

UPMC-Paris 6

Habilitation à diriger les recherches

**De la tolérance
immunitaire à la
physiopathologie de
l'infection par le VIH**

Plan

I. La tolérance immunitaire

- Mécanismes cellulaires et moléculaires
- Manipulation génétique et pharmacologique

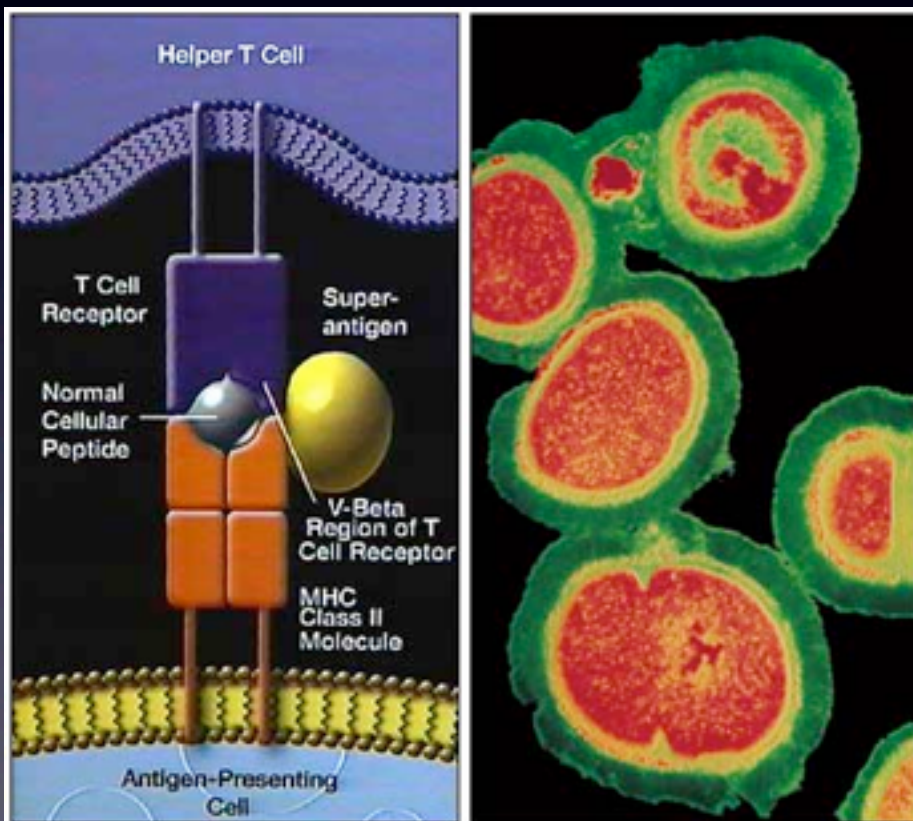
II. Physiopathologie de l'infection par le VIH

- Infection des lymphocytes T DN
- Thérapie génique de l'infection dans le modèle des souris humanisées

La tolérance immunitaire

- Horror Autotoxicus --> Autoimmunity --> Immunorégulation
- Dogme:
 - tolérance centrale (T/B)/tolérance périphérique
 - sélection négative des clones auto-réactifs (apoptose)
 - sélection positive de cellules régulatrices foxp3+ (Treg)
- Basée sur le postulat que le répertoire «naïf» est auto-réactif

Les superantigènes: modèles d'antigènes du Soi



Eadxe Creative Services, Inc.
George Eade, Illustrator

Science Photo Library /
Custom Medical Stock Photo

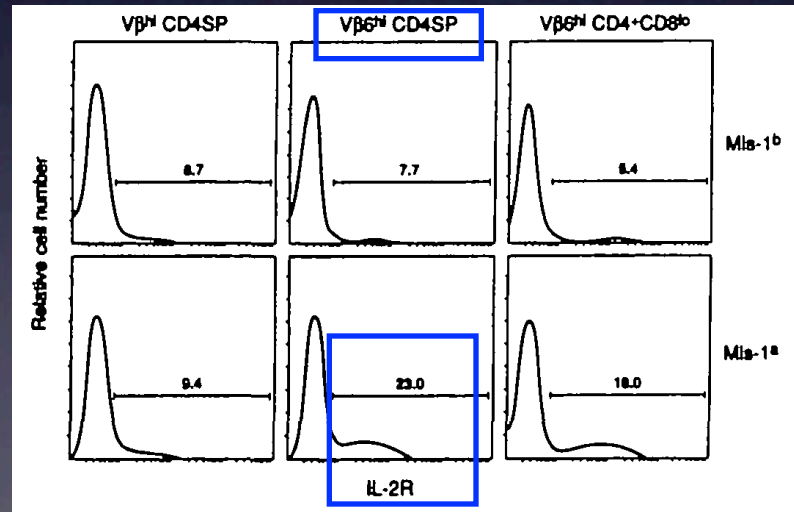
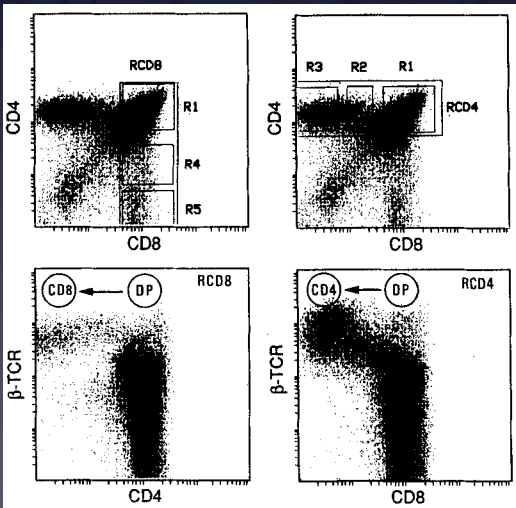
Table 5 Specificity of Viral Superantigens Encoded by Endogenous MMTVs

Mtv	Chromosome	V _β specificity
1	7	3, 5
2	18	14, 15
3	11	3, 5, 17a1
4	?	7, 8, 1-3
6 (<i>Mls3</i>)	16	3, 5, 17a2
7 (<i>Mls1</i>)	1	6, 7, 8, 1, 9
8	6	5, 11, 17a1
9	12	5, 11, 17a1
11	14	5, 11
13	4	3, 5
14	4	
17	4	
23	6	7
27	1	3, 5
28	X	
29	6	
31	Y	
42	Y	
43	?	6, 7, 8, 1, 9
44	?	3, 5, 6, 8, 1, 9
45	3	
48	?	2
51	?	2

Data are compiled from several sources (Acha-Orbea et al. 1993; Simpson et al. 1993; Tomonari et al. 1993; Luther et al. 1994; Nimi et al. 1995). These papers should be consulted for the original references.

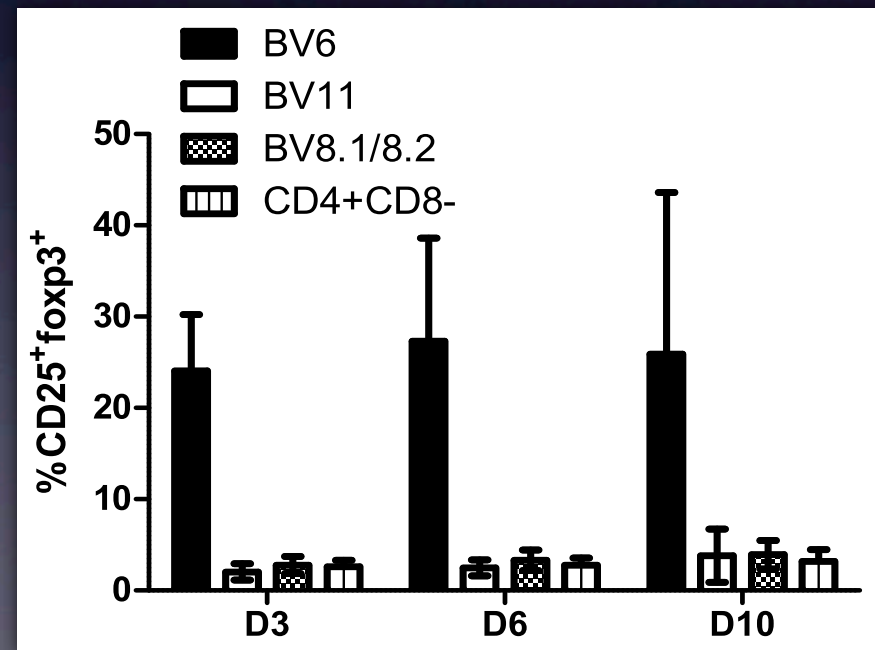
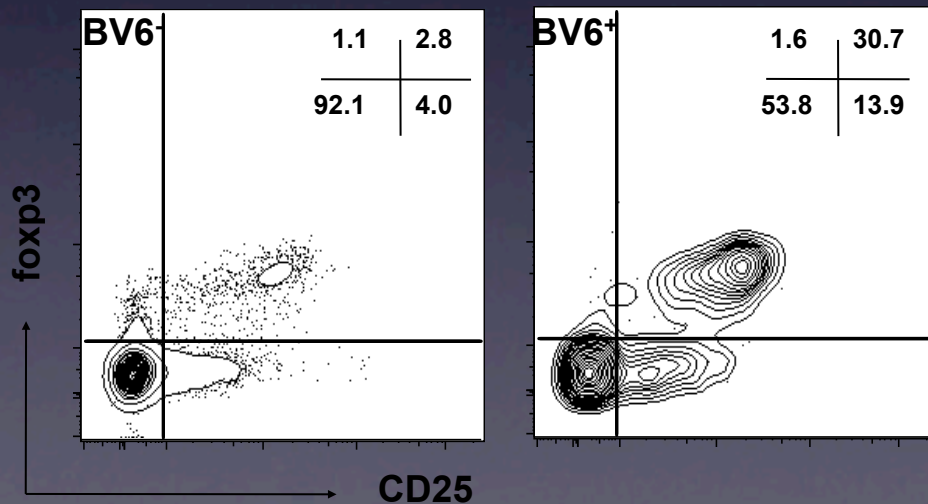
Différentiation thymique et tolérance centrale (I)

- Asymétrie de la différenciation thymique
- Sélection de cellules CD25+



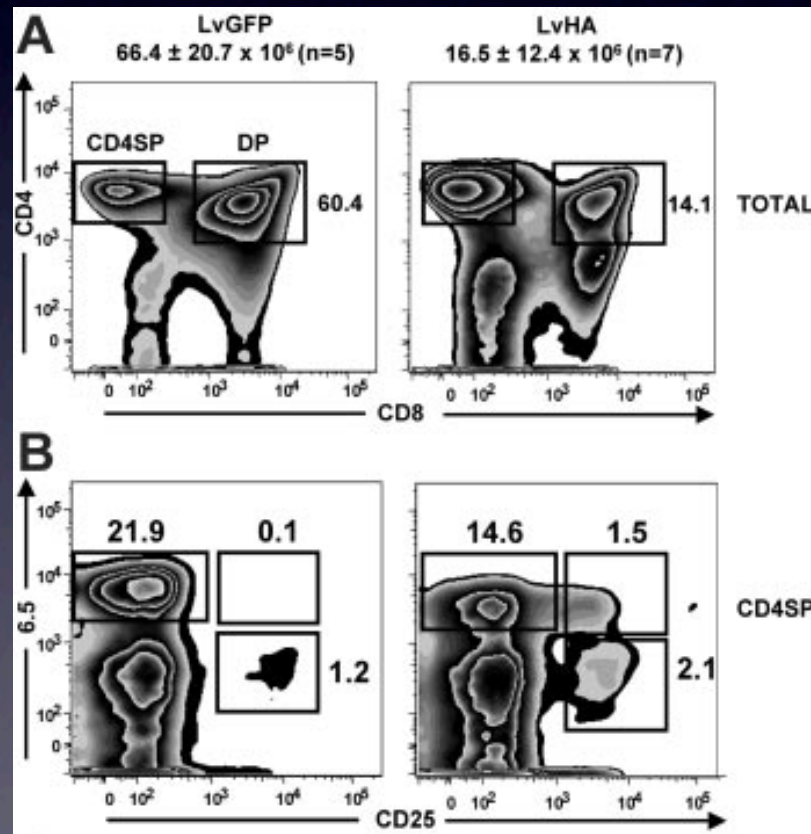
Différentiation thymique et tolérance centrale (II)

