58 TCR $^{-/-}$. Des cellules T 58 $^{-/-}$ (10^6 cellules) ont été transfectées (TR) transitoirement par électroporation (0.35 kV, 900 μ F) simultanément avec 15 μ g de la cassette *pT α -V α 8.5NP18*, 10 μ g de la cassette *pT β -V β 12NP18* et 5 μ g du vecteur *pRc/CMV* contenant le gène de résistance à la généticine (G418). 72h après la transfections, l'ADN et l'ARN ont été extraits de

quelques clones (C1 à C6) pour vérifier l'intégration et l'expression des transgènes. **A et B** : PCR et RT-PCR avec les amorces *Vα8.5NP18LINEW-JαNP18* et *Vα8ext-Cαext*, respectivement, pour détecter la chaîne *TCRα*. Contrôles négatifs : ADN de cellules *EL-4*, ADN de cellules spléniques (*SP*) et ADN de cellules *T 58-/- non-transfectées*. Contrôle positif : ADN de cellules *NP18*. **C et D** : PCR et RT-PCR avec les amorces *Vβ12NP18LINEW-JβNP18* et *Vβ12ext-Cβext*, respectivement, pour détecter la chaîne *TCRβ*. Contrôles négatifs : ADN de cellules spléniques (*SP*) et ADN de cellule *T 58-/-*. Contrôles positifs : ADN de cellules *NP18* et ADN de cellules *EL-4*.

Pour confirmer l'expression de surface et la fonctionnalité du *TCR NP18 Tg*, nous avons généré des clones exprimant de manière stable les deux transgènes. Dans cette optique, les cellules *T 58α-β-* ont été transfectées avec les deux constructions, *pTα-Vα8.5NP18* et *pTβ-Vβ12NP18* (linéarisées ou circulaires) ainsi qu'avec le vecteur *pRc/CMV* contenant le gène de résistance à la généticine (*G418*). L'agent de sélection *G418* a été rajouté 48h après la transfection à 1 mg/mL. Au bout de quatre semaines, les clones survivants ont été analysés par cytométrie en flux pour l'expression de la chaîne bêta du *TCR NP18*. Ainsi, nous avons détecté l'expression de surface de la chaîne bêta sur les transfectants stables (Figure 13a). Deux semaines plus tard, afin de confirmer ce résultat, l'intégration des transgènes a été testée par PCR et RT-PCR sur leur ADN et leur ARN, respectivement (Figures 13b et 13c). Les deux différentes combinaisons d'amorces utilisées sur l'ADN du *TCRαNP18* indiquent qu'aucun des clones n'a intégré le transgène *TCRα*, puisqu'aucune bande correspondante à celle du contrôle positif (cellules *NP18*) n'a été détectée, que le transgène transfecté soit linéaire ou circulaire. À l'opposé, les clones *TRS4* (linéaire) et *TRS5* (circulaire) ont intégré l'ADN du transgène de la chaîne *TCRβ* du *TCR NP18*. Il semblerait donc qu'entre le moment où l'analyse par cytométrie en flux a été effectuée et la confirmation par PCR/RT-PCR, l'expression détectable de la chaîne alpha a été perdue dans les cellules transfectées. De plus, l'intégration seule du vecteur *pRc/CMV* (comprenant le gène de résistance à la généticine), dans certaines cellules, aurait permis à ces dernières de surpasser le faible taux de celles qui ont intégré les trois constructions d'ADN à la fois. Nos résultats suggéreraient également que l'intégration/expression de la chaîne alpha du *TCR* était moins efficace que celle de la chaîne bêta. Cette constatation est appuyée par la perte à plusieurs reprises de l'expression de la cassette *pTα-Vα8.5NP18* dans différentes

transfections stables, comparativement à la cassette pT β -V β 12NP18. Ceci pourrait être attribué, entre autres, à la nature de la séquence nucléotidique de la construction qui favoriserait l'excision du fragment intégré dans l'ADN génomique des cellules transfectés et/ou la formation de recombinaisons.

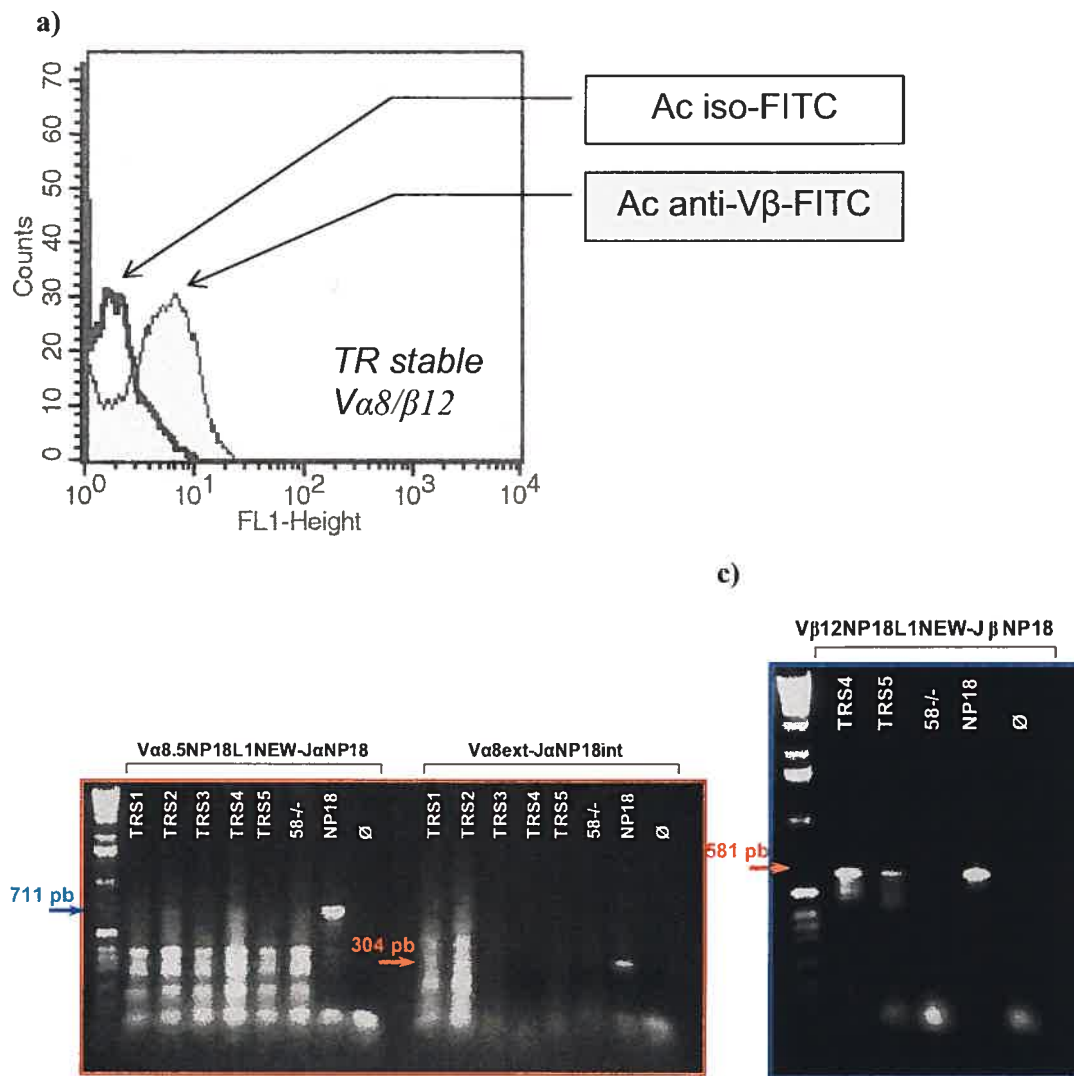


Figure 13 : Expression et intégration des transgènes lors des transfections stables. a) Cytométrie en flux pour mesurer l'expression de surface de la chaîne TCR β (avec un anticorps anti-V β -FITC) sur les cellules transfectées stablement avec les constructions plasmidiques pTa-Va8.5NP18 et pT β -V β 12.NP18 après 4 semaines de sélection à la généticine (G418). Contrôle négatif : anticorps isotypique-FITC. Afin de confirmer ce résultat, l'ADN des clones (TRS1 à TRS5) sélectionné à la généticine pendant 6 semaines, a été utilisé pour vérifier la présence des transgènes TCR α (b) et TCR β (c) par PCR avec les amorces indiquées en haut des figures. Pour le TCR α , une seconde PCR interne (int) a ensuite été effectuée sur les

produits de la première PCR (droite du gel (b)). Contrôle négatif: ADN de cellules T 58^{-/-}; contrôle positif: ADN de cellules NP18.

Avant de nous attarder à comprendre la non-expression de la chaîne alpha, nous avons testé l'expression protéique intracellulaire (cellules perméabilisées au Triton X-100) de la chaîne bêta par immunofluorescence avec un anticorps spécifique anti-V β -FITC sur les clones de cellules transfectées ayant préalablement exprimées la chaîne bêta au niveau de l'ARN (cellules T 58 α -/V β 12+). Les cellules T 58^{-/-} non transfectées ont été utilisées comme contrôle négatif. Cette approche a permis de confirmer l'expression de la chaîne bêta du TCR NP18 au niveau intracellulaire (Figure 14A). Toutefois, l'expression de cette chaîne à la surface cytoplasmique testée avec le même anticorps par cytométrie en flux était négative, en comparaison avec les cellules EL-4 utilisées comme contrôle positif (Figure 14B). Ce résultat est en accord avec la littérature, puisque l'expression de la chaîne bêta à la surface n'est possible que sous la forme dimérique avec la chaîne alpha du TCR.

Nous avons aussi confirmé indirectement la non-expression de surface du TCR au niveau des cellules transfectées que nous venons d'aborder. En effet, ces cellules transfectées de manière stable avec les deux transgènes ou celles n'exprimant que la chaîne bêta du TCR NP18, ne produisaient pas d'IL-2 lorsqu'elles étaient incubées en présence de splénocytes irradiés et chargés avec le peptide NP₃₉₆₋₄₀₄ auquel est spécifique le TCR NP18, tout comme les contrôles négatifs (cellules T 58^{-/-} et spléniques seules chargées ou non-chargées avec le peptide) (non montré).

