

Axe 1 - Cellules dendritiques et régulation Immune

I. Physiologie immunologique des cellules dendritiques humaines

1. Rôle des flux ioniques dans la DC

- Migration des DC

Chez l'homme, nous avons démontré que les événements ioniques principalement calciques, sont associés à la maturation de la cellule dendritique humaine (DC). Des canaux CRAC (Calcium-Released Activated-Channels) contrôlent la maturation et l'activation (sécrétion de cytokines) de la DC humaine alors que certains canaux potassiques sembleraient contrôler sa migration. Cette maturation dépend de l'entrée du calcium qui se produit par l'intermédiaire du couplage des protéines ORAI-1 et STIM-1, appartenant aux molécules CRAC. Cette entrée de calcium est nommée Entrée Capacitive de Calcium ou ECC. Ces protéines ORAI-1 et STIM-1 doivent s'associer afin que ORAI-1 puisse avoir une activité « canal » et permettre l'entrée du calcium. L'inhibition de ces canaux CRAC modifie l'activité de sécrétion de cytokines des DC.

Dans la perspective de ces résultats, nous souhaitons identifier les canaux majeurs impliqués dans les grandes fonctions de la hDC, que sont la maturation, la migration et la présentation antigénique.

2. Ischémie / reperfusion

1. Dans la DC humaine

Identifier le rôle des récepteurs purinergiques dans la DC humaine en situation de réponse inflammatoire à l'ischémie reperfusion. Dans le cas de l'inflammasome (cet ensemble de protéines activées par des alarmines), les DC pourraient avoir un rôle important à l'interface de l'immunité innée et adaptative. Les cellules en nécrose ou en apoptose suite au stress d'une ischémie reperfusion vont libérer des molécules assimilées à des alarmines (acide urique, facteurs de transcription ou Adénosine 5'-TriPhosphate (ATP)). Ces alarmines peuvent induire l'activation de récepteurs membranaires purinergiques P2, des récepteurs métabotropiques P2Y, couplés à des protéines G et des récepteurs - canaux P2X (dits ionotropiques) qui sont perméables aux cations (Ca²⁺, Na⁺ et K⁺). Des travaux montrent que les récepteurs P2X7 sur les macrophages interviennent dans l'activation de l'inflammasome via une entrée de calcium dans la cellule. Sur la DC humaine, la mise en évidence de la cascade de l'inflammasome au travers du complexe NALP3 est relativement récente. Notre but est d'identifier les récepteurs purinergiques (P2Y et P2X) présents sur la surface cellulaire de la DC et de comprendre leur implication dans sa physiologie et sa réponse en situation d'ischémie reperfusion.

2. Dans un modèle de greffe cardiaque

Le phénomène d'ischémie-reperfusion (I/R) myocardique au cours de la transplantation cardiaque est à l'origine de lésions majeures et irréversibles du greffon. Il n'existe actuellement aucun agent thérapeutique validé permettant de prévenir ces lésions d'I/R qui sont très largement le résultat de la réponse immuno-inflammatoire induite. Nos travaux préliminaires *in vitro* montrent que des alarmines libérées par les cellules cardiaques stressées par I/R activent certaines cellules dendritiques (DC) les polarisant vers une réponse de type inflammatoire. Ayant identifié *in vitro* certaines alarmines et récepteurs de l'inflammation impliqués dans cette réponse, l'objectif de notre projet collaboratif est de valider leur effet sur un modèle de transplantation cardiaque chez la souris (WT et KO) avant d'expérimenter leur modulation (développement de biomédicaments) sur un modèle de transplantation chez le porc, étape ultime avant expérimentation humaine.

II- Modulation des propriétés pro-inflammatoires des DC humaines

1. Immunosuppresseurs et DC

Nos résultats sur les effets de certains immunosuppresseurs sur les DC humaines ont conduit entre autre à la description de nouvelles propriétés du Basiliximab (un anticorps monoclonal anti-récepteur à l'IL2 largement utilisé en transplantation). Les anticorps anti-CD25 sont utilisés pour prévenir le rejet de greffes. L'inhibition de la fixation de l'interleukine 2 (IL2) à son récepteur par cet anticorps a été essentiellement étudiée sur les lymphocytes T. Notre laboratoire a été le premier à rapporter ses effets sur des cellules dendritiques humaines, ouvrant ainsi la voie à l'exploration du rôle de la voie IL2 dans la DC. Nous avons montré que l'IL2 stimule la production des principales cytokines inflammatoires des cellules dendritiques. De plus, des travaux réalisés au sein du laboratoire ainsi que d'autres suggèrent que les cellules dendritiques murines et humaines peuvent produire de l'IL2 après activation par divers stimuli inflammatoires. Cette étude tend à démontrer que l'IL2 est nécessaire à la migration des DC ainsi que probablement à leur maturation. D'autres études utilisant des cellules dendritiques provenant de souris dont le gène de l'IL2 a été invalidé ont montrées une capacité réduite de ces cellules à induire la prolifération des lymphocytes T CD4 allogéniques.