- sélection positive de cellules CD25+foxp3+



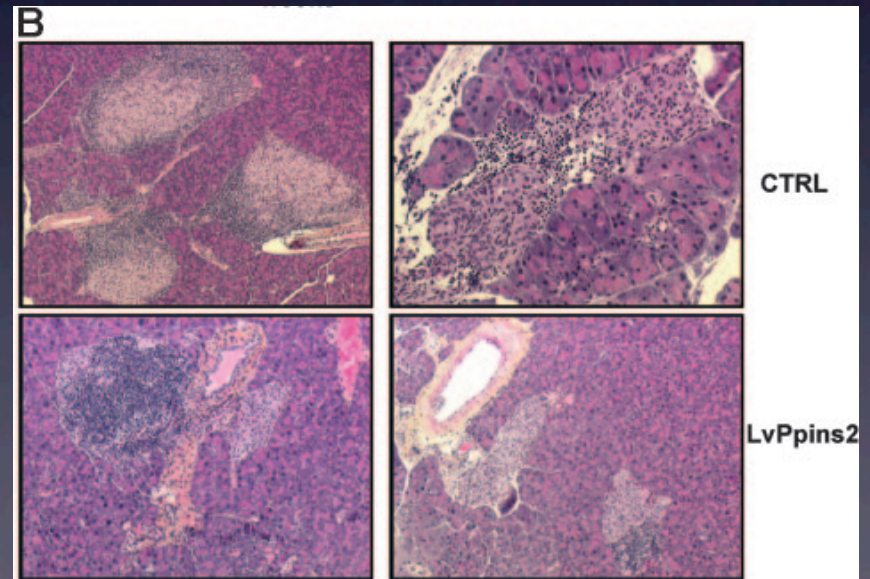
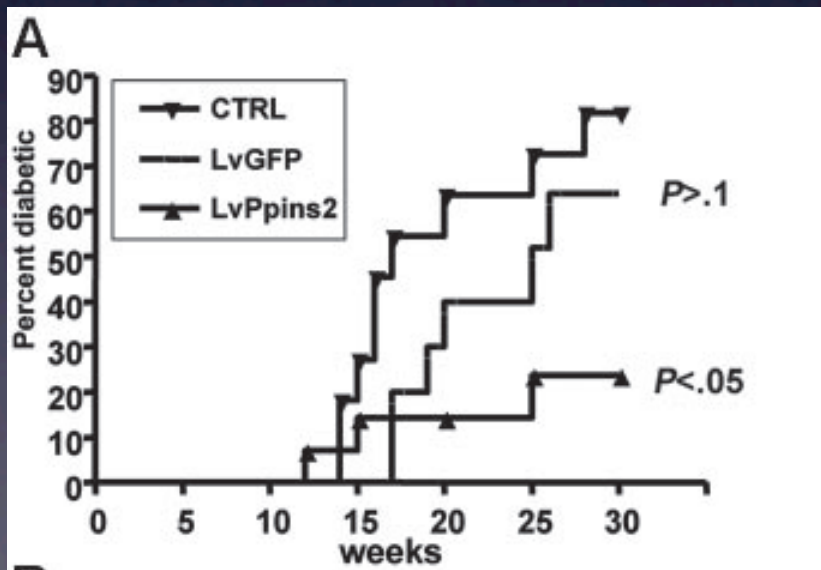
Manipulation de la tolérance centrale

- Injections intrathymique de lentivecteur-HA



Manipulation thérapeutique

- Expression de la préproinsuline dans le thymus pour prévenir le diabète spontané de la souris NOD



Conclusions (I)

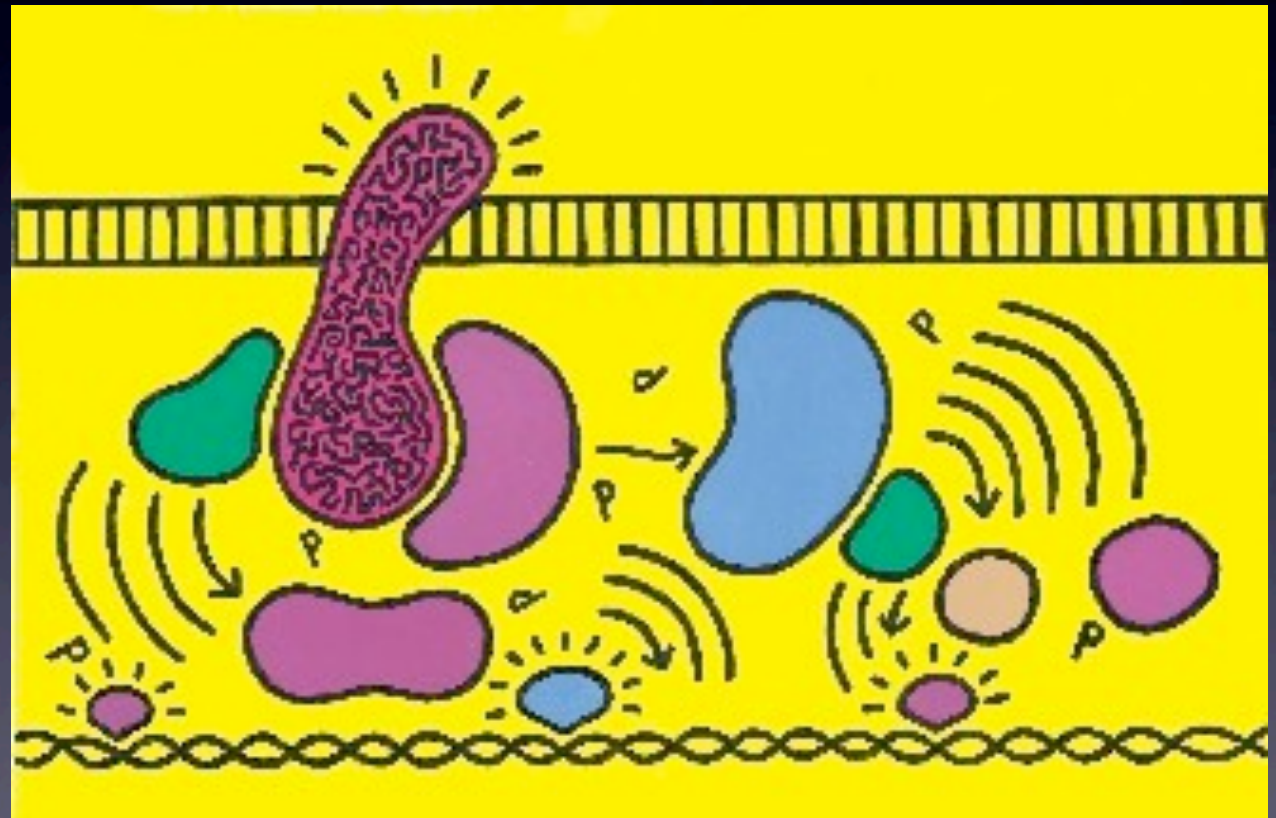
- La sélection négative vis-à-vis de Sag endogènes (Ag du Soi) est indissociable de la sélection positive de lymphocytes T régulateurs
- Etend les résultats obtenus avec des souris transgéniques exprimant l'antigène cognitif dans le thymus
- Rare exemple d'une instruction donnée par un antigène du Soi sur le développement thymique
- Rôle du signal intracellulaire durant la sélection thymique?

Méthodes d'analyse

- Cytométrie de flux multiparamétrique détectant les formes phosphorylées des molécules du signal
- qPCR foxp3
- Chromatin Immunoprécipitation (ChIP)
- Epigénétique (méthylation)

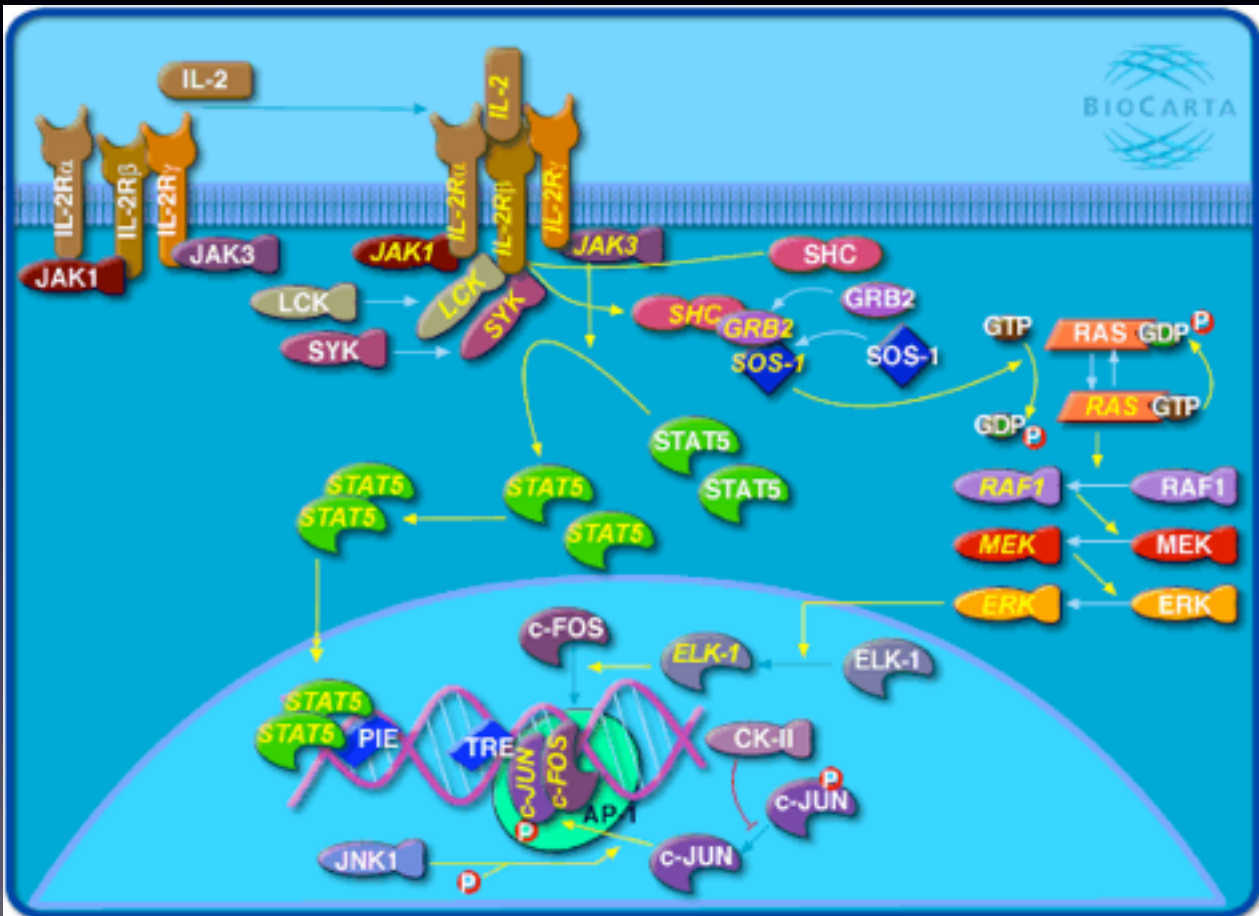
Le signal IL-2

- CD25: IL-2Ra
- CD122: IL-2Rb
- CD132: IL-2Rgc



Le signal IL-2

- CD25: IL-2Ra
- CD122: IL-2Rb
- CD132: IL-2Rgc

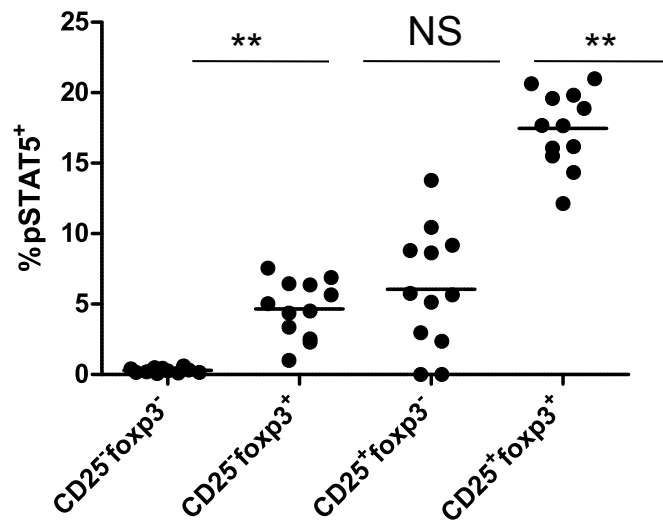
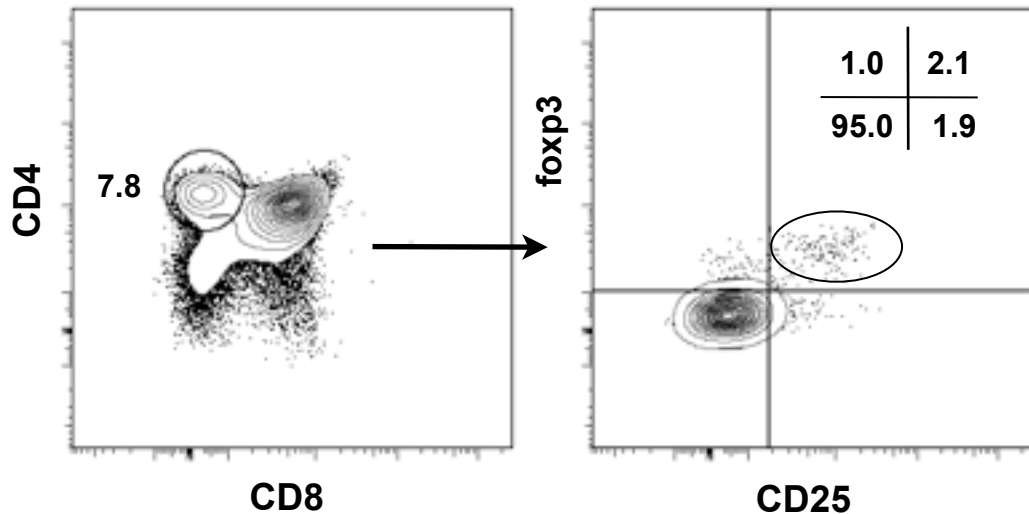


Rôle du signal IL-2 durant la sélection thymique

- Peu d'effet de la délétion d'IL-2, de CD25 ou de CD122 sur la cellularité thymique (diminution des cellules foxp3⁺ en périphérie)
- Effet massif de la délétion de CD132 et CD122 sur les cellules foxp3⁺ du thymus (CD132≠CD122 car pas de thymus?)
- Rôle de STAT5 dans l'induction de l'expression de foxp3 (STAT5-Tg CA + in vitro RA)
- Quid in vivo dans des souris non manipulées?

