



HAL
open science

Approche par CAR-Treg dans la transplantation rénale

Élisa Pezeril

► **To cite this version:**

Élisa Pezeril. Approche par CAR-Treg dans la transplantation rénale. Sciences pharmaceutiques. 2024. dumas-04618915

HAL Id: dumas-04618915

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04618915v1>

Submitted on 20 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THESE

**PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTÉ DE PHARMACIE DE MARSEILLE**

Le 17 juin 2024

PAR

Mme PEZERIL Elisa

Né(e) le 11.03.1997 à Nice

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

Approche par CAR-Treg dans la transplantation rénale

JURY :

Président : Monsieur le Docteur **Jérémy MAGALON**

Directeur : Madame le Docteur **Mélanie VELIER**

Membres : Monsieur le Docteur **Pascal PEDINI**
Monsieur le Docteur **David FENARD**

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	M. Jean-Paul BORG
<i>Vice-Doyens :</i>	Mme Florence SABATIER-MALATERRE, M. François DEVRED, M. Pascal RATHÉLOT, Mme Alexandrine BERTAUD
<i>Chargés de Mission :</i> David BERGE-	Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE, Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i> CHARPIOT, M.	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i> BRIAND,	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean- Claude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Sylvie BUREAU
Chef de Cabinet :	Mme Manon BONIFAY
Responsable de la Scolarité	Mme Flora LATIGNY

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC
M. François DEVRED

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

**PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE
INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE**

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE
INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pierre REBOUILLON
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET
BIOTHERAPIES

M. Jérémy MAGALON

PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

Mme Carole SIANI
Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE

Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise
DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-
GEORGE

Mme Laurence CAMOIN-
JAU

Mme Florence SABATIER-
MALATERRE

Mme Nathalie BARDIN
Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE,
HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET
CLINIQUE

M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN
Mme Sandra GHAYAD

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE,
HYGIENE ETZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU
Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Amandine BONIFAY

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE

M. Jérôme JOUVE
Mme Emmanuelle TONNEAU-PFLUG

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES
ETNUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE
MINERALE ETSTRUCTURALE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE

Mme Sok Siya BUN

**MAITRES DE
CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE
CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
M. Quentin ALBERT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD
Mme Camille DESGROUAS
M. Charles DESMARCHELIER
M. Mathieu CERINO

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES
RISQUES ETNUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Duje BURIC
M. Pascal PRINDERRE

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE
MINERALE ETSTRUCTURALE

Mme Sandrine ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA
Mme Manon ROCHE
Mme Fanny MATHIAS

CHIMIE ORGANIQUE
PHARMACEUTIQUEHYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE

Mme Valérie MAHIOU-
LEDDET
Mme Béatrice BAGHDIKIAN
M. Elnur GARAYEV

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL
(M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES
RISQUES ETNUISANCES TECHNOLOGIQUES

Mme Haïfa LAYACHI RAHABI
M. Cyril PUJOL

DROIT ET ETHIQUE

Mme Laurie PAHUS

GESTION PHARMACEUTIQUE,
PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE
PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET
COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE
ET
GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

DISPOSITIFS MEDICAUX

Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE
SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI
TOXICOLOGIE GENERALE	Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

**MAITRES DE
CONFERENCES**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET
PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Pierre-Henri VILLARD

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	M. Vincent NAIL
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Maeva MONTALEYTANG Mme Charlotte BERARD

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Annie CILIA, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Yann COTTE, Pharmacien Assistant
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Mélanie FALZON, Pharmacie-Adjoint
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Céline HIRSCH, Pharmacien Conseil de l'Assurance Maladie Mme Christelle
LABRANDE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Florence LEANDRO-DIJON, Pharmacien adjoint
Mme Nathalie MARTIN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie MERLIN, Pharmacien Assistant
Mme Vanessa METZ, Pharmacien hospitalier
Mme Alice PERINEAU, Pharmacien Assistant
Mme Florence PEYRON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Bertrand POURROY, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 février 2023

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, Mélanie VELIER pour ses conseils, sa patience et sa gentillesse tout au long de ce parcours.

Je souhaite également remercier le président du jury Jérémy MAGALON, qui m'a transmis sa passion pour la thérapie cellulaire et les biotechnologies durant mon externat de pharmacie. C'est en grande partie grâce à lui et à l'équipe du LcTc que j'ai trouvé ma voie.

Mes remerciements vont également à mes deux membres du jury, Pascal PEDINI et David FENARD, pour avoir gentiment accepté de participer à ce jury.

Un merci à Aline, ma maîtresse de stage chez CellForCure, qui m'a donné ma chance en m'accueillant dans son équipe lors de mon stage de cinquième année. Son enseignement a été précieux et m'a ouvert les portes du monde du contrôle qualité où je travaille désormais.

Je tiens à remercier mes anciens collègues de chez Sangamo Therapeutics pour m'avoir accueillie durant mon apprentissage de sixième année et de m'avoir permis de découvrir le sujet passionnant des CAR-Treg. Un merci particulier à l'équipe HT3 pour leur gentillesse.

Mes collègues de chez Incyte méritent une mention spéciale pour leur encouragement et leur motivation durant ces longs mois d'écriture.

Je n'oublie pas mes amis rencontrés à la faculté de Marseille : Andrea, le meilleur des binômes de TP, rencontré grâce à notre passion commune pour Koh Lanta. Claire avec qui nous avons pris plaisir à éteindre de nombreux flambeaux durant nos années Marseillaises. Lucile avec qui j'ai partagé l'externat de pharmacie puis notre année folle à Nantes. Et enfin Déborah, pour tous les moments partagés.

Un immense merci à toute ma famille !

En particulier, à ma mère, qui a toujours tout donné pour nous cinq, nous encourageant sans cesse. Elle a toujours cru en moi et m'a soutenue dans tous mes projets.

À mes grands-parents, qui m'ont accueillie chez eux durant les PACES et ont transformé ces deux années difficiles en de superbes souvenirs.

À mes sœurs, Julie, Loriane, Anna et Cally, qui ont su me faire rire dans les moments les plus difficiles.

À Antoine, qui m'a toujours soutenue, encouragée, et aidée à construire la confiance en moi nécessaire pour aller de l'avant. Nous avons passé 6 ans à rêver dans nos 15m² du Crous de la fin de nos études et le début de notre nouvelle vie, et nous y sommes enfin.

Et enfin, un merci tout particulier à mon père, mon étoile, dont le soutien et les encouragements m'ont accompagnée tout au long de ce chemin. Tu me manques chaque jour...

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

TABLE DES MATIERES

Introduction	18
Partie I : La transplantation comme traitement de l'insuffisance rénale terminale	19
1. Les insuffisances rénales : définition, épidémiologie et étiologies	19
1.1. Contexte général sur l'insuffisance rénale	19
1.1.1. Anatomie	19
1.1.2. Fonctions rénales	21
1.2. Insuffisance rénale aiguë (IRA)	21
1.3. Insuffisance Rénal Chronique (IRC)	22
1.3.1. Epidémiologie de l'Insuffisance Rénale Chronique.....	23
1.3.2. Les différents stades de l'Insuffisance Rénale Chronique	23
1.3.3. Principales étiologies.....	24
1.4. Prise en charge de l'IR.....	26
1.4.1. Mesures néphroprotectrices.....	27
1.4.2. Pallier les défaillances fonctionnelles du rein.....	27
2. La transplantation rénale comme traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale	29
2.1. Généralités.....	29
2.2. Epidémiologie de la transplantation rénale en France	30
2.3. Processus de la transplantation rénale.....	32
2.3.1. Identification du donneur	32
2.3.2. Déroulement d'une greffe rénale.....	32
2.3.3. Suivi post-opératoire et gestion du rejet : utilisation d'immunosuppresseurs	33
3. Histocompatibilité dans la transplantation	37
3.1. Bases immunologiques dans la transplantation rénale	38
3.1.1. Rôle du CMH.....	38
3.1.2. Gènes et molécules du système HLA	38
3.2. Compatibilité HLA donneur/receveur pour la transplantation	41
3.3. Les différents types de rejets	42
3.4. Physiopathologie du rejet de greffe	45
3.4.1. Acteurs de l'Immunité Innée.....	47
3.4.2. Immunité adaptative	48
3.5. Les limites actuelles comme moteur d'innovation thérapeutique	53
Partie II : Le CAR-Treg : un Médicament de Thérapie Innovant	55
1. Les Lymphocytes T régulateurs : définition et rôles	56
1.1. Le système immunitaire et lymphocyte T	56
1.1.1. Hématopoïèse	57
1.1.2. Lymphocytes T	57
1.2. Lymphocytes T régulateurs.....	58
1.2.1. Généralités	58
1.2.2. Différenciation et origines des lymphocytes T régulateurs	58
1.2.3. Mécanismes d'action des Treg	60
1.2.4. Marqueurs caractéristiques des Lymphocytes T régulateurs	62
2. Thérapie cellulaire adoptive par Treg	62
2.1. Différentes approches thérapeutiques reposant sur les Treg.....	63

2.2. Treg modifiés génétiquement	64
3. Le CAR-Treg	66
3.1. Les cellules CAR-T : historique	66
3.2. Structure du CAR.....	68
3.2.1. Domaine de liaison à l'Antigène	69
3.2.2. Charnière.....	70
3.2.3. Domaine transmembranaire.....	71
3.2.4. Domaine de signalisation	71
3.2.5. Domaine de costimulation	72
3.3. Différentes générations de CAR	72
3.4. Principe général d'un CAR-Treg.....	73
4. Aspect réglementaire des CAR-Treg	76
4.1. Définition d'un Médicament de Thérapie Innovante (MTI).....	76
4.2. CAR-T : entre Thérapie Cellulaire et Thérapie Génique	78
Partie III : Potentiel thérapeutique des CAR-Treg dans la transplantation rénale : défis techniques, cliniques et biologiques.....	79
1. Production des CAR-Treg pour la transplantation rénale : Défis techniques	79
1.1. Procédé général de production.....	79
1.2. La pureté du « Product Master Treg ».....	81
1.3. Design du CAR et choix du vecteur.....	83
1.3.1. Signalisation fonctionnelle du CAR	83
1.3.2. Efficacité de l'intégration génique	84
2. Application clinique des CAR-Treg dans le contexte de la transplantation rénale	86
2.1. Preuve de concept : évaluation des Treg polyclonaux.....	86
2.1.1. L'étude ONE : vers une réduction de l'immunosuppression avec l'utilisation de Treg polyclonaux.....	86
2.1.2. L'étude TWO: validation de la thérapie par Treg polyclonaux dans la transplantation rénale	88
2.2. Evaluation pré-clinique et développement des CAR-Treg.....	89
2.2.1. Choix de l'antigène d'intérêt.....	89
2.2.2. Objectif de l'étude préclinique	90
2.2.3. Spécificité et fonction immunosuppressive <i>in vitro</i> des CAR-Treg HLA-A02.....	91
2.2.4. Efficacité des CAR-Treg dans un modèle murin de GvHD xénogénique	94
2.2.5. Localisation des CAR-Treg dans les greffes de peau.....	95
2.2.6. Absence de transformation et sénescence des CAR-Treg anti-HLA-A02 <i>in Vitro</i> après stimulation chronique	97
2.2.7. Stabilité et sécurité des CAR-Treg anti-HLA-A02 greffés dans un modèle murin humanisé HLA-A02	99
2.2.8. Résistance des CAR-Treg anti-HLA-A02 au Tacrolimus	101
2.2.9. Conclusion de l'étude	102
2.3. Mécanisme d'action supposé des CAR-Treg anti-HLA-A02.....	103
2.4. Le premier essai clinique : l'étude STEADFAST	104
2.4.1. Objectif de l'étude.....	104
2.4.2. Déroulement de l'étude clinique.....	105
2.4.3. Population ciblée	107
3. Défis Biologiques dans le contexte de transplantation rénale	108

3.1. Spécificité et efficacité des CAR-Treg	108
3.2. Persistance des CAR-Treg	109
3.3. Interaction des CAR-Treg avec les immunosuppresseurs	110
4. Perspectives des CAR-Treg	111
4.1. Les CAR-Treg allogéniques.....	111
4.1.1. Développement et implications des CAR-Treg allogéniques.....	111
4.1.2. Obtenir des CAR-Treg « prêts à l'emploi »	113
4.2. Potentielles indications thérapeutiques des CAR-Treg	115
4.2.1. Maladies auto-immunes et inflammatoires.....	116
4.2.2. Autres applications potentielles des CAR-Treg.....	117
Conclusion	119
Références Bibliographiques	121

Liste des abréviations

ACT : Thérapie cellulaire adoptive
ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
BCMA : Antigène de Maturation des Lymphocytes B (B cell Maturation Antigen)
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication (ou en anglais Good Manufacturing Practices : GMP)
BSL 2 : Biosécurité de niveau S2
CAM : Molécules d'Adhésion cellulaire
CAR : Récepteur Antigénique Chimérique
CAR-T : Lymphocytes T exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR)
CAR-Treg : Cellules T régulatrices exprimant un CAR
CD : Cellule Dendritique
CDi : Cellules dendritiques immatures
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CRISPR-Cas9: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- Cas9
CSM : Cellule Souche Mésoenchymateuse
DAMP : Motif Moléculaire Associé aux Dégâts (Damage Associated molecular pattern)
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire
DSR : Débit Sanguin Rénal
DT1 : Diabète de type 1
EMA : Agence européenne des médicaments
FDA: Food and Drug Administration
FOXP3: Forkhead Box P3
GAD : Décarboxylase d'acide glutamique
GARP : Glycoprotéine A répétitions prédominante
GvHD : Maladie du Greffon contre l'Hôte (Graft-versus-Host Disease)
HLA : Antigènes des Leucocytes Humains
HSV1-tk : Thymidine kinase du virus de l'herpès simplex
iCasp9 : Caspases 9 activables
IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase
IL-2 : Interleukine 2
IL-10 : Interleukine 10
IL-35 : Interleukine 35

IRA : Insuffisance Rénale Aiguë
IRC : Insuffisance Rénale Chronique
IR : Insuffisance Rénale
IRT : Insuffisance Rénale Terminale
ITAM : Motif d'Activation Immunorécepteur à Base de Tyrosine
KO: Knock-out
LAG-3: Lymphocyte-Activation Gene-3
LyT : Lymphocytes T
MOG : Glycoprotéine Oligodendrocytaire Myéline
MTI : Médicament de Thérapie Innovante
NK : Natural Killer
NSG : NOD SCID gamma
PBCM : Cellules mononucléées du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cell)
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
SA- β -Gal : β -galactosidase acide de sénescence
scFV: Single Chain Variable Fragment
SCID: Severe Combined Immunodeficiency
SEP : Sclérose En Plaque
SI : Système immunitaire
TALENs: Transcription Activator-Like Effector Nucleases
Tconv : Lymphocytes conventionnels
TCR : Récepteur des Lymphocytes T
Teff: Lymphocyte T effecteur
tEGFR : Truncated epidermal growth factor receptor
TEM : Lymphocyte T à Mémoire effectrice (T effector memory)
TEMRA : Lymphocyte T à Mémoire Effectrice Complètement Différenciée (Terminally Differentiated effector memory)
TGF- β : Facteur de croissance transformant- β
TLR : Toll-Like Receptors
Treg : Cellules (ou lymphocytes) T régulatrices
nTreg : Lymphocytes T régulateurs naturels
iTreg : Lymphocytes T régulateurs induits
ZFNs : Zinc Finger Nucleases

Liste des figures

Figure 1 : Structure du rein et des néphrons.

Figure 2 : Incidence des cas d'IR en fonction de la maladie initiale.

Figure 3 : Comparaison des méthodes de dialyse. (a) Schéma illustrant le processus d'hémodialyse. (b) Schéma représentant la technique de dialyse péritonéale.

Figure 4 : Les chiffres clés de la maladie rénale, au stade de dialyse et de transplantation en 2021.

Figure 5 : Mécanisme d'action des immunosuppresseurs.

Figure 6 : Présentation d'un antigène à un lymphocyte T. (A) Présentation d'un peptide endogène par une cellule nucléée grâce au CMH I et structure de CMH I. (B) Présentation d'un peptide exogène par une CPA avec le CMH II et structure du CMH II.

Figure 7 : Mécanisme du rejet de greffe. (A) Rejet hyperaigu, (B) Rejet aigu, (C) Rejet chronique.

Figure 8 : Mécanismes d'immunité innée menant au rejet de greffe (CD= cellules dendritiques).

Figure 9 : Représentation du processus d'immunité adaptative conduisant au rejet de transplantation.

Figure 10 : Reconnaissance directe (A) et indirecte (B) des allo antigènes.

Figure 11 : Illustration de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

Figure 12 : Population de Treg : origine thymique et périphérique.

Figure 13 : Les différents mécanismes d'action des Treg naturels.

Figure 14 : Les différents types de thérapie cellulaire à base de Treg : (A) Treg polyclonaux, (B) Treg modifiés génétiquement.

Figure 15 : Structure du TCR (A) et du CAR (B).

Figure 16 : Cellule Treg exprimant un CAR, ciblant spécifiquement un antigène.

Figure 17 : Structure d'un récepteur chimérique CAR.

Figure 18 : Conception d'un fragment scFV.

Figure 19 : Les différentes générations de récepteur chimérique à l'antigène.

Figure 20 : Principe général supposé des CAR-Treg.

Figure 21 : Procédé de production global des CAR-Treg.

Figure 22 : Flux de fabrication actuel des produits CAR-Treg et défis associés.

Figure 23 : Exemple d'intégration du gène CAR à l'aide d'un lentivirus.

Figure 24 : Intégration du CAR par système transposon/transposase.

Figure 25 : Résultats du critère principal rejet aigu confirmé par biopsie (BCAR), entre groupe de référence standard (RGT) et six essais de thérapie cellulaire (CTG). (A) Analyse en intention de traiter, (B) Analyse per protocole.

Figure 26 : Spécificité de l'activation des CAR-Treg par mesure de l'expression du CD69 sur les cellules CD4+.

Figure 27 : Capacité des CAR-Treg à inhiber l'activité des Tconv allogéniques.

Figure 28 : Évaluation de la Spécificité des CAR-Treg pour les sous-types de HLA-A02.

Figure 29 : Efficacité des CAR-Treg dans un modèle murin de GvHD xénogénique. (A) Scores de GvHD. (B) Courbes de survie.

Figure 30 : Évaluation immunohistochimique des cellules humaines CD45 et FOXP3.

Figure 31 : Survie des greffes de peau.

Figure 32 : (A) Viabilité des CAR-Treg en l'absence d'IL2 (B) Viabilité des CAR-Treg en présence d'une dose élevée d'IL2.

Figure 33 : Analyse de la sénescence des CAR-Treg TX200 en culture prolongée (A) Diminution de l'activité relative de la télomérase (B) Réduction de la longueur des télomères (C) Phénotypes de sous-populations de Treg après 54 jours de culture (Expression des marqueurs de sénescence CD57 et KLRG1) (E) Activité de la β -galactosidase acide de sénescence (SA- β -Gal).

Figure 34 : Etude de biodistribution *in vivo*. (A) Pourcentage de CAR-Treg dans le sang. (B) Persistance des CAR-Treg dans les différents tissus.

Figure 35 : Évaluation de la production de cytokines chez des souris NSG HLA-A02 recevant des CAR-Treg HLA-A02.

Figure 36 : Interaction avec le Tacrolimus *in vivo* (A) Effet du Tacrolimus sur les PBCM (B) Effet du Tacrolimus sur les CAR-Treg.

Figure 37 : Mécanisme d'action supposé des CAR-Treg dirigés contre HLA-A02.

Figure 38 : Schéma d'une transplantation rénale d'un donneur HLA-A02 (+) avec un receveur HLA-A02(-).

Figure 39 : Etapes et groupes de l'étude STEADFAST.

Figure 40 : Production de CAR-Treg allogéniques.

Liste des tableaux

Table 1 : Classification de l'IRC.

Table 2 : Les six thérapies CAR-T avec AMM européenne.

Table 3 : Fréquence des "mismatches" d'antigènes HLA-A spécifiques sur les 8722 "mismatches" HLA-A totaux dans l'allocation Eurotransplant 2017-2019.

Introduction

L'insuffisance rénale chronique constitue un enjeu majeur de santé publique, engendrant la nécessité d'une transplantation rénale pour pallier la défaillance des fonctions essentielles du rein lors des stades les plus sévères. Cependant, la transplantation d'un organe sain, bien que représentant une stratégie thérapeutique efficace, rencontre de nombreux défis, notamment la pénurie des dons d'organes et le développement de réactions immunologiques entre le rein transplanté et le receveur. En effet, le système immunitaire du patient peut reconnaître les cellules du greffon comme un corps étranger, entraînant ainsi des mécanismes d'allo-immunisation pouvant aboutir au rejet de l'organe greffé. Pour contrôler et réduire ces réponses immunitaires, des combinaisons de traitements immunosuppresseurs sont administrées aux patients. Leur utilisation au long cours entraîne une immunosuppression généralisée, augmentant le risque d'infections, de cancers et d'autres complications liées à une immunité affaiblie.

Dans ce contexte, les approches innovantes telles que les thérapies cellulaires et géniques ont émergé comme des alternatives potentielles aux immunosuppresseurs traditionnels. C'est en particulier le cas de l'utilisation de lymphocytes T régulateurs (Treg), qui sont des cellules au fort potentiel immunomodulateur. Ces thérapies visent à induire une tolérance immunologique spécifique au greffon, minimisant ainsi les effets indésirables associés à l'immunosuppression non ciblée. Parmi ces nouvelles stratégies, l'approche par CAR-Treg, qui consiste à utiliser des Treg exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR) constitue une piste intéressante. Cette stratégie d'ingénierie cellulaire vise à cibler précisément les cellules du greffon, offrant une réponse immunitaire mieux régulée et plus ciblée tout en limitant le risque de rejet.

L'objectif de ce travail est donc d'explorer cette avancée prometteuse à travers trois sections distinctes. La première partie s'intéressera à l'insuffisance rénale, aux principes de la transplantation rénale et aux mécanismes de rejet. La deuxième partie se concentrera sur le développement et les spécificités des cellules CAR-Treg. Enfin, la troisième partie examinera les applications concrètes des CAR-Treg dans le contexte de la transplantation rénale, en discutant notamment des résultats récents, ainsi que des défis biologiques et techniques rencontrés.

Partie I : La transplantation comme traitement de l'insuffisance rénale terminale

1. Les insuffisances rénales : définition, épidémiologie et étiologies

1.1. Contexte général sur l'insuffisance rénale

L'insuffisance rénale (IR) est une affection caractérisée par une diminution de la capacité des reins à effectuer leurs fonctions essentielles. Ces fonctions comprennent la filtration et l'excrétion des produits métaboliques du sang, la régulation des électrolytes, de la pression artérielle, et le maintien de l'équilibre acido-basique. L'insuffisance rénale peut être aiguë ou chronique, selon la durée avec laquelle la fonction rénale se détériore (1).

1.1.1. Anatomie

Situés en position rétro-péritonéale, les reins constituent des organes bilatéraux essentiels au sein de l'appareil urinaire humain. Morphologiquement, ces organes ont la forme typique d'un haricot, avec une longueur avoisinant les 12 centimètres et un poids approximatif de 160 grammes pour chaque rein.

Les néphrons (*Figure 1*), qui constituent les unités fonctionnelles du rein, jouent un rôle essentiel dans ce processus de filtration. Chaque rein en contient environ un million. Ils débutent par les glomérules, des ensembles capillaires où le sang est initialement filtré. L'ultrafiltrat produit est ensuite conduit à travers un système complexe de tubules rénaux, incluant le tubule proximal, la boucle de Henle, le tubule distal et le tube collecteur. Ces structures facilitent la réabsorption sélective de l'eau et des solutés essentiels, ainsi que l'excrétion des déchets, régulant ainsi divers équilibres physiologiques essentiels, tels que ceux des fluides et des électrolytes, et contribuant à la régulation de la pression artérielle (2).

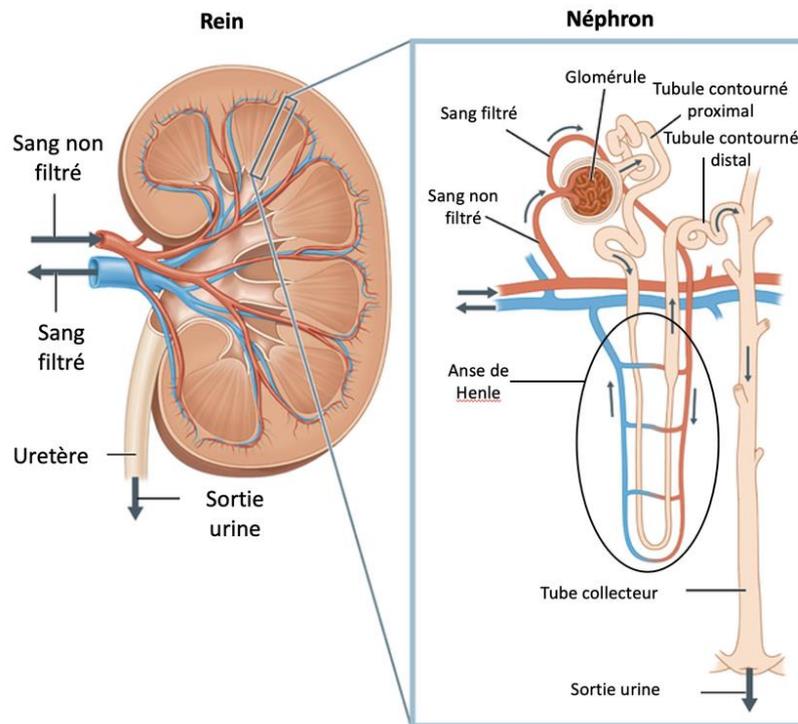


Figure 1 : Structure du rein et des néphrons (3)

La vascularisation rénale est assurée principalement par les artères rénales, responsables de la perfusion d'un volume considérable de sang, estimé à 1 700 litres quotidiennement. Ce mécanisme permet aux reins de filtrer l'intégralité du volume sanguin, garantissant ainsi une épuration continue du milieu intérieur (1).

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est un indicateur clé de l'activité rénale, mesurant le volume de liquide filtré par le rein par unité de temps. En pratique clinique, la clairance de la créatinine mesurée à partir de la collecte d'urine de 24 heures ou calculées par des formules spécifiques comme celle du CKD-EPI qui permet d'estimer le DFG. Chez les individus caucasiens avec une pression artérielle normale, le DFG se situe au minimum à $90 \text{ mL/min/1,73m}^2$, et nécessite un ajustement par un facteur de 1,15 chez les personnes de type africain pour refléter des variations physiologiques. Le DFG tend à diminuer avec l'âge et est affecté par diverses pathologies rénales (4).

La régulation du débit sanguin rénal (DSR) est un autre mécanisme clé qui interagit étroitement avec le DFG pour ajuster le flux sanguin en réponse aux besoins métaboliques du corps. Ce système complexe comprend les artérioles afférentes et efférentes qui ajustent le flux sanguin vers et depuis les glomérules, modulant ainsi la pression intra-glomérulaire et le taux de filtration. Cette régulation fine permet une adaptation optimale de la fonction de filtration en fonction des variations physiologiques et des demandes métaboliques.

1.1.2. Fonctions rénales

Les fonctions rénales se caractérisent par une diversité de processus physiologiques critiques incluant :

- La filtration glomérulaire, visant à épurer le sang des déchets métaboliques, suivie de l'excrétion de ces substances par l'urine tout en réabsorbant les éléments indispensables à l'homéostasie corporelle ;
- La régulation de la composition ionique du plasma (notamment les concentrations en sodium, potassium, et autres électrolytes), essentielle au maintien de l'équilibre osmotique et acido-basique ;
- L'ajustement de la pression artérielle, grâce notamment à la modulation du volume extracellulaire ;
- La conversion de la vitamine D en sa forme active, facilitant ainsi l'absorption intestinale du calcium et son incorporation dans la matrice osseuse ;
- La synthèse d'érythropoïétine, hormone permettant la régulation de l'érythropoïèse et donc, la production continue de globules rouges.

Lorsque les reins sont défaillants, on assiste à un tableau clinico-biologique d'insuffisance rénale, marqué par une incapacité des organes à assumer leurs fonctions. Cette pathologie se traduit par une rétention nocive de déchets métaboliques et de fluides, engendrant une altération significative de l'état de santé général (5).

1.2. Insuffisance rénale aiguë (IRA)

L'insuffisance rénale aiguë (IRA), est une condition soudaine et souvent réversible où les reins perdent rapidement leur capacité à filtrer les déchets du sang. Ce dysfonctionnement transitoire peut survenir sur une période de quelques heures à quelques jours, entraînant une accumulation de produits de déchet dans le sang (azotémie) et souvent une diminution du débit urinaire (oligurie). Dans certains cas, le recours à la dialyse peut devenir indispensable pour pallier aux défaillances fonctionnelles des reins (6).

Les insuffisances rénales aiguës peuvent être systématisées en trois grandes catégories (7):

- IRA pré-rénale : provoquée par des facteurs exogènes n'affectant pas directement les tissus rénaux, cette catégorie inclut des conditions menant à une réduction de la perfusion rénale. Les causes fréquentes sont l'hypovolémie, souvent due à une hémorragie ou à la déshydratation, l'insuffisance cardiaque, et certains médicaments.
- IRA rénale (ou intrinsèque) : cette catégorie fait référence aux lésions rénales directes causées par des processus inflammatoires, des agents toxiques, des médicaments, des infections ou une ischémie. Parmi les pathologies spécifiques, on retrouve la glomérulonéphrite, la pyélonéphrite aiguë, la rhabdomyolyse et les néphropathies d'origine toxique.
- IRA post-rénale : concerne les obstructions du flux urinaire situées en aval des reins. Les obstacles fréquemment rencontrés incluent les lithiases rénales, les tumeurs, l'hypertrophie prostatique, ou d'autres anomalies structurelles affectant les voies urinaires.

On sait aujourd'hui que le processus d'autoréparation rénale n'est pas toujours complet et qu'une "mémoire" de l'agression initiale peut persister, ce qui peut influencer le rétablissement fonctionnel à long terme. Les patients souffrant d'IRA peuvent récupérer une fonction rénale normale avec un traitement adapté, mais la surveillance continue est fondamentale pour détecter et gérer les séquelles potentielles (6).

1.3. Insuffisance Rénal Chronique (IRC)

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est un trouble progressif marqué par une détérioration irréversible de la fonction rénale. Cette pathologie se manifeste par une diminution de l'efficacité des reins sur une période d'au moins trois mois. On distingue cinq phases de l'IRC, classées selon le débit de filtration glomérulaire (DFG), cette mesure permet d'évaluer la gravité de la maladie. Les pathologies rénales évoquées ci-dessous peuvent être le résultat de processus pathologiques variés, incluant des mécanismes inflammatoires, dégénératifs, ou encore génétiques. Le diagnostic de ces affections se fait généralement à travers l'analyse de prélèvements sanguins et urinaires, ou bien par l'évaluation de la pression artérielle.

1.3.1. Épidémiologie de l'Insuffisance Rénale Chronique

En France, l'insuffisance rénale chronique représente un enjeu majeur de santé publique, touchant une part significative de la population. Actuellement, on estime que 7 à 10% de la population française souffre d'une maladie rénale susceptible d'évoluer vers une insuffisance rénale (8). Cette pathologie se manifeste souvent tardivement, après plusieurs années d'évolution asymptomatique, rarement avant l'âge de 45 ans, avec une prévalence accrue après 65 ans. En 2021, le nombre de personnes atteintes d'IRC nécessitant un traitement par dialyse ou transplantation s'élevait à 92 535, selon le Réseau épidémiologie et information en néphrologie (REIN), qui répertorie les patients pris en charge pour insuffisance rénale chronique terminale. Parmi ces personnes, 44,5% étaient porteurs d'un greffon rénal, et 55,5% étaient en dialyse (9).

Le nombre de nouveaux cas d'IR augmente chaque année de 2%, principalement chez les personnes de plus de 75 ans et les diabétiques (1,9).

En 2021, le taux de mortalité des patients sous traitement était de 10 %, et n'a pas évolué de façon significative entre 2008 et 2019 (9).

Malgré ces chiffres alarmants, une grande partie de la population atteinte d'IR reste asymptomatique et non diagnostiquée, estimée à environ 10% des Français. Cette "partie immergée de l'iceberg" souligne l'importance d'un dépistage systématique chez les sujets à risque, notamment les hypertendus, les diabétiques, et les personnes âgées de plus de 60 ans, pour ralentir la progression de la maladie et réduire la nécessité de recourir à la dialyse ou à la transplantation, traitements lourds et coûteux engagés pour plus de 82 000 personnes en France (9).

1.3.2. Les différents stades de l'Insuffisance Rénale Chronique

Les cinq stades de l'IRC représentent une classification basée sur le déclin progressif de la fonction rénale, mesurée par le débit de filtration glomérulaire. Cette mesure reflète la capacité des reins à filtrer et à éliminer les déchets du sang.

Les 5 stades de l'IRC sont décrits dans la table suivante :

Stade	DFG (mL/min/1.73 m ²)	Définition	Gestion
1	≥ 90	Maladie rénale chronique* avec DFG normal ou augmenté	Identification et traitement de la cause, comme l'hypertension et le diabète, pour ralentir la progression de la maladie.
2	Entre 60 et 89	Maladie rénale chronique* avec DFG légèrement diminué	Continuer à surveiller et traiter les facteurs de risque, encourager un régime alimentaire sain et surveiller la progression de la maladie.
3A	Entre 45 et 59	Insuffisance rénale chronique modérée	Prévenir et réduire les symptômes et complications. Prendre des mesures de protection du capital veineux (stade 3B). Assurer la meilleure qualité de vie possible et prévoir une consultation de diététique
3B	Entre 30 et 44		
4	Entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère	Préparation pour le traitement de remplacement rénal (dialyse ou transplantation rénale) et gestion des complications.
5	< 15	Insuffisance rénale chronique terminale	Les reins ne fonctionnent presque plus. Les démarches de dialyse ou de transplantation sont envisagées

**Avec marqueurs d'atteinte rénale comme albuminurie, hématurie, leucocyturie, ou anomalie morphologiques ou histologiques, ou marqueurs dysfonction tubulaire persistant plus de 3 mois (et à 2 ou trois examens consécutifs)*

Table 1 : Classification de l'IRC (10,11)

1.3.3. Principales étiologies

L'origine de l'IRC réside dans la perte progressive de néphrons fonctionnels, entraînant une baisse du DFG. Cette situation s'aggrave à cause de l'hyperfiltration des néphrons restants, provoquant une pression accrue au sein des glomérules et endommageant par la suite le tissu rénal. À mesure que l'efficacité rénale régresse, les reins ne parviennent plus à filtrer les déchets ni à maintenir l'équilibre hydrique et électrolytique de l'organisme, ce qui génère des complications à l'échelle du système.

Parmi les principales étiologies de l'IRC, on trouve (1,9):

- Les diabètes : Tant le diabète de type 1 que de type 2 peuvent induire une néphropathie diabétique, principale cause d'IRC. L'hyperglycémie diabétique peut induire une détérioration des glomérules, entraînant ensuite un dysfonctionnement des reins. Elle représente 22,7% des cas d'IR en 2021, comme le montre la *Figure 2*.
- L'hypertension artérielle (HTA) : L'HTA est la première cause d'IRC. Elle peut à la fois causer et aggraver les dommages rénaux en rétrécissant les petites artères du rein, qui peuvent se boucher, et en diminuant la vascularisation. La néphropathie hypertensive comptait en 2021 environ 25.1 % de nouveaux cas d'IR.
- Glomérulonéphrites primitives : qui correspondent à une inflammation des glomérules. Celle-ci concernait la majorité des néphropathies dans les années 1990, ne concerne maintenant que 10.4 % des patients (6).
- Pyélonéphrites : qui résultent d'infections bactériennes répétées dans les voies urinaires hautes, causées majoritairement par *Escherichia coli*. Ces infections peuvent entraîner une IRA si elles sont sévères et non traitées. À long terme, des épisodes récurrents de pyélonéphrites peuvent causer des lésions organiques conduisant à une IRC.
- Pathologies héréditaires : comme la polykystose rénale, caractérisée par l'apparition de kystes rénaux empêchant le fonctionnement normal du rein. C'est la maladie héréditaire affectant les reins la plus fréquente, et représente 6% des cas en France en 2021.
- Maladies auto-immunes inflammatoires : qui peuvent causer une atteinte des glomérules, comme le lupus ou la polyarthrite rhumatoïde.

Il est essentiel de souligner que l'hypertension artérielle et le diabète sont à l'origine d'environ la moitié des cas d'IRC (9). Ces affections entraînent des lésions des petites artères, provoquant ainsi la dégénérescence des glomérules rénaux et une détérioration marquée de la fonction rénale. D'où l'importance du dépistage précoce de la IRC chez les patients atteints d'hypertension ou de diabète, puisqu'une prise en charge rapide peut considérablement freiner l'évolution.

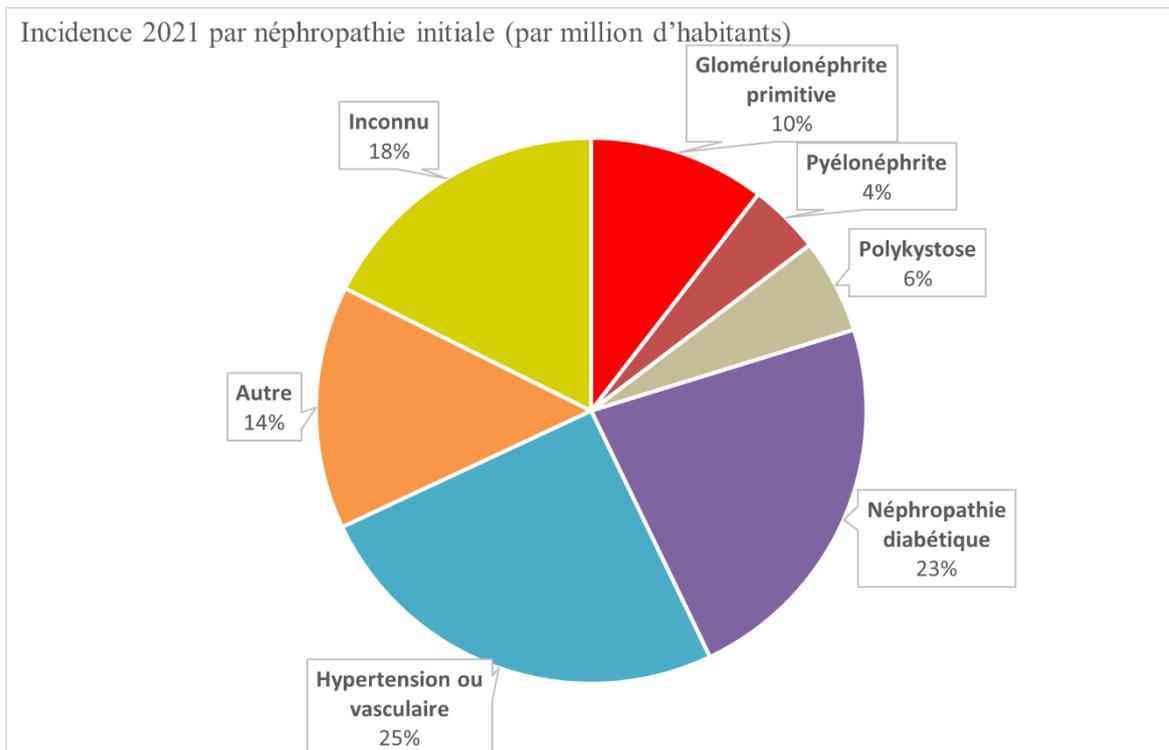


Figure 2 : Incidence des cas d'IRC en fonction de la maladie initiale (9).

