

Compte rendu final du projet financé par l'Allocation de Recherche SFD-Roche Diagnostics 2015 : la protection de la cellule bêta vis-à-vis de sa destruction auto-immune chez les patients diabétiques de type 1.

R. Mallone, PI et R. Scharfmann, co-PI

Contexte

Le diabète de type 1 (DT1) est dû à la destruction des cellules β pancréatiques par des lymphocytes T auto-immuns. Toutefois, les mécanismes de cette destruction restent peu connus chez l'Homme. Nous avons donc proposé de :

- 1) développer un essai *in vitro* qui récapitule l'interaction entre les cellules β et les lymphocytes T CD8+ destructeurs qui a lieu lors du DT1 ;
- 2) utiliser cet essai pour disséquer les mécanismes modulant la destruction des cellules β humaines.

Résultats principaux

La première partie de ces travaux est en cours de révision pour *Science Immunology*. Cet article montre que, contrairement à la vision courante, des lymphocytes T CD8+ auto-immuns sont présents dans la circulation de tous les individus, qu'ils soient DT1 ou sains. De plus, ils montrent un phénotype dit 'naïf', indiquant qu'ils ne sont pas activement engagés dans le processus auto-immun. Au contraire, ces lymphocytes auto-immuns se retrouvent enrichis dans le pancréas de sujets DT1 par rapport aux contrôles, montrant que le répertoire T qui prend effectivement part à la destruction des cellules bêta est plutôt séquestré dans le tissu cible.

Ces premiers résultats ont donné un nouvel élan à la suite de nos investigations. En effet, une des questions qui en découle est : quel est donc la différence entre les sujets DT1 et sains si tous les deux présentent des lymphocytes T auto-immuns ? Une des possibilités est que cette différence puisse être dans la vulnérabilité de la cellule β à ces lymphocytes auto-immuns présents chez tous les individus.

Nous avons donc développé un essai *in vitro* en mettant en contact des lignées β immortalisées avec des clones de lymphocytes T CD8+ reconnaissant l'antigène cible ZnT8. La destruction des cellules β peut ainsi être suivie en temps réel grâce à un système XCelligence (Fig. 1).

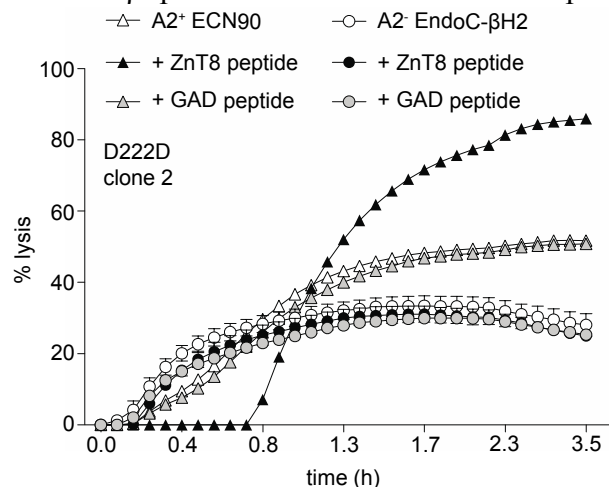


Fig. 1. La lignée β ECN90 exprimant la molécule de présentation de l'antigène HLA-A2 utilisée par le clone anti-ZnT8 D222D est détruite rapidement par ce dernier en absence de peptide ZnT8 exogène (triangles blancs et gris), et encore plus lors que la lignée β est pulsée avec le peptide ZnT8 (triangles noirs). Cette destruction est moins efficace lorsque le même clone est mis en contact avec une lignée β de contrôle EndoC- β H2 qui n'exprime pas la molécule de présentation de l'antigène HLA-A2 (cercles).

Des nouveaux clones T reconnaissant par exemple les antigènes preproinsulin et GAD ont également été obtenus et sont en cours de validation. Ce système nous a permis d'explorer la réaction des lignées β au contact avec les lymphocytes T CD8⁺ tueurs en termes d'expression de molécules inhibitrices.

Nous avons analysé l'expression de plusieurs récepteurs co-inhibiteurs (TIM3, LAG3, TIGIT et PD-1) dans les clones de lymphocytes T CD8⁺ et de leurs ligands (Galectin 9, LSECtin, PVR et PD-L1) dans les lignées β , et nous avons retenu le récepteur PD-1 et son ligand PD-L1, dont l'expression peut être modulée par l'interféron (IFN)- γ dans les cellules β .