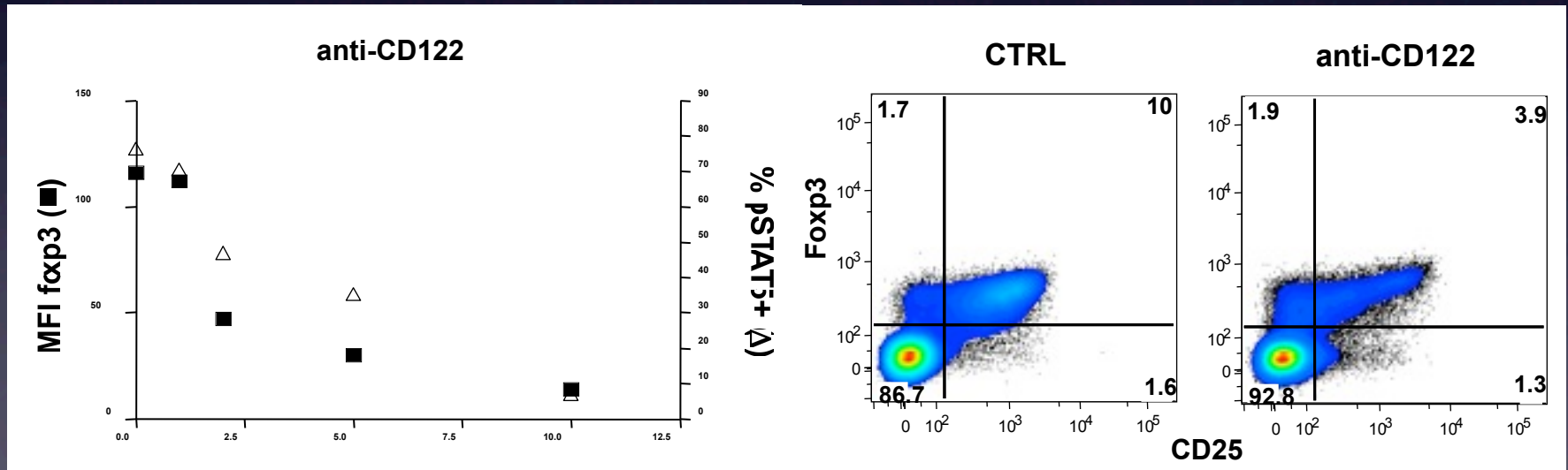
Etude du signal IL-2

- Expression de pSTAT5 dans les thymocytes CD4/CD25/foxp3



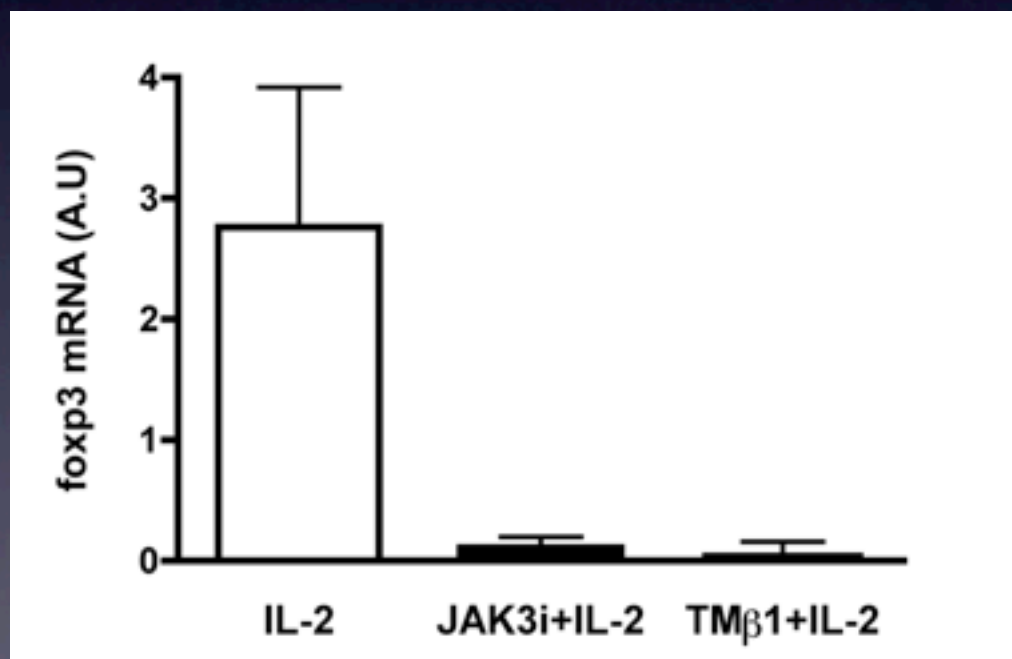
Rôle de pSTAT5 dans l'expression de foxp3 (I)

- Inhibition de CD122 conduit à la perte de foxp3 in vitro et in vivo



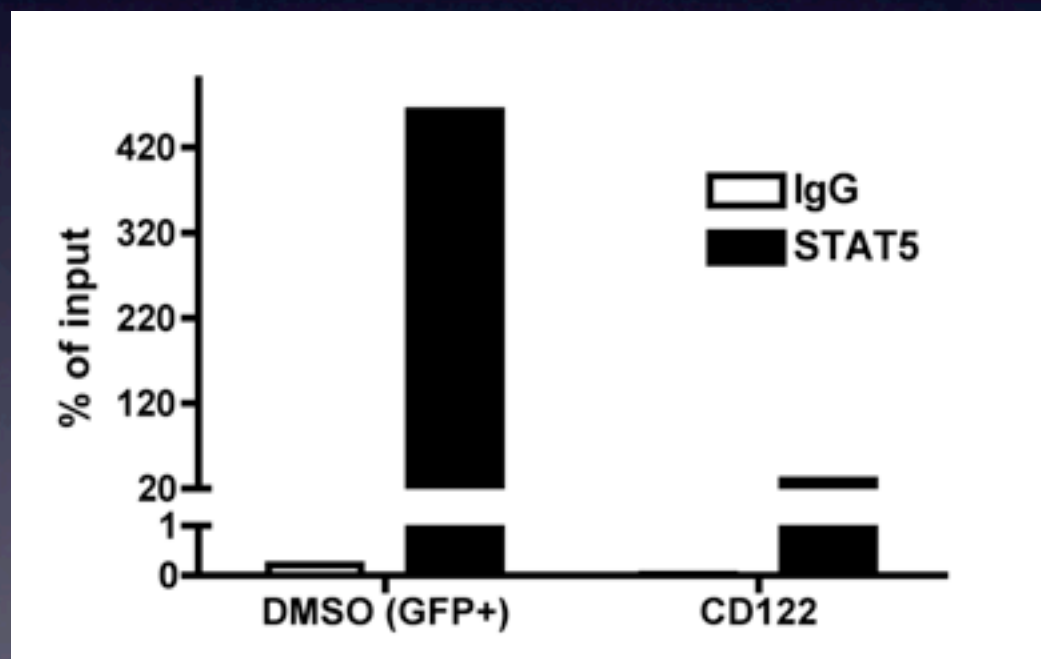
Rôle de pSTAT5 dans l'expression de foxp3 (II)

- pSTAT5 joue un rôle dans le maintien de l'expression de foxp3 dans les Treg



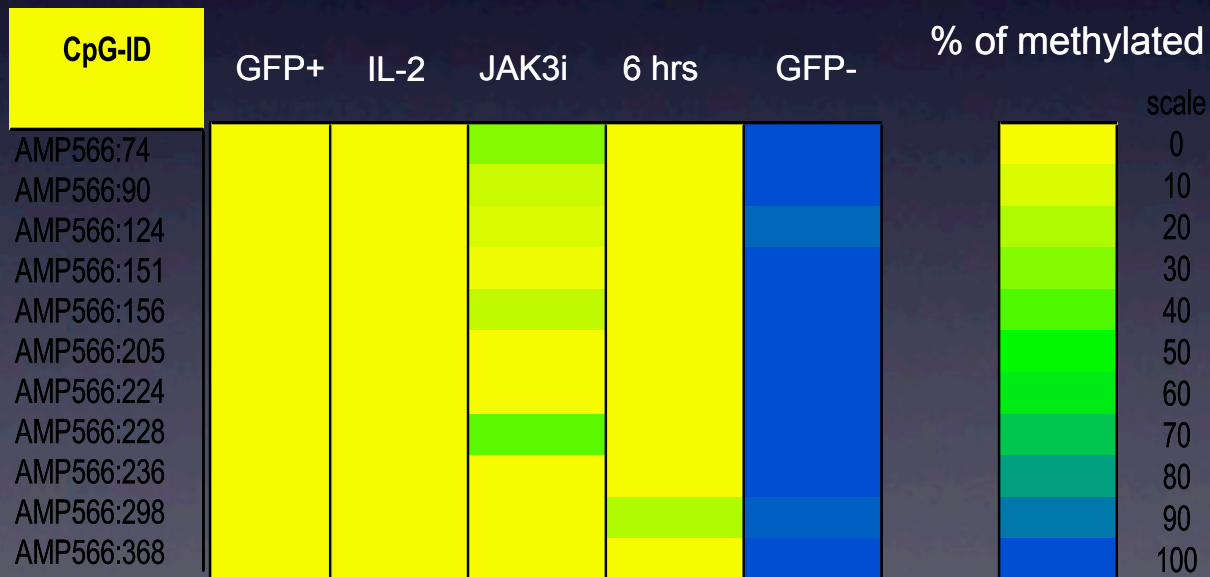
Rôle de pSTAT5 dans l'expression de foxp3 (II)

- pSTAT5 joue un rôle dans le maintien de l'expression de foxp3 dans les Treg



Rôle de pSTAT5 dans l'expression de foxp3 (II)

- pSTAT5 joue un rôle dans le maintien de l'expression de foxp3 dans les Treg

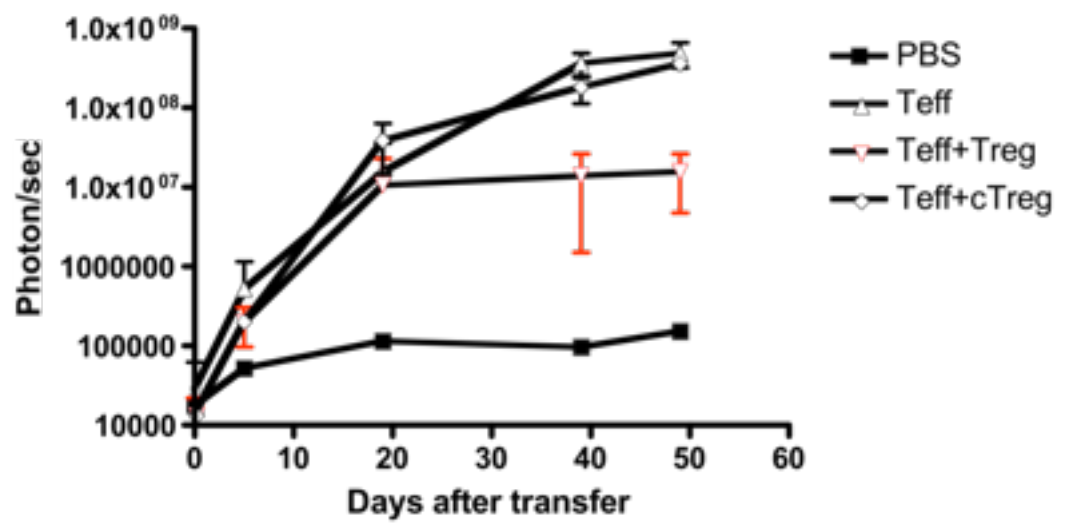
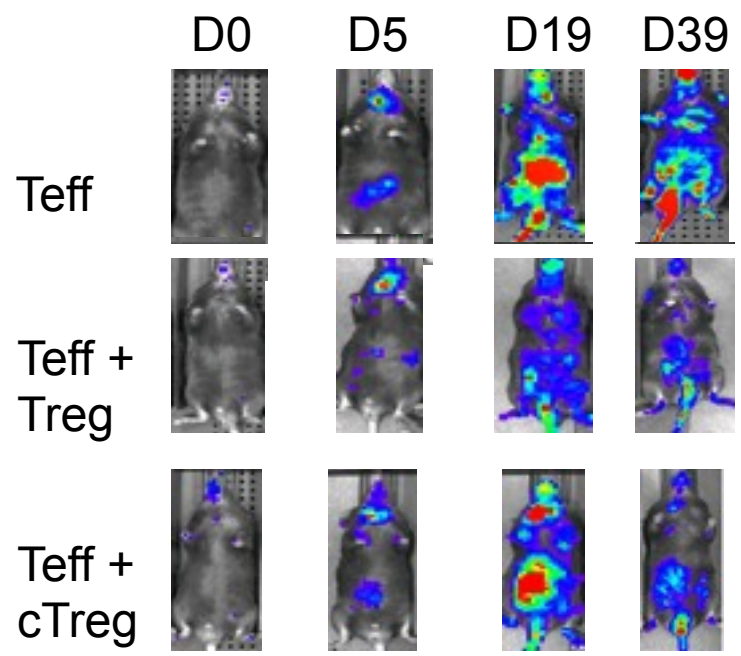