1.4. Prise en charge de l'IRC

L'insuffisance rénale chronique présente une prévalence élevée, mais souffre d'un diagnostic souvent tardif. À la première consultation néphrologique, il est constaté que plus de la moitié des patients se trouvent déjà à un stade avancé de l'IRC, soit le stade 4, ce qui compromet l'efficacité de la prise en charge thérapeutique. Par ailleurs, entre 20 % et 35 % des individus débutant la dialyse ont été orientés vers un néphrologue moins de six mois avant l'initiation de leur traitement dialytique, soulignant ainsi les défis associés à un dépistage précoce (12).

Pour limiter la progression de la maladie, l'identification d'une affection rénale marque le début d'une stratégie visant à préserver la fonction rénale. Cette stratégie consiste principalement à minimiser l'inflammation, responsable des dommages dans les cas de glomérulonéphrite, et à administrer des agents néphroprotecteurs. Cette approche a pour but de prolonger la période avant

l'atteinte d'un stade avancé de l'insuffisance rénale, souvent de plusieurs mois voire années, dès le stade 3 de la maladie (13).

1.4.1. Mesures néphroprotectrices

Les mesures néphroprotectrices à mettre en place peuvent être les suivantes :

- Règles hygiéno-diététiques : arrêt du tabac, régime alimentaire adaptée (réduction des protéines animales, phosphore, potassium) ainsi qu'un exercice physique adapté ;
- Contrôle optimal de l'hypertension artérielle (pression artérielle < 140/90 mm Hg) : elle doit être contrôlée par un régime pauvre en sel, ainsi qu'un traitement hypotenseur ;
- Réduction des facteurs de risque cardiovasculaire ;
- Eviter les médicaments néphrotoxiques, ou adapter leur posologie ;
- Prescription de médicament incluant des agents stimulant l'érythropoïèse et des composés qui limitent l'absorption du phosphore, favorisent l'excrétion de l'eau et du sel par effet diurétique, rétablissent l'équilibre acido-basique, et garantissent un apport adéquat en vitamine D et en calcium.

Cependant, ces mesures néphroprotectrices préventives ne sont pas toujours suffisantes. Dans les situations les sévères, il conviendra d'adopter des stratégies complémentaires afin de pallier aux défaillances fonctionnelles du rein (13).

1.4.2. Pallier les défaillances fonctionnelles du rein

Comme décrit dans la partie 1.3.2, l'IRC se caractérise par cinq stades qui illustrent l'évolution de la détérioration rénale. Dans le cas du stade 5, appelé stade terminale, les reins ont perdu plus de 85 % de leur fonction de filtration glomérulaire (< 15 ml/min). Bien que certains patients puissent maintenir une certaine stabilité à ce stade pendant plusieurs années, il est souvent nécessaire de pallier la fonction rénale défaillante par des traitements de suppléance, c'est-à-dire par dialyse ou transplantation rénale.

Il existe 2 méthodes d'épuration du sang qui ont révolutionné la prise en charge de l'IRC (*Figure 3*):

- L'hémodialyse (*Figure 3a*): c'est une technique de filtration du sang par un circuit extracorporel, qui utilise une membrane artificielle afin d'épurer le sang durant des sessions de quatre heures, trois fois par semaine. Ce traitement nécessite l'administration d'érythropoïétine et l'adoption d'un régime alimentaire spécifique pour compenser les déséquilibres métaboliques non résolus par l'hémodialyse, tels que l'anémie et les déséquilibres phosphocalciques (14).
- La dialyse péritonéale (*Figure 3b*): cette technique fait appel au péritoine du patient en tant que membrane de filtration. Cette méthode, plus douce que l'hémodialyse, évite les chutes de tension et les crampes, offrant ainsi une meilleure tolérance. Un cathéter implanté dans l'abdomen permet l'échange du dialysat qui capte les déchets du sang. Les principales méthodes incluent la dialyse péritonéale continue ambulatoire, avec quatre échanges quotidiens, et la dialyse péritonéale automatisée, qui utilise un cycleur durant le sommeil. Bien que pratique et offrant une grande autonomie, cette technique présente des obstacles tels que les cicatrices internes, et des risques d'infections. De plus, la capacité filtrante du péritoine tend à décroître au fil du temps, réduisant généralement la période d'utilisation viable de cette méthode à environ cinq ans (15).

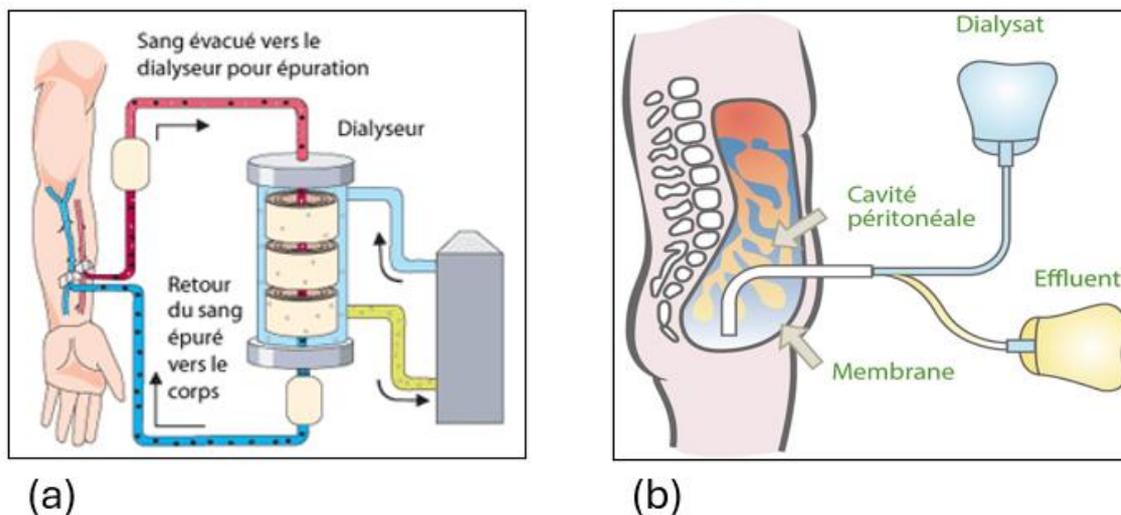


Figure 3 : Comparaison des méthodes de dialyse. (a) Schéma illustrant le processus d'hémodialyse(14). (b) Schéma représentant la technique de dialyse péritonéale (16)

L'hémodialyse existe aussi à domicile, elle modifie le protocole traditionnel en divisant les sessions en 6 séances hebdomadaires de 2 à 2h30, au lieu de 3 séances de 4 à 4h30. Cette méthode nécessite néanmoins une phase d'apprentissage, de la rigueur et de l'assiduité. Elle offre deux avantages majeurs :

- La facilité de gestion des séances plus courtes, ce qui réduit les variations ioniques et volémiques,
- Une nette amélioration de la qualité de vie, permettant une meilleure intégration des séances dans les activités professionnelles ou sociales grâce à la réduction du temps de récupération post-dialyse.

Idéale pour les patients jeunes et en bonne condition physique, souvent en attente de greffe, cette approche favorise l'autonomie dans la gestion de leur traitement (17).

Bien que les dialyses (hémodialyse et la dialyse péritonéale), soient des traitements essentiels pour les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique, elles ne pallient que partiellement les fonctions des reins sans toutefois les restaurer complètement. Ainsi, la transplantation rénale est souvent envisagée comme une alternative privilégiée lorsque les conditions du patient le permettent. En effet, la transplantation rénale peut offrir une solution à long terme, en rétablissant une fonction rénale plus normale et en permettant une libération substantielle des contraintes et des limitations associées aux régimes de dialyse. Cela permet non seulement d'améliorer significativement la qualité de vie, mais aussi de réduire les risques liés aux traitements à long terme de la dialyse (18).

2. La transplantation rénale comme traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale

2.1. Généralités

La transplantation rénale constitue le traitement de choix pour les personnes souffrant d'insuffisance rénale terminale (IRT), offrant une amélioration notable de la qualité et de l'espérance de vie. Cette procédure, qui consiste à greffer un organe sain provenant d'un donneur, permet aux patients de retrouver une fonction rénale plus naturelle et efficace, réduisant ainsi les complications à long terme associées à d'autres traitements comme la dialyse. Les bénéfices incluent une plus grande autonomie, moins de restrictions alimentaires et la capacité de reprendre des activités normales, contribuant à un meilleur état de santé général (19).

Cependant, malgré les avantages indéniables, la transplantation rénale exige la prise quotidienne de médicaments immunosuppresseurs, susceptibles de provoquer des complications telles que des infections ou une prédisposition à certains cancers (20). Par ailleurs, il existe des contre-indications à la transplantation rénale qui doivent être prises en compte. Les infections actives non contrôlées, les cancers actifs, les maladies cardiaques sévères, l'inaptitude à recevoir les traitements post-opératoires et des problèmes psychosociaux graves, comme les troubles de l'usage de substances non contrôlés, sont des facteurs qui peuvent rendre la greffe rénale inappropriée ou dangereuse pour certains patients (21).

Malgré des avancées médicales considérables réalisées au cours de ces dernières décennies dans le domaine de la transplantation, la survie à long terme des greffons rénaux ne s'est pas améliorée. De plus, avec 70% des greffons fonctionnels après 10 ans et 50% après 14 ans, la durabilité de la greffe est significative (6), mais elle est confrontée à un défi majeur : la pénurie de greffons disponibles. Selon le rapport du REIN (9), entre 2016 et 2021, sur 68 049 nouveaux patients en insuffisance rénale chronique terminale, seulement 9 783 (14 %) ont bénéficié d'une première greffe de rein dans un délai médian de 12 mois. Parmi eux, 2 659 (3,9 %) ont reçu une greffe préemptive. Cela souligne l'urgence de promouvoir le don d'organes, notamment à partir de donneurs vivants. La législation française permet le don de rein par des membres de la famille ou toute personne ayant un lien affectif étroit avec le receveur depuis au moins deux ans. Malgré cela, les greffes issues de donneurs vivants restent minoritaires, représentant moins de 20% des transplantations rénales effectuées (6).

2.2. Épidémiologie de la transplantation rénale en France

En 2021, les données du rapport REIN (9), ont mis en évidence plusieurs aspects significatifs de l'épidémiologie de la greffe rénale dans le pays (*Figure 4*).

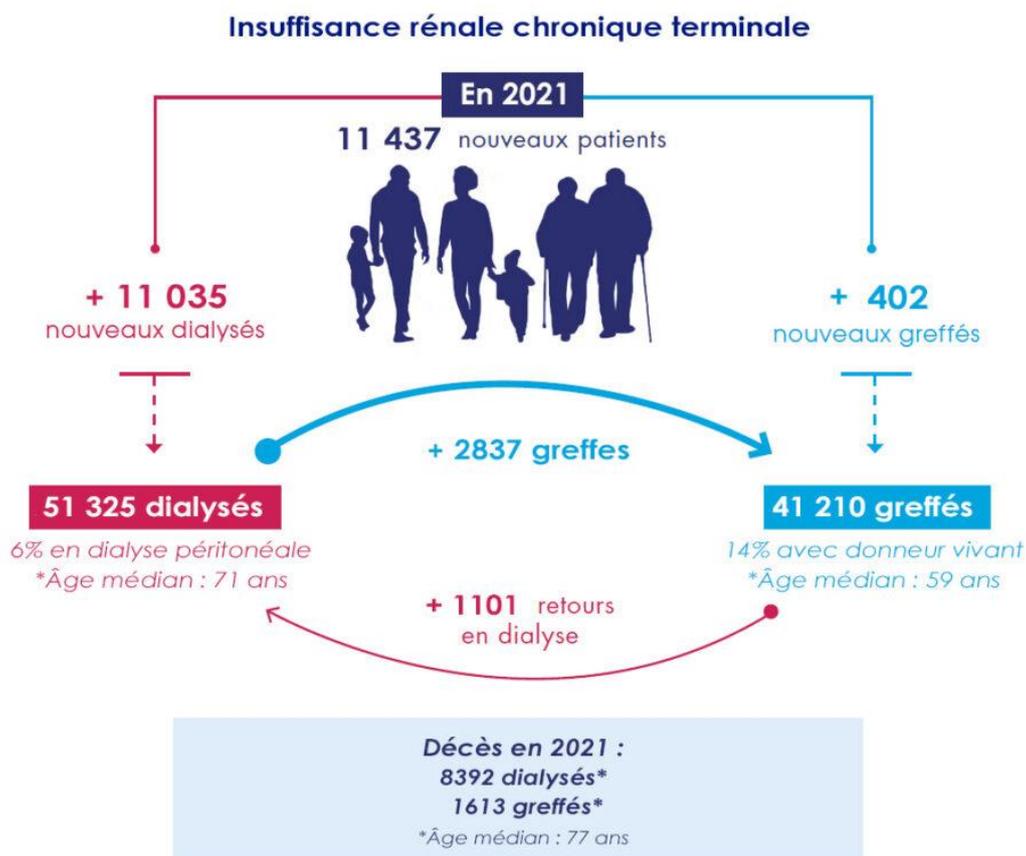


Figure 4 : Les chiffres clés de la maladie rénale, au stade de dialyse et de transplantation en 2021
(8)

En 2021, 11 437 cas d'IRT ont été diagnostiqués. Parmi eux, 11 035 ont commencé une dialyse, soit 96,5 % des nouveaux cas. Cela porte le total des patients sous dialyse à 51 325 pour l'année 2021. Parallèlement, 402 des nouveaux patients, soit environ 3,5 %, ont bénéficié d'une greffe préemptive, c'est-à-dire une transplantation avant de commencer la dialyse, augmentant ainsi le nombre total de patients greffés à 41 210 en 2021. De plus, parmi les patients en dialyse, 2 837, soit environ 5,5 % du total des patients dialysés, ont été transplantés durant l'année.

L'approche préemptive reflète une stratégie thérapeutique émergente visant à améliorer les résultats de santé des patients. Toutefois, malgré les progrès dans le domaine de la transplantation rénale, l'année 2021 a vu 1 101 patients retourner en dialyse après une greffe, soulignant les défis persistants associés à cette procédure. La mortalité reste également élevée au cours de l'IRC, avec 10 005 décès recensés parmi les patients dialysés ou greffés. Parmi ces décès, 1 613 concernent les patients greffés et 8 392 les patients dialysés, indiquant un taux de mortalité plus élevé dans le groupe des patients dialysés. Bien que la spécificité des causes de décès liées directement à la greffe ne soit pas détaillée.

Le temps d'attente pour un greffon varie selon plusieurs facteurs, dont le groupe sanguin du patient. Statistiquement, 31 % des patients sont greffés dans l'année suivant leur inscription sur la liste d'attente, 39 % entre la première et la troisième année, et 15 % après cinq ans (21).

L'importance de la greffe rénale en tant qu'option de traitement pour l'insuffisance rénale est indéniable. Le bilan REIN de l'année 2021 a mis en lumière la dynamique changeante et les défis de la greffe rénale en France, offrant des perspectives cruciales pour les politiques de santé publique et les stratégies de prise en charge des patients.

2.3. Processus de la transplantation rénale

2.3.1. Identification du donneur

L'évaluation du donneur et du receveur est fondamentale dans le processus de transplantation rénale, afin d'assurer une compatibilité immunologique optimale et de minimiser le risque de rejet du greffon.

La transplantation peut être envisagée tant après le début de la dialyse qu'avant, spécifiquement lorsque le DFG, est inférieur à 20 ml/min/1,73m². L'option d'une greffe devient d'autant plus accessible lorsqu'un proche se propose comme donneur vivant.

La réussite de la greffe dépend étroitement de la compatibilité entre les caractéristiques biologiques du donneur et du receveur, notamment le groupe sanguin et d'autres marqueurs immunologiques. Ces aspects seront décrits dans la partie 3 de ce manuscrit (21).

2.3.2. Déroulement d'une greffe rénale

Le déroulement d'une greffe rénale implique plusieurs étapes clés. Pour les greffons issus de donneurs décédés, l'Agence de Biomédecine joue un rôle central en attribuant les organes disponibles selon des critères d'attribution nationaux, tout en veillant à la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur. Une fois le rein prélevé par une équipe chirurgicale spécialisée, il est transporté d'urgence vers l'hôpital du receveur, où une vérification finale de la compatibilité est effectuée avant la transplantation. Le greffon est généralement implanté dans la fosse iliaque droite du receveur, nécessitant le raccordement aux artères, veines et au système urinaire pour assurer son fonctionnement.

Dans le cas d'une greffe à partir d'un donneur vivant, le processus est différent car le rein est prélevé sur le donneur dans une salle opératoire adjacente à celle où le receveur est préparé pour la transplantation. Cette approche synchronisée minimise le temps pendant lequel le greffon est en dehors du corps, maximisant ainsi les chances de succès de la greffe (21).

2.3.3. Suivi post-opératoire et gestion du rejet : utilisation d'immunosuppresseurs

Le suivi post-opératoire d'une greffe rénale est une phase critique qui débute par une période d'hospitalisation de 2 à 4 semaines, essentielle pour une première phase de récupération et d'éducation du patient. Avant la sortie de l'hôpital, l'équipe médicale s'assure de transmettre des informations détaillées sur la nécessité d'une prise régulière et au long court de médicaments immunosuppresseurs. Ces derniers sont vitaux pour le maintien de la fonctionnalité du greffon en prévenant son rejet par le système immunitaire du receveur (21).

Un suivi médical rigoureux et continu est impératif pour surveiller l'état de santé du receveur et le bon fonctionnement du greffon. Ce suivi inclut des examens cliniques et biologiques réguliers, programmés à des dates précises, ainsi que la réalisation d'une ou plusieurs biopsies rénales au besoin. Indépendamment de l'origine du greffon, un régime de médicaments immunosuppresseurs est instauré immédiatement après la transplantation pour prévenir le rejet de l'organe transplanté. Ces traitements sont nécessaires pour le maintien à long terme de la fonction du greffon et nécessitent une adhésion stricte de la part du patient.

Dans le contexte des transplantations d'organes solides, les protocoles médicaments sont bien établis avec l'objectif d'avoir des effets synergiques entre les différentes molécules tout en réduisant la toxicité propre à chaque drogue.

2.3.3.1. Principaux traitements immunosuppresseurs

Il existe différentes catégories qui sont décrites ci-dessous. Les mécanismes d'action sont résumés dans la *Figure 5*.

- Corticostéroïdes : tels que la prednisone, sont des agents fondamentaux dans les régimes d'immunosuppression post-transplantation, en raison de leurs puissants effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. L'efficacité anti-inflammatoire des corticostéroïdes repose en grande partie sur l'inhibition de la phospholipase A2 (PLA2), une enzyme clé dans le processus inflammatoire. Sur le plan de l'immunosuppression, les corticostéroïdes agissent en réduisant l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-2 (IL-2). Ces cytokines permettent l'activation et la régulation des réponses immunitaires, et leur diminution aide à prévenir le rejet du greffon. De plus, les corticostéroïdes limitent la présentation antigénique par les monocytes, les macrophages et les cellules NK, réduisant ainsi l'activation de l'immunité cellulaire (22).
- Inhibiteurs de Calcineurine : comme la ciclosporine et le tacrolimus, ciblent spécifiquement la calcineurine, une phosphatase essentielle à l'activation des lymphocytes T. Ces médicaments se fixent à des récepteurs cytoplasmiques spécifiques, connus sous le nom d'immunophilines : la cyclophiline pour la ciclosporine et la FKBP (FK-binding protein) pour le tacrolimus. Cette liaison forme un complexe qui inhibe ensuite l'activité de la calcineurine. Il en résulte tout d'abord une diminution de la transcription des gènes codant pour l'IL2 ou pour la molécule de costimulation CD40, ce qui induit une inhibition de la réaction immune.
- Inhibiteurs de mTOR : comme le sirolimus et l'évérolimus, agissent spécifiquement la voie de signalisation mTOR, jouant un rôle central dans la prolifération cellulaire et la survie des cellules immunitaires. Ces médicaments agissent en se fixant à l'immunophiline FKBP de mTOR, formant ainsi un complexe inhibiteur. Ce complexe bloque le signal 3 d'activation des lymphocytes, essentiel pour la prolifération cellulaire induite par la fixation de IL2 sur son récepteur. Cette inhibition de mTOR conduit à un effet antiprolifératif marqué, réduisant ainsi l'expansion des lymphocytes T.

- Agents Antimétabolites : comme le mycophénolate mofétil (MMF) et l'azathioprine ; ils inhibent la synthèse purique, jouant un rôle essentiel dans l'entrave à la prolifération des lymphocytes. Ces médicaments fonctionnent par blocage des enzymes nécessaires à la synthèse de nucléotides puriques, mais avec des mécanismes distincts. L'azathioprine se transforme dans l'organisme en métabolites actifs, notamment la 6-mercaptopurine et la 6-thiomercaptopurine. Ces métabolites affectent les voies *de novo* et de sauvetage de la synthèse de nucléotides puriques, et peuvent intégrer directement l'ADN, induisant potentiellement des lésions génomiques. Ce médicament présente ainsi un effet relativement large. D'autre part, le mycophénolate mofétil est converti en acide mycophénolique, qui possède une action plus spécifique et ciblée. Cet acide inhibe exclusivement l'inosine monophosphate déshydrogénase, une enzyme clé dans la voie *de novo* de la synthèse des nucléotides puriques, principalement chez les lymphocytes. Dans ces cellules, contrairement à d'autres types cellulaires, la voie de sauvetage n'est pas efficace, conférant à l'acide mycophénolique une sélectivité élevée et une efficacité particulière dans la prévention du rejet de greffe (22).
- Les anticorps monoclonaux anti-CD25 : comme le basiliximab, ciblent spécifiquement la sous-unité alpha du récepteur de IL-2, communément appelée CD25. Cette sous-unité est principalement exprimée sur les lymphocytes T activés. En se liant à CD25, ces anticorps empêchent l'interaction de l'IL-2 avec son récepteur. En bloquant cette interaction, le basiliximab inhibe efficacement la prolifération des lymphocytes T activés, réduisant ainsi le risque de réaction immunitaire contre le greffon (22).
- Protéine de fusion : comme le Bélatacept, est constituée du domaine extracellulaire modifié de l'antigène 4 cytotoxique associé aux lymphocytes T et le fragment Fc d'une immunoglobuline G1 humaine. Cette conception lui permet de se lier spécifiquement aux récepteurs CD80 et CD86 qui sont exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). En se fixant à ces récepteurs, le Bélatacept bloque la costimulation nécessaire à l'activation des lymphocytes T (22).

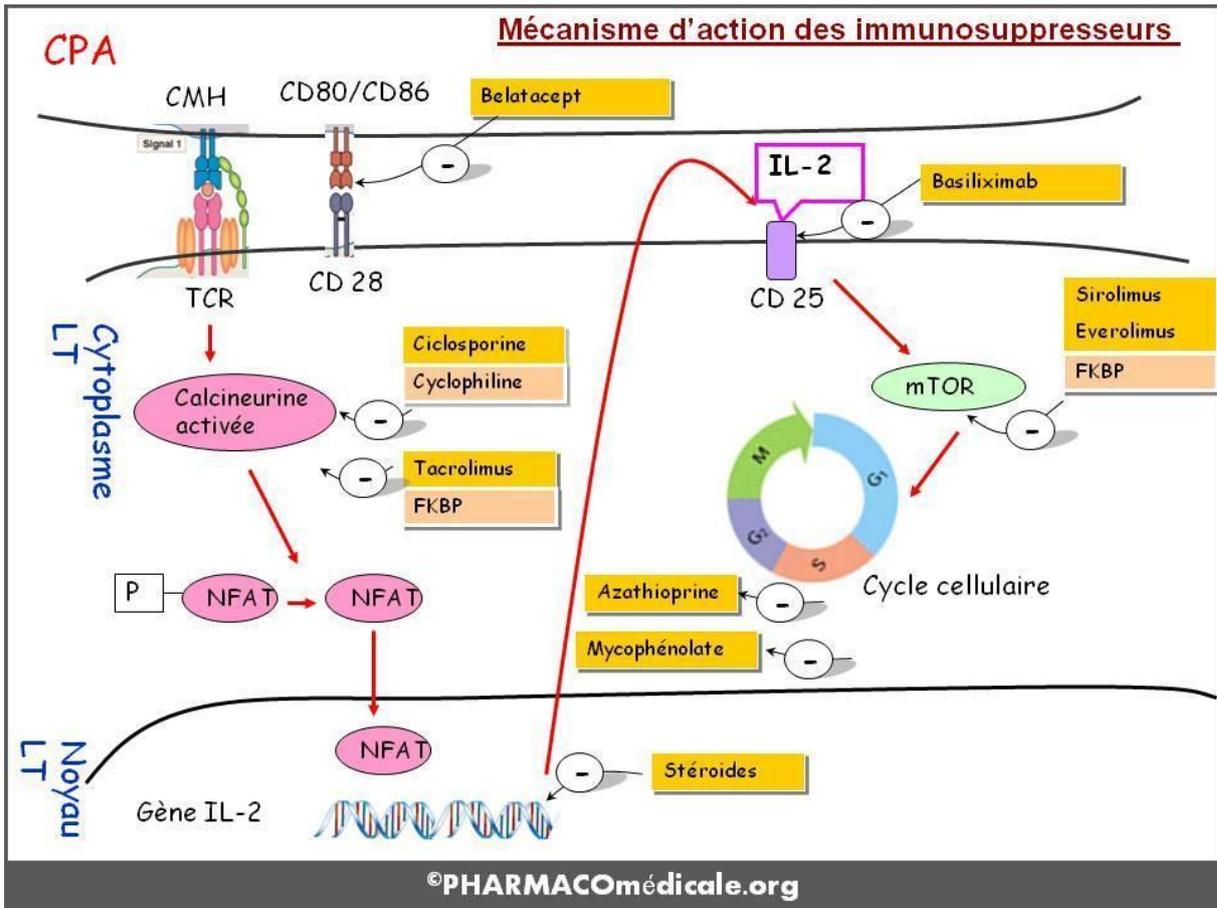


Figure 5 : Mécanisme d'action des immunosuppresseurs (22)

2.3.3.2. Stratégie thérapeutique

Les protocoles d'immunosuppression en transplantation se structurent en plusieurs étapes, adaptées aux besoins spécifiques du patient transplanté :

- Phase induction ou traitement d'attaque : utilisation d'une quadrithérapie durant la période initiale, où le risque de rejet aigu est plus élevé, nécessitant souvent une administration puissante lors des opérations, avec possibilité de ré-administration post-opératoire.
- Traitement d'entretien : Commence 4 à 6 semaines après la transplantation et se poursuit à vie sous forme de trithérapie, cherchant à maintenir un équilibre entre éviter une sous-immunosuppression, qui peut conduire à un rejet, et la sur-immunosuppression, source de complications supplémentaires.

- Gestion des épisodes de rejet aigu : Mise en œuvre d'un traitement curatif spécifique pour adresser et résoudre les épisodes de rejet aigu, assurant la survie du greffon.

La sélection et le dosage de ces molécules sont personnalisés pour chaque patient, en tenant compte de différents facteurs comme le type de greffon, les conditions médicales préexistantes, le risque de rejet et les effets secondaires potentiels. C'est un traitement à vie mais qui reste adapté au risque immunologique : ainsi l'immunosuppression est très puissante à l'initiation puis s'allège au cours du temps.

Les agents immunosuppresseurs, bien qu'essentiels pour prévenir le rejet du rein greffé, ne ciblent pas spécifiquement le greffon. Leur action est globale, entraînant une suppression de l'ensemble du système immunitaire. Cette caractéristique des médicaments immunosuppresseurs conduit à des conséquences potentiellement graves, notamment un risque accru d'infections et d'autres affections sévères. De plus, ces médicaments augmentent significativement le risque de développer certains types de cancer, particulièrement ceux associés à des virus oncogènes comme le virus d'Epstein-Barr, qui peut provoquer divers lymphomes, ou le papillomavirus humain, lié aux cancers anogénitaux. Le risque global de cancer chez les patients transplantés est de deux à quatre fois plus élevé que dans la population générale (20). En outre, les receveurs d'une greffe de rein sont contraints à l'administration à long terme de ces médicaments immunosuppresseurs, pendant toute la durée de vie du rein greffé. Cette exigence soulève la nécessité de développer des approches alternatives visant à faciliter l'acceptation de l'organe transplanté par l'organisme, tout en réduisant la dépendance aux traitements immunosuppresseurs. L'exploration de telles stratégies pourrait non seulement améliorer la qualité de vie des patients greffés mais également réduire l'iatrogénie des immunosuppresseurs à long terme.

3. Histocompatibilité dans la transplantation

L'histocompatibilité entre donneur et receveur est déterminante pour le succès des transplantations. Essentielle pour éviter le rejet, cette compatibilité repose sur les similitudes génétiques entre le donneur et le receveur, en particulier leur capacité à reconnaître les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

3.1. Bases immunologiques dans la transplantation rénale

La transplantation rénale met en lumière l'importance de la concordance immunologique entre le donneur et le receveur, principalement sur compatibilité du CMH, aussi connu chez l'Homme sous le nom de système des antigènes leucocytaires humains (ou Human Leukocyte Antigen : HLA en anglais). Ce système, indispensable pour l'immunité, a été découvert par J.Dausset en 1958 (23) est codé par des gènes sur le chromosome 6 qui codent pour molécules de surface cellulaires spécialisées dans la présentation des peptides antigéniques au récepteur des lymphocytes T (TCR) sur les lymphocytes T. Le destin d'un transplant dépend majoritairement de l'histocompatibilité entre donneur et receveur (24).

3.1.1. Rôle du CMH

Le CMH, présent chez tous les vertébrés, est un ensemble de gènes codant pour des molécules situées sur la surface des cellules, indispensables pour le système immunitaire puisqu'elles présentent les antigènes aux cellules immunitaires. Cela permet la reconnaissance et l'élimination des agents pathogènes ou des cellules altérées.

3.1.2. Gènes et molécules du système HLA

Les gènes du HLA comprennent trois principales régions (25) :

- Classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) : (*Figure 6A*) qui codent pour des molécules exprimées sur la surface de presque toutes les cellules nucléées. Composées de deux chaînes polypeptidiques, α et β , ces molécules CMH de classe I jouent un rôle clé dans la présentation des antigènes aux cellules T CD8+, essentielles pour initier des mécanismes de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines pour éliminer les cellules infectées ou altérées. Elles présentent préférentiellement des peptides dérivés de la décomposition de protéines endogènes localisées dans le cytoplasme cellulaire. Ces peptides peuvent être issus de protéines intracellulaires normales (représentant le soi), de protéines altérées (telles que les protéines cancéreuses) ou de protéines d'origine virale. La chaîne α , polymorphique et codée par les gènes HLA-A, HLA-B, et HLA-C, est divisée en trois domaines immunoglobuline-like : $\alpha 1$, $\alpha 2$, et $\alpha 3$. Ces deux premiers domaines forment la région de liaison au peptide antigénique, une cavité où se logent les peptides. La chaîne β , connue sous le nom de $\beta 2$ -microglobuline, est non-polymorphique et stabilise la conformation de la molécule avec un domaine immunoglobuline-like. Elle n'est pas traduite à partir des gènes du système HLA. Enfin, la structure est complétée par une région transmembranaire et une région intra-

cytoplasmique, conférant à ces complexes une capacité unique de signalisation et d'interaction avec les cellules immunitaires (24)(26).

- Classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP): (*Figure 6B*) codent pour des molécules principalement localisées sur les cellules présentatrices de l'antigène (monocytes/macrophages, cellules dendritiques, les lymphocytes B). Elles présentent aux cellules T CD4⁺ des peptides provenant de protéines exogènes, telles que les protéines de bactéries à développement extracellulaire, les protéines sécrétées et les débris cellulaires. Ces protéines sont capturées par la cellule via divers processus tels que la phagocytose, l'endocytose ou la pinocytose. Composées de deux chaînes polypeptidiques α et β , toutes deux présentant des domaines immunoglobuline-like, ces molécules du CMH-II sont associées de manière non covalente. La chaîne α inclut les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, tandis que la chaîne β comprend les domaines $\beta 1$ et $\beta 2$. Ensemble, les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment la région de liaison au peptide antigénique, qui accueille le peptide antigénique dans une cavité structurée. Les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$, constituant la région immunoglobuline-like, sont impliqués dans la fixation au CD4. En complément, la structure du CMH-II comprend une région transmembranaire formée par les segments des deux chaînes et une région intracytoplasmique, également bipartite, essentielle pour la signalisation et l'interaction cellulaire (24)(26).

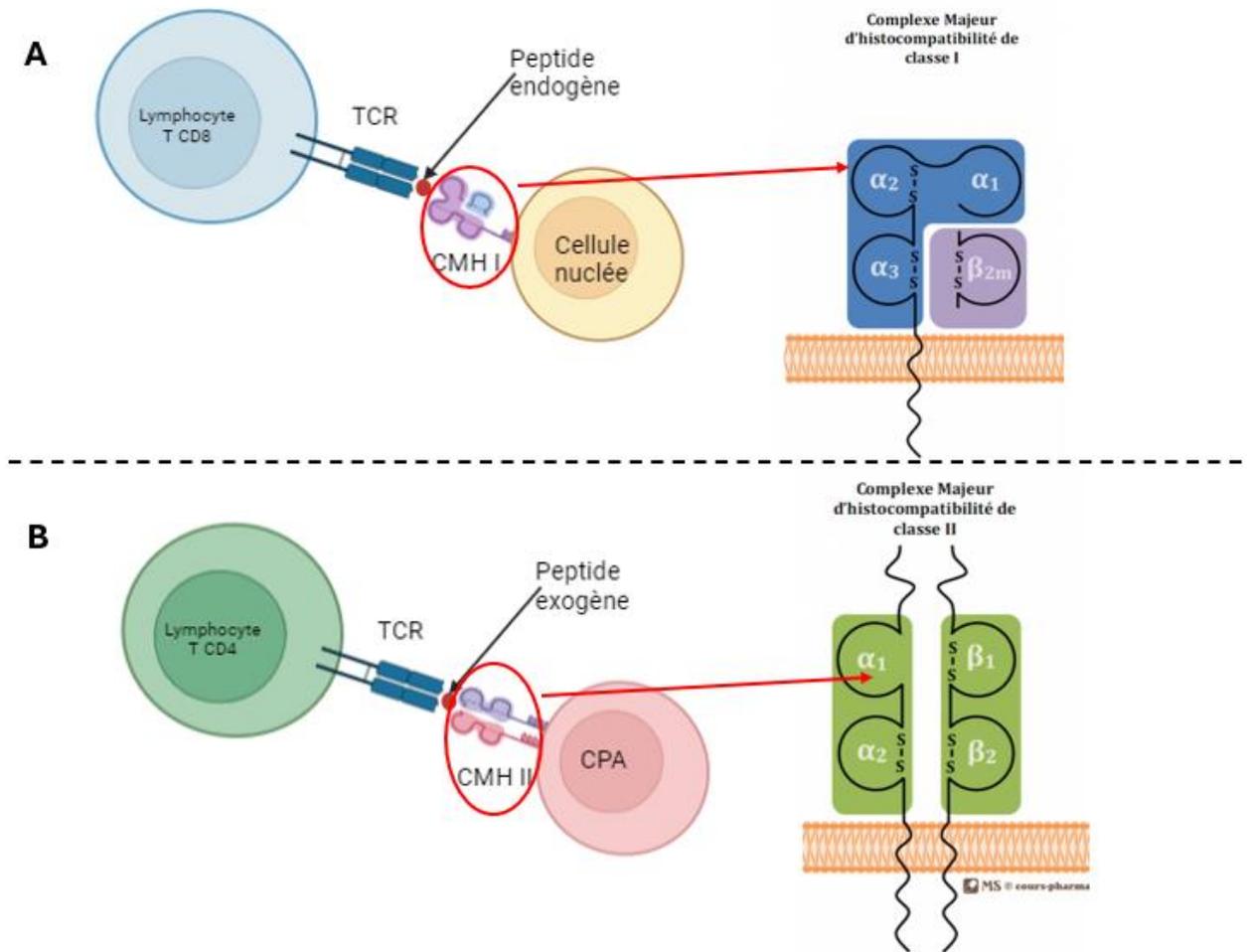


Figure 6 : Présentation d'un antigène à un lymphocyte T. (A) Présentation d'un peptide endogène par une cellule nucléée grâce au CMH I et structure de CMH I. (B) Présentation d'un peptide exogène par une CPA avec le CMH II et structure du CMH II (26)

Ces molécules HLA jouent un rôle fondamental dans la distinction entre les protéines du "soi" et du "non-soi", capables de lier et de présenter un peptide à la fois. Cependant, elles peuvent interagir avec une variété de peptides partageant des résidus d'acides aminés spécifiques, permettant à une molécule HLA unique de présenter de multiples peptides au fil du temps.

3.2. Compatibilité HLA donneur/receveur pour la transplantation

La compatibilité HLA entre donneur et receveur est essentielle pour éviter le rejet de l'organe transplanté. Une incompatibilité peut déclencher l'activation d'une réponse immunitaire allogénique, conduisant au rejet du greffon. Cette exigence souligne l'importance de tests de compatibilité HLA sensibles et reproductibles avant la transplantation pour maximiser les chances de succès (27).

Les gènes du système HLA possèdent des caractéristiques clés qui influencent la compatibilité entre donneur et receveur lors des transplantations. Ces propriétés incluent (28) :

- Polymorphisme : Chaque locus HLA présente un grand nombre de variantes alléliques, ce qui confère à chaque individu un profil unique de molécules HLA. Cette variabilité génétique rend les correspondances parfaites peu probables, sauf entre membres de la même fratrie. Elle peut également entraîner des réactions d'allo-immunisation et la production d'anticorps anti-HLA, posant des défis pour les greffes.
- Expression codominante : Tous les allèles HLA sont exprimés de manière égale, permettant aux cellules de présenter les protéines de chaque allèle sur leur surface. Ceci est visible par la présence d'une combinaison de six molécules HLA de classe I et de six à huit molécules de classe II sur les cellules, reflétant ainsi la diversité génétique de chaque individu (26).
- Liaison étroite ou Transmission en bloc : Les allèles HLA sur un même chromosome (appelé haplotype) sont souvent transmis ensemble de parents à enfants. Cette caractéristique assure une conservation des ensembles de traits HLA au sein d'une famille, facilitant les études génétiques et les appariements pour les transplantations.