2. Anticorps thérapeutiques et modulation de la DC

L'intérêt médical majeur suscité ces dernières années par l'utilisation des anticorps monoclonaux dans le traitement de nombreuses maladies incite à prendre conscience des défis scientifiques, médicaux et économiques que la France se doit de relever pour que son industrie pharmaceutique devienne compétitive en la matière sur le plan international. Déjà largement le présent dans l'arsenal thérapeutique, des anticorps monoclonaux tiennent toujours l'énorme potentiel pendant des décennies futures : pour rester compétitif dans l'industrie pharmaceutique, la France doit impérieusement investir plus largement dans ce domaine de recherche. Le but du MABIMPROVE Laboratoire d'excellence peut être récapitulé en quelques mots "des anticorps améliorés, le développement amélioré et amélioré utilisé". L'équipe EA 4245 est en grande partie impliquée dans ce projet par la surveillance d'un du WPS (WP4 : de nouvelles cibles) et plusieurs projets étudient déjà la modulation de fonction de DC par des anticorps thérapeutiques contre des récepteurs de cytokine ou lectine de type C fait surface des récepteurs. Comme un exemple, la découverte que Basiliximab (anti-IL2R Mab) qu'en bas - module la sécrétion de plusieurs cytokines dans DC pave le futur de nos projets dans ce domaine.

3. Anticorps anti-HLA et DC

L'alloimmunisation humorale anti-HLA est actuellement une cause importante de perte du greffon. Les mécanismes pathogènes précis des anticorps sont mal définis. La fixation d'anticorps anti-HLA sur les cellules endothéliales est suivie par une réaction inflammatoire et l'activation du complément qui sont à l'origine des lésions sur l'organe greffé. Toutefois, un éventuel rôle de la cellule dendritique dans le processus de rejet chronique humoral ne peut pas être exclu. Nous souhaitons étudier l'effet de ces anticorps sur la maturation, l'activation, de cellules dendritiques humaines à partir de sérum de patients immunisés contre des alloantigènes. Ces études in vitro seront complétées par des études cliniques sur les facteurs de risque d'apparition d'anticorps anti-HLA et du suivi longitudinal de ces anticorps chez les patients greffés permettant d'en évaluer les conséquences.

III- Exploration du réseau de régulation de la réponse immunitaire : place des DC régulatrices

Nous avons préalablement montré que des DC traitées par l'acide mycophénolique (MPA) entraînaient la différenciation de DC (DCReg) capables d'induire des lymphocytes T régulateurs allospécifiques (Treg). Les Treg sont d'importantes cellules connues pour réguler l'auto-immunité et l'immunité contre les allogreffes. Deux types de Treg ont été identifiés : les Treg naturels qui acquièrent leur capacité suppressive dans le thymus et les Treg induits (également appelés adaptatifs) qui sont produits en réponse à une stimulation antigénique en périphérie et sont donc spécifiques de l'antigène utilisé pour les générer. La combinaison de différents marqueurs CD25 et foxp3 a été très utile pour étudier les propriétés des cellules Treg naturelles à partir du sang (environ 5% des lymphocytes CD4+ circulants).

Nous proposons d'étudier la capacité des LT reg induits générés dans notre laboratoire à modifier les propriétés allostimulatrices de cellules dendritiques matures et de mieux comprendre les interactions entre DCreg et DC matures immunogènes. Nos premiers résultats indiquent que les Treg induites in vitro transforment des cellules dendritiques pro-inflammatoires en cellules dendritiques pro-toléro-gènes (DCreg). À cette fin, des lymphocytes T régulateurs induits par la co-culture avec ces DC traitées par MPA seront mis en présence de DC matures (traitées par différents agonistes de TLR par des PAMP et DAMP).

Ce travail s'inscrit dans la continuité directe des travaux menés par l'Equipe depuis sa création et présente une originalité, notamment l'aspect des iTreg pour lesquelles les connaissances sont beaucoup moins étendues que pour les nTreg et enfin les interactions entre DC reg et DC matures ont très peu explorées. Il est possible que la DC soit au centre d'un réseau de régulations immunes. D'autre part, une meilleure connaissance des interactions entre cellules dendritiques pourrait permettre de mieux utiliser ces cellules dans une visée de thérapie cellulaire en transplantation d'organe pour moduler la réponse immune des receveurs de greffe d'organe.