Rôle de pSTAT5 dans l'expression de foxp3 (III)

- Perte de fonction suppressive in vivo: colite expérimentale

Rôle de pSTAT5 dans l'expression de foxp3 (III)

- Perte de fonction suppressive in vivo: colite expérimentale

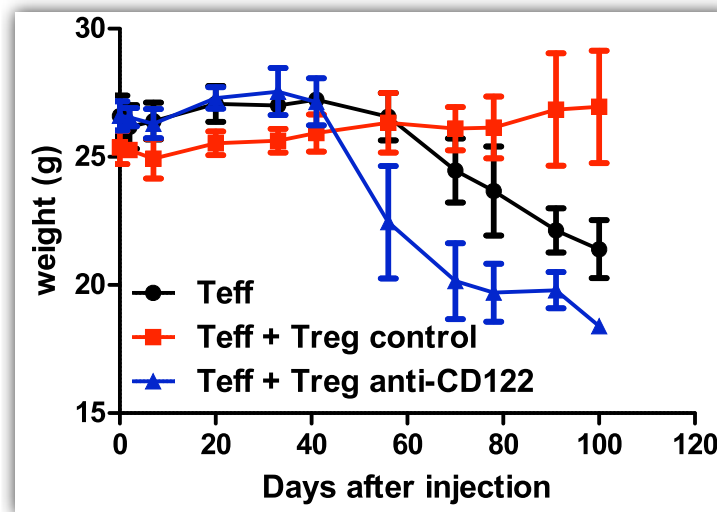


Rôle de pSTAT5 dans l'expression de foxp3 (III)

- Perte de fonction suppressive in vivo: colite expérimentale

Rôle de pSTAT5 dans l'expression de foxp3 (III)

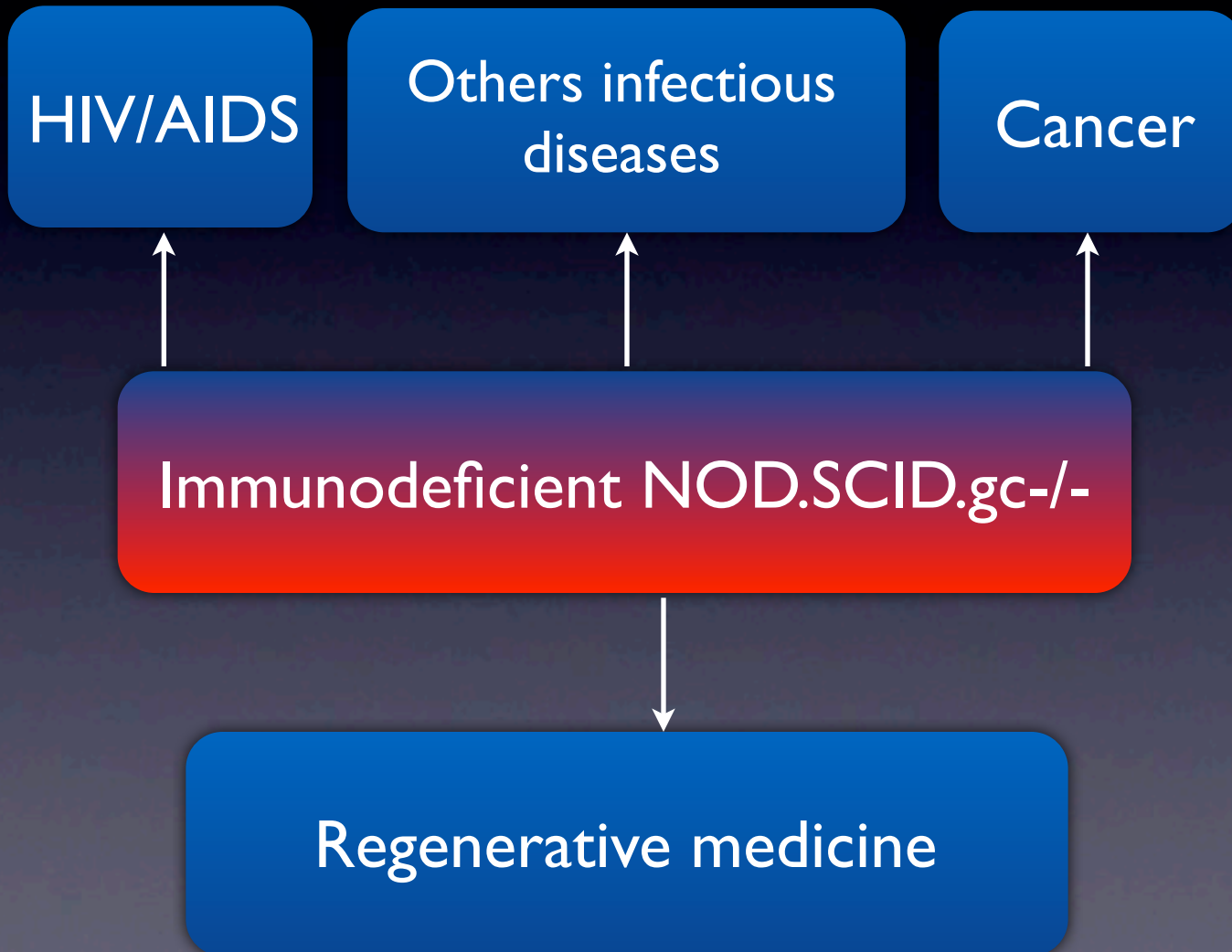
- Perte de fonction suppressive in vivo: colite expérimentale



Projet

- Validation du rôle de pSTAT5 sur l'expression de foxp3 humain
- Déplétion Treg --> immunothérapie du cancer
 - avant transfert de T autologues
 - in vivo (effet synergique sur la tumeur et les Treg)
- Validation dans un modèle animal plus proche de la clinique que la souris

Les souris NSG: in vivo «test tubes»