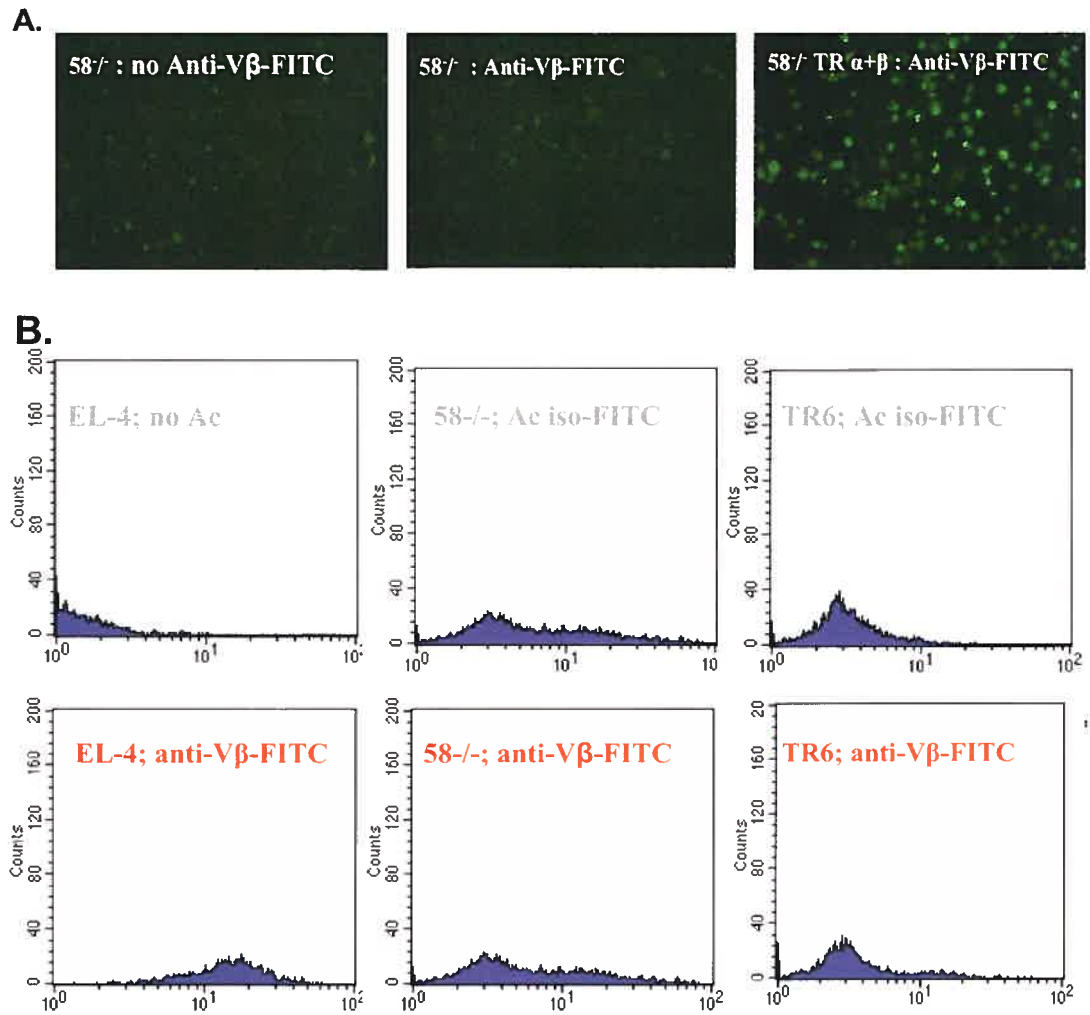


Figure 14 : Expression de la chaîne TCR β NP18. *A. Expression intracellulaire. Immunocytochimie sur les cellules T 58^{-/-} transfectées stablement (58^{-/-} TR $\alpha+\beta$) et marquées avec un anticorps anti-V β -FITC dilué au 1/20 (cellules perméabilisées au Triton X-100). Comme contrôles négatifs de la technique, des cellules T 58^{-/-} marquées avec l'anticorps anti-V β -FITC ou non-marquées (no Anti-V β -FITC) ont été utilisées. **B.** Cytométrie en flux pour mesurer l'expression de surface de la chaîne TCR β sur les mêmes cellules transfectées (clone TR6). Contrôles négatifs : cellules T 58^{-/-} marquées avec l'anticorps anti-V β -FITC. Contrôle positif technique : cellules EL-4 marquées avec l'anticorps anti-V β -FITC.*

Expression du transgène TCR α NP18 à partir du vecteur pIRESpuro2

Pour éviter le problème d'intégration que nous avons rencontré avec la cassette pT α -Va8.5NP18 lors de la tentative d'établissement de transfectants stables sélectionnés à la généticine, l'ADNc complet de la chaîne TCR α NP18 (Figure 15b) a été amplifié par RT-PCR à partir des cellules NP18 à l'aide d'amorces permettant d'englober les régions L1 α et Ca. Le produit de la RT-PCR (Figure 15c) a été purifié et cloné dans le vecteur TOPO pour ensuite être séquencé, afin d'assurer l'intégrité de la séquence avant d'être sous-cloné dans le vecteur pIRESpuro2. L'avantage de l'utilisation du vecteur pIRESpuro2 vient du fait qu'il permet directement la sélection des cellules l'ayant incorporé, par traitement à la puromycine, contrairement à la technique utilisée auparavant, où le vecteur contenant le transgène et celui contenant la résistance à la néomycine étaient séparés. Le sous-clonage a été accompli en excisant le fragment ligué dans TOPO entre les sites de restrictions EcoRI et BamHI, générant ainsi la construction pIRESpuro2-Va8.5NP18, tel qu'illustré à la Figure 15a.

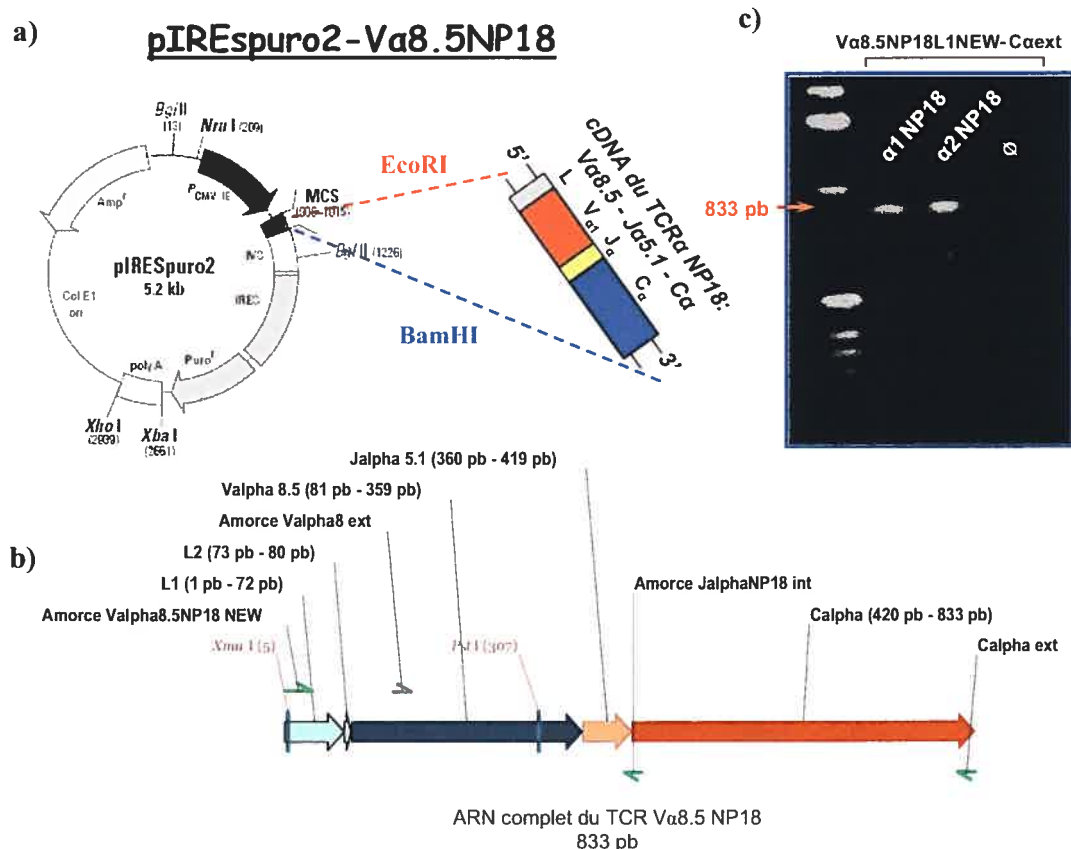


Figure 15 : Clonage de la chaîne complète (VJC) TCR α NP18 dans le vecteur d'expression pIRESpuro2 contenant le gène de résistance à la puromycine. a. Schéma de la stratégie de clonage. L'ARN complet du TCR α NP18 (illustré en b.) a été extrait, puis a servi de matrice pour une RT-PCR (c.) à l'aide des amorces indiquées. La bande de 833 pb obtenue à partir du clone NP18 (et confirmée par deux différentes réactions de RT-PCR, $\alpha 1$ NP18 et $\alpha 2$ NP18) a ensuite été excisée du gel et clonée dans le vecteur TOPO, à partir duquel l'ADNc a été soustrait par restriction avec les enzymes EcoRI et BamHI puis sous-cloné dans le vecteur pIRESpuro2, générant ainsi la construction pIRESpuro2-V $\alpha 8.5$ NP18.

Les cellules T 58 α -/V $\beta 12$ + ayant préalablement intégré le transgène de la chaîne bêta du TCR NP18 ont été transfectées avec cette nouvelle construction plasmidique pIRESpuro2-V $\alpha 8.5$ NP18 circulaire ou linéarisée. Des transfectants transitoires (72h) ou stables ont été générés par sélection à la puromycine. Les cellules transfectées transitoirement avec la forme circulaire de la construction ont été dénotées TRC et celles transfectées avec la forme linéaire ont été dénotées TRL. L'expression et l'intégration du transgène V $\alpha 8.5$ NP18 ont été respectivement testées par RT-PCR et par PCR, pour les transfectants stables et transitoires. La présence du TCR NP18 sur la surface des transfectants transitoires a été visualisée au pourtour des cellules par immunocytochimie sur des lames colorées avec des anticorps anti-V $\alpha 8$ et anti-V β murins couplés au HRP (non-montré). Bien que ces résultats nous ont semblé convaincants, il aurait été judicieux de tester l'expression protéique de chacune des deux chaînes du TCR par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques. L'expression de la chaîne TCR β NP18 par les transfectants stable était positive lorsque testée par PCR et RT-PCR. Toutefois, par immunocytochimie, l'expression de surface de cette chaîne TCR β s'est avérée être négative. De plus nous n'avons pas pu détecter l'expression du TCR α NP18 au niveau des transfectants stables ni par RT-PCR et PCR ni par immunocytochimie (non-montré). Ceci confirme qu'il existe un problème d'instabilité de l'expression intrinsèque à la chaîne TCR α NP18, tel qu'observé précédemment avec les cellules transfectées stablement avec la construction plasmidique pTa-V $\alpha 8.5$ NP18. Étant donné ce résultat, nous avons jugé préférable continuer à travailler avec des transfections transitoires.

Fonctionnalité du TCR NP18 exprimé par les cellules T 58^{-/-} transfectées transitoirement avec les cassettes d'expression pIRESpuro2-V α 8.5NP18 et pT β -V β 12NP18

Nous avons ensuite évalué la fonctionnalité du TCR NP18 exprimé par les transfectants transitoires en testant leur capacité à produire de l'IL-2 lorsqu'ils sont stimulés par des splénocytes irradiés présentant le peptide spécifique NP₃₉₆₋₄₀₄. Comme décrit dans la Figure 16, les transfectants (TRC et TRL) ont été stimulés avec des splénocytes irradiés (3000 rad) et chargées avec le peptide NP₃₉₆₋₄₀₄ (200x10³ transfectants pour 200x10³ splénocytes par puits). Suite à une stimulation de 72h, la présence de l'IL-2 dans le surnageant des cellules a été quantifié par un test d'ELISA. L'augmentation des niveaux d'IL-2 mesurés a confirmé que le TCR NP18 exprimé par ces transfectants est fonctionnel et spécifique au peptide NP₃₉₆₋₄₀₄. La détection de 47.8 à 54 pg/mL d'IL-2 secrétées par les cellules transfectées avec les plasmides pIRESpuro2-V α 8.5NP18 sous forme circulaire et linéaire respectivement, a été comparée aux contrôles négatifs : Cellules T 58^{-/-} seules ou avec des cellules spléniques (Sp) chargées ou non avec le peptide (Ag) et cellules TRC et TRL seules ou avec des cellules spléniques chargées ou non avec le peptide. Les cellules T 58^{-/-}, TRC et TRL seules produisent un faible bruit de fond détectable qui varie entre 3.1 à 6.4 pg/mL d'IL-2. Lorsqu'on incube des splénocytes avec l'antigène, nous observons également une augmentation d'IL-2 atteignant les 11.4 pg/mL, qui serait due à une faible activation non-spécifique des splénocytes. Cette expression basale d'IL-2 par les splénocytes avant leur irradiation est produite suite à une activation non spécifique pendant l'incubation avec le peptide NP₃₉₆₋₄₀₄. Le surnageant des cellules EL-4.IL-2 stimulées au PMA (un activateur non-spécifique de la prolifération des lymphocytes T), a été utilisé comme contrôle positif.

