MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE SARCOÏDOSE

19 janvier 2018 (Odéon)

Valérie BESNARD
EA 2363 « HYPOXIE ET POUMON », Université Paris 13

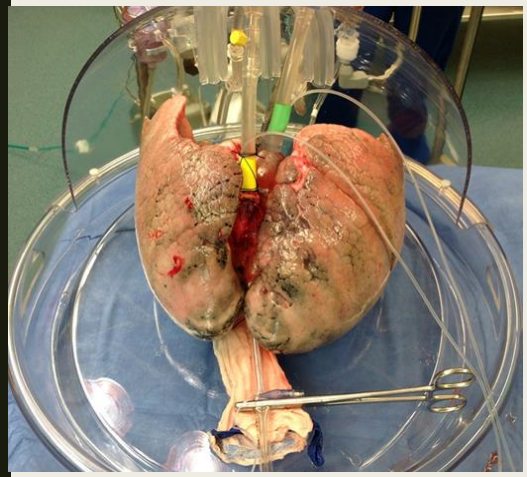
Modèles expérimentaux

modèles chez lesquels les scientifiques reproduisent expérimentalement une maladie (chirurgie, agent infectieux, animal transgénique).

➢≠ des modèles spontanés, orphelins.

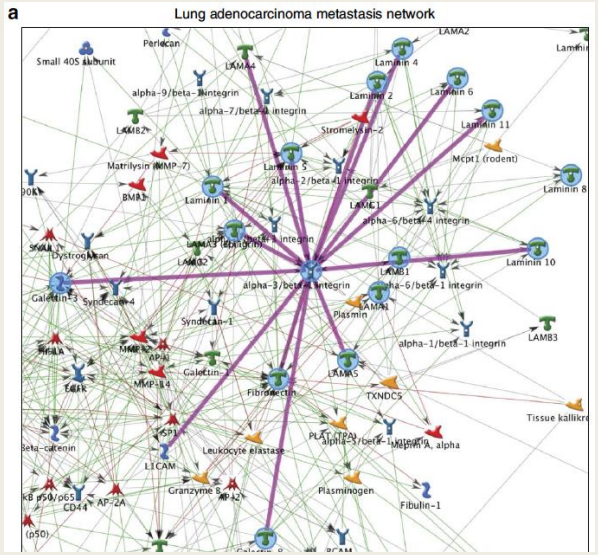
***In vivo*:**
organisme vivant

***In vitro*:** cellules cultivées en dehors de l'organisme



***Ex vivo*:** tissus cultivés en dehors d'un organisme vivant, en reproduisant au maximum les conditions naturelles.

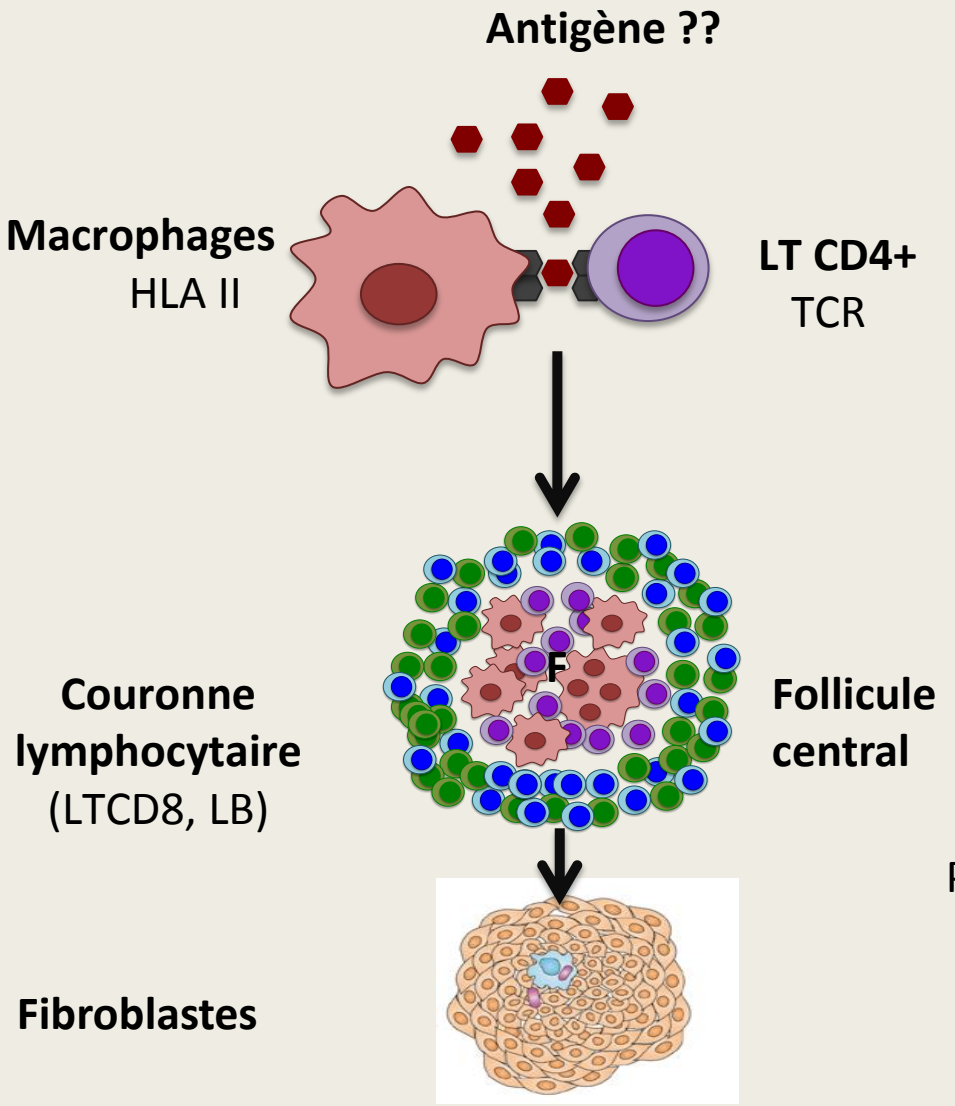
Reconditionnement ex vivo de greffons
Nathan et al. Chest 2015



***In silico*:** modélisation mathématique grâce aux outils informatiques.

Flynn et al. Nature communication 2012

Equation à plusieurs inconnues nécessitant des modèles



Influence environnementale

+

Susceptibilité/terrain génétique

+

Réponse immunologique exagérée

↓

Granulome sarcoïdosique

Persistance → +/- → **FIBROSE**

Résolution

Objectifs des modèles de sarcoïdose

- Reproduire les caractéristiques **histologiques** et **immunologiques** du granulome.
- Modèles devant mimer la **variabilité** de la sarcoïdose (résolution *vs* persistance, granulome vs fibrose).
- Tester les agents **causaux**.
- Tester différents **traitements.**

Approche des modèles de sarcoïdose

Utilisation de modèles de granulomatose dont la cause est connue (tuberculose, Bérylliose)?

Modèles animaux spontanés de sarcoïdose?

Rares

- Chevaux (sarcoïdose)
- Rats exposés aux poussières de leurs environnement d'élevage (granulomes pulmonaires)

Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2013

Noritake et al. *Exp Anim* 2007

Approche des modèles de sarcoïdose

Utilisation de modèles de granulomatose dont la cause est connue (tuberculose, Bérylliose)?

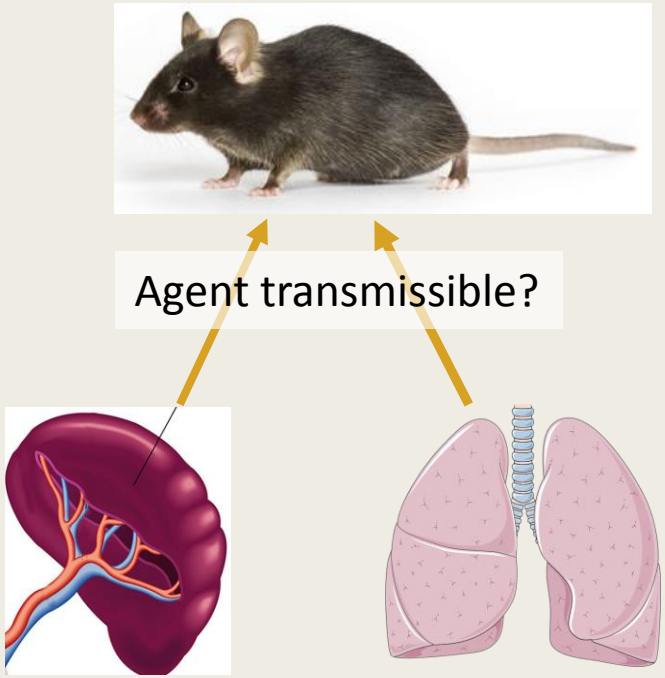
Modèles animaux spontanés de sarcoïdose?

Modèle lié à des agents transmissibles de patients avec sarcoïdose?

Résultats discordants

Premiers modèles

- 1969: 1er modèle avec Kveim reagent
  - Injection de tissus (rate) issus de patients atteints de sarcoïdose chez des rongeurs
  - Obtention de granulomes à 15 mois.
- Résultats discordants… Résultats similaires avec des homogénats de patients contrôles sains.
- Prélèvements respiratoires de patients atteints de sarcoïdose chez des souris et lapins. Uniquement concluant chez le lapin en IT et matériel non désinfecté.



Mitchell et al. *Lancet* 1969, 1976
Belcher et al. *Arch Pathol* 1975
Ikonomopoulos *In Vivo* 2000 & 2006

Approche des modèles de sarcoïdose

Utilisation de modèles de granulomatose dont la cause est connue (tuberculose, Bérylliose)?

Modèles animaux spontanés de sarcoïdose?

Modèle lié à des agents transmissibles de patients avec sarcoïdose?

Antigènes causaux suspectés dans la sarcoïdose

Modèles les plus développés

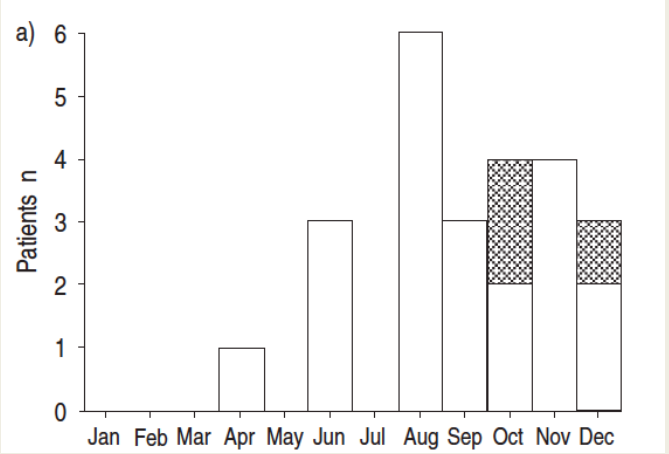
Modèles in vitro

Modèles in vivo

Agent transmissible / cause environnementale?

