



LES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS : DE LA TOLÉRANCE À LA RÉPARATION TISSULAIRE

REGULATORY T CELLS: FROM TOLERANCE TO TISSU REPAIR

Etablissement Université de Montpellier

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Spécialité Biologie Santé

Unité de recherche IRMB - Cellule souches, plasticité cellulaire, régénération tissulaire et immunothérapie des maladies inflammatoires

Encadrement de la thèse Pascale LOUIS-PLENCE (detailResp.pl?resp=12465)

Financement du 01-10-2021 au 30-09-2024

Début de la thèse le 1 octobre 2021

Date limite de candidature 31 décembre 2021

Mots clés - Keywords

Immunologie, Tolérance, Lymphocyte T régulateurs, Polyarthrite Rhumatoïde

Immunology, Tolerance, Regulatory T lymphocytes, Rheumatoid arthritis

Profil et compétences recherchées

Etudiant motivé pour un projet translationnel avec la clinique

La maîtrise de la cytométrie serait souhaitable

Description de la problématique de recherche - Project description

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) ont un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie de la réponse immunitaire et dans le contrôle de l'inflammation systémique. Ils sont bien évidemment retrouvés dans les organes lymphoïdes et en périphérie où ils exercent leur fonction suppressive sur la réponse immunitaire mais ils sont également présents dans les tissus non lymphoïdes, où ils subissent une sorte de polarisation terminale par le microenvironnement pour acquérir des fonctions tout à fait particulières, dont des fonctions de réparation tissulaire, indépendante de leur fonction immune. Ces lymphocytes T régulateurs ayant des capacités de réparation tissulaire ont été mis en évidence dans les poumons et dans la peau dans des modèles infectieux et de lésions musculaires. Dans certains organes tels que le tissu adipeux ils peuvent également jouer un rôle sur le métabolisme lipidique et la sensibilité à l'insuline, des fonctions totalement indépendantes de leur fonction immunitaire.

Dans les pathologies autoimmunes telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR), une des hypothèses de la rupture de tolérance est qu'il existe un défaut de nombre ou de fonction des lymphocytes T régulateurs. Les résultats des travaux les plus récents montrent une accumulation des Tregs dans le site inflammatoire, le liquide synovial, dans la PR. Nous avons récemment confirmé ces résultats avec une analyse approfondie du phénotype des Tregs du liquide synovial. Ce travail a été soutenu par le CHU de Montpellier dans le cadre d'une AOI portée par le Docteur Rosanna Ferreira et a fait l'objet des travaux de thèse de Yasamine El-Ahmadi (Thèse soutenue le 9 décembre 2020, résultats non publiés). Ces lymphocytes Tregs présents dans le site inflammatoire ont un phénotype particulièrement activé avec une forte expression de molécules immunosuppressives telles que CD39 et CTLA-4. Ces résultats suggèrent que le nombre et la fonction suppressives des Tregs ne sont pas altérées dans la pathologie. De nombreuses études s'intéressent particulièrement aux raisons de la dysfonction des Tregs dans la PR pour comprendre l'emballement de la réponse immunitaire, et se focalisent maintenant sur la perte de sensibilité des lymphocytes T conventionnels. En parallèle de ces travaux sur les fonctions immunes des lymphocytes Tregs, les fonctions de réparation tissulaire de ces Tregs présents dans le liquide synovial, ou d'autres fonctions de régulation de la physiologie du tissu cible restent encore très peu étudiés. Ces études sur les Tregs mémoires résidents des tissus sont généralement réalisées dans des modèles expérimentaux chez la souris afin de dépléter spécifiquement des populations de Tregs retrouvées dans les tissus. Dans ce domaine, les études chez l'homme sont extrêmement rares et la pathologie de la PR avec un accès possible au liquide synovial est une réelle opportunité pour étudier les cellules au site même de l'inflammation.