Dans le domaine des transplantations, il est primordial d'obtenir une bonne correspondance entre les antigènes HLA du donneur et du receveur pour minimiser les risques de rejet. La probabilité de trouver une correspondance parfaite entre deux individus non apparentés est extrêmement faible, estimée à moins de 1 sur 1 000 000 (29).

3.3. Les différents types de rejets

Le phénomène de rejet de greffe constitue une réaction immunitaire à la fois complexe et multiforme. Il se manifeste lorsque le système immunitaire du receveur identifie le greffon comme un élément étranger, ce qui déclenche une réponse immunologique chez le receveur visant à combattre cette présence étrangère. Cette réaction immunitaire peut être considérée comme normale puisqu'elle découle de la capacité intrinsèque du système immunitaire à reconnaître et à éliminer les cellules étrangères. Elle conduit à des dommages au niveau du tissu transplanté, à l'origine d'une détérioration de la fonction rénale à court ou moyen terme.

Il existe 3 grands types de rejet, chacun avec ses caractéristiques et implications spécifiques (30) (31) :

- Le Rejet Hyperaigu : (*Figure 7A*) est une réaction immédiate et souvent sévère qui se produit généralement dans les minutes ou les heures suivant la transplantation. Cette forme de rejet est principalement causée par la présence d'allo-anticorps préexistants chez le receveur, qui se fixent sur les cellules du greffon conduisant à une thrombose et nécrose du transplant. Ces anticorps peuvent être des anticorps naturels IgM spécifiques des antigènes de groupes sanguins, ou des anticorps spécifiques de molécules d'un CMH allogénique, induits par des contacts antérieurs avec des cellules allogéniques. Ces anticorps spécifiques se lient aux antigènes exprimés par l'endothélium vasculaire du greffon, activant les systèmes du complément et de la coagulation, ce qui provoque des lésions de l'endothélium et la formation d'un caillot. Cette série de réactions engendre une thrombose des vaisseaux du greffon et une nécrose ischémique du greffon. Depuis l'adoption systématique du test de compatibilité pré-transplantation (crossmatch), les rejets hyperaigus sont devenus extrêmement rares. En effet, le test de crossmatch permet d'identifier la présence éventuelle d'anticorps dirigés contre les cellules du donneur potentiel, réduisant ainsi le risque de rejet hyperaigu.

- Le Rejet Aigu : (*Figure 7B*) survient généralement dans les trois ou quatre mois post-transplantation, avec un pic de fréquence le premier mois. Il est la principale cause d'échec précoce de la greffe. Ce phénomène résulte de l'identification des antigènes HLA du donneur par les lymphocytes T du receveur, lesquels peuvent être des cellules T cytotoxiques qui détruisent directement les cellules du greffon. Les lymphocytes T peuvent également réagir contre les cellules des vaisseaux du greffon, provoquant des lésions vasculaires. Ces réactions se manifestent par des mécanismes de cytotoxicité à la fois cellulaire et humorale, où les lymphocytes du receveur sont activés, entament une phase de prolifération et infiltrent le greffon, soit directement soit via les anticorps. Les anticorps contribuent également de manière significative au rejet aigu, en particulier pour ce qui concerne la composante vasculaire de cette réaction. Les dommages causés aux vaisseaux du greffon sont surtout provoqués par l'activation du complément par la voie classique. Bien que le risque de rejet aigu diminue après quelques mois, il demeure présent tout au long de la période de fonctionnement du greffon. Les traitements immunosuppresseurs actuels sont principalement destinés à prévenir et à réduire le rejet aigu dû aux lymphocytes T.
- Le Rejet Chronique : (*Figure 7C*) est un processus lent qui peut se développer sur plusieurs mois à années. Il s'agit d'une néphropathie chronique du greffon, marquée par une baisse progressive de la performance du greffon, conjuguée à la formation de fibrose et à la dégradation des vaisseaux sanguins, caractérisée par une réduction progressive de leur diamètre interne. Cette altération progressive du greffon conduit à une perte progressive des fonctions du greffon et peut se manifester par une fibrose du greffon ou une obstruction progressive des vaisseaux du greffon, qualifiée d'artériosclérose du greffon. Les lymphocytes T jouent un rôle clé dans ce processus en réagissant contre les allo-antigènes du greffon et en sécrétant des cytokines, qui stimulent la prolifération et les activités des fibroblastes et des cellules musculaires lisses vasculaires du greffon. Ces réactions immunitaires soutenues entraînent des lésions tissulaires chroniques qui compromettent la fonctionnalité du greffon à long terme. Avec l'amélioration du traitement du rejet aigu, le rejet chronique est devenu la cause principale des échecs de transplantation, soulignant l'importance de stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les mécanismes du rejet chronique pour prolonger la survie et la fonction des greffons.

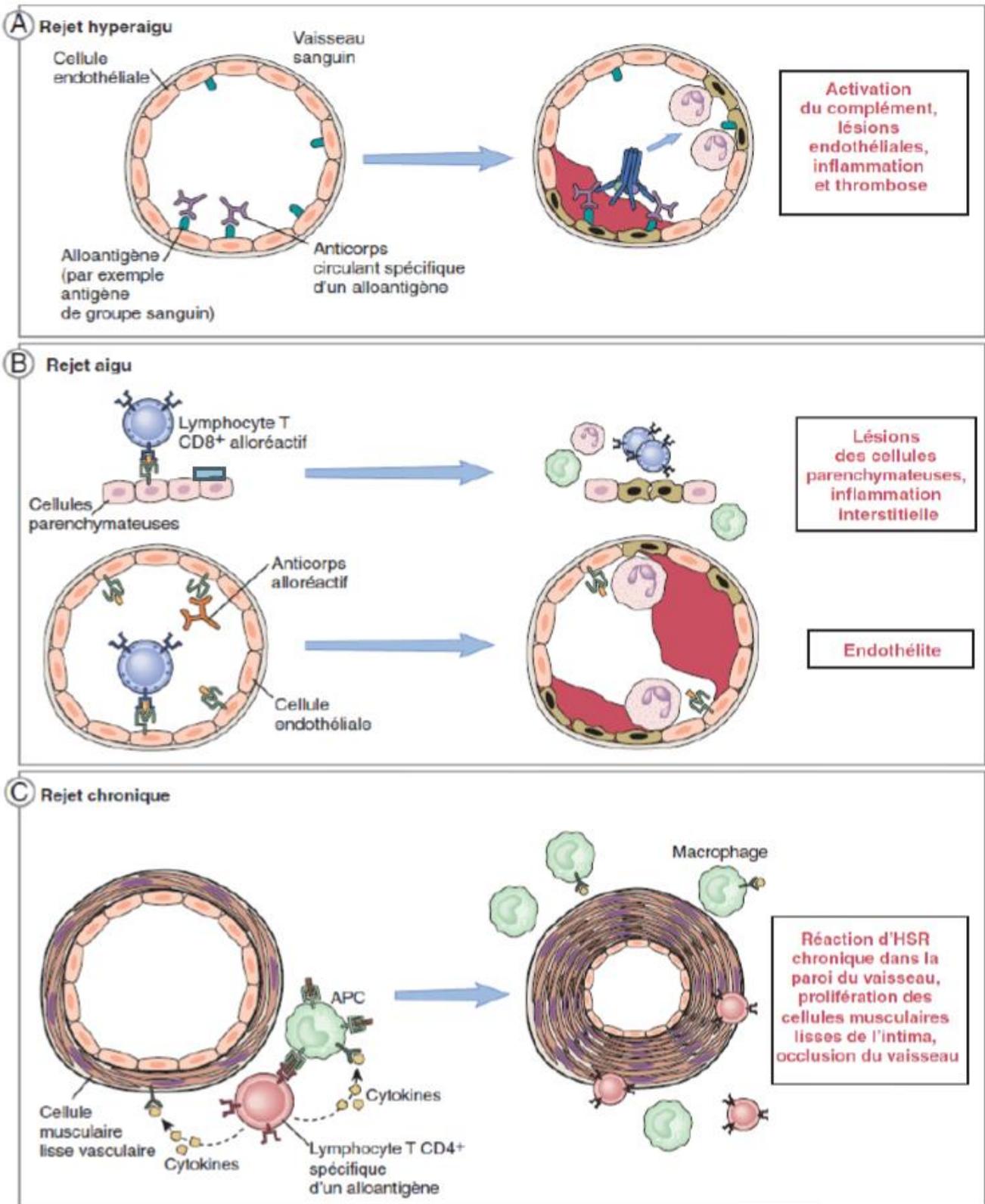


Figure 7 : Mécanisme du rejet de greffe. (A) Rejet hyperaigu, (B) Rejet aigu, (C) Rejet chronique (31).

3.4. Physiopathologie du rejet de greffe

Le rejet de greffe est un processus complexe impliquant plusieurs composants du système immunitaire de l'hôte et divers antigènes présents sur le greffon dont voici les principaux acteurs (30):

- Les cellules immunitaires impliquées :
 - Principalement les lymphocytes T et B qui vont jouer un rôle central dans la reconnaissance et la réaction contre le greffon
 - Les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages qui facilitent la présentation des antigènes du greffon aux Lymphocytes T.
 - Les cellules Natural Killer (NK) : ces cellules ciblent et détruisent les cellules du greffon qui ne présentent pas les marqueurs moléculaires habituels du soi. Ce mécanisme déclenche un rejet du greffon basé sur « l'absence de soi », contrairement aux réactions typiques qui sont généralement provoquées par la reconnaissance de « non-soi » (32).

- Les antigènes cibles, à savoir les molécules présentes sur le greffon identifiées par le système immunitaire de l'hôte, incluant :
 - Les antigènes érythrocytaires ABO exprimés par différents types cellulaires comme les érythrocytes et les cellules endothéliales vasculaires du greffon, susceptibles d'être ciblés par les anticorps naturels anti-ABO du receveur (33),
 - Les antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CHM-I présents sur toutes les cellules nucléées) et de classe II (CMH -II exprimés par les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B, et les cellules endothéliales vasculaires), qui sont d'une grande diversité et représentent les principales cibles du rejet,
 - Les antigènes mineurs d'histocompatibilité : définis comme des systèmes alléliques présentés sous forme de peptides en association avec les molécules HLA de classe I du donneur ou du receveur, capables d'activer uniquement des lymphocytes T (rejet cellulaire). Ces antigènes sont qualifiés de mineurs car ils induisent un rejet moins rapide et moins violent que celui observé en cas d'incompatibilité pour le CMH (34),
 - Les antigènes MICA et MICB, exprimés par divers types cellulaires dont les cellules endothéliales et les monocytes, jouant un rôle dans le rejet de greffes rénales,
 - D'autres antigènes comme le récepteur de type I de l'angiotensine II, le collagène, et la percaline, qui ont été associés au processus de rejet (30).

- Les anticorps dirigés contre les antigènes HLA du greffon : ils vont contribuer à la dégradation du greffon. Ces anticorps peuvent être déjà présents chez le receveur suite à des événements immunisants ou être produits par les plasmocytes suite à la reconnaissance des antigènes du donneur (30).

Le rejet hyperaigu est une forme grave de rejet de greffe qui peut se manifester dans les minutes qui suivent la transplantation, particulièrement pour les greffes vascularisées comme les reins. Ce phénomène est déclenché par la présence d'anticorps préexistants chez le receveur, dirigés contre les antigènes du donneur. Ces anticorps peuvent être naturels, comme ceux dirigés contre les groupes sanguins A et B, ou acquis suite à des événements immunogènes tels que des transfusions sanguines, des grossesses précédentes, ou une transplantation antérieure. Lorsque le greffon est implanté, les anticorps préformés du receveur reconnaissent et se lient rapidement aux antigènes du donneur présent sur les cellules endothéliales des vaisseaux du greffon.

Cette liaison déclenche une série de réactions immunitaires, notamment l'activation du système du complément. L'activation du complément conduit à l'endommagement des cellules endothéliales, entraînant la libération de facteurs pro-coagulants, comme le facteur Von Willebrand. Ce dernier favorise l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sanguines, conduisant à une thrombose vasculaire aiguë. Cette thrombose des vaisseaux du greffon provoque alors une obstruction du flux sanguin, entraînant une ischémie et, finalement, la nécrose du greffon.

Ce type de rejet est particulièrement dangereux car il ne présente pas d'infiltration cellulaire dans le greffon, ce qui signifie qu'il ne s'agit pas d'un processus où les cellules immunitaires migrent vers le greffon, mais plutôt d'une réponse immédiate et dévastatrice déclenchée par la liaison des anticorps. Heureusement, grâce à des tests pré-transplantation minutieux, incluant l'analyse des compatibilités HLA entre le donneur et le receveur et l'épreuve de compatibilité croisée (cross-match), le risque de rejet hyperaigu peut être largement minimisé de nos jours (31).

Les différents événements pouvant conduire à un rejet de greffe (aigu et chronique) sont complexes, et impliquent l'immunité innée et adaptative.

3.4.1. Acteurs de l'Immunité Innée

L'ischémie et la reperfusion du rein désignent respectivement l'arrêt temporaire et la reprise de l'apport sanguin au rein, processus qui peut provoquer des dommages tissulaires sévères.

L'ischémie et la reperfusion du rein favorisent la production de dérivés réactifs de l'oxygène (O_2^- , H_2O_2), entraînant une agression oxydative majeure. Cette agression conduit à la nécrose et à l'apoptose cellulaire, libérant des molécules telles que les DAMPs (modèles moléculaires associés aux dommages). Ces DAMPs sont les ligands des récepteurs de l'immunité innée : les Toll-Like Receptors (TLR) ; présents à la surface de diverses cellules rénales, comme les cellules dendritiques (CD), les cellules endothéliales, les monocytes, les cellules tubulaires épithéliales et les cellules mésangiales. Cette activation va initier ainsi le processus de rejet de l'allogreffe (Figure 8).

Les cellules dendritiques immatures (CDi) du greffon reconnaissent les DAMPs via les TLR, deviennent matures et expriment alors des molécules HLA de classe II et des molécules de co-stimulation, tout en sécrétant des cytokines. L'activation des TLR stimule également les cellules endothéliales à produire des chimiokines et des sélectines, favorisant l'infiltration leucocytaire et créant un état inflammatoire au sein du parenchyme du greffon (30).

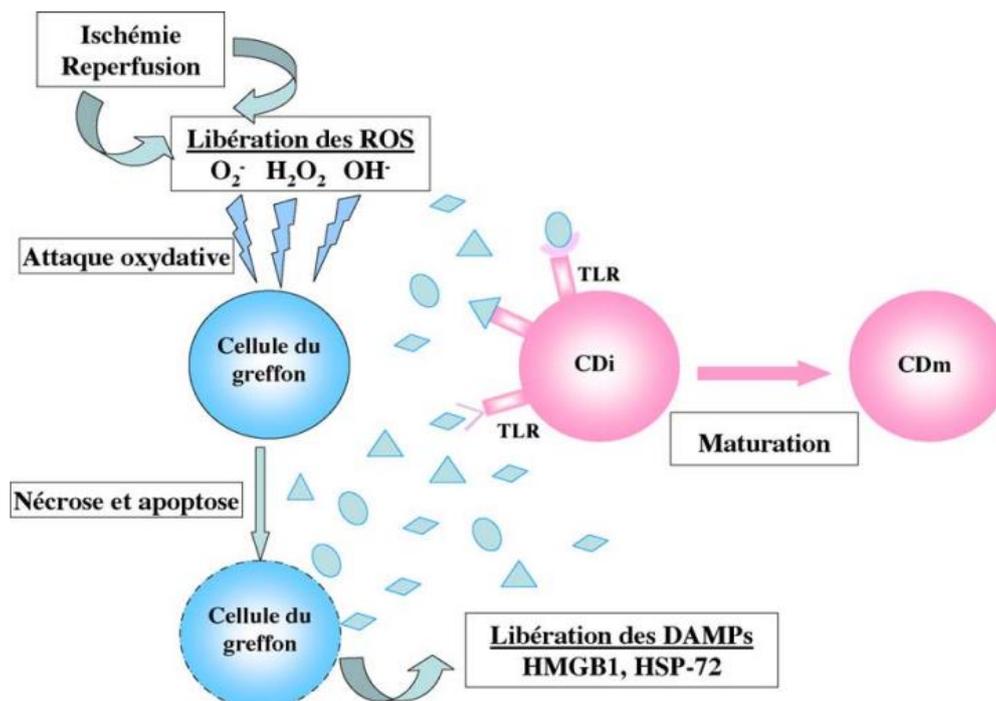


Figure 8 : Mécanismes d'immunité innée menant au rejet de greffe (CD= cellules dendritiques) (30).

3.4.2. Immunité adaptative

Elle succède à l'immunité innée et joue un rôle dans l'identification de l'antigène, l'activation des lymphocytes T, l'infiltration du greffon et l'attaque des cellules du parenchyme, qui sont décrites ci-dessous, et représentées dans la *Figure 9* (30).

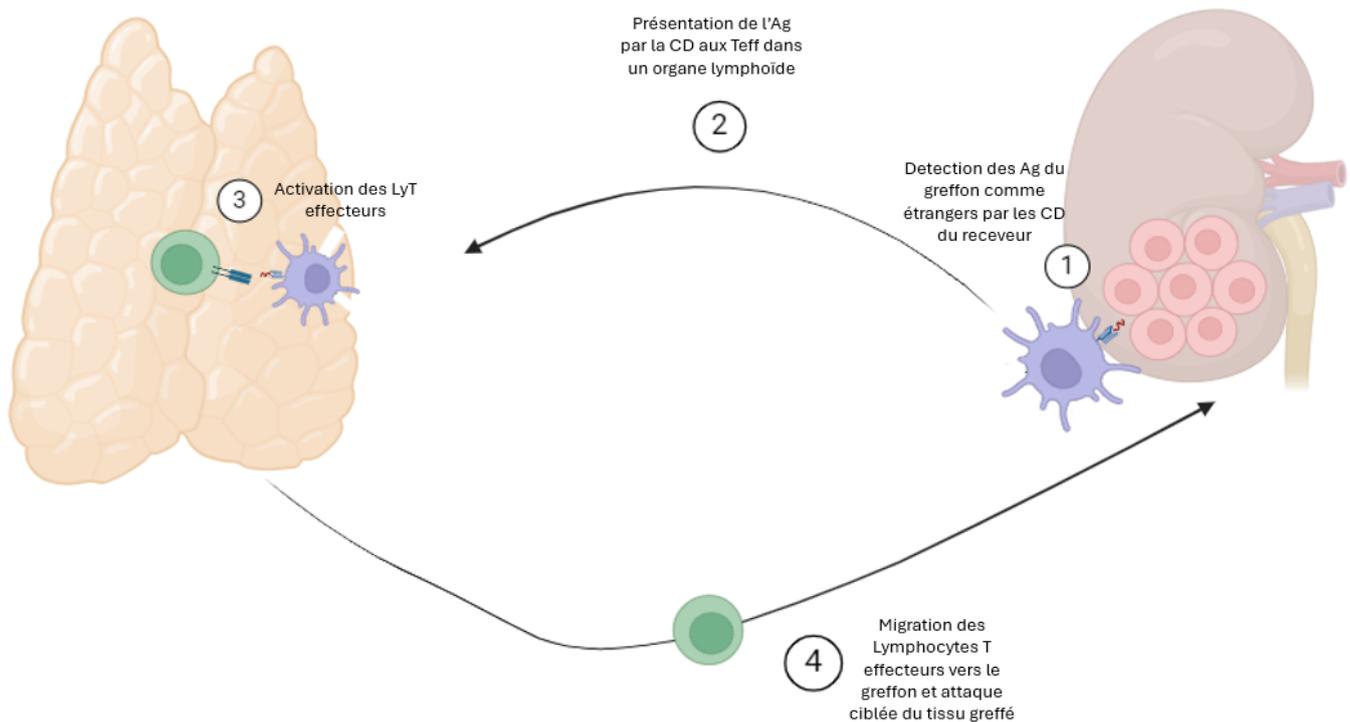


Figure 9 : Représentation du processus d'immunité adaptative conduisant au rejet de transplantation (30).

3.4.2.1. Reconnaissance allogénique

La réaction de rejet immunologique est initiée par la détection d'antigènes étrangers par le receveur, impliquant trois voies de reconnaissance possibles (30).

- Présentation directe : (*Figure 10 A*) cette voie implique un contact direct entre les cellules dendritiques du donneur et les lymphocytes T du receveur. Après la transplantation, les cellules dendritiques du donneur, encore présentes dans le greffon, migrent vers les ganglions lymphatiques du receveur où elles exposent directement les allo-antigènes du donneur aux lymphocytes T. Ces allo-antigènes sont présentés sous forme de complexes

moléculaires à la surface des cellules présentatrices du donneur. Cette interaction ne suit donc pas les règles classiques de restriction par le CMH, ce qui permet une reconnaissance plus large et plus directe des antigènes étrangers. Cette voie de reconnaissance est dominante dans la phase initiale post-transplantation avec la génération de cellules cytotoxiques spécifiques des allo-antigènes. La présentation directe d'antigènes explique la fréquence des rejets aigus cellulaires précoces post-greffe.

- Présentation indirecte : (*Figure 10B*) progressivement, les cellules dendritiques du receveur commencent à infiltrer le greffon et à remplacer celles du donneur. Elles captent alors les allo-antigènes du donneur présents dans le greffon, migrent à leur tour dans les ganglions lymphatiques et présentent ces allo-antigènes aux lymphocytes T par les molécules CMH de classe II du receveur (CMH du soi), conformément aux mécanismes conventionnels de présentation des antigènes. Cette transition vers une présentation indirecte est nécessaire pour la compréhension du rejet chronique, où une réaction allogénique moins intense mais persistante se met en place, suggérant une adaptation du système immunitaire qui continue à reconnaître et à répondre aux allo-antigènes du donneur sur une plus longue période. La présentation indirecte est également responsable de la production d'allo-anticorps anti-HLA.
- Présentation semi-directe : cette voie représente un hybride des deux premières. Elle implique que les cellules dendritiques du receveur puissent capturer les molécules CMH du donneur directement à partir des cellules endothéliales du greffon sans les modifier, puis les présenter aux lymphocytes T du receveur. Cette capacité unique permet une reconnaissance continue des allo-antigènes du donneur par le système immunitaire du receveur, jouant potentiellement un rôle dans les phases aiguës et chroniques du rejet.

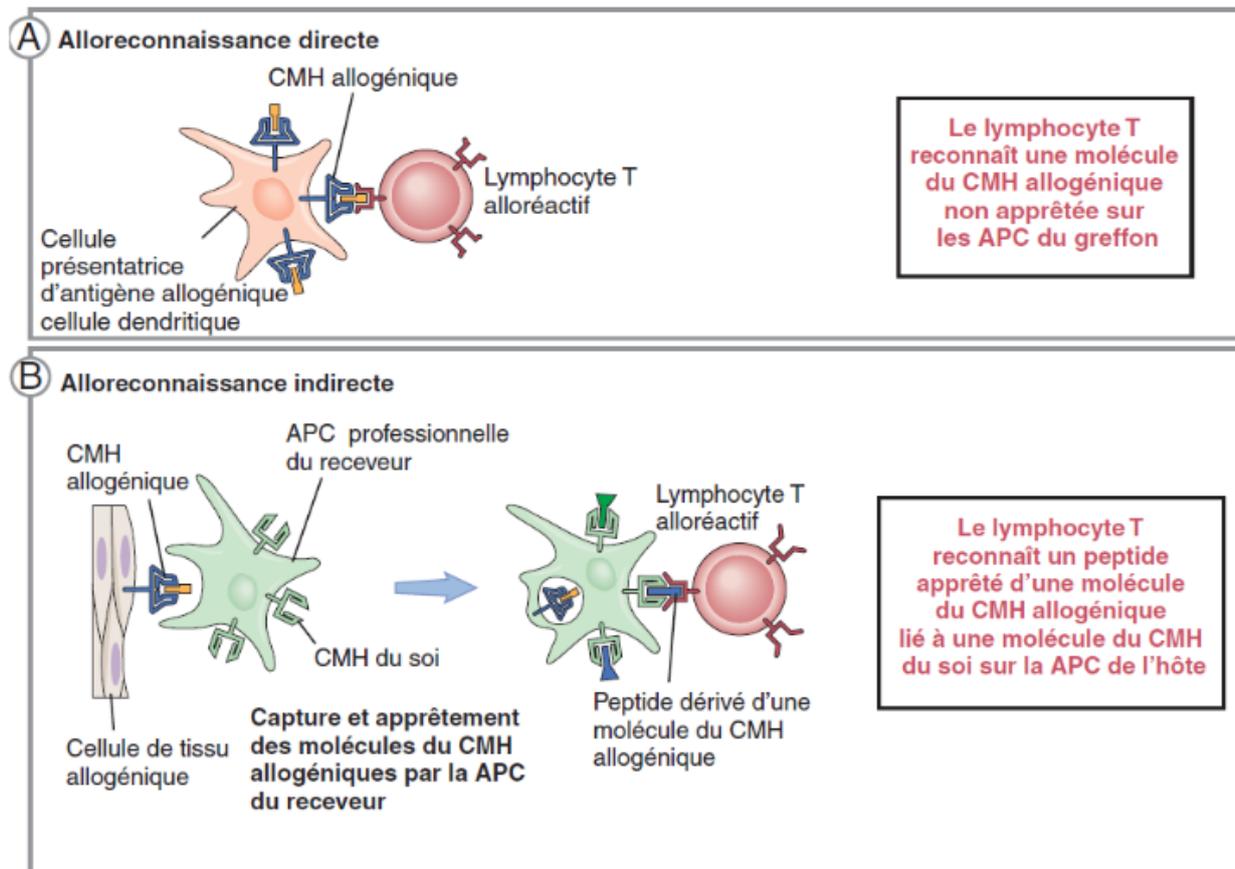


Figure 10 : Reconnaissance directe (A) et indirecte (B) des allo antigènes (31)

3.4.2.2. Activation LyT CD4+

Au sein des ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques exposent les antigènes aux lymphocytes T CD4+ selon les différentes voies de présentation de l'antigène, déclenchant l'activation et la prolifération clonale des T CD4+ ainsi que la production de cytokines. Ces cytokines influencent diverses cellules effectrices, telles que les lymphocytes B, T CD8+, macrophages, et cellules NK, qui participent à la destruction du tissu ciblé. Cette activation des lymphocytes T CD4+ repose sur quatre signaux principaux (30) :

- Signal 1 reconnaissance de l'antigène : ce signal repose sur la liaison entre le complexe récepteur (TCR-CD3) du lymphocyte T et un antigène apprêté par une molécule CMH de classe II sur la cellule dendritique. Ce premier signal assure la spécificité de l'interaction et active des voies de signalisation internes qui stimulent l'expression de diverses molécules, dont l'IL-2, essentielle pour la progression du cycle cellulaire du lymphocyte.

- Signal 2 signal de co-stimulation : il renforce le premier signal, principalement via l'interaction des molécules CD28 sur le lymphocyte T avec CD80/86 sur la cellule présentatrice d'antigène (CPA).

L'action coordonnée de ces premiers signaux permet l'initiation de la prolifération des lymphocytes T allo-réactifs (passage de la phase G0 à la phase G1), la production d'IL-2 et la formation du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 par l'expression de la chaîne α du récepteur (CD25).

- Signal 3 progression dans le cycle cellulaire : La fixation de l'IL-2 à son récepteur de haute affinité favorise la progression du cycle cellulaire du lymphocyte (passage de la phase G1 à la phase S). Ce signal active des voies qui entraînent la traduction d'ARNm et la synthèse des protéines nécessaires à la division cellulaire. L'IL15 peut également induire ce signal via son interaction avec un récepteur partageant des sous-unités avec celui de l'IL2.
- Signal 4 prolifération cellulaire : Ce dernier signal correspond à la phase de prolifération, où la synthèse d'ADN a lieu, marquant l'étape finale de l'activation des lymphocytes T et l'émergence de clones de lymphocytes T (expansion clonale).

3.4.2.3. Infiltration du greffon par les cellules effectrices

Les cellules immunitaires activées migrent des ganglions lymphatiques vers le greffon via le système sanguin, franchissent l'endothélium vasculaire puis infiltrent le greffon. Cette migration s'appuie sur l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire, facilitée par les chimiokines et les molécules d'adhésion cellulaire (CAM). Les chimiokines, produites tant par l'endothélium que par les lymphocytes, attirent et activent ces derniers vers le site du greffon. Les CAM, exprimées à la fois sur les lymphocytes et sur les cellules endothéliales, facilitent l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium vasculaire.

L'infiltration du greffon par les lymphocytes se déroule en une séquence de quatre étapes : le roulement le long de l'endothélium, l'activation des lymphocytes par les chimiokines, l'adhésion ferme par interaction avec les CAM, et enfin la migration à travers la paroi endothéliale. Ce processus coordonné permet aux cellules immunitaires d'atteindre et d'agir efficacement sur le tissu greffé (30).

3.4.2.4. Agression du parenchyme

La destruction du greffon implique divers mécanismes immunologiques, tant cellulaires qu'humoraux, ainsi que des processus inflammatoires. Les rôles précis des différents acteurs immunitaires, notamment le rôle respectif des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'allo-antigènes (constituant environ 1% de l'infiltrat) et d'autres cellules de l'infiltrat (comme les lymphocytes T helper, cellules NK, lymphocytes B, monocytes/macrophages, éosinophiles), suscitent encore des interrogations. Voici les principaux mécanismes de dommages tissulaires identifiés (30) :

- Action des lymphocytes T cytotoxiques : L'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques se fait de manière similaire à celle des T CD4+. Elle peut se produire par interaction directe avec la cible ou par l'intermédiaire lymphocytes T CD4+ activés. Les lymphocytes TCD4+ et CD48+ cytotoxiques détruisent alors les cellules cibles du parenchyme par deux moyens principaux : la libération de granules contenant des perforines et granzymes qui endommagent la cellule cible, et l'activation du signal de mort cellulaire par la liaison Fas-Fas Ligand, aboutissant à l'apoptose cellulaire par activation des caspases.
- Hypersensibilité retardée : Réaction inflammatoire causée par des cytokines (IL2 et IFN γ) principalement sécrétées par les T CD4+. Ces cytokines mobilisent et activent les macrophages qui exercent des effets cytotoxiques et pro-apoptotiques.
- Réaction médiée par les lymphocytes B : Les lymphocytes B contribuent aussi à la destruction tissulaire du parenchyme. Après activation, ils se transforment en plasmocytes qui produisent des anticorps. Ces anticorps se fixent sur l'endothélium vasculaire du greffon, activant la cascade du complément qui aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire susceptible d'entraîner des dommages endothéliaux.
- Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) : Ce mécanisme fait intervenir des cellules dotées de capacités cytotoxiques, telles que les cellules NK et les macrophages, qui possèdent des récepteurs pour le fragment Fc des IgG. Ces récepteurs leur permettent de se lier aux complexes IgG-cellule cible. Une fois engagées, ces cellules libèrent des enzymes lytiques au niveau des zones de contact, entraînant la destruction de la cellule cible par lésion cellulaire.

Ces mécanismes mènent finalement à une ischémie et une nécrose tissulaire du greffon, des événements qui contribuent au rejet du transplant en compromettant gravement sa fonctionnalité et sa survie.

Ces processus montrent la complexité des réponses immunitaires et inflammatoires menant à la destruction du greffon, mettant en lumière la nécessité de stratégies thérapeutiques ciblées pour limiter le rejet (30).

3.5. Les limites actuelles comme moteur d'innovation thérapeutique

La greffe d'organes représente une option thérapeutique efficace pour les individus souffrant d'insuffisances organiques en phase terminale. Bien que l'amélioration de la survie des greffons à court terme soit notable, la prolongation de leur fonction sur le long terme constitue un défi majeur, principalement en raison des risques accrus de mortalité et de complications liées au rejet chronique ainsi qu'à la toxicité des traitements immunosuppresseurs. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer des stratégies innovantes visant à induire une tolérance immunitaire durable. L'un des objectifs clés pour les chercheurs en transplantation est donc de mettre au point de nouvelles méthodes pour étendre la survie des greffons de manière sûre. Actuellement, l'intérêt scientifique se porte sur la modulation des réponses immunitaires, notamment avec des thérapies cellulaires comme les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM), les lymphocytes T régulateurs (Treg) polyclonaux et des Treg spécifiques d'antigènes exprimant un récepteurs antigéniques chimériques (CAR-Treg) (35).

L'utilisation des CSM dans la transplantation d'organes solides représente une stratégie innovante visant à améliorer les résultats post-transplantation en réduisant le rejet chronique et en favorisant un environnement immunologique plus tolérant. Les preuves précliniques actuelles suggèrent que les CSM peuvent moduler efficacement la réponse immunitaire pour protéger le greffon transplanté. Cependant, malgré leurs propriétés anti-inflammatoires et leur capacité à réparer les dommages tissulaires, les résultats cliniques chez l'homme sont encore limités et moins robustes que dans les modèles précliniques (35).

Les études cliniques réalisées, majoritairement des essais de phase I, ont principalement évalué la faisabilité et la sécurité de cette approche, avec des résultats encourageants concernant le risque d'infections et de malignité chez les receveurs. Aucune augmentation significative des infections

opportunistes ni de potentiel de transformation maligne n'a été observée, ce qui renforce le profil de sécurité des CSM, même si une surveillance à long terme reste nécessaire. (36)

Dans le cadre de cette thèse, les cellules souches mésenchymateuses ne seront pas plus développées.

La partie suivante traitera en détail le fonctionnement des thérapies cellulaires à base de Treg, et en particulier les CAR-Treg.

Partie II : Le CAR-Treg : un Médicament de Thérapie Innovant

En 2010, Bill Ludwig et Doug Olson, tous les deux atteints d'une leucémie lymphoïde chronique furent les premiers patients à recevoir un traitement à base de cellules T exprimant un récepteur chimérique appelé CAR (37). Cette approche, impliquant la modification génétique des propres cellules immunitaires du patient pour cibler et détruire les cellules tumorales, a marqué un tournant dans la lutte contre le cancer, inaugurant une ère nouvelle dans les stratégies anti-cancéreuses. Inspirés par cette découverte, les chercheurs se sont attelés à évaluer le potentiel de cette innovation thérapeutique pour combattre d'autres maladies, en quête de traitements aux effets puissants et curatifs.

Dans la continuité de ces avancées, ces dernières années ont vu plusieurs entreprises de biotechnologie et scientifiques se lancer dans le développement de nouveaux traitements innovants, utilisant cette fois les lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces cellules contribuent à préserver l'homéostasie et à prévenir des réponses immunitaires inappropriées contre des auto-antigènes normalement acceptés par l'organisme (38). Ces caractéristiques font des Treg une alternative intéressante car, en théorie, ils pourraient être utilisés comme traitement pour les patients souffrant de dysfonctionnements immunitaires ou dans la gestion du rejet lors de transplantations d'organes solides.

Cette seconde partie vise à détailler ce que sont les CAR-Treg, et en quoi ils représentent un espoir dans la prévention du rejet au cours des transplantation d'organes.

1. Les Lymphocytes T régulateurs : définition et rôles

1.1. Le système immunitaire et lymphocyte T

Le système immunitaire (SI) se compose d'un réseau complexe de cellules, d'organes et de mécanismes qui interagissent de manière coordonnée pour représenter la première ligne de défense du corps humain.

Schématiquement, le SI peut se diviser en deux grandes catégories : l'immunité innée et l'immunité adaptative (*Figure 11*). L'immunité innée est la première ligne de défense aux agents pathogènes de manière non spécifique. Elle se met en place rapidement, dans les heures suivant l'exposition aux agents étrangers. Elle implique différents types de cellules tels que les monocytes, neutrophiles et les cellules NK. L'immunité adaptative, quant à elle, est plus spécialisée et prend plus de temps à se développer. Elle permet une réponse immunitaire ciblée grâce à l'activation des lymphocytes effecteurs T et B, qui reconnaissent des antigènes spécifiques (39).

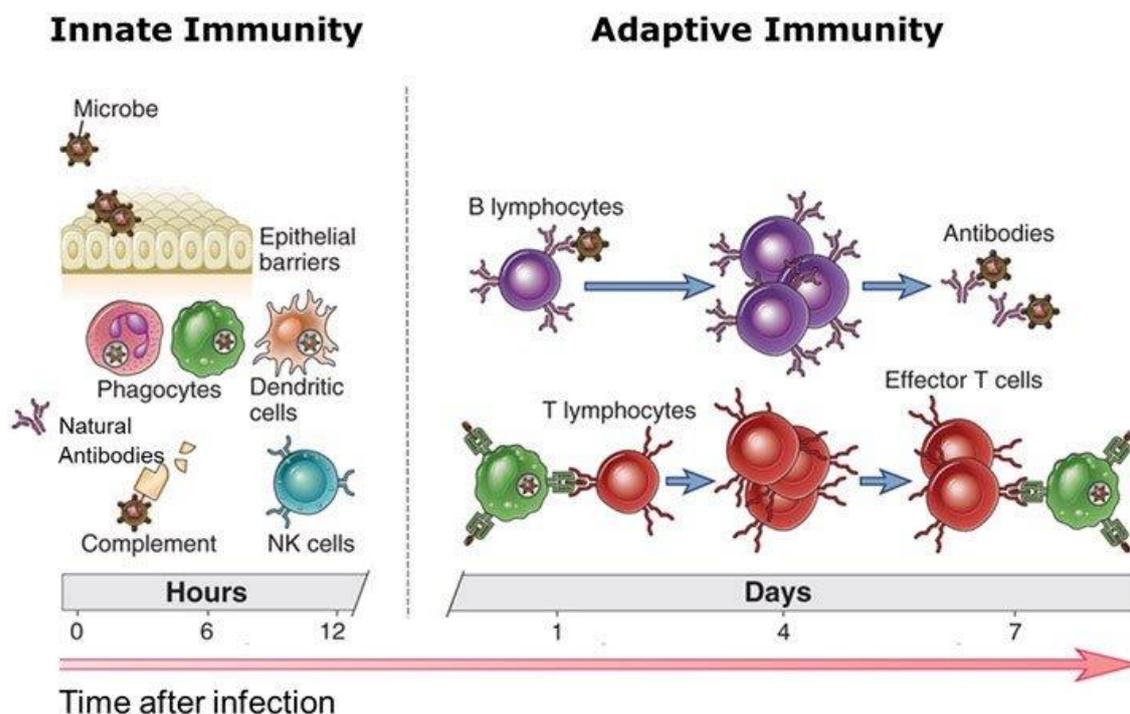


Figure 11 : Illustration de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (40)

Les cellules dendritiques sont des composants essentiels du SI, agissant comme des sentinelles au sein de l'organisme. Elles sont à l'interface entre immunité innée et adaptative puisqu'en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA), elles patrouillent constamment à la recherche de menaces potentielles. Lorsqu'elles détectent un danger, elles capturent et traitent les antigènes, puis alertent d'autres cellules immunitaires pour initier une réponse de défense. (41)

1.1.1. Hématopoïèse

L'hématopoïèse désigne le processus de prolifération et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques en divers types de cellules sanguines. Durant ce processus, qui se déroule principalement dans la moelle osseuse, la cellule souche traverse plusieurs étapes de maturation avant de se spécialiser en une cellule fonctionnelle spécifique (42). À partir d'une unique cellule souche pluripotente, ce mécanisme complexe conduit à la formation de toutes les cellules sanguines, à savoir les globules rouges, les plaquettes et l'ensemble des leucocytes y compris les différents types de lymphocytes, tels que les lymphocytes B, les lymphocytes T, et les cellules NK. Ces dernières sont issues du même progéniteur lymphoïde commun.