Dimension spatio-temporelle:

- pics saisonnier
- regroupement de cas dans des zones géographique limitées (Ile de Man)



Wilsher et al. ERJ 1998
Parkeset al. Thorax 1987

40% des cas de sarcoïdoses sont rentrés en contact avec un patient ayant une sarcoïdose contre 1% chez les contrôles)

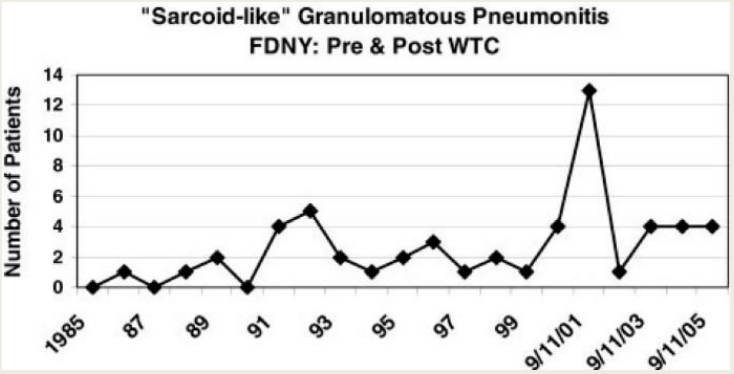
- Développement de sarcoïdose chez le receveur après transplantation d'organes issus de patients atteints de sarcoïdose.

Burke et al. Lancet 1990

Facteurs de risque: Exposition et emploi (moisissure, insecticides, agriculteur)

Newman et al ACCESS Am J Respir Crit Care Med. 2004

Incidence augmentée après les attaques du 11 septembre 2001 du WTC (Nanoparticules).

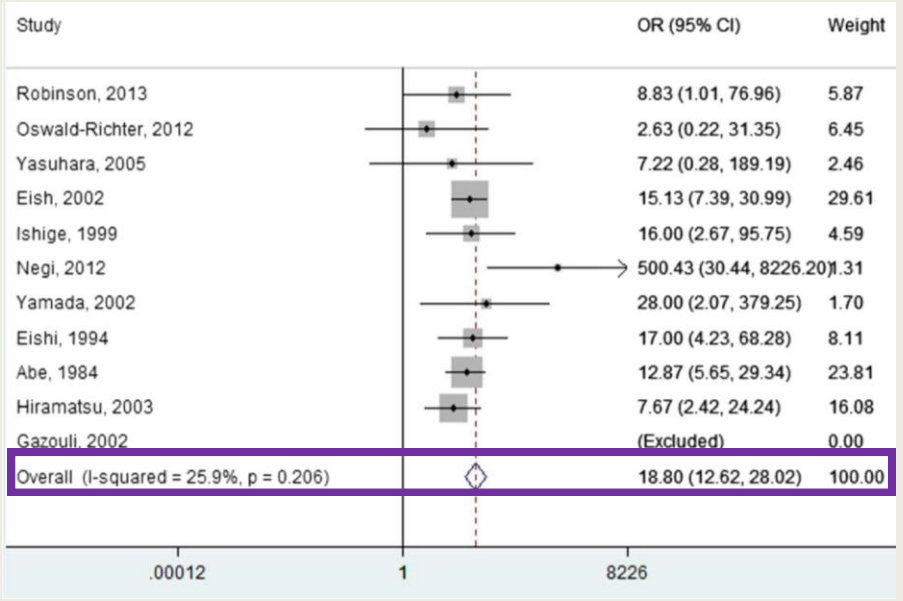


Izbicki G, 2007, Chest

Cause infectieuse?

Méta-analyse:

- 6000 patients 1980-2015
- Sarcoïdose *vs* contrôles (poumon, gg°, peau)
- Présence de pathogènes (PCR spécifique, ARN16S, IHC +/- culture)



Esteves et al. *BMC Pulmonary Medicine* (2016)

Présence de pathogènes dans les tissus

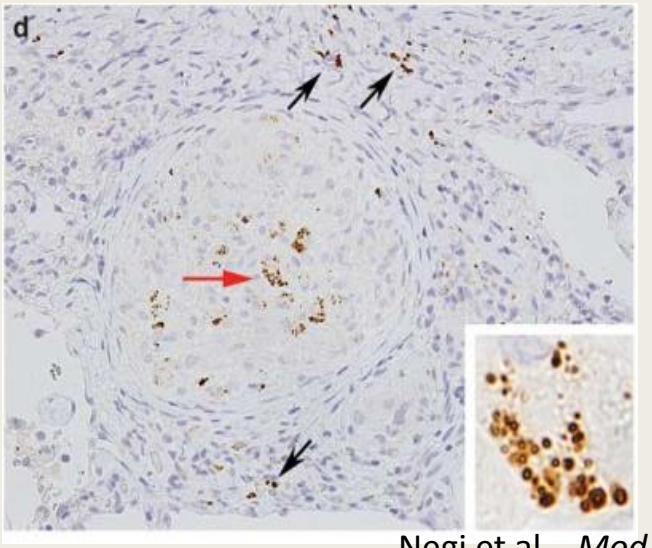
- ***Propionibacterium acnes***

OR 18,8 (12,6 ; 28)

- **Mycobactéries**

OR 6,80 (3,73 ; 12,40)

-> Peptides mSOD-A, mkatG, ESAT-6



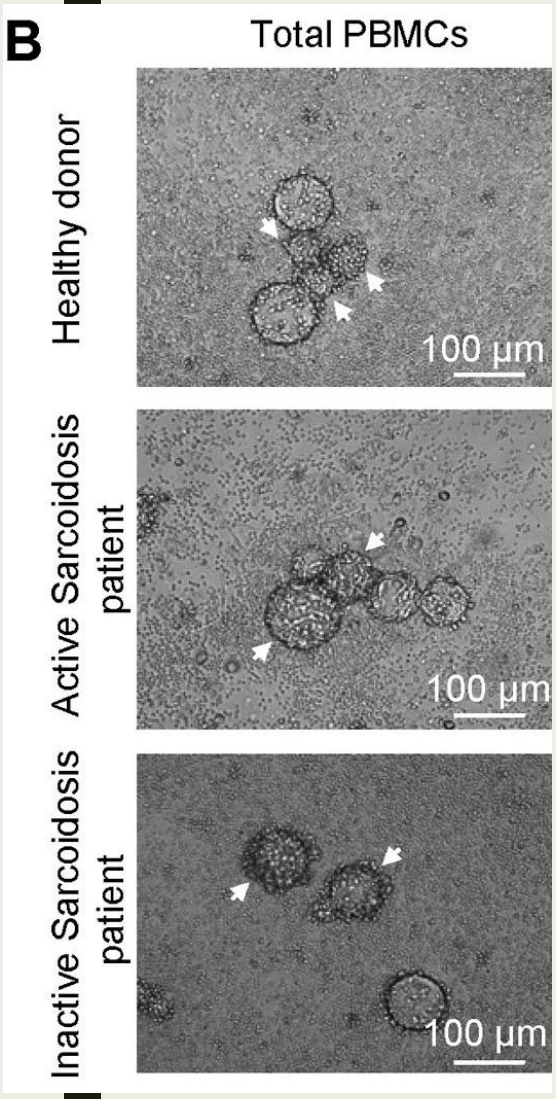
IHC
P. acnes

Negi et al. , *Mod. Path (*2012)

Réponse immune spécifique à ces antigènes et production d'Ac sériques

Chen *Semin respir crit care* Med 2014

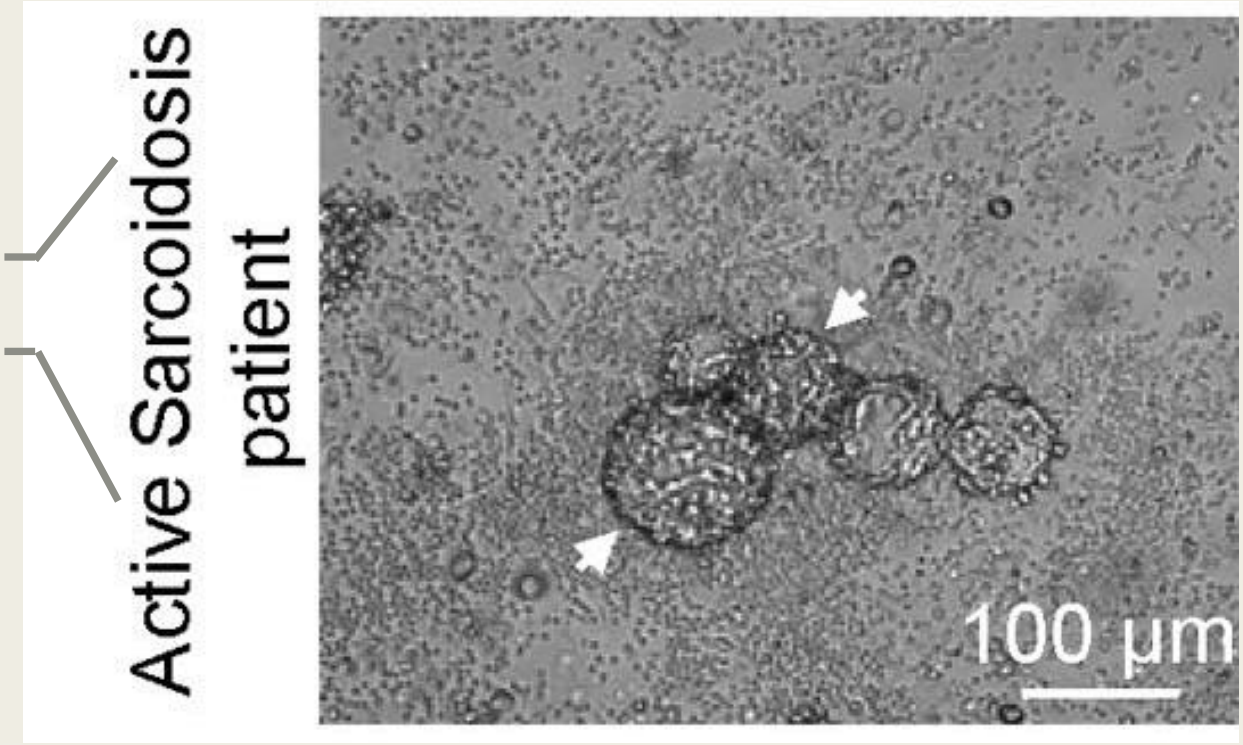
Modèles *in vitro* de granulomes issus de PBMCs de patients avec sarcoïdose



