Mise en place d'un modèle murin du sepsis et caractérisation d'une immunothérapie innovante pour le traitement de l'immunosuppression associée à ce syndrome

Marie Baldazza

▶ **To cite this version:**

Marie Baldazza. Mise en place d'un modèle murin du sepsis et caractérisation d'une immunothérapie innovante pour le traitement de l'immunosuppression associée à ce syndrome. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03951537

HAL Id: hal-03951537
https://ephe.hal.science/hal-03951537

Submitted on 2 May 2023

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.

Copyright

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

BALDAZZA Marie

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Mise en place d'un modèle murin du sepsis et caractérisation d'une immunothérapie innovante pour le traitement de l'immunosuppression associée à ce syndrome

Soutenu le 17 novembre 2022 devant le jury suivant :

Pr. Canque Bruno **– Président**
Dr. Inchauspé Geneviève **– Tuteur scientifique**
Pr. Frachet Véronique **– Tuteur pédagogique**
Dr. Verrier Bernard **– Rapporteur**
Dr. Ray Aurélie **– Examinatrice**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. INCHAUSPE Geneviève
Directrice du département des maladies infectieuses
Transgene S.A.
317 Avenue Jean Jaurès
69364 Lyon Cedex 07

et de

Dr. FRACHET Véronique
École Pratique des Hautes Études - PSL
Institute for Advanced Biosciences (U1209 - UMR 5309)
Site Santé, Allée des Alpes
38700 La Tronche

- Résumé -

L'immunodépression induite par le sepsis est caractérisée par des réponses immunitaires innées et adaptatives altérées. Le premier candidat d'immunothérapie développé contre cette pathologie par la société Transgene est basé sur un virus de la Vaccine Ankara Modifié (MVA) codant pour une cytokine : l'interleukine 7 humaine (hIL7-Fc), portant une région Fc (Fragment cristallisable).

Dans le modèle de ligature et ponction cæcale (CLP ou Cecal Ligation Puncture) récemment introduit dans notre Laboratoire, nous observons une tolérance au LPS (lipopolysaccharide), une réponse cytokinique à une stimulation TCR réduite et une inhibition de la capacité de prolifération des lymphocytes T. L'intérêt de la combinaison MVA-hIL7-Fc est de stimuler à la fois les systèmes immunitaires inné et adaptatif. L'activation de la première ligne de défense non spécifique contre les agents pathogènes étrangers est induite par le MVA et le système immunitaire adaptatif par l'hIL7-Fc. À la suite d'une seule injection intraveineuse chez des souris CLP, le MVA-hIL7-Fc a augmenté le nombre et la fonctionnalité des lymphocytes B, T et NK dans la rate et conféré un avantage de survie significatif dans le modèle CLP. Le contrôle par la protéine soluble de rhIL7-Fc ou le MVA-Vide a induit des activités immunitaires moins complètes que le MVA-hIL7-Fc. Le MVA-hIL-7-Fc a donc un fort potentiel comme nouvelle immunothérapie pour le traitement des patients septiques immunodéprimés.

- Table des matières -

- Résumé - 1

- Table des matières - 2

- Figures - 5

- Tableaux - 6

- Abréviations - 6

I/ INTRODUCTION 9

II/ CONTEXTE 12

1) Le sepsis 12

A/Définition 12

B/ Aspects clinique du sepsis 13

a) Les pathogènes du sepsis 13

b) Symptômes et traitements 15

c) Le Score SOFA 16

d) Mortalité et conséquences sanitaires à long terme 16

e) Conséquences économiques 18

2) Immunologie et physiopathologie du sepsis : la phase d'hyper-inflammation 20

A/ La réponse immunitaire exacerbée 20

B/ Le facteur tissulaire 20

C/ La (dys)fonction endothéliale 22

D/ La protéine C activée 22

E/ Le complément 22

F/ Le rôle des plaquettes 23

3) Immunosupression dans le sepsis 23

A/ Apoptose et immunosuppression 23

B/ Monocytes et macrophages 24

C/ Cellules tueuses naturelles 25

D/ Lymphocytes T 26

a) Lymphopénie 26

b) L'épuisement fonctionnel des lymphocytes T 26

c) Lymphocyte T régulateurs (Treg) 27

4) Thérapies immunostimulatrices dans le sepsis 28

A/ Les facteurs GM-CSF / G-CSF 29

B/ IL-7 / IL-15 29

C/ Anti-PD-1 / anti-PD-L1 29

5) Immunostimulation : le projet ImmunResQ 31

A/ IL-7 : son rôle dans l'immunité adaptative et dans le sepsis 31

B/ MVA : induction de la réponse immunitaire innée 32

a) Caractéristiques 32

b) Applications 34

c) Réponse immunitaire innée au MVA 34

C/ Un nouveau candidat-médicament : le MVATG18897 (MVA-hIL7-Fc) 34
D/ Production et purification de hIL-7-Fc recombinante 35
E/ Modèle CLP 35

6) Hypothèses de travail 36

III/ METHODOLOGIE 38

1) Modèle animal de ligature et de ponction caecale : CLP 38
A/ Procédure chirurgicale 38
B/ Mise en place de la procédure CLP, résolution des problèmes techniques 39

2) Matériel et méthode 43
A/ Répartition des souris par groupe 43
B/ Préparation de l'antibiotique 43
C / Administration du traitement 43
D/ Euthanasie et prélèvements 43
E/ Sérum 44
F/ Hématocrite 44
G/ Analyses biochimiques 44
H/ Splénocytes 45
I/ Stimulation anti-CD3 45
J/ ELISA hIL-7 45
K/ Multiplex : MSD 45
L/ Phénotypage par cytométrie en flux 46
M/ Prolifération 46

3) Mise en place des protocoles 46
A/ Production de cytokines, stimulation anti-CD3 46
B/ Analyse de la prolifération par cytométrie en flux 47
C/ Meso Scale Discovery (MSD) Multiplex 49
D/ Mesure de l'hématocrite 52
E/ Dosage Biochimique 55

IV/ RÉSULTATS - 1ère partie : CARACTÉRISATION DU MODÈLE CLP 57

1) Mortalité 57

2) Populations cellulaires 58

3) Tolérance au LPS 59

4) Cytokines circulantes dans le sérum 60

5) Réponse cytokinique des lymphocytes T à une activation anti-CD3. 61

6) Prolifération des lymphocytes T 62

7) Conclusion de la caractérisation du modèle CLP 63

V/ RÉSULTATS - 2ème PARTIE : PREUVE DE L'EFFICACITÉ DU MVA-hIL7-Fc DANS LE MODÈLE CLP MURIN 65

1) Protocole d'évaluation du MVA-hIL7-fc dans le modèle CLP 65

2) Comparaison de l'activité du MVA-hIL7-Fc vs le MVA-Vide 66
A/ Observations cliniques et dosages sanguins 67

a) Mortalité _____ 67
b) Perte de poids _____ 67
c) Cytokines circulantes dans le sérum _____ 68
d) Phénotypage _____ 69
B/ Réponse cytokinique des lymphocytes T _____ 70
a) Stimulation TCR, sécrétion dans le surnageant _____ 70
b) Stimulation TCR, identification des cellules sécrétrices par cytométrie _____ 71
c) Capacité de prolifération des lymphocytes T _____ 72

3) Comparaison de l'activité du MVA-hIL7-Fc vs la protéine rhIL7 _____ 72

A/ Paramètres sanguins _____ 73
a) Hématocrite _____ 73
b) Phénotypage _____ 74
c) Analyses biochimiques _____ 75
B/ Réponse cytokinique des lymphocytes T _____ 76
a) Stimulation TCR, sécrétion dans le surnageant _____ 76
b) Stimulation TCR et identification des cellules sécrétrices par cytométrie _____ 76

VI/ CONCLUSION _____ 79

1/ Comparaison de l'activité du MVA-hIL7-Fc vs le MVA-Vide dans le modèle CLP _ 79

2/ Comparaison de l'activité du MVA-hIL7-Fc vs la protéine rhIL7 _____ 80

VII/ DISCUSSION _____ 83

1/ Le modèle murin dans le sepsis, limites, avantages et alternatives _____ 83

2/ Caractérisation d'une immunothérapie innovante pour le traitement de l'immunosuppression induite par le sepsis _____ 85

- Bibliographie - _____ 88

- Annexes - _____ 94

- Figures -

Figure 1 : Trois époques de la médecine de soins intensifs ____ 13
Figure 2 : Classement des 13 pathogènes identifiés chez les patients sepsis en %____ 14
Figure 3 : Devenir des patients en choc septique de la première hospitalisation au taux de survie à 3 ans 15
Figure 4 : Évolution des taux d'hospitalisations pour septicémie parmi les interventions des services médicaux d'urgence ____ 17
Figure 5 : Modèle d'évolution clinique d'un patient septique ____ 18
Figure 6 : Activation des systèmes de coagulation et du complément au cours du sepsis____ 21
Figure 7 : Stratification rétrospective des patients en choc septique basée sur un biomarqueur : le mHLA-DR ____ 25
Figure 8 : Illustration synthétique de l'immunosuppression du système immunitaire inné et adaptatif induite par la septicémie ____ 28
Figure 9 : Thérapies d'immunostimulation contre le sepsis____ 30
Figure 10 : les Effets immunomodulateurs de l'interleukine-7 humaine recombinante (rhIL-7).____ 32
Figure 11 : Illustration de la procédure chirurgicale de ligature et ponction du caecum ____ 39
Figure 12 : Injection retro orbital ____ 43
Figure 13 : Microvette de prélèvement sanguin____ 44
Figure 14 : Détermination du taux d'hématocrite sanguin au laboratoire Transgene ____ 44
Figure 16 : Prolifération, stratégie d'analyse ____ 48
Figure 17 : Histogramme représentant la fluorescence du CFSE à chaque cycle de division cellulaire réalisé ____ 48
Figure 18 : Représentation du nombre de parents CD8 partis en prolifération pour chaque cycle de division sur les 4 différents types de plaques____ 49
Figure 19 : Principe de fonctionnement du test MSD____ 50
Figure 20 : Dosage MSD d'un panel de 5 Cytokines sur le sérum et le surnageant de splénocytes stimulés 24h par un anti-CD3 ____ 52
Figure 21 : Différences macroscopiques entre le sang et le sérum des souris Sham et CLP____ 53
Figure 22 : Exemple de lecture du pourcentage d'hématocrite____ 54
Figure 23 : Taux d'hématocrite de souris Sham et CLP____ 54
Figure 24 : Absence de corrélation entre les traitements injectés et le taux d'hématocrite ____ 55
Figure 25 : Taux de survie des souris Sham et CLP à 13 jours post-CLP ____ 57
Figure 26 : Populations cellulaires des splénocytes des souris Sham et CLP ____ 58
Figure 27 : Tolérance au LPS des souris Sham et CLP ____ 59
Figure 28 : Cytokines circulantes dans le sérum de souris Sham et CLP ____ 60
Figure 29 : réponse cytokinique à une stimulation anti-CD3 des souris Sham et CLP____ 61
Figure 30 : Prolifération des cellules T ____ 62
Figure 31 : Chronogramme des expériences réalisées sur les souris CLP ____ 65
Figure 32 : Il-7 humaine circulante dans le sérum des souris à J7 après la CLP et J3 après le traitement __ 66
Figure 33 : Taux de survie des souris Sham et CLP avant et après le traitement à J4. ____ 67
Figure 34 : Perte de poids par rapport au J0 avant la chirurgie ____ 67
Figure 35 : Cytokines circulantes dans le sérum de souris Sham, CLP et CLP traitées____ 68
Figure 36 : Populations cellulaires des splénocytes des souris Sham, CLP et CLP traitées ____ 69
Figure 37 : réponse cytokinique à une stimulation anti-CD3 des souris Sham, CLP et CLP traitées ____ 70
Figure 38 : Réponse cytokinique IFNɣ, TNFα, IL-2, « Intracellular cytokine staining (ICS) » des souris Sham, CLP et CLP traitées ____ 71
Figure 39 : Prolifération des lymphocytes T après traitement des souris CLP____ 72
Figure 40 : Hématocrite ____ 73
Figure 41 : Populations cellulaires des splénocytes des souris Sham, CLP et CLP traitées ____ 74

Figure 42 : Analyses biochimiques du sérum des souris Sham, CLP et CLP traitées _____ 75
Figure 43 : réponse cytokinique à une stimulation anti-CD3 des souris Sham, CLP et CLP traitées _____ 76
Figure 44 : Réponse cytokinique IFNɣ, TNFα, IL-2, « Intracellular cytokine staining (ICS) » des souris Sham, CLP et CLP traitées _____ 77

- Tableaux -

Tableau 1 : Les différentes localisations des foyers infectieux provoquant la septicémie _____ 14
Tableau 2 : Score SOFA _____ 16
Tableau 3 : Les 20 pathologies les plus couteuses en 2017 _____ 19
Tableau 4 : Références des plaques testées _____ 46

- Abréviations -

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine transaminase
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
APACHE	Acute Physiology, Age and Chronic Health Evaluation
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASAT	Aspartate aminotransférase
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B- cell lymphoma-extra large
Bim	Bcl-2-like protein
C. difficile	Clostridium difficile
DC	Dendritic cell
CEF	Chick embryo fibroblasts
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CIVD	Coagulation Intravasculaire Disséminée
CK	Créatine Kinase
CLP	Cecal Ligation Puncture
ConA	Concanavaline A
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CTLA-4	Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein
CVA	Chorioallantois Vaccinia Ankara
CVP	Central Venous Pressure
CXCL1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
DASRI	Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Assay
Fc	Fragment cristallisable
Foxp3	Forkhead box 3
FVII	Facteur VII
Gamma GT	Gamma-glutamyltranspeptidase
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophages Simulation factor
hIL-7	Interleukine 7 humaine
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR isotype
IgG2-Fc	Immunoglobulines g sous classe 2
IL-x	Interleukine x

IL-1β	Interleukine 1 beta
IV	Intraveineuse
LAG-3	Background Lymphocyte-activation gene 3
LDH	Lactate Déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
MEWS	Modified Early Warning Score
mHLA-DR	Monocytes Human Leukocyte Antigen – DR isotype
MSD	Meso Scale Discovery
MVA	Virus de la Vaccine Ankara Modifié
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NF-κB	Facteur Nucléaire-kappa B
NK	Natural Killer
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAL	Phosphatases Alcalines
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBES	Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PFU	Plaque-Forming Unit
PHA	Phytohemagglutinin
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
rhIL-7	Interleukine 7 humaine recombinante
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
SIRS	Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
SMU	Services Médicaux d'Urgence
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
T CD4	Lymphocyte T CD4
T CD8	Lymphocyte T CD8
TCR	T cell receptor
TFPI	Inhibiteur de la voie du Facteur Tissulaire
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
Th	Lymphocytes T CD4 + helper
TIM	T-cell immunoglobulin and mucin domain
TLR	Toll-like receptors
TLR4	Tool like receptor 4
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
Treg	Lymphocytes T régulateurs
VE cadhérine	Cadhérine Endothéliale Vasculaire
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WHO	World Health Organization

INTRODUCTION

I/ INTRODUCTION

La septicémie, ou sepsis, est définie comme un dysfonctionnement d'organe potentiellement mortel causé par une réponse dérégulée de l'hôte à une infection (Singer, 2016). Le taux de mortalité de cette maladie est élevé. Dans le sepsis, la libération de médiateurs pro-inflammatoires induit une instabilité hémodynamique, un dysfonctionnement d'organes et des anomalies de la coagulation. Par conséquent, jusqu'à il y a quelques années, les essais cliniques se sont concentrés sur cette phase hyper inflammatoire provoquée par l'infection, dans le but de diminuer la réponse disproportionnée du système immunitaire de l'hôte. Cependant, cette approche n'a pas amélioré le taux de survie à la maladie. Il a alors été démontré que certain des patients atteints de septicémie ne mouraient pas d'une réponse immunitaire exacerbée mais d'une incapacité du système immunitaire à revenir à son état d'homéostasie initial. Le sepsis entraine en effet une apparition concomitante de mécanismes pro-inflammatoires (dominants dans la phase aigüe) et anti-inflammatoires (dominants dans la phase secondaire). La majorité des patients qui survivent à la première phase rentreront dans un état de profonde et persistante immunodépression.

L'immunodépression induite par le sepsis est caractérisée par des réponses immunitaires innées et adaptatives altérées : un dysfonctionnement et une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T, des défauts de phagocytose, une diminution de l'activation des monocytes et une production de cytokines *ex vivo* altérée (Meisel, 2009). De nombreux patients survivent à la phase hyper inflammatoire initiale du sepsis mais de 10 à 30% de patients meurent dans un second temps. En effet, l'immunodépression rend le patient septique plus vulnérable aux infections opportunistes secondaires, aux infections nosocomiales, à la réactivation d'infections latentes (Hamers, 2015), d'autant plus si le patient présente des comorbidités (par exemple, maladies cardiovasculaires, diabète, insuffisance rénale, insuffisance respiratoire, etc.). La mortalité à long terme, 3 ans après le sepsis, est de 70 % (Venet, 2018).

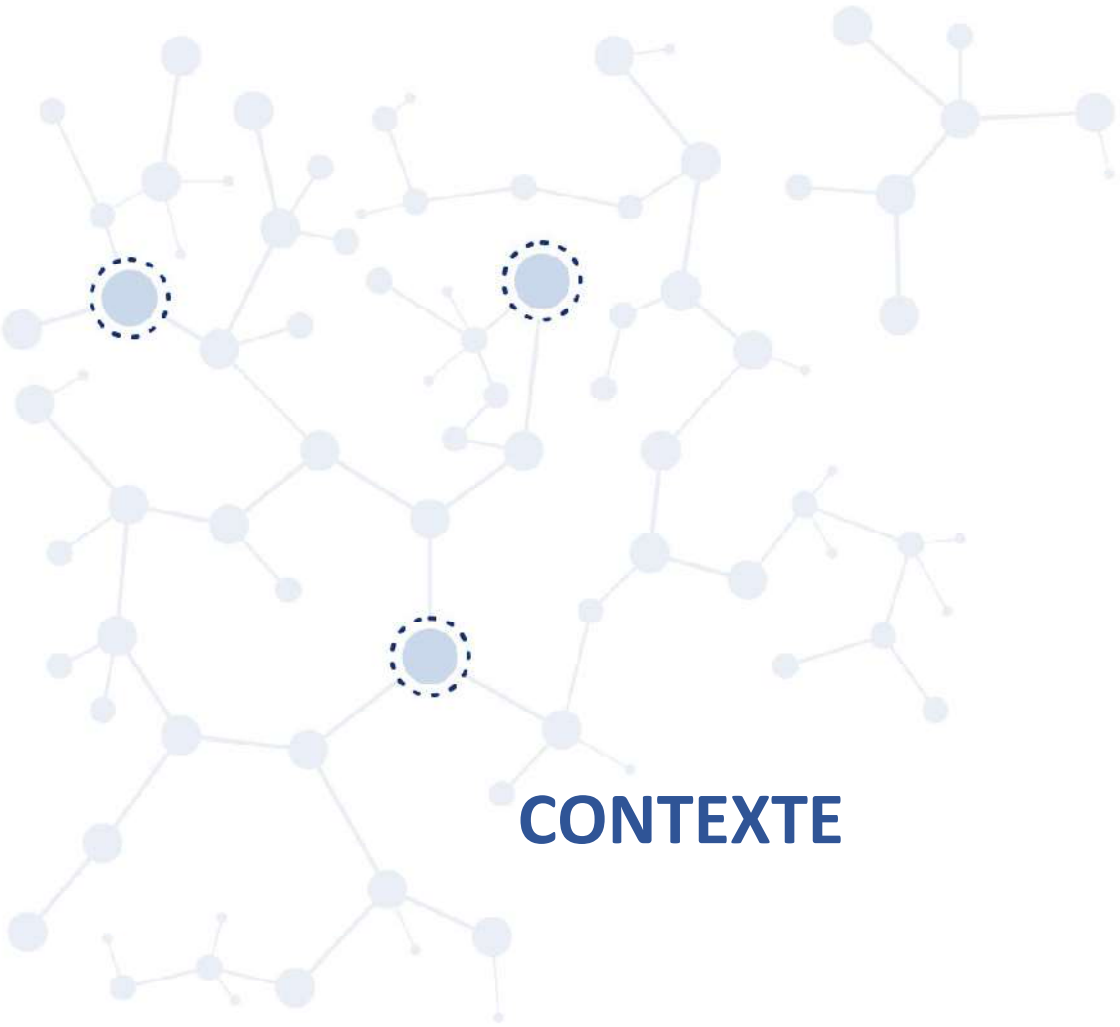
De ce fait, de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à stimuler les fonctions immunitaires ont été évaluées pour le traitement de patients présentant une dépression immunitaire induite par un sepsis (Venet, 2018), avec un intérêt croissant pour le développement de nouvelles immunothérapies.

C'est dans ce contexte que Transgene a développé en 2019 un programme de recherche, appelé ImmunResQ, dont le but est de concevoir un candidat médicament qui permettrait de réduire la mortalité liée à l'immunosuppression post sepsis. Transgene est une société de biotechnologie développant des immunothérapies basées sur des vecteurs viraux recombinants pour le traitement des cancers et des maladies infectieuses chroniques.

Un des savoir-faire de Transgene est donc de concevoir des virus génétiquement modifiés codants pour une molécule d'intérêt. Après l'injection de ce virus dans l'hôte, celui-ci va infecter ses cellules cibles en y introduisant l'acide nucléique codant, entrainant ainsi la production, par les cellules de l'hôte, de la molécule d'intérêt.

Dans notre programme, un premier candidat a été développé et breveté en 2021 (WO2022013221). Il est basé sur un virus de la Vaccine Ankara Modifié (MVA) codant pour une cytokine : l'interleukine 7 humaine (hIL7-Fc), portant une région Fc (Fragment cristallisable). L'intérêt de cette combinaison MVA-hIL7-Fc est de stimuler à la fois les systèmes immunitaires inné et adaptatif. L'activation de la première ligne de défense non spécifique contre les agents pathogènes étrangers est induite par le MVA (principalement les cellules présentatrices d'antigènes (Liu, 2008) et le système immunitaire adaptatif par l'hIL7-Fc produite par les cellules de l'hôte. L'IL-7 est connu pour améliorer la survie et la prolifération des lymphocytes T (de Roquetaillade, 2018).

L'originalité de cette approche réside donc dans la possibilité de stimuler simultanément, avec un seul médicament, les deux composants du système immunitaire, de réactiver ses fonctions défaillantes et ainsi diminuer la mortalité à moyen et long terme des patients victimes de sepsis. La preuve de concept de ce candidat a été démontrée sur un modèle CLP murin (CLP : « Cecal Ligation Puncture », modèle mimant le sepsis chez l'homme) (Lélu, 2022, Annexe 3) et lors d'une première étude sur primate non humain (Coupet, soumis).



CONTEXTE

II/ CONTEXTE

1) Le sepsis

A/Définition

En 2002, le sepsis avait été défini comme un syndrome caractérisé par une réponse inflammatoire généralisée d'origine infectieuse, avec la notion de sepsis « sévère », qui sera abandonnée dans la nouvelle définition mais encore régulièrement retrouvée dans la littérature. En 2016, la définition a été réactualisée (Singer, 2016) pour devenir la définition actuelle appelée Sepsis 3 :

« *Le sepsis est défini comme un dysfonctionnement d'organes potentiellement mortel, résultant d'une réponse dérégulée de l'hôte à l'infection, et dont la forme la plus grave est le choc septique* ».

En septembre 2020, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) publie le premier rapport mondial sur ce qu'il nomme l'état septique (WHO, 2020). Bien que le sepsis soit reconnu comme une priorité sanitaire mondiale depuis 2017, ce rapport a permis de faire un point actuel de la situation. Avec 48,9 millions de cas en 2017, le sepsis est responsable de 11 millions de décès chaque année dans le monde et entraine également un handicap à long terme chez des millions de personnes. Cette reconnaissance récente et la création de la nouvelle définition en 2016 avait pour but d'améliorer le recueil des données épidémiologiques, la prévention, le diagnostic et la prise en charge de cette maladie souvent mortelle (Reinhart, 2017).

Très récemment, cette définition a été rediscutée par un grand nombre de spécialistes dans une publication de juin 2022 (Maslove, 2022). Les auteurs expliquent la nécessité d'une collaboration à l'échelle mondiale pour parvenir à un accord sur la terminologie et la classification, en créant des bases de données partagées pour tester et valider des modèles. Le but est d'incorporer ces modèles dans des essais cliniques randomisés pour en évaluer la valeur prédictive. Dans la figure 1, les auteurs illustrent les avancées majeures dans la précision de la définition du sepsis et l'amélioration de sa prise en charge dans les services de soins intensifs. On constate l'absence d'innovation thérapeutique majeure depuis les années 80 et avec principalement la mise en place de traitements évitants et/ou limitants les défaillances d'organes. Le constat est qu'il est urgent de mettre à profit les nouvelles capacités d'analyses biologiques, cliniques, et surtout génétiques, transcriptomiques et protéomiques. Cela pourrait permettre de comprendre l'hétérogénéité de cette maladie et de redéfinir éventuellement des sous-classes permettant de mieux stratifier les patients pour une prise en charge thérapeutique plus personnalisée et beaucoup plus efficace.

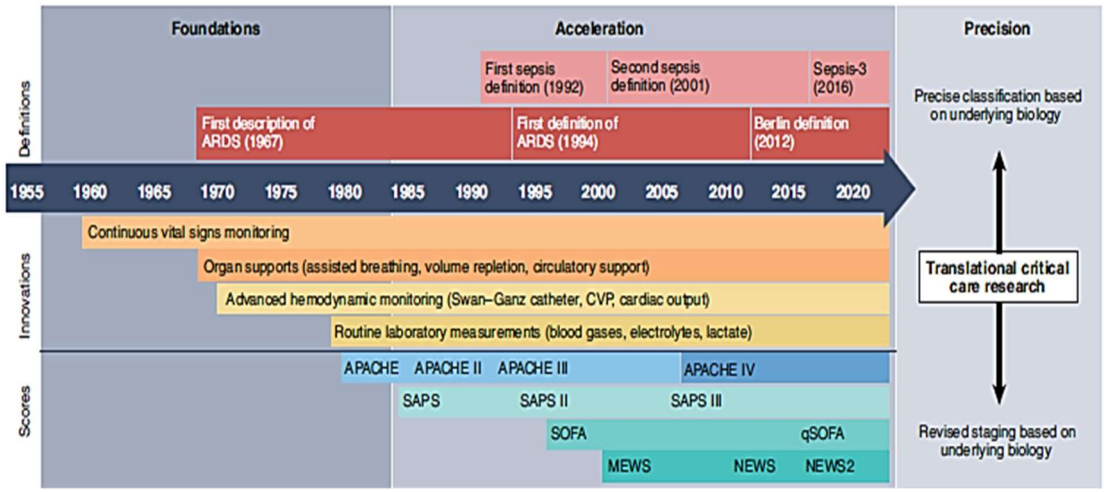


Figure 1 : Trois époques de la médecine de soins intensifs. *La première ère, Fondations, s'étend de la création de la discipline dans les années 1950 et 1960 jusqu'au milieu des années 1980. Dans la deuxième ère, Accélération, la maladie grave était mieux caractérisée par des définitions formelles de syndrome et des descriptions quantitatives de la gravité de la maladie. Les résultats se sont améliorés, bien que peu d'études cliniques aient donné de résultats exploitables. Une troisième ère, Précision, est en train d'émerger, basée sur un nombre croissant de découvertes translationnelles qui révèlent une hétérogénéité biologique dans les concepts actuels de maladies en soins intensifs. Analyser cette hétérogénéité pour identifier les mécanismes précis de la maladie ainsi que les moyens de les identifier cliniquement, conduira à des traitements plus précis et à une plus grande efficacité des soins. (D'après Maslove, 2022)*

Même si la définition du sepsis est amenée à évoluer encore pour améliorer la prise en charge et donc la survie des patients, ces changements de définition ont pour conséquence une grande difficulté à récolter les données déjà publiées. Les données, variables selon le pays ou la définition utilisée, sont à interpréter avec prudence.