Au cours de l'interaction entre les cellules β et les lymphocytes T CD8⁺, nous avons observé une augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface des cellules β dès 8h de co-culture, et une uprégulation de PD-1 à la surface des clones T à 24h, dépendante de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ mais indépendante d'une stimulation préalable des cellules β par IFN- γ (Fig. 2).

Nous allons par la suite étudier le rôle de ces deux molécules inhibitrices dans l'interaction entre les lignées β et les lymphocytes T CD8⁺ en modulant leur cinétique d'expression ou en bloquant leur interaction.

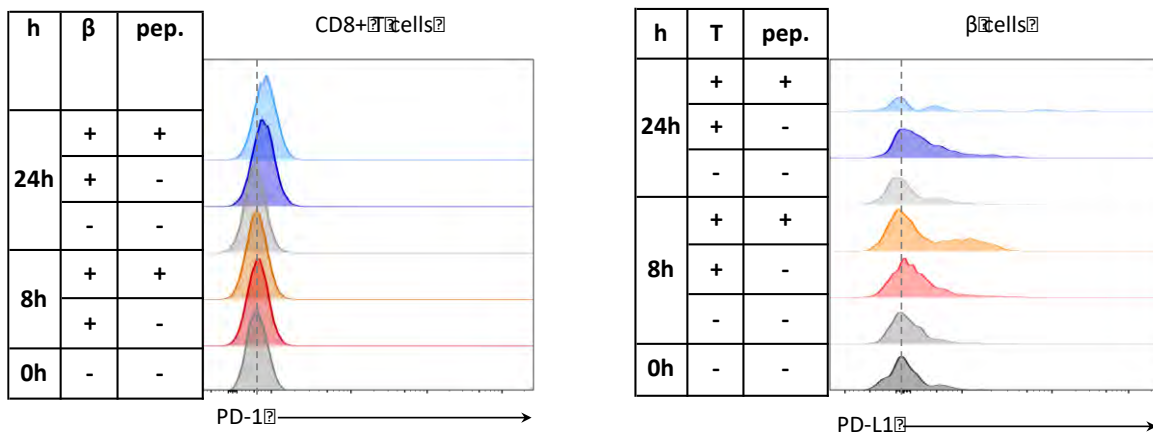


Fig. 2. Analyse de l'expression de PD-1 et PD-L1 à la surface des clones de lymphocytes T CD8⁺ (clone D222D anti-ZnT8) et de la lignée β pulsée ou non avec le peptide ZnT8, avant et après co-culture (8h et 24h). On observe une augmentation d'expression de PD-L1 à 8h sur les cellules β lors qu'elles sont pulsées avec le peptide ZnT8 (profil orange à droite), et une hausse d'expression plus tardive du ligand PD-1 sur les lymphocytes T à 24h (profil bleu claire à gauche). Cela témoigne d'un "dialogue" entre les cellules β et les lymphocytes T et pourrait représenter un mécanisme de défense vis-à-vis de l'agression auto-immune. Ce mécanisme est toutefois inefficace car les cellules β sont efficacement détruites par le clone T en l'espace de quelques heures.

Publications

*S. Culina, A.I. Lalanne, G. Afonso, K. Cerosaletti, S. Pinto, G. Sebastiani, K. Kuranda, L. Nigi, A. Eugster, T. Østerbye, A. Maugein, J.E. McLaren, K. Ladell, E. Larger, J.P. Beressi, A. Lissina, V. Appay, H.W. Davidson, S. Buus, D.A. Price, M. Kuhn, E. Bonifacio, M. Battaglia, S.

Caillat-Zucman, F. Dotta, R. Scharfmann, B. Kyewski, R. Mallone and the ImMaDiab Study Group.

Frequencies of pancreas-infiltrating but not circulating islet-reactive CD8+ T cells distinguish type 1 diabetic from healthy subjects. **Sci Immunol**, under revision.

Présentations (sélection)

*Lilly “Take Control Peaks and Valleys” meeting (Zurich, 2017)

*12th Xiangya International Diabetes and Immunology Forum (Changsha, 2017)

* SFD, Congrès 2017 Plenary Lecture (Lille, 2017)

*Catholic University of Leuven, Prof. C. Mathieu (Leuven, 2017)

*Novartis Institute for Biomedical Research, Dr. M.A. Schneider (Basel, 2016)

*Université Libre de Bruxelles, Center for Diabetes Research, Prof. D.L. Eizirik (Brussels, 2016)

*FOCIS, Federation of Clinical Immunology Societies (Boston, 2016)

*International Congress of Immunology (Melbourne, 2016)

*Danish Immunology Society and the Danish Diabetes Society (Copenhagen, 2016)

*SFD, Prix Auguste Loubatières (Lyon, 2016)