Billes de sépharose couplées au BCG + PBMC

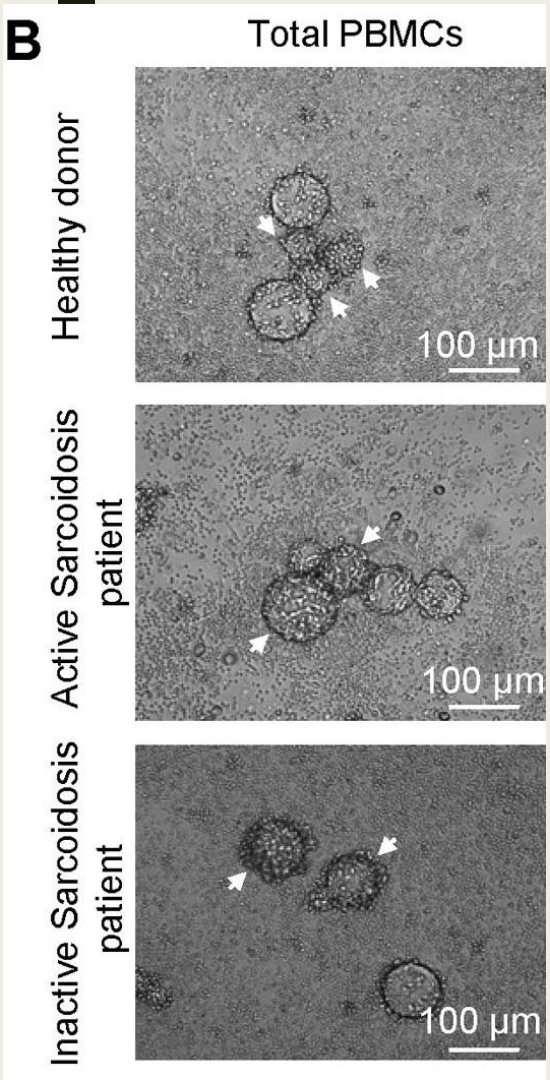
- Patients atteints de sarcoïdose +/- active
- Patients témoins

Granulome = bille recouverte de cellules



Taflin et al. Am J Pathol 2009

Modèles *in vitro* de granulomes issus de PBMCs de patients avec sarcoïdose

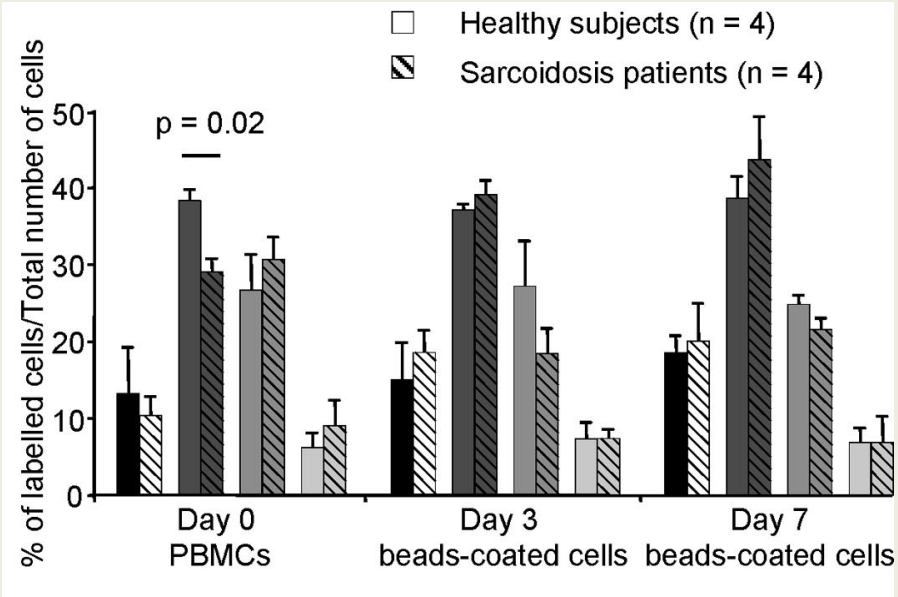


Billes de sépharose couplées au BCG + PBMCs

- Patients atteints de sarcoïdose +/- active
- Patients témoins

Granulome = bille recouverte de cellules

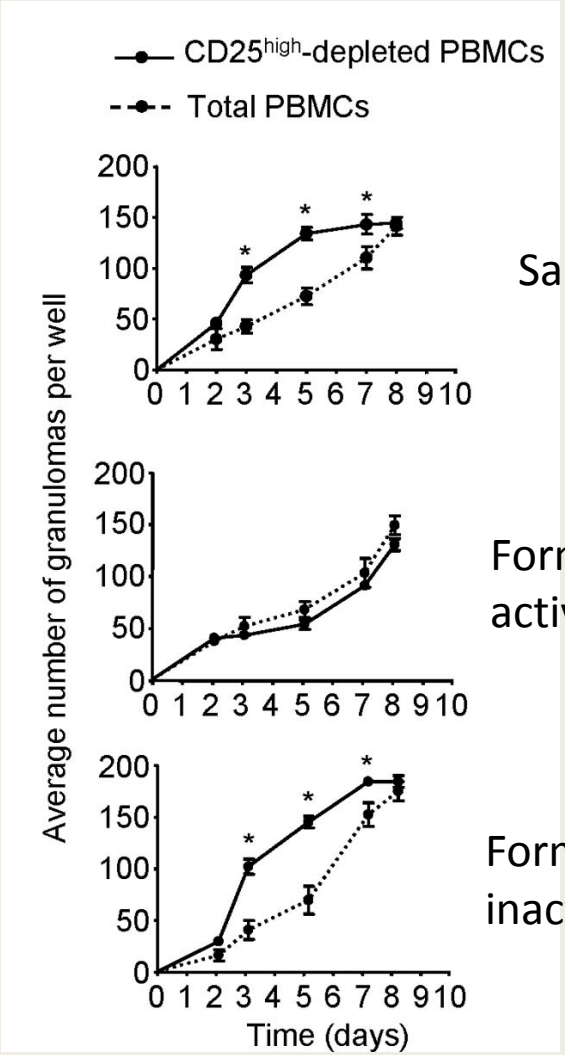
➔Cytométrie mettant en évidence une population cellulaire comparable à celle des granulomes



Taflin et al. Am J Pathol 2009

Modèles *in vitro* de granulomes issus de PBMCs de patients avec sarcoïdose

- Etude de l'effet d'une suppression d'une population cellulaire sur la formation des granulomes : Lymphocytes T régulateurs $CD25^{high}$
- Les Treg chez les sujets sains et dans les formes inactives diminuent la formation initiale des granulomes
- Perte de cette fonction dans formes actives

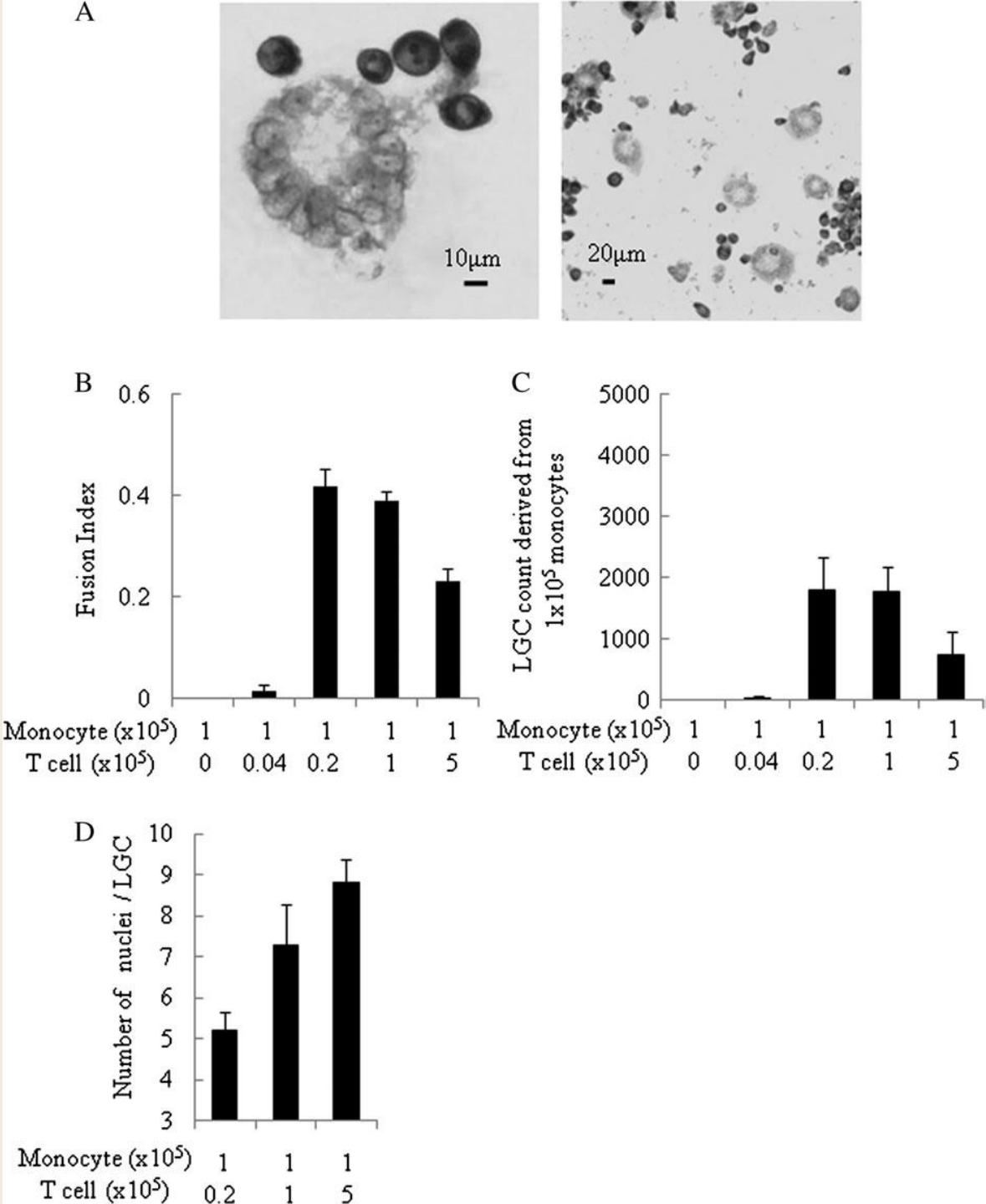


Taflin et al. AJP 2009

Modèles *in vitro*

- Modèles plus simples étudiant les cellules géantes multinucléées
- stimulus issus de coculture avec Ly.