Protocole

Purification CD34+ sang de cordon



Banque



Protocole

Purification CD34+ sang de cordon



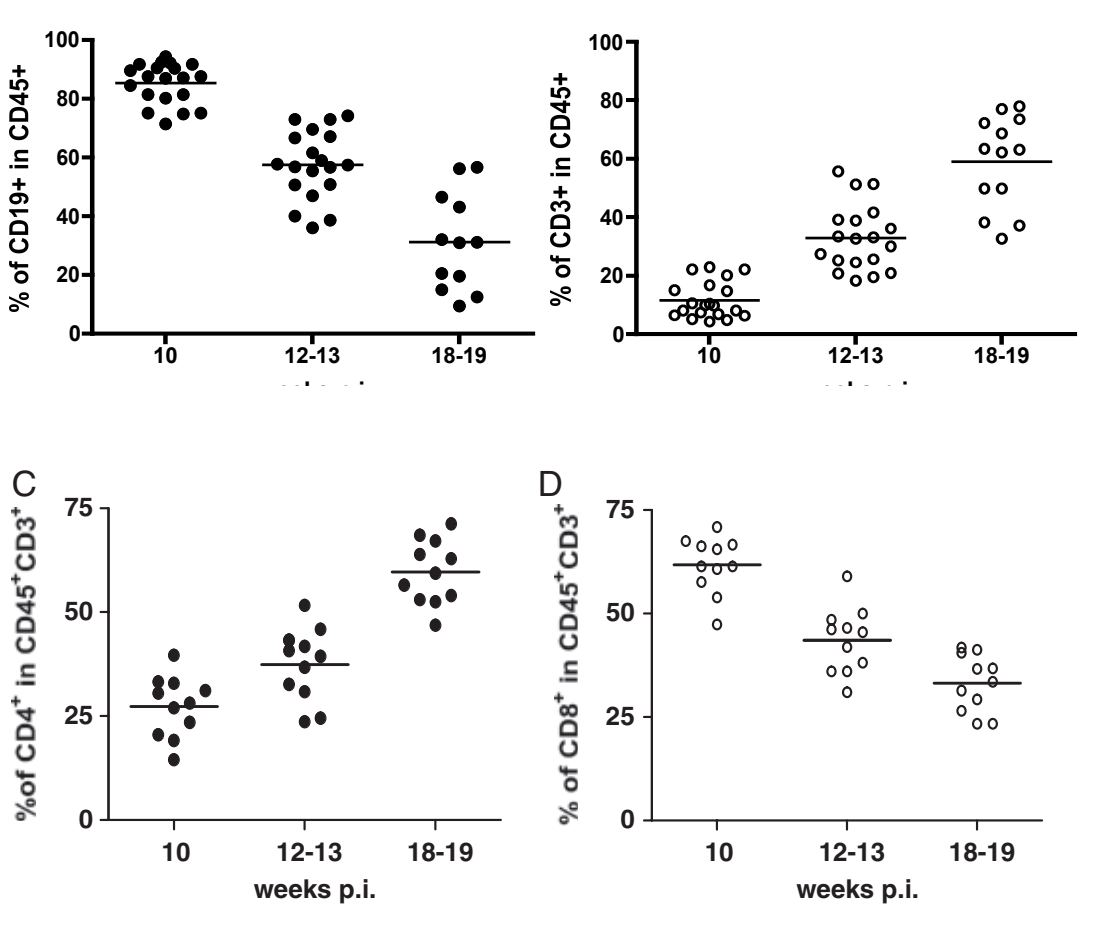
Banque



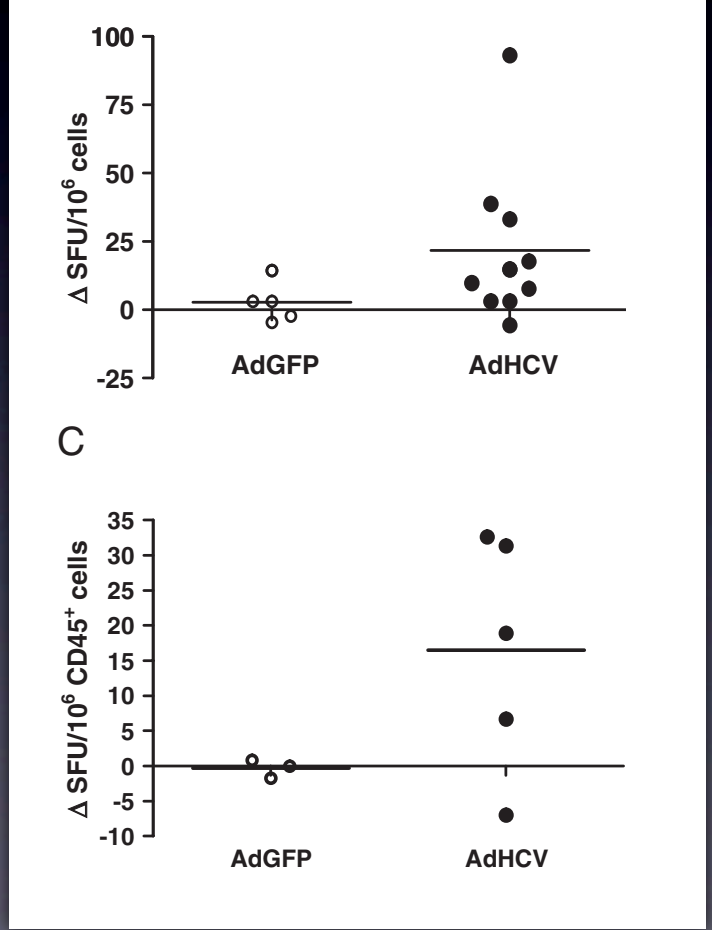
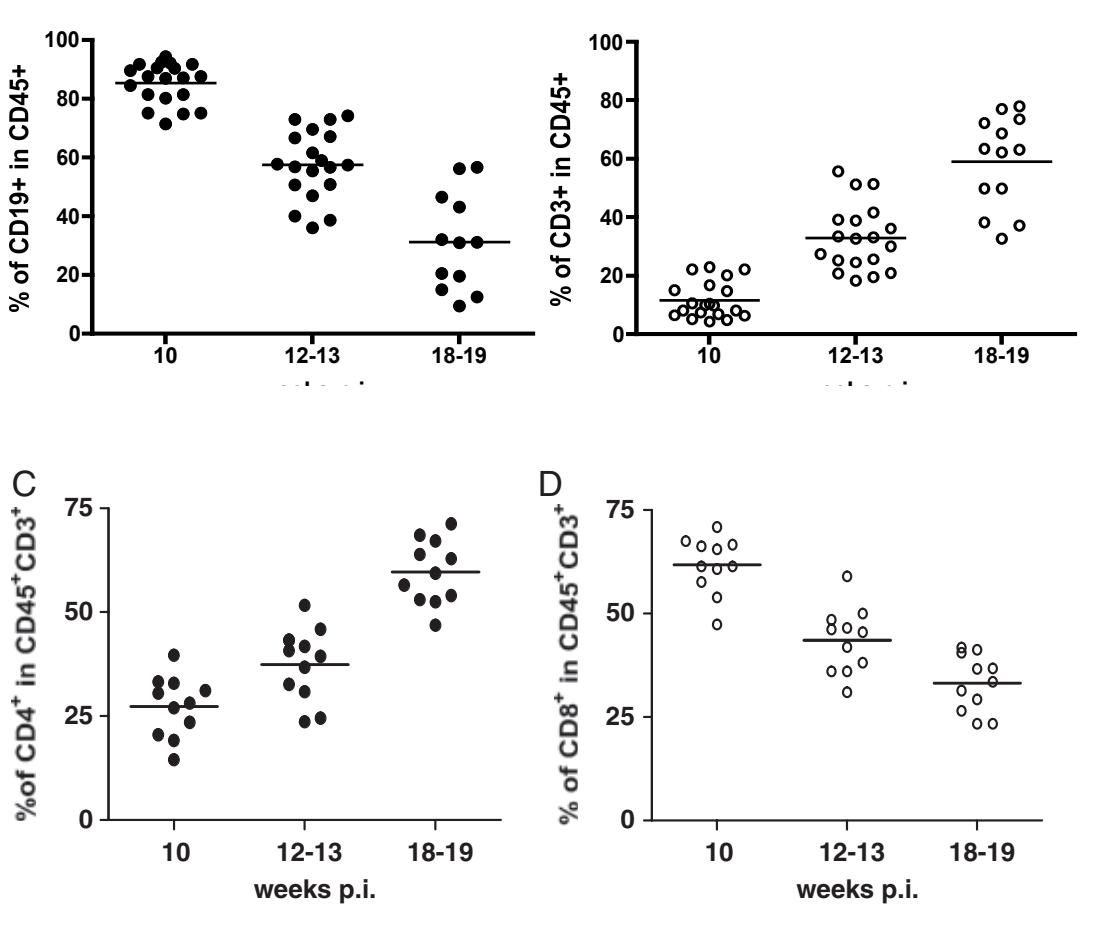
Injection intra-hépatique
 $3 \cdot 10^4 / 10^5$ cellules

Reconstitution et fonctionnalité lymphocytes T humains

Reconstitution et fonctionnalité lymphocytes T humains

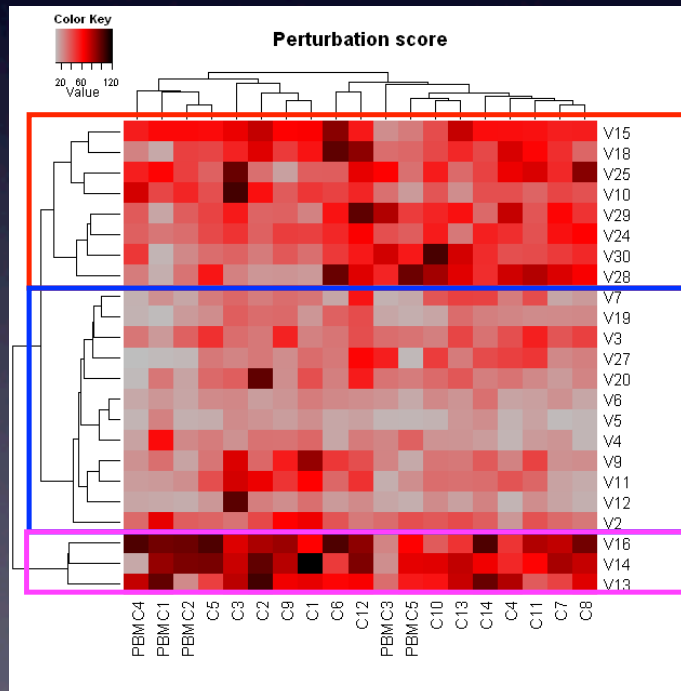


Reconstitution et fonctionnalité lymphocytes T humains



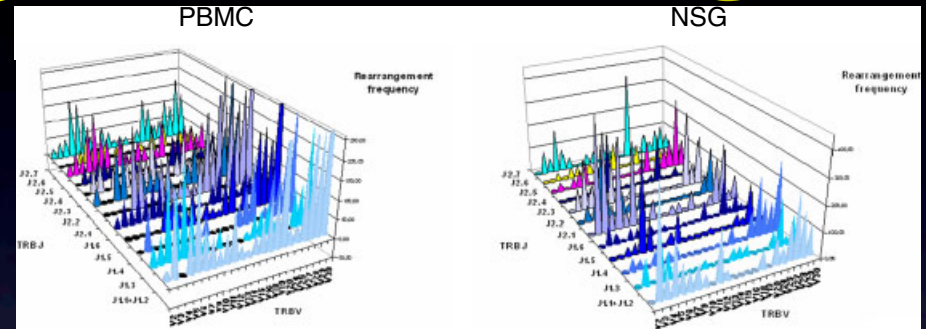
Etude des réarrangements V-J

- Semi-quantitative PCR detecting 100% of V-J rearrangements at the TCR b locus (ImmunID)
- Discrimination by size on gels



Etude des réarrangements V-J

- Semi-quantitative PCR detecting 100% of V-J rearrangements at the TCR b locus (ImmunID)
- Discrimination by size on gels

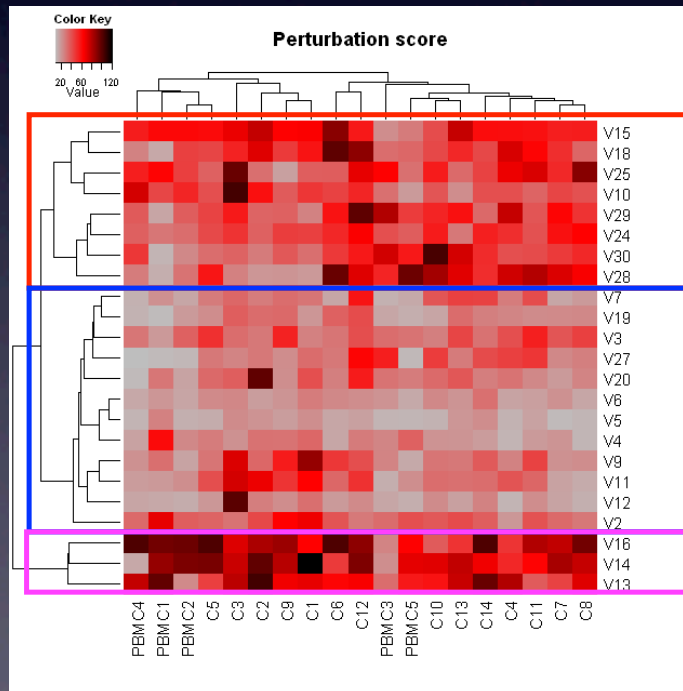


Etude des réarrangements V-J

- Semi-quantitative PCR detecting 100% of V-J rearrangements at the TCR b locus (ImmunID)
- Discrimination by size on gels

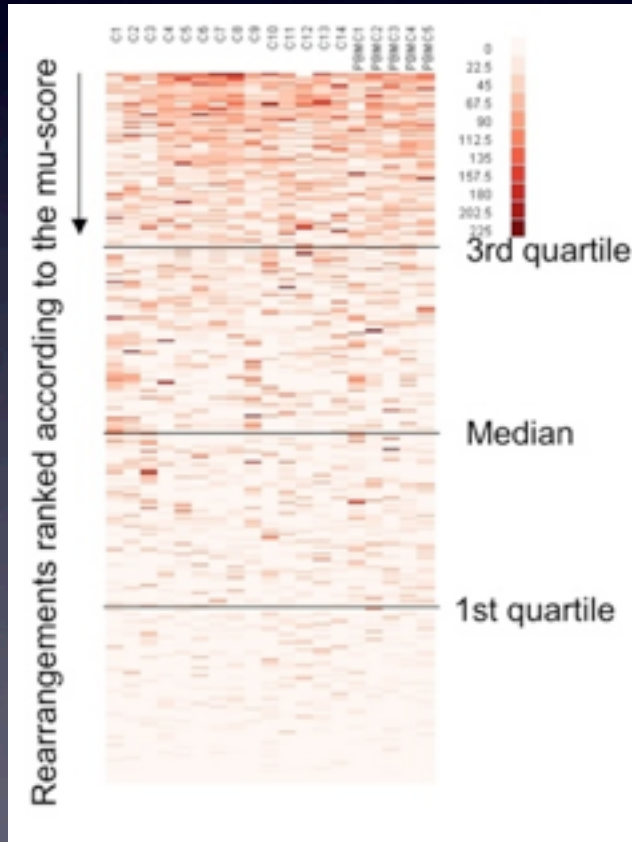
Etude des réarrangements V-J

- Semi-quantitative PCR detecting 100% of V-J rearrangements at the TCR b locus (ImmunID)
- Discrimination by size on gels



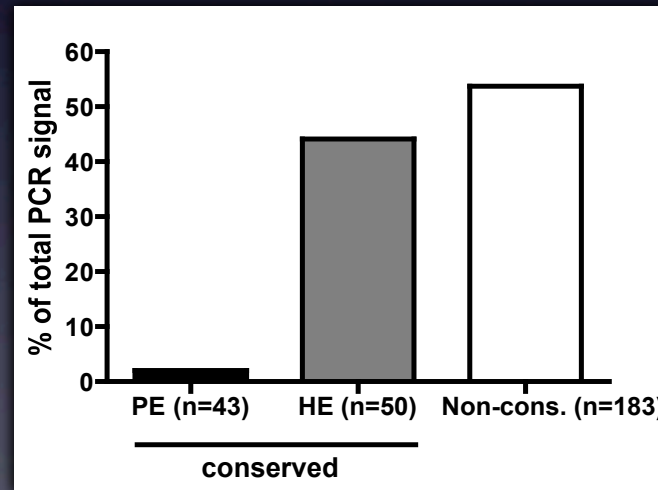
Etude des réarrangements V-J

- Semi-quantitative PCR detecting 100% of V-J rearrangements at the TCR b locus (ImmunID)
- Discrimination by size on gels



Etude des réarrangements V-J

- Semi-quantitative PCR detecting 100% of V-J rearrangements at the TCR b locus (ImmunID)
- Discrimination by size on gels



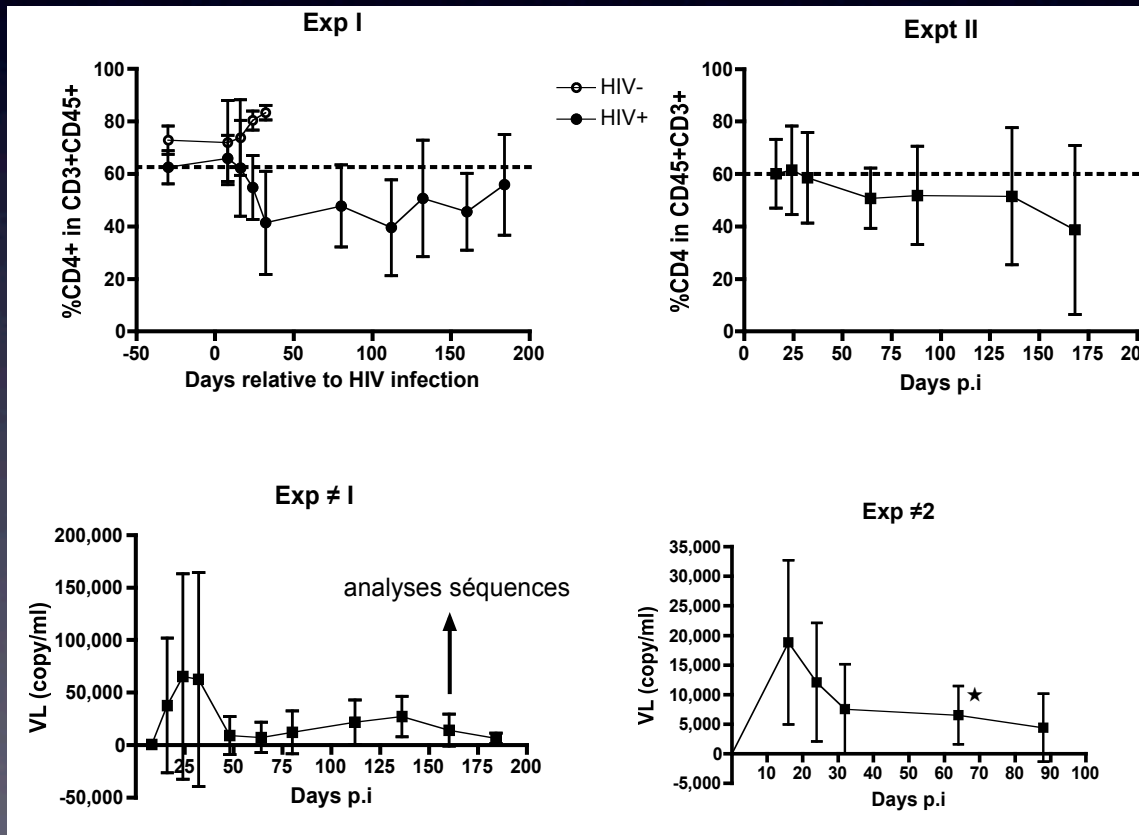
Conclusions (II)

- Répertoire TCRb se chevauche significativement entre humains et souris humanisées
 - Rôles des molécules HLA?
 - Biais inné du répertoire contre le Soi?
- Souris NSG permettent la mise en place de nouveaux projets appliqué à la levée de la tolérance via la manipulation de l'expression de l'antigène et/ou de foxp3
- Reconstitution des lymphocytes T CD4+ est favorisée: quid de l'intérêt du modèle pour les études sur le VIH?