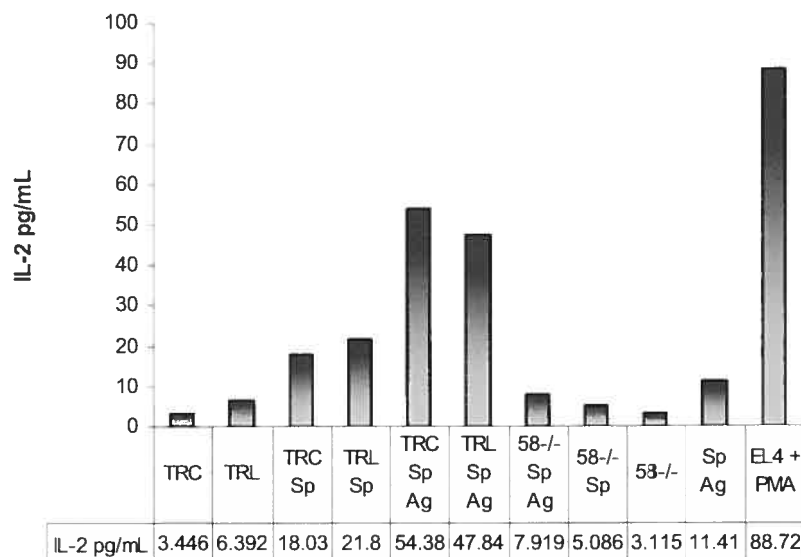


Figure 16 : Production d'IL-2 par les transfectants transitoires de pIREspuro2-V α 8.5NP18. Le clone T 58 α -V β 12 NP18 a été transfecté avec l'agent de transfection DOTAP et en présence de 2 μ g de pIREspuro2-V α 8.5NP18 circulaire (TRC) ou linéarisé (TRL) avec NruI. Les clones ont été incubés (200×10^3 /puits) en présence de splénocytes (200×10^3 /puits) irradiés à 3000 rad, chargés ou non avec 10 μ M du peptide viral NP₃₉₆₋₄₀₄. Après 72h, le surnageant a été collecté. Le test d'EILSA a été effectué en duplicata (200 μ L de surnageant/puits). Contrôle négatif : cellules T 58-/- seules, cellules T 58-/- avec splénocytes (Sp) et peptide NP₃₉₆₋₄₀₄ (Ag), cellules T 58-/- avec Sp sans Ag, Sp avec ou sans Ag, et cellules TRC ou TRL avec ou sans Sp. Contrôle positif : cellules EL-4.IL-2 stimulées au PMA (10 ng/mL).

Fonctionnalité du TCR NP18 exprimé par les cellules T 58-/- transfectées transitoirement avec les cassettes d'expression pT α -V α 8.5NP18 et pT β -V β 12NP18

Suite à la confirmation de la spécificité du TCR généré par la co-expression de pIREspuro2-V α 8.5NP18 et de pT β -V β 12NP18 dans les cellules T 58-/-, nous avons à nouveau testé sa fonctionnalité, en utilisant les deux cassettes d'expression, pT α -V α 8.5NP18 et pT β -V β 12.NP18. Étant donné la faible expression de la chaîne TCR α à partir de la construction pT α -V α 8.5NP18 et l'instabilité de son intégration dans le

génomique des cellules transfectées, il nous a semblé plus approprié de travailler avec des transfections transitoires pour nous permettre d'obtenir une expression détectable de la chaîne TCR α qui est codée par toutes les copies du plasmide dans les cellules transfectées. Tel que décrit précédemment, des cellules T 58 α -V β 12 $^{+}$ ont été transitoirement retransfectées par électroporation avec 10 ou 20 μ g de la construction pT α -V α 8.5NP18 (cellules transfectées transitoirement avec la forme circulaire, TRTC ou linéarisée, TRT) et 48h plus tard les transfectants ont été stimulés avec des splénocytes irradiés (3000 rad) et chargés avec le peptide NP₃₉₆₋₄₀₄ (200x10³ transfectants pour 200x10³ splénocytes par puits). Suite à une stimulation de 72h, l'ARN des cellules a été extrait pour vérifier l'expression de la chaîne alpha par RT-PCR. Cette stimulation avait comme objectif de favoriser l'expansion des transfectants exprimant un TCR NP18 fonctionnel afin d'augmenter nos chances de détection. L'ADNc de la chaîne alpha a tout d'abord été amplifié avec la combinaison d'amorces V α 8.5NP18LINEW - C α ext, puis 1/50 des produits de cette PCR a été réamplifié avec les amorces internes V α 8ext-C α ext pour augmenter l'intensité et assurer la spécificité des bandes obtenues. Nos résultats dans la Figure 17 montrent que contrairement aux cellules EL-4 (qui expriment un TCR V α 10 et qui ont servi de contrôle négatif), nous observons une bande (TCR V α 8) de 706 pb au niveau de toutes les combinaisons de cellules transfectées et incubées avec les cellules spléniques et le peptide NP₃₉₆₋₄₀₄ (TRT10Ag, TRT20Ag et TRTCAg), ou uniquement avec les cellules spléniques sans peptide (TRT10Sp). Puisque toutes ces combinaisons contenaient des cellules spléniques, par précaution et pour nous assurer que ce ne sont pas ces cellules qui permettent l'amplification et la détection d'une bande spécifique, nous avons utilisé des cellules T 58 α -V β 12 β $^{+}$ incubées en présence de splénocytes et du peptide (58SpAg) comme contrôle négatif. Ce contrôle nous a donc permis de confirmer que ce seulement les cellules transfectées expriment le TCR V α 8. Cette détection était positive autant pour les cellules ayant été transfectées avec la forme linéaire avec 10 ou 20 μ g de plasmide (TRT10Ag et TRT20Ag) qu'avec la forme circulaire de la construction pT α -V α 8.5NP18 (TRTCAg). Toutefois, nous ne pouvons pas, ici, spéculer sur le niveau d'expression en nous basant sur l'intensité des bandes puisque l'ADN utilisé pour effectuer les réactions de PCR n'a pas été préalablement quantifié.

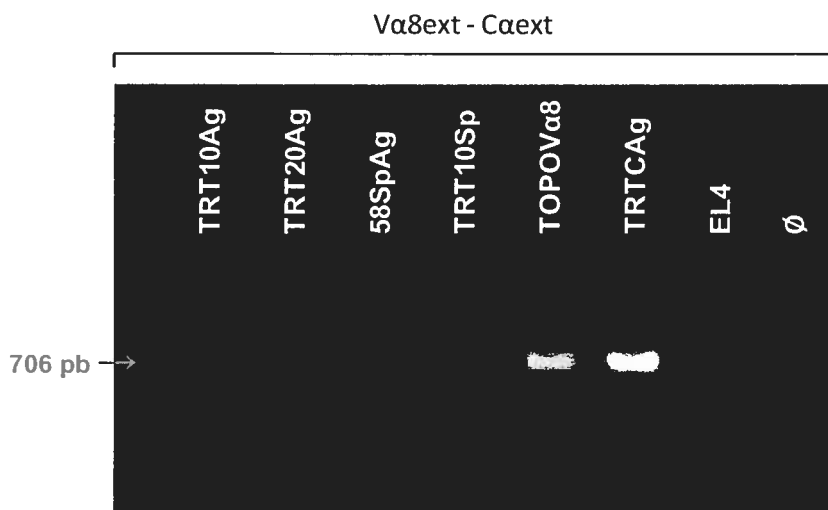


Figure 17 : Expression des transgènes lors des transfections transitoires. Le clone T 58 α -/V β 12 β + a été transfecté transitoirement par électroporation avec 10 μ g ou 20 μ g d'ADN de la cassette pTa-V α 8.5NP18 linéarisée, générant les clones cellulaires dénotés TRT10 ou TRT20 respectivement ou circulaire, générant le clone TRTC. Afin de favoriser l'expansion des clones exprimant le transgène transfecté, 48h après l'électroporation, les transfectants ont été stimulés avec des splénocytes irradiés (3000 rad) et chargés avec le peptide (Ag) NP₃₉₆₋₄₀₄ (200x10³ transfectants pour 200x10³ splénocytes par puits). 72h plus tard, l'ADNc des clones positifs a été généré à partir de leurs ARN respectifs. L'ADNc codant pour la chaîne TCRA a tout d'abord été amplifié avec la combinaison d'amorces V α 8.5NP18LINEW - Ca ext, puis 1/50 des produits de cette PCR a été réamplifié avec des amorces internes, V α 8ext-Caext, pour augmenter l'intensité et assurer la spécificité des bandes obtenues. Contrôles négatifs : ADNc de cellules EL-4 ou ADNc de cellules T 58 α -/V β 12 β + incubées avec des cellules spléniques et le peptide (58SpAg); contrôle positif : ADN de plasmides TOPO avec l'insert V α 8 (TOPOV α 8).

L'expression du TCR NP18 par les cellules transfectées transitoirement que nous venons de discuter a été testée par immunocytochimie au moyen d'un marquage avec un premier anticorps anti-V β , suivi d'un deuxième anticorps anti-IgG-HRP de lapin, ou bien avec un anticorps anti-V α 8 biotinylé incubé avec de la streptavidine-peroxydase. L'analyse microscopique des lames indique que la coloration notée au pourtour de ces cellules transfectées suggère une expression de surface du TCR NP18, comparativement au bruit de fond observé sur les cellules T 58-/- non-transfectées ou celles transfectées uniquement avec la chaîne bêta du TCR (cellules T 58 α -/V β 12+). De plus, cette

expression a été prouvée par immunocytochimie suite à la détection du CD3 avec un anticorps spécifique (non-montré), sachant que l'expression de la molécule CD3 à la surface des cellules T n'est possible que lorsqu'un tous les constituants du TCR sont présents. De même, il aurait été intéressant de confirmer l'expression du TCR par cytométrie en flux. Cependant, le faible nombre de cellules transfectées transitoirement aurait diminué la sensibilité du test et l'interprétation des résultats. À cet effet, nous avons effectué un test de prolifération pour vérifier la fonctionnalité du TCR exprimé par les cellules transfectées transitoirement. Celles-ci ont été stimulées pour produire de l'IL-2, tel que décrit précédemment. Le surnageant de ces cellules a ensuite été collecté et la détection des niveaux d'IL-2 a été accomplie par un test d'ELISA. L'expression d'un TCR transfecté étant faible [187], le surnageant des cellules a été concentré par un facteur de cinq à l'aide des colonnes Centricons ayant un seuil de rétention de 10 kDa, l'IL-2 murin étant de 17 kDa. Le test d'ELISA (Figure 18) a révélé à la fois que l'expression du TCR dans les cellules transfectées est positive, mais encore plus primordial, que ce dernier est fonctionnel et qu'il est spécifique au peptide NP₃₉₆₋₄₀₄, tel que suggéré par la détection de 10.8 à 11.3 pg/mL d'IL-2, comparativement aux contrôles négatifs (cellules T 58-/- plus cellules spléniques avec ou sans peptide où les 3.7 pg/mL d'IL-2 détectés sont probablement dus au bruit de fond causé par une activation non-spécifique des cellules spléniques. Le surnageant des cellules EL-4.IL-2 stimulées pour produire de l'IL-2 avec du PMA à 10 ng/mL a servi de contrôle positif de la technique. Un test alternatif et plus sensible pour mesurer les niveaux d'IL-2 produits par les transfectants après stimulation consiste à ajouter leur surnageant à des cellules de la lignée cellulaire CTLL-2. En effet cette lignée ne prolifère qu'en présence d'IL-2, ainsi la mesure du niveau de prolifération (par un test d'incorporation de 3[H]-thymidine) des cellules CTLL-2 incubées avec le surnageant des transfectant stimulées, nous donne une lecture indirecte du niveau de production d'IL-2 par ces dernières et nous renseigne donc sur l'expression du TCR transfecté.