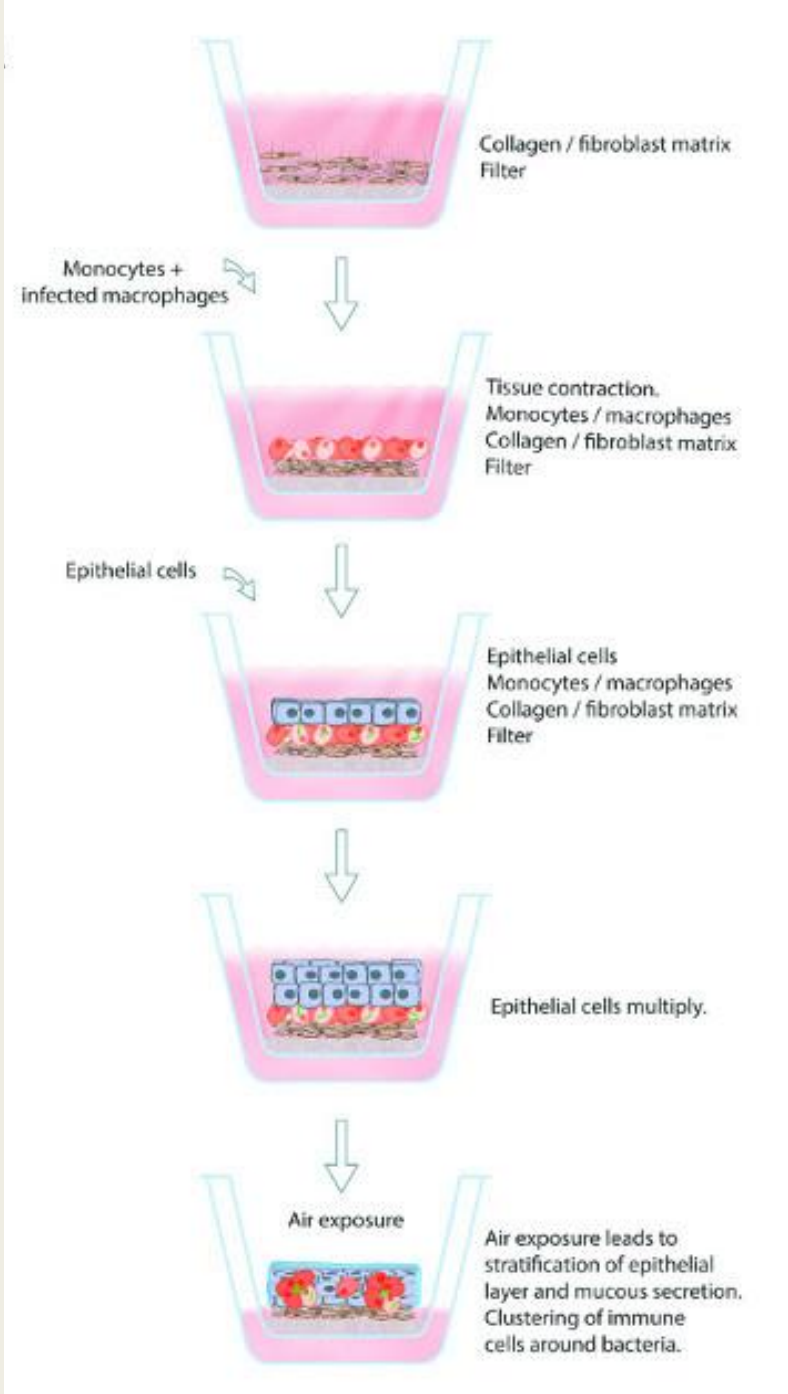
Sakai et al.
I*nternational Immunology*, 2011



Limites des modèles *in vitro*

- Dans le cas de la tuberculose plusieurs études *in vitro* ont permis d'étudier le sécrétome/exosome/panel de gène exprimés lors de la formation du granulome.
- Peu d'études *in vitro* de modèle de granulome sarcoïdose et notamment avec l'utilisation d'antigène suspects.
- Modèles *in vitro* plus rapides, moins couteux, spécifiques de composants cellulaires.
- Limite: absence d'environnement.
- Nécessité de développer des modèles 3D de granulome.

Développement de modèle 3D de granulome.



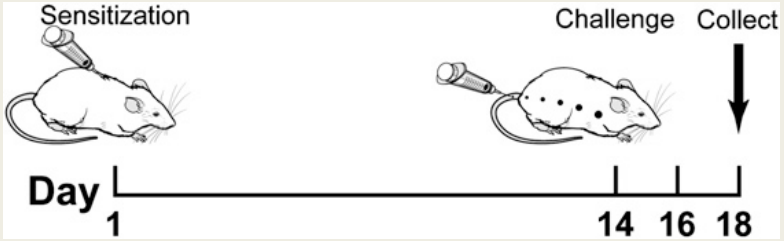
Modèle composé de:

- cellules épithéliales pulmonaires humaines
- macrophages primaires infectés par M. tuberculosis
- monocytes ensemencés sur des fibroblastes

⇨ Etude de l'infection à M. tuberculosis dans un environnement qui ressemble étroitement à un poumon humain.

Braian J Vis Exp. 2015

Modèles infectieux
Peptide de *M. tuberculosis* (SodA)



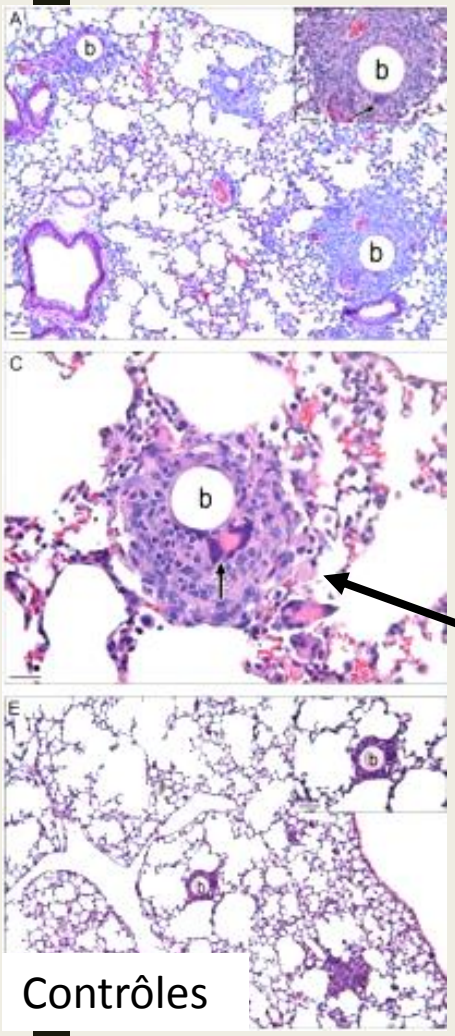
Protocole:

Peptide **mSodA** (superoxyde dismutase)

Utilisation de IFA pour la sensibilisation

20 µg/souris

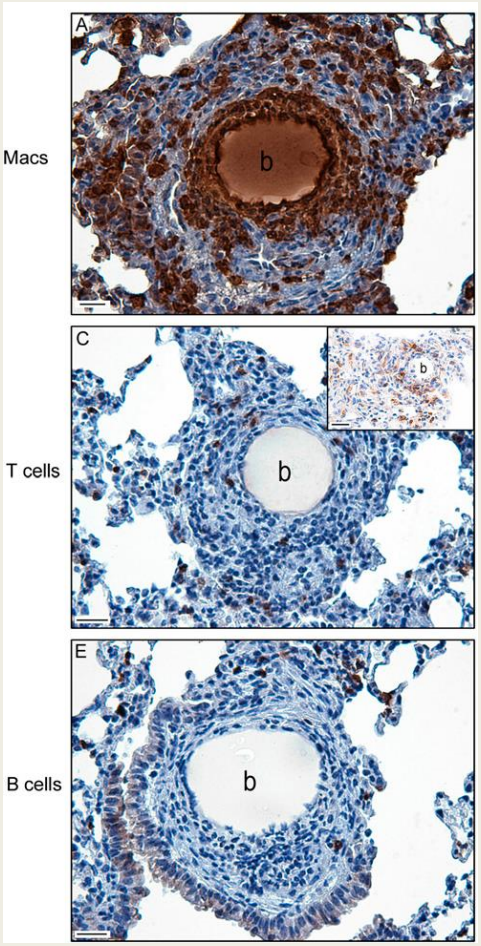
1ère injection SC puis injection IV billes + mSodA à 2 semaines



Contrôles

Granulome sans nécrose

LBA ↗ IL-2 et IFNg (profil Th1)



Swaisgood C, 2010, AJRCMB

Peptide de *M. tuberculosis* mKatG

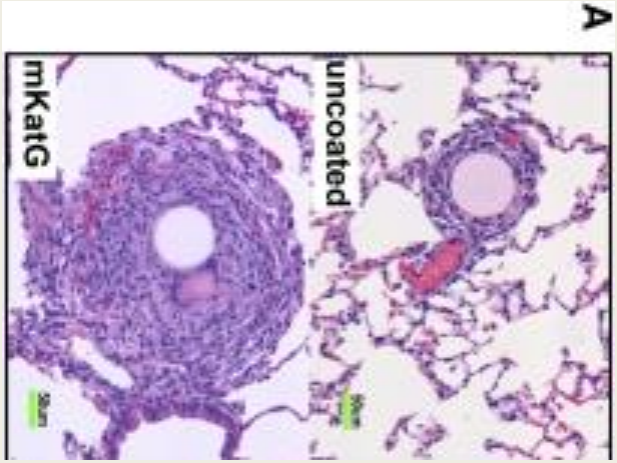
Protocole:

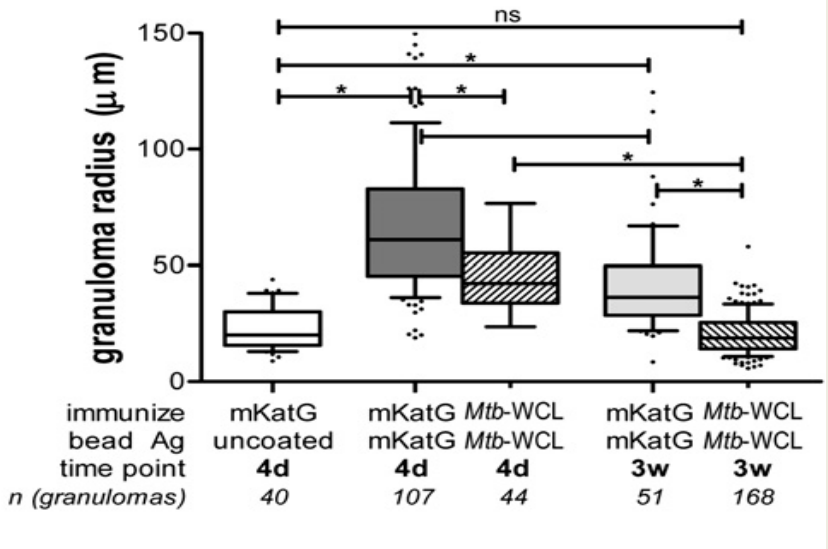
Peptide **mKatG** (catalase-peroxidase)

Utilisation de IFA

10 µg/souris et Rats

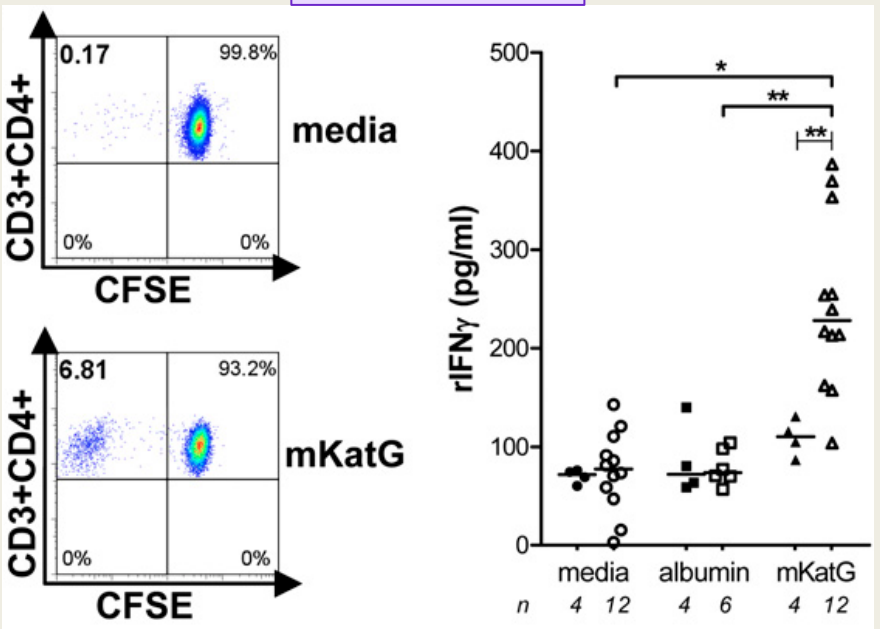
1ère injection IP puis injection de billes couplées à mKatG à J14 (IT ou IV)





Involution des granulomes pulmonaires à 3 semaines

Réponse Th1

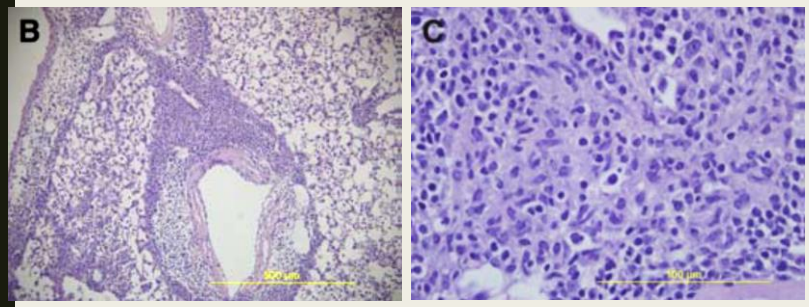


Chen E, 2009, AJRCCM

Modèles infectieux *Propionibacterium acnes*
Variabilité des voies d'administrations

Protocole:

P acnes inactivé par la chaleur
Pas d'utilisation de CFA
500 µg/souris (Balbc et C57BL/6)
1ère injection IP puis injection (it) à J15



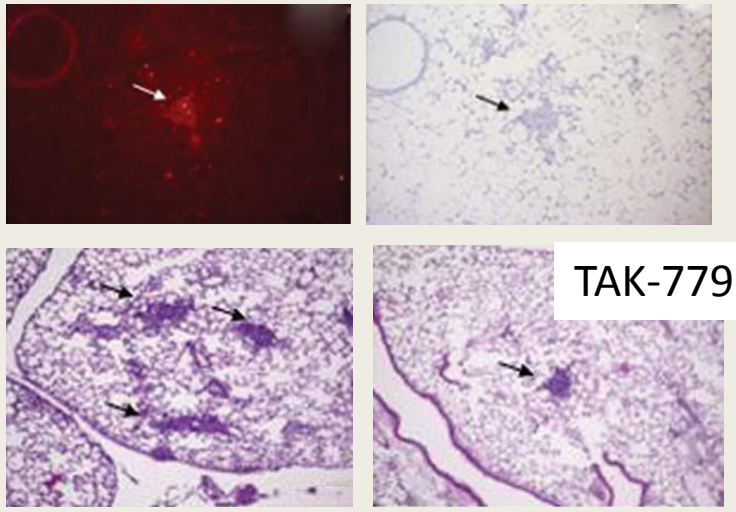
- Prolifération lymphocytaire + macrophagique J5
- Profil Th1
- Augmentation d'ARNm des TLR

Granulomes uniquement chez C57BL/6

McCaskill J *et al. AJRCMB* 2006

Protocole

Immunisation en SC J1-J15 (+IFA) puis challenge IV à J30
-> Granulome hépatique
Adjonction de C. Dendritiques matures J30
-> Granulomes pulmonaires

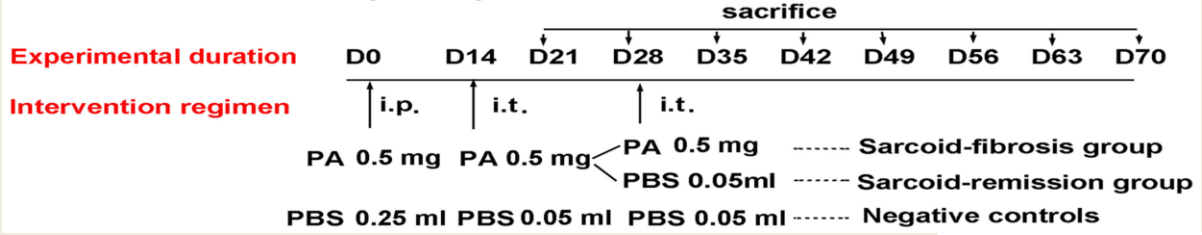


TAK-779

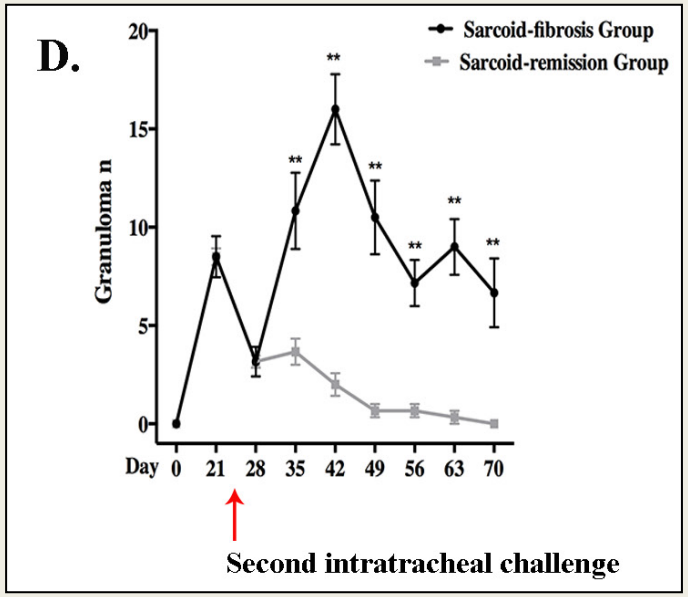
TAK-779 inhibiteur de CXCR3 et CCR5
↘ Recrutement Th1 (mais aussi les CD…)

