

TITRE DU PROJET :

Mécanismes impliqués dans l'effet immunomodulateur des antithymoglobulines à faibles doses dans un modèle de coculture *in vitro* de cellules endothéliales rénales-cellules mononuclées allogéniques et dans le cadre d'une étude clinique pilote chez des patients transplantés rénaux à faible risque immunologique

) Renseignements administratifs sur la direction de thèse (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : BAMOULID

Prénom : Jamal

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- Unité de recherche et équipe

INSERM UMR 1098 RIGHT,

Equipe TA-IT « Transplantation-Auto-immunité et immunothérapies »

8 rue Jean François Xavier Girod

25030 Besançon

- Directeur de thèse

Jamal BAMOULID (jbamoulid@chu-besancon.fr)

- Description du projet (2 pages maximum)

⇒ **Introduction et rationnel**

Les Anti-ThymoGlobulines (rATG) ont démontré leur supériorité comparée aux anti-récepteurs de l'IL-2 (anti-CD25mAb) chez les patients à haut risque immunologique pour prévenir ou traiter le rejet aigu en situation de transplantation d'organes solides (1,2). Les rATG sont un mélange d'immunoglobulines anti-lymphocytaires non spécifiques qui ciblent non seulement les sous-populations lymphocytaires T mais également de nombreuses autres cellules immunitaires et non immunitaires. La déplétion lymphocytaire T est l'effet le mieux décrit des rATG et sa profondeur est dose-dépendante. A fortes doses, elles induisent une déplétion quasi complète du compartiment T, ciblant plus particulièrement les lymphocytes T naïfs (3). La profondeur de la lymphopénie T CD4+ est associée à une augmentation de l'incidence des néoplasies, des événements cardiovasculaires et des infections opportunistes après la transplantation (4). Certains auteurs rapportent également un impact péjoratif de la lymphopénie sur la fonction du greffon à long terme (5). Notre équipe a démontré que la reconstitution du pool de LT CD4+ après administration de rATG est dépendante de la fonction thymique pré-transplantation (6). D'autre part, nous avons rapporté une diminution du risque de rejet aigu chez les patients traités par rATG, présentant une activité réduite de la fonction thymique avant la transplantation (7). Ces données suggèrent que plusieurs paramètres recueillis avant la transplantation tels que la fonction thymique ou le statut CMV pourraient être utilisés pour optimiser la dose de rATG et réduire les effets indésirables et les

complications inhérentes à ces spécialités chez le transplanté rénal. Un des enjeux en transplantation rénale est donc de réduire significativement les doses couramment utilisées. Les mécanismes d'action des rATG n'ont pas été totalement explorés notamment à faibles concentrations. La co-incubation de rATG avec des cellules mononuclées humaines induit l'expansion de lymphocytes T régulateurs (Treg) fonctionnels. Shimony *et al* (8) ont rapporté que les rATG peuvent induire des Treg fonctionnelles après 24h d'incubation avec des cellules mononuclées humaines. Toutes les spécialités de rATG n'ont pas la même capacité d'expansion du compartiment T régulateur. Feng *et al* (9) ont comparé les rATG issus de l'immunisation de lapin et de cheval et ont montré un effet différentiel lors de l'analyse des populations Treg induite après cultures de cellules mononuclées du sang périphérique (=PBMC) avec chacune des spécialités : seul les ATG de lapin étaient associées à une expansion numérique et fonctionnelle des Treg. Plus récemment, Boenish *et al* (10) ont exploré les mécanismes moléculaires de doses non déplétantes d'ATG de lapin et ont aussi montré une expansion Treg via la production du GM-CSF et de l'IL-10. Ces cytokines orienteraient la différenciation des monocytes CD14+ vers un profil de cellules dendritiques tolérogènes CD11c+CD14+, capable de sécréter des quantités élevées d'IL-10 et à l'inverse des quantités diminuées d'IL-12. Ces données soulignent l'effet potentiellement tolérogène de doses non déplétantes de rATG et la nécessité pour les cliniciens en transplantation de déterminer la dose minimale optimale pour atteindre cet effet.