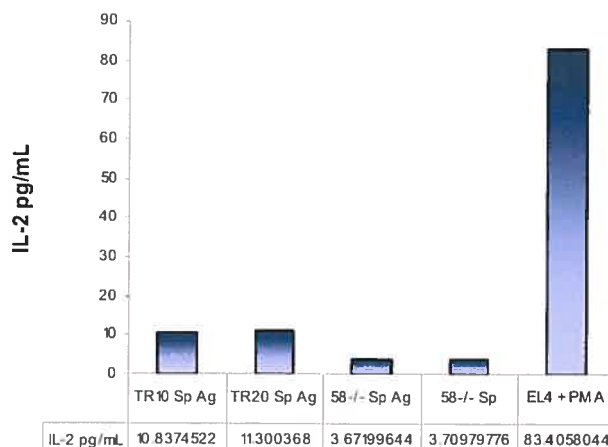
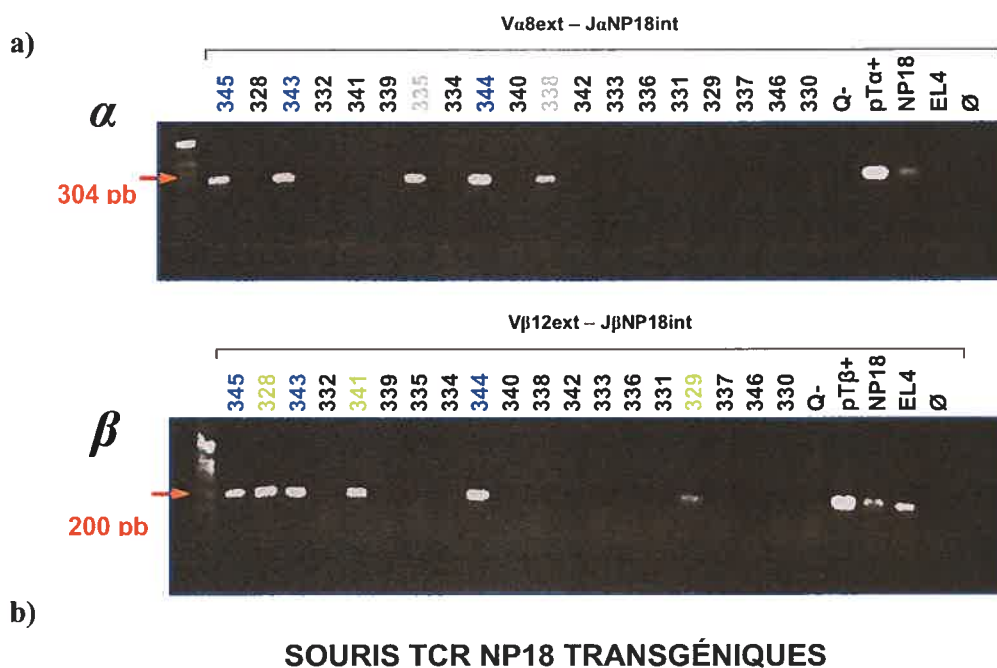


Figure 18 : Test de production d'IL-2. Le clone *T 58 α -V β 12NP18* a été transfecté transitoirement (72h) par électroporation avec 10 μ g (TR10) ou 20 μ g (TR20) d'ADN circulaire de la cassette *pT α -V α 8.5NP18*, incubées (200×10^3 /puits) en présence de splénocytes (200×10^3 /puits) irradiés à 3000 rad, chargés ou non avec 10 μ M du peptide viral NP₃₉₆₋₄₀₄. Après 72h, le surnageant a été collecté et concentré 5 fois avec les colonnes Microcon YM-10. Le test d'EILSA a été effectué en duplicata (200 μ L de surnageant/puits). Contrôle négatifs : cellules *T 58-/-* + Splénocytes (Sp) + peptide NP₃₉₆₋₄₀₄ (Ag), cellules *T 58-/-* + Sp. Contrôle positif : cellules EL-4 stimulées au PMA (10 ng/mL).

Génération de souris C57BL/6 exprimant le TCR NP18 Tg à partir des constructions de transgènes

Enfin, l'expression et la fonctionnalité des transgènes dans leurs cassettes respectives ayant été confirmées, chacune des constructions fut préparée pour la microinjection et la génération de la souris Tg TCR NP18. L'ADN nécessaire à la microinjection a été préparé et linéarisé par la soustraction de la portion procaryotique (voir Figure 10b) en excisant la bande d'intérêt sur un gel d'agarose à basse température de fusion, suite à une digestion avec l'endonucléase SalI pour la construction *pT α -V α 8.5NP18* et KpnI pour la construction *pT β -V β 12NP18*. Les bandes excisées ont été purifiées sur des colonnes selon les exigences du service de souris transgéniques. Six semaines suivant la microinjection, 19 souriceaux sur un fond génétique C57BL/6 ont été obtenus et génotypés par PCR sur l'ADN extrait des bouts de leurs queues (Figure

19a). Cette analyse a permis de détecter huit souris transgéniques. Cinq ont intégré le transgène de la chaîne TCR α NP18 au niveau de leurs génomes, six ont intégré le transgène de la chaîne TCR β NP18, et trois ont intégré les deux transgènes α et β (Figure 19b).



| Numéro | Sexe | Chaîne TCR α | Chaîne TCR β | TCR $\alpha\beta$ |
|--------|---------|---------------------|--------------------|-------------------|
| 328 | mâle | non | oui | NON |
| 329 | mâle | non | oui | NON |
| 335 | mâle | oui | non | NON |
| 338 | mâle | oui | non | NON |
| 341 | Femelle | non | oui | NON |
| 343 | Femelle | oui | oui | OUI |
| 344 | mâle | oui | oui | OUI |
| 345 | mâle | oui | oui | OUI |

Figure 19 : Génotypage des souriceaux TCR NP18 transgéniques. a) PCR effectuée sur l'ADN des queues des 19 souris de 3 semaines (suite à la microinjection chez une femelle gestante C57BL/6) avec les amorces spécifiques à chacune des chaînes du TCR NP18 α et β , tel qu'indiqué. Contrôles négatifs : Queue de souris Tg C57BL/6 sauvage (Q-) et EL-4 pour le TCR α NP18. Contrôles positifs : ADN de cellules NP18, ADN plasmidique des constructions microinjectées (pTa et pT β) et ADN des cellules EL-4 pour le TCR β NP18 b) Tableau récapitulatif des numéros de souris exprimant au moins une des chaînes du TCR $\alpha\beta$ NP18 Tg et d sexe de chacune d'entre elles.

DISCUSSION

Retour sur les fondements du projet

L'immunité dans le foie diffère de celle rencontrée dans les autres organes en termes de composition, d'état d'activation et de réponse aux antigènes. Ces différences sont des éléments dont la compréhension est cruciale pour saisir comment cet organe maintient un équilibre entre la tolérance et la réactivité immunitaire. Malheureusement, la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans l'HAI est encore déficiente, principalement du au fait qu'il n'existe toujours pas un modèle murin d'expérimentation fiable développant une HAI spontanée et chronique. L'utilisation des modèles de souris TCR transgéniques a été d'une importance capitale dans l'étude de la pathogenèse des maladies auto-immunes, notamment le rôle des cellules Treg, le rôle des microbes et du contexte environnemental dans la modification de la réponse immunitaire, l'influence du fond génétique et l'importance de la concentration et l'expression des auto-antigènes dans différents tissus cibles et dans les organes lymphoïdes [92, 107, 120]. L'HAI est une MAI d'étiologie inconnue, affectant principalement les femmes et caractérisée par une inflammation progressive du foie. Différents profils de cytokines (Type 1 et 2) ont été caractérisés chez les patients atteints d'HAI. Les cytokines de type 1 prédominent durant la phase active de l'inflammation, alors que le type 2 est retrouvé durant la rémission. L'HAI est donc caractérisée par une réponse Th1. Des modèles de souris exprimant l'IFN- γ dans le foie ou déficientes en TGF- β 1 ont été rapportés et développent une lésion hépatique, montrant ainsi l'importance des cytokines régulatrices dans la pathogenèse [157, 188].

Une présence massive de lymphocytes dans le foie est communément considérée comme un signe majeur associé à la pathogenèse de l'HAI, suggérant que

ces lymphocytes jouent un rôle primordial dans le dommage hépatique et la nécrose. Effectivement, l'observation histologique prédominante dans les tissus atteints d'HAI est la présence de cellules mononuclées activées infiltrant le foie dont une majorité sont des cellules T CD4⁺ et, en moindre nombre, des cellules T CD8⁺ cytotoxiques. Les cellules T CD8⁺ constituent la population majeure dans la zone de l'hépatite d'interface, alors que les cellules T CD4⁺ prédominent dans la région centrale de la veine porte [67, 68, 189, 190].

Cependant, les mécanismes déclencheurs de la destruction du tissu hépatique sont toutefois inconnus. La prédisposition de certains génotypes de HLA à l'HAI ainsi que l'expansion d'un répertoire clonal limité de TCR, suggèrent que la présentation d'un antigène du soi ou d'une imitation moléculaire serait responsable de l'initiation de la réponse immunitaire. En effet, l'analyse de répertoire du TCR a montré à plusieurs reprises une tendance d'utilisation de certaines chaînes V β , entre autres la surreprésentation de la chaîne V β 3. Il est aussi intéressant de noter que presque toutes les cellules T de clonotypes identiques isolées de patients atteints d'HAI sont du phénotype CD8, alors que chez les patients avec une hépatite chronique, autant les clonotypes CD4 que CD8 ont été observés [190-192]. Ces données suggèrent qu'une expansion de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ amorcée par certains antigènes a lieu dans le foie des patients atteints d'HAI, et que cette réponse est dirigée contre un nombre limité d'épitopes immunodominants. Ainsi, l'échec de détection de motifs CDR3 communs serait attribuable au phénomène d'étalement d'épitopes [193].

Des clones de cellules T spécifiques aux LKM-1 (CYP2D6) ont été isolés du foie des patients avec HAI de type 2. Ces clones possèdent une réponse proliférative spécifique, restreinte par un CMH de classe II, au CYP2D6 recombinant et surexpriment certaines familles de la chaîne V β du TCR. Une accumulation de ces molécules de TCR dans le foie atteint d'HAI a également été démontrée [190, 194]. De plus, une immunosuppression réduit la réponse proliférative des cellules T CD4⁺ périphériques spécifiques à l'épitope CYP2D6₂₆₆₋₂₈₅ [195].