Le projet de thèse que je propose repose sur une meilleure caractérisation de ces Tregs présents dans le liquide synovial des patients et

envisage de répondre à plusieurs questions :

- Est-ce que la présence de ces Tregs dans le site inflammatoire est due à une activation et/ou une prolifération locale des Tregs dans le liquide synovial ?
- Quels sont les couples chimiokines / récepteurs impliqués dans l'accumulation de ces cellules dans le liquide synovial
- Ces Tregs proviennent-ils de la circulation des Tregs en systémique, d'un recrutement des ganglions lymphatiques, d'une prolifération des Tregs résidents, d'une conversion locale des lymphocytes T conventionnels en Tregs (pTregs).
- Dans le liquide synovial, les Treg subissent-ils une adaptation métabolique spécifique, comme cela est le cas dans d'autres tissus tels que les tumeurs ?
- Ces cellules Tregs peuvent être également responsables du recrutement d'autres cellules impliquées dans les fonctions de réparation tissulaire comme les macrophages de type M2.

Regulatory T lymphocytes (Tregs) have a critical role in maintaining the homeostasis of the immune response and controlling systemic inflammation. They are found in lymphoid organs and in the periphery where they exert their suppressive function on the immune response. Tregs are also present in non-lymphoid tissues, where they undergo a kind of terminal polarization by the microenvironment to acquire very specific functions, including tissue repair functions, independent of their immune function. These regulatory T lymphocytes with tissue repair capabilities have been demonstrated in the lungs and skin in infectious and muscle injury models. In certain organs such as adipose tissue they may also play a role in lipid metabolism and insulin sensitivity, functions that are totally independent of their immune function.

In autoimmune pathologies such as rheumatoid polyarthritis (RA), one of the hypotheses of tolerance disruption is that there is a defect in the number or function of regulatory T lymphocytes. The results of the most recent work show an accumulation of Tregs in the inflammatory site, the synovial fluid, in RA. We have recently confirmed these results with an in-depth analysis of the Tregs phenotype of the synovial fluid. This work was supported by the University Hospital of Montpellier in the framework of an AOI carried out by Dr. Rosanna Ferreira and was the subject of Yasamine El-Ahmadi's thesis work (Thesis defended on December 9, 2020, unpublished results). These Tregs lymphocytes present in the inflammatory site have a particularly activated phenotype with a strong expression of immunosuppressive molecules such as CD39 and CTLA-4. These results suggest that the number and suppressive function of the Tregs are not altered in the pathology. Numerous studies have focused on the reasons for Tregs dysfunction in RA to understand the immune response boost, and are now focusing on the loss of sensitivity of conventional T cells. In parallel to this work on the immune functions of Tregs lymphocytes, the tissue repair functions of Tregs present in synovial fluid, or other functions regulating the physiology of the target tissue are still little studied. These studies on tissue resident memory Tregs are generally performed in experimental models in mice in order to specifically deplete populations of Tregs found in tissues. In this field, studies in humans are extremely rare and the pathology of RA with possible access to synovial fluid is a real opportunity to study cells at the site of inflammation.

The thesis project that I propose is based on a better characterization of these Tregs present in the synovial fluid of patients and intends to answer several questions:

- Is the presence of these Tregs in the inflammatory site due to a local activation and/or proliferation of Tregs in the synovial fluid?
- What are the chemokine / receptor pairs involved in the accumulation of these cells in the synovial fluid?
- Do these Tregs come from systemic Treg circulation, lymph node recruitment, resident Treg proliferation, and local conversion of conventional T cells to Tregs (pTregs)?
- In synovial fluid, do Treg undergo specific metabolic adaptation, as is the case in other tissues such as tumors?
- These Tregs may also be responsible for the recruitment of other cells involved in tissue repair functions such as M2 macrophages.

Thématique / Domaine / Contexte

Immunorhumatologie

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune systémique caractérisée par une inflammation chronique qui affecte principalement les articulations. Les cellules immunitaires jouent un rôle essentiel en contribuant directement à l'emballement de la réponse immunitaire conduisant à une inflammation et à la destruction du cartilage et de l'os. Malgré les avancées majeures dans la compréhension de la pathogenèse de la PR et le nombre croissant de biothérapies ciblées, l'origine de la PR reste inconnue et le taux de réponse au traitement de première ligne est de 60%.