Modèle d'infection du VIH chez la souris NSG (I)

- Charge virale et délétion CD4

HIV NSG



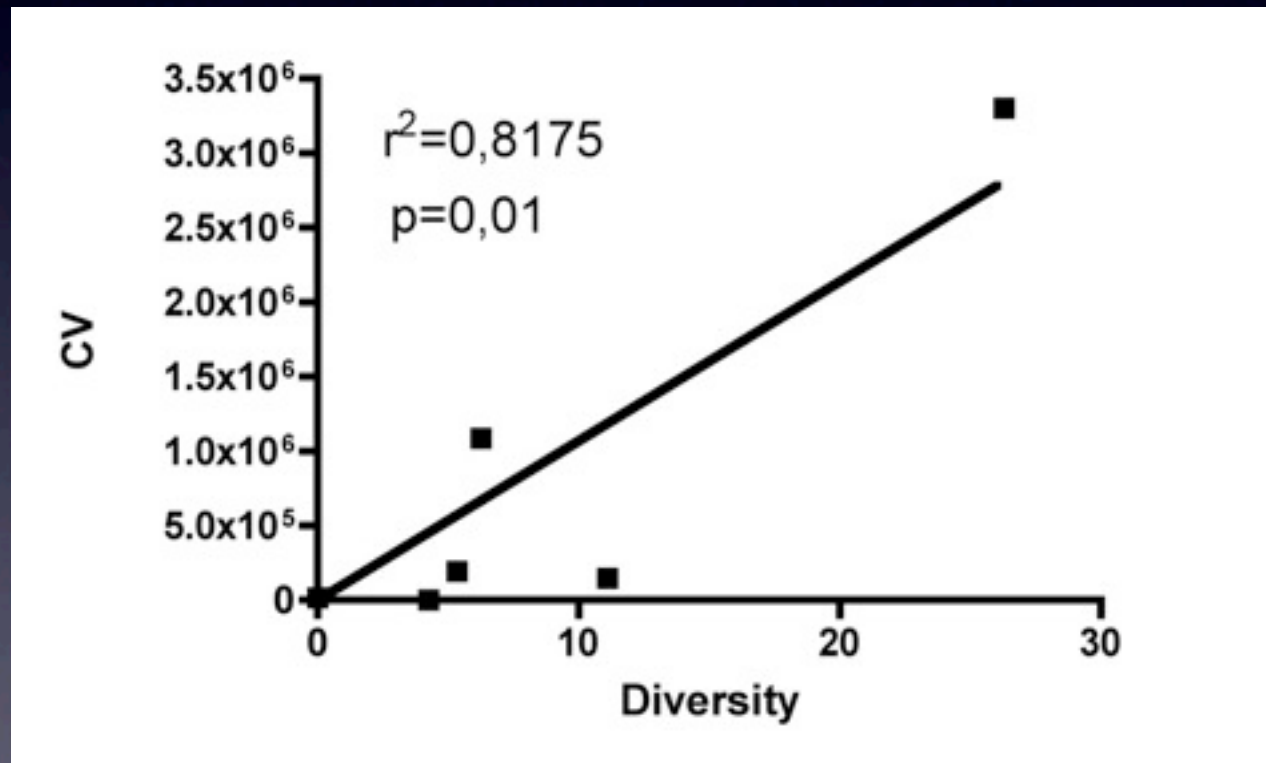
Modèle d'infection du VIH chez la souris NSG (II)

- Analyse de la diversité virale (boucle V3 gp120)

Souris	Nombre de clones	Bulk versus BAL	Clones versus Bulk
Souris B	48	N13H, F20L	E25G (1), G28R (1)
Souris D	47	N13H, N36S	S36N (14)
Souris 5	36	/	K10E (1),G15R (1), E25A (1),N36K (1)
Souris 11	56	/	F20I (1),R31G (1)
Souris 21	48	/	/
Souris 22	19	F20I, T22A	T2I (3), I20L (6),H34R (2)

Modèle d'infection du VIH chez la souris NSG (II)

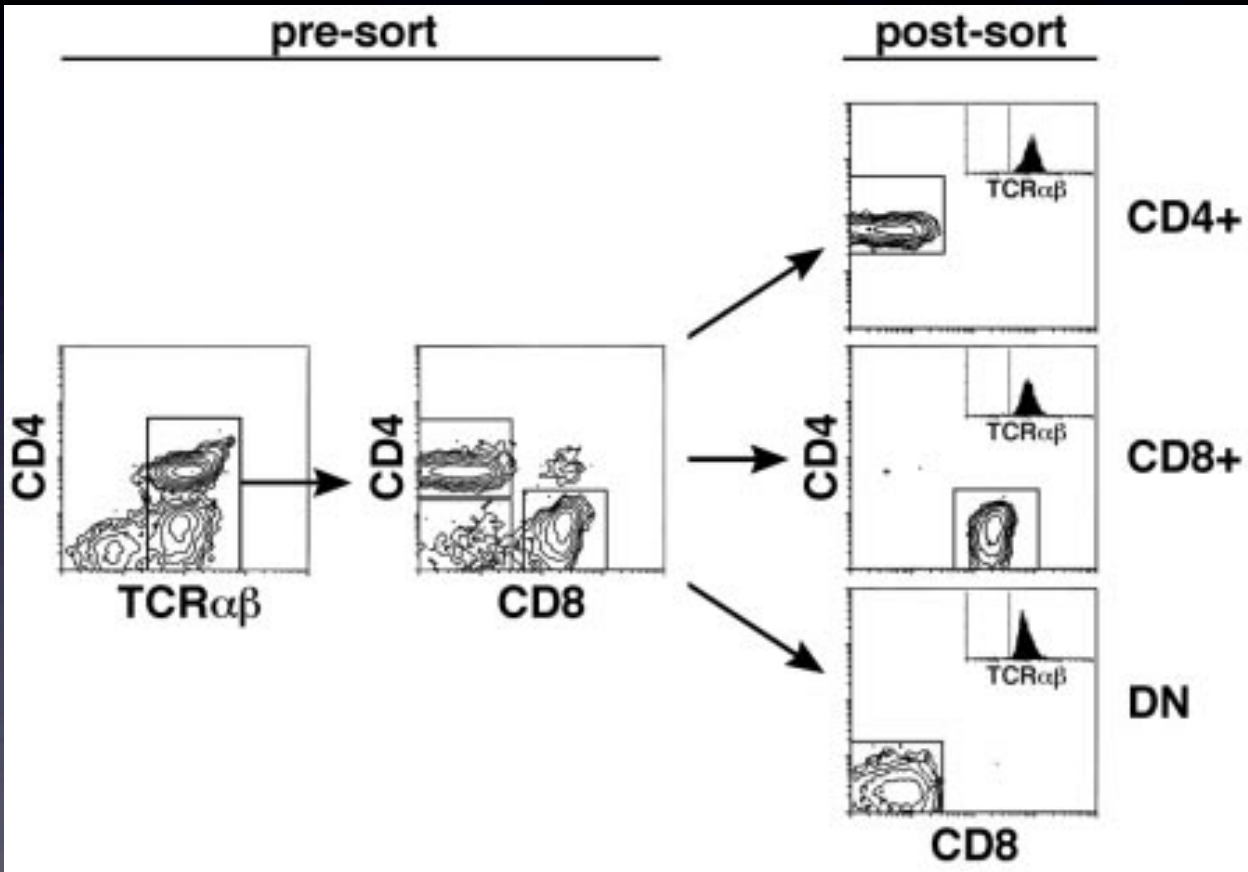
- Analyse de la diversité virale (boucle V3 gp120)



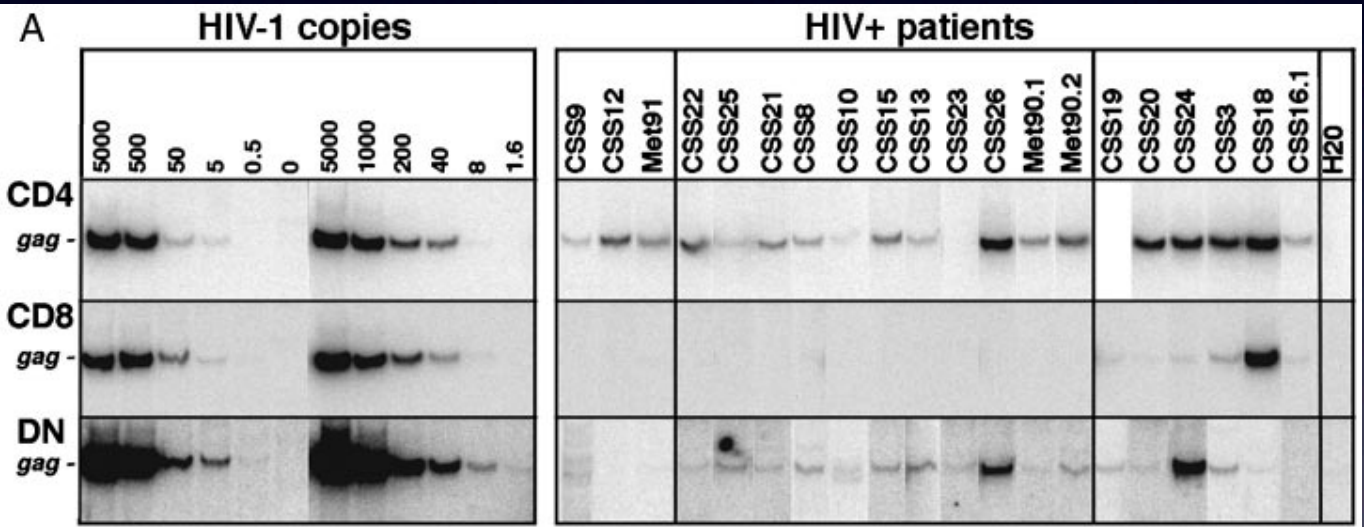
Les cibles de l'infection par le VIH

- Dogme:
 - cellules T CD4+CCR5+ mémoires (>95% du virus)
- Hypothèse: si CD4 est perdu après infection, alors une population de cellules DNT HIV+ devrait être présente chez les patients

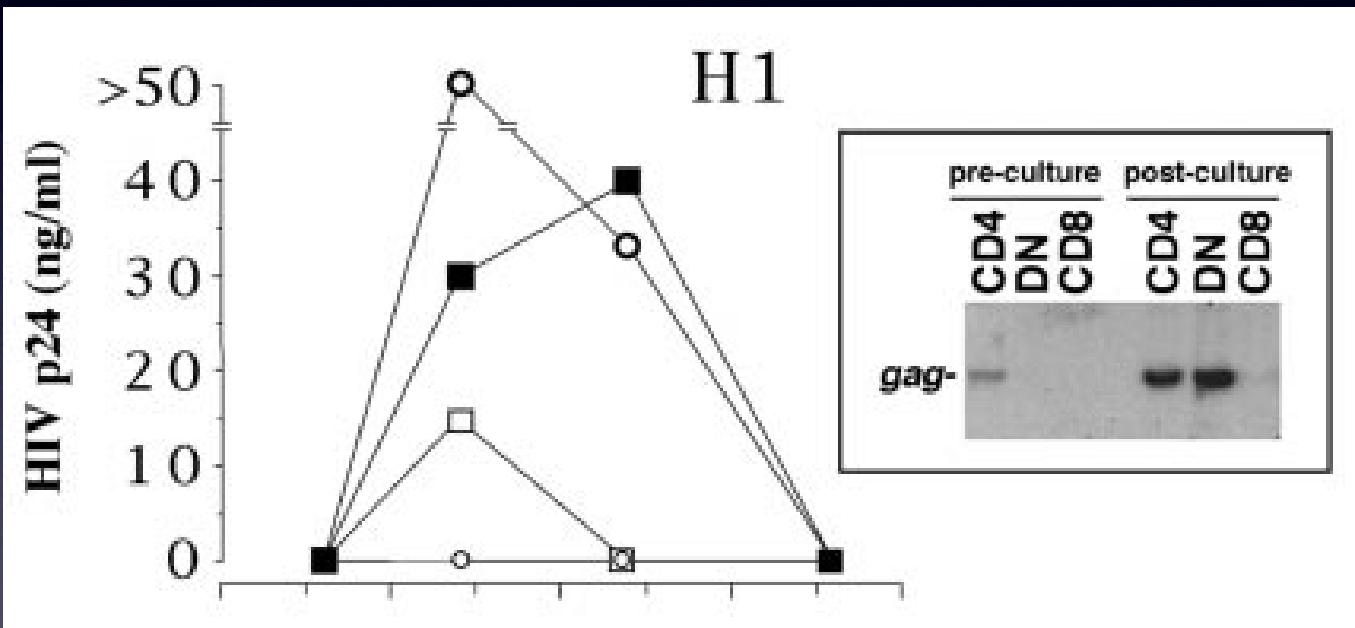
Les DN: réservoirs du VIH?