Justification du choix des outils qui ont servi à élaborer notre modèle

Basé sur ces études chez l'homme et chez les souris transgéniques, l'objectif décrit par ce mémoire consistait à générer un modèle murin double transgénique possédant à la fois des cellules T CD8⁺ pourvues d'un TCR Tg spécifique à la NP₃₉₆₋₄₀₄ du virus LCMV et co-exprimant cette NP-LCMV comme néo-antigène dans le foie sous le contrôle du promoteur TTR spécifique à cet organe, le but étant que les cellules T CD8⁺ TCR NP18 Tg s'attaquent spécifiquement aux tissus hépatiques, initiant ainsi une HAI spontanée et chronique. L'originalité de ce modèle, comparé aux tentatives précédentes décrites dans l'introduction, vient du fait que l'expression du peptide cible est confinée exclusivement au foie, étant sous le contrôle du promoteur-amplificateur minimale TTR [179, 180]. Ceci a comme avantage de prévenir la suppression des clones T CD8⁺ NP18 Tg au niveau du thymus durant le processus de sélection négative. De plus, il est connu que l'infection au LCMV produit une hépatite aiguë élaborée par les cellules T CD8⁺, démontrant qu'il s'agit d'un virus hépatotropique [196]. Cette étude est une tentative d'amélioration d'un modèle d'HAI chez des souris H-2^b transgéniques exprimant la nucléoprotéine (NP) du LCMV sous le promoteur de la transthyréine comme un néo-antigène du soi dans le foie [178]. Ces souris Tg (TTR-NP) développent une HAI 4 à 5 mois après immunisation par des plasmides codant pour cette NP à l'âge de 6 à 8 semaines. Cette étude était basée sur l'hypothèse que des agents infectieux ont le potentiel d'initier une alloréactivité par le mimétisme moléculaire. Les CTL, activés dans les organes lymphoïdes périphériques par la vaccination d'ADN, avaient migré aux régions périportales et lobulaires du foie. Leur présence était associée avec un niveau significatif de cytolysse, tel qu'indiqué par une élévation des transaminases. Puisque des cellules T spécifiques ont proliféré en périphérie et causé une cytolysse des cellules cibles, cette étude suggérait alors que l'HAI pourrait être déclenchée par le mécanisme de mimétisme moléculaire et qu'une lésion locale ne serait pas requise pour initier l'autoréactivité dans le foie. Ces cellules T spécifiques auraient probablement été activées en périphérie dans les ganglions lymphatiques avant de migrer au foie où le néo-antigène cible NP est présenté, dans un contexte H-2D^b, sur la surface des hépatocytes. Pour toutes ces raisons, nous étions convaincus que notre stratégie de

développer un nouveau modèle double transgénique de HAI, basée sur la réponse T, nous permettrait de s'approcher de la pathologie humaine sans altérer les facteurs génétiques et environnementaux.

Étant donné que la réponse des cellules T CD8⁺ restreinte par H-2D^b et dirigée contre l'épitope immunodominant NP₃₉₆₋₄₀₄ [197-199] a été bien documentée et élucidée dans de nombreux travaux, nous avons donc profité de ces connaissances pour élaborer notre modèle. Les souris infectées par le LCMV subissent une activation et une expansion massive des cellules T CD8⁺ qui persistent tout le long de leur vie, même en absence du virus ou d'un antigène viral [200-202]. La souris H-2b transgénique exprimant la NP du LCMV dans le pancréas, sous le contrôle du promoteur RIP, où le peptide LCMV- NP₃₉₆₋₄₀₄ peut être la cible des CTL autoréactifs, est un des modèles d'auto-immunité [203, 204]. Après transfert adoptif de CTL anti-LCMV, ces souris RIP-LCMV-NP développent un diabète de type 1 (IDDM) où les lymphocytes T CD8⁺ sont les principaux médiateurs de la destruction des cellules β du pancréas [204-206]. De plus, le fait que l'IDDM ne se développait pas chez les souris Tg déficientes en CMH de classe I ou déplétées de cellules T CD8⁺ confirme l'implication de ces dernières. Le clone de cellules T CD8⁺ générant la réponse CTL la plus forte contre l'épitope immunodominant NP₃₉₆₋₄₀₄ a été identifié par l'équipe d'Oldstone et al. et dénoté NP18 [181, 186]. Ces résultats ont également été vérifiés dans notre laboratoire.

Génotypage des chaînes du TCR : Lesquelles sont les bonnes ?

Nous avons donc sélectionné le TCR du clone NP18 afin de produire la souris TCR Tg décrite dans le présent mémoire. La batterie d'amorces utilisée et dirigée contre toutes les familles de TCR connus nous a permis de détecter une chaîne V α 8 et une autre V β 12. Il est intéressant de noter qu'aucune autre chaîne alpha n'a été détectée pour ce clone. Il est important de vérifier cette éventualité, car certaines cellules T, du fait que l'exclusion allélique au niveau du locus du TCR alpha est incomplète, expriment une deuxième chaîne alpha de TCR, les deux pouvant s'associer à la seule chaîne bêta exprimée, leur conférant ainsi une double spécificité aux antigènes [207]. En utilisant

une souris dont le TCR Tg A18 est spécifique à la protéine C5 du complément, certaines équipes de recherche ont, en effet, montré que ce principe jouerait un rôle dans l'induction de l'auto-immunité [207-209]. Les cellules T exprimant le TCR Tg A18 se développaient chez les souris déficientes en C5 mais pas chez les souris C5+, où celles-ci sont éliminées par sélection négative au point de transition de cellules doubles positives à CD4 positives. Cependant, la délétion de ces cellules T Tg chez les souris C5+ n'était pas absolue. Les cellules T périphériques de ces souris pouvaient être activées par stimulation *in vitro* avec la protéine C5, mais elles étaient fonctionnellement tolérantes *in vivo*. En revanche, de telles cellules T sont absentes chez les souris Tg TCR A18 C5+ possédant une déficience en Rag1. Ceci indiquerait qu'un réarrangement endogène de la chaîne alpha chez les souris Rag1+/C5+ transgéniques pourrait être impliqué dans la génération d'un répertoire potentiellement autoréactif de cellules T périphériques. Ainsi, ces résultats suggèrent que le réarrangement endogène du locus du TCR alpha génère des cellules T exprimant un deuxième TCR, en plus du TCR transgénique, ce qui permettrait aux cellules T TCR Tg autoréactives munies d'une double spécificité de se retrouver en périphérie, en échappant à la délétion lors de la sélection négative. Cette hypothèse a de plus été confirmée en croisant deux lignées de souris TCR Tg sur un fond Rag1^{-/-} afin d'examiner le destin des cellules T avec un double TCR, le résultat étant que toutes les cellules T exprimaient constitutivement deux TCR [209]. De plus, la même équipe a démontré que les clones T ayant un faible niveau de TCR autoréactifs peuvent échapper à la sélection négative dans le thymus, du moment qu'ils expriment un deuxième TCR non spécifique au soi. Les TCR autoréactifs de ces clones peuvent cependant exercer leurs fonctions effectrices même si l'activation initiale de la cellule T était élaborée par le deuxième récepteur. Les auteurs concluent donc que la présence de quelques clones avec un double TCR pourrait contribuer significativement à l'initiation de l'auto-immunité. Une autre conséquence de taille découlant de cette trouvaille concerne le développement des souris TCR transgéniques. L'expression d'une chaîne alpha endogène et d'une autre transgénique par le même clone pourrait mener à de fausses conclusions à savoir laquelle des deux chaînes est impliquée dans la spécificité à un certain antigène. Aussi, dans la situation où le TCR Tg ne reçoit pas de signal positif de sélection, les cellules T peuvent quand même être

sélectionnées par le récepteur non-transgénique. Les cellules T ayant ce double TCR se retrouveraient alors en périphérie, menant à la fausse conclusion que la sélection positive a eu lieu via le récepteur Tg [208].

En conséquence, nous avons pris la précaution de répéter plusieurs fois des RT-PCR sur le clone T NP18, en utilisant différentes procédures de détection de l'ARN, de manière à écarter la possibilité de la présence éventuelle d'une deuxième chaîne alpha du TCR exprimée par le clone NP18. Ainsi, nous nous sommes assuré qu'une seule chaîne alpha est exprimée par ce clone.

Dans notre étude, les séquences nucléiques de chacune des chaînes du TCR NP18 ont été caractérisées dans le but de s'assurer de leur intégrité et afin d'élaborer une stratégie de clonage. Le site web d'IMGT nous a permis de détailler l'identification des chaînes alpha et bêta région par région. Ainsi, parmi les séquences publiées, nos séquences correspondaient à une chaîne $V\alpha 8.5-J\alpha 5.1$ et $V\beta 12-D\beta 2-J\beta 2.3$. Nous avons toutefois remarqué qu'il y avait une discordance entre les séquences publiées et celles obtenues par séquençage du TCR NP18 (non-montré). Ceci serait probablement associé à la spécificité du TCR, sachant que les différences se situaient majoritairement au niveau des jonctions entre $V\alpha$ et $J\alpha$, $V\beta$ et $D\beta$ ainsi que $D\beta$ et $J\beta$. En effet, c'est à cet endroit que se situe la région HV3 du TCR. Pour s'assurer que la différence des séquences nucléiques était propre au TCR NP18 et non pas attribuée à des erreurs introduites par la Taq polymérase, nous avons séquencé de manière bidirectionnelle plusieurs pPCR du TCR NP18, puis les séquences ont été comparées entre elles. La traduction de ces séquences en acides aminés a enfin permis de confirmer que celles-ci codent pour une chaîne alpha et une chaîne bêta complète et intacte.

Les principales difficultés du projet

L'obstacle majeur que nous avons rencontré concerne l'expression de la chaîne alpha par les cellules T 58-/- transfectées. Alors que la chaîne bêta s'est intégrée et a été détectée sans problèmes dès la première tentative de transfection stable avec la cassette

pTB-V β 12.NP18 (qui ne contient pas de résistance à un antibiotique), la chaîne alpha a été détectée en transfection stable par cytométrie en flux uniquement au début de la sélection, car on arrivait plus à la détecter sur ces cellules après plusieurs semaines de culture. Ceci a été expliqué par la perte de l'ADN plasmidique intégré au début de la sélection qui a été vérifiée par PCR. De même, lorsque les cellules ont été transfectées avec le plasmide pIREspuro2-V α 8.5NP18 suivi d'une sélection à la puromycine, nous avons observé le même problème concernant l'instabilité de l'intégration de l'ADN des séquences codant cette chaîne alpha (non-montré). Ces cellules devenaient toutefois résistantes à la puromycine, confirmant qu'il ne s'agit pas d'un problème intrinsèque à la procédure de transfection. Cette observation est d'autant plus appuyée par le fait que la transfection par électoporation et celle par l'agent de transfection DOTAP donnent des résultats similaires. Étonnamment, nous avons cependant remarqué qu'une transfection transitoire avec pIREspuro2-V α 8.5NP18 permet de détecter l'expression de la chaîne alpha. Ceci nous a poussé à tenter une transfection transitoire avec la cassette pT α -V α 8.5NP18, qui s'est avérée positive. Il est plausible que la différence entre la facilité d'expression de chaîne bêta comparée à la chaîne alpha soit attribuée au fait connu que la chaîne alpha est habituellement instable et susceptible à la dégradation dans le réticulum endoplasmique, ce qui limite grandement son niveau d'expression dans les cellules eucaryotiques transfectées [187]. Cette instabilité serait en partie attribuée à un pli moins compact au niveau du domaine C α . Ceci expliquerait aussi les très faibles niveaux d'IL-2 détectés lors du test de fonctionnalité du TCR. En sachant que l'expression par le promoteur de la cassette est moins efficace que le promoteur humain du cytomégalovirus (CMV) présent dans le vecteur pIREspuro2, nous avons alors décidé de concentrer, à l'aide de colonnes Microcons YM-10, de cinq fois le surnageant des cellules soumises stimulées pour la production d'IL-2. Cette simple procédure que nous avons mise au point semble être un moyen efficace pour tester la fonctionnalité des TCR avant de passer à la production de la souris TCR Tg.

En perspective...

La prochaine étape du projet consiste à croiser notre souris Tg TCR NP18 avec la souris Tg TTR-NP, afin de générer la souris double Tg TCR NP18/TTR-NP. Cette dernière nous permettra ensuite d'étudier les facteurs impliqués dans la lyse des hépatocytes induite par les cellules T CD8+, ainsi que l'ampleur de la réponse immunitaire chez notre modèle double transgénique (TCR/TTR-NP). Tout d'abord, nous effectuerons des analyses pour la caractérisation des populations lymphocytaires au niveau du thymus, du sang périphérique, des ganglions lymphatiques ainsi que dans la rate. Il sera également pertinent d'évaluer le taux de cellules T NP18 présent dans ces organes. Il faudra aussi isoler les lymphocytes intrahépatiques et évaluer leur potentiel cytotoxique vis-à-vis des hépatocytes ainsi que du peptide cible NP₃₉₆₋₄₀₄, ce qui permettra d'évaluer leur état d'activation. Les cytokines impliquées dans l'inflammation hépatique et leur niveau d'expression dans le foie seront aussi déterminées. L'analyse histologique des coupes du foie en concordance avec le dosage des transaminases sera essentielle au suivi de la progression de l'inflammation hépatique.