Notre équipe constituée de cliniciens et chercheurs en biologie moléculaire, cellulaire et immunologistes étudie depuis plus de 20 ans la physiopathologie des arthrites par le prisme des cellules immunitaires pour identifier de nouveaux marqueurs et développer de nouvelles approches thérapeutiques. Mon groupe de recherche travaille sur la rupture de tolérance et l'homéostasie de la réponse immunitaire avec un intérêt particulier pour les lymphocytes T régulateurs dans le contexte inflammatoire. Nous avons développé de nouvelles approches thérapeutiques visant à augmenter le nombre de lymphocytes T régulateurs dans les modèles expérimentaux d'arthrite chez la souris, par l'injection de cellules dendritiques tolérogènes. Puis nous avons orienté nos travaux sur les cellules immunitaires présentes au sein du liquide synovial dans les pathologies inflammatoires articulaires chez l'homme et l'enfant. Aujourd'hui nos résultats nous orientent vers le potentiel thérapeutique des lymphocytes T régulateurs chez l'homme, et plus particulièrement pour restaurer une homéostasie de la

réponse immunitaire et du tissu cible. Une partie de ce projet repose sur la description/caractérisation des lymphocytes T régulateurs présents dans le liquide articulaire de patients PR. Ces lymphocytes Treg présentent un phénotype de T mémoires / activés différents des Tregs circulants et le rôle de ces Tregs résidant dans le liquide synovial des patients PR dans l'homéostasie tissulaire n'est pas encore étudié

Objectifs

Notre objectif est d'utiliser le potentiel régulateur des lymphocytes Tregs et/ou des cellules dendritiques tolérogènes pour restaurer une homéostasie de la réponse immunitaire dans les pathologies autoimmunes.

Méthode

Ce travail sera divisé en 3 grands axes

1- Etude du microenvironnement articulaire sur le phénotype et la fonction des Tregs. Cette partie de l'étude sera réalisée grâce à la collection biologique de liquide articulaire qui a pu être réalisée au cours de la thèse de Yasamine El Ahmadi. Cette collection biologique regroupe 8 prélèvements de liquide articulaire de PR et 15 prélèvements de liquide articulaire issus d'arthrose. Ces liquides articulaires seront utilisés sur des lymphocytes T effecteurs et T régulateurs pour évaluer les modifications phénotypique et fonctionnelle de ces populations.

Nous avons dans les travaux de thèse de Yasamine démontré que les T effecteurs du liquide synovial des patients PR sont principalement des T helpers exprimant CD161 et qu'ils sur-expriment la molécule PD-1. Ces résultats suggèrent une activation des T effecteurs et la mise en place de rétro-contrôle négatif de cette activation. Des résultats récents démontrent que cette population est résistante à la fonction suppressive des Tregs et que ces T helpers sont responsables de la sécrétion locale de cytokines pro-inflammatoires de type IL-17. La signalisation de PD-1 sera étudiée particulièrement dans le contexte inflammatoire pour comprendre la sur-activation de ces cellules.

En parallèle de ces résultats nous avons également démontré que le liquide synovial de patients PR a un impact positif sur la prolifération des T effecteurs et négatif sur les fonctions suppressives des Tregs. Ces résultats seront validés sur un nombre plus important de prélèvements, et des expériences complémentaires seront mises en place pour disséquer l'impact de l'environnement inflammatoire sur la fonction des lymphocytes T. Ces expériences permettront d'appréhender tout particulièrement l'effet de cytokines recombinantes, telles que l'IL-33 et l'IL-18, présentes dans les liquides articulaires et impliqués dans les mécanismes d'activation des Tregs résidents pour leur conférer des propriétés de réparation tissulaire. La sécrétion de l'amphireguline (AREG), un ligand du récepteur de l'EGF, est un des principaux mécanismes impliqués dans la réparation tissulaire au niveau de la peau et des poumons. La sécrétion de AREG par les Treg activés par le liquide synovial ou les cytokines IL33 et IL-18 sera investiguée. L'impact du liquide articulaire sera également évalué dans ces expériences, sur la prolifération, la fonction suppressive et le métabolisme des Treg. Suivant les effets observés l'utilisation d'anticorps bloquants permettra de disséquer le rôle de certaines cytokines pro-inflammatoires.