B/ Aspects clinique du sepsis

Comme mentionné, la définition clinique actuelle est basée sur les défaillances d'organes observées chez les patients. Cependant d'un point de vue immunologique, le sepsis se caractérise par une 1ère phase hyper-inflammatoire rapide qui survient en réponse à l'introduction de l'agent pathogène dans l'organisme. Cette 1ère phase précoce est contrebalancée par des mécanismes immunosuppresseurs qui donnent lieu à une 2ème phase d'immuno-paralysie ou immunosuppression chez certains patients. Ces deux phases sont initiées de façon concomitante mais avec une dominance différente. Chez de nombreux patients survivants à la 1ère phase essentiellement hyper-inflammatoire (2-3 jours), cette 2ème phase d'immuno-paralysie dominante peut persister des mois ou parfois même des années, l'homéostasie immunitaire n'arrivant pas à se rétablir complètement (Venet, 2013). Cela peut conduire à la réactivation de virus latents (comme le Cytomégalovirus, Herpès Virus…) et ces patients se montrent plus susceptibles à des infections secondaires nosocomiales et/ou communautaires (Venet, 2018).

a) Les pathogènes du sepsis

Peu d'études répertorient les pathogènes spécifiquement liés à l'induction du sepsis chez l'homme. Cela s'explique par la définition relativement récente du sepsis

(2016) et de la composante multifactorielle de la maladie. Une étude de 2015 répertorie les sites d'infections les plus fréquents chez des patients septiques : les poumons, le tractus urinaire et l'abdomen (Tab. 1).

Site d'infection	Nombre de patients	%
Tractus respiratoire	297	42.8
Tractus urinaire	168	24.2
Tractus gastrointestinal supérieur	127	18.3
Peau / Tissu mou	65	9.4
Post opératoire	43	6.2
Intracrânien, tête et cou	21	3.0
Tractus gastrointestinal inferieur	17	2.4
Os / articulations	11	1.6
Endocardite	9	1.3
Dispositif implantable	8	1.2
Gynécologique / Infection sexuellement transmise	7	1.0
Autres	41	5.9

Tableau 1 : Les différentes localisations des foyers infectieux provoquant la septicémie *(n=694) ; les réponses peuvent être multiples, 16 « sans réponse ». Traduit du tableau 7.12, JustSaySepsis, 2015.*

Il est souvent difficile de retrouver le pathogène source primaire de la maladie. Il existe une étude rétrospective sur des données cliniques de 2015 (avant la nouvelle définition « sepsis 3 ») qui indique que sur 551 patients septiques, seulement 41 % ont pu voir leur pathogène identifié (JustSaySepsis, 2015). Cette même étude classe la fréquence des pathogènes identifiés (Fig. 2) : Escherichia coli (E. coli), Streptococcus et Staphylococcus sont les 3 pathogènes les plus fréquemment retrouvés dans respectivement 51, 39 et 29% des cas. Même s'il ne s'agit que d'une étude rétrospective sur questionnaire, ce type de résultats est rarement publié mais intéressant à analyser. E. coli et Streptococcus sont deux familles de bactéries commensales de l'homme pouvant devenir pathogènes hors de leur compartiment.

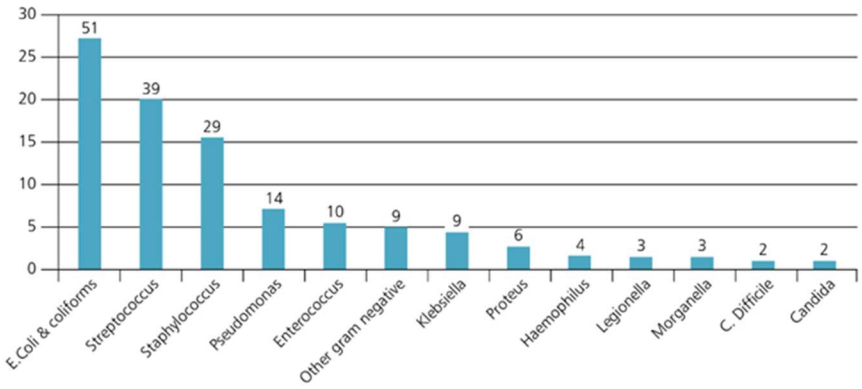


Figure 2 : Classement des 13 pathogènes identifiés chez les patients sepsis en % *(n=226). (JustSaySepsis, 2015).*

Le staphylococcus est une bactérie des muqueuses qui est responsable de maladies nosocomiales, suite notamment à des chirurgies. Il semblerait donc que les septicémies soient dues principalement à des pathogènes colonisant naturellement l'homme. Cette

observation est en accord avec le tableau 1 puisque deux des sites d'infections les plus fréquents sont le poumon et l'abdomen.

b) Symptômes et traitements

Dès l'arrivée des patients septiques aux soins intensifs, la prise en charge de la première phase inflammatoire aigue est cruciale pour la survie du patient. Selon l'hôpital prenant en charge le patient et le pays où celui-ci se trouve, entre 10 et 30% des patients (voire d'avantage) ne survivent pas à la première semaine. Le traitement classique est le suivant: antibiotiques (avant même la détermination du pathogène), amines vasopressives, transfusion de sang, réanimation volémique, corticostéroïdes, nutrition parentérale et un suivi des marqueurs biochimiques et sanguins de défaillance d'organe (Venet, 2018). Une fois la phase aigüe passée, les défaillances d'organes et les déséquilibres de la formule sanguine (Xu, 2022) (lymphopénie, dysfonction plaquettaire) peuvent encore provoquer le décès de 20 à 40% des patients admis pour ce diagnostic dans le premier mois. Chez certains patients en capacité de rentrer chez eux, il persiste une immunosuppression qui va les rendre plus fragiles aux infections à moyen ou long terme. Pour ces personnes-là, la mortalité cumulée à 3 ans varie de 50 à 70% (Fig. 3).

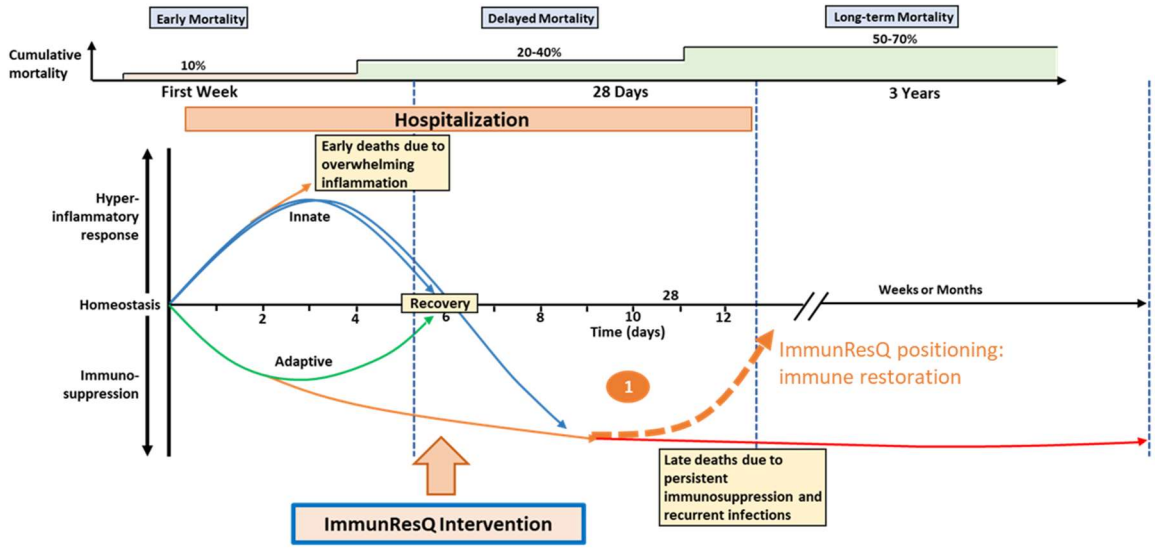


Figure 3 : Devenir des patients en choc septique de la première hospitalisation au taux de survie à 3 ans. *Des études récentes montrent que l'activation des réponses immunitaires à la fois pro- et anti-inflammatoires se produisent rapidement après le début de la septicémie. Le sepsis entraine une inflammation aigue (ligne bleue - jours 1 à 3). L'intensité de l'inflammation initiale varie d'un patient à l'autre, en fonction de plusieurs facteurs, y compris la nature du pathogène, sa charge et sa virulence, ainsi que les facteurs génétiques et les comorbidités du patient. Les décès précoces dans la septicémie (ligne orange supérieure - jour 3) sont généralement dues à une réponse hyper-inflammatoire incontrôlable. Puis les patients retrouvent leur immunité innée et adaptative et survivent à l'infection (récupération – jour 6). Si la septicémie persiste, il y a mise en place d'un échec chronique du système immunitaire à la fois inné et adaptatif. Les patients entrent alors dans un état immunosuppresseur profond (lignes bleue et rouge – après le jour 6). Les décès sont dus à une incapacité du patient à éliminer les infections et le développement d'infections secondaires. Figure inspirée des références (Hotchkiss, 2013 et Venet, 2018).*

c) Le Score SOFA

Les patients septiques présentent fréquemment de la fièvre, un état de choc et une insuffisance respiratoire à la suite de la réponse pro-inflammatoire exacerbée. Les premières définitions de gravité étaient axées sur le Syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) du patient. Mais ce critère trop tardif était controversé et à la suite de la redéfinition du sepsis, un nouveau score de gravité a été mis en place : le score d'évaluation de la défaillance organique ou SOFA (en anglais Sequential Organ Failure Assessment) (Singer, 2016). Différents marqueurs de défaillance d'organe, cliniques, hématologiques et biochimiques permettent d'évaluer, classifier l'état du patient et donc adapter et standardiser le traitement (Tab. 2). On parle de défaillance d'organe lorsque le SOFA est supérieur ou égal à 2.

SOFA Score		**1**	**2**	**3**	**4**
Respiration	PaO2/FiO2 mm Hg with respiratory support	<400	<300	<200	<100
Coagulation	Plaquettes $x10^3/mm^3$	<150	<100	<50	<20
Hépatique	Bilirubine mg/dL	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Système nerveux central	Score de Glasgow	13-14	10-12	6-9	<6
Renal	Créatinine mg/dL ou debit urinaire	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 <500mL/jour	>5.0 <200mL/jour

Tableau 2 : Score SOFA. *La septicémie est définie comme un dysfonctionnement organique menaçant le pronostic vital causé par une réponse dérégulée de l'hôte à l'infection. Le dysfonctionnement d'organe peut être identifié par un changement brutal du score SOFA suite à une infection. SOFA : Séquential Organe Failure Assessment (en français : Évaluation séquentielle de l'insuffisance organique).(Tableau traduit de la référence Singer, 2016).*

d) Mortalité et conséquences sanitaires à long terme

Le sepsis représente un problème de santé majeur dans le monde. Aux Etats-Unis en 2009, le taux d'incidence brute de la septicémie dite « sévère » selon la définition en vigueur à cette date, était de 4,1% des admissions des services médicaux d'urgence (SMU). Ce taux est supérieur à celui de l'infarctus aigu du myocarde ou de l'accident vasculaire cérébral (AVC) (1,8% et 1,7% respectivement) (Seymour, 2012-Fig. 4). Chaque année, la moitié des patients atteints de sepsis se rétablissent, un tiers décèdent au cours de l'année suivante et un sixième ont des déficiences persistantes sévères (Prescott, 2018). Ces déficiences, telles que l'incapacité de se laver ou de s'habiller de manière indépendante, l'anxiété et la dépression, conduisent environ 40 % des patients à être réhospitalisés dans les 90 jours suivant leur sortie. Les raisons de la détérioration de la santé après une septicémie sont multifactorielles et comprennent la progression accélérée de maladies

chroniques préexistantes, des lésions organiques résiduelles et une altération de la fonction immunitaire.

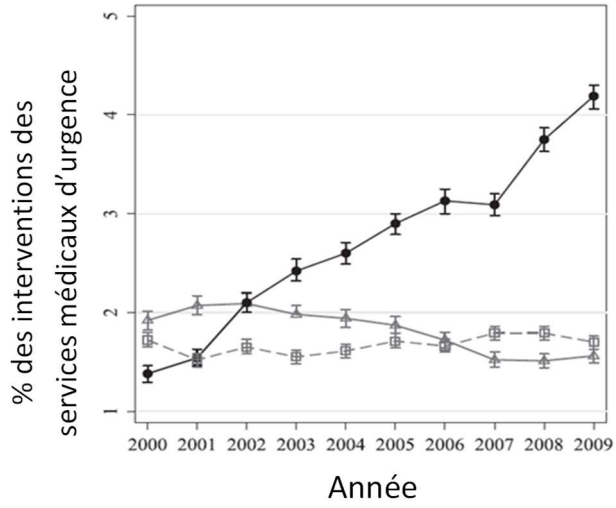


Figure 4 : Évolution des taux d'hospitalisations pour septicémie parmi les interventions des services médicaux d'urgence *(SMU). Ajusté pour l'âge, le sexe et l'hôpital d'accueil en comparaison avec l'infarctus aigu du myocarde (IAM) et l'AVC. Les barres d'erreur représentent les Intervalles de confiance à 95 % (Seymour, 2012). Cercles pleins, septicémie sévère ; triangles gris, IAM ; carrés gris, AVC.*

Il existe ainsi de nombreuses évolutions cliniques potentielles qu'un patient peut subir après une hospitalisation pour septicémie, allant d'une récupération complète et rapide à des complications récurrentes et au décès. La figure 5 inspirée de celle publiée par l'équipe du Pr Prescott (Prescott, 2018) illustre des exemples de trajectoires cliniques courantes d'un patient hospitalisé pour septicémie. Cette figure s'inspire du modèle conceptuel général de la santé de Wilson et Cleary (Seymour, 2012, Wilson, 1995) qui relie les mesures biologiques objectives aux conséquences subjectives de la maladie telles qu'elles sont perçues par les patients. Ce modèle très intéressant tente d'illustrer les interactions complexes et non mesurables entre 5 domaines de santé : état biophysiologique, symptômes, état fonctionnel, perception générale de la santé et qualité de vie.

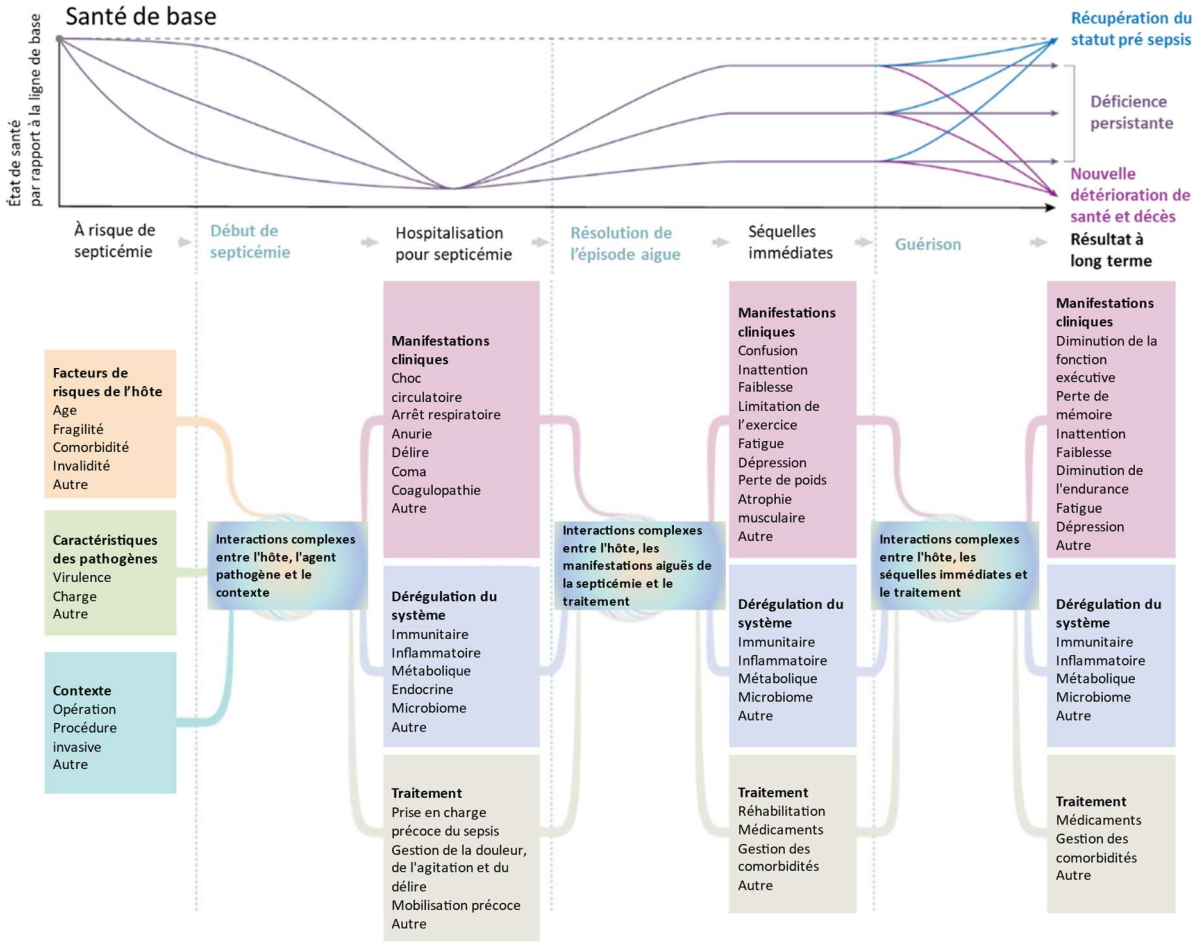


Figure 5 : Modèle d'évolution clinique d'un patient septique. *Un modèle conceptuel illustrant l'imbrication de différents facteurs et leurs interactions déterminant l'évolution clinique d'un patient et les conséquences à long terme d'une septicémie. Inspiré du modèle de Wilson-Cleary (Prescott, 2018).*

e) Conséquences économiques

L'incidence croissante de cas documentés de septicémie a été attribuée d'une part aux changements démographiques, à l'augmentation du nombre de patients présentant des comorbidités (cancer, diabète, maladies inflammatoires chroniques) ou âgés au moment des soins (chirurgies plus risquées) et d'autre part à l'accroissement du nombre de traitements avec des médicaments ou des dispositifs médicaux invasifs pouvant affaiblir la réponse immunitaire. L'amélioration de la définition et des déclarations de cas de septicémie ont également été mentionnés comme une cause possible (Fleischmann, 2016). Plus inquiétant, l'incidence augmente de manière exponentielle avec l'âge (WHO, 2020) et les Nations Unies prévoient que la population humaine mondiale âgée de plus de 60 ans va tripler au cours des prochaines décennies et dépassera la taille de la population mondiale des jeunes d'ici 2050. Les coûts liés à cette maladie se calculeront donc en dizaines de milliards de dollars. Selon les Centres pour la Prévention et le Contrôle des Maladies, plus de 22 milliards de dollars sont dépensés chaque année en hospitalisations

pour septicémie aux États-Unis, ce qui représente la cause d'hospitalisation la plus coûteuse dans ce pays devant l'arthrose et l'insuffisance cardiaque (Torio, 2013-Tab. 3).

La Septicémie coutera donc très cher en vies humaines et en coût de santé publique au cours du 21ème siècle.

Rang	Pathologies regroupées par catégorie CCSR par défaut	Coûts hospitaliers totaux, $, millions	Coûts hospitaliers totaux, %	Nombre de séjours à l'hôpital, en milliers	Séjours hospitaliers, %
1	Septicemie	22 795	11,2	1 291	8,9
2	Arthrose	11 290	5,5	713	4,9
3	Insuffisance cardiaque	9 397	4,6	806	5,6
4	Infarctus aigu du myocarde	8 007	3,9	381	2,6
5	Spondylopathies/spondylarthropathies (y compris infectieuses)	5 791	2,8	250	1,7
6	Insuffisance respiratoire chronique	5 182	2,5	334	2,3
7	Athérosclérose coronarienne et autres maladies cardiaques	5 066	2,5	217	1,5
8	Maladie pulmonaire obstructive chronique	4 981	2,4	537	3,7
9	Troubles du rythme cardiaque	4 764	2,3	417	2,9
10	Infarctus cérébral	4 607	2,3	344	2,4
11	Fracture du col du fémur (hanche), première hospitalisation	4 530	2,2	267	1,8
12	Troubles valvulaires non rhumatismaux et non précisés	4 017	2,0	92	0,6
13	Pneumonie (sauf celle causée par la tuberculose)	3 922	1,9	383	2,6
14	Diabète sucré avec complication	3 637	1,8	280	1,9
15	Insuffisance rénale aiguë et sans précision	3 480	1,7	373	2,6
16	Complication d'un dispositif cardiovasculaire, d'un implant ou d'une greffe, première hospitalisation	2 774	1,4	111	0,8
17	Complication d'autres soins chirurgicaux ou médicaux, blessure, première hospitalisation	2 658	1,3	151	1,0
18	Infections des voies urinaires	2 560	1,3	345	2,4
19	Hémorragie gastro-intestinale	2 477	1,2	230	1,6
20	Complication d'un appareil orthopédique interne ou d'un implant, première hospitalisation	2 369	1,2	111	0,8
	Total pour les 20 principales pathologies	**114 305**	**56,2**	**7 632**	**52,6**
	Total pour tous les séjours	**203 533**	**100,0**	**14 514**	**100,0**

Tableau 3 : Les 20 pathologies les plus couteuses en 2017 *pour les séjours payés par le Medicare, Medicaid, une assurance privée, ou autofinancées aux Etat-Unis (Torio, 2013). Clinical Classifications Software Refined (CCSR).*

A ce jour, aucune intervention thérapeutique ciblant spécifiquement la réponse de l'hôte n'a été approuvée par les autorités de santé et le sepsis reste la première cause de mortalité dans les unités de soins intensifs (Hotchkiss, 2016, van der Poll, 2017).

2) Immunologie et physiopathologie du sepsis : la phase d'hyper-inflammation

Des avancées majeures ont été faites dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis. Malgré ces progrès, l'échec thérapeutique et la mortalité sont encore très élevés. Ces échecs sont dus, en partie, au fait que durant des années, la première phase d'hyper inflammation a été considérée comme la cible à privilégier pour combattre la maladie. On sait maintenant que la réponse immunitaire de l'hôte est perturbée de manière complexe et profonde et qu'elle est en incapacité à revenir à son état initial d'homéostasie chez les patients qui décèdent de cette pathologie (Torres, 2021).

A/ La réponse immunitaire exacerbée

La forte activation du système immunitaire inné est induite par la présence du pathogène via des récepteurs sensibles à des composants de ces derniers. Ces composants protéiques ou lipidiques ont des motifs moléculaires ou PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) qui vont activer des récepteurs spécifiques sur les cellules immunitaires. Ces récepteurs, appelés PRR (Pattern Recognition Receptor) vont induire dans ces cellules de l'immunité innée la translocation du facteur nucléaire- κB (NF- κB) dans le noyau et l'activation des gènes cibles, en particulier ceux codants pour les cytokines induisant l'inflammation. Les cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la pathogenèse du sepsis les plus représentatives sont : le facteur de nécrose tumorale (TNF α), l'interleukine 1β (IL-1β), l'IL-12, l'IL-6 et l'IL-18 (Wiersinga, 2014). La mortalité précoce dans la septicémie survient généralement à la suite d'un collapsus cardiovasculaire et un dysfonctionnement multi-organes aigu dû à des réactions inflammatoires excessives. Les réponses inflammatoires caractéristiques dans le sepsis comprennent l'activation par le facteur tissulaire de l'endothélium vasculaire, de la protéine C, du système du complément, du système de coagulation, dont les fonctions sont étroitement interconnectées et régulées de manière croisée.

B/ Le facteur tissulaire

Le sepsis se traduit également par un état pro coagulant, ce qui favorise le dépôt de fibrine dans les micro-vaisseaux via au moins trois voies (fig. 6) : le facteur tissulaire, le dysfonctionnement des mécanismes anticoagulants endogènes et l'altération de l'élimination de la fibrine en raison de la suppression du système fibrinolytique (van der Poll, 2017).

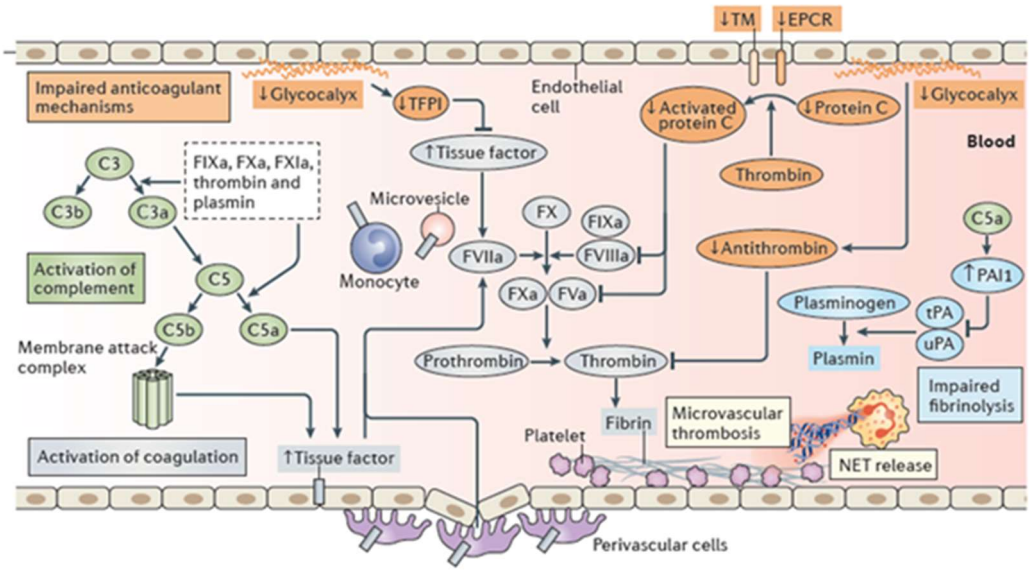


Figure 6 : Activation des systèmes de coagulation et du complément au cours du sepsis. *Le sepsis se traduit par un état pro coagulant qui favorise le dépôt de fibrine dans les micro-vaisseaux via au moins trois mécanismes : le facteur tissulaire producteur de thrombine (gris), le dysfonctionnement des mécanismes anticoagulants endogènes (orange) et l'altération de l'élimination de la fibrine en raison de la suppression du système fibrinolytique (bleu). La coagulation et la fibrinolyse interagissent étroitement avec le système du complément (vert) (van der Poll, 2017).*

La coagulation et la fibrinolyse interagissent étroitement avec le système du complément. Le facteur tissulaire est un récepteur transmembranaire qui stimule l'activation de la coagulation après l'infection (Levi, 2017). Pour cela le facteur tissulaire se lie et active le facteur VII (FVII), après quoi une cascade de réactions protéolytiques entraîne la formation du facteur Xa, de thrombine et de fibrine (Nieman, 2016). Les cellules périvasculaires (telles que les fibroblastes, les péricytes et les cellules épithéliales) expriment le facteur tissulaire préservant ainsi l'hémostase et l'intégrité des vaisseaux.