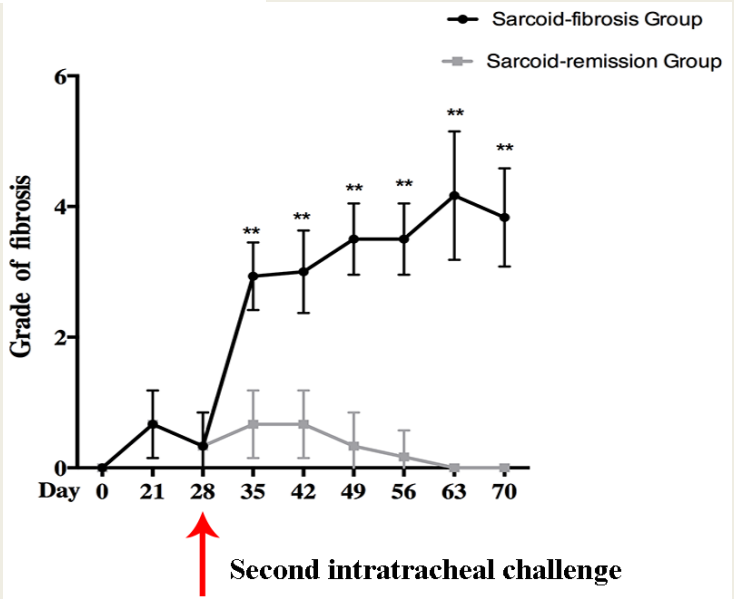
Kishi et al ERJ 2011

Modèles *P. acnes* et fibrose



Jiang *et al. Oncotarget* 2016



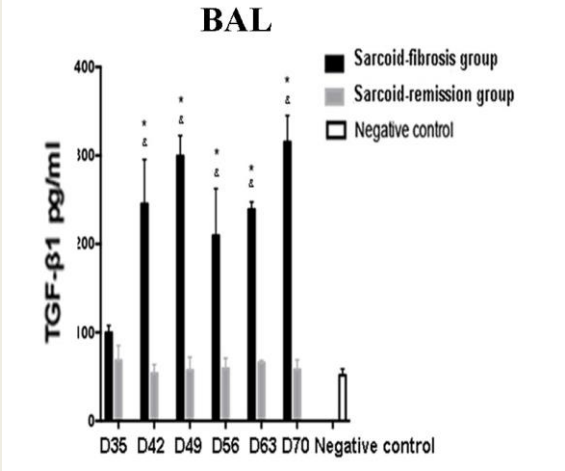


2x IT

↗ Granulomes

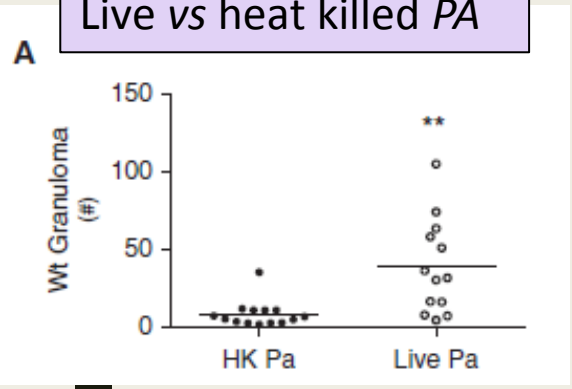
Fibrose pulmonaire

Cytokines profibrosantes



Modèle infectieux *P. acnes*

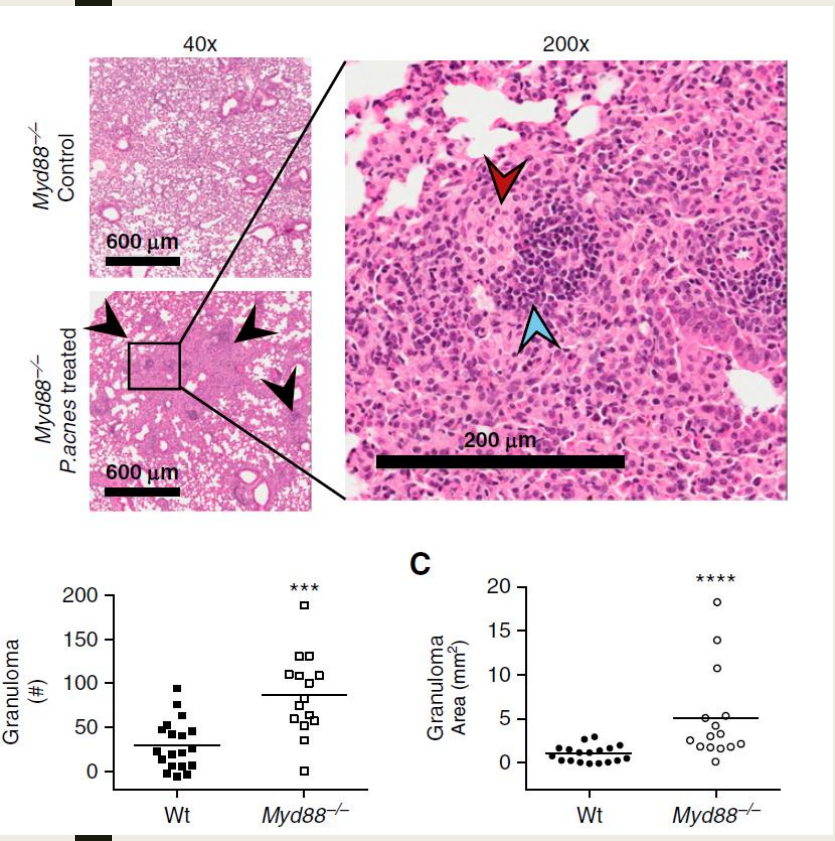
Live *vs* heat killed *PA*

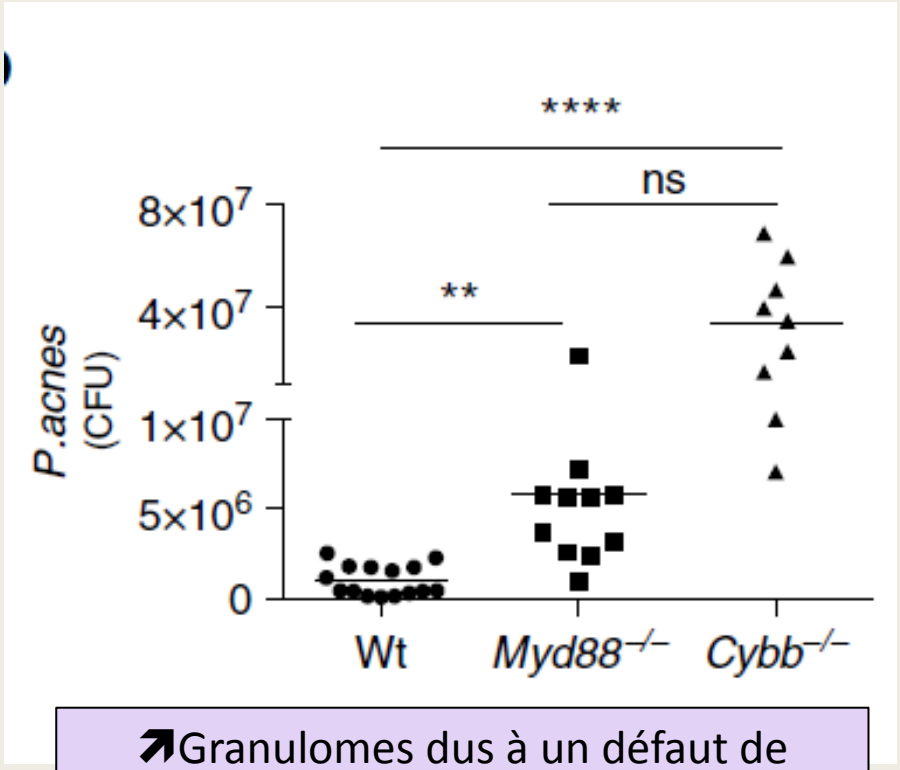


Modèles de Souris transgéniques

Myd88$^{-/-}$ (immunité innée recrutement des PNN)

Cybb$^{-/-}$ (production de ROS dans le phagosome)





↗Granulomes dus à un défaut de clairance de *P. acnes*

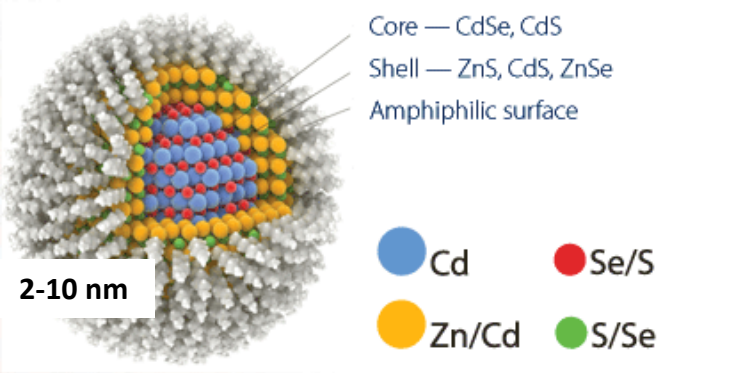
Werner *et al. AJRCMB* 2017

Nanoparticules

- **Nanoparticules de carbones**: produits de la combustion (e.g., diesel, methane, propane). Possible imputabilté dans de nombreuses pathologies et notamment dans la sarcoïdose (WTC, Izbicki G, 2007, Chest).

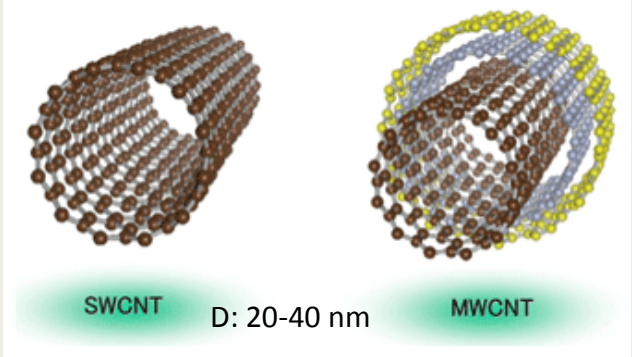
- **Nanoparticules synthétiques:** application dans de nombreux domaines (industrie, textile, armement, santé, informatique…).

Qdot® 705 ITK™ Carboxyl Quantum Dots



Crystal semi conducteur
émission de fluorescence
Surface amphiphile
⇨ transporteur de médicaments, gène vaccins, à des tissus spécifiques…

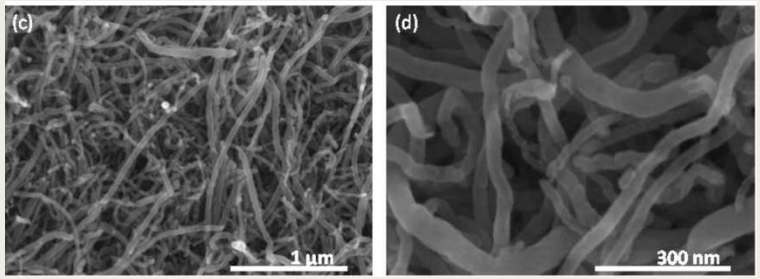
<u>Nanotubes de carbone</u>
mono ou multi feuillet



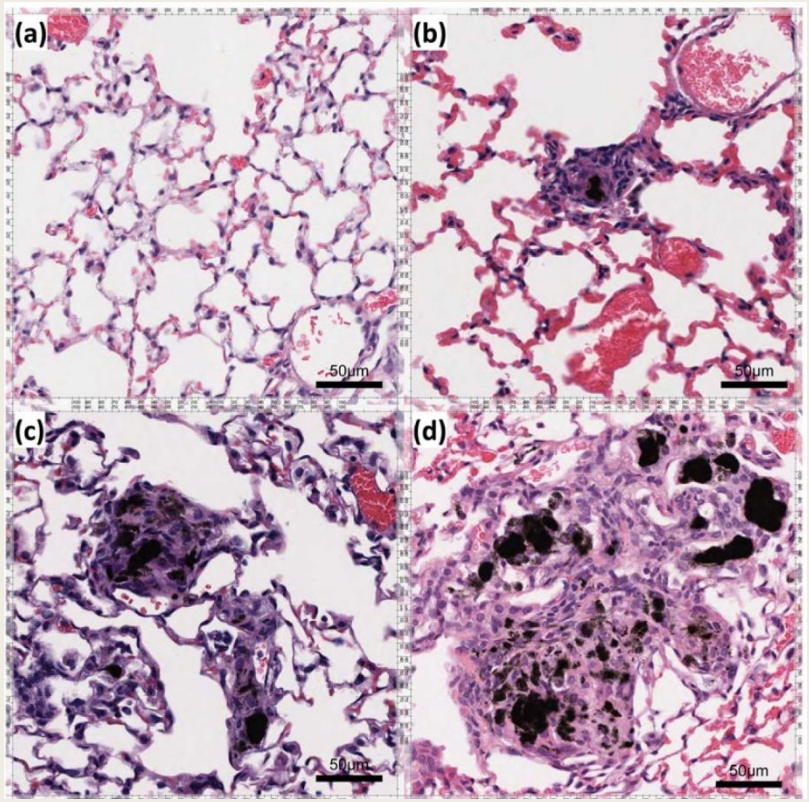
Rigidité très élevée et large déformabilité leur confèrent des propriétés d'absorption d'énergie surpassant celles des matériaux existants (vêtement, polyethylene, matériel militaire). Propriété de réservoir.