1.1.2. Lymphocytes T

Les cellules progénitrices lymphoïdes immatures, issues de la moelle osseuse migrent vers le thymus où elles subissent un processus de différenciation. Les lymphocytes T peuvent être distingués en plusieurs catégories selon leur état et leur fonction :

- Lymphocytes T naïfs : Ce sont des lymphocytes T qui résident dans les ganglions lymphatiques prêts à répondre aux signaux de danger émis par d'autres cellules du système immunitaire. Ils n'ont pas encore été exposés à l'antigène auquel ils sont spécifiques.
- Lymphocytes T effecteurs (Teff) : Ces lymphocytes ont été activés par la présentation d'un antigène spécifique et sont chargés de lancer une attaque ciblée contre cet antigène. Ils sont donc directement impliqués dans l'élimination de l'agent infectieux ou de la cellule tumorale (43).

En plus de ces états, les lymphocytes T peuvent être divisés en trois types principaux selon leurs fonctions et leurs marqueurs de surface :

- Les lymphocytes T CD4 : ou T auxiliaires, qui soutiennent l'immunité en activant d'autres cellules immunitaires. Ils permettent aux lymphocytes B de produire des anticorps spécifiques et activent les cellules phagocytaires grâce à la libération de cytokines. Le récepteur CD4 reconnaît les peptides présentés sur les molécules de CMH de classe II (44).
- Les lymphocytes T CD8 : ou T cytotoxiques, spécialisés dans l'identification et la destruction des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales. En effet, elles sont capables de détruire des cellules cibles qui présentent des antigènes à travers le CMH de classe I (45).

- Les lymphocytes T régulateurs seront détaillés dans la partie 1.2

1.2. Lymphocytes T régulateurs

1.2.1. Généralités

C'est au cours des années 90 que le Dr.Sakaguchi a découvert et décrit le rôle des Lymphocytes T régulateurs (Treg) dans le SI (46). Ils représentent une sous population de lymphocytes T CD4+, qui modulent l'activité d'une grande diversité de cellules du SI, tant innée qu'adaptative. Ils sont nécessaires au maintien de l'homéostasie et de la tolérance immunitaire et sont impliqués dans diverses situations pathologiques comme les maladies auto-immunes, les allergies, les infections chroniques, la croissance tumorale ou encore la transplantation d'organes. Ces dernières décennies ont permis d'identifier plusieurs populations de Treg qui se distinguent par leurs origines, leurs marqueurs de surface et leurs fonctions.

1.2.2. Différenciation et origines des lymphocytes T régulateurs

Les Treg, également connus sous le nom de cellules T régulatrices, jouent un rôle essentiel dans la modulation de la réponse immunitaire. Les Treg ne sont pas une population cellulaire homogène et unique de lymphocytes ; en effet ils se divisent en deux catégories selon leur origine développementale (*figure 12*) :

- Les Treg naturels (nTreg), d'origine thymique ;
- Les Treg induits (iTreg), en périphérie, formés à partir de lymphocytes T conventionnels suite à une exposition antigénique (47).

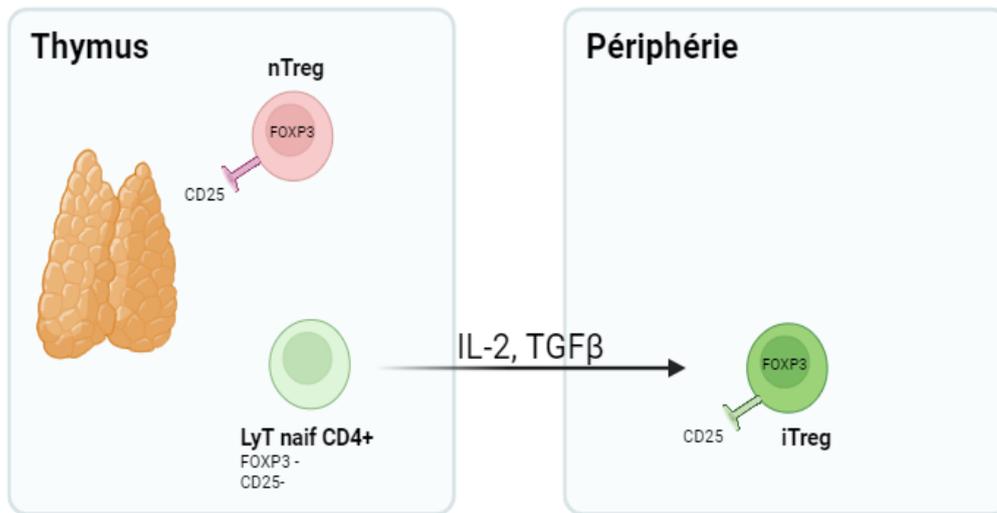


Figure 12 : Population de Treg : origine thymique et périphérique (48)

Les nTreg sont présents naturellement dans l'organisme dès la naissance, et jouent un rôle clé dans le maintien de la tolérance immunitaire. Ils régulent les réponses immunitaires et préviennent les réactions auto-immunes excessives.

Les iTreg, quant à eux, se forment sous l'influence de signaux spécifiques de l'environnement, dans des conditions expérimentales ou pathologiques particulières, suite à une stimulation antigénique. Ils sont donc impliqués dans la régulation de réponses immunitaires spécifiques.

La principale distinction entre les deux types de Treg réside dans leur origine et leur mode de génération. Les iTreg sont induits en réponse à des signaux externes, tandis que les nTreg sont présents naturellement dès la formation des cellules T dans le thymus. Ensemble, ces deux variétés de Treg exercent une fonction essentielle dans le contrôle du système immunitaire, évitant des réactions excessives ou inadaptées.

La différenciation des Treg est un processus fondamental, nécessitant la présence du transforming growth factor beta (TGF- β) dans le thymus. De plus, l'interleukine-2 (IL-2) est primordiale pour le maintien et l'expansion des Treg en périphérie. L'IL-2 soutient la prolifération, la survie et la fonction inhibitrice des Treg agissant en synergie avec le TGF- β pour renforcer leur rôle régulateur (47).

1.2.3. Mécanismes d'action des Treg

Lorsqu'un pathogène pénètre dans l'organisme, il est immédiatement repéré par le système immunitaire, déclenchant ainsi une série d'événements visant à mobiliser et à transformer des lymphocytes T effecteurs spécifiques. Ces lymphocytes sont d'abord activés et dirigés vers le site de l'infection. Ensuite, ils subissent une transformation en cellules effectrices, acquérant des capacités cytotoxiques et de production de cytokines nécessaires pour neutraliser et éliminer de manière ciblée le microorganisme en question. Par la suite, la réponse immunitaire est régulée par l'intervention des Treg pour éviter des dommages collatéraux aux tissus qui seraient causés par une réaction immunitaire excessive.

Les Treg naïfs mobilisés vont quitter le thymus afin de coloniser les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Après leur sortie du thymus, les nTreg jouent un rôle essentiel en bloquant des réactions auto-immunes potentiellement dangereuses en périphérie, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie tissulaire. Lorsque les nTreg rencontrent un antigène, ils entrent en phase d'activation et commencent à exprimer des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion. Ces changements leur permettent d'exercer leurs fonctions suppressives en périphérie, au sein des tissus inflammatoires.

Ces mécanismes peuvent être classés en différentes catégories (49,50) comme le montre la *Figure 13*:

- Sécrétion de cytokines immunosuppressives : les Treg produisent différentes cytokines immunosuppressives ayant pour fonction d'inhiber la prolifération et l'activité des lymphocytes T effecteurs, ainsi que d'autres cellules immunitaires. Les cytokines principalement produites par les Treg sont l'IL-10 (Interleukine 10), le TGF- β (facteur de croissance transformant- β) et l'IL-35 (Interleukine 35).
- Cytolyse : les Treg ont la capacité d'exploiter la voie de cytolyse à l'aide de granules cytotoxiques. En effet, les Treg peuvent induire la lyse directe de leurs cibles en utilisant la voie perforine/granzyme, un mécanisme qui implique la libération de perforine et de granzymes pour déclencher la mort cellulaire.
- Perturbations métaboliques : les Treg sont capables de perturber le métabolisme, entraînant ainsi l'inhibition des fonctions effectrices ou le déclenchement de l'apoptose au sein de leurs cibles. Tout d'abord, les enzymes CD39 et CD73, localisées à la surface des Treg, facilitent la transformation de l'ATP en adénosine, molécule aux effets inhibiteurs notables. De plus, du fait de l'expression élevée de CD25, les Treg consomment une quantité significative

d'IL-2, privant ainsi les Teff de cette cytokine essentielle à leur activité. Caractérisés par une forte concentration intracellulaire d'AMPc, les Treg peuvent transférer cet AMPc aux cellules avoisinantes via des jonctions Gap, ce qui induit la suppression des fonctions effectrices de la cellule ciblée.

- Action sur les cellules dendritiques : Les Treg sont aussi capables d'interférer avec les cellules dendritiques, réduisant ainsi leur capacité à activer les Teff. Cela implique notamment l'interaction du CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), situé à la surface des Treg, avec les molécules CD80 ou CD86 présentes sur les cellules dendritiques. Cette interaction induit la production de facteurs suppresseurs par les cellules dendritiques comme l'IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) qui entraîne le catabolisme du tryptophane en un métabolite toxique pour les Teff (11). Par ailleurs, lorsque le Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3), exprimé à la surface des Treg, se lie au CMH de classe II sur une cellule dendritique immature, il contribue à maintenir l'état d'immaturité de cette dernière, limitant ainsi ses capacités à présenter des antigènes (51).

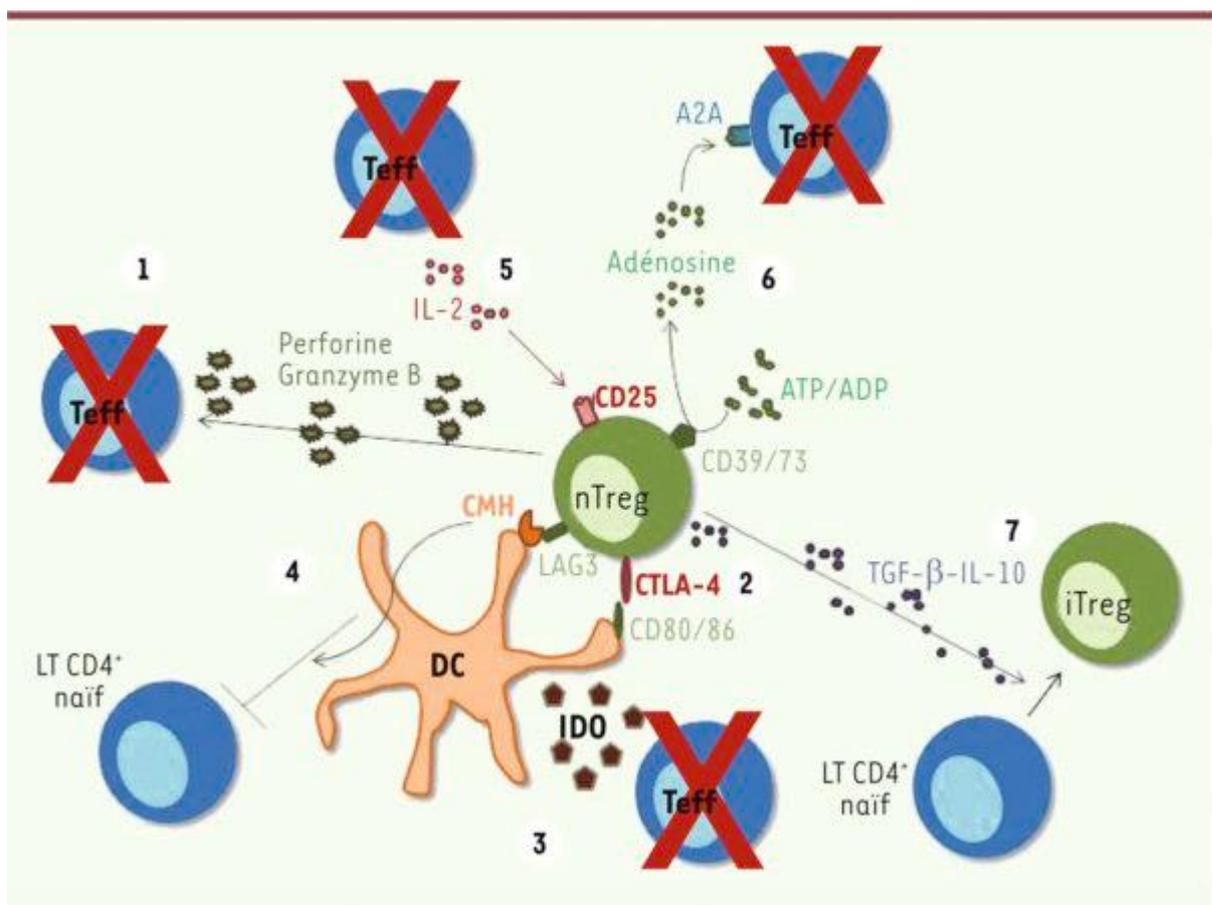


Figure 13 : Les différents mécanismes d'action des Treg naturels (38)

1.2.4. Marqueurs caractéristiques des Lymphocytes T régulateurs

Différents marqueurs plus ou moins spécifiques des Treg ont été découverts au fil des années. En 1995, S. Sakaguchi et al. (46) identifient le CD25 (la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-2) comme marqueur de Treg (49). Pendant longtemps, ce marqueur fut le seul critère d'identification des Treg. Cependant, il est apparu que ce marqueur n'est pas spécifique aux Treg puisqu'il est aussi exprimé par les Teff, bien que généralement à des niveaux inférieurs que sur les Treg. En 2003, il a été découvert par divers groupes de recherche que les Treg expriment également le facteur de transcription FOXP3 (Forkhead Box P3) (50), qui joue un rôle central dans la formation et le maintien des Treg. Actuellement, les Treg se caractérisent par un phénotype CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺.

Afin d'améliorer l'identification des Treg, il est possible d'utiliser plusieurs autres marqueurs en association avec le CD25 et/ou FOXP3 :

- L'expression de CD45RA permet de distinguer les Treg au repos (CD45RA⁺FOXP3^{faible}), les Treg activés (CD45RA⁻FOXP3^{fort}) et les Teff exprimant FOXP3 faiblement (CD45RA⁻).
- Les Treg CD4⁺FOXP3⁺ montrent également une expression accrue de marqueurs d'activation tels que CD5, CD25, CD44, CD103, CTLA-4 ou le récepteur du TNF induit par les glucocorticoïdes (GITR).
- Les Treg présentent des marqueurs absents à la surface des Teff, tels que le GARP (glycoprotéine A répétitions prédominante) (38).
- Le marqueur CD127 (chaîne α du récepteur de l'IL-7) : peu ou pas exprimé par les Treg.

2. Thérapie cellulaire adoptive par Treg

La thérapie cellulaire adoptive (ACT), ou transfert adoptif de cellules, implique le transfert de cellules dans un hôte afin d'exploiter leurs fonctions immunitaires (52). Elle a particulièrement été utilisée dans la lutte contre le cancer. Cette méthode, qui renforce le système immunitaire du patient avec ses propres cellules modifiées, a été pionnière dans les années 1980 par l'équipe de Rosenberg. Ils ont utilisé des lymphocytes infiltrant les tumeurs, activés *in vitro* par l'IL-2, et réinjectés aux patients (53).

Les lymphocytes T du patient sont prélevés souvent directement au niveau du site tumoral à l'aide d'une biopsie, et isolés par centrifugation ou tri magnétique. Ces cellules, choisies pour leur potentiel cytolytique et leur capacité de ciblage spécifique des cellules tumorales, sont ensuite manipulées en laboratoire pour renforcer leurs fonctions. L'ajout d'interleukine 2 favorise leur prolifération et leur capacité à reconnaître des antigènes tumoraux. Enfin, ces lymphocytes sont administrés au patient (54). Bien que cette approche ait montrée des bons résultats pour le traitement du mélanome, elle a eu moins de succès avec d'autres cancers (53). Des approches plus avancées reposant sur la modification génétique des lymphocytes sont en développement afin de les rendre plus efficaces.

L'intervention régulatrice des Treg dans le système immunitaire, décrite dans la partie 1.2.3, souligne leur potentiel thérapeutique. Cette capacité à équilibrer l'immunité offre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans les maladies où cette régulation immune est compromise, comme dans la prévention du rejet post- transplantation d'organes ou les maladies auto-immune.

La thérapie cellulaire adoptive dans le cas des Treg implique l'administration de ces cellules immunitaires spécifiques dans le but de moduler la réponse immunitaire et traiter certaines maladies. Ces cellules, naturellement chargées du maintien de la tolérance immunitaire envers le soi, pourraient être détournées pour induire une tolérance spécifique aux antigènes du greffon dans le cas des transplantations d'organes. Cette approche, qui détourne les mécanismes naturels de l'immunité, représente une stratégie innovante pour surmonter les obstacles liés au rejet de greffe, offrant une solution potentielle pour améliorer les résultats à long terme des transplantations d'organes sans les inconvénients des traitements immunosuppresseurs traditionnels. (38,55,56)

2.1. Différentes approches thérapeutiques reposant sur les Treg

Les Treg isolés peuvent être utilisés de différentes façons dans le cadre du transfert adoptif de cellules.

- Les Treg polyclonaux : (*figure 14 A*) ceux-ci sont isolés à partir du sang périphérique et expansés in vitro. Le rendement cellulaire est élevé lors de la production. Cependant, leur spécificité ainsi que leur efficacité, désignées ici par « puissance », sont relativement faibles.
- Treg génétiquement modifiés : (*figure 14 B*) cette approche consiste en l'expansion de Treg polyclonaux modifiées afin d'exprimer un récepteur de synthèse, tel qu'un récepteur antigénique chimérique (CAR) ou un récepteur de cellule T (TCR) artificiel, capables de

reconnaître un antigène cible d'intérêt. Cette stratégie permet d'obtenir un plus grand nombre de cellules Treg spécifiques de l'antigène après expansion (46).

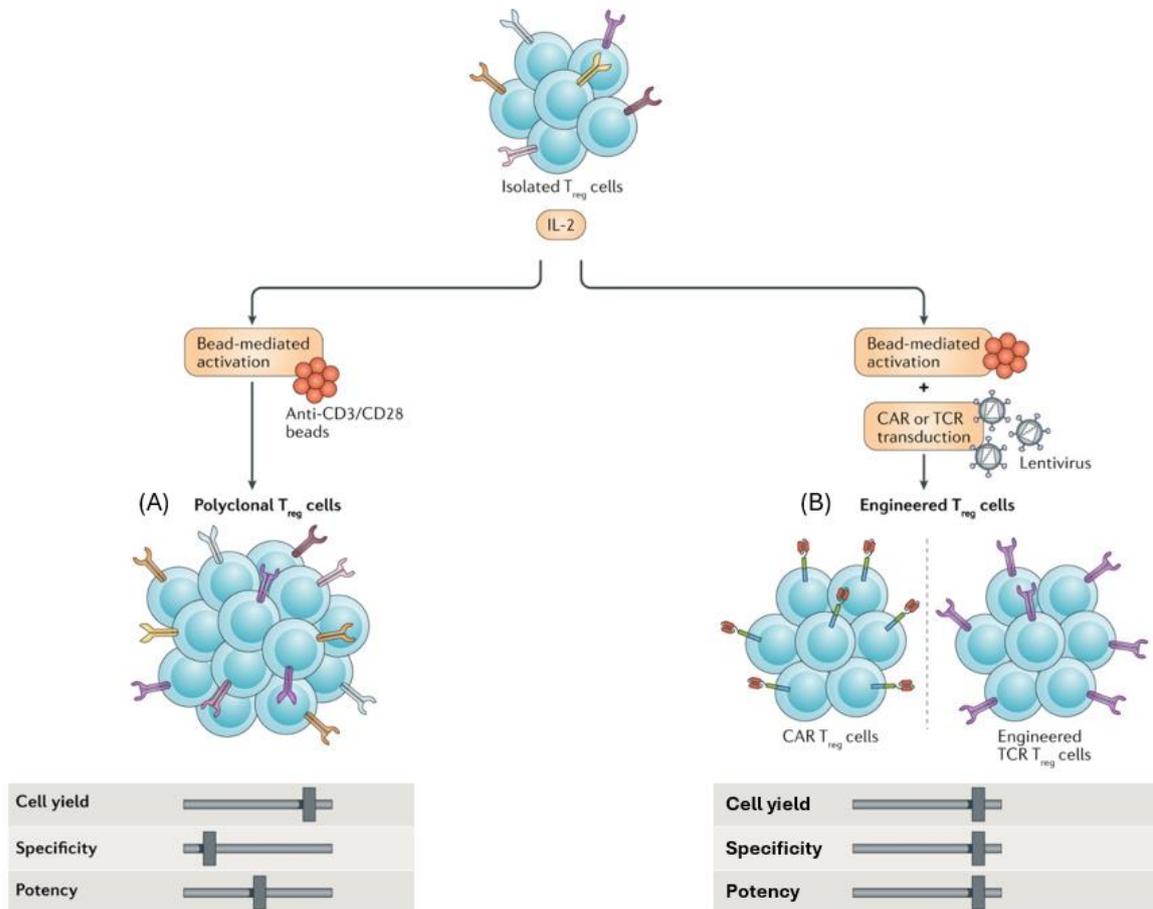


Figure 14 : Les différents types de thérapie cellulaire à base de Treg : (A) Treg polyclonaux, (B) Treg modifiés génétiquement (57)

2.2. Treg modifiés génétiquement

Deux types de récepteurs peuvent être transduits à la surface des Treg : (i) le CAR et (ii) le TCR.

Comme représenté sur la *Figure 15 (A)*, le TCR, naturellement exprimé par les Treg, se compose de chaînes alpha et bêta et se lie aux antigènes via les molécules du CMH présentes sur les cellules. Cette interaction CMH-dépendante permet aux TCR d'engager les Treg dans la régulation et l'inhibition de réactions immunitaires inappropriées. Un TCR recombinant est une version artificiellement générée par l'intégration des gènes qui codent pour les chaînes α et β d'un TCR spécifique à un antigène d'intérêt. L'objectif d'un TCR recombinant est de donner aux Treg la capacité de reconnaître spécifiquement des antigènes qui ne sont pas normalement ciblés par le

répertoire naturel du TCR d'une personne. Cela est particulièrement nécessaire dans le contexte de maladies où des cellules pathogènes ou des cellules tumorales échappent au système immunitaire en modifiant les antigènes qu'elles expriment ou en diminuant la présentation de ces antigènes au système immunitaire. Les TCR recombinants sont donc essentiels pour améliorer la précision et l'efficacité de la réponse immunitaire dans le traitement de cancers, d'infections chroniques ou d'autres maladies où une reconnaissance antigénique précise est nécessaire pour une thérapie efficace (57) (58).

Ces TCR recombinants permettent également aux Treg de cibler spécifiquement des antigènes liés à des maladies telles que le diabète de type 1 (59), la sclérose en plaques (60), et la polyarthrite rhumatoïde (61), en s'accumulant dans les tissus spécifiques où ils exercent une suppression ciblée. Ces cellules sont aussi utilisées pour augmenter la tolérance aux greffes (62) et pour traiter des conditions auto-immunes en modifiant la spécificité des cellules Treg pour qu'elles reconnaissent et régulent des antigènes pathogéniques spécifiques.

D'autre part, les récepteurs CAR, représentés par la *Figure 15 (B)*, absents chez les Treg à l'état naturel, sont conçus pour identifier directement des antigènes spécifiques à la surface cellulaire indépendamment de la présence du CMH. Une caractéristique majeure des CAR-Treg, par rapport aux Treg traditionnels, réside dans leur capacité à reconnaître des antigènes sans la présentation par une autre cellule, ouvrant de nouvelles voies pour la modulation précise des réponses immunitaires (57). Seuls les CAR-Treg seront développés dans le cadre de cette thèse.

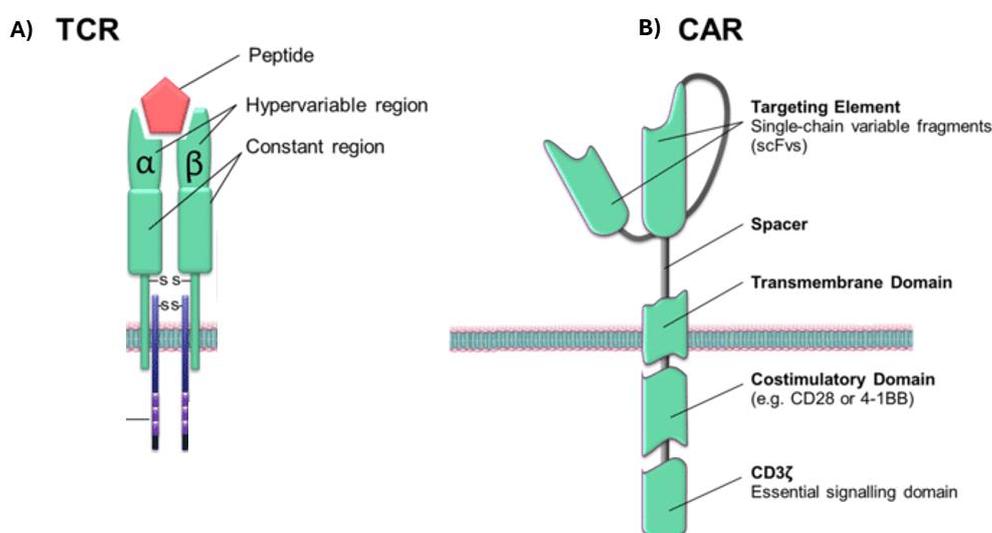


Figure 15 : Structure du TCR (A) et du CAR (B) (63)

Les TCR recombinants et les CAR offrent une spécificité antigénique aux cellules Treg, mais diffèrent dans leurs mécanismes et fonctions, offrant des avantages et des inconvénients variables selon les contextes. Les TCR sont efficaces même avec de faibles niveaux d'expression antigénique et sont dépendants du CMH. En revanche, les CAR-Treg requièrent une haute densité antigénique sur la cellule cible pour être activés, mais leur reconnaissance antigénique est indépendante du CMH, permettant une application plus large parmi les patients.

Les CAR-Treg, orientés vers des antigènes fortement exprimés, pourraient concentrer leur activité sur les sites d'inflammation mais présentent un risque de cytotoxicité (57).

Les enjeux cliniques des Treg polyclonaux et des CAR-Treg seront plus développés dans la Partie III de ce travail « Potentiel thérapeutique des CAR-Treg dans la transplantation rénale, défis techniques, cliniques et biologiques ».

3. Le CAR-Treg

3.1. Les cellules CAR-T : historique

Les cellules CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T cells) ont une histoire qui remonte aux années 1980 (64). Les scientifiques ont exploré la possibilité de créer des cellules immunitaires génétiquement modifiées pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses grâce à l'expression d'un récepteur chimérique. C'est seulement dans les années 2000 que des progrès significatifs ont été réalisés dans la conception des récepteurs antigéniques chimériques (CAR). Les CAR sont des protéines de synthèse qui confèrent aux cellules T la capacité de cibler des antigènes spécifiques exprimés par les cellules cibles. Au cours des années 2010, les essais cliniques ont montré des résultats prometteurs pour les CAR-T dans le traitement de certains types de cancers, en particulier les leucémies et les lymphomes (65). En 2017 la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis a approuvé la première thérapie CAR-T anti-CD19, appelée Kymriah® (tisagenlecleucel), développée par Novartis, pour le traitement de certaines formes de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) (66). Peu de temps après l'approbation de Kymriah®, une autre thérapie CAR T appelée Yescarta® (axicabtagene ciloleucel), développée par Kite Pharma, une filiale de Gilead Sciences, a été approuvée par la FDA pour le traitement de certains lymphomes non hodgkiniens (67). Depuis les approbations initiales, la recherche sur les cellules CAR-T s'est poursuivie, explorant de nouveaux antigènes cibles et élargissant le champ d'application de cette approche à d'autres types de cancers (65).

Les autorisations de mise sur le marché (AMM) pour les thérapies par CAR-T en Europe sont centralisées et données par l'European Medicines Agency (EMA). A ce jour, 6 traitements par CAR-T ont obtenu une AMM européenne (Table 2).

DCI	Nom commercial	Cible	Indications
Tisagenlecleucel	Kymriah®	CD19	- Lymphome folliculaire chez les patients adultes en rechute ou réfractaire après deux lignes de traitement ou plus - Lymphome B diffus à grandes cellules - Leucémies lymphoïdes aiguës de type B (68)
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta®	CD19	- Lymphome à cellules B de haut grade - Lymphome diffus à grandes cellules B - Lymphome médiastinal primaire à grandes cellules B - Lymphome folliculaire (69)
Brexucabtagene autoleucel	Tecartus®	CD19	- Lymphome à cellules du manteau - Leucémie lymphoblastique (70)
Lisocabtagène maraleucel	Breyanzi®	CD19	- Lymphome diffus à grandes cellules B - Lymphome à cellules B de haut grade - Lymphome primaire médiastinal à grandes cellules B - Lymphome folliculaire de grade 3B (71)
Idecabtagene vicleucel	Abecma®	B cell maturation antigen (BCMA)	- Myélome multiple (72)
Ciltacabtagenum autoleucelum	Carvykti®	BCMA	- Myélome multiple (73)

Table 2 : Les six thérapies CAR-T avec AMM européenne

3.2. Structure du CAR

Les CAR-Treg sont des lymphocytes T régulateurs génétiquement modifiés ex-vivo afin d'exprimer à leur surface des récepteurs dits « chimériques », appelés CAR (*Figure 16*). La structure et spécificité du CAR va permettre aux lymphocytes T régulateurs de cibler spécifiquement un antigène donné et donc de cibler une pathologie dans laquelle l'antigène va être reconnu et exprimé au sein du tissu inflammatoire.

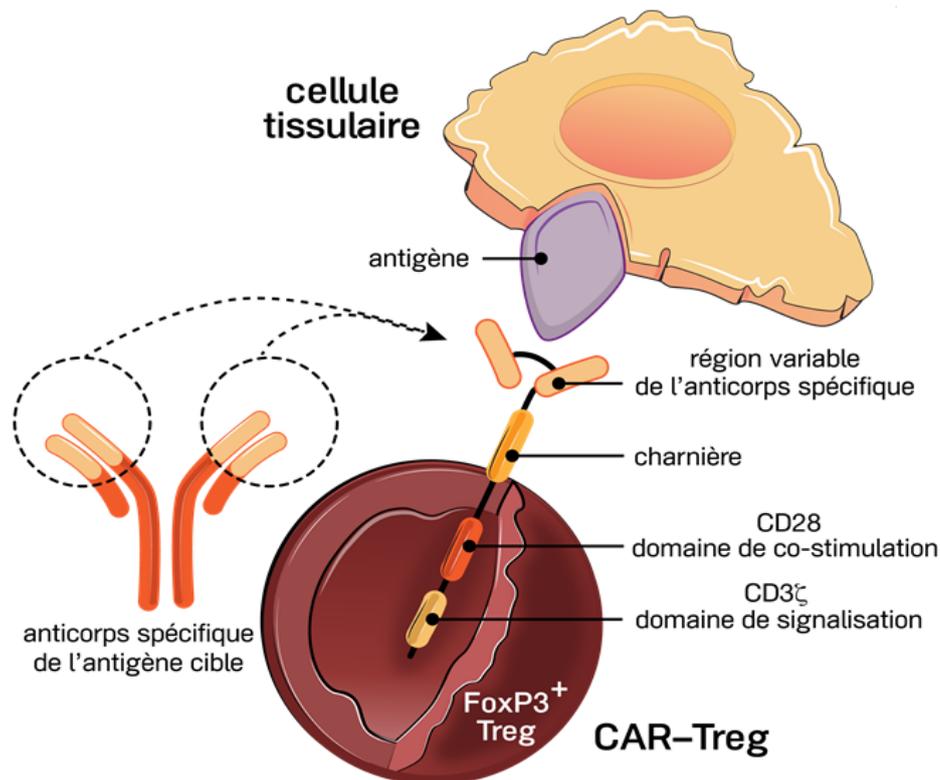


Figure 16 : Cellule Treg exprimant un CAR, ciblant spécifiquement un antigène (74)

Comme on peut le voir sur la *Figure 17*, le récepteur chimérique CAR est composé de 5 principales parties : le domaine de liaison à l'antigène (le plus couramment utilisé est le ScFv), détaillé en partie 3.2.1), la charnière, le domaine transmembranaire, le domaine de co-stimulation, et enfin les domaines de signalisation (75).

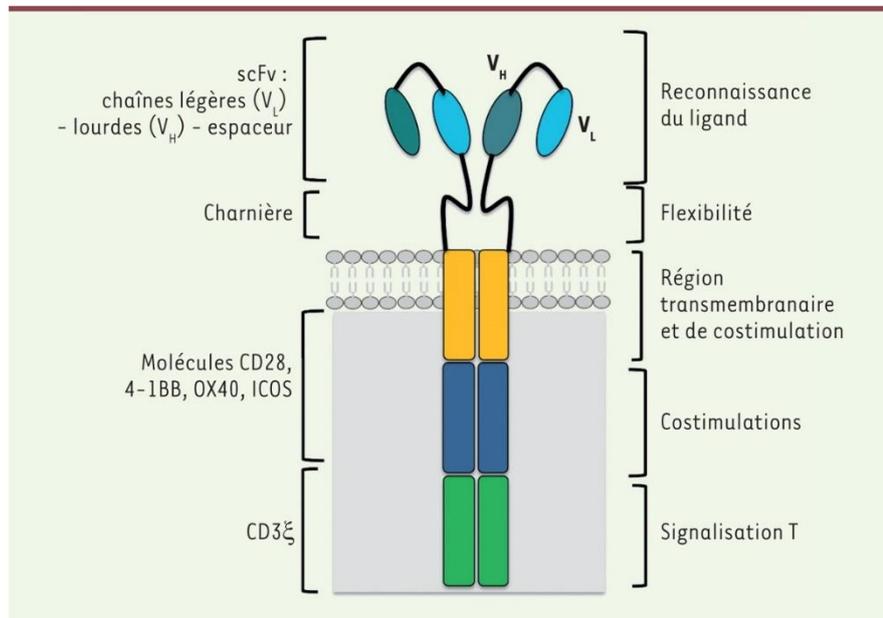


Figure 17 : Structure d'un récepteur chimérique CAR (65)

3.2.1. Domaine de liaison à l'Antigène

Le domaine de liaison à l'antigène est la partie extracellulaire du récepteur. Il confère au CAR sa spécificité et assure la reconnaissance de l'antigène ciblé par les CAR-Treg. Le domaine de liaison à l'antigène le plus couramment utilisé est un fragment variable à chaîne unique (scFv) qui est constitué des parties variables chaînes légères et lourdes variables (VL et VH respectivement) dérivées d'un anticorps et fusionnées par un peptide de liaison (*Figure 18*). Les scFv présentent des propriétés d'affinité et de spécificité similaires à celles des anticorps et réorientent la spécificité cellulaire vers les antigènes dans leur conformation native. Le scFv peut être orienté dans deux directions : VL-VH ou VH-VL, chaque orientation pouvant potentiellement présenter des différences d'expression et de fonction. De plus, la longueur et la composition en acides aminés du peptide liant les domaines VL et VH jouent un rôle important. Les liens codant pour des répétitions de glycine et de sérine sont les plus largement utilisés en raison de leur flexibilité, mais l'ajout d'acides aminés chargés au peptide de liaison peut également favoriser la fonction du scFv. (75)

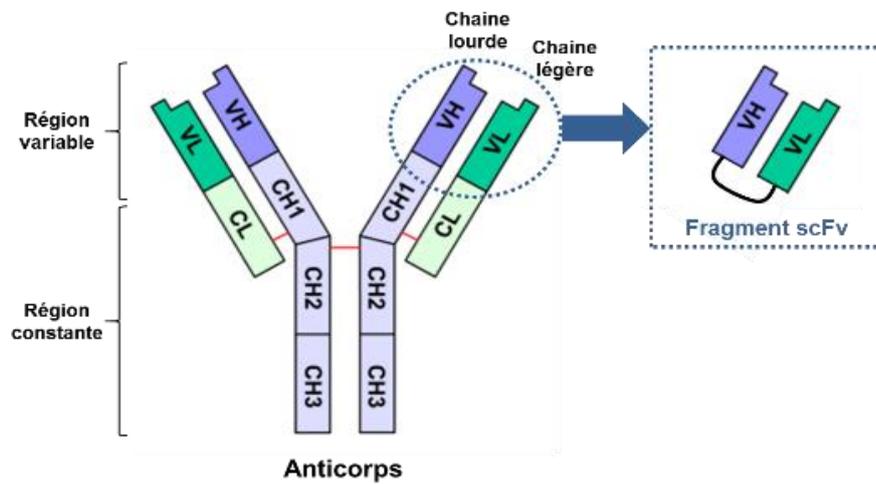


Figure 18 : Conception d'un fragment scFv (76)

3.2.2. Charnière

La charnière, que l'on peut également appeler *spacer* est également une partie extracellulaire du CAR faisant le lien entre le domaine de liaison à l'antigène et le domaine transmembranaire. Elle permet de décoller la partie scFv de la membrane cellulaire et apporte une certaine stabilité et flexibilité pour faciliter sa liaison à l'antigène dans un environnement en mouvement (75). Des études comparant différentes versions de CAR, avec ou sans charnière ont démontré la supériorité des CAR avec charnière en terme d'expansion cellulaire et d'efficacité antitumorale dans le cas des CAR-T anti-CD19 (77).

Différents aspects de la charnière peuvent affecter la fonction du CAR et doivent donc être pris en compte lors de sa conception :

- La longueur de la charnière peut influencer l'activation du CAR. Les charnières plus longues donnent une forte flexibilité permettant l'interaction avec les antigènes proximaux à la membrane et les antigènes plus complexes comme les glycoprotéines. Les charnières plus courtes, quant à elles, peuvent être plus efficaces pour induire l'activation cellulaire, ce qui les rend adaptées pour des antigènes de faible densité et des antigènes membranaires faciles à atteindre.
- Le type de charnière et la composition en acides aminés sont également importants pour la fonction du CAR. Les charnières couramment utilisées sont issues des domaines extracellulaires de CD4, CD8 et CD28, ainsi que de la région extracellulaire Fc de l'IgG. La région Fc d'un anticorps est la partie constante qui interagit avec les récepteurs Fc (FcR)

sur des cellules immunitaires comme les monocytes et les cellules NK. Des substitutions d'acides aminés sont fréquemment effectuées dans le domaine Fc afin d'éviter des interactions indésirables avec les récepteurs Fc gamma (FcR γ) exprimés par des cellules telles que les monocytes et les cellules tueuses naturelles (78).