La septicémie s'accompagne de lésions vasculaires induites par l'inflammation, ce qui expose donc le facteur tissulaire aux facteurs de coagulation sanguine, entraînant la formation de caillots et microcaillots. Les cellules qui sont en contact étroit avec le sang, telles que les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les monocytes, n'expriment pas de grandes quantités de facteur tissulaire lorsqu'elles sont en situation physiologique, mais elles peuvent en exprimer davantage en cas d'infection bactérienne (Pawlinski, 2010).

Le risque de thrombose pendant la septicémie est aussi augmenté par l'inhibition des trois principales voies anticoagulantes contrôlées par : l'antithrombine, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et le système de la protéine C (Fig. 6). L'antithrombine est le principal inhibiteur de la thrombine et du FXa, alors que le TFPI est le principal inhibiteur du complexe « facteur tissulaire-FVIIa ». Les propriétés anticoagulantes sus citées sont de plus soutenues par le glycocalyx, une couche de glycoprotéine-polysaccharide qui recouvre l'endothélium (Levi, 2017).

C/ La (dys)fonction endothéliale

La perturbation de l'intégrité de la barrière endothéliale est un phénomène clé dans la pathogenèse du sepsis. Dans des conditions homéostatiques, la fonction de la barrière endothéliale est maintenue par le cytosquelette cellulaire, le glycocalyx, les molécules d'adhérence intercellulaire et d'autres protéines de jonction. Au cours de la maladie, l'intégrité du glycocalyx endothélial est compromise, ce qui augmente la perméabilité de celle-ci et altère la fonction de l'antithrombine et du TFPI. Le terme d'immunothrombose a été introduit pour indiquer la codépendance de la coagulation et de l'immunité innée (Engelmann, 2012).

Les connexions cellule-cellule sont maintenues par des jonctions adhérentes, impliquant la cadhérine endothéliale vasculaire (VE cadhérine) et des jonctions serrées. En réponse à une infection localisée, les leucocytes et les plaquettes adhèrent à la surface de l'endothélium et migrent vers les foyers infectieux (Levi, 2017). Dans le sepsis, une inflammation exacerbée augmente ces processus, ce qui compromet la compétence de la barrière endothéliale. Une perte d'intégrité de la barrière provoque la fuite de protéines intravasculaires et de plasma dans l'espace extravasculaire entrainant un œdème tissulaire et une perfusion microvasculaire réduite.

D/ La protéine C activée

Le processus de coagulation met en jeu des protéines circulantes inactives qui acquièrent successivement une activité catalytique de type sérine protéase. La protéine C activée est un anticoagulant physiologique généré à partir de la protéine C présente à la surface des cellules endothéliales au repos (Danese, 2010). Au cours de la septicémie, le système de la protéine C est altéré en raison de multiples facteurs, notamment la diminution de la synthèse de protéine C par le foie (Borgel, 2011).

E/ Le complément

Des interactions multiples existent entre les systèmes de coagulation et du complément. Les protéases de la coagulation peuvent activer le système du complément, et inversement (Merle, 2015). Par exemple, FIXa, FXa et FXIa, ainsi que la thrombine et la plasmine, peuvent convertir C3 et C5 en C3a et C5a, respectivement. C5a et le complexe d'attaque membranaire (qui est composé de C5b, C6, C7, C8 et C9) peuvent stimuler l'expression du facteur tissulaire sur les cellules endothéliales (Guo, 2005). C5a peut faciliter la libération d'un protéoglycane de la surface des cellules endothéliales, perturbant ainsi la fonction normale du glycocalyx. L'inflammation vasculaire et la coagulation sont augmentées par la libération de Nétose (en anglais : Neutrophil extracellular traps (NET)) par les neutrophiles. C'est un processus cellulaire immunitaire impliquant les cellules polynucléaires neutrophiles, et qui libère des fibres composées d'ADN et de protéines, et dont la fonction est de piéger des micro-organismes pathogènes (Papayannopoulos, 2018).

L'activation du complément entraîne la libération de petits fragments d'activation connus sous le nom d'anaphylatoxines, en particulier C3a et C5a, qui ont de puissants effets pro-inflammatoires, notamment sur le recrutement et l'activation des leucocytes, des cellules endothéliales et des plaquettes. Bien que l'activation du complément soit une composante essentielle de l'immunité protectrice, l'activation incontrôlée du complément peut causer des dommages aux tissus et une défaillance des organes (Guo, 2005).

F/ Le rôle des plaquettes

La prévention des hémorragies et le maintien de l'intégrité vasculaire sont médiés par les plaquettes qui adhèrent et s'agrègent aux sites de lésion vasculaire et par l'activation du système de coagulation. Une faible numération plaquettaire est indépendamment associée à la mortalité chez les patients atteints de septicémie (Claushuis, 2016). L'hyperactivation des plaquettes a été impliquée dans les lésions organiques au cours de la septicémie par plusieurs mécanismes, notamment l'augmentation du recrutement des cellules immunitaires et de l'inflammation, la facilitation de la formation de thrombus vaso-occlusifs dans les capillaires sanguins et les effets toxiques cellulaires directs médiés par les microparticules dérivées des plaquettes (Shannon, 2020). Bien que plusieurs agents antiplaquettaires améliorent la survie dans des modèles animaux de septicémie, l'effet des inhibiteurs de la fonction plaquettaire dans la septicémie humaine n'a pas été étudié dans des essais cliniques randomisés.

La forte activation du système de coagulation peut entraîner une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) chez les patients septiques, provoquant des thromboses microvasculaires et des hémorragies dues à la consommation de facteurs de coagulation et de plaquettes (Levi, 2017).

3) Immunosupression dans le sepsis

Il y a deux causes de décès bien distinctes dans le sepsis, liées aux deux composantes de la maladie : les décès rapides des patients atteints de septicémie sont généralement liés à une réponse hyper-inflammatoire dite « tempête cytokinique » décrite précédemment et les décès à moyen ou long terme concernent alors des patients qui n'ont pas pu revenir à leur état d'homéostasie immunitaire initial (Munford, 2001). Cette phase d'immunosuppression jouerait un rôle important dans la mortalité (Boomer, 2011).

A/ Apoptose et immunosuppression

L'apoptose est une réaction irréversible de mort cellulaire programmée par laquelle le système immunitaire maintient l'homéostasie en éliminant les cellules activées après la résolution normale de l'infection/inflammation (Hotchkiss, 1999). Lors de la réponse hyper-inflammatoire du sepsis, le facteur nucléaire-kappa B (NF-κB) est impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires et également dans l'activation du

clivage des caspases. Lors de l'apoptose, les caspases interviennent dans la mort cellulaire en dégradant les protéines cellulaires. NF-κB et les caspases vont donc simultanément induire l'apoptose des cellules immunitaires.

Il a été démontré qu'une réponse apoptotique est mise en place dans la septicémie en association avec la réponse pro-inflammatoire (Unsinger, 2009). Bien que la suppression des cellules immunitaires adaptatives soit connue comme un élément important de la physiopathologie du sepsis, les mécanismes responsables de celle-ci ne sont pas entièrement compris (Hotchkiss, 2009). L'apoptose provoque une forte diminution des cellules de l'immunité, y compris les cellules tueuses naturelles (NK), les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (DC), dans divers organes de patients qui vont décéder de septicémie (Liu, 2008 - Hotchkiss, 2000). La perte de tissus intraépithéliaux intestinaux et les lymphocytes de la lamina propria pourraient également faciliter la translocation bactérienne dans la circulation systémique, perpétuant ainsi la réponse inflammatoire systémique et prédisposant aux infections. Les effets néfastes de l'apoptose ne sont pas seulement associés à la perte sévère de cellules immunitaires, mais aussi à l'effet que l'absorption des cellules apoptotiques par les cellules immunitaires survivantes (Voll, 1997). En effet, l'absorption par les monocytes, les macrophages et les DC des corps apoptotiques issus des cellules lysées provoque une tolérance immunitaire en induisant une anergie et donc une défaillance de réponse immunitaire appropriée lors d'une infection secondaire.

B/ Monocytes et macrophages

Les patients atteints de septicémie ont des monocytes présentant une capacité réduite à libérer des cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS (lipopolysaccharide) (Tsujimoto, 2004). Cette découverte est cohérente avec le phénomène de tolérance au LPS déjà connu. Les monocytes de patients atteints de septicémie montrent une diminution de la capacité à libérer des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α, l'IL-1β, l'IL-6 et l'IL-12, alors que leur capacité à libérer des médiateurs anti-inflammatoires, tels que l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 ou l'IL- 10, est soit intacte, soit améliorée (Biswas, 2009, Fig. 8).

Dans les études cliniques, l'ampleur et la persistance de cet état d'immuno-paralysie sont associées à une mortalité augmentée. Les deux conséquences majeures de la tolérance au LPS sur les monocytes sont : une augmentation de la libération de médiateurs immunosuppresseurs, tels que l'IL-10, et une diminution de la présentation antigénique en raison de l'expression réduite de l'antigène leucocytaire humain (HLA)-DR à leur surface (Monneret, 2004, Hynninen, 2003).

La diminution de l'expression monocytaire de HLA-DR (mHLA-DR) représente un marqueur fiable de l'altération monocytaire et de l'immunoparalysie, permettant

d'évaluer l'état général fonctionnel du système immunitaire. Les résultats sont exprimés en nombre d'anticorps (Ac) anti-HLA-DR liés par monocytes (Ac/C).

Sur une étude rétrospective (Fig. 7, Venet, 2013), les patients ont été stratifiés *a posteriori* en fonction de l'expression du mHLA-DR mesurée à J3-5 après la déclaration du sepsis en fixant le seuil de mHLA-DR à 8 000 Ac/C (Meisel, 2009). Seuls 8 décès sont survenus avant le 4ème jour et 92 patients ont pu être stratifiés. La diminution du mHLA-DR est observé chez 55 patients. Dans ce sous-groupe, il y a eu 22 décès (soit 65 % de la mortalité totale) contre seulement 4 décès sur 37 patients dans l'autre groupe (10% de mortalité).

La diminution du mHLA-DR, serait donc associée à un mauvais pronostic dans la septicémie. Il faut cependant rester prudents quant aux conclusions des études rétrospectives qui, dans cet exemple, ne comptent qu'une centaine de patients. De plus, la libération continue d'IL-10 pourrait contribuer au maintien de l'immunosuppression induite par le sepsis et donc augmenter la sensibilité aux infections microbiennes secondaires (Oberholzer, 2002).

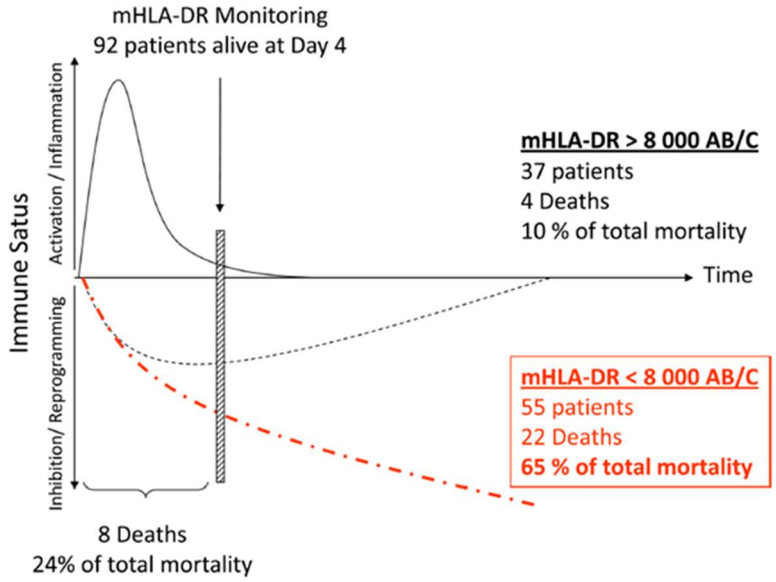


Figure 7 : Stratification rétrospective des patients en choc septique basée sur le mHLA-DR. *Etude rétrospective. Cent patients en choc septique ont été inclus et suivis pour l'expression de l'Human Leukocyte Antigen-DR (mHLA-DR) sur les monocytes circulants (Landelle, 2010, Monneret, 2006). Les résultats sont exprimés en nombre d'anti-HLA-DR anticorps liés par monocytes (Ac/C ou AB/C en anglais). Les patients sont stratifiés en fonction du mHLA-DR mesuré à J3-5 (seuil mHLA-DR = 8 000 Ac/C). La mortalité à 28 jours est de 34 % (c'est-à-dire n = 34 non-survivants au total). Quatre-vingt-douze patients ont pu être stratifiés après J4. La diminution du mHLA-DR est observé chez 55 patients. Dans ce sous-groupe, 22 décès surviennent (soit 65 % de la mortalité totale). Cette cohorte virtuelle basée sur des observations réelles illustre qu'un mHLA-DR diminué augmenterait le risque de décès. Référence de la figure : Venet, 2013.*

C/ Cellules tueuses naturelles

Les cellules naturelles tueuses (NK) sont les principales productrices d'IFN-γ au cours de l'infection bactérienne (Seki, 1998). Ces cellules produisent une grande quantité

d'IFN-γ lorsqu'elles sont stimulées par IL-12 ou IL-18, produites par les monocytes activés lors du sepsis, notamment par le LPS. L'IFN-γ est le principal activateur des macrophages au cours du sepsis.

Une production *ex vivo* altérée d'IFN-γ en réponse au lipopolysaccharide (LPS) a été rapportée dans les cellules NK provenant de patients atteints de septicémie. D'autres études ont indiqué que la septicémie diminue nettement le nombre de cellules NK circulantes chez les patients. Un faible nombre de cellules NK est associé dans ce contexte à augmentation de la mortalité (Hiraki, 2007). De plus, une diminution de la fonction cytotoxique des cellules NK et la sécrétion de cytokines se produit pendant la septicémie.

Les cellules NK étant essentielles lors des infections, une diminution de leur nombre et de leur fonction au cours du sepsis serait un facteur important dans la survenue de surinfections.

D/ Lymphocytes T

Dans le sepsis, la dysfonction lymphopénique est principalement due à deux phénomènes bien distincts : la diminution du nombre de lymphocytes : la lymphopénie, et l'altération de leurs fonctionnalités : l'épuisement fonctionnel lymphocytaire.

a) Lymphopénie

Une lymphopénie sévère est décrite après un choc septique (Castelino, 1997). Toutes les populations lymphocytaires sont affectées, à l'exception des lymphocytes T régulateurs (Treg) (Venet, 2010). L'amplitude de la lymphopénie est corrélée à la survenue d'infections nosocomiales et/ou à la mortalité (Inoue, 2013). De plus, un état lymphopénique prolongé peut amener à des complications secondaires tardives. Cette lymphopénie est principalement due à des processus apoptotiques (Hotchkiss, 2003).

Les lymphocytes T CD4+helper (Th) sont schématiquement classés en trois sous-populations : Th1, Th2 et Th17 en fonction de leur profil cytokinique. Elles sont toutes les trois touchées par ce phénomène d'apoptose (Monneret, 2008). Les cellules Th17 jouant un rôle important dans la lutte contre les infections bactériennes et les candidoses, leur disfonctionnement participerait à l'augmentation du risque d'infection nosocomiale par exemple.

b) L'épuisement fonctionnel des lymphocytes T

Le phénomène d'épuisement fonctionnel des lymphocytes correspond à une perte progressive de leurs fonctions sécrétrices : baisse et/ou perte de la production de cytokines (IL-2, TNF-α, IFN-γ), diminution de la prolifération lymphocytaire, perte des propriétés de cytotoxicité, et enfin, apoptose. Ce phénomène s'explique par deux mécanismes : une augmentation des cytokines immunosuppressives et des molécules de co-régulation telles que PD-1 (Programmed cell death 1), CTLA-4 (Cytotoxique-T-

Lymphocyte- Antigen 4 protein), LAG-3 (Background Lymphocyte-activation gene 3) ou TIM (T-cell immunoglobulin and mucin domain) (Boomer, 2011). Les taux sériques d'IFN-γ et la production d'IFN-γ par les PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) sont significativement diminués chez les patients atteints de septicémie dans des études les comparant à des volontaires sains (Hiraki, 2007 - Ikuta, 2003). Les molécules de la famille PD-1 sont associées à la survenue d'infections nosocomiales, ainsi qu'à la diminution de la prolifération lymphocytaire après un choc septique (Guignant, 2011).

La prolifération lymphocytaire mesurée *ex vivo* est très diminuée après un choc septique, quels que soient les inducteurs utilisés : anticorps anti-CD3/CD28, PHA (phytohemagglutinin), PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), et ConA (concanavaline A) (Monneret, 2008).

c) Lymphocyte T régulateurs (Treg)

La suppression médiée par les lymphocytes T CD4+ semble résulter de la fonction d'un petit sous-ensemble de lymphocytes T qui expriment CD4+CD25+ (Sakaguchi, 1995). Ces lymphocytes T CD4 + CD25 + agiraient sur les lymphocytes T par un mécanisme de contact cellulaire impliquant des antigènes des lymphocytes T cytotoxiques et on pense également qu'ils produisent de l'IL-10 et le facteur de croissance TGF-β, et inhibent la production d'IFN-γ (Sakaguchi, 2006). Par la suite, la protéine Forkhead box 3 (Foxp3) s'est avérée exprimée dans les lymphocytes T CD4+CD25+, et ces cellules ont ensuite été appelées cellules Treg. Chez les patients septiques, le pourcentage de cellules Treg circulantes est nettement augmenté, ce qui contribue vraisemblablement à la survenue de l'immunosuppression induite par le sepsis (Monneret, 2003). Cette augmentation du pourcentage de Treg a été observée dès le début du sepsis mais, élément important, a persisté seulement chez les patients décédés par la suite (Monneret, 2003).

Des données cliniques indiquent que l'IL-10 peut contribuer à l'augmentation du pourcentage des cellules Treg parmi la population de lymphocytes T CD4+, contribuant ainsi à l'état immunosuppresseur associé à la septicémie (Ono, 2013). Ces résultats indiquent que cette augmentation relative est probablement causée par une diminution du nombre de lymphocytes T effecteurs. Des études récentes ont indiqué que l'augmentation du nombre de cellules Treg est délétère dans le sepsis et est associée avec une diminution de la prolifération et de la fonction des lymphocytes T effecteurs (Venet, 2009).

Les cellules Treg peuvent également éliminer les cellules de l'immunité innée en inhibant à la fois la fonction des monocytes et des neutrophiles (Venet, 2006). Les cellules Treg, en agissant à la fois sur l'inné et l'adaptatif, altèrent l'immunité et contribuent à la mortalité lors du sepsis.

L'ensemble de ces processus observés chez le patient après un choc septique explique en partie l'impossibilité du retour à l'homéostasie immunitaire pour le malade.

C’est en partie sur ce versant de l’immunosuppression que notre équipe tente d’intervenir par le traitement avec notre candidat.

En conclusion, (fig. 8) l'apoptose provoque la suppression marquée des cellules immunitaires, y compris les cellules tueuses naturelles (NK), les lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+ et lymphocytes B, dans divers organes des patients septiques, entraînant une immunosuppression souvent mortelle à moyen ou long terme. La diminution de l’expression de l'antigène leucocytaire humain (HLA)-DR sur les cellules présentatrices d'antigène, y compris les monocytes et les macrophages, est une caractéristique de la septicémie, ce qui peut nuire à une présentation des antigènes microbiens aux lymphocytes T.

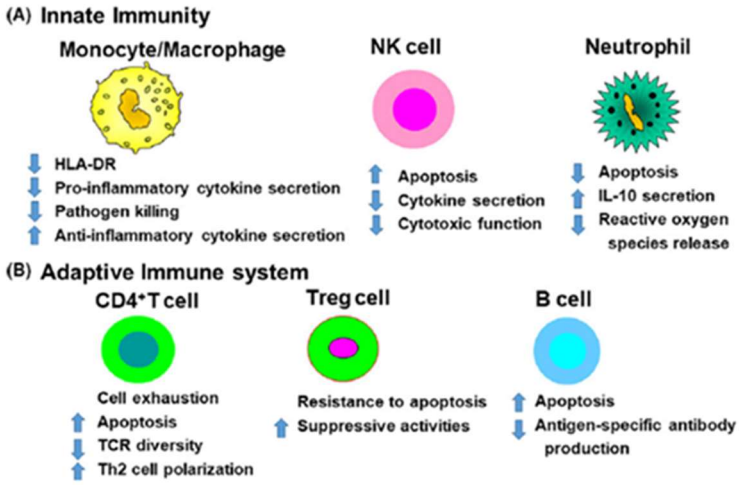


Figure 8 : Illustration synthétique de l’immunosuppression du système immunitaire inné et adaptatif induite par la septicémie *(Ono, 2018).*

4) Thérapies immunostimulatrices dans le sepsis

Les patients atteints de septicémie ont une phase d’hyper-inflammation relativement courte. Aucune thérapie anti-inflammatoire n’a pour le moment réellement démontré une efficacité et un bénéfice pour les patients. Les efforts pour améliorer les résultats des thérapies en ciblant les cytokines et les médiateurs, tels que les antagonistes du TNFα et de l'IL-1β, les antagonistes des endotoxines (LPS), les bloqueurs des récepteurs de type Toll (TLR) et les inhibiteurs du facteur d'activation plaquettaire, ont échoué (Hotchkiss, 2010).

La description de la phase d’immunosuppression dans le sepsis offre donc une nouvelle compréhension de la maladie, ainsi qu'une nouvelle fenêtre thérapeutique prometteuse.

A/ Les facteurs GM-CSF / G-CSF

Les chercheurs ont tenté de stimuler les systèmes immunitaires innés avec l'IFN-γ, les facteurs de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (Granulocyte-Macrophages simulation factor : GM-CSF), ou facteur de stimulation des colonies de granulocyte (G-CSF). Bien qu'il soit possible que la thérapie immunostimulatrice exacerbe la phase hyper-inflammatoire du sepsis, les essais cliniques avec l'IFN-γ, un puissant immunostimulant, et le GM-CSF chez les patients atteints de diverses maladies inflammatoires systémiques n'ont pas suscité de réactions inflammatoires exacerbées. La plupart des patients atteints de septicémie étant sévèrement immunodéprimés, le traitement avec le GM-CSF a été testé pour reverser le dysfonctionnement des cellules dendritiques et des monocytes/macrophages (Flohe, 2008). Le G-CSF a été utilisé pour augmenter le nombre des leucocytes polymorphonucléaires dans le but d'améliorer la régulation de l'agent pathogène. Cependant, une méta-analyse réalisée sur le GM-CSF et les études sur le G-CSF n'ont pas montré de bénéfice en termes de survie (Bo, 2011).

B/ IL-7 / IL-15

En plus du GM-CSF, du G-CSF et de l'IFN-γ, d'autres thérapies immunoadjuvantes, telles que l'IL-7 et l'IL-15, peuvent être efficaces pour augmenter le système immunitaire adaptatif et restaurer l'immunité. L'apoptose des lymphocytes dans le sepsis est l'une des cibles thérapeutiques privilégiées. Pour prévenir l'apoptose induite des cellules immunitaires effectrices chez les patients atteints de sepsis, une stratégie potentielle est l'utilisation d'immunostimulants anti-apoptotiques, telles que l'IL-7 et l'IL-15. Les deux cytokines ont montré une efficacité dans les modèles de septicémie. Il a été rapporté que le traitement à l'IL-15 augmente la survie des lymphocytes, diminue l'apoptose des cellules NK, des cellules dendritiques et des lymphocytes T, et induit une augmentation de la sécrétion d'IFN-γ (Inoue, 2010). L'IL-7 est considérée comme une cytokine ciblant les lymphocytes T. C'est une cytokine multifonctionnelle du système immunitaire qui interagit à la fois avec les lymphocytes T et les lymphocytes B et induit la prolifération des lymphocytes T naïfs et mémoire (Fry, 2005). Le traitement par IL-7 de lymphocytes isolés de patients septiques restaure la prolifération des lymphocytes T et leur fonctionnalité, comme la sécrétion d'IFN-γ (Venet, 2012). Le traitement par la protéine IL-7 soluble a été testé pour restaurer l'immunité adaptative des patients sepsis (François, 2018). Ces essais cliniques de phase 1 et 2 ont montré un bon profil d'innocuité et des signes d'activité immunitaire : la restauration de l'expression du mHLA-DR et une augmentation du nombre de lymphocytes.

C/ Anti-PD-1 / anti-PD-L1

Une étude récente a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui entrainent l'immunodépression post hyper inflammation dans le sepsis. Une protéine semble importante, le PD-1. PD-1, est une molécule de costimulation négative exprimée

sur les cellules immunitaires effectrices. Par exemple : au cours de l'infection chronique par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), elle est régulée positivement par son ligand apparenté : PD-L1. PD-1 affaiblit l'immunité en induisant l'apoptose, en augmentant la production d'IL-10, empêchant la prolifération des lymphocytes T et provoquant la non-réponse des lymphocytes T (Nakamori, 2021). Ainsi, PD-1 affecte l'immunosuppression par son effet sur l'expression de l'IL-10. Le point commun à la plupart des patients septiques est l'augmentation de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T au cours de la progression de l'hyper-inflammation à l'hypo-inflammation. En oncologie, les thérapies par anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1 sont utilisées avec succès pour traiter diverses tumeurs (Topalian, 2012). En effet, certaines cellules tumorales expriment PDL1 à leur surface, ce qui bloque la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces données indiquent que le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 est une cible prometteuse pour restaurer la fonction immunitaire dans le sepsis humain.

En résumé (Fig. 9) Les cibles d'approches immunothérapeutiques potentielles comprennent des agents bloquants de l'apoptose, les molécules costimulatrices négatives, permettant de diminuer le niveau de cytokines anti- inflammatoires, d'augmenter l'expression de l'HLA-DR, et enfin de lever l'anergie des lymphocytes T.

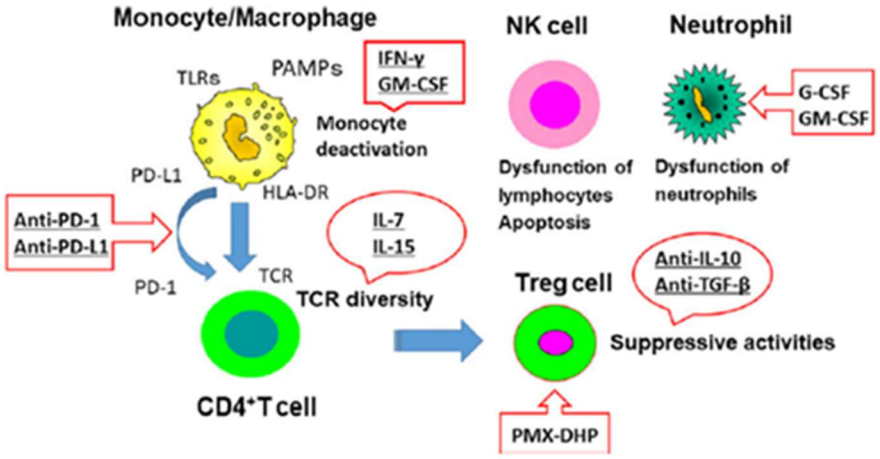


Figure 9 : Thérapies d'immunostimulation contre le sepsis. *Les cibles d'approches immunothérapeutiques potentielles. G-CSF, facteur de stimulation des colonies de granulocytes ; GM-CSF, granulocyte-macrophage facteur de croissance de globules blancs; IFN, interféron ; IL, interleukine; NK, tueur naturel ; PAMP, paternes moléculaires associés aux agents pathogènes ; PD-1, programmé mort cellulaire-1 ; PD-L1, mort cellulaire programmée 1 ligand 1 ; PMX-DHP, hémoperfusion directe à la polymyxine B ; TCR, récepteur des lymphocytes T ; TGF, transformant facteur de croissance; TLR, récepteur de type Toll (Ono, 2018).*

Ces différentes cibles thérapeutiques, anti-PD-1/PD-L1, IFNγ, GM-CSF ou l'IL-7 ont été testées cliniquement chez des patients sepsis pour essayer de restaurer leurs immunités innée et /ou adaptative, mais les résultats obtenus n'ont pas démontré de réels bénéfices sur la mortalité de ces patients, bien qu'améliorant parfois les temps de prise en charge en réanimation et/ou la nécessité d'oxygénation mécanique.