Par ailleurs, les rATG peuvent agir sur l'adhérence leucocytaire à l'endothélium vasculaire par la régulation négative de l'expression de nombreuses intégrines et molécules d'adhérence intercellulaires, par la fixation sur l'endothélium vasculaire *in vivo* et par la diminution *in vitro* de la détection des molécules d'adhérence et de l'expression des cytokines inflammatoires en immunohistochimie (11,12). L'intérêt de notre groupe pour l'effet des rATG sur l'endothélium provient du double rôle de l'endothélium de l'allogreffe à la fois cible et médiateur des réponses allo-immunes dans le rejet. Notre équipe a une expérience importante dans l'étude des rATG. Nous avons récemment rapporté des différences notables dans la reconstitution lymphocytaire après rATG en fonction du type d'ATG utilisé (GRAFALON® vs THYMOGLOBULINE®). Ceci pourrait avoir des conséquences à long terme sur le devenir des greffons et des patients.

L'effet précis des rATG et leur conséquence sur l'immunomodulation lymphocytaire T dans un modèle expérimental de cellules endothéliales allogéniques exposées à un environnement inflammatoire n'ont quant à eux jamais été explorés et pourraient aider à mieux appréhender les interactions entre les rATG, les cellules endothéliales inflammatoires et les lymphocytes T. Pour ce travail, nous avons collaboré avec le groupe INSERM U 976 (Dr Nuala Mooney). Ce groupe a démontré que les cellules endothéliales humaines sont capables d'induire simultanément une réponse Th17 pro-inflammatoire et T régulatrice pro-tolérogène en condition inflammatoire (13). Les signaux qui polarisent la réponse T CD4+ vers un profil pro-inflammatoire ou tolérogène sont l'IL-6 pour la polarisation Th17 et une interaction contact-dépendant des lymphocytes T avec les cellules endothéliales CD54+ pour la différenciation Treg. Cette capacité immunomodulatrice de l'endothélium peut être modifiée par des facteurs environnementaux et humoraux (anticorps dirigés contre les antigènes HLA de classe II exprimés par les cellules endothéliales) entraînant une augmentation de la sécrétion d'IL-6 avec

une augmentation de la polarisation Th17. Par ailleurs, la fixation des allo-anticorps dirigés contre la molécule HLA-DQ exprimée sur les cellules endothéliales diminuent leur capacité à générer la population Treg (14). De plus, cette immunorégulation peut également être modifiée par un effet direct des immunosuppresseurs sur les cellules endothéliales (15). L'homéostasie de la réponse immune médiée par l'endothélium est alors sujette aux facteurs présents dans son environnement et la capacité de l'endothélium à moduler la réponse des lymphocytes T CD4+ vers une réponse pro-inflammatoire ou régulatrice n'est donc pas figée mais peut différer en fonction de la présence des allo-anticorps et/ou des immunosuppresseurs. En revanche, l'effet des rATG à différentes concentrations est l'aspect novateur de ce projet et reste à déterminer dans ce contexte. De plus, cet aspect est d'une importance évidente pour les applications cliniques des rATG.

▪ Objectifs

L'objectif de ce travail est de caractériser et comparer l'effet des deux principales spécialités d'rATG (GRAFALON® et THYMOGLOBULINE®) à concentrations décroissantes sur l'interaction entre les rATG, les cellules endothéliales inflammatoires et les lymphocytes T-CD4+. Le modèle que nous avons mis au point *in vitro* de coculture allogénique de PBMC de donneurs sains et de cellules microvasculaires (*Human Microvascular Endothelial Cells 1*: HMEC-1), permet néanmoins de reproduire les interactions allogéniques entre des cellules endothéliales humaines et le système immunitaire, alors qu'un modèle murin même humanisé ne serait pas adapté à cette étude, étant données les différences (phénotypiques, réponse à l'inflammation et fonctionnelles) entre les cellules endothéliales humaines et murines.