MWCNT

IT de MWCNT

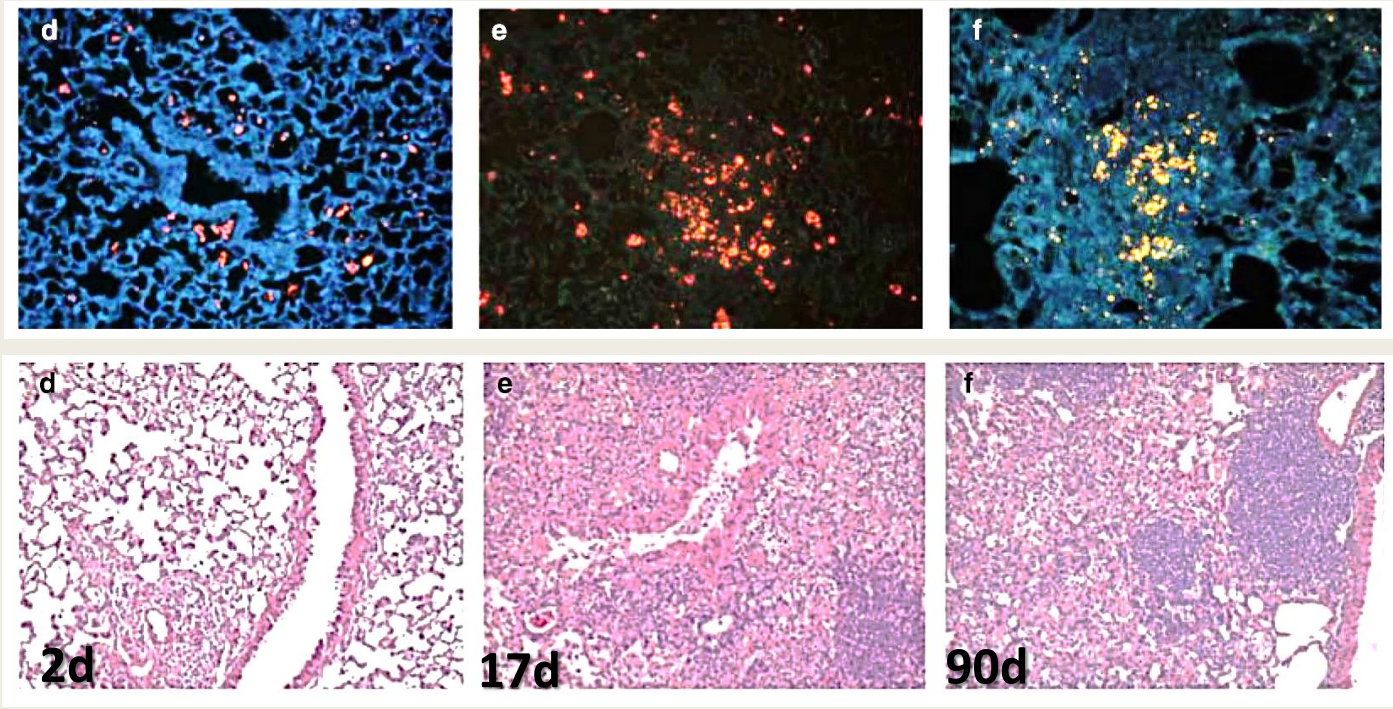


- Inflammation granulomateuse: macrophages et infiltration de lymphocytes T
- Similarité avec la chronicité des granulomes humains, avec la persistance jusqu'à 90 jours
- Elévation marquée dans les foyers granulomateux :
  OPN, MMPs, molécules d'adhésion



Huizar I et al. *Am J Respir Cell Mol Biol,* 2011

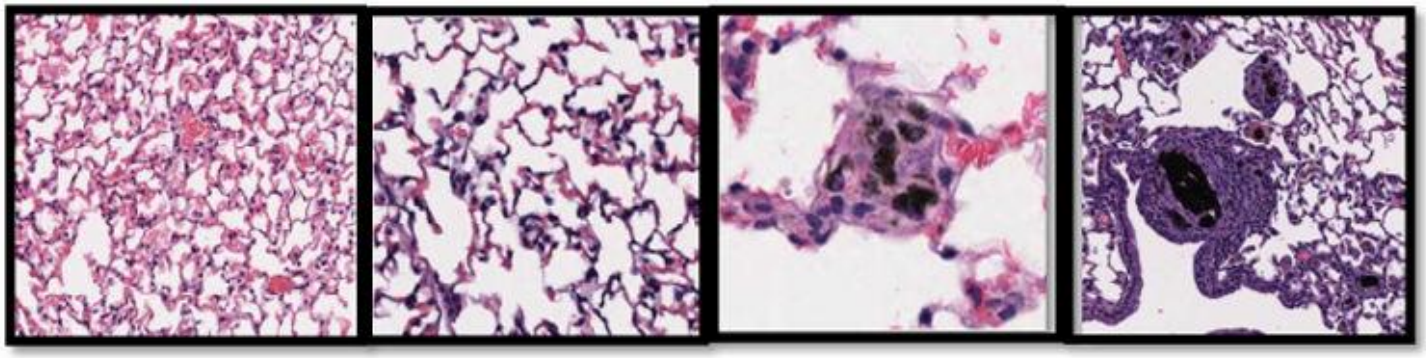
Qdot® 705 ITK™ Carboxyl Quantum Dots



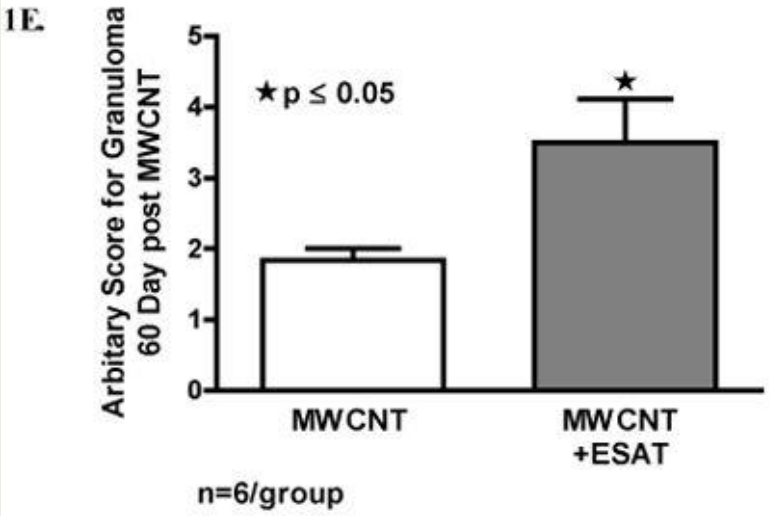
- Formation de granulomes dans les régions péribronchiolaires et interstitium
- Recrutement des macrophages et infiltration des lymphocytes T
- Persistance jusqu'à 90 jours
- Augmentation de l'expression de:
  - TNFa, IL6, Cxcl1 (cytokines pro-inflammatoires)
  - MMP12 (remodelage de la MEC)
  - CCL1, CCL17 et Cxcl13 (recrutement lymphocytes)

Ho C *et al. Nanotoxicology 2013*

Association de modèles: ESAT-6 et MWCNT



Protocole
IT MWCNT +/- ESAT-6
J60 sacrifice



↗ Granulomes
↗ Fibrose et des marqueurs de l'inflammation

Malur et al. *j nanomed Nanotec*hnol 2015

Approche des modèles de sarcoïdose

Utilisation de modèles de granulomatose dont la cause est connue (tuberculose, Bérylliose)?

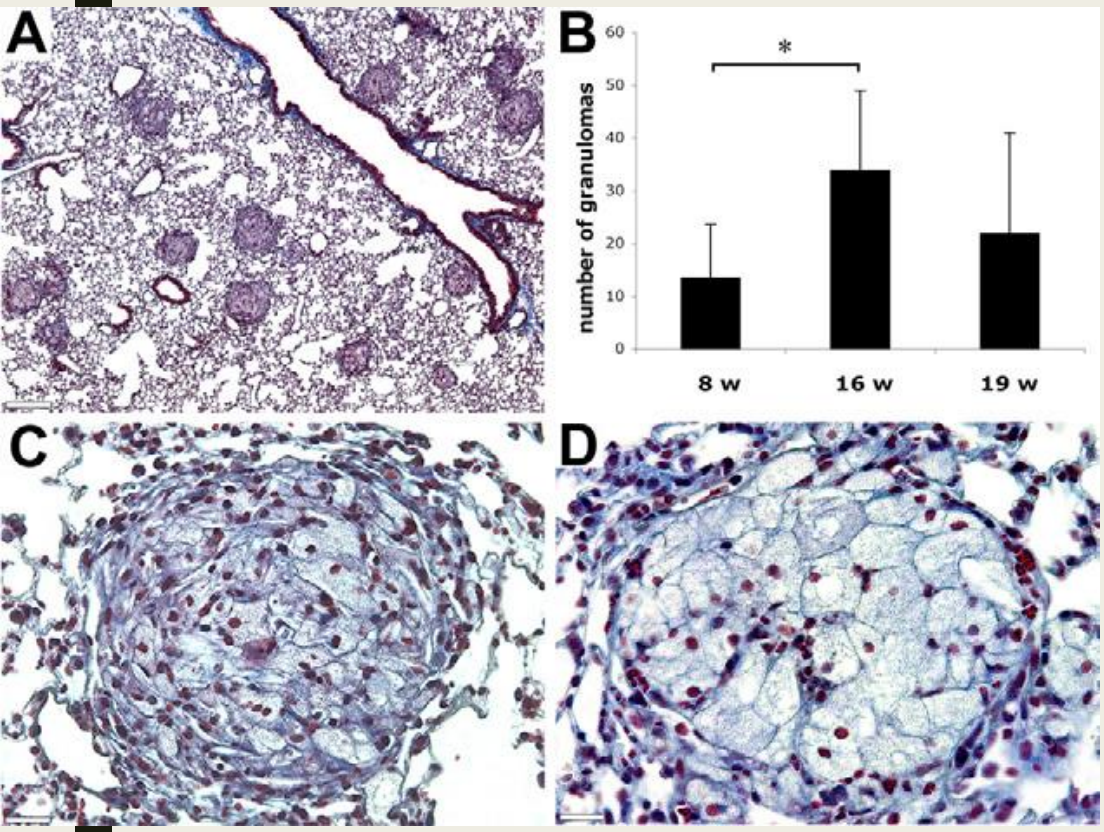
Modèles animaux spontanés de sarcoïdose?