Ainsi, l'ingénierie de la charnière (à la fois en termes de longueur et de composition en acides aminés) pourrait servir à ajuster la sensibilité ou l'activité du CAR afin d'optimiser sa fonctionnalité.

3.2.3. Domaine transmembranaire

La partie transmembranaire, généralement hydrophobe, est nécessaire pour l'ancrage du CAR à la membrane plasmique.

Les domaines transmembranaires des CAR se composent généralement du domaine transmembranaire de CD4, CD8, CD28 ou CD3 ζ . Tout comme la charnière, la sélection du domaine transmembranaire a un impact sur la stabilité du CAR-T, ainsi que sur sa signalisation.

Les récepteurs CAR de première génération contenant des domaines issus de CD3 ζ , présentent une stabilité moindre par rapport aux récepteurs CAR de deuxième génération dotés d'un domaine transmembranaire CD28 (79). Le choix du domaine transmembranaire influence la stabilité globale de la molécule une fois qu'elle est fusionnée avec un domaine C-terminal.

Ces données mettent en évidence l'importance non seulement du choix du type de domaine co-stimulateur intracellulaire, mais également de l'optimisation de la région transmembranaire pour assurer une expression et une fonction optimales du CAR-Treg (75).

3.2.4. Domaine de signalisation

Le domaine de signalisation (CD3 ζ) est une partie intracellulaire qui correspond au domaine de signalisation naturel des récepteurs de cellules T (TCR), permettant l'activation cellulaire du Treg après la liaison avec l'antigène. Ce domaine possède une région contenant des motifs d'activation basés sur la tyrosine des immunorécepteurs (ITAM), généralement dérivés de la molécule CD3 ζ du TCR. La molécule CD3 ζ , en particulier, est nécessaire pour la médiation de la signalisation en raison de sa capacité à transmettre des signaux d'activation via ses ITAMs. Ces motifs jouent un

rôle important dans la phosphorylation qui déclenche les voies de signalisation en aval essentielles pour l'activation et la survie des cellules T (78)(75).

3.2.5. Domaine de costimulation

Les domaines intracellulaires CD28 et 4-1BB sont fréquemment utilisés à cet effet. La co-stimulation offre un deuxième signal nécessaire pour la différenciation et la fonction des Treg (80). Par exemple, la signalisation de CD28 est essentielle pour le développement et l'homéostasie des Treg, la signalisation de 41BB permet quant à elle d'améliorer la prolifération des Treg (75).

3.3. Différentes générations de CAR

Les récepteurs CAR ont évolué à travers plusieurs générations, chacune conçue pour améliorer l'efficacité, la sécurité et la durabilité de la réponse immunitaire, en optimisant les domaines intracellulaires (domaines de signalisation et de co-stimulation) (*Figure 19*).

- Première génération de CAR : Ils se composent d'une région variable (scFv) qui reconnaît l'antigène cible, un domaine transmembranaire, et le domaine intracellulaire de signalisation de la molécule CD3 ζ . Bien que prometteurs, les essais *in vivo* ont révélé que ces CAR de première génération n'induisaient pas un niveau d'activation et d'expansion cellulaire suffisant pour maintenir une réponse immunitaire durable et efficace (81,82).
- Deuxième génération de CAR : Pour améliorer l'activation, la survie et la fonctionnalité des CAR-T, la deuxième génération a été développée en ajoutant un domaine de co-stimulation, généralement CD28 ou 4-1BB. Cette innovation a prouvé son efficacité, rendant les CAR-T plus performants grâce à une meilleure persistance. (82,83)
- Troisième génération de CAR : Ils intègrent une ou plusieurs molécules de co-stimulation supplémentaires. L'ajout de multiples signaux de co-stimulation aide à prévenir l'anergie cellulaire et réduit l'apoptose après reconnaissance antigénique, facilitant une sécrétion autocrine d'IL-2 et une capacité accrue d'expansion après des expositions répétées à l'antigène (82,84).

- Quatrième génération de CAR : intègre des avancées telles que l'expression de cytokines (comme IL-18, IL-15, IL-12) et de technologies de régulation comme SynNOTH, permettant une activation ciblée et contrôlée. Il existe également une variante de CAR intégrant les domaines de signalisation JAK-STAT de l'IL-2, imitant ainsi le signal de l'IL-2 dans les cellules CAR-T (75).

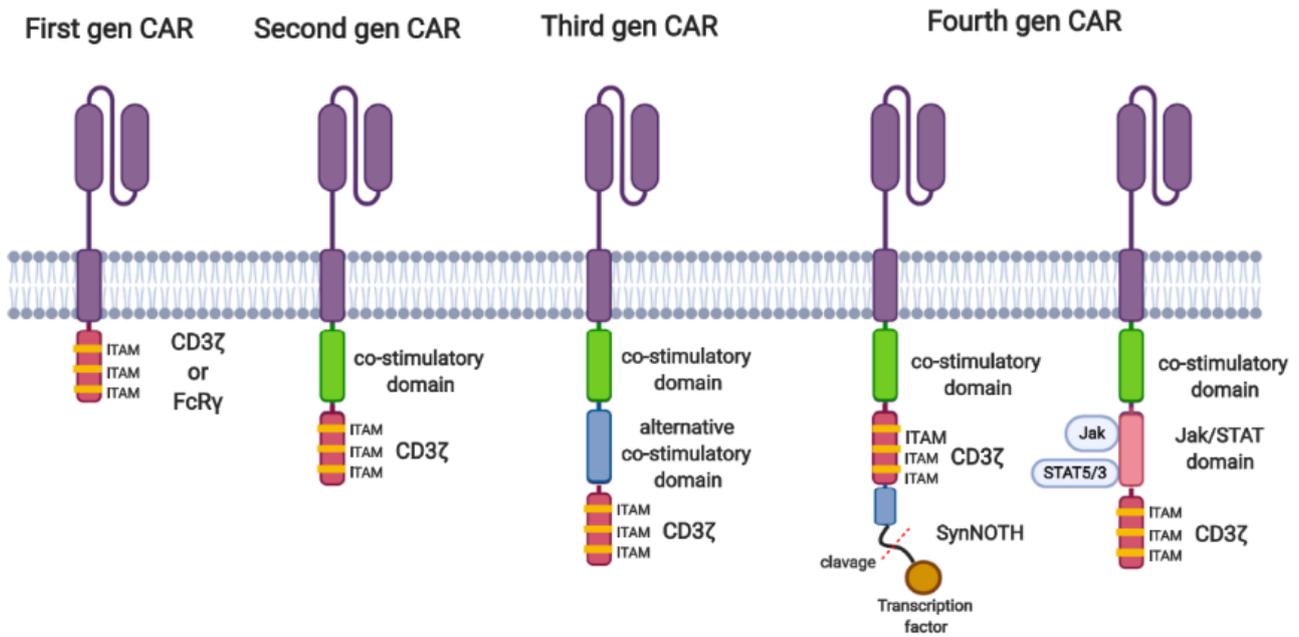


Figure 19 : Les différentes génération de récepteur chimérique à l'antigène (75)

3.4. Principe général d'un CAR-Treg

Le concept des CAR-Treg a été initialement breveté en 2008 par l'Institut Weizmann des sciences, en Israël, sous le numéro EP2126054 (85). Ce brevet, accordé par l'Office Européen des Brevets est licencié par TxCell en juin 2016 (74).

Le mécanisme d'action supposé des CAR-Treg tel qu'illustré par TxCell dans la *Figure 20*, diffère considérablement de celui des médicaments conventionnels. Les CAR-Treg manifestent une affinité spécifique pour le tissu à traiter et exercent leur impact sur plusieurs cibles moléculaires et cellulaires.

Le mécanisme d'action présumé des cellules CAR-Treg peut être synthétisé en quatre étapes distinctes.

- Injection des cellules CAR-Treg : l'administration des CAR-Treg se réalise par voie intraveineuse, indépendamment de la pathologie spécifique ou du tissu inflammatoire visé. Ce mode d'administration, moins invasif que les injections locales, est rendu possible par la capacité des Treg à migrer vers les tissus inflammatoires, un phénomène également appelé homing.
- Migration vers les tissus inflammatoires : sur leur membrane cellulaire, les Treg présentent les récepteurs CAR, qui leurs permettent de migrer vers le tissu ciblé.
- Activation locale des cellules CAR-Treg : la présentation locale de l'antigène joue un rôle indispensable dans l'efficacité thérapeutique des CAR-Treg. Une fois que les cellules CAR-Treg ont infiltré les tissus inflammatoires, il est impératif qu'elles entrent en contact avec leur antigène spécifique pour déclencher leur effet thérapeutique. Lorsque les CAR-Treg entrent en interaction avec l'antigène, la reconnaissance par le récepteur membranaire spécifique les active. Cette activation locale, spécifique à l'antigène, restreint l'activité anti-inflammatoire des cellules CAR-Treg à la région nécessitant un traitement (74).
- Élimination de l'inflammation locale : l'activation des CAR-Treg induit l'expression de nouveaux gènes dotés d'activités suppressives. Grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives, les cellules CAR-Treg agissent de manière synergique : (i) d'un côté, elles interviennent sur les composantes cellulaires de la réponse immunitaire pro-inflammatoire, et (ii) de l'autre côté, elles agissent sur le milieu extracellulaire. En effet, les CAR-Treg influencent les lymphocytes T effecteurs (Teff) par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, ils sécrètent des cytokines qui suppriment l'activité immunitaire, tel qu'IL-10 et TGF- β . De plus, le récepteur CTLA-4 présent sur les Treg activés concurrence le récepteur CD28 sur les Teff pour se lier aux molécules CD80/CD86 sur les cellules présentatrices d'antigènes. Les Treg peuvent sécréter des granzyme B/A et de la perforine, et engager le Fas ligand, des actions qui peuvent déclencher l'apoptose des Teff (cf partie 1.2.3) (86).

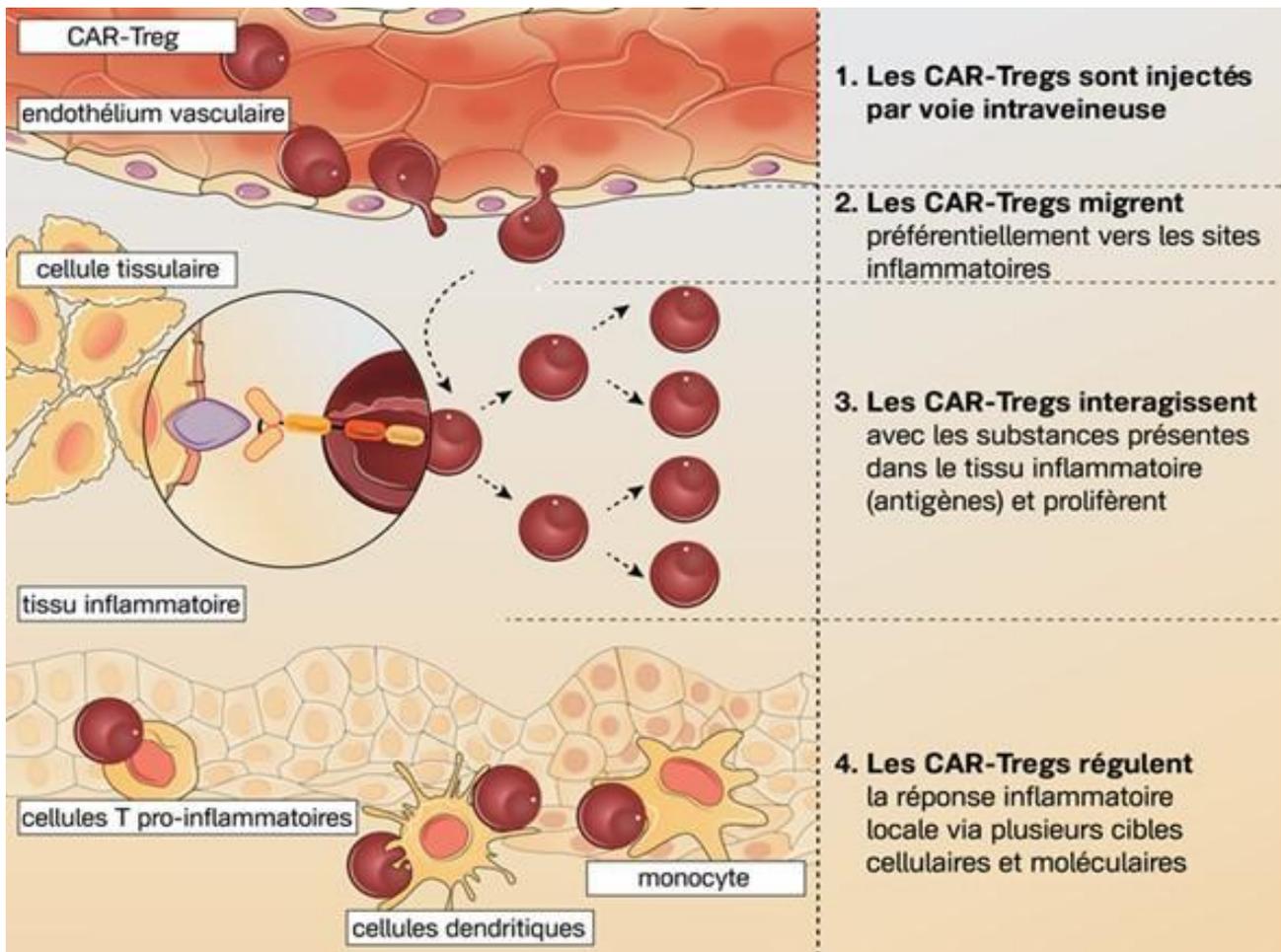


Figure 20 : Principe général supposé des CAR-Treg (74)

4. Aspect réglementaire des CAR-Treg

4.1. Définition d'un Médicament de Thérapie Innovante (MTI)

La notion de MTI est introduite pour la première fois, en 2008, par le règlement européen n°1394/2007/CE en 2008. Ce dernier permet d'établir des dispositions spécifiques pour ces nouveaux médicaments (87).

Ce règlement définit les MTI comme des médicaments qui sont des produits biotechnologiques, englobant diverses approches novatrices visant à traiter, prévenir ou guérir des maladies par le biais d'interventions thérapeutiques avancées, basées sur des médicaments à base de gènes, des médicaments cellulaires, ou des combinaisons de ceux-ci.

Afin de mieux comprendre le spectre d'application et l'innovation portée par les MTI, il est essentiel de connaître les quatre classes principales définies dans le règlement européen (88):

- Médicament de thérapie génique : « contient une substance active qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant et est administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique. Son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou au produit de l'expression génétique de cette séquence. »
- Médicament de thérapie cellulaire somatique : « contient ou consiste en des cellules ou des tissus qui ont fait l'objet d'une manipulation substantielle de façon à modifier leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurelles par rapport à l'usage clinique prévu, ou des cellules ou tissus qui ne sont pas destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur. Il est présenté comme possédant des propriétés permettant de traiter, de prévenir ou de diagnostiquer une maladie à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique de ses cellules ou tissus, ou est utilisé chez une personne ou administré à une personne dans une telle perspective. »

- Produits issus de l'ingénierie tissulaire : « il contient ou est constitué des cellules ou tissus issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire, comme des cellules ou tissus soumis à une manipulation substantielle, ou qui ne sont pas destinés à être utilisés pour la même fonction essentielle chez le receveur et chez le donneur. Il est présenté comme possédant des propriétés lui permettant de régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain, ou est utilisé chez l'être humain ou administré à celui-ci dans ce but. »
- Médicaments combinés de thérapie innovante : « Un médicament combiné de thérapie innovante est un médicament qui présente les caractéristiques suivantes :
 - il doit inclure comme partie intégrante un ou plusieurs dispositifs médicaux ou bien un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs ;
 - sa partie cellulaire ou tissulaire doit contenir des cellules ou des tissus viables, OU elle doit contenir des cellules ou des tissus non viables et doit être susceptible d'avoir sur le corps humain une action qui peut être considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités. »

Au-delà de fournir un cadre pour leur qualité, sécurité, et efficacité, le règlement européen n°1394/2007/CE (87) présente également un cadre réglementaire spécifique aux MTI au sein de l'Union européenne, facilitant ainsi leur accès au marché européen parmi lesquels :

Autorisation centralisée : Une innovation majeure introduite par ce règlement est le principe de l'autorisation centralisée. Cela implique que toute demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour un MTI doit être soumise à l'Agence européenne des médicaments (EMA). L'EMA procède à l'évaluation de la qualité, la sécurité, et l'efficacité du médicament, garantissant ainsi une approbation valide dans toute l'union européenne. Cette procédure centralisée vise à harmoniser l'accès aux thérapies innovantes pour tous les patients européens.

Procédure Accélérée : Pour plus de flexibilité, plusieurs parcours accélérés sont disponibles pour les MTI comme pour les autres médicaments : autorisation de mise sur le marché conditionnelle, autorisation de mise sur le marché accordée sous circonstances exceptionnelles et/ou à la suite d'une évaluation accélérée. L'EMA a également développé et promu des dispositifs réglementaires pour permettre un accès plus rapide aux médicaments innovants en encourageant leur développement dans le respect des exigences réglementaires. Le règlement prévoit en effet la possibilité d'une procédure d'autorisation accélérée pour les MTI, sous certaines conditions, telles que la présence d'un intérêt public marqué ou des besoins médicaux non satisfaits.

Surveillance après la mise sur le marché : Pour assurer une surveillance continue de la sécurité et de l'efficacité des MTI après leur approbation, le règlement instaure des exigences rigoureuses en matière de suivi post-commercialisation. Cela inclut la collecte et l'analyse continues de données, afin de détecter et de gérer tout effet indésirable ou autre problème de sécurité pouvant survenir.

En consolidant ces aspects réglementaires, le règlement européen n°1394/2007/CE sur les MTI établit un cadre solide visant à soutenir le développement, l'évaluation, et la mise à disposition des thérapies innovantes, tout en assurant leur sécurité et leur efficacité pour les patients européens.

4.2. CAR-T : entre Thérapie Cellulaire et Thérapie Génique

Les CAR T sont souvent décrits comme des médicaments de thérapie cellulaire ET génique. En effet, les traitements thérapie par CAR-T implique la modification génétique des lymphocytes T du patient pour exprimer un récepteur antigénique chimérique spécifique, généralement dirigé contre des cellules cibles, ce qui en fait un candidat à la fois pour la thérapie génique et cellulaire.

La distinction entre thérapie cellulaire et thérapie génique réside souvent dans l'approche principale du traitement. La thérapie génique se concentre principalement sur la modification directe de l'ADN des cellules pour atteindre un effet thérapeutique, tandis que la thérapie cellulaire implique l'utilisation de cellules modifiées pour exercer un effet bénéfique. Les CAR-T s'inscrivent dans les deux catégories, utilisant à la fois la manipulation des cellules vivantes et la modification génétique, ce qui soulève des questions intéressantes quant à leur classification précise et souligne la complexité et l'interdépendance des approches en biotechnologie médicale.

Bien que les CAR-T soient parfois classés comme une thérapie cellulaire parce qu'ils utilisent des cellules vivantes modifiées pour traiter ou combattre des maladies, l'EMA les classe comme une forme de thérapie génique (68). Cette classification peut être attribuée à la modification du matériel génétique des cellules T pour introduire le récepteur chimérique, soulignant ainsi l'aspect de modification génétique propre à la thérapie génique.

Partie III : Potentiel thérapeutique des CAR-Treg dans la transplantation rénale : défis techniques, cliniques et biologiques.

Après avoir exploré les concepts fondamentaux de l'insuffisance rénale et de la transplantation rénale, ainsi que les caractéristiques et les mécanismes des CAR-Treg, cette section se concentre sur les défis techniques, cliniques et biologiques associés à leur utilisation thérapeutique. Cette partie va d'abord traiter les aspects techniques de la production des CAR-Treg, puis examiner les défis cliniques rencontrés lors de leur application, et enfin aborder les défis biologiques de leur usage dans le contexte de la transplantation rénale.

1. Production des CAR-Treg pour la transplantation rénale : Défis techniques

Le développement des cellules CAR-T a mis en lumière divers défis et obstacles pour garantir des traitements efficaces, sûrs, et reproductibles. L'application de ces connaissances aux thérapies CAR-Treg est susceptible de faciliter leur adoption clinique. Fritsche et coll. (89) ont examiné en détails les techniques de production optimisées de CAR-Treg en conformité aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF ou en anglais Good Manufacturing Practices : GMP). Ils soulèvent des défis tels que l'élaboration de produits immédiatement utilisables, l'amélioration de leur persistance *in vivo* et la réduction des toxicités liées aux CAR-Treg. Ces obstacles, et particulièrement ceux liés aux CAR-Treg ciblant l'antigène HLA-A02, dont l'application et les défis spécifiques seront détaillés ultérieurement, seront explorés dans cette partie.

1.1. Procédé général de production

La production d'une thérapie CAR-Treg ciblant HLA-A02, décrite dans la *Figure 21*, débute par le prélèvement des lymphocytes T du patient à travers une leucaphérèse. Ces lymphocytes sont ensuite soumis à un processus d'isolement des Treg, sélectionnés pour leurs marqueurs spécifiques comme CD4+, CD25 high, et FOXP3+. Ces Treg sont modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR) qui cible spécifiquement l'antigène HLA-A02, en utilisant des vecteurs viraux pour insérer le gène du CAR dans le génome des Treg. Après modification génétique, les CAR-Treg sont cultivés et multipliés *ex-vivo*, en présence de cytokines et facteurs de croissance, afin d'accroître leur quantité jusqu'à atteindre la dose nécessaire pour l'administration. Avant la réinjection chez le patient, ces cellules sont soumises à des contrôles qualité rigoureux pour vérifier leur pureté, viabilité et la spécificité de l'expression du CAR. Les cellules sont finalement réinjectées au patient, où elles contribuent à la tolérance du greffon en ciblant

spécifiquement les cellules exprimant HLA-A02, avec un suivi étroit pour surveiller l'efficacité de la thérapie et identifier d'éventuels effets secondaires (89).

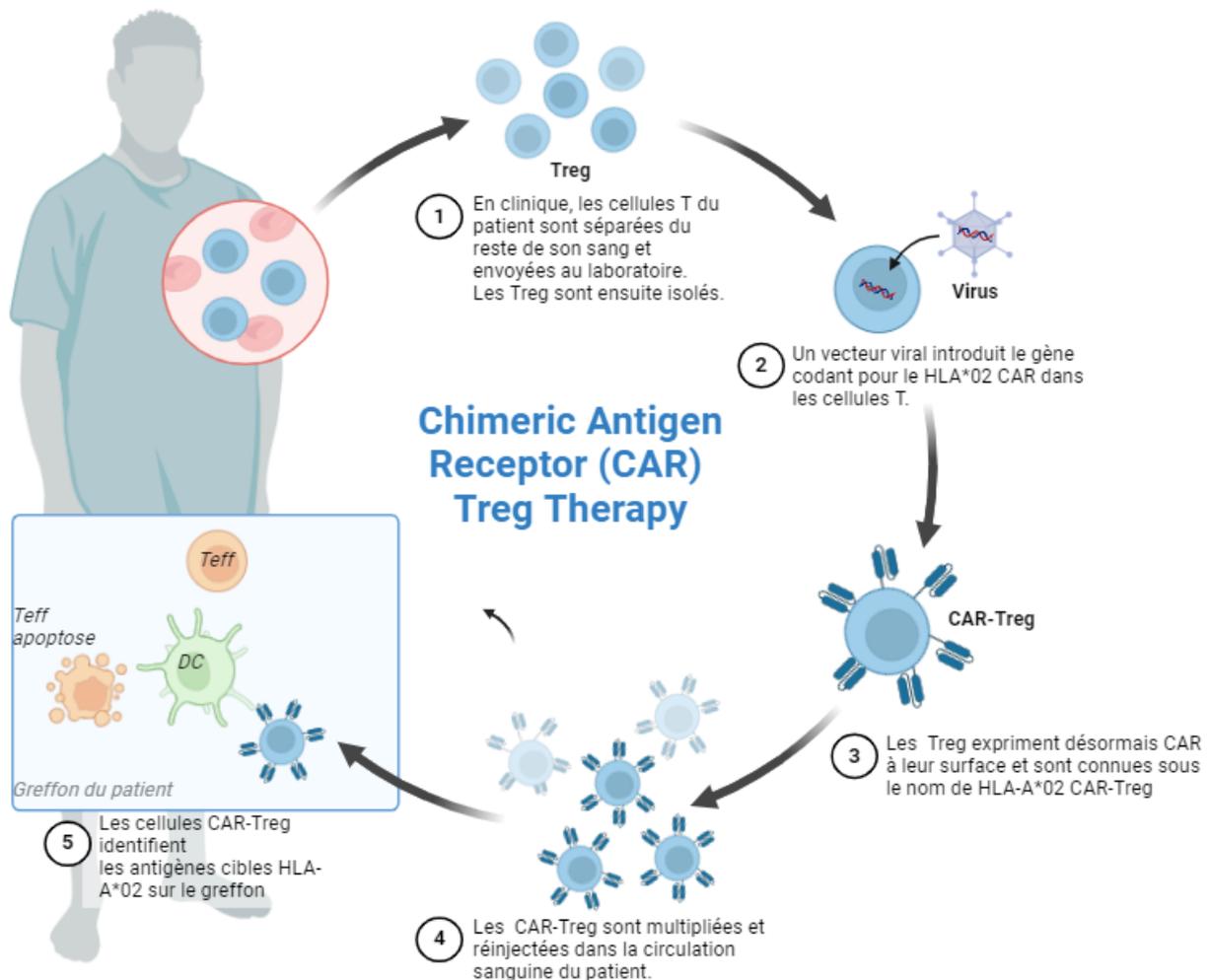


Figure 21 : Procédé de production global des CAR-Treg

Comme décrit dans la *Figure 22*, la fabrication de CAR-Treg commence par l'isolement et l'activation des cellules des Treg polyclonales. Le processus commence par une leucaphérèse suivie d'une sélection initiale qui élimine les cellules CD8+ et enrichit les Treg CD4+CD25high FOXP3+ à travers des techniques de tri cellulaire, détaillées au paragraphe suivant. L'activation est réalisée via des billes anti-CD3/CD28 et de l'IL-2 exogène, avec la possibilité d'utiliser un inhibiteur de mTOR, comme le sirolimus ou l'évérolimus, pour empêcher l'expansion de cellules T effectrices contaminantes. Après une expansion suffisante, les Treg atteignent une haute pureté et fonctionnalité : on parle alors de « Master Product Treg ».

Une fois ce « Master product Treg » obtenu, il est ensuite génétiquement modifié pour exprimer un CAR, utilisant un vecteur viral conforme aux normes BPF. Le produit CAR-Treg subit alors une expansion supplémentaire et est soumis à des tests de contrôle qualité avant d'être soit cryoconservé, soit administré frais au patient.

Les défis du procédé de fabrication incluent la gestion de la pureté et de la fonctionnalité des Treg tout au long de la fabrication, et l'application de techniques spécifiques pour l'enrichissement des cellules et leur modification génétique (89).

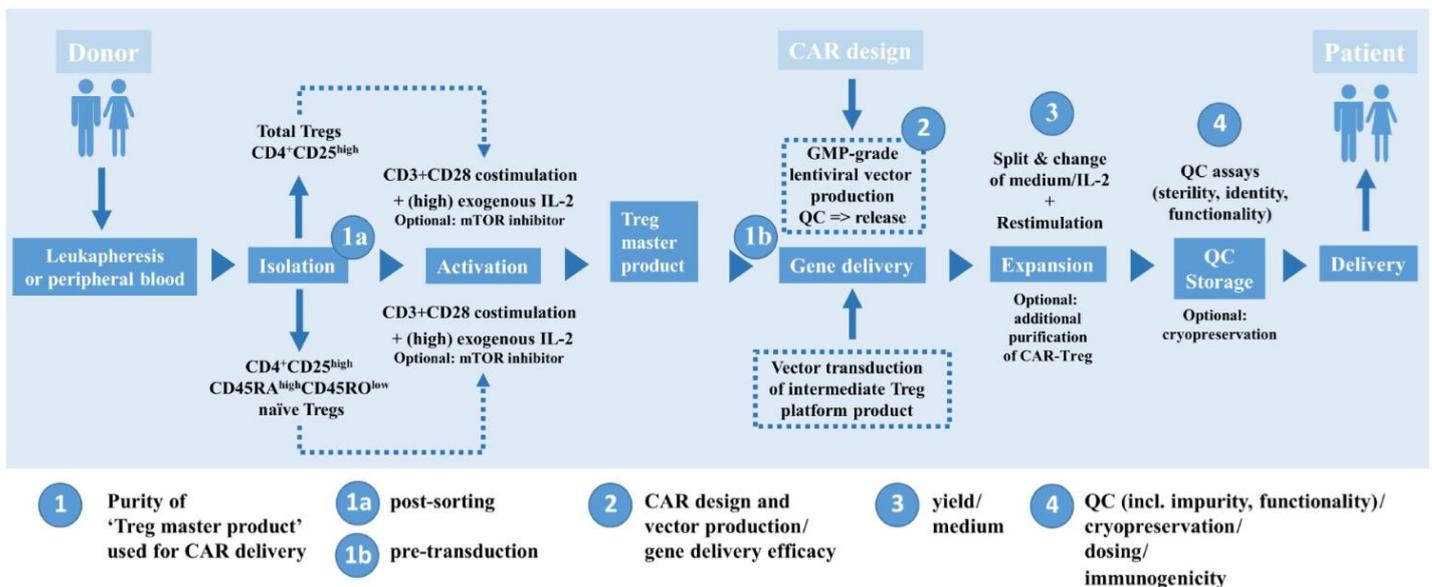


Figure 22 : Flux de fabrication actuel des produits CAR-Treg et défis associés (89)

1.2. La pureté du « Product Master Treg »

Au cœur du développement des thérapies CAR-Treg, la principale difficulté réside dans la capacité à isoler une quantité suffisante de Treg très purs, étant donné leur proportion initialement basse (environ 3%) parmi les cellules mononucléées du sang périphérique. Les méthodes de tri précliniques utilisant la cytométrie en flux (CMF) ne satisfont pas encore aux exigences des BPF, malgré qu'elles permettent d'obtenir une pureté post-tri remarquable (approximativement 98 %). Les protocoles BPF actuels s'appuient principalement sur les technologies de tri cellulaire magnétique (MACS), également connues sous le nom de séparation immunomagnétique. Bien qu'elles soient fonctionnelles, ces dispositifs conduisent à des puretés variables post-tri, de 60 à 80%. Cette pureté insuffisante nécessite l'utilisation de techniques d'expansion sélective pour augmenter le nombre de Treg. Toutefois, cette approche peut entraîner une variabilité dans la pureté des cellules, notamment

en raison de la contamination par des cellules T conventionnelles (Tconv) ou de l'instabilité potentielle des Treg.

L'intégration du CAR aux Treg est particulièrement critique puisqu'elle se fait pendant une phase d'expansion où la pureté des Treg est encore faible. Ceci présente un risque de redirection accidentelle des cellules Tconv indésirables vers des cibles spécifiques du CAR, élevant les préoccupations en matière de sécurité.

Pour contrer ces risques, deux approches sont envisagées :

- L'emploi de Treg naïfs : Issus du thymus, ces Treg affichent une stabilité fonctionnelle accrue, rendant leur utilisation préférable dans la production de CAR-Treg. L'enrichissement en Treg CD45RA+ est favorisée pour renforcer la sécurité, bien que cela puisse limiter le rendement global en raison de la prédominance du phénotype de mémoire CD45RO chez les Treg adultes.
- Des méthodes de tri plus performantes : L'utilisation de techniques CMF pour le tri des Treg améliore leur pureté grâce à l'introduction de marqueurs sélectifs additionnels. Néanmoins, la reconnaissance de ces dispositifs comme étant conformes aux normes BPF par les autorités réglementaires, surtout en Europe, est restreinte, et leur intégration dans des études cliniques avancées pour l'obtention d'autorisations de mise sur le marché représente un défi.

Ces stratégies soulignent la nécessité de mettre au point des méthodes de tri et d'expansion qui optimisent à la fois la pureté et le rendement des Treg, tout en minimisant les risques de contamination ou la redirection indésirable des cellules Tconv, tout en respectant les contraintes réglementaires Ceci est nécessaire pour assurer la sécurité et l'efficacité des thérapies basées sur les CAR-Treg (89).

1.3. Design du CAR et choix du vecteur

Dans la conception du CAR pour la génération de Treg, nous identifions différents enjeux majeurs qui seront décrits ci-dessous.

1.3.1. Signalisation fonctionnelle du CAR

Le bon design des récepteurs CAR dans la fabrication des CAR-T permet d'assurer une activation et une expansion cellulaires efficaces. Comme décrit dans la partie II, les récepteurs CAR de première génération se composent uniquement d'un domaine de liaison antigénique extracellulaire, d'un domaine transmembranaire, et d'une chaîne de signalisation CD3 intracellulaire. Avec l'évolution des technologies, les constructions de nouvelle génération intègrent désormais des domaines de signalisation provenant de CD28 et/ou de 4-1BB (CD137), qui jouent un rôle significatif dans l'amélioration de l'activation et de la fonction des cellules T.

En termes de processus de fabrication, la stimulation des cellules T par les anticorps anti-CD3 et CD28, souvent par des billes magnétiques, est la méthode la plus utilisée pour activer les cellules T dans la production de CAR-T. Cette méthode est suivie par l'ajout de l'IL-2, enrichissant ainsi le milieu de culture pour soutenir la croissance et l'activation des cellules.

Cependant, pour les CAR-Treg, le design du CAR peut nécessiter des adaptations spécifiques pour maximiser leur fonctionnalité tout en préservant leur capacité immunorégulatrice. Il n'existe pas encore de consensus sur la nécessité de privilégier la signalisation 4-1BB ou CD28 dans ce contexte. Néanmoins, de nombreuses études (90–92) recommandent l'utilisation du CD28, particulièrement dans les situations de transplantations d'organes, pour maintenir l'activation et la fonctionnalité des CAR-Treg.

Le design optimal des récepteurs CAR est essentiel non seulement pour l'efficacité thérapeutique immédiate mais aussi pour la survie à long terme et la fonctionnalité des cellules CAR-Treg dans des applications cliniques variées telles que les maladies auto-immunes et la tolérance immune post- transplantations (89).

1.3.2. Efficacité de l'intégration génique

L'efficacité des méthodes d'intégration de gènes est importante dans la transduction du gène CAR. Pour ceci, il existe une diversité de vecteurs utilisés, incluant à la fois des vecteurs viraux, tels que les rétrovirus et les lentivirus, et des vecteurs non viraux.

Les systèmes à base de lentivirus (*Figure 23*) sont couramment utilisés en raison de leur efficacité, mais ils sont également coûteux et nécessitent une chaîne de production spécialisée incluant des analyses rigoureuses de contrôles qualité. La mise en œuvre de ces systèmes n'est pas anodine ; elle doit être conduite dans un environnement sécurisé de biosécurité de niveau S2 (BSL-2). Jusqu'à présent, les essais cliniques utilisant des cellules CAR-T basées sur des lentivirus n'ont pas relevé de problèmes de sécurité majeurs (89,93) . Néanmoins, les vecteurs non viraux gagnent en intérêt, étant perçus comme des alternatives potentiellement plus sûres et économiques.

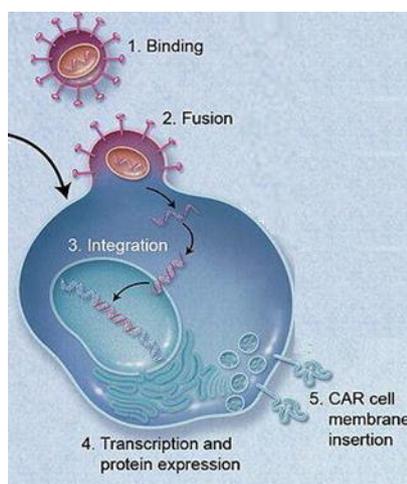


Figure 23 : Exemple d'intégration du gène CAR à l'aide d'un lentivirus (94)

Parmi les innovations récentes, figure la technique de transfert de transgènes CAR par des systèmes transposon/transposase, utilisant des plasmides. Un transposon est une séquence d'ADN qui peut s'insérer et se déplacer d'un endroit à un autre au sein d'un même brin d'ADN ou entre différents brins, soit dans un génome soit dans un plasmide. Un plasmide est une molécule d'ADN bicaténaire et généralement circulaire, distincte de l'ADN chromosomique de la cellule, qui peut se répliquer de manière autonome et n'est pas essentielle pour la survie cellulaire. Dans cette stratégie, les transgènes CAR sont intégrés dans une séquence de transposon, puis le plasmide est introduit dans les cellules T par électroporation. La transposase excise ensuite la séquence de transposon et le transgène CAR du plasmide et l'insère dans le génome des cellules T (*Figure 24*). Les premières tentatives utilisant la transfection d'ADN nu ont montré des taux d'intégration faibles par rapport

aux systèmes viraux, mais les méthodes transposon récentes ont montré des taux d'intégration comparables à ceux des vecteurs viraux.

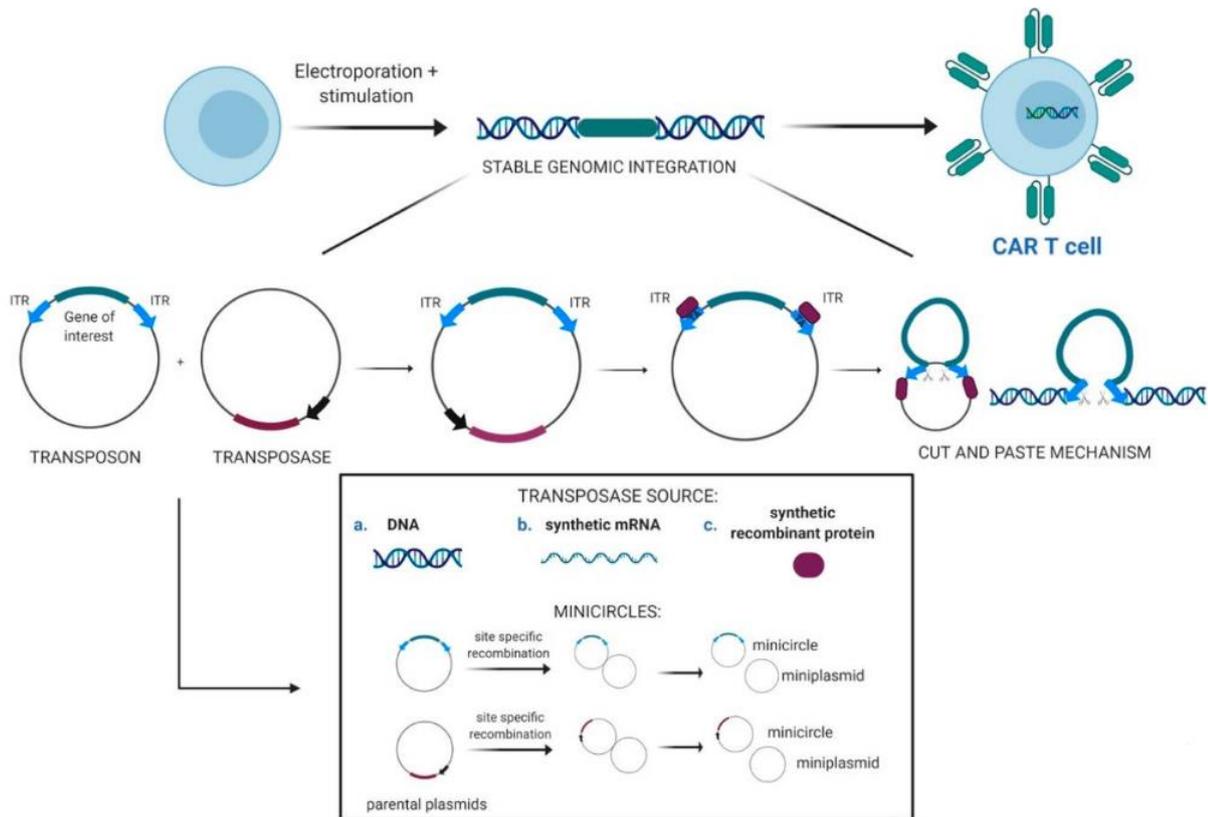


Figure 24 : Intégration du CAR par système transposon/transposase (95)

Les systèmes de livraison basés sur des virus et des plasmides comportent des risques de perturbation génique ou d'événements oncogéniques en raison de l'intégration semi-aléatoire de l'ADN. Réduire le nombre de copies vectorielles par cellule diminue aussi le risque d'oncogénèse par insertion, en abaissant progressivement les niveaux d'ADN plasmidique suite à la transfection.