⇒ Objectif primaire

L'objectif primaire est d'identifier les effets et les mécanismes sous-jacents de deux rATG dans l'interaction entre cellules mononuclées (PBMC) et cellules endothéliales allogéniques en conditions inflammatoires et particulièrement sur l'amplification des Treg afin de pouvoir étudier l'effet de doses moindres et l'immunomodulation liée aux rATG dans ce contexte allogénique. Cet objectif, comme nous le verrons ci-dessous, se divise en 3 axes et a pour but *in fine* de développer une stratégie clinique de réduction de dose de rATG dans un essai clinique chez les patients transplantés rénaux à faible risque immunologique.

Cet objectif primaire sera conduit en 3 étapes :

1. déterminer les mécanismes (facteurs solubles et/ou contact-dépendant) d'expansion des Tregs en présence des cellules endothéliales activées par : le ciblage des molécules endothéliales augmentées sous conditions inflammatoires (en présence des anticorps bloquants, ou par l'introduction des shARN ciblés), l'étude du rôle de facteurs solubles en menant les expériences dans un support de culture compartimenté et empêchant les interactions cellulaires directes (Transwell)
2. identifier des cytokines/chimiokines induites ou présentes dans les surnageants de co-culture par une approche 'multiplex' (Luminex et/ou technologie MSD) en présence/absence des rATG au cours de la période d'expansion des Treg. Une fois, le/les facteurs identifiés, des expériences de cinétique, du blocage et/ou déplétion seront entreprises afin d'attribuer un rôle.

3. Evaluer les interactions cellulaires par des études d'imagerie (Incucyte, vidéo et microscopie confocale)

Les interactions entre les cellules endothéliales et les PBMC (ou les T CD4⁺isolés) identifiés par marquage avec un colorant vital, seront initialement étudiées avec la technologie Incucyte afin de déterminer la cinétique d'interaction. Ensuite, la vidéo microscopie nous permettra de déterminer la stabilité et la durée des interactions en présence/absence des rATG, et le rapport entre ces facteurs et l'expansion de Treg fonctionnels. La microscopie confocale permettra de qualifier des molécules impliquées dans ces interactions. L'ensemble de ces techniques sont disponibles dans notre unité (Besançon).

⇒ Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires sont de :

- Explorer la fonctionnalité des Tregs induits par les rATG : réactions mixtes lymphocytaires après tri cellulaire de nos Treg résultant de nos cultures cellulaires en présence/absence de rATG.
- Vérifier l'interaction entre rATG et cellules endothéliales (activées ou non) à l'aide d'un marquage secondaire anti-rATG. Nos données préliminaires indiquent une fixation partielle des rATG aux cellules endothéliales.
- Evaluer et quantifier avec précision la fixation et la concentration de rATG en présence de PBMC de donneurs sains et insuffisants rénaux dans nos modèles,
- Etudier d'autres cellules endothéliales humaines primaires (eg les HRGEC, Human Renal Glomerular Endothelial Cells) pour rechercher de nouvelles cibles et valider nos observations dans un modèle des cellules endothéliales humaines rénales.

▪ **Résultats attendus et perspectives**

Nous avons déjà des résultats préliminaires sur l'effet de faibles concentrations de rATG dans un modèle de coculture cellulaire proche de la situation d'allorecognition direct en transplantation d'allogreffe rénale (résultats Master 2 et début de thèse de science de Mathilde COLLADANT). Ce modèle de coculture allogénique de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains et de cellules microvasculaires nous a permis d'étudier l'effet propre de deux rATG (Thymoglobuline® et Grafalon®) sur la proportion de Treg, le phénotype endothélial et le microenvironnement cytokinique et chimiokinique. A faibles concentrations, les rATG induisaient une augmentation de la proportion de Treg CD3⁺CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺CD127^{low}. Dans notre modèle de coculture allogénique ((PBMC de donneurs sains cocultivées avec desHMEC-1 activées à l'interferon γ (=aHMEC-1)), l'augmentation de la proportion de Treg est conservée, mais uniquement sous GRAFALON®.