5) Immunostimulation : le projet ImmunResQ

L'objectif du programme ImmunResQ est de développer une immunothérapie immunostimulante pour agir sur la phase d'immunodépression observée dans le sepsis. En utilisant les plateformes virales utilisés par Transgene, le produit en cours de développement est un virus, le MVA, qui permettra l'expression de l'IL-7. Ces deux composants, le virus MVA et l'IL7, devraient agir de concert, l'un sur la stimulation de la partie innée de l'immunité, l'autre sur la partie adaptative.

A/ IL-7 : son rôle dans l'immunité adaptative et dans le sepsis

L'IL-7 est principalement un facteur de survie pour différentes sous populations de progéniteurs et de cellules lymphoïdes matures. L'IL-7 induit d'une part la synthèse de facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2 (B-cell lymphoma 2); Bcl-xl (B-cell lymphoma-extra large)) et d'autre part, inhibe l'apoptose par suppression de l'activité de protéines pro-apoptotiques (Bax (Bcl-2-associated X protein); Bim (Bcl-2-like protein)) (Mackall, 2011 - Lundstrom, 2021). Ainsi, l'IL-7 agit principalement sur la survie, l'homéostasie, le développement et la prolifération des lymphocytes T. Elle est utilisée dans la régulation de la prolifération des lymphocytes T CD4+ et « CD8+ en réponse à une lymphopénie. L'IL-7 joue également un rôle dans la transition des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T mémoire. En lien avec ses actions sur la prolifération et sur la diversité du répertoire T, l'IL-7 est capable de restaurer un phénotype à nouveau fonctionnel des lymphocytes T (de Roquetaillade, 2018).

Lors d'un choc septique, l'ensemble des fonctions des lymphocytes T est altéré, entrainant une augmentation de la survenue d'infections secondaires et ainsi du risque de décès. Chez ces patients présentant une lymphopénie marquée, l'IL-7 recombinante humaine utilisée comme thérapeutique immuno-adjuvante devrait être un bon candidat. (Prescott, 2018 - Monneret, 2014).

Plusieurs des études *in vivo* et *ex vivo* ont rapporté un effet bénéfique de l'IL-7 recombinante humaine (rhIL-7) dans le sepsis par restauration de la prolifération lymphocytaire, de la production d'IFN-γ (Venet, 2012 - Unsinger, 2012) ou la reprogrammation métabolique des lymphocytes T CD4+ (Venet, 2017).

L'IL-7 humaine recombinante a de multiples effets immunomodulateurs pour contrer les altérations immunitaires induites par la septicémie (Fig. 10 - de Roquetaillade, 2018). Elle diminue l'apoptose lymphocytaire induite par le sepsis via la modulation de l'expression des gènes de l'apoptose. Elle améliore la distribution lymphocytaire via l'expression des intégrines et favorise le recrutement des neutrophiles par une induction indirecte et la sécrétion d'rhIL-7 lève l'anergie des lymphocytes.

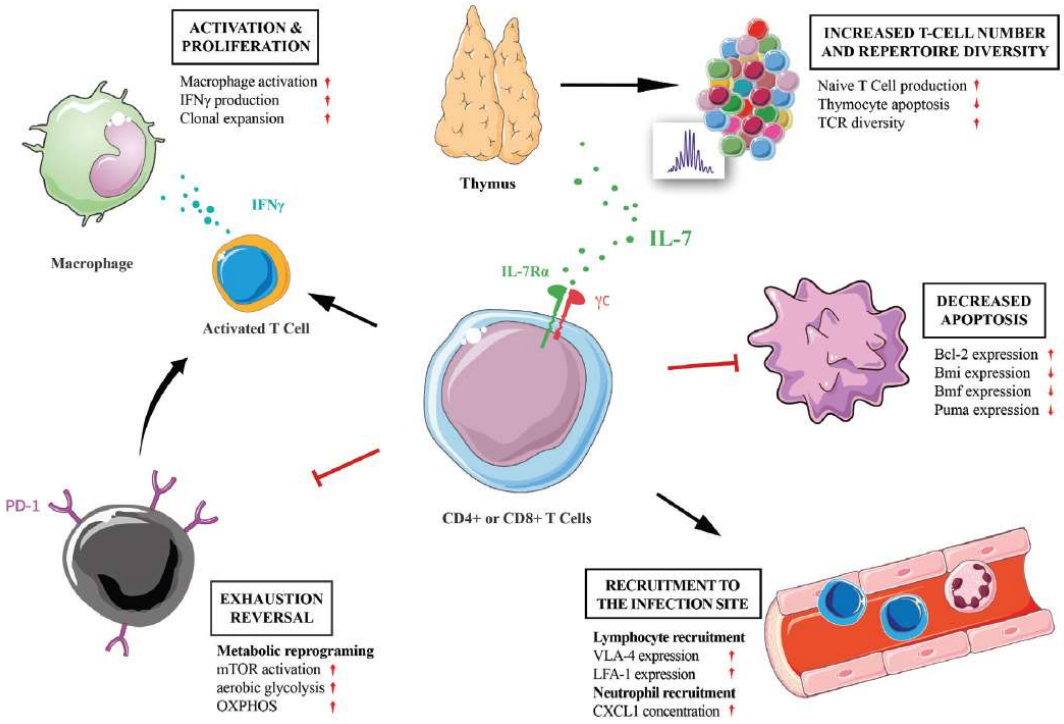


Figure 10 : les Effets immunomodulateurs de l'interleukine-7 humaine recombinante (rhIL-7). *Elle diminue l'apoptose lymphocytaire induite par le sepsis via la modulation de l'expression des gènes de l'apoptose. Elle améliore la distribution lymphocytaire via l'expression des intégrines et favorise le recrutement des neutrophiles par la sécrétion de CXCL1. rhIL-7 lève l'anergie des lymphocytes en agissant sur la voie mTOR et peut également induire l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+, augmentant ainsi la production d'IFNγ qui conduit à l'activation des macrophages. Enfin, la rhIL-7 augmente la production de lymphocytes T naïfs à partir du thymus, prévient l'atrophie thymique induite par la septicémie et augmente la diversité du répertoire TCR (récepteur des lymphocytes T). de Roquetaillade, 2018.*

En 2018, la capacité *ex vivo* de la rhIL-7 à restaurer la fonction des lymphocytes T chez les patients infectés par des bactéries multirésistants a été testée (Thampy, 2018). Ces patients étaient lymphopéniques et présentaient une expression accrue des marqueurs d'anergie des lymphocytes par rapport aux patients gravement malades mais non septiques. La rhIL-7, les anticorps anti-PD-L1 et les traitements OX40L *ex vivo* ont tous été efficaces pour augmenter la production d'IFNγ par les lymphocytes T. Mais parmi ces trois traitements, la rhIL-7 était le plus efficace.

B/ MVA : induction de la réponse immunitaire innée

a) Caractéristiques

Le Virus de la vaccine Ankara modifié (MVA) est un virus qui appartient à la famille des poxviridae et au genre orthopoxvirus. Le MVA est un virus enveloppé à ADN linéaire et double brin (178 kpb), avec une réplication cytoplasmique. L'analyse de son génome a montré que le virus pouvait être considéré comme homogène, génétiquement stable et incapable de réplication productive dans la plupart des lignées cellulaires de mammifères, y compris dans des lignées humaines (Antoine, 1998).

Bien que le MVA soit connu depuis de nombreuses décennies, son tropisme cellulaire n'est pas complètement élucidé. Les études menées à la fois sur des cellules humaines et des modèles murins arrivent à la conclusion que les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et les cellules dendritiques (CD), sont les principales cibles du MVA (Metcalf, 2015 - Chougnet, 2015) lorsqu'il est utilisé à visée vaccinale en intramusculaire ou sous cutanée et les hépatocytes lorsqu'il est injecté par voie intra-veineuse (Fend, 2014). Ces cellules CPA et DC sont l'un des composants majeurs du système immunitaire inné et sont responsables du lien avec le système adaptatif, ce qui fait du MVA un inducteur potentiel de l'immunité innée (Liu, 2008).

Le MVA est une souche hautement atténuée du virus Vaccinia qui était la première souche utilisée dans la vaccination contre la variole. Il provient à l'origine de la souche du virus de la vaccine Ankara développée dans la capitale de la Turquie. Il a ensuite été introduit en Allemagne et transformé en virus Chorioallantois Vaccinia Ankara (CVA), qui est l'ancêtre le plus récent du MVA. En 1968, au cours des dernières années de la campagne de vaccination, après 516 passages tissulaires en série du CVA dans des fibroblastes d'embryon de poulet (CEF), il a été renommé MVA (Volz, 2017). Cette atténuation a permis de trouver une option de vaccin plus sûre pour les dernières années de campagne d'éradication de la variole. La campagne de vaccination a pris fin en 1980, lorsque la variole a été déclarée éradiquée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (cdc.gov, 2019). Le dernier cas endémique a été détecté en octobre 1977 (Volz, 2017 ; Deria, 1980).

En 2013, un vaccin MVA a été homologué en Europe (Agence européenne des médicaments, 2013). Les données de plusieurs études cliniques de phase II ont confirmé l'innocuité et l'immunogénicité du vaccin MVA chez les populations de patients considérées à risque pour une vaccination conventionnelle contre la variole, y compris les personnes atteintes par le VIH (Overton, 2015). De plus, le MVA a été testé avec succès pour la sécurité cardiaque dans un vaste essai clinique de phase II (Zitzmann-Roth, 2015).

Aujourd'hui le virus MVA est considéré comme sûr pour la vaccination, depuis l'éradication de la variole, les craintes concernant une utilisation du virus « monkeypox » comme arme biologique ont maintenu l'intérêt pour ce vaccin (Moss, 2011). Jusqu'à il y a peu de temps la vaccination était rare et réservée aux personnes à risque (travaillant en laboratoire ou en contact avec des primates) mais la récente épidémie due au virus monkeypox a entrainé la vaccination des populations les plus à risque ou en contact avec des malades. En Aout 2022 on comptait un peu moins de 60 000 cas de « Variole du singe », donc 20 000 aux Etats-Unis et 4 000 en France pour 10 décès dans le monde. Il existe deux vaccins sur le marché : IMVANEX qui dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne et JYNNEOS qui dispose d'une AMM américaine, les deux sont formulé à partir du MVA.

b) Applications

La première application du MVA était donc d'être un vaccin de substitution au CVA, qui entrainait des effets secondaires très rares mais assez graves. De nos jours, le MVA présente un certain nombre de caractéristiques qui en font une option intéressante à utiliser comme vecteur pour la vaccination et/ou pour la délivrance de gènes. Parmi ces caractéristiques, on peut noter un grand génome avec de l'espace permettant d'insérer un grand nombre de gènes recombinants jusqu'à plus de 10 kb (Ewer, 2016). De plus, la réplication cytoplasmique, qui évite l'insertion dans le génome de l'hôte, et l'incapacité de se propager dans les cellules humaines contribuent à son profil d'innocuité (Gomez, 2008).

Il a été utilisé comme vecteur dans divers vaccins candidats pour les maladies infectieuses et la délivrance de gènes pour l'immunothérapie anticancéreuse, et il y a actuellement une trentaine d'essais cliniques en cours / en recrutement utilisant le MVA seul ou en combinaison avec d'autres traitements recensés sur Clin. Trial. Gov.

c) Réponse immunitaire innée au MVA

Les vecteurs viraux peuvent agir comme adjuvants car ils ne sont pas immunologiquement inertes, ce qui rend leur utilisation dans le domaine vaccinal particulièrement intéressante. L'activation du système immunitaire et en particulier du système inné peut être obtenue par cet agent actif, ce qui peut entrainer par la suite une réponse adaptative optimisée (Ewer, 2016). Il faut cependant trouver un équilibre entre l'induction de l'immunité innée pour soutenir le système adaptatif mais sans provoquer de clairance trop rapide du virus, ce qui nécessite de trouver la dose à injecter la plus appropriée.

Dans l'ensemble, la capacité du MVA à cibler spécifiquement les CPA, en particulier les CDs, et à activer fortement l'immunité innée sans provoquer d'événements indésirables graves même dans la population à haut risque (Pascutti, 2011) font du MVA un outil vaccinal très intéressant.

Le MVA est une plateforme sur laquelle Transgene a un très fort savoir-faire et a accumulé beaucoup de données sur l'innocuité du vecteur. C'est pour l'ensemble de ces raisons que nous avons choisi cette plateforme pour faire exprimer l'IL-7 dans notre stratégie d'immunothérapie du programme ImmunResQ.

C/ Un nouveau candidat-médicament : le MVATG18897 (MVA-hIL7-Fc)

Le candidat qui a été caractérisé durant les deux années de mon diplôme est le MVATG18897, également appelé MVA-hIL7-Fc. Il est basé sur un MVA non réplicatif, conçu pour exprimer une IL-7 humaine (hIL-7) fusionnée à une séquence Fc humaine d'IgG2a.

Le MVA hIL-7 Fc (MVATG18897, Lélu, 2022) possède un gène synthétique codant pour la fusion de la séquence de l'hIL-7 et de la séquence de l'IgG2-Fc humaine. Cette

combinaison permet d'augmenter la demi-vie de cette cytokine. L'IgG2-Fc humaine a été sélectionnée pour son effet modéré sur cellules immunitaires murines et humaines lorsqu'elles sont liées aux récepteurs Fc par rapport à d'autres IgG-Fc (Dekkers, 2017 - Bruhns, 2015) Une séquence de Kozak (ACC) a été ajoutée avant le codon start (ATG), et une séquence de terminaison de la transcription 39-TTTTTNT a été ajoutée immédiatement après le codon stop. Cette séquence a été clonée dans un plasmide contenant le promoteur précoce-tardif pH5R, entouré des portions du gène MVA 164R et 165R, qui permettent la recombinaison homologue dans la délétion MVA III. Le rMVA a été généré sur des fibroblastes primaires d'embryon de poulet (CEF). Pour cela, les cellules ont été infectées avec un vecteur MVA « parent » contenant une cassette d'expression de sélection mCherry III et transfectées avec le plasmide navette recombinant. La sélection des clones recombinants non fluorescents a été réalisée par plusieurs cycles de purification sur plaque. Après la génération du virus recombinant, la séquence de l'ADN inséré et la pureté virale ont été vérifiées. L'absence du virus parental a été également vérifiée par PCR.

D/ Production et purification de hIL-7-Fc recombinante

L'IL-7 humaine se lie au récepteur murin de l'IL-7 et peut donc être utilisée pour des applications dans des modèles murins (Johnson, 2005). La séquence hIL-7-Fc a été clonée dans un vecteur d'expression, exprimée dans des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) et la cytokine produite a été purifiée par la société GeneArt (Regensburg, Allemagne). En bref, les cellules ExpiCHO™ ont été transfectées de manière transitoire avec un vecteur d'expression et cultivées 6 jours. Le milieu de culture a ensuite été récolté et chargé sur une résine de protéine A (MabSelect, Cytiva) et la protéine hIL-7-Fc a été éluée en suivant les instructions du fournisseur. La protéine hIL-7-Fc recombinante (rhIL-7-Fc) a été purifiée une seconde fois par chromatographie d'exclusion de taille. Le pic principal correspondant à la rhIL-7-Fc dimère a été collecté et la concentration en protéine a été déterminée par absorption à 280 nm. La protéine rhIL-7-Fc, représentant la contrepartie de la hIL-7-Fc produite par le MVA-hIL-7-Fc, a été aliquotée à 1 mg/mL et stockée à -80°C jusqu'à utilisation. La séquence utilisée dans la production de la hIL-7-Fc soluble est identique à 100 % à celle utilisée dans la construction de la MVA-hIL-7-Fc.

E/ Modèle CLP

Transgene a mis en place depuis 2018 le modèle murin de ligature et ponction cæcale (CLP ou Cecal Ligation Puncture) en particulier celui décrit par Restagno et al. (Restagno,2016). Ce modèle consiste en la ligature et la perforation du cæcum de la souris, permettant la libération de matière fécale dans la cavité péritonéale pour générer une réponse immunitaire exacerbée induite par une infection polymicrobienne. C'est actuellement le modèle principal de référence reproduisant la complexité de la dynamique du sepsis chez l'Homme qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques,

biochimiques et immunologiques (Dejager, 2011). Il permet d'observer les deux phases immunitaires clés du sepsis : la phase inflammatoire puis la phase d'immunodépression. Dans le but de restaurer l'homéostasie immunitaire chez le patient septique immunodéprimé, le premier candidat médicament de Transgene MVA-hIL7-Fc sera évalué et caractérisé dans ce modèle CLP.

6) Hypothèses de travail

Le programme de Transgene appelé ImmunResQ a pour objectif de développer certaines thérapies visant à restaurer l'homéostasie immunitaire chez les patients immunodéprimés à la suite d'un choc septique. L'un de ses candidats est un MVA codant pour un gène de l'interleukine-7 humaine (IL-7) sur lequel a porté mon travail. Ce produit est composé de deux éléments : d'une part l'hIL-7, qui est cruciale pour le maintien, la survie et le développement des lymphocytes et de l'immunité adaptative, et d'autre part le MVA, qui a la capacité de jouer le rôle d'adjuvant grâce à son fort effet sur le système immunitaire inné, en ciblant particulièrement les cellules présentatrices d'antigènes.

L'hypothèse de travail est qu'ensemble, ces deux composants pourraient être en mesure de renforcer et d'améliorer l'immunité innée et adaptative chez les patients septiques en phase d'immunosuppression. La finalité de ce traitement est de réduire significativement la mortalité due à la septicémie.

Pour permettre de valider cette hypothèse, mon travail dans la phase préclinique de développement durant ces deux années de diplôme a été scindé en deux grandes parties :

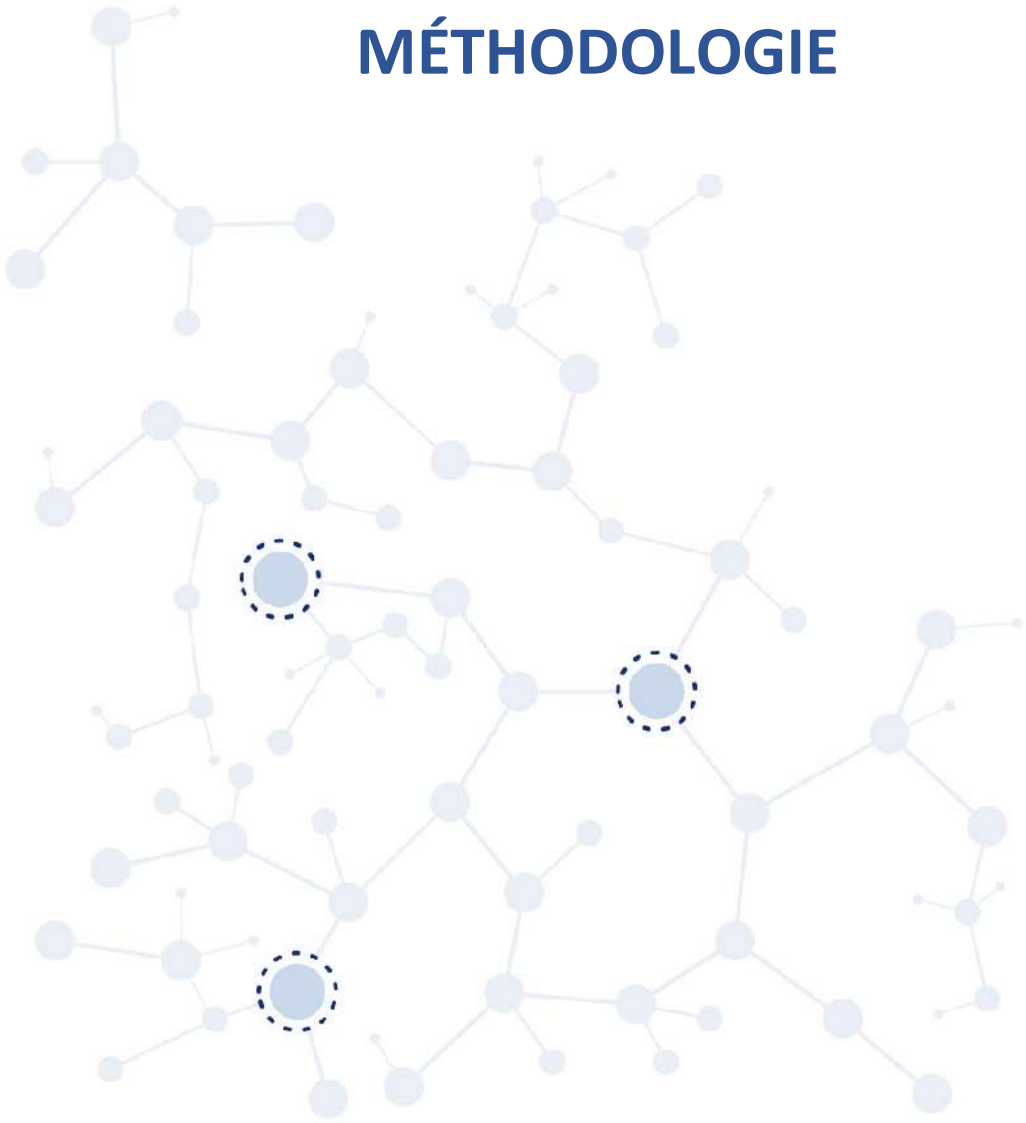
I/ La mise en place du modèle CLP

Elle consiste en la mise en place du modèle CLP et de l'ensemble de différentes techniques d'analyses permettant de valider le modèle.

II/ La preuve d'efficacité du candidat à différentes doses

Pour cette deuxième partie, le candidat a été injecté par voie intraveineuse dans notre modèle CLP murin. La voie intraveineuse a été choisie à la suite des résultats de pharmacocinétique obtenue dans notre équipe (Lélu, 2022). Les différentes techniques précédemment mises au point nous ont permis d'apporter la preuve de l'efficacité de notre candidat MVA-hIL7-Fc.

MÉTHODOLOGIE



III/ METHODOLOGIE

Lors de la caractérisation du premier candidat médicament, notre département était divisé en 2 équipes : une équipe travaillant sur des souris naïves qui ne subissent aucune chirurgie avant l'injection du produit et l'équipe "CLP". Les membres de l'équipe dite « Naïve » ont tout d'abord testé sur un grand nombre de souris naïves la cinétique de production de l'hIL7-fc après l'injection de notre candidat à différents temps, différentes concentrations et différentes voies d'injections. C'est en se basant sur les résultats obtenus lors de la caractérisation du modèle CLP et des données de cinétique pharmacologique précédemment obtenues sur les souris naïves que l'équipe CLP, au sein de laquelle j'ai réalisé ces travaux, a utilisé le modèle CLP pour mettre en évidence la capacité du MVA-hIL7-Fc à lever l'immunosuppression induite par la CLP.

1) Modèle animal de ligature et de ponction caecale : CLP

A/ Procédure chirurgicale

Pour induire une péritonite polymicrobienne chez des souris mâles C57BL / 6 âgées de 8 à 11 semaines, nous réalisons une chirurgie de ligature et de ponction caecale (CLP). Après une pré-analgésie par de la buprénorphine (50µL à 0,03mg/mL de Buprecare en sous-cutané 1h avant la chirurgie), les souris sont anesthésiées avec un mélange de xylazine (0,33mg/souris) /kétamine (1,67mg/souris). Après une laparotomie, le cæcum est exposé, ligaturé à son tiers externe et perforé deux fois avec une aiguille de calibre 21. Une petite quantité de matières fécales est extrudée afin d'induire une septicémie polymicrobienne légère puis le cæcum est réintroduit dans le péritoine et les couches musculaires sont refermées par une suture en surjet avec du fil 6.0 en polypropylène (Ethicon #1823). La peau est refermée par 3 ou 4 agrafes chirurgicales (Fig. 11). Les témoins sont soit des souris naïves, soit des souris « Sham » subissant une laparotomie avec seulement exposition de cæcum mais sans ligature ni ponction. A la fin de la chirurgie, les souris reçoivent une injection sous-cutanée d'une solution de glucose à 5%, correspondant à la réanimation volémique chez un patient septique. La durée totale de la procédure chirurgicale est de 25 min par souris. Environ six heures après la chirurgie, puis toutes les douze heures pendant les deux jours suivants, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale d'antibiotique (Tienam: 25 mg/kg) et une injection sous-cutanée de buprénorphine (Buprecare :100µL à 0,03mg/mL) contribuant à la gestion de la douleur. Les souris sont ensuite surveillées deux fois par jour jusqu'à la fin de l'étude. Lors de cette surveillance, un score clinique est défini en observant et en notant le comportement des souris dans la cage, l'activité motrice et l'aspect du pelage (dans la première version du suivi). La température des souris est monitorée par sonde rectale, puis les souris sont pesées et la perte de poids en pourcentage est calculée. Afin de faciliter l'accès à l'alimentation, quelques croquettes mouillées et de l'eau gélifiée sont déposées dans la

litière et changées chaque jour. Si le score calculé est supérieur au seuil prédéterminé les souris sont euthanasiées. Deux jours après la chirurgie, le traitement à la buprénorphine est arrêté et remplacé par une solution de paracétamol dans l'eau de boisson (Doliprane 2,4% sirop, Sanofi). La durée totale du protocole se situe entre 1 et 13 jours post CLP. Si un animal montre des signes de souffrance, nous réalisons une injection de 100µL en sous-cutanée (SC) dans le pli de peau du cou, de Buprénorphine (Buprécare) à 0,03mg/mL. Si la perte de poids est supérieure à 10%, nous injectons du glucose 5%, préchauffé à 37°C, par voie sous-cutanée. Le volume injecté est calculé d'après le poids de la souris (500µL pour une souris de 30g afin de ne jamais dépasser la limite injectable de 1mL/jour/souris de 30g). L'animal sera immédiatement euthanasié si un des points limites suivants est observé : Température <30°C dès 24h post-CLP, incapacité à se maintenir debout, respiration laborieuse, perte de poids supérieure à 20 ou 25% selon le protocole ou si la perte de poids est comprise entre 20 et 25% avec plus de 2 matins consécutifs de perte de poids.