Bien que basé sur les modèles précédents, nous sommes persuadés que notre modèle sera concluant. Il est toutefois prudent de s'attarder sur quelques obstacles qui pourraient survenir en cours de route. Il est en effet possible que la présence des CTL Tg NP18, ainsi que de leur cible, ne soient pas suffisants pour déclencher l'auto-immunité, particulièrement dans le foie. En effet, une étude de Bertolino et al. [152] a montré qu'en plus de son rôle connu de tombeau non-spécifique des lymphocytes, le foie est aussi impliqué dans l'activation antigène-spécifique des cellules T CD8+ recirculantes, sans qu'il n'y ait de signal de danger d'inflammation préalable. Toutefois, celles-ci meurent par négligence et par manque de costimulation. Ce mécanisme contribuerait donc à la capacité tolérogène du foie et à l'acceptation des allogreffes hépatiques, mais aussi à la chronicité des hépatites virales. Dans le cas d'un tel scénario, il sera intéressant de vacciner les souris doubles transgéniques avec l'ADN codant pour la NP ou de les injecter avec des stimulateurs des TLR, permettant ainsi de provoquer une inflammation qui initierait le processus auto-immun. Une telle étude serait aussi

avantageuse dans la perspective de mettre en lumière les mécanismes responsables de la tolérance et les facteurs extrinsèques pouvant mener à l'auto-immunité.

Le modèle que nous mettons au point constitue un outil qui servira éventuellement à plusieurs autres applications et études. Un de projets intéressants consistera à établir cette souris double transgénique sur un fond génétique RAG^{-/-} ou C α ^{-/-}. Ceci aurait pour conséquence d'empêcher les thymocytes à réarranger et exprimer un TCR endogène, ce qui veut dire que les cellules T périphériques seront majoritairement TCR Tg. On s'attendrait alors à ce que ces souris développent une HAI plus sévère et avec plus de pénétrance. Notre imagination étant la seule limite quant aux projets possibles avec de tels modèles, nous espérons tous que la compréhension qu'ils apporteront contribuera à la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques aux différentes MAI et aux maladies virales et qu'ils profiteront ultimement au bien-être des patients.

RÉFÉRENCES

- [1] Janeway C. Immunobiology : the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science 2005.
- [2] Benjamini E, Coico R, Sunshine G. Immunology : a short course. 4th ed. New York, NY ; Toronto: John Wiley & Sons 2000.
- [3] Morel PA, Livingstone AM, Fathman CG. Correlation of T cell receptor V beta gene family with MHC restriction. *The Journal of experimental medicine*. 1987 Aug 1;166(2):583-8.
- [4] Tan KN, Datlof BM, Gilmore JA, Kronman AC, Lee JH, Maxam AM, et al. The T cell receptor V alpha 3 gene segment is associated with reactivity to p-azobenzene arsonate. *Cell*. 1988 Jul 15;54(2):247-61.
- [5] Saito T, Germain RN. Predictable acquisition of a new MHC recognition specificity following expression of a transfected T-cell receptor beta-chain gene. *Nature*. 1987 Sep 17-23;329(6136):256-9.
- [6] Sorger SB, Hedrick SM, Fink PJ, Bookman MA, Matis LA. Generation of diversity in T cell receptor repertoire specific for pigeon cytochrome c. *The Journal of experimental medicine*. 1987 Feb 1;165(2):279-301.
- [7] Matis LA. The molecular basis of T-cell specificity. *Annual review of immunology*. 1990;8:65-82.
- [8] Malissen B, Malissen M. Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Current opinion in immunology*. 1996 Jun;8(3):383-93.
- [9] Wange RL, Samelson LE. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity*. 1996;5(3):197-205.
- [10] Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature reviews*. 2004 Feb;4(2):123-32.
- [11] Casrouge A, Beaudoin E, Dalle S, Pannetier C, Kanellopoulos J, Kourilsky P. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5782-7.
- [12] Zhu C, Roth DB. Mechanism of V(D)J recombination. *Cancer surveys*. 1996;28:295-309.

- [13] Bogue M, Roth DB. Mechanism of V(D)J recombination. *Current opinion in immunology*. 1996 Apr;8(2):175-80.
- [14] Glusman G, Rowen L, Lee I, Boysen C, Roach JC, Smit AF, et al. Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci. *Immunity*. 2001 Sep;15(3):337-49.
- [15] Khor B, Sleckman BP. Allelic exclusion at the TCRbeta locus. *Current opinion in immunology*. 2002 Apr;14(2):230-4.
- [16] Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annual review of biochemistry*. 2002;71:101-32.
- [17] Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature reviews*. 2005 Oct;5(10):772-82.
- [18] Zuniga-Pflucker JC, Lenardo MJ. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Current opinion in immunology*. 1996 Apr;8(2):215-24.
- [19] Laky K, Fleischacker C, Fowlkes BJ. TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development. *Immunological reviews*. 2006 Feb;209:274-83.
- [20] Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance: good but imperfect. *Immunological reviews*. 2006 Feb;209:290-6.
- [21] Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature reviews*. 2002 Jan;2(1):11-9.
- [22] Young DA, Lowe LD, Booth SS, Whitters MJ, Nicholson L, Kuchroo VK, et al. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2000 Apr 1;164(7):3563-72.
- [23] Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krahl T, Patstone G, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2511-20.
- [24] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2000;18:767-811.
- [25] Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.
- [26] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology*. 1994;12:991-1045.

- [27] Greenwald RJ, Boussiotis VA, Lorsch RB, Abbas AK, Sharpe AH. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*. 2001 Feb;14(2):145-55.
- [28] Mackay IR. The "Autoimmune diseases" 40th anniversary. *Autoimmunity reviews*. 2002 Feb;1(1-2):5-11.
- [29] Verhasselt V, Goldman M. From autoimmune responses to autoimmune disease: what is needed? *Journal of autoimmunity*. 2001 May;16(3):327-30.
- [30] Avrameas S, Ternynck T. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Research in immunology*. 1995 May-Jun;146(4-5):235-48.
- [31] Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 1998 Apr 10;280(5361):243-8.
- [32] Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *The New England journal of medicine*. 2001 Aug 2;345(5):340-50.
- [33] Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nature medicine*. 2001 Aug;7(8):899-905.
- [34] Beeson PB. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *The American journal of medicine*. 1994 May;96(5):457-62.
- [35] Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nature immunology*. 2001 Sep;2(9):777-80.
- [36] Shamim EA, Miller FW. Familial autoimmunity and the idiopathic inflammatory myopathies. *Current rheumatology reports*. 2000 Jun;2(3):201-11.
- [37] Ortonne JP. Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *The British journal of dermatology*. 1999 Apr;140 Suppl 54:1-7.
- [38] Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999 Dec;84(12):4371-8.
- [39] Gregersen PK. Genetic analysis of rheumatic diseases. *Textbook of rheumatology*. 1:209-27.
- [40] Djilali-Saiah I, Larger E, Harfouch-Hammoud E, Timsit J, Clerc J, Bertin E, et al. No major role for the CTLA-4 gene in the association of autoimmune thyroid disease with IDDM. *Diabetes*. 1998 Jan;47(1):125-7.
- [41] Boillot D, Assan R, Dardenne M, Debray-Sachs M, Bach JF. T-lymphopenia and T-cell imbalance in diabetic db/db mice. *Diabetes*. 1986 Feb;35(2):198-203.

- [42] Bellgrau D, Lagarde AC. Cytotoxic T-cell precursors with low-level CD8 in the diabetes-prone Biobreeding rat: implications for generation of an autoimmune T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990 Jan;87(1):313-7.
- [43] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2000 Sep 28;343(13):938-52.
- [44] Dahlquist G. The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. *Acta Paediatr Suppl*. 1998 Oct;425:5-10.
- [45] Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer PA, Cantor H. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science (New York, NY)*. 1998 Feb 27;279(5355):1344-7.
- [46] Galvin JE, Hemric ME, Ward K, Cunningham MW. Cytotoxic mAb from rheumatic carditis recognizes heart valves and laminin. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Jul;106(2):217-24.
- [47] Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, et al. Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation*. 1995 Aug 1;92(3):415-20.
- [48] Malkiel S, Liao L, Cunningham MW, Diamond B. T-Cell-dependent antibody response to the dominant epitope of streptococcal polysaccharide, N-acetylglucosamine, is cross-reactive with cardiac myosin. *Infection and immunity*. 2000 Oct;68(10):5803-8.
- [49] Yuki N. Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *Japanese journal of infectious diseases*. 1999 Jun;52(3):99-105.
- [50] Kukreja A, Maclaren NK. Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: immune-mediated (type 1) diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Apr;57(4):534-41.
- [51] Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. 1995 Mar 10;80(5):695-705.
- [52] Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Oct;108(8):1097-104.

- [53] Forrester J, Golbus J, Brede D, Hudson J, Richardson B. B cell activation in patients with active procainamide induced lupus. *The Journal of rheumatology*. 1988 Sep;15(9):1384-8.
- [54] Arndt PA, Leger RM, Garratty G. Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Transfusion*. 1999 Nov-Dec;39(11-12):1239-46.
- [55] Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature medicine*. 1997 Jul;3(7):797-801.
- [56] Walter U, Santamaria P. CD8+ T cells in autoimmunity. *Current opinion in immunology*. 2005 Dec;17(6):624-31.
- [57] Gronski MA, Boulter JM, Moskophidis D, Nguyen LT, Holmberg K, Elford AR, et al. TCR affinity and negative regulation limit autoimmunity. *Nature medicine*. 2004 Nov;10(11):1234-9.
- [58] Han B, Serra P, Yamanouchi J, Amrani A, Elliott JF, Dickie P, et al. Developmental control of CD8 T cell-avidity maturation in autoimmune diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Jul;115(7):1879-87.
- [59] Qin H, Trudeau JD, Reid GS, Lee IF, Dutz JP, Santamaria P, et al. Progression of spontaneous autoimmune diabetes is associated with a switch in the killing mechanism used by autoreactive CTL. *International immunology*. 2004 Nov;16(11):1657-62.
- [60] Santamaria P. Effector lymphocytes in islet cell autoimmunity. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2003 Sep;4(3):271-80.
- [61] Ejrnaes M, Videbaek N, Christen U, Cooke A, Michelsen BK, von Herrath M. Different diabetogenic potential of autoaggressive CD8+ clones associated with IFN-gamma-inducible protein 10 (CXC chemokine ligand 10) production but not cytokine expression, cytolytic activity, or homing characteristics. *J Immunol*. 2005 Mar 1;174(5):2746-55.
- [62] Matejuk A, Dwyer J, Ito A, Bruender Z, Vandenbark AA, Offner H. Effects of cytokine deficiency on chemokine expression in CNS of mice with EAE. *Journal of neuroscience research*. 2002 Mar 1;67(5):680-8.
- [63] Panoutsakopoulou V, Huster KM, McCarty N, Feinberg E, Wang R, Wucherpfennig KW, et al. Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Apr;113(8):1218-24.