Les DN: réservoirs du VIH?



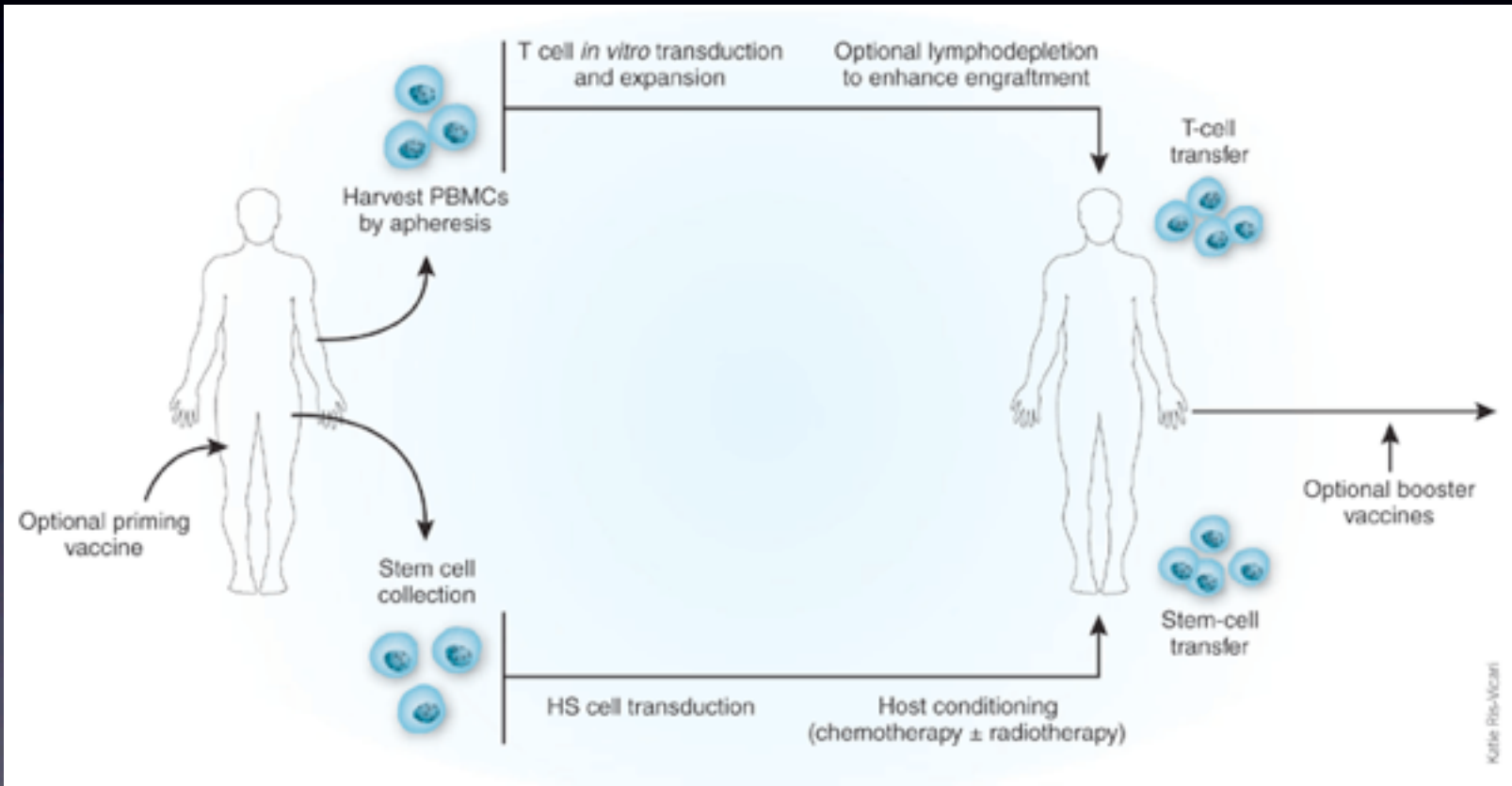
Les DN: réservoirs du VIH?



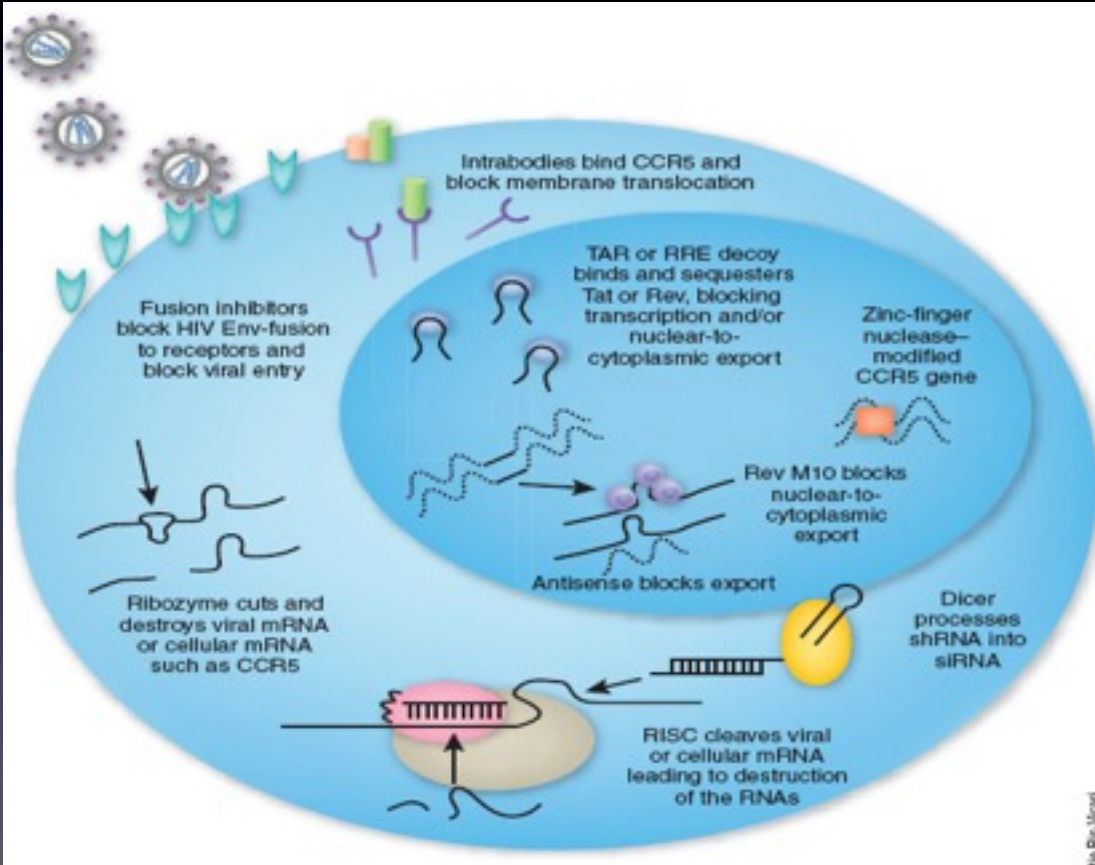
Projets: souris VIH

- Immunopathologie de l'infection
 - Rôle des DN dans les réservoirs viraux
 - Rôle des CD8 dans le contrôle du pic de virémie (phase aiguë)
- Thérapie génique
 - But: supprimer les antirétroviraux (curatif?)

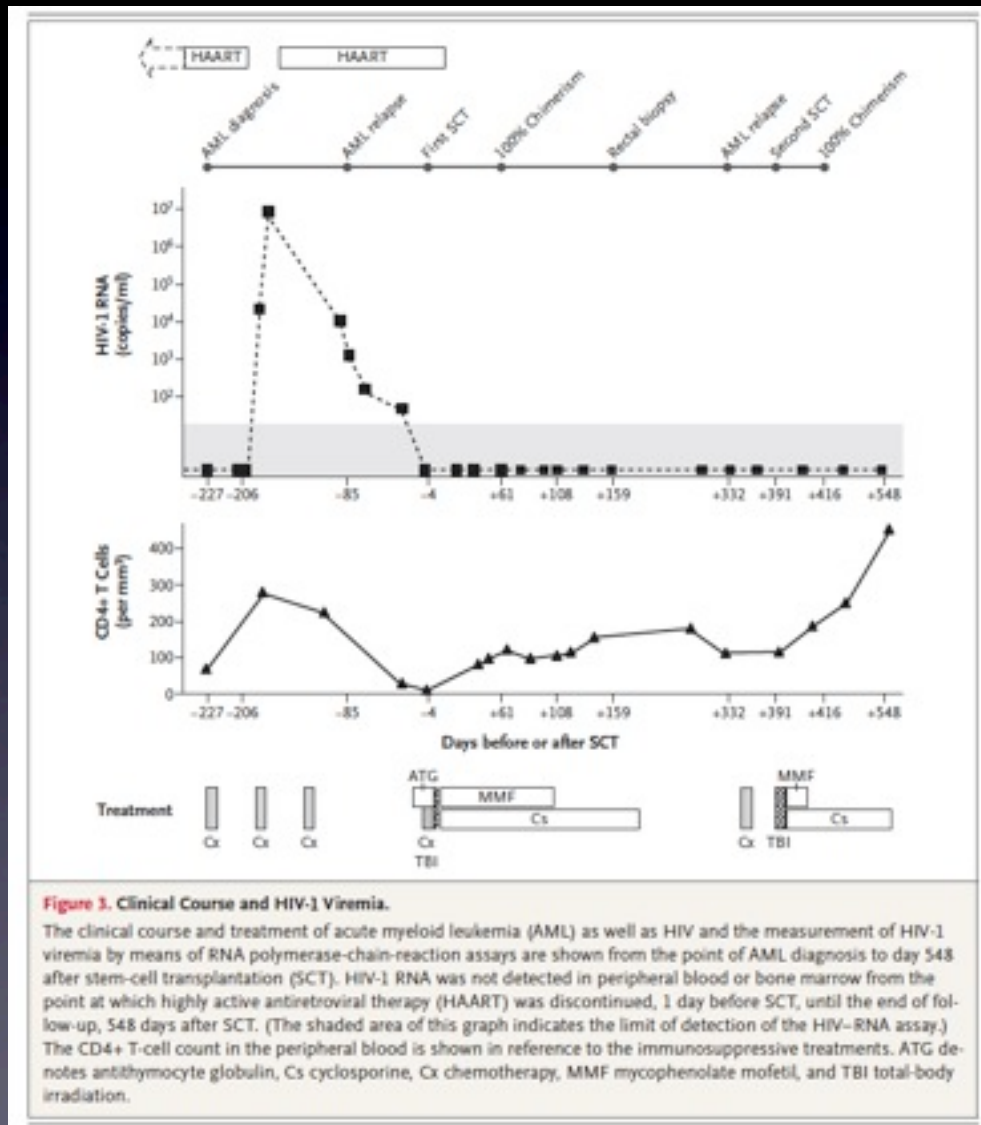
Les stratégies de thérapie génique anti-VIH