Dans les mêmes conditions de coculture, l'expression d'HLA-DR de PDL1 et de la molécule d'adhésion CD54 par les aHMEC-1 est augmentée, mais uniquement en présence de faibles concentrations de GRAFALON®.

Enfin, la sécrétion d'IL-6, IL-10 et IL-2 dans les surnageants est augmentée uniquement en présence de faibles concentrations de GRAFALON®.

Notre hypothèse, à l'issue de ces expériences préliminaires, est que le GRAFALON® favoriserait l'expansion de Treg à cause des modifications de l'expression endothéliale de PDL1 et HLA-DR et des facteurs solubles dans notre modèle cellulaire allogénique. Bien que l'IL-10 et l'IL-2 sont engagés dans l'expansion et la stabilité de certaines populations de Treg, ceci représente la première démonstration de leur implication dans l'expansion/induction des Treg par des cellules endothéliales allogéniques en présence de rATG. Ce mécanisme serait alors distinct des voies de modulation des Treg précédemment identifiées.

La suite de ces travaux doit nous permettre de mettre en évidence la fonctionnalité des Treg induits par la présence de rATG dans nos modèles *in vitro* et de mettre en évidence les mécanismes en jeu, qu'ils soient cytokiniques ou contact-dépendants. L'interaction cellulaire en présence des cellules endothéliales activées semblent également jouer un rôle qui sera à préciser à l'aide de support de culture compartimenté (*transwell*) et par technique d'imagerie cellulaire. De plus cette étude permettra de mieux comprendre la capacité immunorégulatrice des cellules endothéliales et d'identifier des facteurs impliqués. Ceci pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles diagnostiques/thérapeutiques.

Cette étude fondamentale, est indispensable à l'élaboration de protocoles cliniques de réduction de dose de rATG en induction de la transplantation rénale. La translation vers la clinique est prévue via l'étude pilote ODORAT (Optimal Dose Of Rabbit AntiThymocyte globulins) qui doit permettre de déterminer chez des patients à faible risque immunologique la dose minimale d'antithymoglobulines (Grafalon®) n'entraînant pas une déplétion lymphocytaire de plus de 30% tout en conservant la capacité à augmenter la proportion de lymphocytes T régulateurs circulant. Il s'agit d'une étude longitudinale qui débutera en 2024 et qui permettra d'explorer la cinétique d'évolution des différentes sous-populations lymphocytaires d'intérêt. Le travail de thèse inclura des expériences en lien avec cette étude clinique et donnera un caractère translationnelle au travail de thèse de sciences du candidat.

Conclusion

L'utilisation et l'effet des rATG à faibles doses (*i.e.* doses peu ou non déplétantes) est un aspect assez peu exploré dans la littérature. Nous avons mis au point un modèle *in vitro* de coculture de cellules mononucléées/aHMEC-1 pour explorer l'effet immunomodulateur des rATG à faibles concentrations en contexte allogénique. L'analyse de cet effet dans ce modèle n'a jamais été rapporté à ce jour. Nous avons montré dans nos résultats préliminaires, qu'à faibles concentrations, les 2 rATG ont la capacité d'augmenter de manière significative la proportion de LT de phénotype régulateur parmi les cellules mononucléées de donneurs sains. Néanmoins, en condition de coculture allogénique, en présence de cellules endothéliales inflammatoires, seul le GRAFALON® est associé à une augmentation significative de la proportion des lymphocytes Treg. Aucune des 2 spécialités ne modifie de façon directe le phénotype ou la sécrétion cytokinique basale d'IL-6 des aHMEC-1 en monoculture (sans la présence de PBMC), ce qui n'est pas le cas en contexte de coculture allogénique (en présence de PBMC). Ceci suggère que l'interaction des PBMC avec les aHMEC-1 en présence de GRAFALON® semble être la « clé de voûte » de cette différence d'effet à faible concentration des 2 rATG. Même si ce résultat reste à consolider, notre hypothèse est que les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la proportion de Treg sous de faibles concentrations de GRAFALON®