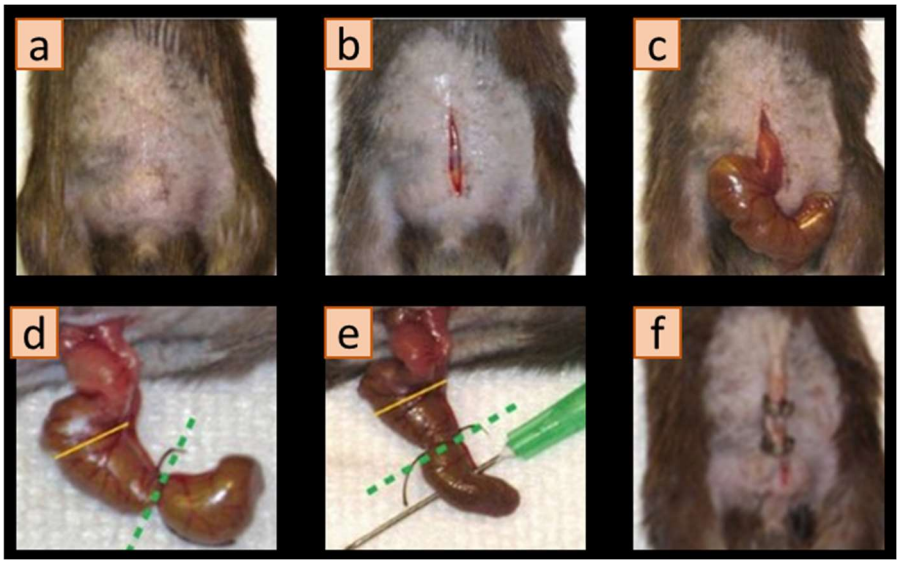


Figure 11 : Illustration de la procédure chirurgicale de ligature et ponction du cæcum *(Rittirsch, 2009). a : Rasage de la zone à opérer, b : ouverture médiane de la peau et du péritoine, c et d : exposition, ligature à 1/3 du cæcum, ponction et extrusion de la matière fécale. f : remise en place du cæcum puis fermeture du péritoine par une suture en surjet et fermeture de la peau par des agrafes chirurgicales.*

B/ Mise en place de la procédure CLP, résolution des problèmes techniques

Avant d'en arriver finalement au protocole ci-dessus, il a fallu résoudre un certain nombre de problèmes liés à la sévérité du modèle ou à des contraintes techniques. De plus, le modèle CLP est un protocole classé sévère par le comité d'éthique de notre animalerie. Il présente plusieurs contraintes ne permettant d'avoir qu'un nombre réduit de souris par groupe.

La lourdeur de la procédure chirurgicale et du suivi des souris matin et soir nous ont imposé d'opérer un nombre maximum de 20 à 25 animaux par jour de chirurgie. Chaque protocole mobilisait un binôme de chirurgien et une personne chargée des anesthésies et de la préparation et du réveil des souris (rasage, injection de glucose après la chirurgie, suivi du réveil). Le roulement du suivi biquotidien nécessitait d'avoir une équipe d'au minimum 4 personnes formées aux gestes et à la notation des scores de surveillance des animaux. Ces personnes devaient se rendre disponibles matin et soir, week-end compris pour réaliser les soins et le monitoring des animaux. Mon rôle dans cette équipe de 4 personnes était de réaliser, en alternance avec mes collègues, la préparation, les chirurgies, le suivi des animaux et toute la planification nécessaire au bon déroulement des expérimentations. J'établissais le planning de surveillance en fonction des disponibilités de chacun des opérateurs tout en respectant les temps de repos légaux en vigueur dans notre entreprise. Les soins pouvant durer plusieurs heures et parfois tard le soir, le temps de repos minimum de 11h imposait de ne pas enchainer deux suivis. Il n'était pas possible non plus d'intervenir deux fois dans le week-end pour respecter le temps de repos hebdomadaire. J'ai eu aussi pour mission d'assurer la coordination avec le Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) où nous réalisons nos chirurgies et nos suivis. Nous utilisions pour ces chirurgies une salle commune et une hotte utilisée par le personnel de l'animalerie. Il a fallu organiser rigoureusement nos semaines de protocole pour une bonne entente avec les autres utilisateurs et les membres du PBES.

La mortalité au 7ème jour post CLP se situant entre 10 et 50%, le nombre de souris en fin de protocole est limité, ce qui nous a imposé de faire des choix de groupes et de réaliser plusieurs fois les protocoles afin de cumuler les données.

Le protocole CLP est une procédure lourde et complexe. La mise en place de la chirurgie et son optimisation a été une partie importante de ma contribution à ce projet. Chaque nouveau protocole nous apportant de nouveaux points bloquants, il a fallu y répondre au fur et à mesure. J'ai participé, au sein de l'équipe CLP pour la partie chirurgie et de manière individuelle, à la mise au point de protocoles, à chacune des tâches décrites ci-après.

Procédure chirurgicale : La procédure chirurgicale en elle-même est assez longue et nécessitait une optimisation pour gagner du temps et pouvoir augmenter le nombre de souris opérées. Dans un premier temps, nous avons amélioré l'ergonomie du poste de travail sous poste de sécurité microbiologique (PSM). Une troisième personne s'est jointe à l'équipe pour la préparation (anesthésie, rasage, injection finale de glucose). Nous réalisons maintenant un roulement pour que les 3 personnes passent au poste de préparation afin de limiter le risque de troubles musculosquelettiques dus à la position de la chirurgie plusieurs heures d'affilée.

Concernant la chirurgie elle-même, nous avons choisi de ne plus ligaturer la peau mais d'utiliser des agrafes chirurgicales, ce qui nous a fait gagner un temps précieux et

optimise le temps d'anesthésie pour la souris sans impact sur la cicatrisation. Ces optimisations nous ont permis de faire aujourd'hui environ 25 souris pour 4 heures de chirurgie, auxquelles il faut ajouter plus 2 heures de préparation et de rangement.

Double contrôle : La quantité de matière fécale libérée dans le péritoine étant un des facteurs de la gravité du sepsis induit par la CLP, nous avons décidé de mettre en place un double contrôle. A chaque souris opérée, le deuxième chirurgien doit contrôler sous la loupe que la quantité de fèces extrudé lui semble correcte. Cette vérification permet de limiter les variations de mortalité qui pourraient être liées à l'opérateur.

Utilisation d'un antibiotique de classe critique : Dans un contexte d'évolution à la hausse de la consommation des antibiotiques et d'émergence constante de souches bactériennes résistantes, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a publié en 2013 et actualisé en 2015 un rapport concernant les antibiotiques « critiques » (ANSM rapport, 2015).

La définition des antibiotiques critiques repose sur la notion de « pression de sélection» et cela concerne les antibiotiques particulièrement générateurs de résistances, et les antibiotiques de dernier recours en milieu hospitalier.

Notre modèle CLP se voulant le plus proche possible du contexte clinique, nous utilisons dans notre modèle un antibiotique de dernier recours à large spectre et de classe critique, le Tienam®, composé d'Imipénème et de Cilastatine. L'imipénème est un antibiotique de la famille des bêtalactamines et la Cilastatine est un inhibiteur compétitif réversible et spécifique de la déhydropeptidase, l'enzyme rénale qui métabolise et inactive l'Imipénème. Le Tienam est utilisé en milieu hospitalier comme antibiotique de dernière ligne en absence d'autre alternative thérapeutique disponible (pathologies graves, des infections dues à des bactéries multirésistantes…). Il est interdit de le disperser dans la nature pour limiter l'apparition de résistances. Il était donc impossible d'utiliser la filière classique d'élimination des déchets dans nos protocoles. Rapidement dans la mise en place du modèle, l'évacuation de ces déchets a été un problème pour la zone d'animalerie conventionnelle. Nous avons dû mettre en place un système de « double peau », un insert en plastique jetable au fond de la cage permettant de jeter directement la litière en évitant les manipulations par les animaliers et ensuite l'évacuation des déchets en poubelles de Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux (DASRI) avec inactivation des déchets par chaleur humide sous pression.

Changement de zone d'animalerie : Nos premières chirurgies de caractérisation du modèle étaient réalisées en zone conventionnelle A1 avec un minimum de contraintes sanitaires. Lorsque nous avons voulu injecter notre candidat MVA-hIL7-Fc classé OGM (organisme génétiquement modifié) de niveau 2, nous avons dû mettre en place un transfert de zone des cages. Cela a impliqué de réaliser toutes nos manipulations de cages et nos chirurgies sous hotte stérile à flux horizontal ou à flux laminaire, ce qui a apporté une contrainte supplémentaire à la manipulation. Le changement de zone a demandé une

forte collaboration avec les équipes de l'animalerie et une anticipation maximum de nos plannings.

Mise en place d'un chauffage individuel : Une des causes de mortalité due à la CLP est l'hypothermie. Pour pallier ce problème et pour veiller au bien-être animal, nous utilisions une armoire chauffante à 28°C mise à disposition par l'animalerie en zone conventionnelle. Nous avons rapidement constaté qu'au moment du transfert des cages en zone d'animalerie de niveau 2, l'état général des souris se dégradait avec une perte de poids et une diminution de la température. N'ayant pas de chauffage à disposition en zone A2, nous avons mis en place un système de chauffage individuel des cages. Pour cela, j'ai commandé des tapis chauffants de vivarium de 17x17cm installés sous chaque cage en portoir ventilé (posé quelques cm en dessous de la cage sur le couvercle de la cage vide d'en dessous). La petite taille du tapis permet de garder une zone fraiche pour que la souris puisse choisir sa température de confort. Nous avons contrôlé avec les animaliers les normes électriques des tapis, leur résistance aux produits de nettoyage et nous avons vérifié que l'augmentation de la température dans nos 6 cages ne modifiait pas la température des autres cages en stabulation sur le même portoir ventilé. Ce système a été apprécié dans l'animalerie qui a elle aussi commandé ce modèle de tapis chauffants. Nous avons également ajouté des dômes en plexiglas rouge pour permettre aux souris de rester au chaud tout en étant visibles pour des contrôles visuels rapides.

Fiche de score clinique : L'appréciation de l'état général de la souris se fait grâce à un système de note ou de score. Cette notation individuelle de la souffrance de nos animaux est réalisée matin et soir et est une partie très importante des protocoles. En effet, le score obtenu est déterminant pour la décision d'euthanasier ou non une souris en souffrance et pour l'analyse longitudinale des scores. Cette fiche nous a permis de cumuler des données de poids, température, comportement avant et après l'injection de notre traitement pendant plus de 2 ans. Pour standardiser et faciliter ce travail long et réalisé à des horaires atypiques, j'ai conçu avec l'aide de l'équipe des grilles de notation des scores les plus fonctionnelles possibles. Cette grille a été en constante évolution depuis le début de nos chirurgies pour rendre cette étape-là la plus fluide possible. Les premières fiches étaient extrêmement complètes (Annexe1). Nous notions tous les signes physiques (état du pelage, déshydratation, mobilité, diarrhée…) ainsi que des données physiologique (poids, température). Puis notre expérience nous a permis de dire que les critères les plus pertinents pour l'atteinte des points limites était le poids et la température (Annexe 2). J'ai également créé un abaque de pourcentage de perte de poids pour évaluer rapidement la perte de poids sans calculatrice. Les dernières fiches de notation des scores utilisées en 2021 étaient donc simplifiées, et plus rapide à remplir.

2) Matériel et méthode

A/ Répartition des souris par groupe

Les souris sont réparties aléatoirement dans les différents groupes expérimentaux, de façon à obtenir une moyenne de perte de poids par rapport à la veille de la chirurgie le 4ème jour, ou juste avant l'injection, équivalente entre chaque groupe. La répartition est faite objectivement, à l'aide d'un programme informatique mis en place par les bio-informaticiens de Transgene.

B/ Préparation de l'antibiotique

Le Tienam en poudre est formulé pour la dose humaine et stable seulement une heure après remise en suspension., Des aliquots de l'ordre de 0,020g sont préparés et stockés à température ambiante. Le jour de l'injection, la poudre est re suspendue dans le volume adéquat de glucose 5%.

C / Administration du traitement

Le MVA-hIL-7-Fc et le MVA-Vide ont été produits sur des fibroblastes primaires d'embryon de poulet (CEF). La charge virale des ampoules de stock est exprimée en unités formant des plaques (PFU ou Plaque-forming unit), une unité de mesure utilisée en virologie pour décrire le nombre de particules virales capables de former des plaques de lyses cellulaires par unité de volume. Elle a été évaluée sur des cellules DF-1 (lignée immortalisée de fibroblastes d'embryon de poulet). Les souris du groupe traité reçoivent une injection de MVA-hIL7-Fc 4 jours après la CLP par voie intraveineuse (IV) au sinus rétro-orbitaire (Fig.12) avec $1x10^8$ PFU ou $1x10^7$ PFU de MVATG18897 (MVA-hIL7-Fc) ou 5µg d'rhIL7-Fc dans 100 µL de tampon, sous anesthésie par isoflurane et une anesthésie locale (TETRACAINE 1% Collyre). Le groupe contrôle reçoit la même injection en utilisant un MVA vide ou aucune injection.

Figure 12 : Injection retro orbital. *Photo d'illustration (JoVE Science Education Database)*

D/ Euthanasie et prélèvements

Au jour défini comme étant la fin du protocole, un prélèvement de 200µL de sang au sinus rétro-orbitaire est réalisé après une anesthésie locale (TETRACAINE 1% Collyre),

puis la souris est euthanasiée par dislocation cervicale. La rate est prélevée et conservée dans un milieu de culture (αMEM), à 4°C, jusqu'à la dissociation.

E/ Sérum

A la fin de l'étude, le sang est collecté dans des tubes de prélèvement (Microvette® CB 200 Z-Gel, Sarstedt). Ces tubes possèdent un capillaire calibré permettant de prélever précisément 200µL de sang (Fig. 13). Les échantillons de sang sont conservés pendant minimum 1 h à 4 °C après le prélèvement. Ensuite, les tubes sont centrifugés (10 000g pendant 5 min à 4 °C) et les sérums se situant en surface du gel séparateur sont collectés dans de nouveaux tubes et conservés à -20 °C jusqu'aux dosages ELISA et multiplex.

Figure 13 : Microvette de prélèvement sanguin, *comportant un capillaire calibré à 200µL et un gel séparateur facilitant le prélèvement du sérum après la centrifugation.*

F/ Hématocrite

Le sang est prélevé en microvette 200LH (Réf 20.1292). Une extrémité du capillaire à hématocrite héparine d'ammonium 18µL (Dutscher #090530) est plongé dans le tube de sang afin de le remplir par capillarité jusqu'à la limite de remplissage (Fig. 14 a) puis le tube est bouché à son extrémité propre à l'aide de cire (Plaque de cire operculaire, Dutscher #090531). Après avoir nettoyé et désinfecté le tube, il est placé dans le portoir conçu pour y glisser les tubes en verre (Fig. 14 b et c) puis centrifugé 30min à 3100g. Le taux d'hématocrite est lu à l'aide d'un abaque et exprimé en pourcentage.

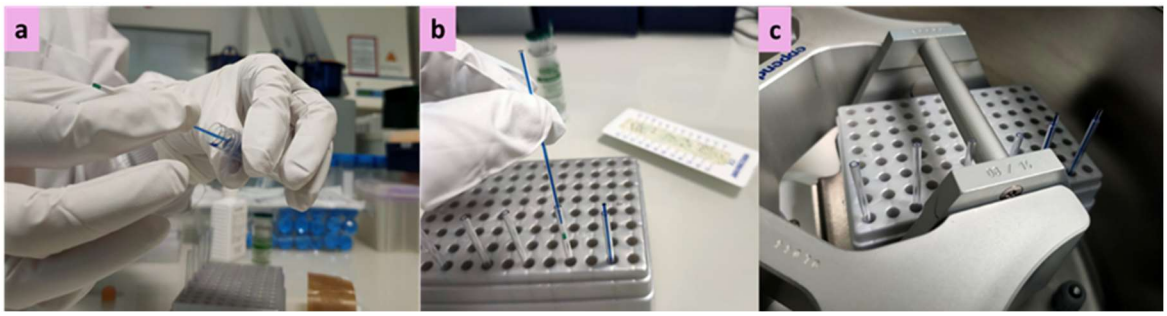


Figure 14 : Détermination du taux d'hématocrite sanguin au laboratoire Transgene

G/ Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques ont été réalisées dans un laboratoire d'analyse vétérinaire : IODOLAB. Pour ces analyses en laboratoire conventionnel, les sérums sont filtrés en utilisant des inserts filtrants (0,1µM) de 1,5mL (Millipore #UFC30VV00). 100µL de

sérum sont filtrés 4 min, 12000g à 4°C puis envoyés au laboratoire par transport réfrigéré à 4°C. Les dosages suivants sont réalisés : ASAT (Aspartate aminotransférase), ALAT (alanine transaminase), Bilirubine Conjuguée, Bilirubine Totale, Gamma GT (gamma-glutamyltranspeptidase), Créatinine, CK (créatine kinase), PAL (phosphatases alcalines), LDH (lactate déshydrogénase).

H/ Splénocytes

Afin mesurer l'activité biologique du MVA-hIL7-Fc, les rates sont collectées, dissociées par écrasage manuel sur tamis cellulaire de 40µm (BD Falcon #734-0002) puis après lyse des globules rouges (Tampon de lyse Sigma #R7757) et lavages, les culots cellulaires sont re suspendus en milieu de culture. Ces suspensions cellulaires sont comptées à l'aide d'un Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore) afin d'harmoniser les concentrations à $5x10^6$ cellules/mL. Les différents tests immunologiques réalisés sont décrits ci-dessous.

I/ Stimulation anti-CD3

Les plaques 96 puits (Plaque immunologie Microlon 600 stérile, Dutscher #655081) sont coatées la veille par une solution d'anti-CD3 de hamster IgG1, kappa (BD #553057) à 1µg/mL ou par du PBS 1X (Gibco #14190-094). Le lendemain, les plaques sont lavées en PBS 1X puis 0,5 x 10^6 splénocytes par puits sont cultivés 24h à 37°C dans 200µL de milieu de culture. Au bout de 24h, les surnageants sont récoltés puis conservés à -20°C avant d'être dosés.

J/ ELISA hIL-7

L'ELISA est réalisé en utilisant le kit ELISA humain IL-7 DuoSet® (R&D Systems, # DY207) conformément aux instructions du fournisseur. Il est à noter que tous les volumes de réactifs ont été divisés par deux. Les sérums ont été dilués au 1/3, puis par 5 dilutions consécutives également au tier. La concentration de chaque échantillon a ensuite été calculée en utilisant une courbe standard établie et fournie par R&D Systems, englobant des valeurs de 7,81 pg/mL à 500 pg/mL.

K/ Multiplex : MSD

Le dosage a été réalisé à la fois sur des sérums et des surnageants de splénocytes stimulés. Les splénocytes ont été ensemencés à 0,5 x 10^6 cellules par puits de plaque 96 puits, recouverts par un anticorps anti-CD3 (1µg/mL). Vingt-quatre heures plus tard, les surnageants ont été collectés et stockés à -20 ° C. Le test multiplex a été réalisé sur des sérums et des surnageants en utilisant le test U-PLEX Multiplex de MSD (Meso Scale Discovery) selon les instructions du fournisseur afin d'évaluer les cytokines suivantes : IL-

1β, IL-6, IL-10, TNFα et IFNγ. La concentration de ces cytokines dans chaque échantillon a ensuite été calculée à l'aide des courbes standards fournies par le kit.

L/ Phénotypage par cytométrie en flux

Les splénocytes sont marqués en utilisant les anticorps et réactifs suivants : solution de bloqueur Fc (Anti-CD16 / 32, clone 2.4G2), anti-CD45-PE-Cy7, anti-CD3 APC, anti-CD4 APC-H7, anti-CD8 V500, anti-CD19-PE, anti-NK1.1 PercpCy-5, marqueur de viabilité (LiveDead LV450). Tous les réactifs proviennent de chez BD à l'exception du marqueur de viabilité d'Invitrogen. L'incubation avec la solution de bloqueur Fc a été réalisée avant le marquage. Les échantillons sont ensuite analysés sur un cytomètre FACSCanto II et les données analysées en utilisant le logiciel BD Diva.

M/ Prolifération

Les plaques 96 puits (Plaque immunologie Microlon 600 stérile, Dutscher #655081) sont coatées la veille par une solution d'anti-CD3 de hamster IgG1, kappa (BD) à 1µg/mL ou par du PBS 1X (Gibco #14190-094). Le lendemain, les plaques sont lavées en PBS 1X puis 0,5.x 10^6 splénocytes/puits marquées au CFSE (CellTrace CFSE, Life Technologies) 20min à 37°C au bain marie sont cultivés 72h à 37°C dans 200µL de milieu de culture. Au bout de 72h, les cellules sont récoltées, lavées et incubées 10 minutes à 4°C avec un bloqueur des récepteurs Fc CD16/32 (2.4G2) à 2µg/mL (d1/250) puis marquée par un marqueur de viabilité cellulaire (Live/dead V450, Invitogen) et par les anticorps de surface anti-CD4 APC-H7 et CD8 PE-Cy7 (BD). Les échantillons sont ensuite analysés sur un cytomètre FACSCanto II et les données analysées en utilisant le logiciel BD Diva.

3) Mise en place des protocoles

A/ Production de cytokines, stimulation anti-CD3

La stimulation des cellules T par un anticorps anti-CD3 permet la liaison et l'activation non antigène-spécifique du complexe TCR de tous les CD3. L'anticorps anti-CD3 est habituellement coaté au fonds des puits et nous avions besoin de standardiser cette étape. Cette mise au point a donc concerné principalement le choix de la plaque de coating anti-CD3, en dosant l'Interféron-Gamma (IFN-γ) comme contrôle de l'activation.

	Caractéristiques	Fournisseur / Référence
Plaque A	Plaque de culture cellulaire 96 puits à fond plat	Dominique Dutscher / 353072
Plaque B	Plaque 96p Advanced TC plate (+++) Stérile / avec couvercle	Dominique Dutscher / 655980
Plaque C	Plaques immulon 4HBX couplage ULTRA non stérile / sans couvercle	Dominique Dutscher / 0476212
Plaque D	Plaque immunologie Microlon 600 stérile / avec couvercle	Dominique Dutscher / 655081

Tableau 4 : Références des plaques testées. *Chacune présente une technologie de plastique différentes fixant plus ou moins bien les molécules présentes dans une suspension liquide. Ici les anticorps à coaté au fond de la plaque.*

Afin de comparer ces plaques de culture (Tab. 4), elles ont été coatées la veille par une solution d'anti-CD3 de hamster IgG1, kappa (BD 553057) à 1µg/mL ou par du PBS 1X. Le lendemain, les plaques ont été lavées en PBS puis 0,5 x.10^6 splénocytes par puits ont été mis en culture 24h à 37°C dans 200µL de milieu de culture. Au bout de 24h les surnageants ont été récoltés puis conservés à -20°C avant d'être dosés. On a ensuite réalisé un test ELISA pour doser l'IFNγ (Kit Biolegend #430806).

Le coating de l'anti-CD3 sur des plaques de culture classique (plaque A) n'est pas optimal (Fig. 15). Dans ce test, les plaques B, C et D ne semblent pas différentes et permettent une production d'environ 80 000 pg/mL d'IFNɣ en 24h de stimulation contre 20 000 pg/mL pour la plaque de culture classique. Ces tests réalisés sur des splénocytes de 4 souris naïves ont permis de choisir la plaque permettant la plus forte production d'IFN-γ en 24h de stimulation.

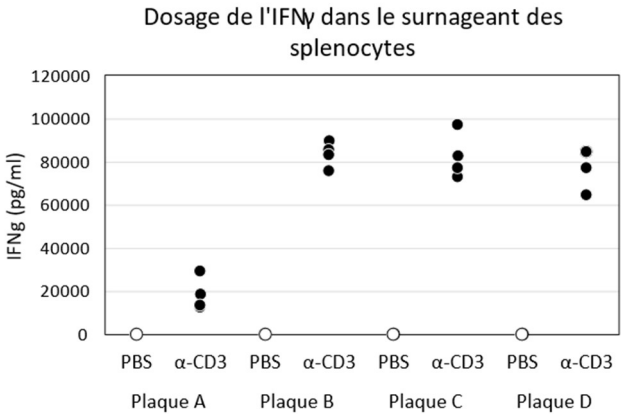


Figure 15 : Concentration d'IFNγ dans le surnageant de splénocytes stimulés (anti-CD3) *ou non stimulés (PBS) 24h en fonction du type de plaque utilisé.*

Ces données nous ont confirmés que nous devions changer de type de plaque mais pour déterminer laquelle des 3 références restantes nous allions utiliser il a fallu les tester également dans le protocole de prolifération cellulaire que nous mettions au point.

B/ Analyse de la prolifération par cytométrie en flux

Le CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) est une sonde fluorescente qui pénètre la cellule et marque de façon covalente les protéines intracellulaires. Au départ, toutes les cellules reçoivent la même quantité de colorant, les cellules en se divisant partagent uniformément le colorant qu'elles ont reçu entre leurs deux cellules filles. Par conséquent, la prolifération cellulaire peut être suivie par la diminution progressive de l'intensité de colorant dans les cellules.

Les splénocytes donc sont marqués au CFSE, puis cultivés 72h en présence d'anti-CD3 sur les 4 types de plaques (Tab. 4). Après la récolte des cellules, celles-ci sont marquées par un marqueur de viabilité (Live/dead V450, Invitrogen) et des anticorps de surface anti-CD4 APC-Cy7 et anti-CD8 PE-Cy7 (BD). Les échantillons sont ensuite analysés

sur un cytomètre Canto II (BD) via le logiciel Diva (BD). La stratégie d'analyse est représentée sur la figure 16.

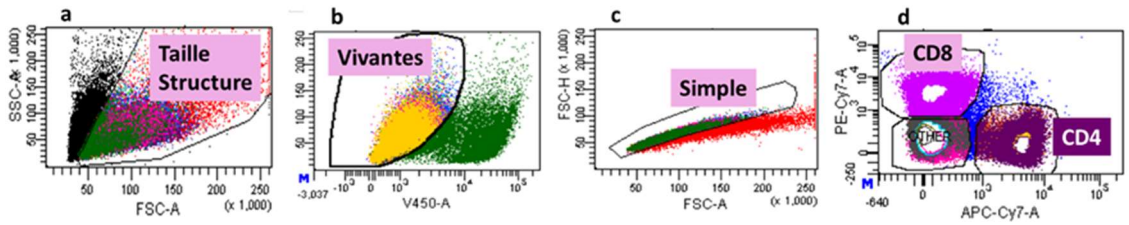


Figure 16 : Prolifération, stratégie d'analyse, *logiciel Diva (Beckton Dickinson). a) Elimination des débris en sélectionnant la bonne taille structure, b) sélection des cellules vivantes grâce à un marquage de viabilité, c) élimination des doublets de cellules, d) représentation graphique des population CD8 et CD4 de l'échantillon. L'analyse de la prolifération sera faite sur ces deux populations.*

S'il y a prolifération, on obtient un pic de fluorescence qui diminue de moitié à chaque cycle de division (Fig. 17). Grace à cette représentation, on peut réaliser le calcul d'index de prolifération et du nombre de cellules parentes parties en prolifération. L'index de prolifération représente la moyenne du nombre de cycles réalisés par les cellules en prolifération. Le pourcentage ou le nombre de cellules parentes en prolifération correspond à la population de cellules capable de proliférer. Ces deux informations sont complémentaires, puisque que le message délivré sera différent si une grande partie d'une population part en prolifération mais ne réalise qu'un cycle alors que dans un autre échantillon, une petite fraction des cellules mises en culture part en prolifération mais est capable de réaliser 4 ou 5 cycles de division. Je représenterai donc ces deux informations lors de mes analyses.