La transduction virale reste la méthode dominante dans la livraison de transgènes CAR, représentant 94% des essais cliniques, avec une préférence pour les lentivirus (54%) par rapport aux rétrovirus (41%) (89).

2. Application clinique des CAR-Treg dans le contexte de la transplantation rénale

2.1. Preuve de concept : évaluation des Treg polyclonaux

Au cours de la dernière décennie, les progrès scientifiques, détaillés dans la partie précédente, ont marqué un tournant dans le développement de thérapies innovantes. Parmi celles-ci, l'utilisation des thérapies à base de CAR-Treg se distingue pour induire un environnement tolérogène, essentiel propice à la prévention du rejet de greffe (96). L'objectif est de protéger le greffon des réactions allo-immunes tout en s'affranchissant d'une immunosuppression pharmacologique à hautes doses et à long terme.

2.1.1. L'étude ONE : vers une réduction de l'immunosuppression avec l'utilisation de Treg polyclonaux

L'innovation dans le domaine de la transplantation rénale a franchi un cap significatif en 2020 avec l'évaluation de thérapie par Treg dans l'étude ONE (97). Cette étude multicentrique internationale de phase 1/2a, impliquant des essais conduits dans huit hôpitaux répartis entre la France, l'Allemagne, l'Italie, le Royaume-Uni et les États-Unis, a mis en lumière la possibilité d'intégrer des cellules régulatrices dans le traitement des receveurs de greffe de rein. Les résultats de ces essais, regroupant un échantillon de 130 patients, comprenaient un essai de groupe de référence standard et six essais de thérapie cellulaire. Les patients du groupe de référence ont reçu les soins standard avec du basiliximab, des corticostéroïdes à doses décroissantes, du mycophénolate mofétil et du tacrolimus. Les patients des six essais de thérapie cellulaire ont reçu l'un des six produits de thérapie cellulaire contenant des Treg, des cellules dendritiques ou des macrophages, en remplacement du basiliximab, avec la possibilité de diminuer progressivement le mycophénolate mofétil. Le critère principal d'évaluation était le rejet aigu confirmé par biopsie (BCAR) dans les 60 semaines suivant la transplantation.

Les résultats ont été évalués selon deux types d'analyses : en intention de traiter et en per protocole.

- Analyse en Intention de Traiter : (Figure 25 A) Cette analyse inclut tous les patients initialement assignés aux groupes de traitement, indépendamment de leur adhésion au protocole. Les résultats montrent une probabilité de survie sans BCAR de 88% dans le groupe de référence (RGT) (n=66) et de 84% dans le groupe de thérapie cellulaire (CTG) (n=38).

- Analyse per Protocole : (Figure 25 B) Cette analyse inclut uniquement les patients ayant suivi le protocole de l'étude comme prévu. Les résultats indiquent une probabilité de survie sans BCAR de 83% pour le RGT (n=47) et de 81% pour le CTG (n=32).

Les essais ont été menés entre le 11 décembre 2012 et le 14 novembre 2018. Parmi les 782 patients évalués pour l'éligibilité, 130 (17%) ont été inscrits et 104 ont été traités et inclus dans l'analyse. Les 66 patients du RGT étaient à 73% des hommes avec un âge médian de 47 ans, tandis que les 38 patients des six essais CTG étaient à 71% des hommes avec un âge médian de 45 ans.

Le traitement standard du RGT a abouti à un taux de rejet aigu confirmé par biopsie de 12%, tandis que le taux global de BCAR pour les six essais de thérapie cellulaire était de 16%. De plus, 15 patients (40%) ayant reçu des thérapies cellulaires ont été sevrés avec succès du mycophénolate mofétil et maintenus en monothérapie avec le tacrolimus. Les données combinées des événements indésirables et des épisodes de BCAR des six essais de thérapie cellulaire n'ont révélé aucun problème de sécurité par rapport au groupe standard, et moins d'épisodes d'infections ont été enregistrés dans les essais CTG par rapport au RGT.

Les résultats ont révélé que l'utilisation de thérapie par Treg était non seulement sûre mais également associée à une diminution des complications infectieuses. De plus, les études utilisant des Treg polyclonaux autologues chez les receveurs de greffe de rein ont montré des taux de rejet similaires au traitement standard au cours de la première année, fournissant ainsi des preuves initiales de leur efficacité. Ces résultats suggèrent que la thérapie par cellules immunitaires régulatrices est une approche prometteuse pour minimiser la charge de l'immunosuppression pharmacologique chez ces patients (97).

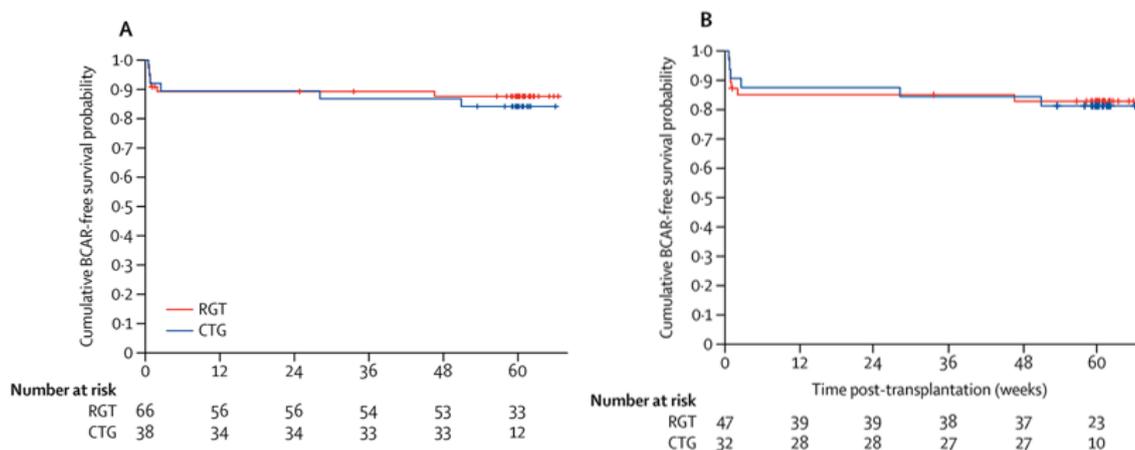


Figure 25 : Résultats du critère principal rejet aigu confirmé par biopsie (BCAR), entre groupe de référence standard (RGT) et six essais de thérapie cellulaire (CTG). (A) Analyse en intention de traiter (B) Analyse per protocole (97).

Ces études soulignent l'intérêt des thérapies par cellules T régulatrices dans des thérapies post-transplantation, ouvrant la voie à des protocoles de traitement innovants qui visent à alléger l'immunosuppression générale. Elles ont fourni des preuves initiales de leur efficacité. En effet, la capacité de sevrer avec succès 40% des patients traités avec thérapie par cellules T régulatrices du mycophénolate mofétil, tout en maintenant une monothérapie de tacrolimus, illustre le potentiel de ces approches thérapeutiques pour améliorer la qualité de vie des receveurs de greffe, en minimisant les risques liés à l'immunosuppression à long terme.

L'efficacité de la thérapie par Treg, y compris sa faisabilité, sa tolérance, et sa sécurité, a été établie au travers d'études cliniques préliminaires dans le contexte de la transplantation (98).

2.1.2. L'étude TWO: validation de la thérapie par Treg polyclonaux dans la transplantation rénale

L'étude TWO (99) s'inscrit dans le prolongement direct des découvertes réalisées lors de l'étude ONE, en se concentrant spécifiquement sur l'application de la thérapie par Treg chez les receveurs de greffe de rein de donneurs vivants. Ce nouvel essai contrôlé randomisé de phase 2b, qui a débuté en 2022, vise à confirmer la sécurité et à explorer l'efficacité de l'infusion de Treg autologues expansés ex vivo, administrés cinq jours après la transplantation. Avec 60 patients répartis équitablement entre le traitement par Treg et le « standard of care », l'étude ambitionne de démontrer une réduction du rejet aigu évalué par biopsie à 18 mois, tout en évaluant l'impact sur les protocoles d'immunosuppression, la dysfonction chronique du greffon et les complications médicamenteuses. Cet essai clinique est toujours en cours.

2.2. Evaluation pré-clinique et développement des CAR-Treg

Bien que la majorité des essais cliniques sur les Treg aient utilisé jusqu'à présent des cellules polyclonales expansées ex vivo, les Treg spécifiques à l'antigène, dont les approches CAR-Treg promettent une approche plus efficace (100). Les CAR, conçus avec un domaine de liaison à l'antigène spécifique, permettent d'orienter les CAR-Treg vers des cibles antigéniques définies, offrant ainsi une nouvelle stratégie prometteuse. Selon des études précliniques (101), cette spécificité devrait permettre une immunosuppression ciblée, minimisant les effets indésirables d'une immunosuppression généralisée associée à l'utilisation de Treg polyclonaux.

2.2.1. Choix de l'antigène d'intérêt

La sélection d'un antigène cible adéquat est fondamental dans le développement des thérapies par CAR-Treg. Cette spécificité permet aux CAR-Treg de limiter l'activation et la fonction de clones de lymphocytes T effecteurs contre l'antigène ciblé sur le greffon, favorisant ainsi la tolérance au greffon lors des transplantations rénales. Le choix de cet antigène, notamment dans le cadre des transplantations rénales, dépend de plusieurs facteurs, incluant sa spécificité vis-à-vis des cellules hôtes du greffon et la présence d'antigènes spécifiques activés sur les Treg. À cet égard, les antigènes du système HLA, et plus particulièrement l'allèle HLA-A02, se distinguent comme cibles prometteuses. Cette préférence est motivée par le fait que HLA-A02 est souvent impliqué dans les incompatibilités de transplantation, avec une proportion significative de greffons « mismatch » sur le HLA-A02 en Europe et aux États-Unis. Environ 70 % des receveurs de transplantation caucasiens sont négatifs pour HLA-A02 et 30 % des donneurs d'organes sont positifs pour cet allèle, ce qui entraîne une incompatibilité potentielle dans 21 % des transplantations (101). Cette discordance sur l'allèle HLA-A02 constitue un obstacle majeur à la réussite des transplantations, provoquant de puissantes réactions immunitaires et la production d'anticorps anti-HLA-A02, menant souvent à des rejets de greffon. La fréquence élevée de l'allèle et la disproportion entre les receveurs négatifs et les donneurs positifs accentuent le risque d'incompatibilité (101).

Cette approche a le potentiel de supprimer sélectivement les réponses immunitaires contre les cellules HLA-A02(+) du greffon, minimisant ainsi le risque de rejet du greffon. Sangamo Therapeutics a capitalisé sur cette stratégie en développant un vecteur lentiviral qui code pour un CAR anti-HLA-A02.

Ainsi, l'intégration de ces avancées dans le domaine des CAR-Treg souligne l'importance de cibler spécifiquement les antigènes HLA pour surmonter les obstacles immunologiques à la

transplantation, ouvrant la voie à des traitements plus efficaces et personnalisés pour les patients nécessitant des greffes d'organes.

2.2.2. Objectif de l'étude préclinique

L'étude préclinique (101) a pour principal objectif d'évaluer l'efficacité et la sécurité des Treg modifiées par un CAR spécifique à l'antigène HLA-A02, connu sous le nom de TX200, dans le contexte de la transplantation d'organes. Ces investigations ont cherché à établir des données robustes pour de futures applications cliniques, s'appuyant sur des preuves précliniques convaincantes de leur capacité à cibler et à inhiber sélectivement les réponses immunitaires contre les allogreffes exprimant HLA-A02. Plus spécifiquement, l'étude a testé ces CAR-Treg anti-HLA-A02 dans des modèles de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) xénogénique et le rejet de greffes de peau humaine. La GvHD est une complication où les cellules immunitaires du donneur attaquent les tissus du receveur, considérant ces derniers comme étrangers.

Pour atteindre cet objectif, des essais *in vitro* (réalisé en dehors d'un organisme vivant et impliquant généralement des tissus, des organes ou des cellules isolés) et *in vivo* (réalisés sur des organismes vivants) ont été réalisés.

Concernant les essais *in vivo*, des souris NOD SCID gamma (NSG) et des souris HLA-A02 NSG humanisées avec HLA-A02 ont été utilisées. Les souris NSG possèdent deux mutations qui les rendent idéales pour ce type de recherche. La première mutation communément appelée « SCID » (Severe Combined Immunodeficiency), bloque le développement des lymphocytes T et B, induisant ainsi une immunodéficience sévère. La deuxième mutation est un knock-out (KO) du gène codant, récepteur gamma de l'interleukine 2 (IL-2RG), pour la chaîne gamma c commune aux récepteurs de plusieurs interleukines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15). Ce gène est essentiel pour la différenciation et la fonction de nombreuses cellules hématopoïétiques, telles que les macrophages et les cellules dendritiques, et a une incidence complète sur le développement des cellules NK. Ces caractéristiques permettent aux souris NSG de supporter la greffe de cellules humaines, ce qui en fait un modèle pour étudier l'efficacité des CAR-Treg spécifiques à HLA-A02 dans la prévention du rejet de greffes et des complications liées à la transplantation (102).

Les résultats de ses différentes études sont décrits dans les parties suivantes.

2.2.3. Spécificité et fonction immunosuppressive *in vitro* des CAR-Treg HLA-A02

La première étape a été de montrer que les CAR-Treg TX200 sont spécifiques du HLA-A02 et exercent une fonction immunosuppressive *in vitro*.

- **Spécificité de l'activation des CAR-Treg HLA-A02 :** (Figure 26)

La spécificité de l'activation des CAR-Treg via l'antigène cible HLA-A02 a été confirmée grâce à la cytométrie en flux. Cette technique a permis de mesurer l'expression de CD69 sur les cellules CD4+, CD69 étant l'un des premiers antigènes de surface cellulaire à augmenter après l'activation des Treg. Le pourcentage de cellules CD4+/CD69+ a été utilisé pour observer l'expression de ce marqueur d'activation des Treg.

Contrôles Positifs :

- Billes magnétiques (Dynabeads) anti-CD3/CD28 : Ces microbilles recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 stimulent fortement le récepteur des cellules T (TCR), provoquant une activation maximale des Treg.
- PBMCs HLA-A02-positifs : les cellules mononucléées du sang périphérique (en anglais peripheral blood mononuclear cell PBMCs) positives pour l'antigène HLA-A02 sont utilisées avec les Treg pour tester l'activation spécifique via le CAR. Les PBMCs, incluant lymphocytes (T et B), monocytes et cellules dendritiques, sont couramment utilisées pour évaluer les réponses immunitaires.

Contrôles Négatifs :

- PBMCs HLA-A02-négatifs : Ces PBMCs dépourvus de l'antigène HLA-A02 servent à vérifier que l'activation des Treg ne se produit pas en absence de l'antigène cible.
- Dextramer HLA-A02 : utilisé pour une stimulation spécifique des Treg par leur CAR, ce dextramer permet de vérifier la spécificité du CAR pour HLA-A02. Un dextramer est une molécule synthétique utilisée pour imiter des structures biologiques spécifiques et ainsi provoquer une réponse immunitaire.
- Dextramer « blank » : ce dextramer de contrôle, sans antigène HLA-A02, sert à s'assurer que toute activation observée avec le dextramer HLA-A02 est bien spécifique à cet antigène.

Les CAR-Treg sont exposées aux différents agents de stimulation (dynabeads, PBMCs positifs/négatifs pour HLA-A02, dextramer HLA-A02, dextramer « blank ») pendant 24 heures. Les

cellules récoltées sont ensuite analysées par cytométrie en flux pour évaluer l'activation des Treg, en mesurant l'expression du marqueur d'activation cellulaire (CD69).

L'objectif de cet essai est de comparer l'efficacité et la spécificité des différents agents de stimulation pour activer les CAR-Treg anti-HLA-A02. Les dynabeads anti-CD3/CD28 servent de référence pour une activation maximale via le TCR, tandis que les PBMCs et les dextramers permettent de tester la spécificité et l'efficacité du CAR ciblant HLA-A02. Les contrôles négatifs assurent que l'activation observée est spécifique à la présence de l'antigène cible HLA-A02.

La stimulation des CAR-Treg anti-HLA-A02 avec des PBMCs HLA-A02 positifs a produit un niveau d'activation comparable à celui obtenu avec des dynabeads anti-CD3/CD28, utilisés comme contrôle positif pour une activation maximale via le TCR ($88,5 \pm 6,2\%$ de cellules $CD4+/CD69+$ avec PBMCs contre $90,5 \pm 5,6\%$ avec dynabeads). Une activation notable a également été observée avec le dextramer HLA-A02 ($41,5 \pm 8,4\%$ de cellules $CD4+/CD69+$), tandis que le dextramer « blank » et les PBMCs HLA-A02 négatifs n'ont pas entraîné d'augmentation significative des cellules $CD4+/CD69+$ ($12,0 \pm 3,9\%$ et $15,2 \pm 4,7\%$, respectivement) (101).

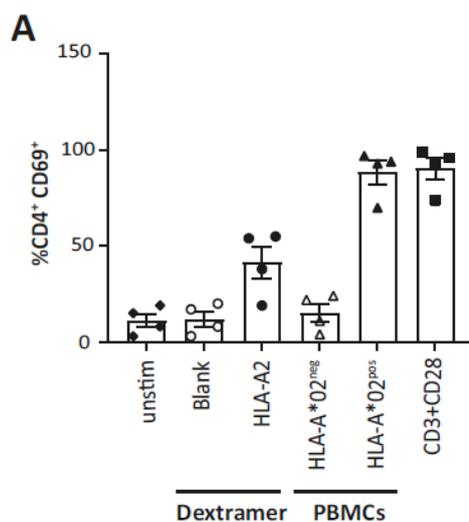


Figure 26 : Spécificité de l'activation des CAR-Treg par mesure de l'expression du CD69 sur les cellules CD4+ (101)

- **Capacité des CAR-Treg à inhiber les Tconv allogéniques** (Figure 27)

La capacité des CAR-Treg à inhiber les cellules T conventionnelles (Tconv) allogéniques a été évaluée après co-culture à différents ratios, suite à la pré-activation des CAR-Treg avec le dextramer HLA-A02 et des Tconv avec des dynabeads anti-CD3/CD28.

Les CAR-Treg pré-activés par leur antigène cible HLA-A02 (dextramer HLA-A02) ont montré un effet suppressif dose-dépendant sur la prolifération des Tconv, avec une suppression de $52,7 \pm 6,3$ % observée lors de la co-culture, comparée à une suppression de $19,2 \pm 2,8$ % pour les Treg activés avec le dextramer contrôle (101).

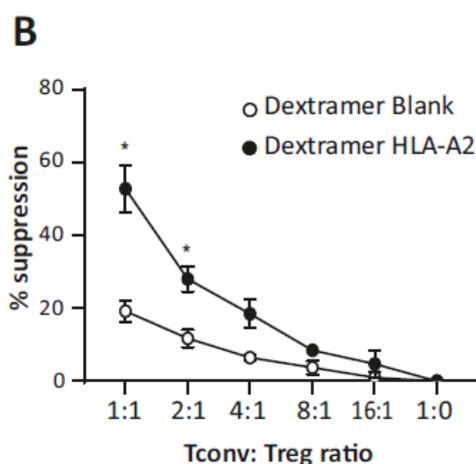


Figure 27 : Capacité des CAR-Treg à inhiber l'activité des Tconv allogéniques (101)

- **Évaluation de la spécificité des CAR-Treg HLA-A02** : (Figure 28)

En raison de la grande similitude entre les allèles HLA, pratiquement tous les anticorps anti-HLA peuvent présenter une réactivité croisée. Pour garantir la sécurité et la biodisponibilité du CAR-Treg anti-HLA-A02, il est important que cette réactivité croisée avec d'autres molécules de type HLA soit minimale. Idéalement, chaque sous-type de HLA-A02 doit activer les CAR-Treg HLA-A02.

La spécificité a été évaluée par co-culture des CAR-Treg avec des PBMCs humains, suivie d'une analyse en cytométrie en flux des cellules CD69+. Les CAR-Treg activés par co-culture avec des PBMCs porteurs d'allèles HLA-A02 ont montré une activation significative (36-75% de cellules CD69+) des CAR-Treg. Un seul allèle HLA-A02 suffisait à induire l'activation. À l'inverse, très peu de CAR-Treg ont été activés par co-culture avec des PBMCs porteurs d'autres allèles HLA (4-13% de cellules CD69+) (101).

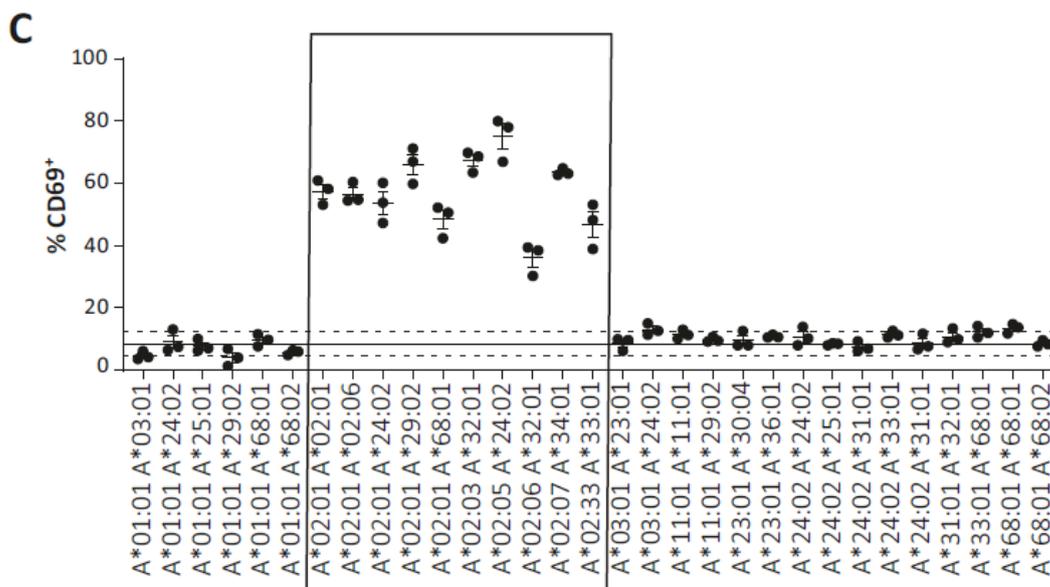


Figure 28 : Évaluation de la Spécificité des CAR-Treg pour les sous-types de HLA-A02 (101)

2.2.4. Efficacité des CAR-Treg dans un modèle murin de GvHD xénogénique

L'efficacité des CAR-Treg anti-HLA-A02 pour réduire l'activité des Teff a été testée *in vivo* dans un modèle de GvHD xénogénique. Les souris NSG sont conditionnées avec du busulfan, un traitement qui prépare les souris pour une greffe en supprimant les cellules de la moelle osseuse. Ces souris ont ensuite été injectées avec des PBMC humaines positives pour HLA-A02 dans trois configurations différentes (Figure 29 A et 29 B) :

- Souris injectées uniquement avec des PBMC humaines : Ces souris ont développé une GvHD significative, avec des scores de GvHD élevés (5.8 ± 0.58 au jour 26). La survie médiane de ces souris était de 24,5 jours.

- Souris co-injectées avec des PBMC humaines et des CAR-Treg de contrôle (TX235-TR101): ces CAR-Treg sont équivalents à des Treg polyclonaux, car le CAR de contrôle est dépourvu de domaine de signalisation. Ces souris ont également montré des scores élevés de GvHD (7.0 ± 0.55 au jour 26). La survie médiane de ces souris était de 27 jours.
- Souris co-injectées avec des PBMC humaines et des CAR-Treg anti-HLA-A02 : Ces souris ont montré des scores de GvHD beaucoup plus faibles (0.6 ± 0.4 au jour 26) indiquant une réduction significative des symptômes de la GvHD. La survie des souris dans ce groupe a été significativement améliorée par rapport aux autres groupes ($p = 0.039$).

Les résultats présentés par la *Figure 29 A* montrent l'efficacité des CAR-Treg anti-HLA-A02 pour atténuer la sévérité de la GvHD par rapport aux groupes de contrôle. La *figure 29 B* montre également une amélioration significative de la survie chez les souris traitées avec des CAR-Treg TX200 (101).

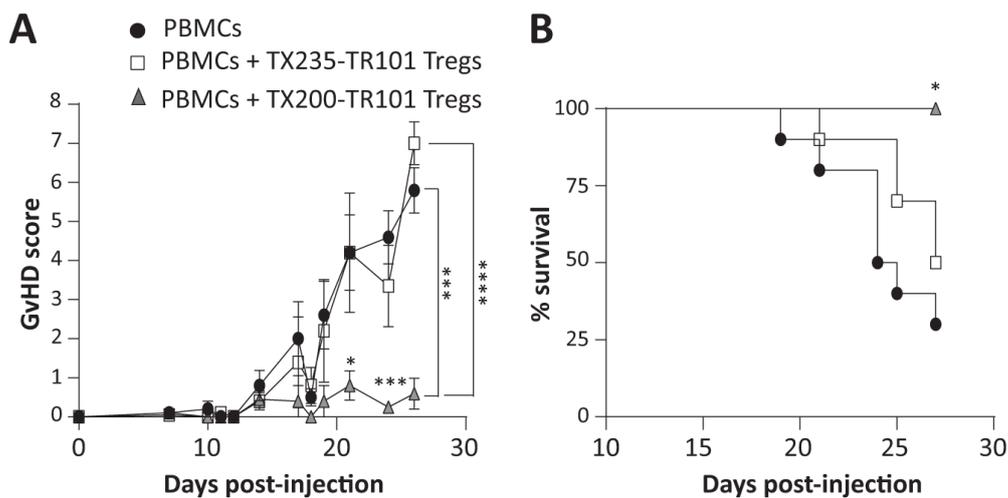


Figure 29 : Efficacité des CAR-Treg dans un modèle murin de GvHD xénogénique. (A) Scores de GvHD. (B) Courbes de survie (101)

2.2.5. Localisation des CAR-Treg dans les greffes de peau

Afin d'évaluer si CAR-Treg anti-HLA-A02 pouvaient prévenir le rejet d'allogreffe *in vivo*, des souris NSG ont reçu des greffes de peau de donneur humain HLA-A02(+), suivies pour deux groupes d'une injection de PBCM humain HLA-A02(-) pour provoquer le rejet de la greffe de peau. Les souris ont été divisées en quatre groupes recevant chacun un traitement différent : PBMC seul, PBMC avec CAR-Treg anti-HLA-A02 autologues ; CAR-Treg anti-HLA-A02 seuls, et PBS (solution saline) comme contrôle.

- Immunopositivité CD45 :** (*Figure 30*) CD45 qui est un marqueur des cellules T humaines, a été détecté à de faibles niveaux dans l'intestin (score moyen \pm écart-type de 0.75 ± 0.25 unités arbitraires [UA]) et à des niveaux plus élevés dans le foie (2.78 ± 0.22 UA), les poumons (3.33 ± 0.29 UA) et la rate (3.67 ± 0.24 UA) des souris injectées avec des PBMC. Les scores sont plus bas dans les organes des souris co-injectées avec des CAR-Treg anti-HLA-A02 humains autologues et PBMC par rapport à celles injectées uniquement avec des PBMC (intestin 0.45 ± 0.21 UA, foie 1.75 ± 0.22 UA, poumons 2.5 ± 0.29 UA, et rate 2.75 ± 0.33 UA). Dans les greffons de peau humaine, les scores CD45 étaient légèrement plus élevés chez les souris co-injectées avec des CAR-Treg anti-HLA-A02 humains autologues et des PBMC par rapport à celles injectées uniquement avec des PBMC (1.25 ± 0.18 UA contre 0.56 ± 0.24 UA, respectivement), bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative ($p = 0.08$). Chez les souris injectées uniquement avec des CAR-Treg anti-HLA-A02 humains, le CD45 humain n'a été détecté qu'à de faibles niveaux dans les greffes de peau humaine (0.167 ± 0.17 UA) et n'a pas été observé dans les autres organes analysés, indiquant une spécificité pour leur antigène cible HLA-A02.
- Immunopositivité FOXP3 :** (*Figure 30*) qui est un marqueur des Treg, a été détecté uniquement dans les greffes de peau humaine des souris co-injectées avec CAR-Treg anti-HLA-A02 et des PBMC, ainsi que chez celles injectées uniquement avec des CAR-Treg anti-HLA-A02. La quantification des cellules CD45⁺ et FOXP3⁺ dans les greffes de peau prélevées au 28^{ème} jour chez les souris ayant reçu des PBMC et CAR-Treg anti-HLA-A02 ou CAR-Treg anti-HLA-A02 uniquement a montré que $61.4 \pm 4.59\%$ et $75.9 \pm 7.29\%$ des cellules CD45⁺ étaient également positives pour FOXP3. Ces résultats suggèrent que les CAR-Treg anti-HLA-A02 humains se relocalisent efficacement dans les greffes de peau humaine et y maintiennent une présence notable.

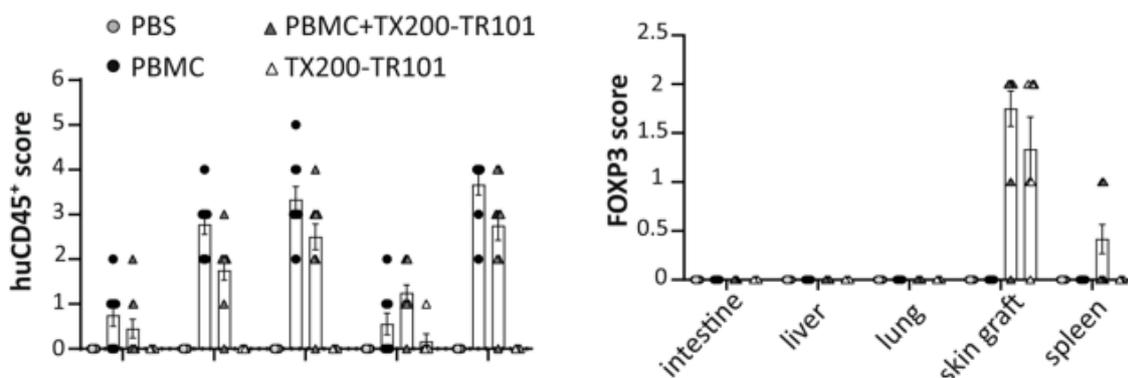


Figure 30 : Évaluation immunohistochimique des cellules humaines CD45 et FOXP3 (101)

- Survie des greffons de peau** : la *Figure 31* présente les courbes de survie des greffes de peau. Le rejet de la greffe de peau a été retardé chez les animaux recevant des PBMC et des CAR-Treg anti-HLA-A02 ou des CAR-Treg anti-HLA-A02 seuls, comparé aux animaux injectés uniquement avec des PBMC. La survie médiane des greffes était de 35 jours pour les groupes PBMC+ CAR-Treg anti-HLA-A02 et CAR-Treg anti-HLA-A02 seuls, contre 16 jours pour les PBMC seuls. Ces résultats montrent que l'ajout de CAR-Treg anti-HLA-A02, qu'ils soient co-injectés avec des PBMC ou administrés seuls, prolonge la survie des greffes de peau en retardant le rejet. Cela suggère un effet protecteur des CAR-Treg anti-HLA-A02 sur les greffes de peau (101).

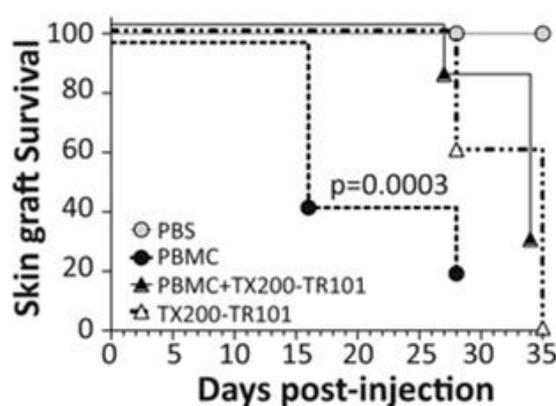


Figure 31 : Survie des greffes de peau (101)

2.2.6. Absence de transformation et sénescence des CAR-Treg anti-HLA-A02 *in Vitro* après stimulation chronique

Les CAR-Treg ont été testés *in vitro* afin de déterminer si la transduction avec le vecteur lentiviral ou le processus de culture cellulaire provoquait des altérations cellulaires ou moléculaires susceptibles d'accroître le risque de tumorigénicité.

- Viabilité des CAR-Treg en l'absence d'IL-2** : comme le montre la *Figure 32 A*, la viabilité des CAR-Treg anti-HLA-A02 diminue rapidement lorsqu'elles sont cultivées sans interleukine 2 (IL-2). Plus précisément, moins de 10 % des cellules restent viables après 2 semaines, et aucune cellule viable n'est observée après un mois de culture. Cette perte de viabilité est également observée lors de la stimulation chronique des récepteurs des cellules T (TCR) avec des dynabeads anti-CD3/CD28, indiquant que sans IL-2, les CAR-Treg anti-HLA-A02 ne peuvent pas survivre, même en présence d'une stimulation continue des TCR.

- **Viabilité des CAR-Treg avec IL2** : comme le montre la *Figure 32 B*, une dose élevée d'IL-2 permet de maintenir la viabilité des CAR-Treg anti-HLA-A02 pendant une période prolongée, atteignant jusqu'à 75 jours de culture. Cependant, lorsque l'IL-2 est retirée, les cellules commencent rapidement à ne plus être viables. Cela démontre que les CAR-Treg anti-HLA-A02 dépendent de l'IL-2 pour leur survie et leur croissance, indépendamment de la stimulation chronique du TCR avec des dynabeads anti-CD3/CD28.

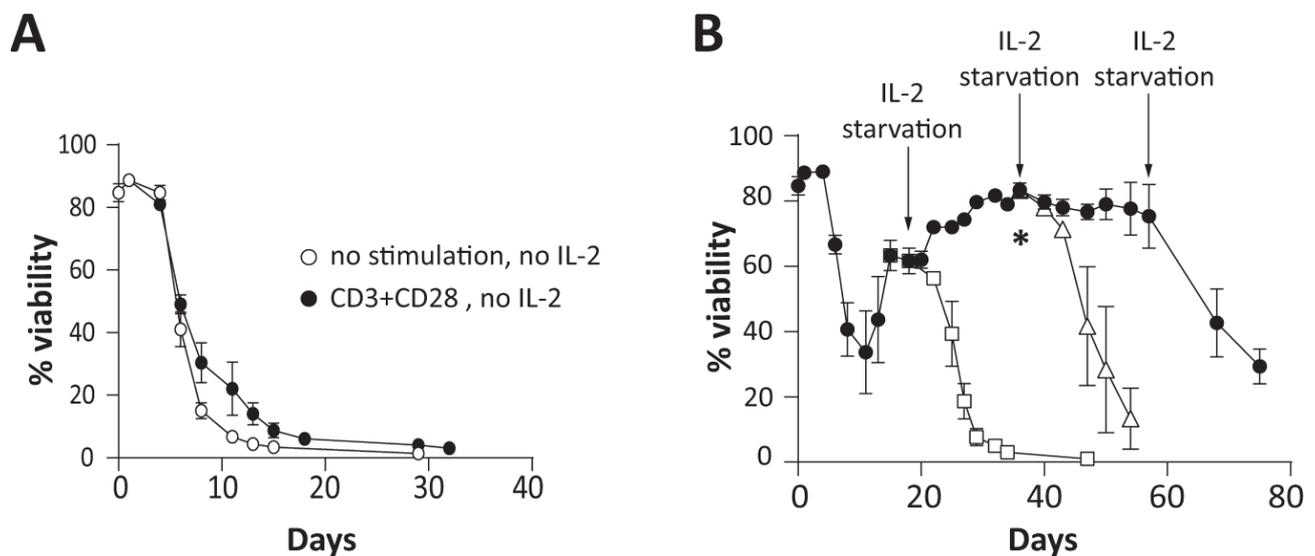


Figure 32 : (A) Viabilité des CAR-Treg en l'absence d'IL2 (B) Viabilité des CAR-Treg en présence d'une dose élevée d'IL2 (101)

- **Analyse de la sénescence des CAR-Treg anti-HLA-A02 en culture prolongée** : l'étude montre une tendance significative vers la sénescence cellulaire, malgré une stimulation continue par l'IL-2 et les dynabeads anti-CD3/CD28, soulignant leur dépendance à l'IL-2 pour la survie et la croissance. La télomérase est une enzyme qui maintient la longueur des télomères, qui sont les extrémités protectrices des chromosomes, jouant un rôle clé dans la prolongation de la durée de vie cellulaire et la prévention de la sénescence. La diminution progressive de l'activité de la télomérase (*Figure 33 A*) et la réduction de la longueur des télomères (*Figure 33 B*) attestent donc d'une sénescence des CAR-Treg. Les phénotypes de sous-populations de Treg après 54 jours de culture montrent une prédominance des phénotypes de mémoire effectrice (TEM) et de mémoire effectrice terminale différenciée (TEMRA) (*Figure 33 C*). L'expression accrue des marqueurs de sénescence CD57 et KLRG1 (*Figure 33 D*), ainsi que l'activité élevée de la β -galactosidase acide de sénescence (SA- β -Gal) (*Figure 33 E*), renforcent la théorie de la sénescence cellulaire des CAR-Treg anti-HLA-A02 dans les conditions de culture étudiées.