Les cibles



CCR5 est LA cible pour la TG VIH

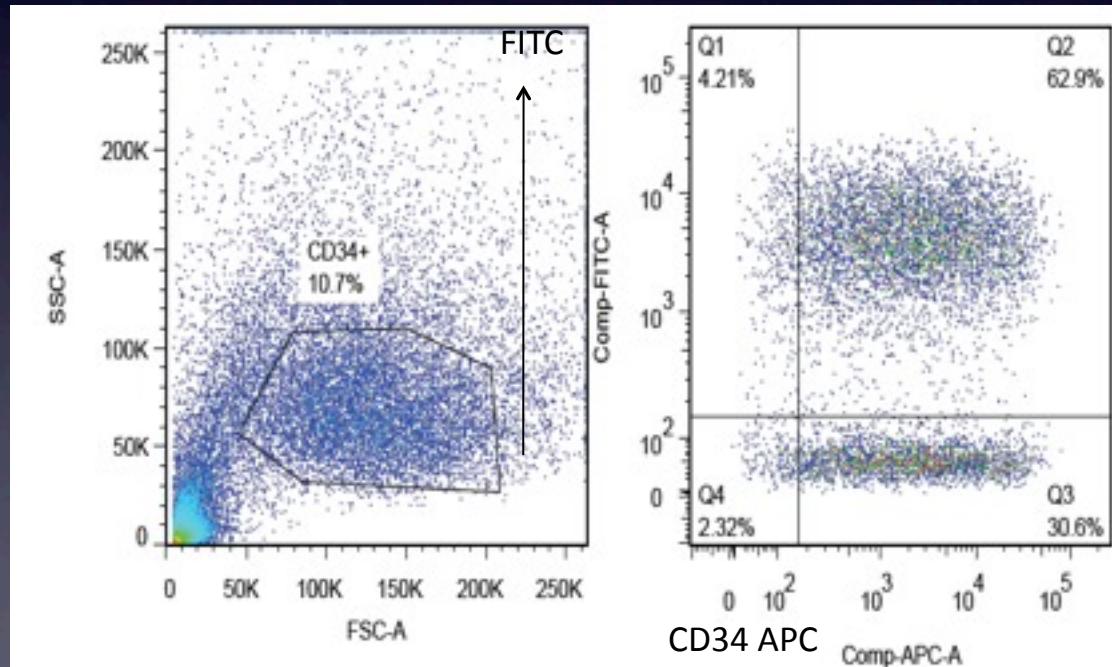


Notre stratégie

- Transfert de gènes dans les précurseurs CD34+
- Vecteurs lentiviraux pour insertion stable dans le génome
- Expression ciblée aux lymphocytes T CD4+
- Gènes inhibant l'entrée du virus --> agoniste de CCR5 (P2i) et inhibiteur de fusion (T20)

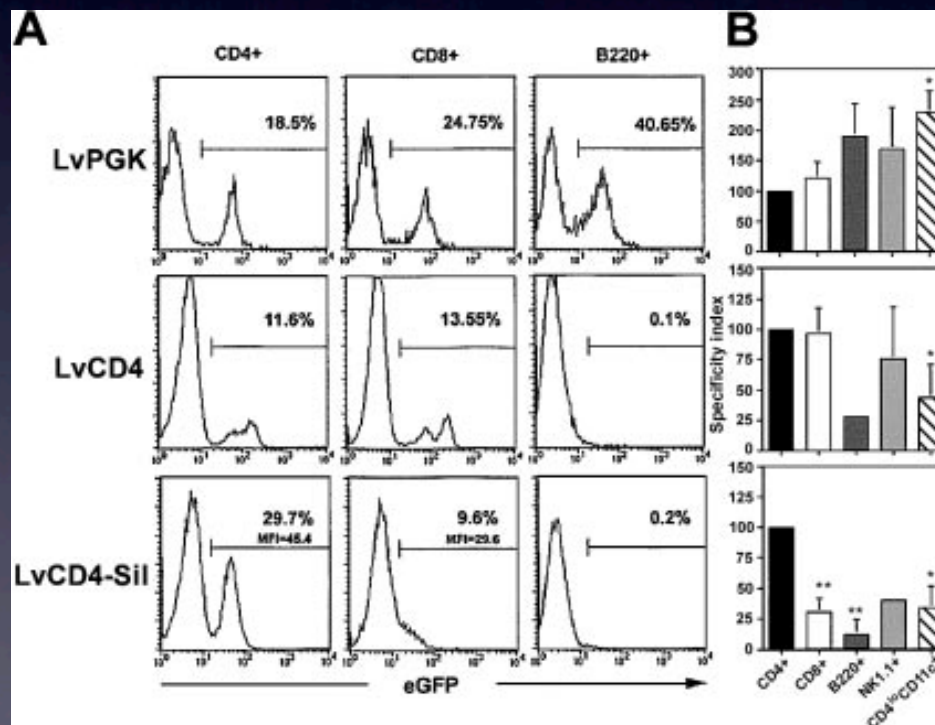
Transfert de gènes dans les précurseurs CD34+

- lentivecteur PGK-GFP



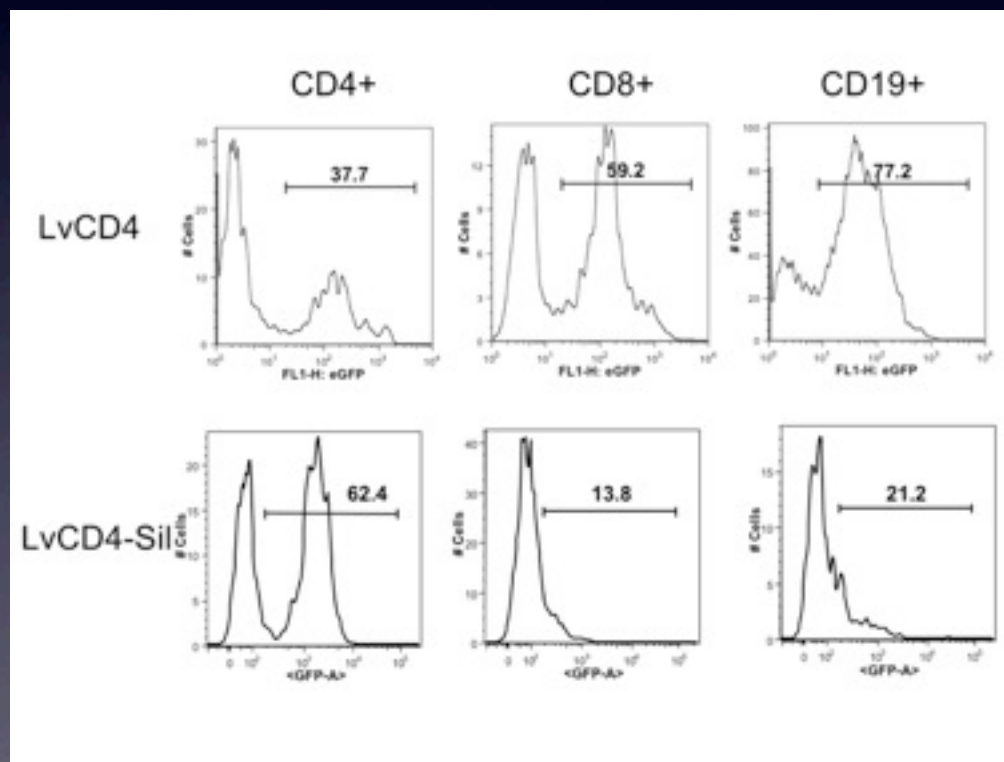
Ciblage transcriptionnel

- Expression spécifique chez la souris et chez l'homme



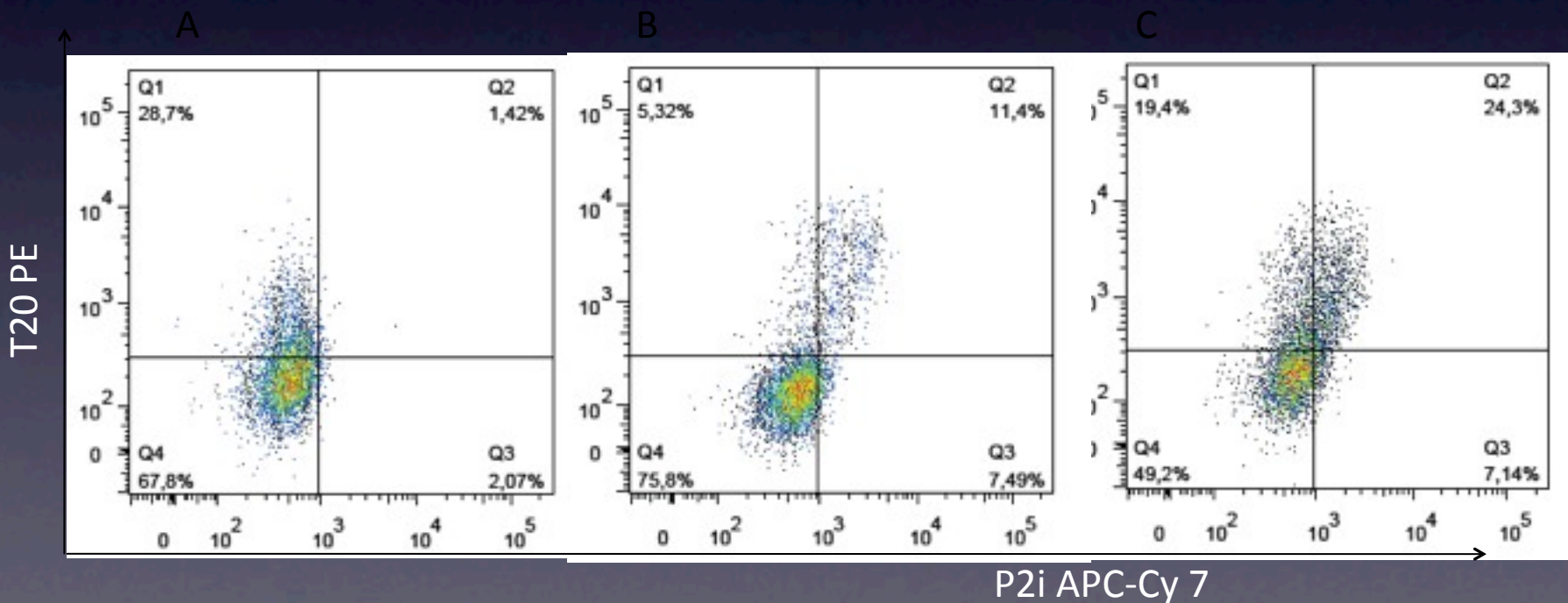
Ciblage transcriptionnel

- Expression spécifique chez la souris et chez l'homme



Les vecteurs

- vecteur bicistronique exprimant analogue de gp41 (T20) et un agoniste de CCL5 (P2i)

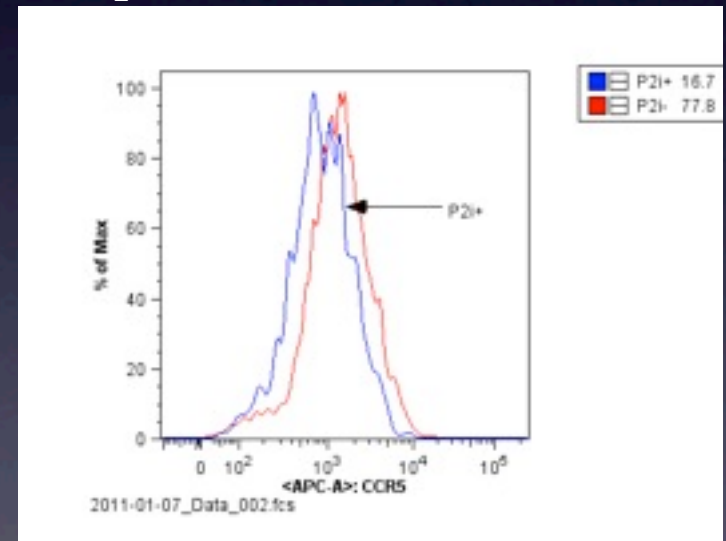


Résultats préliminaires

[p24] evolution after HIV BAL infection in vitro



Down modulation de CCR5 après infection lenti-P2i



Projet TG VIH

- Transduction CD34+ humaines
- Reconstitution T CD4 «résistants»
- Infection virus R5
- Mesure CV, délétion CD4 et avantage sélectif
- Analyse de la diversité virale

Remerciements

- Dr B. Rocha
- Pr D.N. Posnett
- Pr D. Klatzmann

Remerciements

- Dr B. Rocha
- Pr D.N. Posnett
- Pr D. Klatzmann

Tous les collaborateurs et collègues

Remerciements

- Dr B. Rocha
- Pr D.N. Posnett
- Pr D. Klatzmann

Tous les collaborateurs et collègues

- J. Goldstein, doctorant
- L. Mercey, AI
- N. Petit, doctorant

Remerciements

- Dr B. Rocha
- Pr D.N. Posnett
- Pr D. Klatzmann

Tous les collaborateurs et collègues

- J. Goldstein, doctorant
- L. Mercey, AI
- N. Petit, doctorant

- Financements