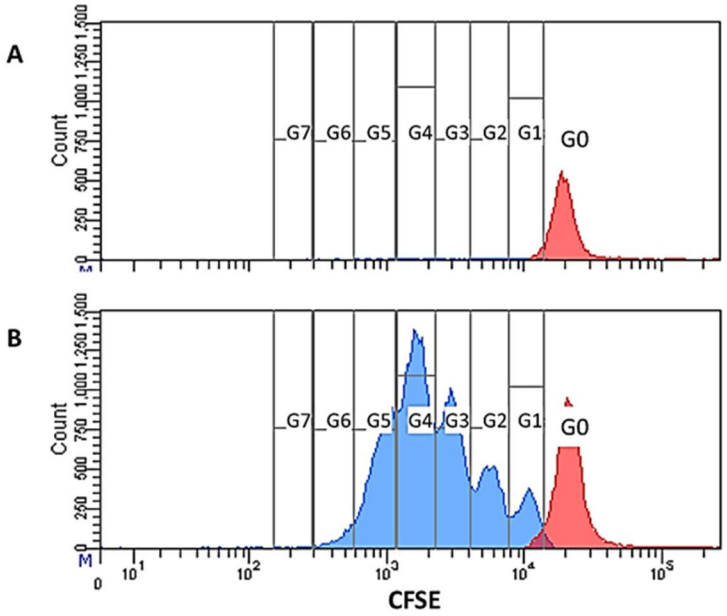


Figure 17 : Histogramme représentant la fluorescence du CFSE à chaque cycle de division cellulaire réalisé. *A : Contrôle négatif non stimulé (NS): toutes les cellules sont dans la fenêtre G0. Il n'y a pas eu de division. B : Cellules cultivés en présence d'anti-CD3 (S). La fluorescence du CFSE a été divisée par deux à chaque cycle de division réalisé. Chaque génération est représentée par les fenêtres G0 à G6.*

Afin de représenter graphiquement les résultats obtenus, j'ai calculé le nombre de cellules parentes parties en prolifération en divisant le nombre d'évènement dans le pic par 2n, « n » étant le nombre de génération (Fig.17). La génération 0 (G0) correspond aux cellules n'ayant réalisé aucun cycle cellulaire, la génération 1 (G1) aux cellules ayant réalisé un cycle, ainsi de suite. Le résultat sur les CD4 (non représenté) est similaire au CD8.

La figure 18 illustre la différence de comportement entre la plaque de culture classique (plaque A) et des 3 autres plaques. En effet même si les CD8 qui partent en prolifération sont capables de faire jusqu'à 6 cycles, si on additionne le nombre de cellules parentes CD8 parties en prolifération de chaque génération, il n'y en a que 900 environ avec la plaque A, contre 2000 avec les 3 autres plaques. A noter que la plaque C, utilisée en routine au laboratoire pour la réalisation de dosage ELISA, n'est pas stérile et n'a pas de couvercle ce qui est un problème pour une culture de 72h. La plaque B a subi un traitement de son revêtement plastique pour pouvoir fixer les cellules non ou mal adhérentes. Ce revêtement semble efficace mais nous n'avons pas eu de garantie de reproductibilité d'un lot de plaque à l'autre. Pour ces raisons, notre choix s'est porté sur la plaque D, qui est une plaque de dosage ELISA stérile.

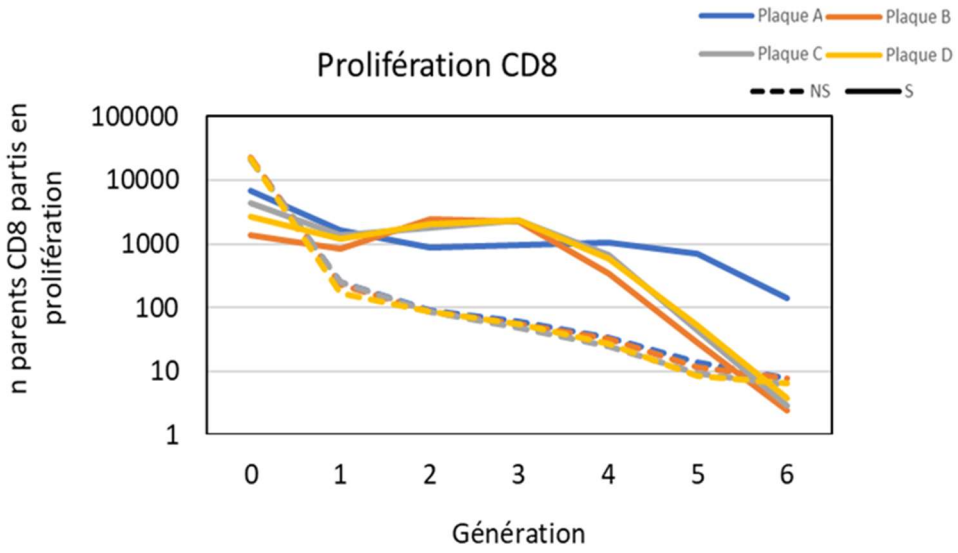


Figure 18 : Représentation du nombre de parents CD8 partis en prolifération pour chaque cycle de division sur les 4 différents types de plaques,*A, B, C, D respectivement en bleu, rouge, gris et jaune (références citées dans le tableau 4). La condition stimulé (S) représentée en trait plein et la condition non stimulée (NS) en pointillé.*

C/ Meso Scale Discovery (MSD) Multiplex

Le MSD est une technologie de dosage multiplex utilisant la technique de l'ELISA sandwich couplée à une réaction d'électro chimiluminescence. Le MSD permet de doser jusqu'à 10 analytes par puits d'une plaque 96 avec une gamme dynamique d'environ 3 log. C'est donc bien supérieur à ce que l'on peut obtenir avec les gammes colorimétriques et un volume très faible d'échantillon de 25µL par puits, avec une lecture de plaque en moins de 3 minutes.

Cette technologie n'était pas utilisée par Transgene avant mon arrivée. Cet appareillage que j'avais déjà eu l'occasion d'utiliser dans d'autres entreprises m'a paru adapté à nos besoins et à nos contraints. Pour caractériser notre modèle nous avions besoin de doser une large gamme de cytokines mais le modèle souris ne permet d'avoir qu'un faible volume d'échantillon, principalement de sérum.

Les électrodes en carbone au fond des microplaques permettent une fixation facile des réactifs biologiques (capacité de liaison 10 fois supérieure à celle du polystyrène). Les dix emplacements au fond du puits permettent de lier spécifiquement l'anticorps de capture de notre choix grâce à une sonde unique (Linker) pour chaque puits. Cette distribution peut être réalisée à façon au laboratoire ce qui permet de changer ou d'éliminer un analyte si besoin. Les tests MSD utilisent des marqueurs électrochimiluminescents (SULFO-TAGTM) qui sont conjugués à des anticorps de détection. Ces marqueurs permettent une détection ultra-sensible. L'électricité appliquée aux électrodes de la plaque par le lecteur de plaque MSD conduit à l'émission de lumière par les marqueurs. L'intensité lumineuse est ensuite mesurée pour quantifier les analytes dans l'échantillon (Fig. 19).

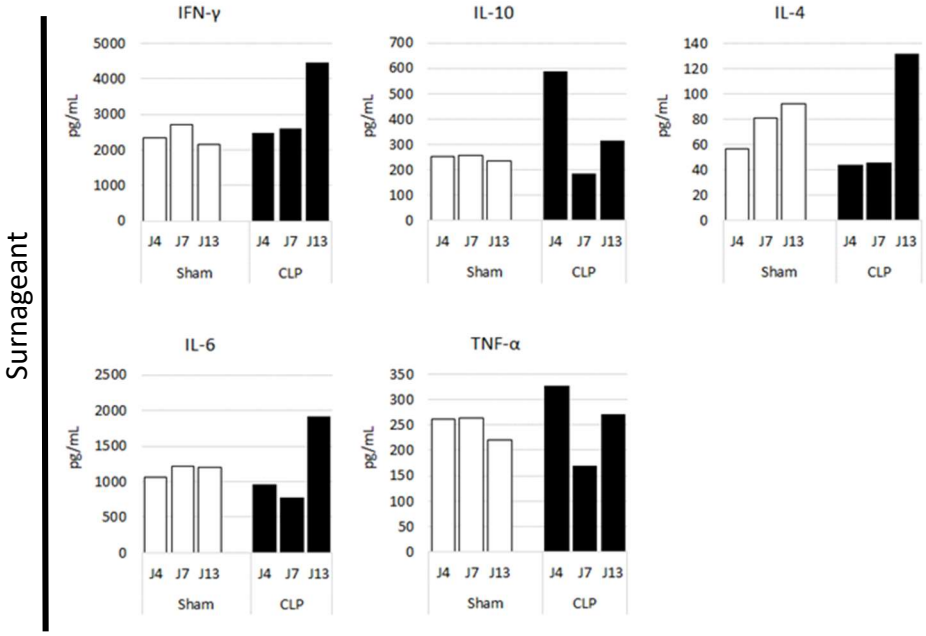
Figure 19 : Principe de fonctionnement du test MSD. *Dans une plaque 96 puits, 10 micropuits en électrode de carbone soumis à un courant électrique en présence du tampon de révélation et de l'anticorps secondaire couplé au SULFO-TAG TM vont produire une lumière détectée et quantifiée par le lecteur.*

Les splénocytes ont été stimulées 24h par anti-CD3, puis les surnageants de culture ont été prélevés afin de doser les cytokines excrétées. Ce protocole permet de mettre en évidence la bonne fonctionnalité ou l'anergie des lymphocytes T CD3+ en réaction à une stimulation TCR non spécifique par anti-CD3.

Lors de la mise au point, des pools d'anciens surnageants de splénocytes provenant de mise en culture à différents jours post CLP (J4, J7, J13 post CLP) ainsi que des sérums de souris CLP et de souris contrôle Sham (subissant une laparotomie avec seulement exposition de cæcum mais sans ligature ni ponction) ont été testé. Le panel de cytokines dosées est composé de cytokines pro inflammatoires (IFNγ, TNFα, IL6) et anti inflammatoires (IL4 et IL10). Les 5 cytokines sont dosables dans le surnageant de cellules. Seul l'IL4 n'est pas détectable dans le sérum (Fig. 20).

On peut voir que la concentration en cytokine est beaucoup plus faible dans le sérum que dans le surnageant, ce que l'on retrouvera à chaque fois pour les sérums prélevés à distance de la chirurgie CLP ou de l'injection de notre candidat.

Pour pouvoir doser chaque point, j'ai réalisé différentes dilutions des échantillons et pour que chaque échantillon soit dans sa concentration optimale de dosage, j'ai préconisé de doser les échantillons purs uniquement pour le sérum et pur et dilués au 1/10e pour les surnageants plus concentrés. Dans la suite de mes dosages, j'irai même jusqu'à une dilution au 1/100e pour les échantillons inconnus. Je n'analyserai pas ici les concentrations obtenues puisqu'il s'agit de pool uniquement destiné à estimer les concentrations que l'on pourrait attendre par la suite et pour ajuster les dilutions de travail.



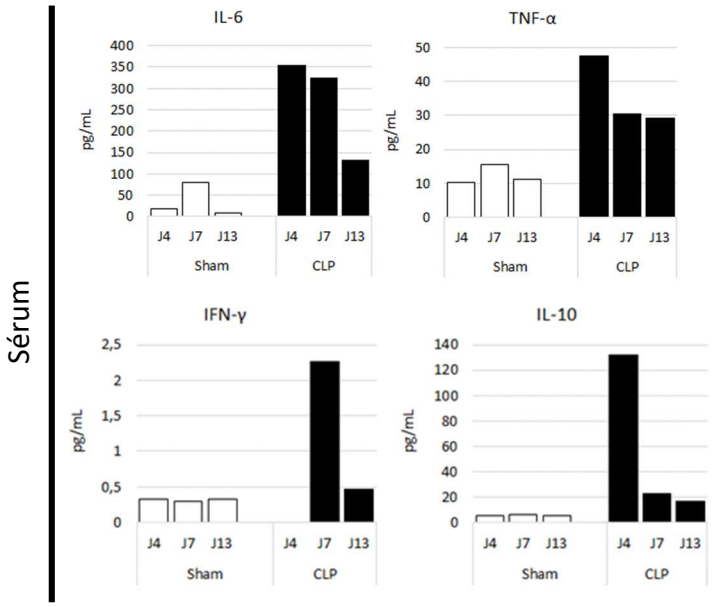


Figure 20 : Dosage MSD d'un panel de 5 Cytokines sur le sérum et le surnageant de splénocytes stimulés 24h par un anti-CD3 *(1µg/mL). L'IL4, non représentée ici, n'était pas détectable dans le sérum. Les souris contrôles Sham ont subi la même procédure chirurgicale que les CLP sans ligature et ponction du cæcum.*

D/ Mesure de l'hématocrite

Le taux d'hématocrite (en pourcentage) représente le volume occupé par les globules rouges dans un volume de sang. Il est mesuré après décantation spontanée ou accélérée (par centrifugation) du sang dans un capillaire. On observe alors la phase plasmatique, supérieure et jaunâtre, la phase érythrocytaire, inferieure et rouge et une interphase de leucocytes et de plaquettes, petite et blanchâtre.

La septicémie est souvent accompagnée d'une diminution de l'apport d'oxygène et d'une hypoperfusion des organes nécessitant des transfusions sanguine (Singer, 2016). Les seuils de transfusion étaient fixés à un hématocrite inférieur à 30 % dans les premières directives médicales, afin de limiter le phénomène de dilution à la suite de la réanimation volémique (Rivers, 2001, Dellinger, 2004).

Il nous a donc semblé intéressant de mesurer le taux d'hématocrite de nos souris CLP. Nous avions également constaté des différences de viscosité au moment du prélèvement sanguin ainsi qu'une différence de comportement du culot de globule rouge et de la couleur du sérum après centrifugation (Fig.21). Dans le protocole illustré dans la figure 21, deux culots de globules rouges sur 3 ne passent pas en dessous du gel de séparation après la centrifugation, ce qui suggère une anomalie de la densité du culot. Nous avons également noté une différence de couleur du sérum, rosé pour les souris Sham et jaune pour les deux souris CLP présentant un défaut de séparation. Cette couleur jaune du sérum pourrait nous orienter vers une défaillance d'organe.

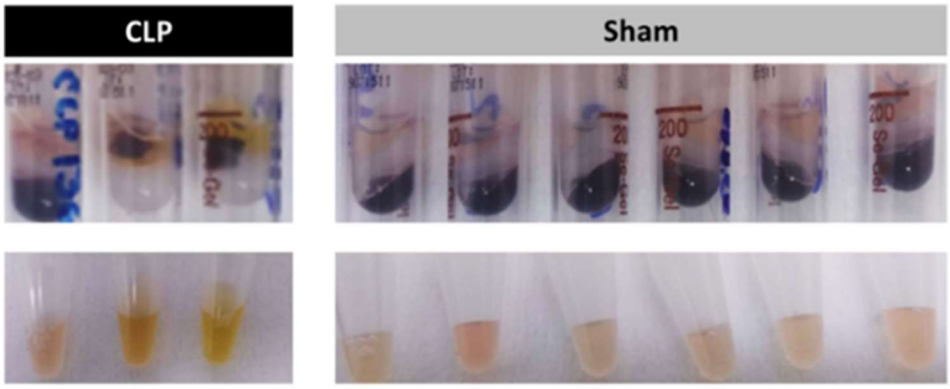


Figure 21 : Différences macroscopiques entre le sang et le sérum des souris Sham et CLP. *Le sang est prélevé en présence d'anticoagulant (EDTA) sur tube avec un gel séparateur. Après la centrifugation, 2 souris CLP présentent un défaut de sédimentation du culot globulaire et un sérum de couleur jaune. Ces observations macroscopiques nous ont conduit à mettre au point un protocole permettant de mesurer l'hématocrite.*

Dans un souci de limitation du volume sanguin prélevé à la souris (200µL), j'ai utilisé la référence de tube contenant un volume de sang réduit (18µL), sachant que les volumes classiques pour ce test se situent plutôt entre 60 et 100µL.

J'ai ensuite créé un portoir adapté aux rotors de centrifugeuse à ma disposition pour pouvoir centrifuger les capillaires à hématocrite. Pour la sécurité de la manipulation, j'ai utilisé de petits capillaires en plastique assez grand pour contenir un tube à hématocrite et capable de retenir le sang et les éclats de verres en cas de casse ou de fuite de sang. Chaque mesure sera réalisée en duplicat ou en triplicat. La vitesse de centrifugation préconisée (10 000g, 5min) n'étant pas réalisable sur nos centrifugeuses, j'ai adapté le protocole en réalisant une centrifugation de 3 100g, 30min.

Les résultats obtenus chez les souris naïves (52.9% en moyenne) sont encore au-dessus des valeurs de références (37,5 ± 2,5% Physiological Data Summary, C57BL/6J, http://jackson.jax.org). Mais ce protocole nous permet cependant de chiffrer la différence d'hématocrite entre les souris Sham et CLP.

Résultats : Cette mise au point a été réalisée à partir de sang de souris obtenu au moment du sacrifice de souris Naïves, CLP et CLP + MVA-hIL7-Fc. La figure 22 illustre par un exemple la différence de taux d'hématocrite en pourcentage entre une souris naïve et une souris CLP (54% et 34% respectivement).

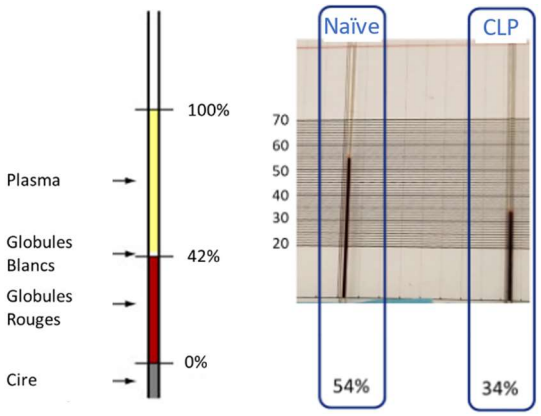


Figure 22 : Exemple de lecture du pourcentage d'hématocrite. *A gauche : représentation schématique du capillaire à hématocrite après centrifugation, la phase plasmatique, supérieure et jaunâtre, la phase érythrocytaire, inferieure et rouge et une interphase de leucocytes et de plaquettes, petite et blanchâtre. A droite : Exemple du taux d'hématocrite d'une souris Sham (54%) et une souris CLP (34%).*

Les résultats obtenus sur l'ensemble des souris de ce protocole confirment nos premières observations, le taux d'hématocrite moyen des souris Sham est de 52,8% de 42,4% pour les souris CLP (Fig.23-gauche). La robustesse des résultats est illustrée par la reproductibilité des réplicas (Fig. 23-droite).

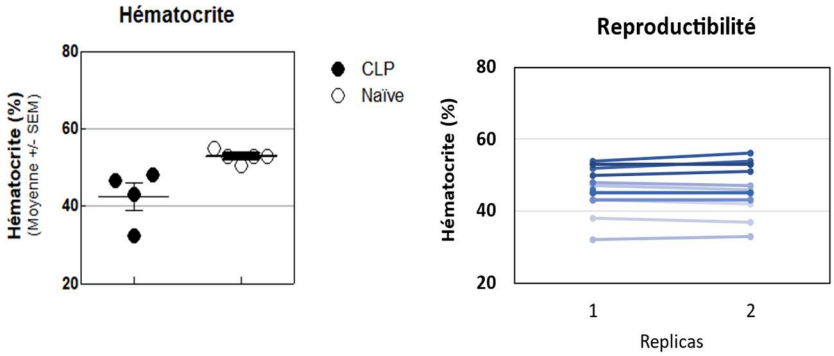


Figure 23 : Taux d'hématocrite de souris Sham et CLP. *Gauche : 18µL de sang de souris naïves (blanc) et CLP (noir) est centrifugé puis le taux d'hématocrite est lu grâce à un abaque. Droite : Chaque prélèvement de souris a été dosé en duplicats afin de moyenner les deux valeurs, cette représentation illustre la reproductibilité des réplicats.*

J'ai également cherché à mettre en évidence une corrélation entre le taux d'hématocrite et le volume total de traitements injectés tout au long du protocole (A et C) ou le dernier jour d'injection (B et D), afin d'éliminer la possibilité d'un impact des différents traitements injectés à la souris sur le taux d'hématocrite (Fig. 24).

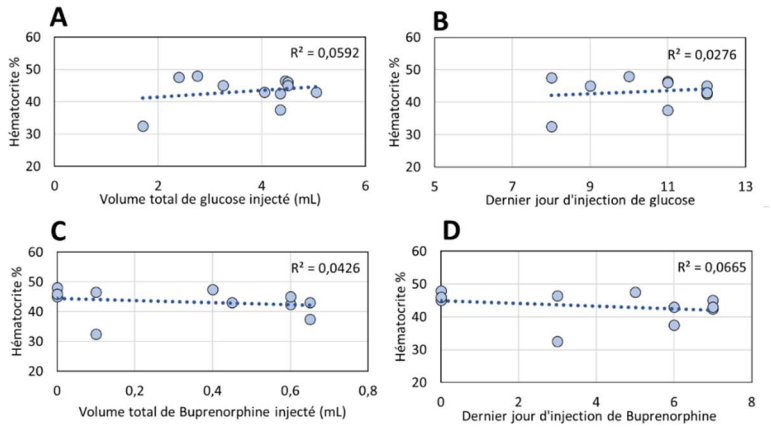


Figure 24 : Absence de corrélation entre les traitements injectés et le taux d'hématocrite

E/ Dosage Biochimique

Afin de mettre en évidence la défaillance d'organe chez les souris CLP nous avons voulu réaliser des analyses biochimiques sur les sérums de souris CLP. Dans un premier temps nous avions envisagé de faire les analyses nous-même mais les automates d'analyse sanguine vétérinaire sont chers et demandent une maintenance régulière. De plus, les kits de dosage consomment beaucoup de matériel biologique alors que nous n'avions que 100µL de sérum à disposition. Nous avons finalement contacté un laboratoire d'analyse vétérinaire près de Lyon qui, bien que non spécialiste de la souris, a accepté immédiatement et avec beaucoup d'enthousiasme de réaliser nos analyses.

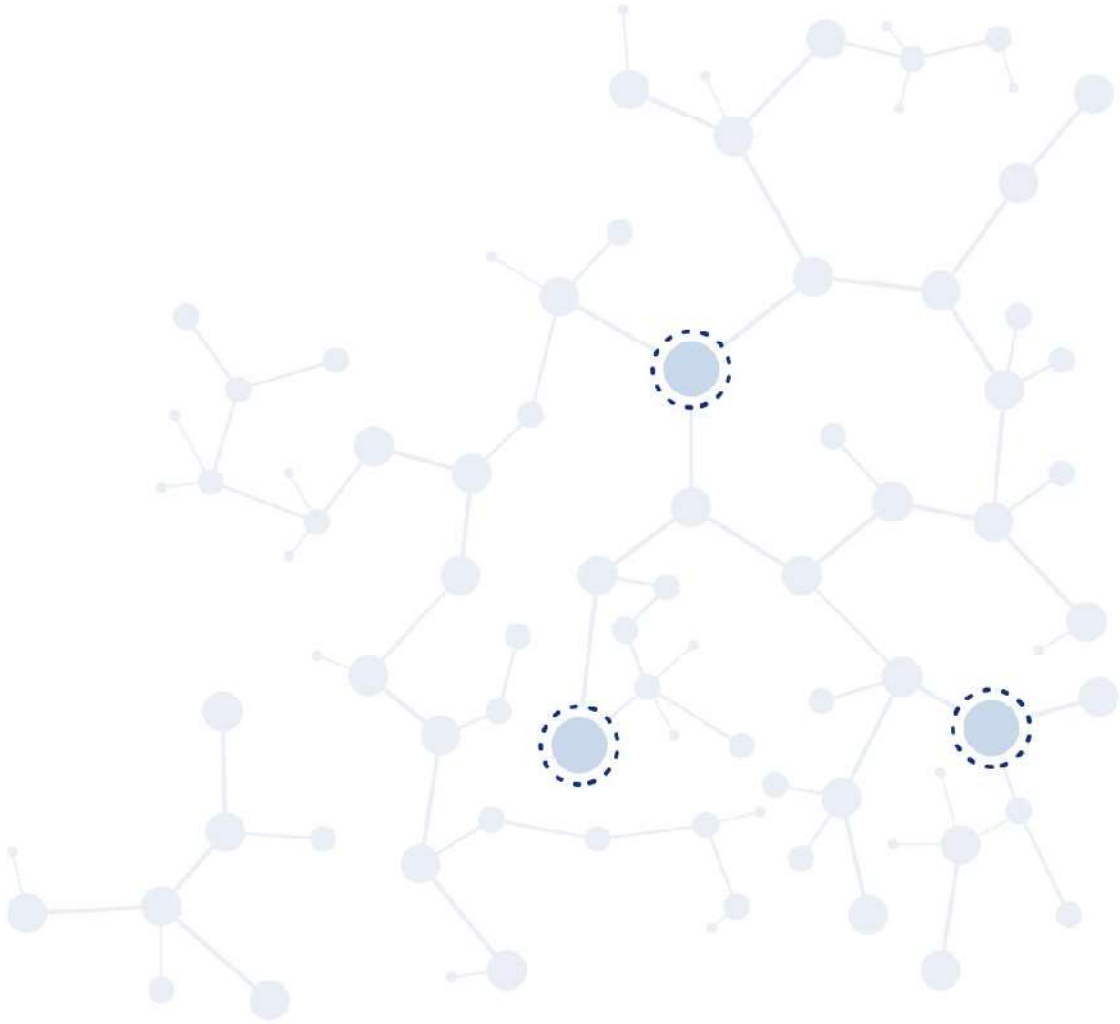
Plusieurs questions se sont alors posées : le volume de sérum disponible étant très faible, nous avons calculé au plus juste un volume de 90µL de sérum par souris nécessaire au dosage.

L'envoi de sérum pour des souris injectées par le MVA-hIL7-Fc classé OGM de niveau 2 est règlementé et même si le risque est faible de retrouver des particules virales 3 jours après l'injection, ce sérum doit être manipulé sous PSM. Ce type d'équipement n'existant pas dans le laboratoire d'analyse, nous avons opté pour la filtration, en utilisant des inserts filtrants de 0,1µM (Milipore). Le sérum (100µL) est filtré par centrifugation à travers un insert pour récupérer le volume nécessaire de 90 µL. Les sérums sont conservés, manipulés et envoyés à 4°.

Afin de caractériser au mieux la défaillance d'organe spécifique à la CLP nous avons choisi de réaliser les dosages suivants : Défaillance hépatique : ASAT (Aspartate aminotransférase), ALAT (alanine transaminase, Bilirubine Conjuguée, Bilirubine Totale, Gamma GT (gamma-glutamyltranspeptidase), Défaillance rénale : Créatinine, Défaillance cardiaque :CK (créatine kinase), Défaillance multiple : PAL (phosphatases alcalines), LDH (lactate déshydrogénase).