pourraient passer, soit par des facteurs solubles (augmentation de la sécrétion d'IL-10 notamment), soit par une interaction directe PBMC/aHMEC-1 via l'augmentation de l'expression de signaux inhibiteurs de la costimulation (comme PDL1) lors de la présentation des alloantigènes par les aHMEC-1 (via l'augmentation de l'expression d'HLA-DR). Nous avons donc développé les objectifs de notre étude de façon à pouvoir identifier *in vitro* ces interactions et mécanismes sous-jacents. Toutes ces étapes seront réalisées en parallèle d'une translation vers la clinique chez le patient transplanté rénal. L'observation de l'effet immunomodulateur *in vitro* des rATG à faibles concentrations permet en effet d'étayer le rationnel nécessaire au développement d'un essai clinique de faisabilité et d'évaluation de l'efficacité sur l'incidence du rejet aigu de faible dose de rATG en traitement d'induction chez le transplanté rénal à faible risque immunologique.

▪ **Références bibliographiques**

- 1- Brennan DC, Daller JA, et al. N Engl J Med. 2006; 355:1967-77.
- 2- Noël C, Abramowicz D, et al. J Am Soc Nephrol. 2009;20:1385-92
- 3- Ruzek MC, Neff KS, et al. Transplantation. 2009; 88:170-9.
- 4- Ducloux D, Courivaud C, et al. J Am Soc Nephrol. 2010 May;21(5):868-75.
- 5- Couvrat-Desvergnès G, Salama A, et al. J Clin Invest. 2015; 125: 4655-4665.
- 6- Ducloux, D, Courivaud C, et al. J Am Soc Nephrol 2010;21: 868 –875.
- 7- Bamoulid J, Courivaud C, et al. Pretransplant thymic function predicts acute rejection in antithymocyte globulin-treated renal transplant recipients. Kidney Int. 2016;89:1136-1143.
- 8- Shimony O, Nagler A, et al. J Clin Immunol 2012;32:173-88.
- 9- Feng X, Kajigaya S, et al. Blood 2008;111:3675-83.
- 10- Boenish O, Lopez M, et al. Am J Transplant 2012;12:856-66.
- 11-Beiras-Fernandez A, Hernandez-Sierra A, et al. Transplant. 2016 May 17;21:311-6.
- 12- Beiras-Fernandez A, Chappell D, et al. Transpl Immunol. 2009 Mar;20(4):224-8.
- 13- Taflin C, Favier B et al. Human endothelial cells generate Th17 and regulatory T cells under inflammatory conditions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Feb 15;108(7):2891-6.
- 14- Cross A, Lion J, et al. Kidney International 2019 ;96(3):689-698.
- 15- Lion J, Burbach M, et al. Front. Immunol. 2017,
|<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01761>

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)

Le projet sera financé pour sa partie fondamentale par le budget recherche de l'UMR 1098 RIGHT (EFS (163900 euros en 2024), Université de Franche Comté (102 600 euros annuelle en 2024) et INSERM (55 000 euros annuelle en 2023)) alloué annuellement à l'équipe TA-IT.

La partie clinique est financée à hauteur de 70 000 euros par le partenaire industriel (NEOVII®) dans le cadre de l'étude ODORAT dont le promoteur est le CHU de Besançon.

- Connaissances et compétences requises

Le ou la candidate devra avoir des compétences en culture cellulaire, en cytométrie en flux, en technique ELISA® et Luminex® et en biologie moléculaire. Il ou elle devra également avoir de solides connaissances en immunologie (notamment immunologie de la transplantation), en statistiques fondamentales avec l'utilisation de logiciels de statistique.