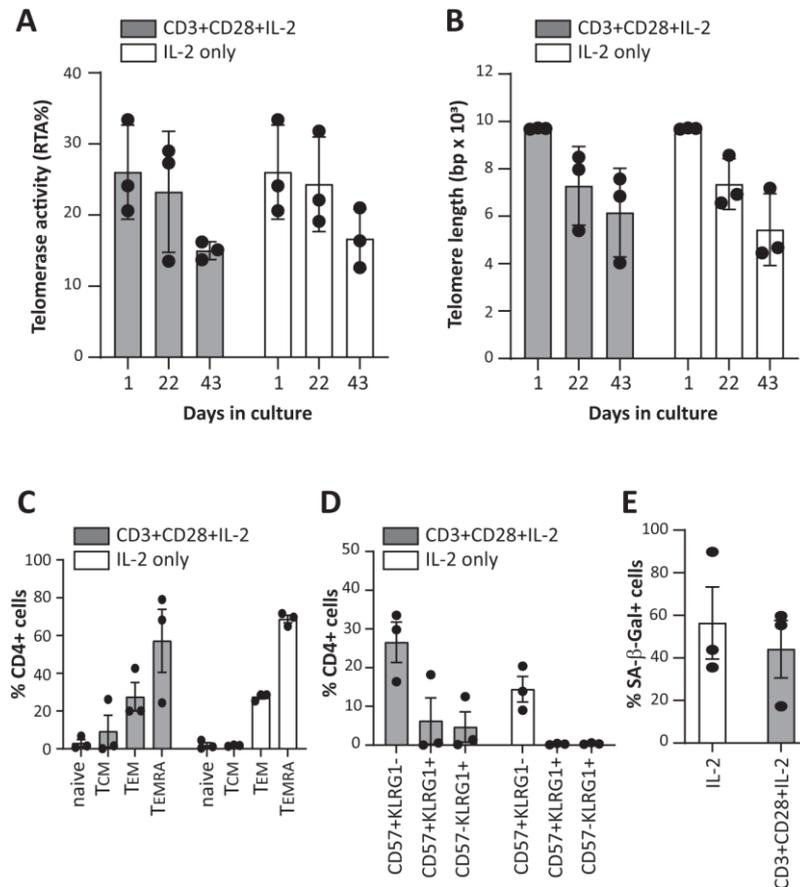


Figure 33 : Analyse de la sénescence des CAR-Treg TX200 en culture prolongée (A) Diminution de l'activité relative de la télomérase (B) Réduction de la longueur des télomères (C) Phénotypes de sous-populations de Treg après 54 jours de culture (Expression des marqueurs de sénescence CD57 et KLRG1) (E) Activité de la β -galactosidase acide de sénescence (SA- β -Gal) (101)

2.2.7. Stabilité et sécurité des CAR-Treg anti-HLA-A02 greffés dans un modèle murin humanisé HLA-A02

L'analyse de la biodistribution, la persistance et toxicité potentielle des CAR-Treg anti-HLA-A02, a été réalisée sur une période de trois mois dans un modèle de souris NSG humanisées HLA-A02+. Les résultats montrent que les CAR-Treg anti-HLA-A02 sont bien tolérées sans signe majeur de toxicité clinique ni d'effet sur le poids des souris ou de GvHD, à l'exception d'une souris avec un score de GvHD de 6 au jour 47 conduisant au décès au jour 50, et une autre euthanasiée au jour 35 en raison d'un ostéosarcome non lié aux Treg. Le taux de survie global à la fin de l'étude était de 95,8 %.

L'analyse par cytométrie a révélé que les taux sanguins de CAR-Treg anti-HLA-A02 (Figure 34 A) diminuaient au fil du temps mais restaient détectables après trois mois (de 13,4 % \pm 1,96 % à trois semaines post-injection à 0,93 % \pm 0,49 % à 3 mois). Les niveaux les plus élevés de ces cellules ont été trouvés dans la rate, les poumons et le foie, avec des niveaux plus bas dans le cœur, le cerveau,

les reins et les organes reproducteurs. Les Treg ont montré une persistance dans les tissus sur trois mois, avec une expression élevée de FOXP3, indiquant un phénotype stable pendant deux mois (Figure 34 B).

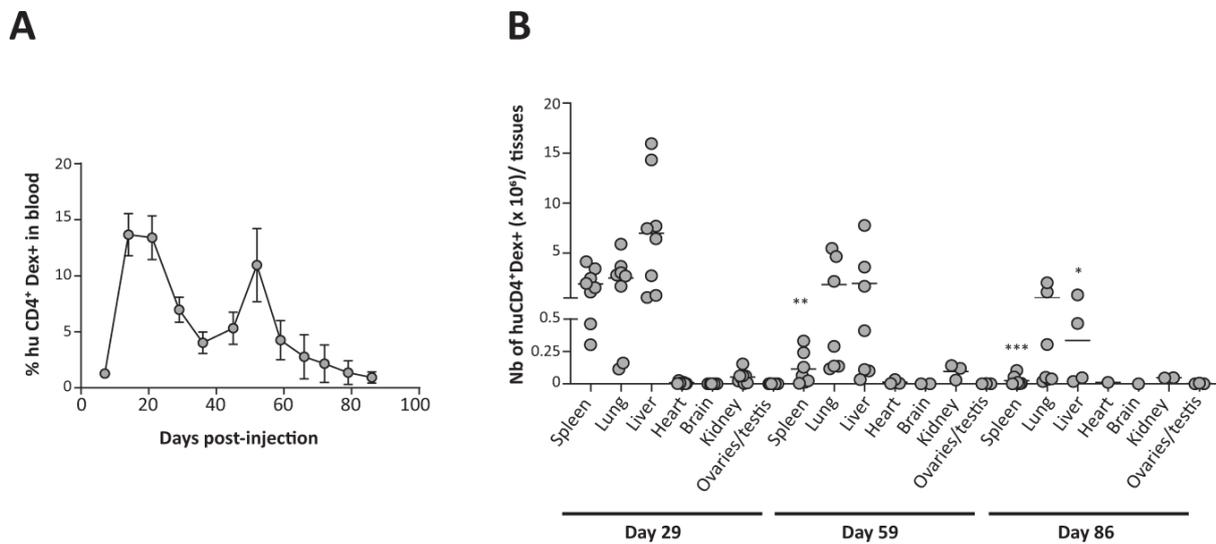


Figure 34: Etude de biodistribution in vivo. (A) Pourcentage de CAR-Treg dans le sang (B) Persistance des CAR-Treg dans les différents tissus (101)

Aucun signe macroscopique de tumeurs n'a été observé dans les organes analysés lors des nécropsies programmées. Des anomalies telles que l'hypercellularité de la rate, l'hématopoïèse extra-médullaire et la congestion pulmonaire avec infiltration lymphocytaire autour des vaisseaux pulmonaires ont été notées, sans anomalies dans les reins, le foie, les ovaires et les testicules. L'absence de spermatogenèse, attribuée au busulfan, a été observée chez les souris mâles.

Les niveaux de cytokines plasmatiques n'ont pas montré de passage des Treg à un phénotype pro-inflammatoire (figure 35). Les niveaux de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12p70, IL-1 β , IL-13 et IL-17A/F) étaient inférieurs aux limites de quantification, et les niveaux d'IL-2 étaient très bas et n'ont pas augmenté au fil du temps. Les niveaux d'IFN γ ont légèrement augmenté, de $540,8 \pm 150,7$ pg/ml à 30 jours à $323,7 \pm 83,7$ pg/ml à 86 jours, compatibles avec une production modérée par les CAR-Treg anti-HLA-A02 activées. L'IL-10 anti-inflammatoire a augmenté au jour 30 ($19,1 \pm 4,49$ pg/ml) et a diminué progressivement jusqu'à $0,60 \pm 0,20$ pg/ml au jour 86.

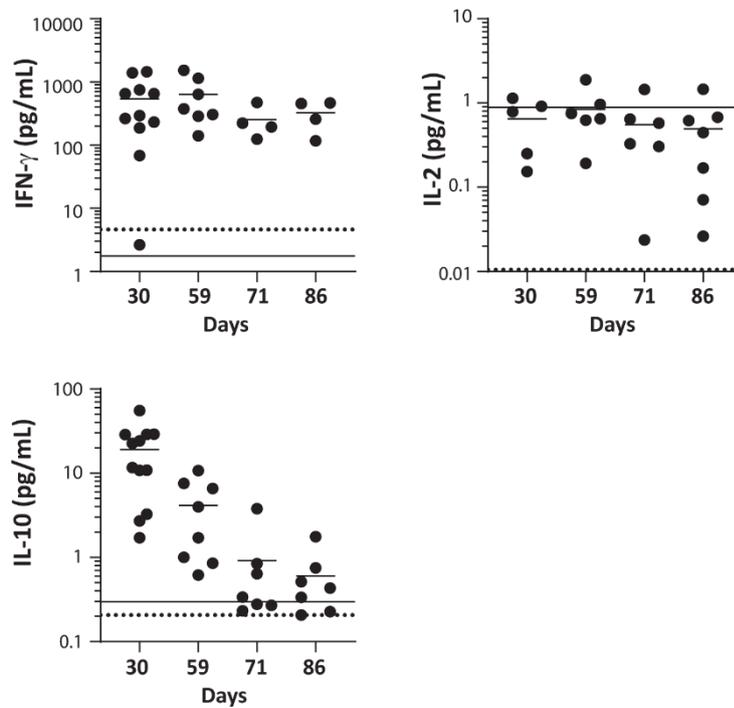


Figure 35: Évaluation de la production de cytokines chez des souris NSG HLA-A02 recevant des CAR-Treg HLA-A02 (101)

Les CAR-Treg anti-HLA-A02 montrent une persistance et une stabilité dans le modèle murin humanisé HLA-A02 sans toxicité significative, confirmant leur sécurité et leur potentiel pour des applications thérapeutiques (104).

2.2.8. Résistance des CAR-Treg anti-HLA-A02 au Tacrolimus

Le tacrolimus, un immunosuppresseur standard dans la transplantation d'organes solides, est connu pour être nuisible à la survie des Treg. Une étude pilote de deux semaines a été menée pour tester l'impact du tacrolimus sur la greffe et le phénotype des CAR-Treg dans un modèle murin HLA-A02 NSG. À des doses de tacrolimus supérieures à 0,5 mg/kg/jour, une perte de poids de plus de 20 % et des symptômes de GvHD ont été observés chez les souris. À la dose de 0,5 mg/kg/jour, le tacrolimus a réduit de manière significative le nombre de PBMCs dans la rate par rapport aux souris ayant reçu des PBMCs sans Tacrolimus (*Figure 36 A*). Cependant, chez les souris ayant reçu des CAR-Treg (*Figure 36 B*), l'implantation des cellules dans la rate n'a pas été affecté et a même augmenté en présence de tacrolimus. L'expression de FOXP3 chez les cellules CD4⁺ HLA-A02 négatives n'a pas été affectée par le traitement, indiquant que la stabilité des Treg n'était pas compromise.

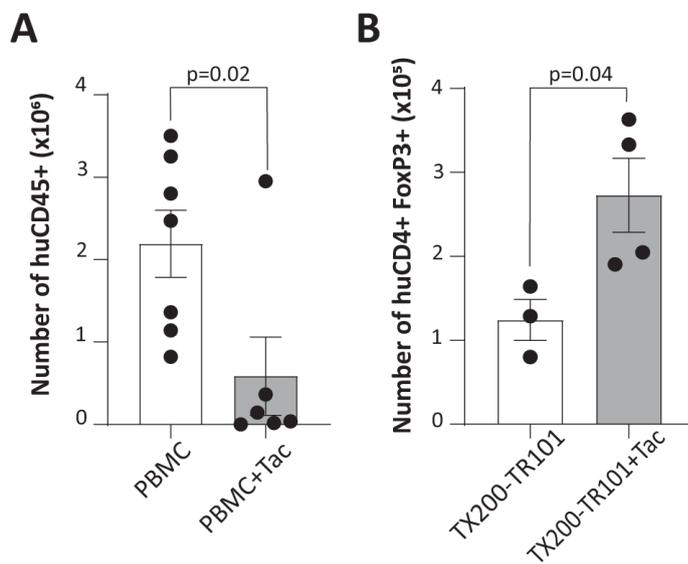


Figure 36 : Interaction avec le Tacrolimus in vivo (A) Effet du Tacrolimus sur les PBCM (B) Effet du Tacrolimus sur les CAR-Treg (101)

2.2.9. Conclusion de l'étude

La validation de ces CAR-Treg dans des modèles murins a marqué un pas significatif, démontrant non seulement leur spécificité cible mais aussi leur persistance et efficacité dans la prévention du rejet d'allogreffe.

Les résultats obtenus dans cette phase préclinique ont révélé la spécificité, la fonction immunosuppressive, et la sécurité des CAR-Treg anti-HLA-A02. Les tests *in vitro* ainsi que les études sur des modèles murins, en particulier les souris NOD et NSG humanisées pour HLA-A02, ont mis en évidence l'aptitude des CAR-Treg anti-HLA-A02 à prévenir efficacement la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) et à se localiser précisément sur les greffes de peau humaine exprimant HLA-A02, tout en restant stables et fonctionnels sur la durée de l'étude. De plus, l'usage concomitant avec le tacrolimus, n'a ni affecté la survie ni la capacité fonctionnelle des CAR-Treg anti-HLA-A02.

Ces données précliniques robustes soutiennent la spécificité, l'efficacité, et la sécurité de TX200, offrant ainsi une justification solide pour la progression vers une première étude chez l'humain. Cette étape future vise à explorer la capacité de TX200 à induire une tolérance immunitaire spécifique chez les patients HLA-A02- négatifs recevant des greffons de donneurs positifs pour cet antigène.

2.3. Mécanisme d'action supposé des CAR-Treg anti-HLA-A02

Le mécanisme d'action supposé des CAR-Treg anti-HLA-A02 (TX200) dans le contexte de la transplantation rénale repose sur plusieurs étapes clés, décrites dans la *Figure 37* (96).

Cela débute par la migration des CAR-Treg anti-HLA-A02 vers les cellules du greffon l'HLA-A02 (+) (1). Une fois dans le greffon, les cellules TX200 entrent en interaction avec les cellules cibles HLA-A02 (+) (2), conduisant à l'activation et la prolifération des CAR-Treg (3, 4).

Les CAR-Treg anti HLA-A02 activés déploient ensuite un éventail de fonctions immunomodulatrices destinées à atténuer l'activation des cellules T effectrices et cytotoxiques (5, 7), principales responsables du rejet de greffe. Cette modulation est réalisée notamment à travers la production de cytokines immunomodulatrices réduisant ainsi l'activation des cellules T effectrices (Teff) et des cellules présentatrices d'antigènes. De plus, l'interaction des CAR-Treg anti HLA-A02 activés avec les cellules présentatrices d'antigènes vise à rendre le microenvironnement défavorable pour les Teff, entraînant leur apoptose (6). Les CAR-Treg anti- HLA-A02 peuvent aussi avoir une activité cytotoxique, entraînant la mort des Teff par apoptose. (7).

Par ailleurs, les CAR-Treg anti- HLA-A02-pourraient stopper l'activation et la différenciation des cellules B en cellules produisant des anticorps, réduisant ainsi le risque de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) dirigée contre le tissu transplanté. Cette capacité de réduire l'activation des cellules B n'est pas explicitement représentée dans le mécanisme mais constitue un avantage significatif, minimisant les risques associés à la réaction immunitaire contre l'allogreffe.

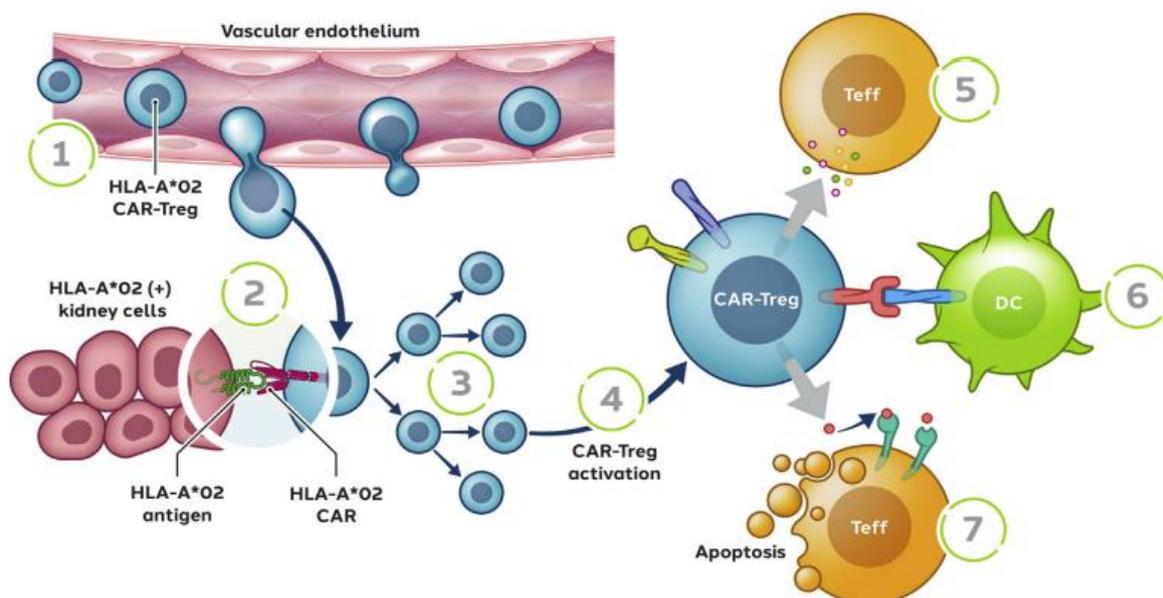


Figure 37 : Mécanisme d'action supposé des CAR-Treg dirigés contre HLA-A02 (96)

2.4. Le premier essai clinique : l'étude STEADFAST

2.4.1. Objectif de l'étude

Les CAR-Treg anti- HLA-A02 (TX200) représente une avancée significative, étant la première thérapie CAR-Treg soumise à une évaluation clinique. Initié par Sangamo Therapeutics, ce traitement expérimental cible spécifiquement les patients en attente de transplantation rénale. L'évaluation de TX200 dans le cadre de l'étude clinique STEADFAST (103) marque un jalon important dans l'étude des CAR-Treg pour améliorer le devenir des transplantations rénales.

Ce programme de recherche clinique vise à évaluer des cellules CAR-Treg autologues qui ciblent HLA-A02 (cf partie 2.2.1). L'objectif est de permettre une reconnaissance précise des cellules du greffon exprimant HLA-A02, favorisant une réponse immunitaire modulée directement sur le site de transplantation.

Cette approche repose dans la discordance HLA-A02 entre le donneur (HLA-A02 positif) et le receveur (HLA-A02 négatif). Le rein greffé est porteur de l'antigène HLA-A02, ce qui n'est pas compatible avec le système HLA du patient receveur qui ne possède pas l'allèle HLA-A02 (*Figure 38*). Les cellules CAR-Treg spécifiques d'HLA-A02 ont donc pour but de reconnaître le greffon et de moduler l'inflammation locale, contribuant ainsi à l'induction d'une tolérance immunitaire locale et à la réduction du risque de rejet. Ce risque de rejet est particulièrement pertinent dans les cas où le receveur et le donneur sont respectivement négatifs et positifs pour l'HLA-A02, une situation estimée concerner environ 20 à 25 % des transplantations rénales (96), comme décrit dans la partie 2.2.1. L'identification de cette incompatibilité HLA-A02 souligne l'importance de développer des stratégies thérapeutiques telles que TX200 pour surmonter ces obstacles immunologiques.

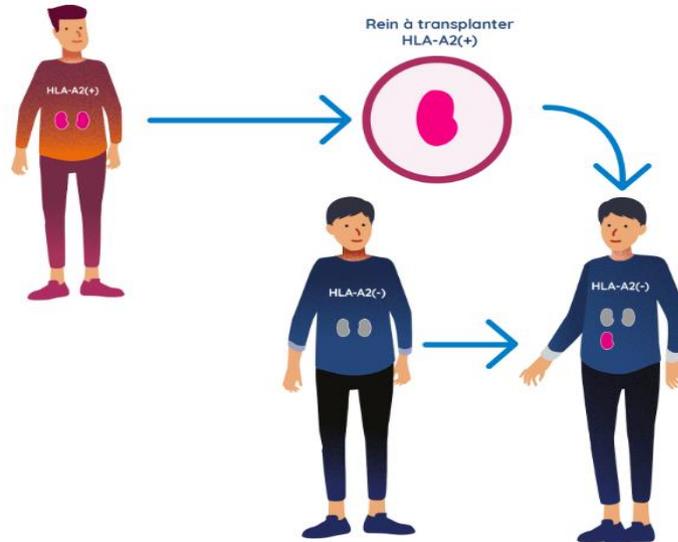


Figure 38 : Schéma d'une transplantation rénale d'un donneur HLA-A02 (+) avec un receveur HLA-A02(-) (103)

L'étude STEADFAST est un essai de phase I/IIa, qui cible une cohorte adulte, âgée de 18 à 70 ans, souffrant d'insuffisance rénale terminale en attente de transplantation rénale issu de donneur vivant. Cette étude vise principalement à évaluer la sécurité et la tolérance de TX200.

2.4.2. Déroulement de l'étude clinique

L'étude est structurée autour de deux groupes de participants : le groupe expérimental, qui reçoit le traitement TX200, et le groupe témoin, à qui l'on administre uniquement les traitements standard actuels (Figure 39).

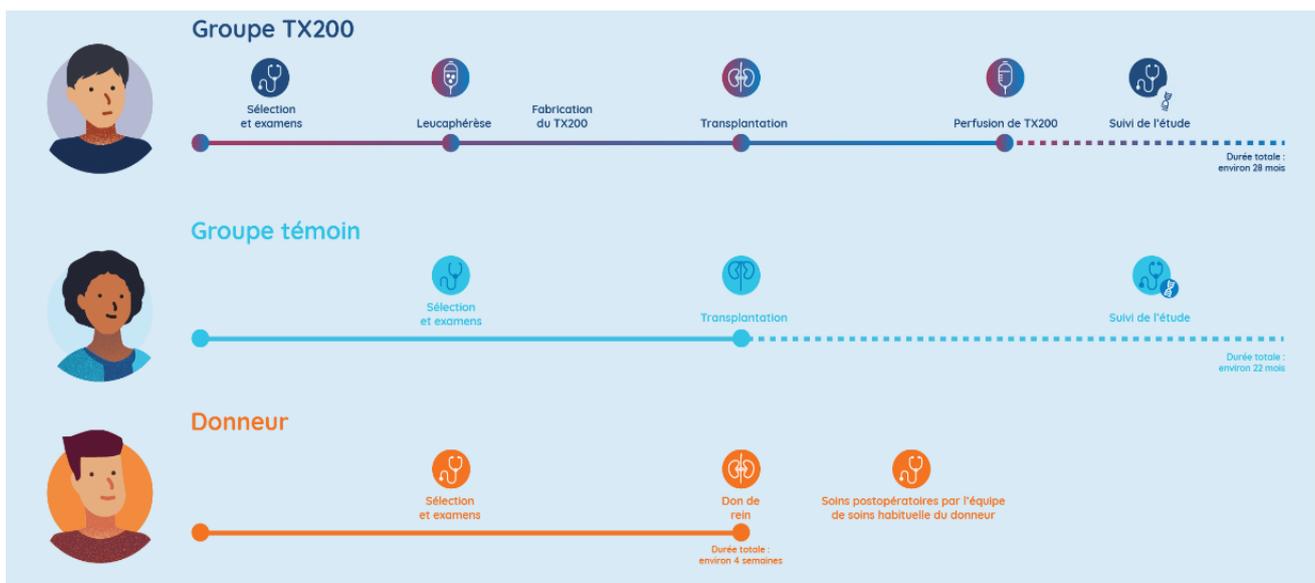


Figure 39 : Etapes et groupes de l'étude STEADFAST (103)

Première Étape : Préparation des Participants

Avant la transplantation, les participants du groupe expérimental subissent une procédure appelée leucaphérèse, réalisée à l'hôpital. Cette étape, d'une durée de 3 à 5 heures, consiste à séparer les cellules circulantes du sang et à isoler les cellules mononucléées, à l'aide d'un appareil d'aphérèse. Les cellules Treg sont ensuite isolées, comme décrit dans la partie 1.1. Une fois isolées, les cellules Treg subissent une modification génétique pour exprimer un récepteur CAR ciblant HLA-A02 en surface des Treg du patient. Cette spécificité est nécessaire pour la réussite de la thérapie, car elle permet aux cellules Treg modifiées de cibler précisément les cellules du rein transplanté, favorisant ainsi sa tolérance par le système immunitaire du receveur.

Transplantation et Traitement

Après la transplantation du rein HLA-A02(+), les participants reçoivent un traitement immunosuppresseur standard, nécessaire pour prévenir le rejet de l'organe. C'est à ce moment que les participants du groupe expérimental se distinguent car ils bénéficient également de l'administration de leur traitement autologue TX200, environ trois mois après la greffe. Le traitement TX200 est administré lors d'une unique injection à l'hôpital, suivie d'une période de surveillance de 24 à 48 heures pour assurer l'absence de complications immédiates.

En parallèle, une réduction progressive des doses d'immunosuppresseurs est réalisée, sous supervision médicale, afin d'atteindre la dose la plus faible possible pour chaque patient, réduisant ainsi les effets secondaires associés à ces médicaments.

Le Groupe témoin : un comparatif essentiel

Le groupe témoin joue un rôle fondamental dans l'évaluation de l'efficacité du TX200. Ce groupe reçoit les soins standards de transplantation, incluant l'administration d'immunosuppresseurs post-greffe, mais ne bénéficie pas du traitement TX200. La comparaison des résultats entre les deux groupes permettra d'évaluer l'impact réel du TX200 sur l'amélioration de la tolérance immunitaire du greffon, et ainsi de déterminer l'avantage potentiel de cette approche thérapeutique innovante par rapport aux traitements existants.

Cette structuration de l'essai clinique TX200 vise à fournir des données robustes et fiables sur la sécurité et la tolérance de la thérapie innovante dans le contexte de la transplantation d'organes, ouvrant la voie à de nouvelles stratégies pour améliorer la qualité de vie des patients greffés (103).

2.4.3. Population ciblée

Les recherches actuelles sur les CAR-Treg se concentrent principalement sur leur spécificité pour l'antigène HLA-A02 dans des modèles précliniques (104).

L'étude de CAR-Treg ciblant d'autres allèles HLA pourrait offrir une sécurité et une efficacité comparables à celles obtenues avec HLA-A02. En intégrant diverses spécificités de CAR-Treg, il serait possible d'augmenter leur efficacité tout en diminuant les doses administrées. Une sélection restreinte de ces spécificités pourrait suffire à couvrir la majorité des cas de transplantation en présence d'incompatibilité HLA, en s'adaptant aux exigences particulières de diverses régions géographiques. Une étude des données de transplantation de reins dans le cadre du système Eurotransplant pour les années 2017 à 2018, illustrée dans le *Tableau 3*, révèle que pour répondre aux besoins de plus de 90% de cette population, environ 12 spécificités HLA-A de CAR-Treg seraient nécessaires. Ces résultats encouragent la mise en place d'essais cliniques visant à déterminer le régime de dosage optimal pour les CAR-Treg, une étape essentielle pour leur application future dans le domaine de la transplantation.

Antigen	Number of specific HLA-A mismatches	Percentage of total HLA-A mismatches	Cumulative percentage of HLA-A mismatches
A2	1411	16,2%	16,2%
A3	1215	13,9%	30,1%
A1	972	11,1%	41,3%
A24	929	10,7%	51,9%
A11	629	7,2%	59,1%
A68	591	6,8%	65,9%
A32	490	5,6%	71,5%
A26	441	5,1%	76,6%
A31	356	4,1%	80,6%
A29	351	4,0%	84,7%
A25	343	3,9%	88,6%
A30	341	3,9%	92,5%
A23	338	3,9%	96,4%
A33	191	2,2%	98,6%
A66	82	0,9%	99,5%
A69	16	0,2%	99,7%
A74	10	0,1%	99,8%
A34	9	0,1%	99,9%
A36	4	0,0%	100,0%
A80	3	0,0%	100,0%

Tableau 3 : Fréquence des “mismatches” d'antigènes HLA-A spécifiques sur les 8722 “mismatches” HLA-A totaux dans l'allocation Eurotransplant 2017-2019. (104)

Comme décrit précédemment, un premier essai clinique de phase I/IIa est en cours pour évaluer la sécurité et la tolérance des CAR-Treg HLA-A02 chez les receveurs de transplantation rénale. Cet essai pourrait potentiellement marquer une avancée vers l'utilisation des CAR-Treg comme thérapie pour remplacer partiellement l'immunosuppression actuelle, s'approchant ainsi de l'objectif ultime de tolérance spécifique au greffon. Le succès de cette thérapie dépend de l'historique immunologique du patient, et plusieurs questions restent ouvertes concernant le dosage optimal et la fréquence des administrations de CAR-Treg nécessaires.

3. Défis Biologiques dans le contexte de transplantation rénale

Les CAR-Treg représentent une avancée prometteuse dans le domaine de la transplantation rénale, visant à induire une tolérance immunitaire spécifique à l'organe transplanté. Cependant, plusieurs défis biologiques et techniques doivent être surmontés afin de maximiser leur efficacité et sécurité.

Les données de biodistribution détaillées dans l'évaluation préclinique des CAR-Treg (partie 2.2) montrent que les CAR-Treg anti-HLA-A02, bien que diminuant progressivement dans le sang, restent détectables après trois mois. De plus, l'étude montre également que les CAR-Treg se localisent efficacement dans les greffons.

3.1. Spécificité et efficacité des CAR-Treg

Comme décrit précédemment, les CAR-Treg sont conçus pour reconnaître des antigènes spécifiques à la surface des cellules de l'organe transplanté, permettant ainsi une régulation immunitaire ciblée. Un grand défi consiste dans l'identification et le ciblage précis des antigènes spécifiques du système HLA du greffon sans affecter les tissus hôtes. Une spécificité insuffisante pourrait réduire l'efficacité des CAR-Treg et entraîner le rejet du greffon.

Dans le cadre des essais cliniques, garantir la sécurité des patients constitue une préoccupation majeure. Pendant la phase expérimentale, l'incertitude demeure quant à la capacité des cellules thérapeutiques à parvenir à leur cible spécifique au sein de l'organisme, risquant ainsi de provoquer des réactions indésirables. S'agissant des thérapies basées sur les CAR-Treg, un fonctionnement inapproprié pourrait induire une immunosuppression généralisée chez le patient, affaiblissant sa capacité de lutte contre les infections opportunistes et favorisant éventuellement l'émergence de cancers.

Une stratégie envisageable pour moduler l'activité de ces cellules thérapeutiques une fois administrées repose sur l'intégration d'un gène de suicide (104). Ce dernier agit en tant que mécanisme de contrôle, permettant l'élimination ciblée des cellules exprimant ce gène en présence d'un agent pharmacologique spécifique. Parmi les gènes de suicide, on compte des gènes codant pour des protéines de surface telles que RQR8 et *truncated epidermal growth factor receptor* (tEGFR), qui peuvent être ciblées par des anticorps monoclonaux. L'activation des gènes suicides se fait lorsque les anticorps monoclonaux se lient à ces protéines de surface, déclenchant ainsi des signaux qui mènent à l'élimination des cellules modifiées. Toutefois, l'efficacité de l'élimination par cette méthode peut être limitée par la difficulté d'atteindre les concentrations nécessaires de ces anticorps dans les tissus ciblés.

Alternativement, d'autres systèmes de gènes de suicide exploitent des petites molécules activatrices, comme la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSV1-tk) et les caspases 9 activables (iCasp9). HSV1-tk, une enzyme non toxique, transforme certains analogues nucléosidiques en métabolites toxiques, engendrant la mort cellulaire ciblée. Cette approche est fréquemment adoptée en oncologie. Quant à iCasp9, il s'agit d'une construction hybride comprenant une protéine de liaison humaine modifiée et le domaine catalytique de la caspase 9 humaine. Son activation par l'administration d'une molécule de dimérisation AP1903 (105) induit la mort des cellules qui l'expriment, avec une spécificité élevée et un risque immunogène réduit. La technologie iCasp9, ayant démontré son efficacité et sa sécurité, constitue une option de choix pour les thérapies basées sur les CAR-Treg. Di Stasi et al. ont démontré, dans une étude impliquant des patients leucémiques post-greffe de cellules souches, qu'une administration unique d'un agent d'activation d'iCasp9 permettait d'éliminer plus de 90% des cellules T modifiées (106). L'incorporation de ce mécanisme de sécurité dans les cellules CAR-T de nouvelle génération souligne son potentiel pour renforcer la sécurité des thérapies cellulaires ciblées (107).

3.2. Persistance des CAR-Treg

La persistance des CAR-Treg est nécessaire pour assurer leur efficacité thérapeutique à long terme (104). Pour que les CAR-Treg puissent se substituer aux médicaments immunosuppresseurs, elles doivent demeurer actives dans l'organisme du patient sur une période prolongée. Des recherches sur des modèles animaux ont exploré la persistance des CAR-Treg chez le patient après leur administration. Par exemple, une étude a révélé la présence de CAR-Treg *in vivo* dans le sang, la rate et les ganglions lymphatiques des souris immunocompétentes jusqu'à sept jours après leur administration (108). De plus, une autre étude a montré une persistance plus longue, jusqu'à

quarante jours, des CAR-Treg ciblant spécifiquement HLA-A02, détectées dans les allogreffes cutanées de souris humanisées (109).

Ces études indiquent que, dans les modèles murins, l'efficacité des CAR-Treg n'est pas durable et que les greffons finissent par être rejetés. Cette limitation est accentuée par l'absence de cytokines et de chimiokines humaines essentielles à la survie des cellules T humaines dans les modèles de souris immunodéficientes, rendant ces modèles peu représentatifs de la situation chez l'humain. Néanmoins, ces travaux suggèrent que la thérapie par CAR-Treg pourrait nécessiter des administrations répétées pour maintenir une immunosuppression spécifique à l'antigène, une hypothèse qui doit être confirmée par des essais cliniques.

Les cytokines jouent un rôle fondamental dans la prolifération et la survie des Treg, notamment IL-2, TGF β et des molécules de co-stimulation. Les CAR-Treg, typiquement anergiques, dépendent de l'IL-2 exogène pour proliférer. Bien que les CAR puissent activer temporairement les cellules indépendamment de l'IL-2, l'absence de cette cytokine réduit à terme leur viabilité (104). L'administration d'IL-2 à faible dose a été étudiée pour favoriser la prolifération et la survie des Treg spécifiques au donneur. En outre, d'autres cytokines comme l'IL-33, qui régule les Treg dans divers tissus, dont le rein, et l'IL-7, nécessaire à la circulation et à la survie des nTreg, sont également importantes.

L'impact de l'exposition à l'antigène sur la survie des CAR-Treg est également majeure. Les CAR-Treg spécifiques à un antigène présentent des taux de survie plus élevés lorsqu'ils sont exposés à cet antigène, ce qui confirme l'importance de l'exposition antigénique pour la persistance des CAR-T. Cette relation entre l'exposition à l'antigène et la survie des CAR-T souligne l'importance de concevoir des stratégies thérapeutiques qui maintiennent une interaction continue entre les CAR-Treg et leurs antigènes cibles pour une efficacité à long terme.

3.3. Interaction des CAR-Treg avec les immunosuppresseurs

L'interaction des traitements CAR-Treg avec les régimes immunosuppresseurs des patients pose également question. Des médicaments comme le sérum anti-lymphocytaire, la ciclosporine, l'anti-CD25 et la rapamycine, administrés aux patients transplantés, influencent la quantité et la fonction des Treg. Le sérum anti-lymphocytaire, par exemple, diminue le nombre total de Treg et des doses élevées peuvent affecter négativement le développement des Treg thymiques. Les inhibiteurs de la calcineurine, tels que la ciclosporine, répriment l'activation des Treg et réduisent l'expression de FOXP3, un effet qui peut être restauré par l'IL-2. L'étude ThrIL (110) a démontré l'efficacité des

thérapies Treg chez les patients suivant des traitements immunosuppresseurs, incluant le sérum anti-lymphocytaire et le tacrolimus, ce qui est prometteur pour les futures applications des CAR-Treg. Des médicaments comme les inhibiteurs de la voie mTOR (tel que la rapamycine), peuvent être bénéfiques car ils soutiennent l'utilisation des Treg dans le traitement des transplantations et la rapamycine est couramment employée pour l'expansion ex vivo des Treg (107).

4. Perspectives des CAR-Treg

4.1. Les CAR-Treg allogéniques

4.1.1. Développement et implications des CAR-Treg allogéniques

Le développement des thérapies CAR-Treg allogéniques représente une perspective intéressante, offrant une réponse potentiellement révolutionnaire aux défis thérapeutiques posés par les maladies auto-immunes et le rejet de transplantations d'organes solides. L'approche allogénique, où un donneur peut fournir les cellules nécessaires pour créer de 10 à 100 doses (111), permettrait de surmonter les limites associées aux thérapies CAR-T autologues, notamment les délais de production, les risques d'échec de production et les coûts élevés. Cette perspective souligne la nécessité de surmonter les défis techniques inhérents à la création de cellules CAR-Treg allogéniques prêtes à l'emploi pour leur adoption clinique effective.

La production actuelle de cellules CAR-T autologues pour les patients souffrant de cancers met en évidence des inconvénients significatifs tels que le risque d'échec de production et un délai de préparation de plusieurs semaines, ce qui est particulièrement problématique pour les cancers à croissance rapide. Les essais cliniques en cours sur les cellules CAR-T allogéniques révèlent leur potentiel dans le traitement du cancer grâce à l'utilisation de cellules issues de donneurs sains, permettant une production à grande échelle (112).

Bien que les traitements CAR-Treg ciblant l'auto-immunité et le rejet de greffe ne requièrent pas la même rapidité de livraison, ils sont confrontés à des défis similaires, y compris le risque d'échec dû au faible nombre ou à la fonctionnalité réduite des Treg. Ces problèmes sont augmentés par l'interaction avec des médicaments immunosuppresseurs et par les coûts élevés de fabrication et de distribution, posant des défis majeurs pour leur intégration dans les systèmes de santé.

Les CAR-Treg allogéniques (*Figure 40*), issues de donneurs sains, peuvent être une solution prometteuse, permettant une production à grande échelle, rapide et moins coûteuse. Elles offrent

également l'avantage d'une cryopréservation efficace, assurant la disponibilité immédiate pour les patients. Cependant, l'application de cette approche est entravée par des obstacles tels que la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), une complication où les cellules immunitaires du donneur attaquent les tissus du receveur, considérant ces derniers comme étrangers, et l'élimination des cellules thérapeutiques par le système immunitaire de l'hôte. Pour surmonter ces défis, des stratégies novatrices, présentées ci-après, sont actuellement explorées (107).