Les échantillons étaient anonymisés et les résultats envoyés par mail par le laboratoire

RÉSULTATS



IV/ RÉSULTATS - 1ère partie : CARACTÉRISATION DU MODÈLE CLP

La phase de mise en place de la partie chirurgicale du modèle murin CLP terminée, nous avons caractérisé le modèle tel qu'il existe entre nos mains. Pour cela les dosages et analyses détaillés précédemment nous ont permis d'évaluer le système immunitaire inné et adaptatif de l'hôte dans le modèle. Je ne présenterai dans cette partie que les résultats que j'ai plus particulièrement générés. Ces études étant néanmoins un travail d'équipe, certains résultats cités pourront être consultés dans notre récente publication (Lélu, 2022).

Les deux objectifs de cette caractérisation étaient : *1)* la mise en évidence de l'immunosuppression induite par la CLP chez la souris à la fois dans le système immunitaire inné et adaptatif et *2)* la détermination du jour d'injection de notre thérapie, tout en restant le plus proche possible du parcours clinique d'un patient septique.

1) Mortalité

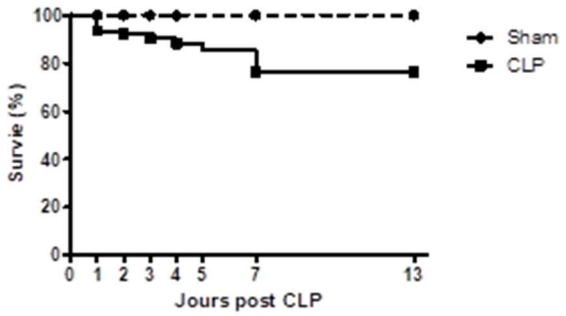


Figure 25 : Taux de survie des souris Sham et CLP à 13 jours post-CLP. *5 expériences au total : 1 expérience pour les jours 1, 2 et 3 et 2 expériences pour les jours 4, 7 et 13 avec 6 à 9 souris/groupe/expérience.*

La survie est représentative de la gravité du modèle CLP ; elle a été suivie chez les souris Sham et subissant une chirurgie CLP durant 13 jours. Ce graphique (Fig. 25) représente 5 expériences au total. Le taux de survie de 76.6% démontre que notre modèle est de grade modéré, ce qui était la gravité recherchée. En effet, le but étant d'intervenir après phase aigüe de l'inflammation, nous avions besoin que les souris restent en vie les premiers jours pour qu'elles puissent recevoir le traitement mais que la gravité soit suffisante pour mettre en évidence l'efficacité de notre candidat.

2) Populations cellulaires

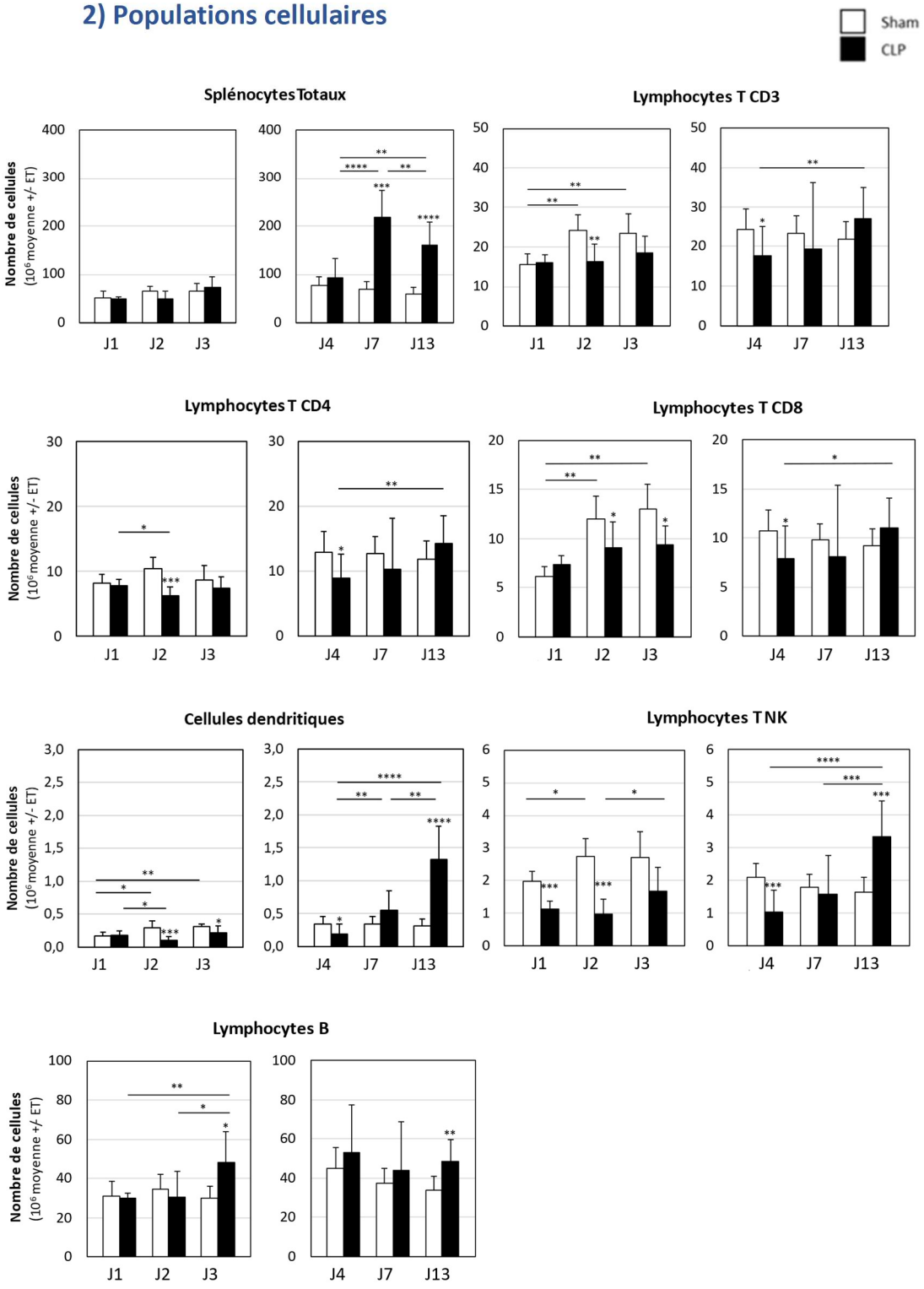


Figure 26 : Populations cellulaires des splénocytes des souris Sham et CLP. *Les splénocytes ont été prélevés à 1, 2, 3, 4, 7 et 13 jours post-opératoires sur des souris Sham (blanc) et CLP (noir). Les sous-ensembles de cellules vivantes ont ensuite été analysés dans 2 séries d'expériences distinctes, J1/J2/J3 et J4/J7/J13, par cytométrie en flux en utilisant les combinaisons suivantes de marqueurs de surface cellulaire : lymphocytes T CD3 (CD3+), lymphocytes T CD4 (CD3+ B220-NK1.1-CD4+ ou CD3+CD4+), cellules T CD8 (CD3+B220-NK1.1-CD8+ ou CD3+CD8+), lymphocyte B (NK1.1-B220+ ou CD3-CD19+), cellules NK (B220-NK1.1+ ou CD3-NK1.1+), cellules dendritiques (CD3-CD19-CD11b-CD11c +Ly6c-Ia/Ie+ ou CD3-CD19-CD11c+Ia/Ie+). Les données représentent 6-9 souris/groupe (J1/J2/J3, 1 expérience) et 8-15 souris/groupe (J4/J7/J13, 2 expériences indépendantes). Test U de Mann-Whitney : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.*

L'analyse des différentes populations cellulaires de la rate aux jours 1, 2, 3, 4, 7 et 13 après la CLP met en évidence l'établissement de l'immunosuppression par la baisse de certaines populations cellulaires chez les souris CLP par rapport aux souris Sham (Fig. 26). C'est le cas pour les lymphocytes T CD4+, CD8+ et NK dont le nombre est diminué chez les souris CLP. Cette diminution est significative aux jours 2 et 4 pour les CD4+, aux jours 2, 3 et 4 pour les CD8+ et aux jours 1, 2 et 4 pour les lymphocytes T NK. La tendance s'inverse à J7 et 13 où l'on peut observer une restauration du nombre des CD4+, CD8+ et T NK. Les cellules dendritiques, dont le rôle est d'induire des réponses immunitaires en activant les lymphocytes T voient leur nombre diminué également, et de manière significative aux jours 2, 3 et 4. On observe ensuite une normalisation de leur nombre à J7, avant un rebond du nombre de ces cellules à J13.

Cette lymphopénie, ainsi que la baisse des cellules dendritiques dans la rate, étaient attendues, car elles correspondent à ce que nous attendions de ce modèle CLP. D'après ces premières données, elles sont cependant transitoires, ce qui nous imposera d'injecter notre thérapie avant le jour 7.

3) Tolérance au LPS

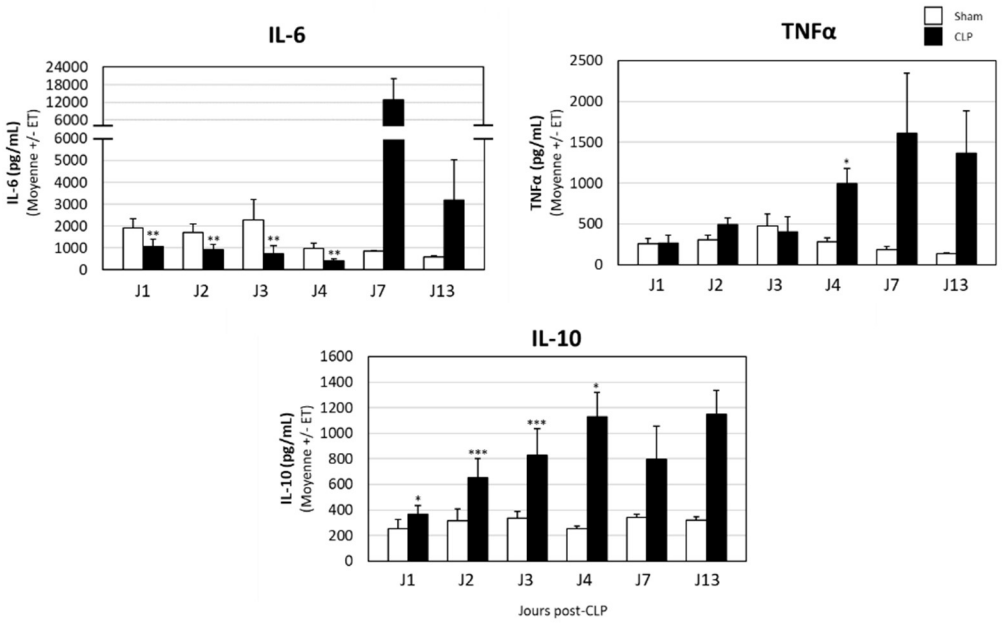


Figure 27 : Tolérance au LPS des souris Sham et CLP. *5 x 10^5 splénocytes/puits de souris Sham (blanc) et CLP (noir) ont été stimulés avec du LPS (1 µg/mL) pendant 24h. Les cytokines ont été mesurées dans le surnageant à l'aide du kit de test U-PLEX Multiplex (MSD). Une expérience réalisée pour chaque temps. 2-6 souris et 4-9 souris/groupe dans les groupes Sham et CLP, respectivement. Test U de Mann-Whitney : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001.*

Le test de tolérance au LPS est réalisé afin de mettre en évidence la non-réponse des cellules après une stimulation par le LPS du récepteur TLR4 (Tool like receptor 4) à la surface des cellules myéloïdes (Fig.27). À la suite d'une stimulation par le LPS des splénocytes des souris CLP, ceux-ci produisent significativement moins d'IL-6 aux jours 1 à

4. On observe un rebond de la production d'IL6 au jour 7. La production de TNFα montre un profil de sécrétion différent dans le temps. La production de TNFα n'est pas significativement diminuée aux jours précoces, mais aux jours 4, 7 et 13 on observe une forte augmentation de la production de TNFα chez les souris CLP. En parallèle, nous avons dosé l'IL-10, qui est une cytokine anti inflammatoire. Sa production est augmentée chez les souris CLP tout au long des 13 jours, ce qui pourrait expliquer en partie la tolérance des premiers jours. Ces résultats montrent un défaut de production de cytokines par la composante innée du système immunitaire des souris CLP jusqu'à 4 jours après la CLP. Dans le cas du sepsis, une tolérance peut entrainer une incapacité du système immunitaire inné à combattre la première infection, qui est la cause du sepsis ou des infections secondaires.

4) Cytokines circulantes dans le sérum

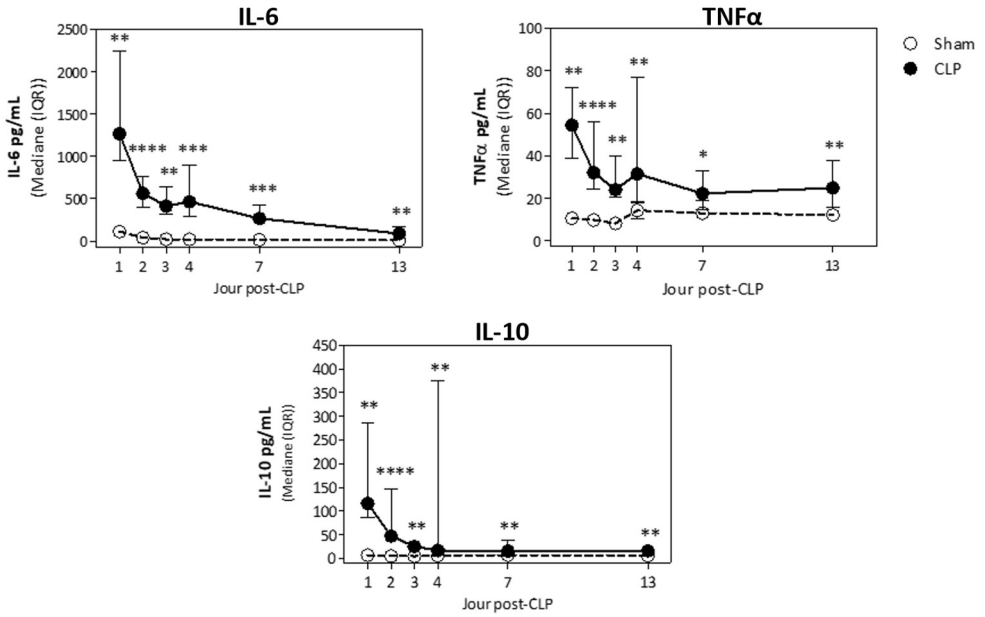


Figure 28 : Cytokines circulantes dans le sérum de souris Sham et CLP. *Du sang de souris Sham (blanc) et CLP (noir) a été prélevé 1, 2, 3, 4, 7 et 13 jours après la chirurgie et les cytokines ont été mesurées dans le sérum à l'aide du kit de dosage U-PLEX Multiplex (MSD). Sham : 8-17 souris/groupe. CLP : 9-20 souris/groupe. Une et deux expériences réalisées pour les points de temps J1/J2/J3 et J4/J7/J13, respectivement, médiane IQR. Test U de Mann-Whitney : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001 par rapport au groupe Sham.*

Le dosage des cytokines dans le sérum permet d'observer la phase d'hyper-inflammation post CLP chez la souris (Fig. 28). Nous avons détecté des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNFα, en forte concentration le premier jour après la chirurgie, puis leur concentration dans le sérum baisse les 7 jours suivants. Les deux cytokines restent cependant significativement plus concentrées chez les souris CLP à jour 13 par rapport au souris Sham. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire augmentée dans le sérum aux jours 1, 2, 3 et 4 après la CLP, en accord avec la mise en place par le système immunitaire d'une stratégie anti-inflammatoire dans le sepsis. Concernant les souris Sham, la légère

hausse du niveau d'IL-6 le premier jour après la chirurgie démontre que la chirurgie seule ne suffit pas à entrainer une hyper inflammation et que la forte charge cytokinique des premiers jours est bien due aux deux facteurs de la CLP (la ligature et l'infection) et non pas à la laparotomie.

5) Réponse cytokinique des lymphocytes T à une activation anti-CD3.

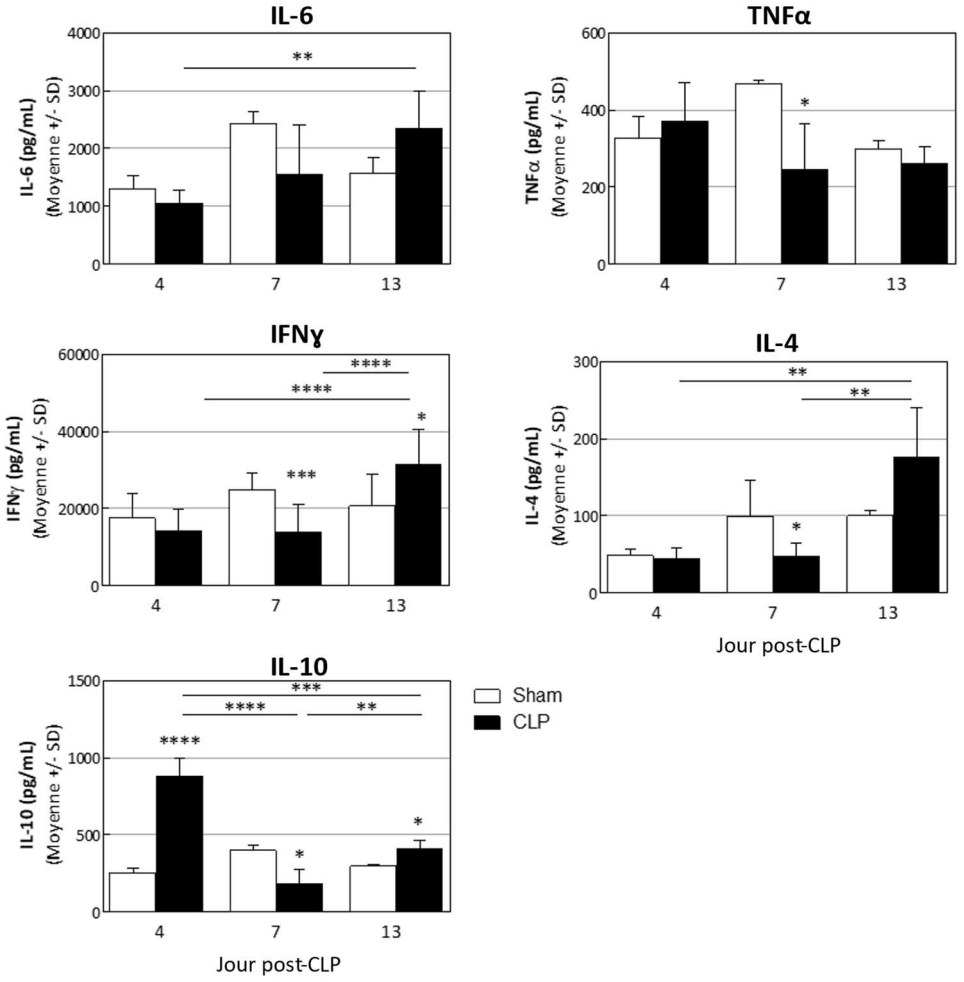


Figure 29 : réponse cytokinique à une stimulation anti-CD3 des souris Sham et CLP. *Des splénocytes (5x10^5 cellules/puits) de souris Sham (blanc) et CLP (noir) ont été stimulés avec un anticorps anti-CD3 coaté (1 µg/mL) pendant 24h et les cytokines libérées dans le surnageant ont été mesurées par U- Kit de test PLEX Multiplex (MSD, jours 4, 7 et 13). Deux expériences indépendantes, 11-15 souris/groupe, moyenne +/- SD. Test U de Mann-Whitney : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.*

La stimulation anti-CD3 permet de mettre en évidence l'anergie des lymphocytes T, c'est-à-dire leur incapacité à répondre à une stimulation non antigénique, ce qui est le reflet d'une stimulation du système immunitaire adaptatif. Le dosage des cytokines en multiplex n'a donc été réalisé que sur les temps 4, 7 et 13 jours, puisque nous voulons voir ici les effets sur la partie adaptative plus tardive (Fig. 29). Alors que l'IL-10 (anti-inflammatoire) est significativement augmenté au jour 4 et au jour 13, il semble diminué au jour 7. Les cytokines pro-inflammatoire (TNFα, IL-4, IFNγ) sont augmentées au jour 13.

La tendance à la baisse de la réponse cytokinique est présente à jour 4 (non significative) et à jour 7 (significative), puis disparaît au jour 13, où la réponse semble même être augmentée.

Ces résultats démontrent que le défaut de production de cytokines et donc l'anergie des lymphocytes T et du système immunitaire adaptatif est effectif aux jours 4 et 7. Elle est cependant transitoire puisque l'on observe un rebond de la réponse à J13. Pour cette raison, l'injection de notre candidat ne devrait pas être faite trop tardivement si nous voulons voir l'effet attendu sur le système adaptatif.

6) Prolifération des lymphocytes T

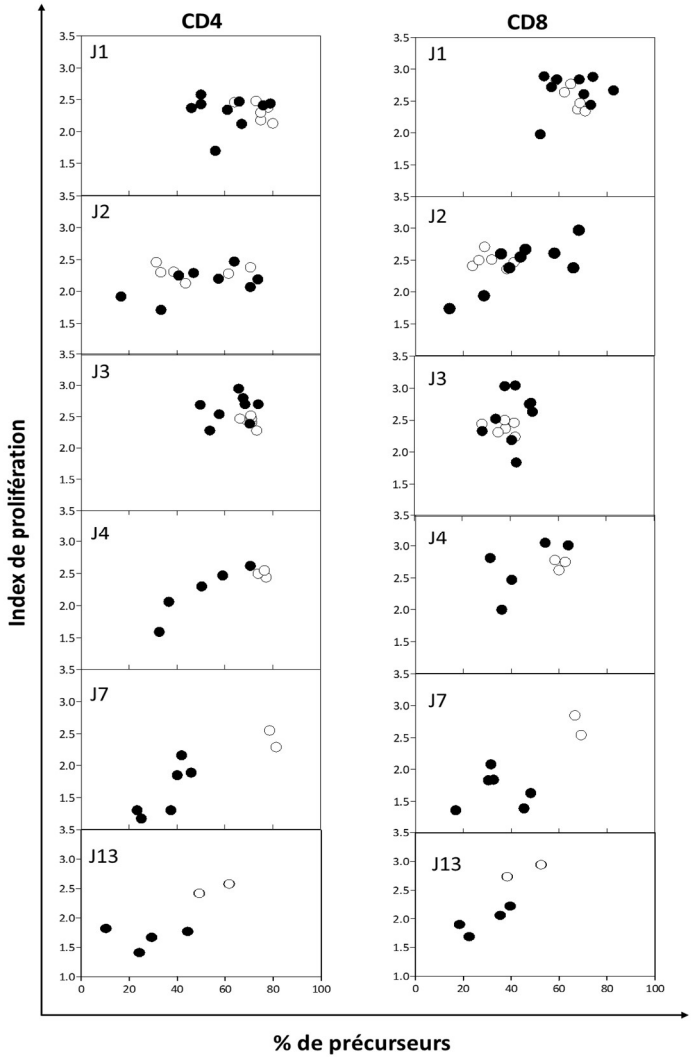


Figure 30 : Prolifération des cellules T. *Des splénocytes de souris Sham (blanc) et CLP (noir) ont été récoltés 1, 2, 3, 4, 7 et 13 jours après la chirurgie. Les cellules marquées au CFSE ont ensuite été stimulées avec un anticorps anti-CD3 enrobé (1 µg/ml) pendant 72 h. La prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 a ensuite été analysée par cytométrie en flux. Calcul du % de Précurseurs= (Somme des parents avec CFSE dilué / Parents totaux) x 100. Indice de prolifération = (Somme du nombre total de divisions) / (Nombre de cellules qui sont entrées en division). Une expérience/temps. Le dosage des jours 4, 7 et 13 a été réalisé dans une même expérience, et les protocoles des jours 1, 2 et 3 ont été réalisés individuellement.*

L'étude de la prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ à la suite d'une stimulation anti-CD3 de 72h montre un défaut de prolifération des lymphocytes T des souris CLP (Fig. 30) par rapport aux souris Sham. L'index de prolifération, ainsi que le pourcentage de précurseurs des lymphocytes T capables de réaliser un ou plusieurs cycles de division, sont fortement diminués à partir du jour 4 et ce défaut de prolifération est maintenu jusqu'au jour 13. Ce résultat, obtenu sur 2 expériences, montre une altération à long terme du système immunitaire adaptatif jusqu'à 13 jours après la chirurgie.

7) Conclusion de la caractérisation du modèle CLP

Cette analyse longitudinale avait pour but de démontrer la progression des déficiences du système inné et adaptatif de l'hôte. Le modèle CLP n'avait jamais été utilisé dans le laboratoire et sa mise en place a été longue et complexe. Il était nécessaire de valider et d'illustrer les atteintes immunitaires liée à la CLP chez la souris pour pouvoir ensuite se comparer à la littérature existante, choisir le meilleur moment d'injection du MVA-hIL7-Fc et mieux démontrer les effets de notre thérapie sur les deux composantes, innée et adaptative, du système immunitaire.

L'atteinte précoce du système immunitaire inné est visible dès le premier jour après la chirurgie CLP. Les splénocytes ont une réponse cytokinique significativement réduite (cytokines pro-inflammatoires : IL6 et TNFα) en réponse au LPS, ce qui révèle une tolérance immunitaire au LPS induite par la CLP. Elle sera détectée dans la rate au moins jusqu'au troisième jour après la chirurgie. Cet effet est transitoire puisque 7 et 13 jours après la chirurgie, on observe un rebond de production de cytokines.

La lymphopénie, qui est une des principales caractéristiques de l'immunodépression, a pu être mise en évidence 2 à 4 jours après la chirurgie CLP. Le nombre de lymphocytes T CD4+, CD8+ et NK est significativement diminué chez les souris CLP par rapport aux souris Sham. Cette diminution est significative aux jours 2 et 4 pour les CD4+, aux jours 2, 3 et 4 pour les CD8+ et aux jours 1, 2 et 4 pour les lymphocytes T NK.

La réponse immunitaire adaptative a également été rapidement diminuée dans notre modèle CLP, comme le montre la réduction significative de la production d'IFNγ par les cellules T, seulement 2 jours après la CLP et à la suite d'une stimulation anti-CD3. Plus important encore, il a été démontré que les souris CLP présentaient une réponse adaptative altérée de longue durée, caractérisée par une capacité réduite des lymphocytes T à proliférer pendant au moins 13 jours après la CLP.

Ce résultat et ceux obtenus lors du test de tolérance au LPS illustrent les défaillances du système immunitaire de la souris. Aux jours 7 et 13, la réponse innée n'est plus diminuée et se trouve même significativement augmentée, tandis que la prolifération des lymphocytes T reste perturbée jusqu'au jour 13, donc différentes altérations sont observées mais avec des cinétiques et des persistances différentes suivant l'activité

regardée. Ces résultats illustrent la difficulté du système immunitaire à revenir à son état d'homéostasie. L'ensemble de ces résultats démontre la capacité de notre modèle de chirurgie CLP décrit jusqu'à 13 jours après la CLP, à évaluer de nouvelles immunothérapies ciblant le système immunitaire inné et adaptatif de l'hôte lors de la phase d'immunodépression.

Les souris seront traitées par une injection intra veineuse de MVA-hIL7-Fc 4 jours après la CLP. De cette manière, l'immunosuppression aura eu le temps de s'installer et le rétablissement de certaines fonctions immunitaires que nous observons le jour 7 et le jour 13 n'aura pas encore eu lieu.