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

Objectifs

Les Anti-ThymoGlobulines (rATG) sont utilisés comme traitement immunosuppresseur d'induction et dans le traitement du rejet aigu chez les patients transplantés rénaux. L'utilisation des rATG induit une lymphopénie T CD4+ dose-dépendante, associée à des complications. Réduire significativement les doses couramment utilisées est un enjeu majeur. Les mécanismes d'action des rATG n'ont cependant pas été totalement explorés à faibles concentrations. Nous explorerons comment les ATG modulent l'interaction de l'endothélium avec des cellules mononuclées allogéniques pour modifier la réponse allo-immune.

Résultats attendus

Cette étude a pour objet de déterminer les concentrations minimales de rATG qui sont actives dans un environnement allogénique; qui altèrent les mécanismes d'interaction allogénique (contact cellulaire et facteurs solubles); et qui augmentent la différenciation Treg. Les résultats de ces travaux doivent nous permettre de mettre en évidence la fonctionnalité des Treg induits par les rATG dans nos modèles *in vitro* et les mécanismes en jeu.

Méthodes

Les doses-réponses de l'activité des 2 principales rATG seront définies dans notre modèle. Des cellules mononuclées HLA-incompatibles de donneurs (sains et malades rénaux chroniques) seront mises en interaction avec les cellules microvasculaires endothéliales humaines pour étudier l'effet de différentes concentrations de rATG. Nous déterminerons phénotypiquement et fonctionnellement les Tregs ainsi que la durée et la stabilité de leur différenciation pour ces différentes concentrations. Nous identifierons la fonction endothéliale associée. Les médiateurs potentiels impliqués dans les interactions cellulaires seront testés en utilisant des anticorps bloquants et des shARN bloquant l'expression de ces facteurs. Les facteurs solubles seront dosés par dosage multiplex. La méthodologie MSD (Meso Scale Discovery) sera utilisée pour détecter des niveaux d'expressions même faibles. Les interactions cellulaires contact-dépendant seront visualisées par vidéo et/ou microscopie confocale.

Objectives

Anti-ThymoGlobulins (rATG) are used as an immunosuppressive induction therapy and in the treatment of acute rejection in kidney transplant recipients. The use of rATG induces dose-dependent CD4+ T cell lymphopenia associated with complications. Reducing currently used

doses is a major issue. However, the mechanisms of action of rATG have not been fully explored at low concentrations. We will explore how ATG modulate the interaction of endothelium with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to modify the alloimmune response.

Expected results

This study aims to determine the minimum rATG concentrations that are active in an allogeneic environment; that alter the mechanisms of allogeneic interaction (cell contact and soluble factors); and that increase Treg differentiation. The results of this work should allow us to highlight the functionality of rATG-induced Treg in our in vitro models and the mechanisms at play.

Methods

The dose-response of the activity of the 2 main rATG will be defined in our model. HLA-incompatible donor mononucleus cells (healthy and chronic kidney disease) will be interacted with human endothelial microvascular cells to study the effect of different rATG concentrations. We will determine phenotypically and functionally the Tregs and the duration and stability of their differentiation for these different concentrations. We will identify the associated endothelial function. Potential mediators involved in cellular interactions will be tested using blocking antibodies and shRNAs blocking the expression of these factors. Soluble factors will be measured by multiplex dosing. Meso Scale Discovery (MSD) methodology will be used to detect even low expression levels. Contact-dependent cellular interactions will be visualized by video and/or confocal microscopy.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

X Santé, médecine humaine, vétérinaire

Mots clés : Transplantation rénale, antithymoglobulines, LT régulateurs, cellules endothéliales, immunomodulation/Kidney transplantation, antithymocyte globulins, Treg cells, endothelial cells, immunomodulation