- [64] Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5814-22.
- [65] Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, et al. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature.* 1998 Jan 8;391(6663):177-81.
- [66] Ichiki Y, Aoki CA, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmunity reviews.* 2005 Jun;4(5):315-21.
- [67] Eggink HF, Houthoff HJ, Huitema S, Gips CH, Poppema S. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. I. Lymphocyte subsets in liver biopsies of patients with untreated idiopathic autoimmune hepatitis, chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis. *Clinical and experimental immunology.* 1982 Oct;50(1):17-24.
- [68] Hashimoto E, Lindor KD, Homburger HA, Dickson ER, Czaja AJ, Wiesner RH, et al. Immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis. *Mayo Clinic proceedings.* 1993 Nov;68(11):1049-55.
- [69] Reuben A. A sheep in wolf's clothing. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2003 Dec;38(6):1596-601.
- [70] zum Buschenfelde KH. Autoimmune hepatitis: "Hepatitis sui generis". *Journal of hepatology.* 2003 Feb;38(2):130-5.
- [71] Bearn AG, Kunkel HG, Slater RJ. The problem of chronic liver disease in young women. *The American journal of medicine.* 1956 Jul;21(1):3-15.
- [72] Saint EG, King WE, Joske RA, Finckh ES. The course of infectious hepatitis with special reference to prognosis and the chronic stage. *Australasian annals of medicine.* 1953 Nov;2(2):113-27.
- [73] Joske RA, King WE. The L.E.-cell phenomenon in active chronic viral hepatitis. *Lancet.* 1955 Sep 3;269(6888):477-80.
- [74] Cowling DC, Mackay IR, Taft LI. Lupoid hepatitis. *Lancet.* 1956 Dec 29;271(6957):1323-6.
- [75] Mackay IR, Weiden S, Hasker J. Autoimmune hepatitis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1965 Jun 30;124(2):767-80.
- [76] Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 1993 Oct;18(4):998-1005.

- [77] Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*. 1999 Nov;31(5):929-38.
- [78] Holborow EJ, Asherson GL, Johnson GD, Barnes RD, Carmichael DS. Antinuclear factor and other antibodies in blood and liver diseases. *British medical journal*. 1963 Mar 9;5331:656-8.
- [79] Johnson GD, Holborow EJ, Glynn LE. Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. *Lancet*. 1965 Oct 30;2(7418):878-9.
- [80] Whittingham S, Mackay IR, Irwin J. Autoimmune hepatitis. Immunofluorescence reactions with cytoplasm of smooth muscle and renal glomerular cells. *Lancet*. 1966 Jun 18;1(7451):1333-5.
- [81] Mackay IR. The hepatitis-lupus connection. *Seminars in liver disease*. 1991 Aug;11(3):234-40.
- [82] Gurian LE, Rogoff TM, Ware AJ, Jordan RE, Combes B, Gilliam JN. The immunologic diagnosis of chronic active "autoimmune" hepatitis: distinction from systemic lupus erythematosus. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1985 May-Jun;5(3):397-402.
- [83] Gajdusek DC. An autoimmune reaction against human tissue antigens in certain acute and chronic diseases. I. Serological investigations. *AMA*. 1958 Jan;101(1):9-29.
- [84] Mackay IR, Gajdusek DC. An autoimmune reaction against human tissue antigens in certain acute and chronic diseases. II. Clinical correlations. *AMA*. 1958 Jan;101(1):30-46.
- [85] Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S63-74.
- [86] Meyer zum B. [Immunopathogenesis of chronic inflammatory liver diseases]. *Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde*. 1972;32:31-81.
- [87] Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*: Blackwell Science 2002.
- [88] Manns MP, Paumgartner G. *Immunology and Liver: Immunology and Liver*: Kluwer Academic Publishers 2000.
- [89] Diamantis I, Boumpas DT. Autoimmune hepatitis: evolving concepts. *Autoimmunity reviews*. 2004 Mar;3(3):207-14.

- [90] Beland K, Lapierre P, Marceau G, Alvarez F. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of autoimmunity*. 2004 Mar;22(2):159-66.
- [91] Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *Ann Ital Med Int*. 1996 Apr-Jun;11(2):119-24.
- [92] Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* (Baltimore, Md. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S132-44.
- [93] Mackay IR, Morris PJ. Association of autoimmune active chronic hepatitis with HL-A1,8. *Lancet*. 1972 Oct 14;2(7781):793-5.
- [94] Strettell MD, Donaldson PT, Thomson LJ, Santrach PJ, Moore SB, Czaja AJ, et al. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type I autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1997 Jun;112(6):2028-35.
- [95] Doherty DG, Donaldson PT, Underhill JA, Farrant JM, Duthie A, Mieli-Vergani G, et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md. 1994 Mar;19(3):609-15.
- [96] Seki T, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Kondo T, Hino K, et al. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology*. 1992 Sep;103(3):1041-7.
- [97] Vazquez-Garcia MN, Alaez C, Olivo A, Debaz H, Perez-Luque E, Burguete A, et al. MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*. 1998 Jun;28(6):985-90.
- [98] Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Farias AQ, et al. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *The American journal of gastroenterology*. 1999 Jul;94(7):1906-13.
- [99] Fainboim L, Marcos Y, Pando M, Capucchio M, Reyes GB, Galoppo C, et al. Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1*1301) haplotype. *Human immunology*. 1994 Oct;41(2):146-50.
- [100] Djilali-Saiah I, Renous R, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. Linkage disequilibrium between HLA class II region and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *Journal of hepatology*. 2004 Jun;40(6):904-9.
- [101] Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type I autoimmune hepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md. 2000 Jan;31(1):49-53.

- [102] Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Human immunology*. 2001 Dec;62(12):1356-62.
- [103] Suchy FJ. *Liver disease in children: Lippincott Williams & Wilkins* 2001.
- [104] Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1999 Sep;117(3):645-52.
- [105] Djilali-Saiah I, Fakhfakh A, Louafi H, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. HLA class II influences humoral autoimmunity in patients with type 2 autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*. 2006 Dec;45(6):844-50.
- [106] Marceau G, Lapierre P, Beland K, Soudeyns H, Alvarez F. LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry? *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2005 Sep;42(3):675-82.
- [107] Jaeckel E. Animal models of autoimmune hepatitis. *Seminars in liver disease*. 2002 Nov;22(4):325-38.
- [108] Kita H, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology*. 2001 May;120(6):1485-501.
- [109] Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, et al. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol*. 1999 Aug 15;163(4):2314-21.
- [110] Bertolino P, Klimpel G, Lemon SM. Hepatic inflammation and immunity: a summary of a conference on the function of the immune system within the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2000 Jun;31(6):1374-8.
- [111] Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T, et al. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunological reviews*. 2000 Apr;174:35-46.
- [112] Burke S, Landau S, Green R, Tseng CC, Nattakom T, Canchis W, et al. Rat cluster of differentiation 1 molecule: expression on the surface of intestinal epithelial cells and hepatocytes. *Gastroenterology*. 1994 May;106(5):1143-9.
- [113] Mandal M, Chen XR, Alegre ML, Chiu NM, Chen YH, Castano AR, et al. Tissue distribution, regulation and intracellular localization of murine CD1 molecules. *Molecular immunology*. 1998 Jun;35(9):525-36.

- [114] Golden-Mason L, Kelly AM, Traynor O, McEntee G, Kelly J, Hegarty JE, et al. Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development. *Cytokine*. 2001 May 7;14(3):143-51.
- [115] Schlitt HJ, Schafers S, Deiwick A, Eckardt KU, Pietsch T, Ebell W, et al. Extramedullary erythropoiesis in human liver grafts. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1995 Mar;21(3):689-96.
- [116] Mehal WZ, Azzaroli F, Crispe IN. Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic T cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic T cell apoptosis. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):667-73.
- [117] Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunological reviews*. 2000 Apr;174:47-62.
- [118] Tanaka A, Iwabuchi S, Takatori M, Ohno A, Yamada H, Hashimoto N, et al. Clonotypic analysis of T cells in patients with autoimmune and viral hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1997 May;25(5):1070-6.
- [119] Lohr HF, Schlaak JF, Gerken G, Fleischer B, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver*. 1994 Jun;14(3):161-6.
- [120] Peters MG. Animal models of autoimmune liver disease. *Immunology and cell biology*. 2002 Feb;80(1):113-6.
- [121] Vergani D, Mieli-Vergani G. Mechanisms of autoimmune hepatitis. *Pediatric transplantation*. 2004 Dec;8(6):589-93.
- [122] Mabee CL, Thiele DL. Mechanisms of autoimmune liver disease. *Clinics in liver disease*. 2000 May;4(2):431-45, vii.
- [123] Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S54-62.
- [124] Lapierre P, Beland K, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Type 2 autoimmune hepatitis murine model: the influence of genetic background in disease development. *Journal of autoimmunity*. 2006 Mar;26(2):82-9.
- [125] Behar AJ, Tal C. Experimental liver necrosis produced by the injection of homologous whole liver with adjuvant. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1959 Apr;77(2):591-6.
- [126] Warnatz H, Scheiffarth F, Schwarz R. [Animal experiment studies on the pathogenesis of chronic hepatitis. II. Serological studies following sensitization with

homologous liver cell fractions]. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin*. 1965 Aug 13;339(4):364-71.

[127] Scheiffarth F, Warnatz H, Niederer W. [Animal experiment studies on the pathogenesis of chronic hepatitis. I. Morphological liver studies following sensitization with homologous liver cell fractions]. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin*. 1965 Aug 13;339(4):358-63.

[128] Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet*. 2000 Apr 29;355(9214):1510-5.

[129] Costa M, Rodriguez-Sanchez JL, Czaja AJ, Gelpi C. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clinical and experimental immunology*. 2000 Aug;121(2):364-74.

[130] Volkmann M, Martin L, Baurle A, Heid H, Strassburg CP, Trautwein C, et al. Soluble liver antigen: isolation of a 35-kd recombinant protein (SLA-p35) specifically recognizing sera from patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2001 Mar;33(3):591-6.

[131] Lohse AW, Meyer zum Buschenfelde KH. Remission of experimental autoimmune hepatitis is associated with antigen-specific and non-specific immunosuppression. *Clinical and experimental immunology*. 1993 Oct;94(1):163-7.

[132] Kossling FK, Meyer zum B. [On the induction of an active chronic hepatitis by heterologic soluble liver proteins]. *Virchows Archiv A: Pathology*. 1968;345(4):365-76.

[133] Toyabe S, Seki S, Iiai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, et al. Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol*. 1997 Aug 1;159(3):1537-42.

[134] Kohda H, Sekiya C, Kanai M, Yoshida Y, Uede T, Kikuchi K, et al. Flow cytometric and functional analysis of mononuclear cells infiltrating the liver in experimental autoimmune hepatitis. *Clinical and experimental immunology*. 1990 Dec;82(3):473-8.

[135] Mori Y, Mori T, Yoshida H, Ueda S, Iesato K, Wakashin Y, et al. Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice. *Clinical and experimental immunology*. 1984 Jul;57(1):85-92.

[136] Mori Y, Mori T, Ueda S, Yoshida H, Iesato K, Wakashin Y, et al. Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice: transfer of spleen cells sensitized with liver proteins. *Clinical and experimental immunology*. 1985 Sep;61(3):577-84.

- [137] Mori T, Mori Y, Yoshida H, Ueda S, Ogawa M, Iesato K, et al. Cell-mediated cytotoxicity of sensitized spleen cells against target liver cells--in vivo and in vitro study with a mouse model of experimental autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.* 1985 Sep-Oct;5(5):770-7.
- [138] Lohse AW, Manns M, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH, Cohen IR. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology (Baltimore, Md.* 1990 Jan;11(1):24-30.
- [139] Knolle PA, Gerken G, Loser E, Dienes HP, Gantner F, Tiegs G, et al. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.* 1996 Oct;24(4):824-9.
- [140] Nicoletti F, Di Marco R, Zaccone P, Salvaggio A, Magro G, Bendtzen K, et al. Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. *Hepatology (Baltimore, Md.* 2000 Oct;32(4 Pt 1):728-33.
- [141] Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000 May 9;97(10):5498-503.
- [142] Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, et al. Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *The Journal of experimental medicine.* 2000 Jan 3;191(1):105-14.
- [143] Gantner F, Leist M, Jilg S, Germann PG, Freudenberg MA, Tiegs G. Tumor necrosis factor-induced hepatic DNA fragmentation as an early marker of T cell-dependent liver injury in mice. *Gastroenterology.* 1995 Jul;109(1):166-76.
- [144] Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol.* 1994 Aug 15;153(4):1778-88.
- [145] Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology (Baltimore, Md.* 2004 Apr;39(4):1066-74.
- [146] Chisari FV. Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *The American journal of pathology.* 2000 Apr;156(4):1117-32.
- [147] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *Journal of virology.* 1995 Oct;69(10):6158-69.