Allogeneic CAR-Treg cell therapy approach

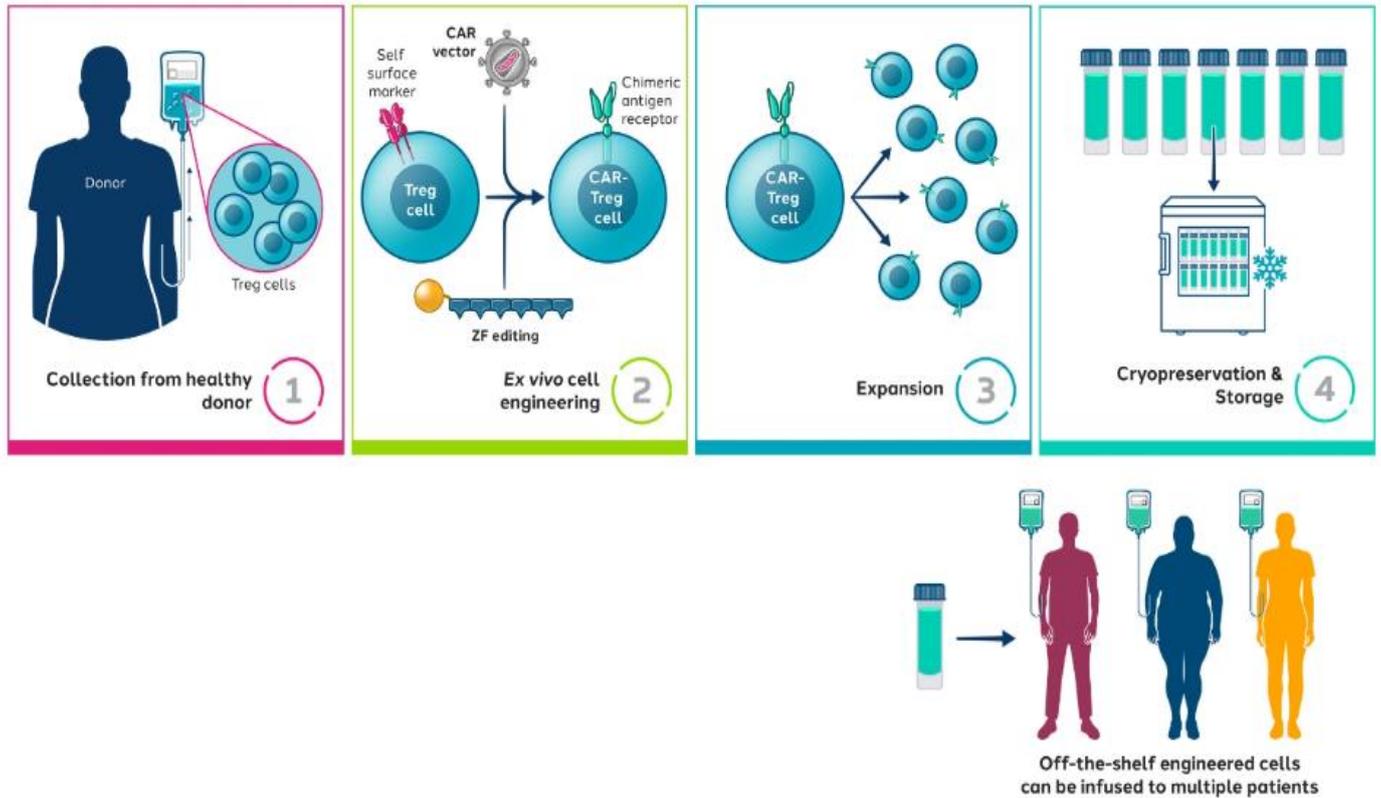


Figure 40 : Production de CAR-Treg allogéniques (111)

4.1.2. Obtenir des CAR-Treg « prêts à l'emploi »

4.1.2.1. Stratégies d'édition génomique

L'ingénierie des CAR-T allogéniques « prêtes à l'emploi » propose différentes stratégies pour contourner les obstacles comme la GvHD et le rejet, principalement par des technologies d'édition génomique. L'édition du génome consiste à modifier ce dernier avec une grande précision grâce à des « ciseaux moléculaires ». Voici un résumé des trois technologies principalement utilisées: (112)

- Zinc Finger Nucleases (ZFNs) : Les ZFNs sont des endonucléases artificielles qui utilisent des protéines à doigt de zinc fusionnées au domaine de clivage de l'enzyme de restriction FokI. Cette configuration permet de cibler et de cliver des séquences génomiques spécifiques, entraînant des réparations cellulaires qui peuvent insérer ou supprimer des gènes, contribuant ainsi à éviter la GvHD en éliminant par exemple le gène Beta-2 microglobuline (B2M) pour réduire l'expression des molécules HLA de classe I sur les cellules.
- TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) : Similaires aux ZFNs, les TALENs combinent un domaine de liaison à l'ADN dérivé d'un effecteur similaire à un activateur transcriptionnel avec le domaine de clivage FokI. Ils permettent un ciblage précis et sont utilisés pour modifier des gènes clés comme le T-cell receptor alpha constant (TRAC) et CD52, améliorant la persistance des CAR-T allogéniques et réduisant la reconnaissance immunitaire.
- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- Cas9 (CRISPR-Cas9) : Issu d'un système immunitaire adaptatif microbien, CRISPR-Cas9 utilise un ARN guide pour cibler spécifiquement des séquences d'ADN, avec la nucléase Cas9 pour cliver l'ADN. Cette méthode est particulièrement efficace pour éliminer simultanément plusieurs gènes, tels que ceux impliqués dans la GvHD et le rejet, favorisant la persistance cellulaire et l'efficacité thérapeutique. La technologie CRISPR est célèbre pour sa capacité à minimiser les mutations hors cible, ce qui la rend idéale pour le transfert adoptif de cellules.

Ces technologies d'édition génomique sont essentielles pour développer des CAR-Treg allogéniques qui pourraient alors être administrés à un éventail plus large de patients sans nécessiter de correspondance génétique étroite. Toutefois, la complexité de ces interventions soulève des enjeux significatifs en matière de sécurité, nécessitant une évaluation rigoureuse des risques et des bénéfices avant leur application clinique.

4.1.2.2. Stratégie d'édition non génomique

L'édition non génomique vise à contourner la complexité et les préoccupations de sécurité liées à l'édition génomique, notamment lors de la suppression multiplexée de plusieurs gènes. Voici un résumé des principales technologies sans édition du génome développées pour les CAR-T allogéniques : (112)

- Utilisation de molécules inhibitrices du TCR : Cette méthode repose sur l'incorporation d'une molécule inhibitrice du TCR dans l'ADN des cellules T, rendant le TCR non réactif. Cette approche a été utilisée pour un CAR-T anti Natural Killer Group 2, member D (NKG2D), dans le traitement du cancer colorectal métastatique, démontrant son potentiel pour réduire la réactivité des cellules T sans nécessiter d'édition génétique directe.
- Structure porteuse de miRNA ciblant CD3 ζ : En ciblant CD3 ζ , ces structures porteuses de miRNA entraînent l'élimination complète du TCR des cellules. Cette stratégie a été évaluée dans un essai clinique de phase I avec des CAR-T anti BCMA pour des patients atteints de myélome multiple réfractaire ou en rechute. Cette méthode présente une alternative intéressante à l'édition génomique pour supprimer les éléments du TCR.
- Rétention intracellulaire du TCR/HLA-I : Certaines approches se concentrent sur la rétention de composants comme le TCR et HLA-I dans le réticulum endoplasmique, utilisant des peptides associés à la rétention dans le réticulum endoplasmique. Cette stratégie empêche l'expression de ces molécules à la surface cellulaire, réduisant ainsi le risque de GvHD et de rejet.

Bien que des techniques d'éditions génomiques et non génomiques aient été mises au point pour réduire les risques de GvHD en modifiant les cellules afin qu'elles échappent au système immunitaire du receveur, ces méthodes ne sont pas parfaites et une GvHD peut encore se manifester.

Un autre obstacle majeur est le rejet de l'hôte, où les cellules du receveur attaquent les CAR-T allogéniques en raison de la reconnaissance des molécules HLA différentes sur les cellules T donneuses. Ce phénomène limite l'activité et la durée des réponses des CAR-T, réduisant ainsi leur efficacité globale. Des mesures comme l'intensification des régimes de lymphodéplétion et l'augmentation des doses de cellules administrées ont été testées pour contrer ce rejet, mais ces

solutions peuvent conduire à des complications supplémentaires, telles que des risques accrus d'infections graves.

Concernant les CAR-Treg allogéniques, ils n'ont pas encore progressé jusqu'aux essais cliniques, en partie à cause de ces défis. Le faible nombre et la fonctionnalité réduite des Treg extraits pour ces thérapies posent des problèmes similaires à ceux rencontrés dans la production de CAR-T autologues. Ces enjeux soulignent la complexité de développer des thérapies CAR-T allogéniques viables et efficaces, malgré les promesses des technologies d'édition génomique. L'amélioration continue des techniques pour surmonter ces obstacles est nécessaire pour l'avenir de ces thérapies innovantes.

4.2. Potentielles indications thérapeutiques des CAR-Treg

Les cellules CAR-Treg ont démontré un fort potentiel dans la modulation de la réponse immunitaire post-transplantation rénale, suggérant leur applicabilité dans un spectre plus large de maladies. Cette section propose des perspectives d'utilisation des CAR-Treg dans le traitement des maladies auto-immunes et d'autres conditions inflammatoires, élargissant ainsi le cadre d'application de cette approche.

Les CAR-Treg peuvent également être utilisés dans d'autres types de transplantations. Un essai clinique en cours, le "LIBERATE" (Quell Therapeutics), explore l'utilisation des CAR-Treg chez les patients ayant reçu des transplantations hépatiques afin de réduire l'immunosuppression systémique. Il s'agit du même principe que les CAR-Treg étudiés tout au long de cette partie, les Treg sont modifiés avec un CAR spécifique à l'HLA-A02 pour rediriger les Treg des receveurs HLA-A02 négatifs vers le foie du donneur HLA-A02 positif. Les cellules CAR-T sont également équipées d'un module de verrouillage du phénotype FOXP3 et d'un mécanisme de sécurité pour l'élimination spécifique des Treg en cas d'effets indésirables. L'étude est conçue pour induire une tolérance opérationnelle durable en prévenant une réponse immunitaire de l'hôte contre le greffon, ce qui résulterait en un rejet de l'organe (113,114).

4.2.1. Maladies auto-immunes et inflammatoires

Les maladies auto-immunes sont caractérisées par une réponse immunitaire inappropriée contre les propres tissus de l'organisme, conduisant à une inflammation et une destruction tissulaire. Les CAR-Treg, grâce à leur capacité à moduler spécifiquement l'immunité, offrent des perspectives prometteuses pour ces maladies. Voici quelques exemples de potentielles applications (115) :

- Diabète de type 1 (DT1) : le DT1 est une maladie auto-immune où les cellules immunitaires détruisent les cellules β productrices d'insuline du pancréas. Les études ont démontré que les CAR-Treg spécifiques à l'antigène pourraient protéger les cellules β restantes et potentiellement rétablir la tolérance immunitaire. Par exemple, les CAR-Treg ciblant l'antigène GAD (décarboxylase d'acide glutamique) ont montré une capacité à supprimer la prolifération des cellules T spécifiques en laboratoire. Cette large suppression des cellules T pourrait présenter des risques d'immunosuppression excessive, soulignant la nécessité d'une approche équilibrée pour éviter d'affaiblir la réponse immunitaire globale tout en ciblant le DT1 de manière précise et efficace.
- Polyarthrite rhumatoïde (PR) : La PR implique une inflammation chronique des articulations. Les CAR-Treg ciblant les antigènes spécifiques présents dans les articulations enflammées, comme la vimentine citrullinée, pourraient fournir une suppression localisée de l'inflammation sans les effets secondaires des traitements systémiques. Des études préclinique ont évalué des CAR-Treg dirigés contre des antigènes spécifiques, démontrant leur potentiel pour réduire efficacement l'inflammation. Notamment, des Treg spécifiques à l'ovalbumine ont été testés (116), révélant leur capacité à inhiber la prolifération des cellules T. Ces Treg modifiés se sont accumulés dans les tissus lésés, ont diminué la population de cellules pro-inflammatoires, et ont ainsi réduit de manière significative la destruction osseuse associée à l'arthrite.
- Sclérose en plaques (SEP) : la SEP est une maladie démyélinisante où les cellules T auto-réactives attaquent la gaine de myéline des nerfs. Les CAR-Treg ciblant des antigènes spécifiques de la myéline, comme la glycoprotéine oligodendrocytaire myéline (MOG), pourraient réduire l'inflammation et la dégénérescence neuronale. Des études précliniques ont montré que les CAR-Treg anti MOG réduisent les symptômes de la maladie et les

cytokines pro-inflammatoires dans le tissu cérébral des modèles animaux de SEP, offrant un potentiel pour des traitements plus ciblés et moins immunosuppresseurs.

- Maladie inflammatoire chronique de l'intestin : Dans les maladies inflammatoires intestinales telles que la maladie de Crohn, où de meilleurs traitements sont nécessaires, l'inflammation est localisée dans le tractus gastro-intestinal. Sangamo a développé des CAR-Treg ciblant le récepteur à l'IL23 (IL23R) (111), une protéine présente dans le tractus gastro-intestinal et sur-exprimée par les cellules inflammatoires chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Lorsqu'elles sont administrées chez le patient, ces CAR-Treg migrent vers le tractus gastro-intestinal, interagissent avec l'IL23R, et suppriment l'inflammation locale. Cette approche cible directement les cellules responsables de l'inflammation, offrant une stratégie prometteuse pour réduire spécifiquement l'activité de la maladie sans les effets secondaires des thérapies immunosuppressives plus larges.
- Vitiligo : En ciblant des antigènes spécifiques présents sur les mélanocytes, les CAR-Treg pourraient réguler l'immunité et potentiellement retarder ou inverser la dépigmentation de la peau.

4.2.2. Autres applications potentielles des CAR-Treg

Au-delà de leur intérêt dans les maladies auto-immunes et inflammatoires, les CAR-Treg montrent un potentiel dans le traitement de plusieurs autres maladies (115) :

- Asthme : Les CAR-Treg ciblant les antigènes associés à l'asthme pourraient réduire l'inflammation pulmonaire et améliorer les symptômes respiratoires chez les patients asthmatiques.
- Hémophilie : Les CAR-Treg spécifiques aux facteurs de coagulation pourraient aider à moduler les réponses immunitaires indésirables chez les patients traités par thérapie substitutive, réduisant ainsi les complications liées aux inhibiteurs.

Ces applications diverses des CAR-Treg illustrent leur polyvalence et le potentiel dans le traitement de maladies complexes par modulation spécifique de l'immunité. L'investigation continue et les essais cliniques seront nécessaires afin de réaliser pleinement leur potentiel thérapeutique.

Conclusion

Le traitement de choix pour l'insuffisance rénale terminale est la transplantation d'un rein sain depuis un donneur compatible. Cette stratégie nécessite une compatibilité maximale au niveau du système HLA entre le donneur et le receveur ainsi que la prise d'immunosuppresseurs à vie par les patients pour éviter le rejet d'organes. La pénurie de donneurs compatibles et la iatrogénie liée à l'immunosuppression chronique sont les principales limites aux transplantations rénales. L'objet de cette thèse a ainsi été d'évaluer le potentiel des approches par CAR-Treg dans la prévention du rejet en transplantation rénale.

Ces thérapies reposent sur une modification génétique des lymphocytes T régulateurs autologues pour leur faire exprimer un récepteur chimérique CAR ciblant spécifiquement les cellules du greffon. Le rationnel thérapeutique est de moduler spécifiquement le système immunitaire du receveur pour tolérer le greffon rénal, réduisant les risques de rejet tout en limitant les complications liées à une immunosuppression systémique. Cependant, bien que les perspectives offertes par les CAR-Treg soient prometteuses, il est essentiel de rester prudent. Les résultats prometteurs des essais précliniques ont permis d'initier une étude clinique de phase I/IIa évaluant la sécurité et l'efficacité des CAR-Treg autologues dans la gestion du rejet post transplantation rénale. Il est indispensable que ces études fournissent des preuves solides et fiables, à court et long terme, avant que cette approche puisse être adoptée en pratique clinique.

Par ailleurs, les CAR-Treg ont également le potentiel de traiter un éventail de maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques ou encore la maladie de Crohn. Ces pathologies, caractérisées par des réactions immunitaires inappropriées contre les tissus de l'organisme, pourraient bénéficier de la capacité des CAR-Treg à moduler spécifiquement ces réponses immunitaires, offrant ainsi de nouvelles voies thérapeutiques pour des conditions jusqu'alors difficiles à gérer avec les thérapies standards.

La perspective de développer des CAR-Treg allogéniques est également prometteuse car ces médicaments de thérapie innovante pourraient alors être préparés à l'avance de manière standardisée, ce qui réduirait les coûts et les délais de production. Cette approche "prête à l'emploi" pourrait donc démocratiser l'accès à des thérapies innovantes pour un plus grand nombre de patients, rendant les traitements à la fois plus accessibles et plus rapides à mettre en œuvre.

La route vers l'utilisation généralisée des CAR-Treg en clinique est encore longue et se confronte à de nombreux défis biologiques et techniques. Ces défis incluent la nécessité d'améliorer la spécificité et l'efficacité des cellules, la gestion de leur persistance et leur interaction avec les traitements immunosuppresseurs existants, ainsi que des enjeux liés à la production et la qualité des cellules conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Bien qu'il n'existe pas encore de thérapie innovante "optimale" dans la gestion du rejet post transplantation, l'intégration des CAR-Treg dans les options thérapeutiques disponibles pourrait marquer un tournant dans le domaine de la thérapie cellulaire et génique. À l'ère de la médecine personnalisée, les CAR-Treg, pourraient jouer un rôle clé dans la modulation ciblée des réponses immunitaires, ouvrant ainsi la voie à des traitements plus spécifiques et mieux tolérés.

Références Bibliographiques

1. Maladie rénale chronique et insuffisance rénale : définition et causes [Internet]. [cité 18 févr 2024].
2. Marieb E, Hoehn K. Anatomie et physiologie humaines: Livre + eText + plateforme numérique MonLab - Licence étudiant 60 mois. Pearson Education France; 2014. 1506 p.
3. ResearchGate [Internet]. [cité 9 mai 2024]. Figure 1.2 -Structure du rein et des néphrons, adapté de National... Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Structure-du-rein-et-des-nephrons-adapte-de-National-Institute-of-Diabetes-and_fig2_366845875
4. Pottel H, Hoste L, Yayo E, Delanaye P. Le débit de filtration glomérulaire normal : une méta-analyse. *Néphrologie & Thérapeutique*. 1 sept 2016;12(5):333.
5. France Rein [Internet]. [cité 9 mai 2024]. Les fonctions du rein. Disponible sur: <https://www.francerein.org/vivre-avec-la-maladie/maladies-et-traitements/les-fonctions-du-rein/>
6. Inserm [Internet]. [cité 24 févr 2024]. Insuffisance rénale · Inserm, La science pour la santé. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/insuffisance-renale/>
7. Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. [cité 18 févr 2024]. Lésion rénale aiguë (insuffisance rénale aiguë) - Troubles génito-urinaires.
8. Vignolles T. France Rein. 2023 [cité 28 janv 2024]. Les données du rapport REIN 2021 sont en ligne. Disponible sur: <https://www.francerein.org/actualites/les-donnees-du-rapport-rein-2021-sont-en-ligne-2/>
9. rapport_rein_2021_2023-06-26.pdf [Internet]. [cité 9 mai 2024]. Disponible sur: https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/rapport_rein_2021_2023-06-26.pdf
10. Coronavirus et maladies rénales - Carenity [Internet]. [cité 18 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.carenity.com/infos-maladie/magazine/actualites/coronavirus-et-maladies-renaales-1342>
11. Les 5 stades de l'insuffisance rénale – Info Rein Santé [Internet]. [cité 18 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.inforeinsante.fr/les-5-stades-de-linsuffisance-renale/>
12. Quelques chiffres [Internet]. SiteGPR. [cité 24 févr 2024]. Disponible sur: <https://sitegpr.com/fr/rein/en-savoir-plus/quelques-chiffres/>
13. Néphroprotection (Traitement néphroprotecteur protégeant les reins) | Fiche santé HCL [Internet]. [cité 24 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.chu-lyon.fr/nephroprotection-traitement-nephroprotecteur-protecteant-les-reins>
14. Hémodialyse - Service de néphrologie et hypertension à Genève aux HUG - HUG [Internet]. [cité 24 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.hug.ch/nephrologie/hemodialyse>
15. NEPHROHUG [Internet]. 2015 [cité 9 mai 2024]. Les deux méthodes de dialyse péritonéale. Disponible sur: <https://www.nephrohug.ch/2015/09/04/les-deux-methodes-de-dialyse-peritoneale/>
16. Types d'accès corporel de la dialyse [Internet]. 2018 [cité 24 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.ontariorenalnetwork.ca/fr/ressources-sur-les-soins-renaux/vivre-avec-une-maladie-renale-chronique/a-propos-de-la-dialyse/types-d-acces-corporel>
17. L'hémodialyse quotidienne à domicile : une alternative efficace pour la qualité de vie des patients | Néphrologie Lyon - Néphropôle Centre Léon Blum [Internet]. [cité 24 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.nephrologie-lyon.com/lhemodialyse-quotidienne-domicile-une-alternative-efficace-pour-la-qualite-de-vie-des-patients.html>
18. Transplantation de rein - HUG [Internet]. [cité 9 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.hug.ch/transplantation/transplantation-rein>

19. Qu'est ce que la greffe rénale ? – Fondation du rein [Internet]. [cité 28 janv 2024]. Disponible sur: <https://fondation-du-rein.org/quest-ce-que-la-greffe-renale/>
20. Immunosuppresseurs après une transplantation d'organe : traitement de fond et risque de cancer – CBIP [Internet]. [cité 9 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.cbip.be/fr/immunosuppresseurs-apres-une-transplantation-dorgane-traitement-de-fond-et-risque-de-cancer/>
21. Transplantation rénale : préparation et suivi des patients porteurs d'une greffe de rein | Fiche santé HCL [Internet]. [cité 24 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.chu-lyon.fr/transplantation-renale-preparation-et-suivi-des-patients-porteurs-dune-greffe-de-rein>
22. *Immunosuppresseurs : Les points essentiels [Internet]. [cité 13 mai 2024]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/immunosuppresseurs-les-points-essentiels>
23. La découverte du système HLA par le Professeur Jean Dausset, Prix Nobel de Médecine - Edgardo D. Carosella - Histoire des sciences / Évolution des disciplines et histoire des découvertes - Avril 2015. 2015;
24. Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. [cité 29 janv 2024]. Système de l'Human Leukocyte Antigen (HLA) - Immunologie; troubles allergiques.
25. le-complexe-majeur-dhistocompatibilité.pdf [Internet]. [cité 26 févr 2024]. Disponible sur: <https://facmed.univ-constantine3.dz/wp-content/uploads/2022/06/le-complexe-majeur-dhistocompatibilit%C3%A9.pdf>
26. SIMON M. Cours Pharmacie. 2009 [cité 10 mai 2024]. De l'immunité innée à l'immunité adaptative & Complexe majeur d'histocompatibilité. Disponible sur: <https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/de-limmunit%C3%A9-inn%C3%A9e-%C3%A0-limmunit%C3%A9-adaptative-et-complexe-majeur-d-histocompatibilit%C3%A9.html>
27. Takemoto S, Port FK, Claas FHJ, Duquesnoy RJ. HLA matching for kidney transplantation. *Human Immunology*. déc 2004;65(12):1489-505.
28. le-complexe-majeur-dhistocompatibilité.pdf [Internet]. [cité 25 févr 2024]. Disponible sur: <https://facmed.univ-constantine3.dz/wp-content/uploads/2022/06/le-complexe-majeur-dhistocompatibilit%C3%A9.pdf>
29. Recherche d'un donneur compatible- Agence de la biomedecine [Internet]. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/hla.pdf>
30. Brick C, Atouf O, Benseffaj N, Essakalli M. Rejet de la greffe rénale : mécanisme et prévention. *Néphrologie & Thérapeutique*. 1 févr 2011;7(1):18-26.
31. chap_mi_bpc_djaara_01.pdf [Internet]. [cité 10 mai 2024]. Disponible sur: https://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/djaara_hayat/files/chap_mi_bpc_djaara_01.pdf
32. cprejetgreffonVdef_0.pdf [Internet]. [cité 10 mai 2024]. Disponible sur: https://www.cnrs.fr/sites/default/files/press_info/2020-03/cprejetgreffonVdef_0.pdf
33. Hadaya K. Transplantation rénale ABO incompatible. *Rev Med Suisse*. 20 juin 2012;346(24):1310-3.
34. Immunologie de la transplantation (2021-2022).
35. Mansourabadi AH, Mohamed Khosroshahi L, Noorbakhsh F, Amirzargar A. Cell therapy in transplantation: A comprehensive review of the current applications of cell therapy in transplant patients with the focus on Tregs, CAR Tregs, and Mesenchymal stem cells. *International Immunopharmacology*. 1 août 2021;97:107669.
36. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Solid Organ Transplantation - PMC [Internet]. [cité 10 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7902912/>

37. Study of Patients with Leukemia Remission after CAR T Therapy [Internet]. [cité 7 janv 2024]. Disponible sur: <https://www.pennmedicine.org/news/news-releases/2022/february/study-of-penn-patients-with-decade-long-leukemia-remissions-after-car-t-cell-therapy>
38. Siri A, Boysson H de, Boursier G. Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4+. *Med Sci (Paris)*. 1 juin 2012;28(6-7):646-51.
39. Mirandole. Différence entre immunité innée et immunité adaptative [Internet]. 2020 [cité 13 mai 2024]. Disponible sur: <https://jeretiens.net/difference-entre-immunite-innee-et-immunite-adaptative/>
40. ResearchGate [Internet]. [cité 13 mai 2024]. Figure 7. Kinetics of innate and adaptive immune responses. Adapted... Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Kinetics-of-innate-and-adaptive-immune-responses-Adapted-from-Abbas-19_fig7_283274416
41. Mieux connaître les cellules dendritiques pour mieux combattre le cancer | Institut Curie [Internet]. [cité 13 mai 2024]. Disponible sur: <https://curie.fr/actualite/publication/mieux-connaître-les-cellules-dendritiques-pour-mieux-combattre-le-cancer>
42. Larousse É. hématopoïèse - LAROUSSE [Internet]. [cité 13 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/h%C3%A9matopo%C3%AF%C3%A8se/13488>
43. Comment se scelle le destin des lymphocytes T ? | Institut Curie [Internet]. [cité 13 mai 2024]. Disponible sur: <https://curie.fr/actualite/immunotherapie/comment-se-scelle-le-destin-des-lymphocytes-t>
44. rédaction la. Futura. [cité 13 mai 2024]. Définition | Lymphocyte T4 - LT CD4+ - LT4 - Lymphocyte T auxiliaire | Futura Santé. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-lymphocyte-t4-13447/>
45. Immunité et lymphocytes T CD8 cytotoxiques — Centre International de Recherche en Infectiologie [Internet]. [cité 13 mai 2024]. Disponible sur: <https://ciri.ens-lyon.fr/teams/icl/presentation>
46. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1 août 1995;155(3):1151-64.
47. Corvaisier-Chiron M, Beauvillain C. Les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes Th17 : fonctions physiologiques et pathologiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. juill 2010;2010(424):31-40.
48. ResearchGate [Internet]. [cité 29 oct 2023]. Figure 1: Regulatory T cell populations. Selection of naïve CD4+ T... Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Regulatory-T-cell-populations-Selection-of-naive-CD4-T-cells-and-natural-Tregs-occurs_fig1_282041062
49. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. avr 2003;4(4):330-6.
50. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 14 févr 2003;299(5609):1057-61.
51. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol*. 1 mai 2008;180(9):5916-26.
52. Martins F, Orcurto A, Michielin O, Coukos G. Principes de la thérapie cellulaire par transfert adoptif à base de Tumor Infiltrating Lymphocytes. *Rev Med Suisse*. 18 mai 2016;519:989-93.
53. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. avr 2008;8(4):299.
54. June CH. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest*. 1 mai 2007;117(5):1204-12.

55. Boursier G, Siri A, Boysson H de. Utilisation des lymphocytes T régulateurs en thérapies cellulaires dans les maladies auto-immunes. *Med Sci (Paris)*. 1 août 2012;28(8-9):757-63.
56. Joffre O, Santolaria T, Meerwijk JPM van. Utilisation des lymphocytes T régulateurs en transplantation - Supprimer l'immunosuppression. *Med Sci (Paris)*. 1 août 2008;24(8-9):689-91.
57. Raffin C, Vo LT, Bluestone JA. Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat Rev Immunol*. mars 2020;20(3):158-72.
58. Kim YC, Zhang AH, Su Y, Rieder SA, Rossi RJ, Ettinger RA, et al. Engineered antigen-specific human regulatory T cells: immunosuppression of FVIII-specific T- and B-cell responses. *Blood*. 12 févr 2015;125(7):1107-15.
59. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*. 7 juin 2004;199(11):1455-65.
60. Stephens LA, Malpass KH, Anderton SM. Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol*. avr 2009;39(4):1108-17.
61. Fujio K, Okamoto A, Araki Y, Shoda H, Tahara H, Tsuno NH, et al. Gene therapy of arthritis with TCR isolated from the inflamed paw. *J Immunol*. 1 déc 2006;177(11):8140-7.
62. Tsang JYS, Tanriver Y, Jiang S, Xue SA, Ratnasothy K, Chen D, et al. Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest*. nov 2008;118(11):3619-28.
63. Structure of TCRs and CARs. a The TCR is comprised of α and β chains... | Download Scientific Diagram [Internet]. [cité 10 mai 2024]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-TCRs-and-CARs-a-The-TCR-is-comprised-of-a-and-b-chains-that-closely_fig4_316426573
64. Abken H. Building on Synthetic Immunology and T Cell Engineering: A Brief Journey Through the History of Chimeric Antigen Receptors. *Hum Gene Ther*. oct 2021;32(19-20):1011-28.
65. Catros V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux - De nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. *Med Sci (Paris)*. 1 avr 2019;35(4):316-26.
66. Haute Autorité de Santé [Internet]. [cité 12 mai 2024]. KYMRIAH (tisagenlecleucel), CAR T anti-CD19 (LAL). Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2891689/fr/kymriah-tisagenlecleucel-car-t-anti-cd19-lal
67. Haute Autorité de Santé [Internet]. [cité 12 mai 2024]. YESCARTA (axicabtagene ciloleucel) - Lymphome diffus à grandes cellules B. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3358972/fr/yescarta-axicabtagene-ciloleucel-lymphome-diffus-a-grandes-cellules-b
68. Kymriah | European Medicines Agency [Internet]. [cité 12 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah>
69. Yescarta | European Medicines Agency [Internet]. [cité 12 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yescarta>
70. Tecartus | European Medicines Agency [Internet]. [cité 12 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecartus>
71. Breyanzi | European Medicines Agency [Internet]. [cité 12 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/breyanzi>
72. Abecma | European Medicines Agency [Internet]. [cité 12 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/abecma>

73. Carvykti | European Medicines Agency [Internet]. [cité 12 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/carvykti>
74. Edison Group [Internet]. 2018 [cité 4 janv 2024]. TxCell — Robust and stable Treg manufacturing. Disponible sur: <https://www.edisongroup.com/research/robust-and-stable-treg-manufacturing/20436/>
75. Isaac Rosado-Sánchez, Megan K Levings. Building a CAR-Treg: Going from the basic to the luxury model. *Cellular immunology*. sept 2020; Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33096321/>
76. Définition | Immunoglobuline E - IgE [Internet]. [cité 12 mai 2024]. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-immunoglobuline-e-13125/>
77. Qin L, Lai Y, Zhao R, Wei X, Weng J, Lai P, et al. Incorporation of a hinge domain improves the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *Journal of Hematology & Oncology*. 13 mars 2017;10(1):68.
78. Chang ZL, Chen YY. CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. *Trends Mol Med*. mai 2017;23(5):430-50.
79. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and Development of Therapies using Chimeric Antigen Receptor-Expressing T cells. *Immunol Rev*. janv 2014;257(1):10.1111/imr.12131.
80. Liu J, Zhou G, Zhang L, Zhao Q. Building Potent Chimeric Antigen Receptor T Cells With CRISPR Genome Editing. *Front Immunol*. 2019;10:456.
81. Brocker T. Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*. 1 sept 2000;96(5):1999-2001.
82. Marie-Thérèse Rubio¹, Jeanne Galaine, Christophe Borg, Étienne Daguindau. *Biologie, concepts et principes des CAR-T cells*.
83. Van der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov*. juill 2015;14(7):499-509.
84. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol*. janv 2002;20(1):70-5.
85. Eshhar Z, Elinav E. Cellules régulatrices t redirigées, génétiquement modifiées et leur utilisation dans la suppression d'une maladie auto-immune et inflammatoire [Internet]. EP2126054B1, 2016 [cité 12 mai 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/EP2126054B1/fr>
86. Zhang Q, Lu W, Liang CL, Chen Y, Liu H, Qiu F, et al. Chimeric Antigen Receptor (CAR) Treg: A Promising Approach to Inducing Immunological Tolerance. *Front Immunol*. 12 oct 2018;9:2359.
87. LexUriServ.pdf [Internet]. [cité 20 janv 2024]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:324:0121:0137:FR:PDF>
88. Définitions | AFMPS [Internet]. [cité 20 janv 2024]. Disponible sur: <https://www.afmps.be/fr/definitions>
89. Fritsche E, Volk HD, Reinke P, Abou-EI-Enein M. Toward an Optimized Process for Clinical Manufacturing of CAR-Treg Cell Therapy. *Trends in Biotechnology*. oct 2020;38(10):1099-112.
90. Boardman DA, Philippeos C, Fruhwirth GO, Ibrahim M a. A, Hannen RF, Cooper D, et al. Expression of a Chimeric Antigen Receptor Specific for Donor HLA Class I Enhances the Potency of Human Regulatory T Cells in Preventing Human Skin Transplant Rejection. *American Journal of Transplantation*. 1 avr 2017;17(4):931-43.
91. Boroughs AC, Larson RC, Choi BD, Bouffard AA, Riley LS, Schiferle E, et al. Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function. *JCI Insight*. 4(8):e126194.

92. Dawson NAJ, Rosado-Sánchez I, Novakovsky GE, Fung VCW, Huang Q, McIver E, et al. Functional effects of chimeric antigen receptor co-receptor signaling domains in human Tregs [Internet]. *bioRxiv*; 2019 [cité 14 mai 2024]. p. 749721.
93. Bailey SR, Maus MV. Gene editing for immune cell therapies. *Nat Biotechnol*. déc 2019;37(12):1425-34.
94. Jacobson CA, Ritz J. Time to put the CAR-T before the horse. *Blood*. 3 nov 2011;118(18):4761-2.
95. Magnani CF, Tettamanti S, Alberti G, Pisani I, Biondi A, Serafini M, et al. Transposon-Based CAR T Cells in Acute Leukemias: Where Are We Going? *Cells*. 27 mai 2020;9(6):1337.
96. Schreeb K, Culme-Seymour E, Ridha E, Dumont C, Atkinson G, Hsu B, et al. Study Design: Human Leukocyte Antigen Class I Molecule A*02-Chimeric Antigen Receptor Regulatory T Cells in Renal Transplantation. *Kidney International Reports*. juin 2022;7(6):1258-67.
97. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, et al. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *The Lancet*. 23 mai 2020;395(10237):1627-39.
98. Rana J, Biswas M. Regulatory T cell therapy: Current and future design perspectives. *Cellular Immunology*. 1 oct 2020;356:104193.
99. The TWO Study: Transplantation Without Over-immunosuppression [Internet]. [cité 16 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.nds.ox.ac.uk/the-two-study/the-two-study>
100. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 26 sept 2006;109(2):827-35.
101. Proics E, David M, Mojibian M, Speck M, Lounnas-Mourey N, Govehovitch A, et al. Preclinical assessment of antigen-specific chimeric antigen receptor regulatory T cells for use in solid organ transplantation. *Gene Ther*. avr 2023;30(3):309-22.
102. Janvier-Labs [Internet]. [cité 17 mai 2024]. Souris NXG. Disponible sur: https://janvier-labs.com/fiche_produit/1-nxg/
103. STEADFAST Clinical Research Study [Internet]. [cité 28 janv 2024]. Disponible sur: <https://www.steadfastclinicalstudy.com/fr/>
104. Gille I, Claas FHJ, Heidt S. Chimeric Antigen Receptor (CAR) Regulatory T-Cells in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 26 mai 2022 [cité 17 mars 2024];13. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.874157/full>
105. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol*. 28 oct 2014;5:235.
106. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 3 nov 2011;365(18):1673-83.
107. Mohseni YR, Tung SL, Dudreuilh C, Lechler RI, Fruhwirth GO, Lombardi G. The Future of Regulatory T Cell Therapy: Promises and Challenges of Implementing CAR Technology. *Front Immunol* [Internet]. 24 juill 2020 [cité 29 mars 2024];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.01608/full>
108. Sicard A, Lamarche C, Speck M, Wong M, Rosado-Sánchez I, Blois M, et al. Donor-specific chimeric antigen receptor Tregs limit rejection in naive but not sensitized allograft recipients. *Am J Transplant*. juin 2020;20(6):1562-73.

109. Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, et al. Prevention of Allograft Rejection by Use of Regulatory T Cells With an MHC-Specific Chimeric Antigen Receptor. *Am J Transplant.* avr 2017;17(4):917-30.
110. Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust. Pilot Study Evaluating the Safety and Efficacy Profile of Regulatory T Cell Therapy in Liver Transplant Recipients [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2019 janv [cité 1 janv 2024]. Report No.: NCT02166177. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02166177>
111. Sangamo [Internet]. [cité 1 avr 2024]. Autoimmunity and Transplantation. Disponible sur: <https://www.sangamo.com/science/therapeutic-applications/autoimmunity-and-transplantation/>
112. Loney C, Breman E. Allogeneic CAR-T Therapy Technologies: Has the Promise Been Met? *Cells.* janv 2024;13(2):146.
113. Kaljanac M, Abken H. Do Treg Speed Up with CARs? Chimeric Antigen Receptor Treg Engineered to Induce Transplant Tolerance. *Transplantation.* janv 2023;107(1):74-85.
114. Quell Therapeutics Limited. A Single-arm, Open-label, Multi-center, Phase I/II Study Evaluating the Safety and Clinical Activity of QEL-001, an Autologous CAR T Regulatory Cell Treatment Targeting HLA-A2, in HLA-A2/ A28neg Patients That Have Received an HLA-A2pos Liver Transplant. [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2024 avr [cité 1 janv 2024]. Report No.: NCT05234190. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05234190>
115. Arjomandnejad M, Kopec AL, Keeler AM. CAR-T Regulatory (CAR-Treg) Cells: Engineering and Applications. *Biomedicines.* 26 janv 2022;10(2):287.
116. Wright GP, Notley CA, Xue SA, Bendle GM, Holler A, Schumacher TN, et al. Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 nov 2009;106(45):19078-83.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.