Modèle lié à des agents transmissibles de patients avec sarcoïdose?

Antigènes causaux suspecté dans la sarcoïdose

Modèles génétiques?
Modèles mathématiques?

Modèle souris transgénique *ApoE*$^{-/-}$



- Régime riche en graisse + ac. Cholique
- 16 sem >40% souris
- Présence de cellules épithélioïdes (ACE, OPN, CTS)
- Atteinte extrathoracique sans véritable granulome
- Evolution progressive vers une fibrose pulmonaire
- Réversibilité de la formation des granulomes

➔ Modèle dont le rationnel pathogénique est mal compris (absence d'inflammation et d'agent causal)

Samokhin *et al. Am J Pathol* 2010

Modèle souris transgéniques *Tsc2*

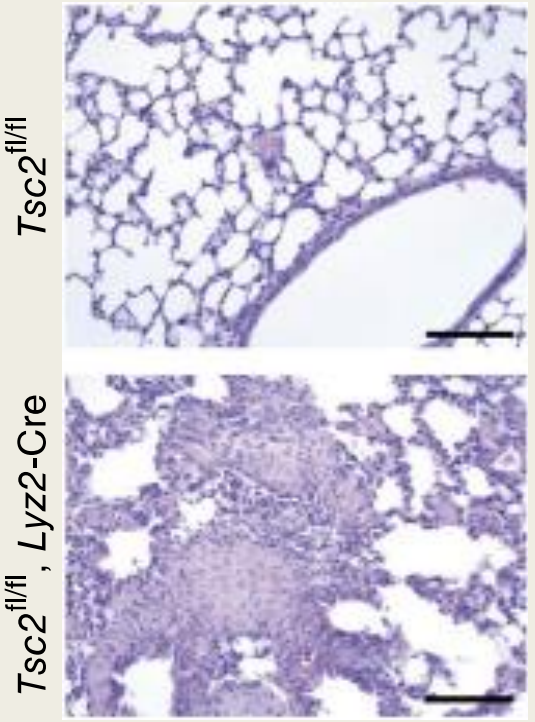
Tuberous sclerosis complex *Tsc2*
gène suppresseur de tumeur

- Régulation de la glycolyse, du métabolisme mitochondrial
- Régulation de la réponse inflammatoire des cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, cellules dendritiques).
- Polarisation des macrophages et production de cytokines

Délétion spécifique de Tsc2
dans les cellules myéloïdes

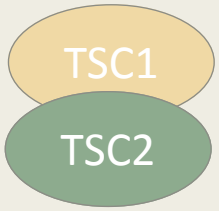
Macrophages
- ↘ Apoptose
- ↗ Prolifération

Formation de Granulomes
- Poumon
- Ganglions
- Peau



Linke et al. *Nature Immunology* 2017

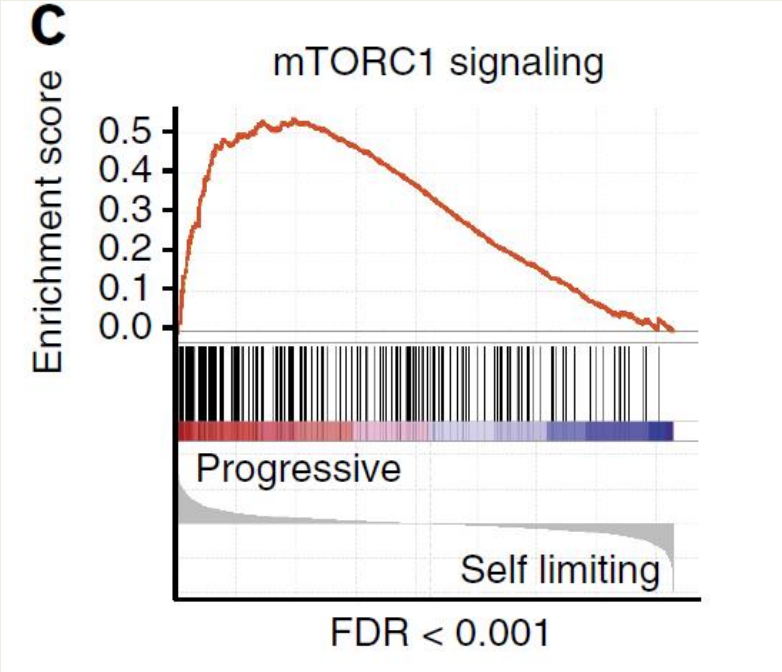
Modèle souris transgéniques *Tsc2*



Complexe mTORC1

→

Prolifération
Mobilité
Croissance cellulaire (SI innées)



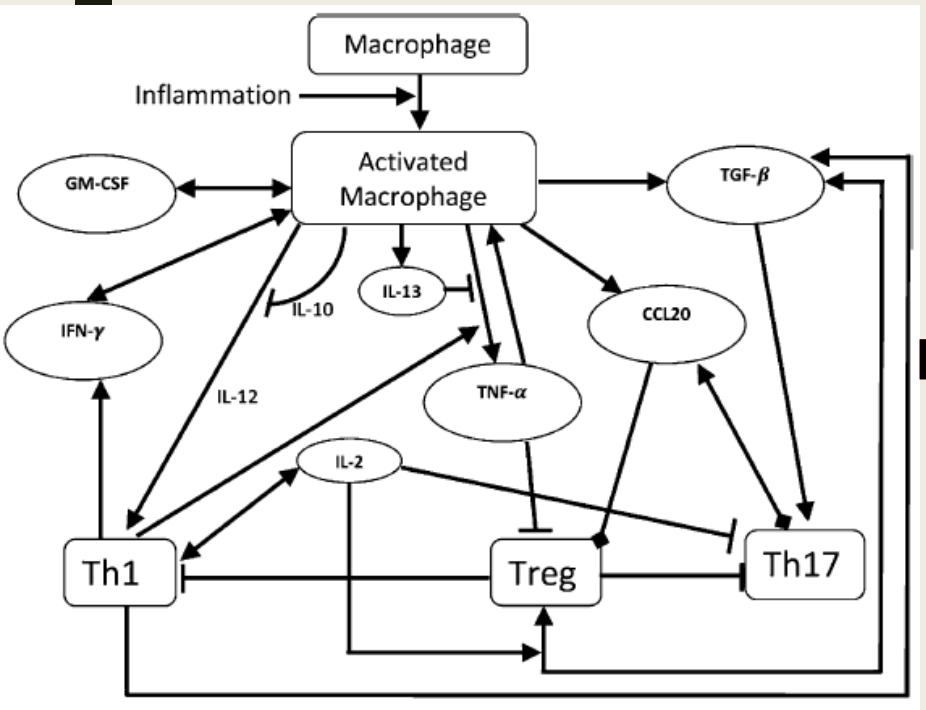
Chez l'homme:
enrichissement de la voie mTORC1 dans les formes de sarcoïdoses fibrosantes progressives *vs* formes limitées (n=15)

Linke et al. *Nature Immunology* 2017

Modèles *in silico*

Hao PNAS 2014

Exemple d'équation du macrophage alvéolaire



$$\frac{dM_A}{dt} - \underbrace{\nabla\cdot(\mathbf{u}M_A)}_{\text{transport}} - \underbrace{D_{M_A}\nabla^2 M_A}_{\text{dispersion}}$$

$$= \left(\underbrace{f}_{\text{inflammation}} + \underbrace{\lambda_{MI_\gamma}\frac{I_\gamma}{I_\gamma + K_{I_\gamma}}}_{\text{activation by IFN}-\gamma} + \underbrace{\lambda_{MG}\frac{G}{G+K_G}}_{\text{activation by GM}-\text{CSF}} \right.$$

$$\left. + \underbrace{\lambda_{MT_\alpha}\frac{T_\alpha}{T_\alpha + K_{T_\alpha}}}_{\text{activation by TNF}-\alpha} \right) M_0 - \underbrace{d_{M_A}M_A}_{\text{death}},$$

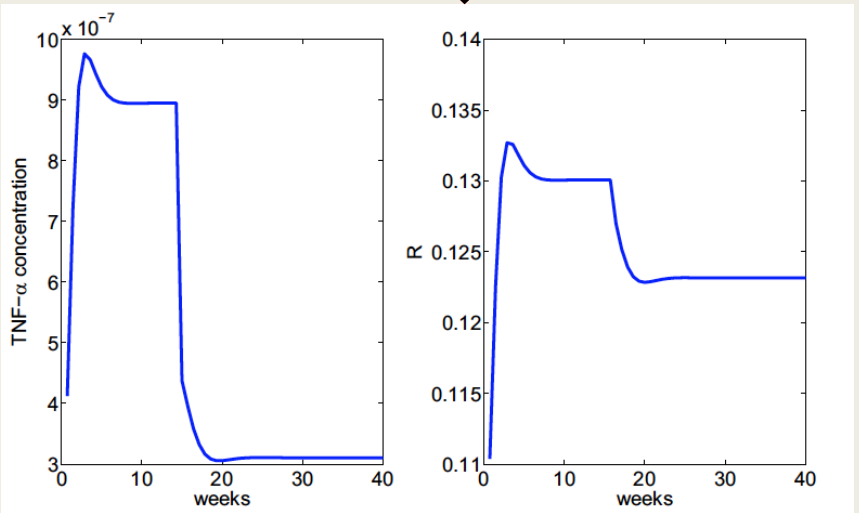


Fig. 4. The profile of the radius under anti–TNF-α treatment administered after week 15.

Simulation de l'effet d'un traitement par anti TNFa sur le rayon du granulome

Conclusion

- Emergence de nombreux modèles depuis 10 ans.
- Le modèle lié à ***P.acnes*** est le plus étudié et reproduit.
- Manque de modèles présentant une atteinte **systémique.**
- Pas de modèle parfait reprenant à lui seul le caractère de **variabilité** de la sarcoïdose.

Perspectives

- Coupler des modèles **génétiques** (sarcoïdose familiale) avec plusieurs modèles environnementaux
- Décortiquer les phases d'initiation et d'évolution du granulomes et développer des modèles courts et long et évoluant +/- vers une fibrose.
- Valider les modèles pour tester des **thérapies**.
- Avenir des modèles **mathématiques +++** pour assembler les différentes pièces du puzzle.