2-Analyse transcriptomique des Tregs activés du liquide synovial. L'analyse du profil transcriptionnel des Tregs activés présents dans le liquide synovial sera comparée au profil transcriptionnel des Tregs issus du sang périphérique traités ou non avec du liquide synovial. Ces analyses transcriptomiques permettront de déterminer si les Treg activés présents dans le liquide synovial est une population Treg mémoires résidentes du tissu, avec un profil transcriptionnel similaire aux autres populations de Tregs résidentes. L'expression de certains marqueurs comme KLRG1 et ST2 semblent être communs aux lymphocytes Tregs résidents dans les tissus qui présentent également un profil de reprogrammation épigénétique particulier et une signature de plus de 100 gènes hypométhylés spécifiques de ces Tregs mémoires résidents dans les tissus. Cette analyse transcriptomique nous permettra également de valider l'expression d'une série de transcrits impliqués dans les fonctions suppressives des Tregs et de déterminer également le profil d'expression des cytokines, chimiokines et récepteurs de chimiokines spécifiques de cette population. Les résultats de ces analyses nous permettront également de prédire d'autres fonctions biologiques associées aux fonctions suppressives et pouvant être importante au sein du site inflammatoire.

3-Analyses en Single cells sur les Tregs activés du liquide synovial. Ces analyses en single cells seront réalisés dans un premier temps, avec la technologie Fluidigm C1 pour une analyse de 96 transcrits sur 96 cellules issues de 3 patients différents. Les résultats de ces analyses permettront d'analyser l'hétérogénéité de la populations Tregs du liquide synovial, leur profil d'expression de facteurs de transcription, cytokines et récepteurs de chimiokines, molécules suppressives et gènes impliqués dans le métabolisme. Les Tregs activés sont décrits comme très hétérogènes et sont capables de se différencier en sous-population en miroir des populations T helpers classiques avec des Tregs de type 1 qui exprime le facteur de transcription des Th1 (t-bet+) des Tregs de type 2 qui expriment les facteurs de type Th2 (IRF4+ GATA-3+) et des Tregs de type 3 qui expriment RORgt, c-MAF et STAT-3. En co-exprimant ces facteurs de transcription avec FoxP3 ces Tregs acquièrent une partie du transcriptome des Thelpers de façon à leur permettre, comme les T helpers, de migrer dans les tissus et de s'adapter aux mieux pour réguler les réponses effectrices des T helpers. Cette polarisation est nécessaire à une homéostasie de l'organe cible. Suivant les résultats obtenus et suivant l'hétérogénéité de la population Tregs activés nous envisagerons une approche single cells RNA sequencing pour révéler des populations cellulaires rares, mettre en évidence de nouveaux marqueurs et associer des pathways de fonctions à certaines sous populations spécifiques.

Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

Fin du projet dans le cadre de l'AOI du CHU de Montpellier et Demande de Financement en cours à la fondation Avenir

Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...

Participation au congrès européen EWRR

Publication des résultats sous forme de poster, présentation orale et articles scientifiques

Références bibliographiques

Références récentes sur le sujet:

Miragaia RJ et al. Single-Cell transcriptomics of regulatory T cells reveals trajectories of tissue adaptation. *Immunity* 2019, 50, 493-504.

Shi et al. Metabolic control of Treg cell stability, plasticity and tissue-specific heterogeneity. *Front. Immunol.* 2019, 2716.

Piccirillo CA. Transcriptional and translational control of FoxP3 regulatory T cell functional adaptation to inflammation. *Current Opinion in Immunol.* 2020, 67: 27-35.

Busko M et al. Control of regulatory T cell homeostasis. *Current Opinion in Immunol.* 2020, 67: 18-26

Complément sur le sujet

<https://irmb-montpellier.fr/about/pascale-louis-plence/> (<https://irmb-montpellier.fr/about/pascale-louis-plence/>)

Dernière mise à jour le 19 février 2021