- [148] Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, Moss B, Pinkert CA, Palmiter RD, et al. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science*. 1990 Apr 20;248(4953):361-4.
- [149] Ando K, Guidotti LG, Wirth S, Ishikawa T, Missale G, Moriyama T, et al. Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol*. 1994 Apr 1;152(7):3245-53.
- [150] Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, et al. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *The Journal of experimental medicine*. 1993 Nov 1;178(5):1541-54.
- [151] Voehringer D, Blaser C, Grawitz AB, Chisari FV, Buerki K, Pircher H. Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol*. 2000 Sep 1;165(5):2415-22.
- [152] Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, Fazekas de St Groth B. Antigen-specific primary activation of CD8⁺ T cells within the liver. *J Immunol*. 2001 May 1;166(9):5430-8.
- [153] Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Rabourdin-Combe C. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8⁺ T lymphocytes but fail to promote survival. *European journal of immunology*. 1998 Jan;28(1):221-36.
- [154] Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Thomas J, Fazekas de St Groth B, Pihlgren M, Marvel J, et al. Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *International immunology*. 1999 Aug;11(8):1225-38.
- [155] Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature medicine*. 2000 Dec;6(12):1348-54.
- [156] Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, et al. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1428-40.
- [157] Gorham JD, Lin JT, Sung JL, Rudner LA, French MA. Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis. *J Immunol*. 2001 May 15;166(10):6413-22.
- [158] Clemente MG, Obermayer-Straub P, Meloni A, Strassburg CP, Arangino V, Tukey RH, et al. Cytochrome P450 1A2 is a hepatic autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type 1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997 May;82(5):1353-61.

- [159] Clemente MG, Meloni A, Obermayer-Straub P, Frau F, Manns MP, De Virgiliis S. Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome type I. *Gastroenterology*. 1998 Feb;114(2):324-8.
- [160] Obermayer-Straub P, Perheentupa J, Braun S, Kayser A, Barut A, Loges S, et al. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Gastroenterology*. 2001 Sep;121(3):668-77.
- [161] Lafaille JJ. T-cell receptor transgenic mice in the study of autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*. 2004 Mar;22(2):95-106.
- [162] Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*. 1993 Feb 26;72(4):551-60.
- [163] Brabb T, Goldrath AW, von Dassow P, Paez A, Liggitt HD, Goverman J. Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J Immunol*. 1997 Jul 1;159(1):497-507.
- [164] Lafaille JJ, Nagashima K, Katsuki M, Tonegawa S. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*. 1994 Aug 12;78(3):399-408.
- [165] Olivares-Villagomez D, Wang Y, Lafaille JJ. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Nov 16;188(10):1883-94.
- [166] Van de Keere F, Tonegawa S. CD4(+) T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Nov 16;188(10):1875-82.
- [167] Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell*. 1993 Sep 24;74(6):1089-100.
- [168] Gonzalez A, Katz JD, Mattei MG, Kikutani H, Benoist C, Mathis D. Genetic control of diabetes progression. *Immunity*. 1997 Dec;7(6):873-83.
- [169] Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, Katz JD. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Jan 7;94(1):213-8.
- [170] Luhder F, Katz J, Benoist C, Mathis D. Major histocompatibility complex class II molecules can protect from diabetes by positively selecting T cells with additional specificities. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Feb 2;187(3):379-87.

- [171] Ji H, Korganow AS, Mangialaio S, Hoglund P, Andre I, Luhder F, et al. Different modes of pathogenesis in T-cell-dependent autoimmunity: clues from two TCR transgenic systems. *Immunological reviews*. 1999 Jun;169:139-46.
- [172] Verdaguer J, Schmidt D, Amrani A, Anderson B, Averill N, Santamaria P. Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice. *The Journal of experimental medicine*. 1997 Nov 17;186(10):1663-76.
- [173] Osman GE, Cheunsuk S, Allen SE, Chi E, Liggitt HD, Hood LE, et al. Expression of a type II collagen-specific TCR transgene accelerates the onset of arthritis in mice. *International immunology*. 1998 Nov;10(11):1613-22.
- [174] McHugh RS, Shevach EM, Margulies DH, Natarajan K. A T cell receptor transgenic model of severe, spontaneous organ-specific autoimmunity. *European journal of immunology*. 2001 Jul;31(7):2094-103.
- [175] Adams TE, Alpert S, Hanahan D. Non-tolerance and autoantibodies to a transgenic self antigen expressed in pancreatic beta cells. *Nature*. 1987 Jan 15-21;325(6101):223-8.
- [176] Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Nov 6;98(23):13306-11.
- [177] Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *The New England journal of medicine*. 1996 Apr 4;334(14):897-903.
- [178] Djilali-Saiah I, Lapierre P, Vittozi S, Alvarez F. DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):4889-96.
- [179] Yan C, Costa RH, Darnell JE, Jr., Chen JD, Van Dyke TA. Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice. *The EMBO journal*. 1990 Mar;9(3):869-78.
- [180] Wu H, Wade M, Krall L, Grisham J, Xiong Y, Van Dyke T. Targeted in vivo expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 halts hepatocyte cell-cycle progression, postnatal liver development and regeneration. *Genes & development*. 1996 Feb 1;10(3):245-60.
- [181] Yanagi Y, Tishon A, Lewicki H, Cubitt BA, Oldstone MB. Diversity of T-cell receptors in virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognizing three distinct viral epitopes restricted by a single major histocompatibility complex molecule. *Journal of virology*. 1992 Apr;66(4):2527-31.

[182] Baker FJ, Lee M, Chien YH, Davis MM. Restricted islet-cell reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Jul 9;99(14):9374-9.

[183] van Hall T, van Bergen J, van Veelen PA, Kraakman M, Heukamp LC, Koning F, et al. Identification of a novel tumor-specific CTL epitope presented by RMA, EL-4, and MBL-2 lymphomas reveals their common origin. *J Immunol*. 2000 Jul 15;165(2):869-77.

[184] Kouskoff V, Signorelli K, Benoist C, Mathis D. Cassette vectors directing expression of T cell receptor genes in transgenic mice. *Journal of immunological methods*. 1995 Mar 27;180(2):273-80.

[185] Letourneur F, Malissen B. Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor alpha and beta chain transcripts reveals a nonfunctional alpha-mRNA of BW5147 origin. *European journal of immunology*. 1989 Dec;19(12):2269-74.

[186] Hudrisier D, Riond J, Bulet-Schiltz O, von Herrath MG, Lewicki H, Monsarrat B, et al. Structural and functional identification of major histocompatibility complex class I-restricted self-peptides as naturally occurring molecular mimics of viral antigens. Possible role in CD8+ T cell-mediated, virus-induced autoimmune disease. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jun 1;276(22):19396-403.

[187] Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, et al. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*. 1996 Oct 11;274(5285):209-19.

[188] Toyonaga T, Hino O, Sugai S, Wakasugi S, Abe K, Shichiri M, et al. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Jan 18;91(2):614-8.

[189] Tordjmann T, Soulie A, Guettier C, Schmidt M, Berthou C, Beaugrand M, et al. Perforin and granzyme B lytic protein expression during chronic viral and autoimmune hepatitis. *Liver*. 1998 Dec;18(6):391-7.

[190] Arenz M, Pingel S, Schirmacher P, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohr HF. T cell receptor Vbeta chain restriction and preferred CDR3 motifs of liver-kidney microsomal antigen (LKM-1)-reactive T cells from autoimmune hepatitis patients. *Liver*. 2001 Feb;21(1):18-25.

[191] Hoshino Y, Enomoto N, Izumi N, Kurosaki M, Marumo F, Sato C. Limited usage of T-cell receptor beta chains and sequences of the complementarity determining region 3 of lymphocytes infiltrating in the liver of autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1995 Jul;22(1):142-7.

- [192] Yoshizawa K, Ota M, Katsuyama Y, Ichijo T, Inada H, Umemura T, et al. T cell repertoire in the liver of patients with autoimmune hepatitis. *Human immunology*. 1999 Sep;60(9):806-15.
- [193] Lohr HF, Pingel S, Weyer S, Fritz T, Galle PR. Individual and common antigen-recognition sites of liver-derived T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Scandinavian journal of immunology*. 2003 Apr;57(4):384-90.
- [194] Lohr H, Manns M, Kyriatsoulis A, Lohse AW, Trautwein C, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Clonal analysis of liver-infiltrating T cells in patients with LKM-1 antibody-positive autoimmune chronic active hepatitis. *Clinical and experimental immunology*. 1991 May;84(2):297-302.
- [195] Lohr HF, Schlaak JF, Lohse AW, Bocher WO, Arenz M, Gerken G, et al. Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticlonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1996 Dec;24(6):1416-21.
- [196] Zinkernagel RM, Haenseler E, Leist T, Cerny A, Hengartner H, Althage A. T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51Cr-release assay? *The Journal of experimental medicine*. 1986 Oct 1;164(4):1075-92.
- [197] Gairin JE, Mazarguil H, Hudrisier D, Oldstone MB. Optimal lymphocytic choriomeningitis virus sequences restricted by H-2Db major histocompatibility complex class I molecules and presented to cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology*. 1995 Apr;69(4):2297-305.
- [198] Schulz M, Aichele P, Vollenweider M, Bobe FW, Cardinaux F, Hengartner H, et al. Major histocompatibility complex--dependent T cell epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein and their protective capacity against viral disease. *European journal of immunology*. 1989 Sep;19(9):1657-67.
- [199] Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive D, Zajac A, Ahmed R. In vivo dynamics of anti-viral CD8 T cell responses to different epitopes. An evaluation of bystander activation in primary and secondary responses to viral infection. *Advances in experimental medicine and biology*. 1998;452:123-42.
- [200] Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science*. 1999 Nov 12;286(5443):1377-81.
- [201] Sourdive DJ, Murali-Krishna K, Altman JD, Zajac AJ, Whitmire JK, Pannetier C, et al. Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell

responses to an acute viral infection. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Jul 6;188(1):71-82.

[202] Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *The Journal of experimental medicine*. 1998 May 4;187(9):1383-93.

[203] Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, et al. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*. 1991 Apr 19;65(2):305-17.

[204] Oldstone MB, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell*. 1991 Apr 19;65(2):319-31.

[205] von Herrath MG, Dockter J, Oldstone MB. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity*. 1994 Jun;1(3):231-42.

[206] Kagi D, Odermatt B, Ohashi PS, Zinkernagel RM, Hengartner H. Development of insulinitis without diabetes in transgenic mice lacking perforin-dependent cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine*. 1996 May 1;183(5):2143-52.

[207] Bluthmann H, Kisielow P, Uematsu Y, Malissen M, Krimpenfort P, Berns A, et al. T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes. *Nature*. 1988 Jul 14;334(6178):156-9.

[208] Heath WR, Miller JF. Expression of two alpha chains on the surface of T cells in T cell receptor transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 1993 Nov 1;178(5):1807-11.

[209] Zal T, Weiss S, Mellor A, Stockinger B. Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Aug 20;93(17):9102-7.