V/ RÉSULTATS - 2ème PARTIE : PREUVE DE L'EFFICACITÉ DU MVA-hIL7-Fc DANS LE MODÈLE CLP MURIN

1) Protocole d'évaluation du MVA-hIL7-fc dans le modèle CLP

Afin d'évaluer la capacité de notre candidat à restaurer l'immunité innée et adaptative chez les souris immunodéprimées, nous avons réalisé différentes procédures au cours des deux dernières années. Dans ce mémoire, je présenterai plus particulièrement la partie concernant la restauration de l'immunité adaptative pour laquelle les expériences ont été faites selon le modèle ci-dessous (Fig. 31). Nos analyses statistiques nécessitant un nombre de souris suffisant, certaines procédures ont été répétées plusieurs fois.

La voie d'injection retenue à la suite des expériences de pharmacocinétique sur les souris Naïves est la voie intra-veineuse (IV) (Lélu,2022).

Les souris étaient opérées à JO, recevaient une dose de 10^7PFU/souris ou 10^8PFU/souris de MVA-hIL7-Fc ou 10^8PFU/souris de MVA-Vide ou 5µg de protéine humaine IL-7 (hIL-7) à J4. Le MVA-Vide correspond au virus MVA contrôle sans le matériel génétique codant pour la protéine hIL-7fc.

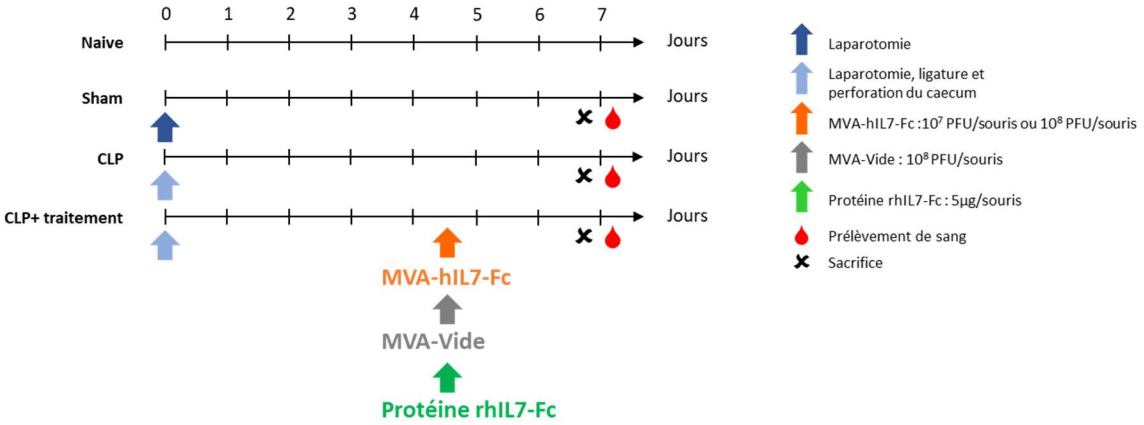


Figure 31 : Chronogramme des expériences réalisées sur les souris CLP *afin de mettre en évidence une immunorestauration à la suite du traitement des souris CLP par le MVA-hIL7-Fc.*

Le matin du jour 7, les souris sont euthanasiées afin de procéder au prélèvement du sang et de la rate. Le sang, le sérum et les splénocytes sont ensuite étudiés comme détaillé dans la partie Matériel et méthodes.

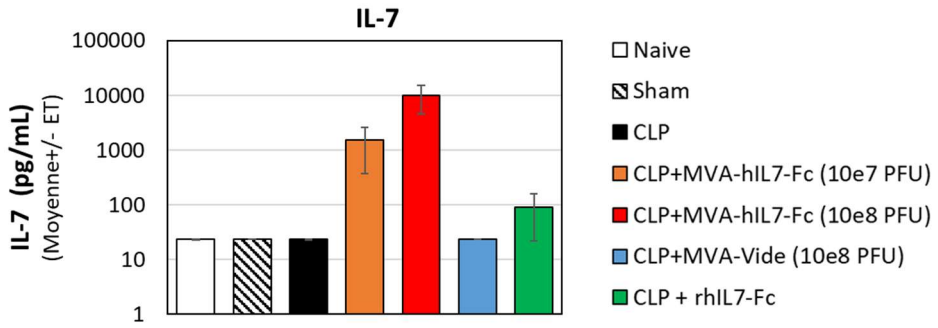


Figure 32 : Il-7 humaine circulante dans le sérum des souris à J7 après la CLP et J3 après le traitement. *Naives : 33 souris, Sham : 5 souris, CLP : 22 souris, MVA 10^8 : 24 souris, MVA 10^7 : 19 souris, CLP+rhIL7-Fc : 14 souris, MVA-Vide : 6 souris.*

Lors de cette étude visant à mettre en évidence l'efficacité du MVA-hIL7-Fc dans notre modèle CLP murin, nous avons testé deux doses de traitement : 10^7PFU et 10^8PFU de MVA-hIL7-Fc par souris injectés par voie IV, 4 jours après la chirurgie. La dose la plus élevée nous a permis de voir les effets de notre thérapie basée sur un MVA recombinant exprimant l'hIL7-Fc et de la comparer au vecteur viral vide. Dans un second temps, nous avons diminué la dose injectée afin de nous rapprocher de la dose qui serait utilisée chez l'homme dans de futures études cliniques. Dans cette deuxième partie de résultats, nous comparerons la dose 10^7PFU avec l'injection de la cytokine humaine hIL-7-Fc identique à celle produite par le MVA.

La concentration d'hIL7-Fc dosée dans le sérum des souris contrôle, CLP et CLP traitées est augmentée uniquement dans les groupes traités par le MVA-hIL7-Fc ou la protéine recombinante rhIL7-Fc (Fig. 32). La concentration en hIL7-Fc reflète la dilution d'un facteur 10 appliquée à la dose de MVA au moment du passage de la dose forte à la dose faible. L'injection de protéine rhIL-7-Fc entraine une concentration cytoplasmique de MVA 10 fois inferieure à la dose faible de MVA-hIL7-Fc.

2) Comparaison de l'activité du MVA-hIL7-Fc vs le MVA-Vide

Notre thérapie est innovante par sa double composition : le vecteur MVA et la cytokine hIL-7-Fc. Les premiers résultats ont été générés en comparant l'efficacité du MVA-hIL7-Fc et du MVA-Vide à une dose élevée de 10^8PFU/Souris. Le but était de mettre en évidence la valeur ajoutée de l'hIL-7Fc dans le MVA.

A/ Observations cliniques et dosages sanguins

a) Mortalité

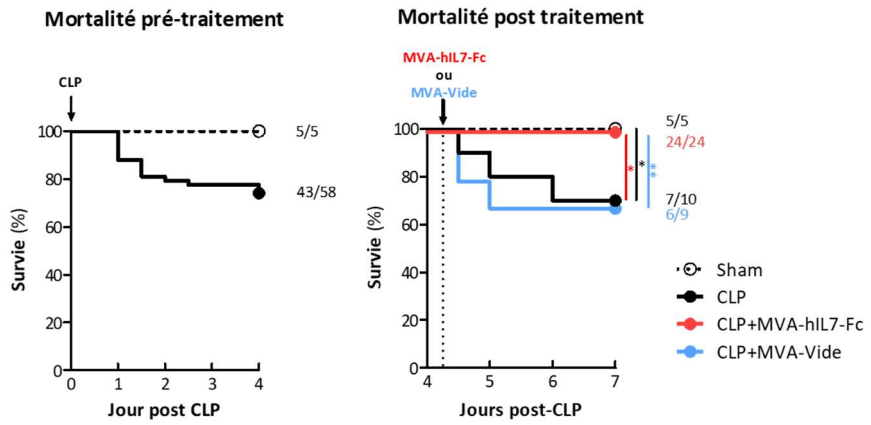


Figure 33 : Taux de survie des souris Sham et CLP avant et après le traitement à J4. *Après J4, les souris survivantes sont réparties en 4 groupes, Sham, CLP, CLP+MVA-hIL7-Fc (10^8PFU) ou CLP+MVA-Vide (10^8PFU). 3 expériences au total avec respectivement 5/10/24/9 souris/groupe. Log-rank test, *, p<0,05 ; **, p<0,01.*

Le taux de survie de ces trois expériences est de 73%, ce qui correspond aux résultats obtenus lors de la caractérisation du modèle CLP. Les souris survivantes au jour 4 sont réparties en 3 groupes, un groupe CLP, un groupe traité par le MVA-hIL7-Fc (10^8PFU) et un groupe contrôle traité par la plateforme virale seule : MVA-Vide (10^8PFU).

Le suivi de la survie des souris jusqu'à J7 montrent un effet du traitement par le MVA-hIL7-Fc sur la mortalité (Fig.33). On n'observe aucune perte dans le groupe traité et le groupe control Sham contre 3/10 souris et 3/9 souris mortes dans les groupes CLP et CLP traités par le contrôle MVA-Vide.

b) Perte de poids

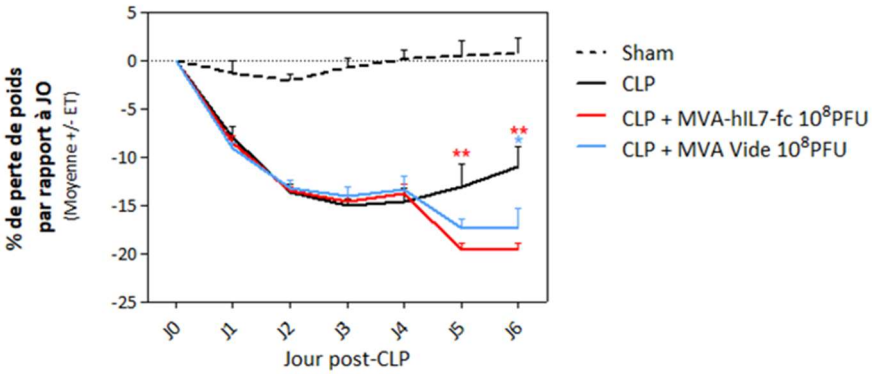


Figure 34 : Perte de poids par rapport au J0 avant la chirurgie. *La perte de poids a été mesurée dans 3 expériences distinctes. Deux expériences comparant le groupe CLP et le groupe CLP+MVA-hIL7-Fc et 1 expérience comparant les groupes CLP+MVA-hIL7-Fc et CLP+MVA-Vide. Les trois expériences cumulées représentent : 5/10/24/9 souris dans les groupes Sham/CLP/ CLP+MVA-hIL7-Fc/ CLP+MVA-Vide Test U de Mann-Whitney : *, p<0,05 ; **, p<0,01 à J5 et J6.*

La perte de poids est un critère de surveillance de la souffrance de l'animal. La chirurgie CLP entraine une perte de poids maximum d'environ 15% du poids corporel. Au jour 4, les souris CLP reprennent du poids, alors que l'injection du traitement entraine une nouvelle chute de poids dans les deux groupes MVA-hIL7-Fc et MVA-Vide (Fig. 34). Cette baisse était attendue compte tenue de l'activité du MVA. Malgré cette perte de poids supplémentaire, nous n'avons noté aucune perte dans le groupe traité par le MVA-hIL7-Fc.

c) Cytokines circulantes dans le sérum

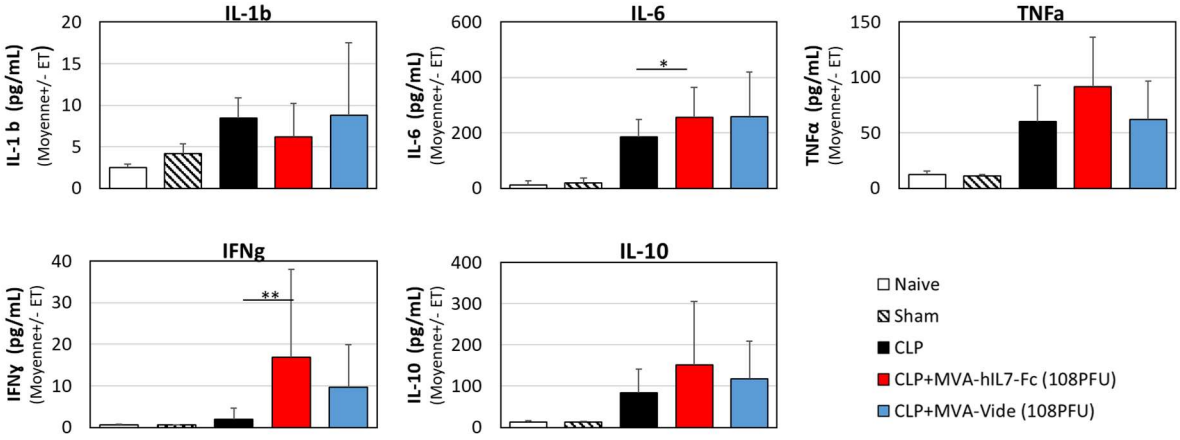


Figure 35 : Cytokines circulantes dans le sérum de souris Sham, CLP et CLP traitées. *Du sang de souris Naïves (blanc), Sham (rayé), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^8PFU) (rouge) et CLP+MVA-Vide (10^8PFU) (bleu) a été prélevé 7 jours après la chirurgie, donc 3 jours après le traitement et les cytokines ont été mesurées dans le sérum à l'aide du kit de dosage U-PLEX Multiplex (MSD). Naives : 15 souris/groupe, Sham : 5 souris/groupe, CLP : 7 souris/groupe, CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^8PFU): 24 souris/groupe, CLP+MVA-Vide (10^8PFU) : 6 souris/groupe. Trois expériences réalisées, Test U de Mann-Whitney uniquement pour comparer les groupe CLP/ CLP+MVA-hIL7-Fc/ CLP+MVA-Vide : *, p<0,05 ; **, p<0,01.*

Le dosage par MSD des cytokines circulantes dans le sérum des souris prélevées 7 jours après la CLP et 3 jours après l'injection du traitement montre une élévation des cytokines pro et anti-inflammatoires dans les groupes CLP avec une exacerbation de ce taux dans le groupe CLP+MVA-hIL7-Fc (Fig. 35). On observe plus particulièrement l'augmentation d'un facteur 10 de la concentration d'IFNγ après l'injection de notre candidat. On ne retrouve pas de différences significatives de cytokines produites et retrouvées dans le sérum entre notre traitement et le MVA-Vide, même s'il existe une tendance pour une plus forte concentration de TNFα, IFNγ et IL-10 après l'injection du MVA-hIL7-Fc.

d) Phénotypage

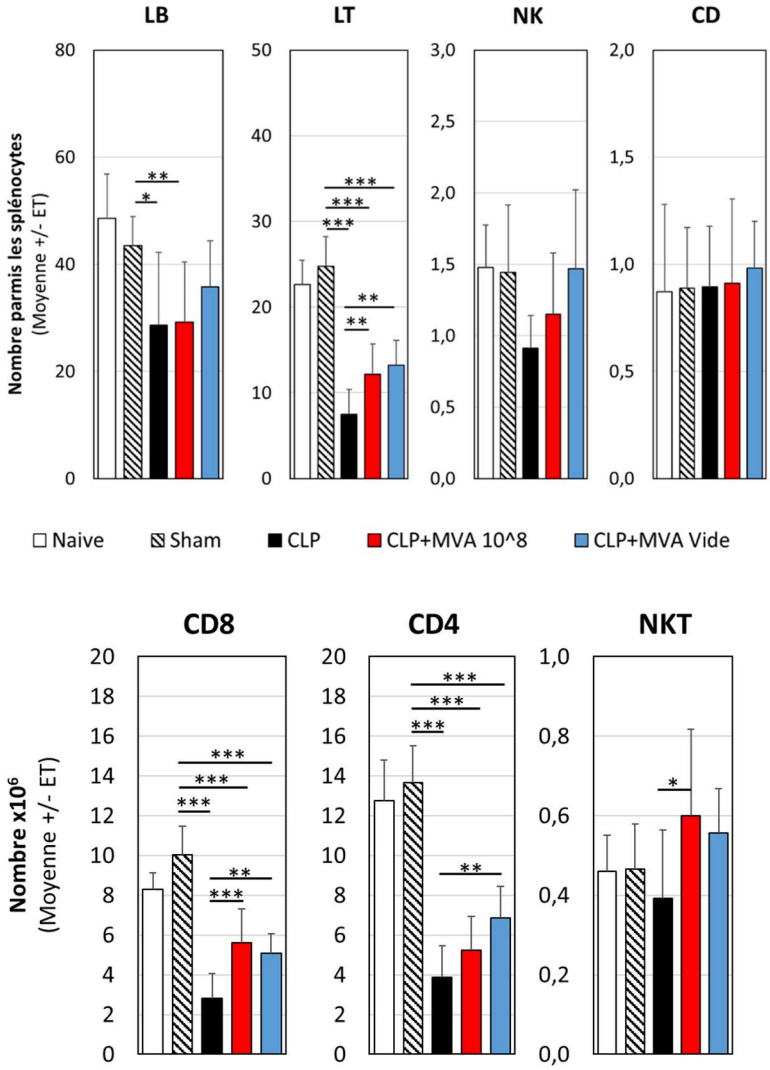


Figure 36 : Populations cellulaires des splénocytes des souris Sham, CLP et CLP traitées. *Les splénocytes ont été prélevés 7 jours post-opératoires sur des souris Naïves (blanc), Sham (rayé), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^8PFU) (rouge) et CLP+MVA-Vide (10^8PFU) (bleu). Les sous-ensembles de cellules vivantes ont ensuite été analysées par cytométrie en flux en utilisant les combinaisons suivantes de marqueurs de surface cellulaire : lymphocytes B : Live dead-CD45+CD3-CD19+NK1.1-, lymphocytes T CD3 (CD4 ou CD8): Live dead-CD45+CD3+CD19-NK1.1-CD4+ or CD8+, NK : Live dead-CD45+CD3-CD19-NK1.1+, Cellules dendritiques : Live dead-CD45+CD3-CD19-CD11b-CD11c +Ly6c-Ia/Ie+ ou CD3-CD19-CD11c+Ia/Ie+), NKT : Live dead-CD45+CD3+CD19-NK1.1+. Naives : 15 souris/groupe, Sham : 5 souris/groupe, CLP : 7 souris/groupe, CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^8PFU) : 24 souris/groupe, CLP+MVA-Vide (10^8PFU) : 6 souris/groupe. Trois expériences réalisées, Test U de Mann-Whitney uniquement pour comparer les groupe CLP/ CLP+MVA-hIL7-Fc/ CLP+MVA-Vide : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001.*

Le nombre de lymphocytes T et de lymphocyte B diminue significativement dans les rates des souris CLP par rapport au groupe contrôle Sham (Fig. 36). Parmi les lymphocytes, cette diminution due à la CLP concerne les CD8 et les CD4. Les NK et les NKT sont diminués de manière non significative à la suite de la CLP. On remarquera cependant une immunostimulation liée à l'injection du MVA-hIL7-Fc des NK et NKT 7 jours après la chirurgie et 3 jours après l'injection et une restauration partielle significative du nombre de lymphocytes T, plus particulièrement des CD8. Dans cette expériences les cellules

Dendritiques ne semblent impactées ni par la CLP, ni par le traitement, ce qui reflète l'hétérogénéité du modèle et la nécessité de répéter plusieurs fois les protocoles pour aboutir à des conclusions fermes. La restauration est identique dans le groupe MVA-hIL7-Fc et le groupe MVA-Vide ce qui est en accord avec le fait que la dose injectée de 10^8PFU et donc la réponse contre le MVA soit élevée et que la plateforme MVA est immunologiquement active et capable de stimuler à elle seule le système immunitaire de la souris septique.

B/ Réponse cytokinique des lymphocytes T

a) Stimulation TCR, sécrétion dans le surnageant

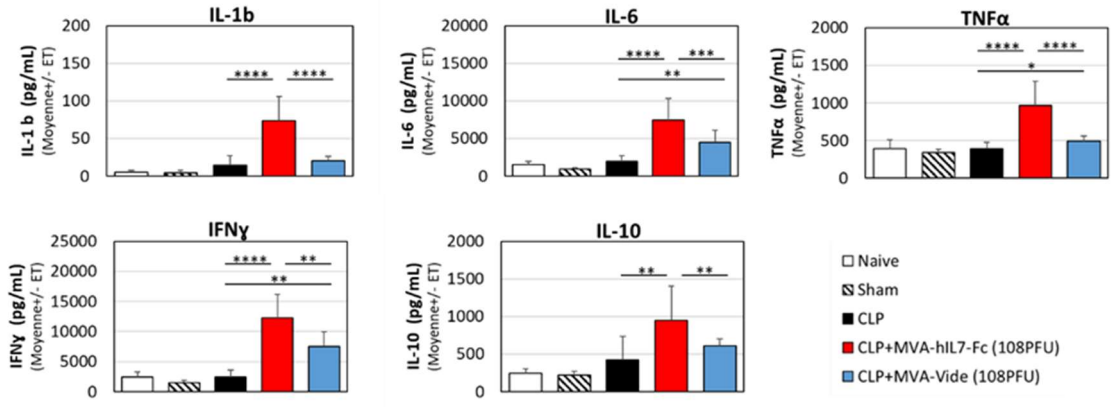


Figure 37 : réponse cytokinique à une stimulation anti-CD3 des souris Sham, CLP et CLP traitées. *Des splénocytes (5x10^5 cellules/puits) de souris Naïves (blanc), Sham (rayé), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^8PFU) (rouge) et CLP+MVA-Vide (10^8PFU) (bleu) ont été stimulés avec un anticorps anti-CD3 coaté (1 µg/mL) pendant 24h et les cytokines libérées dans le surnageant ont été mesurées par U-PLEX Multiplex (MSD). Trois expériences réalisées, Test U de Mann-Whitney uniquement pour comparer les groupes CLP/ CLP+MVA-hIL7-Fc/ CLP+MVA-Vide : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.*

La stimulation TCR des splénocytes par un anti-CD3 induit une production significativement augmentée d'IL-1β, IL-6, TNFα, IFNγ, et IL-10 dans le groupe de souris traitées par le MVA-hIL7-Fc par rapport aux souris CLP non traitées (Fig. 37). Malgré l'augmentation du nombre des lymphocytes mise en évidence par le phénotypage dans le groupe MVA-Vide, on observe une moindre augmentation de secrétions de cytokine. Ce résultat prouve l'effet combiné des deux composantes de notre candidat, le MVA-Vide étant moins immunostimulateur que le MVA-hIL7-Fc.

b) Stimulation TCR, identification des cellules sécrétrices par cytométrie

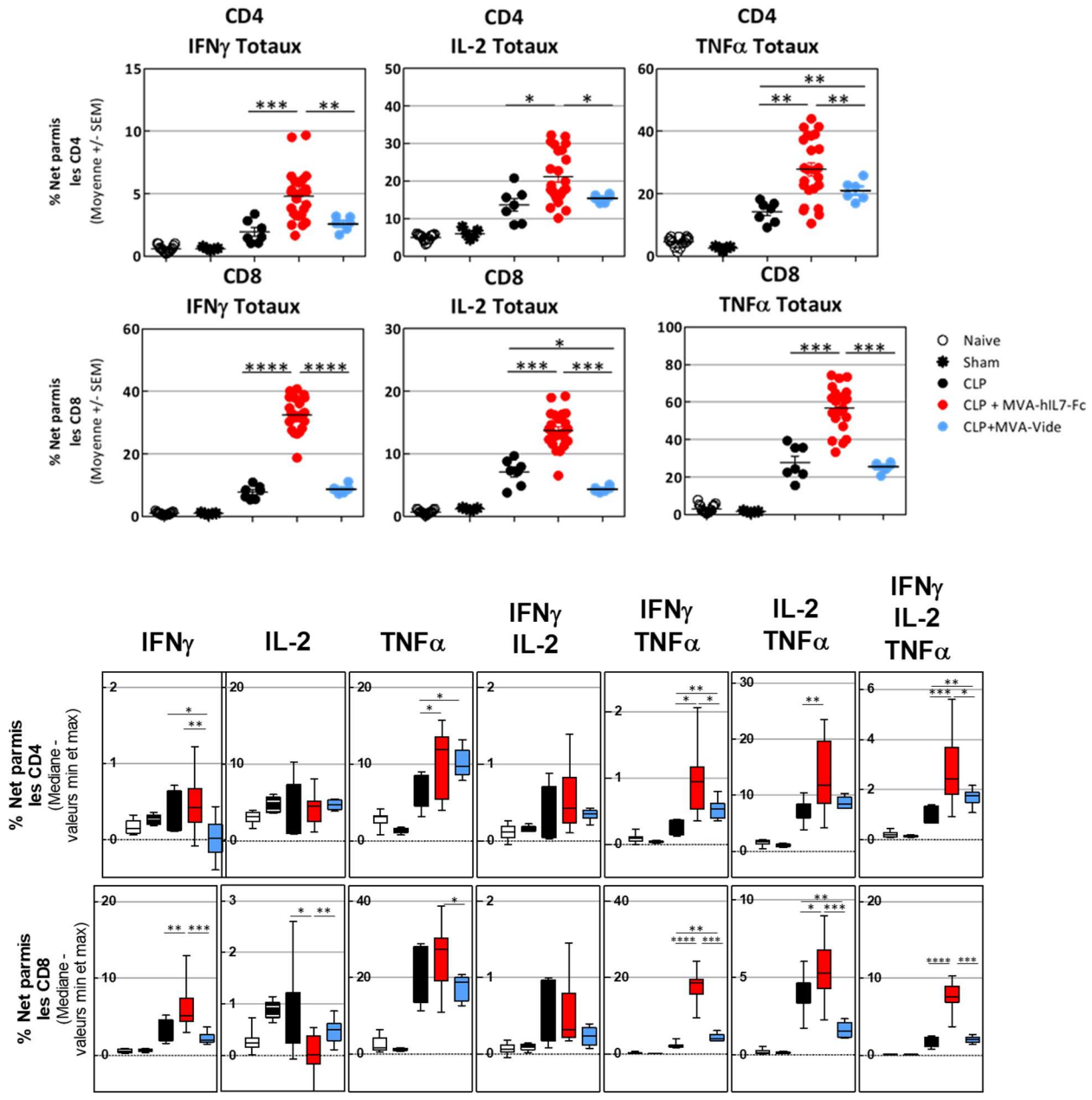


Figure 38 : Réponse cytokinique IFNɣ, TNFα, IL-2, « Intracellular cytokine staining (ICS) » des souris Sham, CLP et CLP traitées. *Des splénocytes (5x10^5 cellules/puits) de souris Naïves (blanc), Sham (rayé), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^{8}PFU) (rouge) et CLP+MVA-Vide (10^{8}PFU) (bleu) ont été stimulés 4 h avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (1 mg/ml) en présence d'un inhibiteur du transport des protéines (contenant de la bréfeldine A). Les sous-ensembles de cellules vivantes récoltées ont ensuite été analysées par cytométrie en flux en utilisant des marqueurs de surface (CD4, CD8) et intracellulaires (CD3, IFN-ɣ, TNFα, IL-2). Trois expériences réalisées, Test U de Mann-Whitney uniquement pour comparer les groupe CLP/ CLP+MVA-hIL7-Fc/ CLP+MVA-Vide : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0, 0001.*

Nous avons déjà mis en évidence l'augmentation du nombre de lymphocytes T dans la rate à la suite de l'injection du MVA-hIL7-Fc. L'ICS est un test permettant de voir leur fonctionnalité. Les trois cytokines IFN-ɣ, TNFα, IL-2 jouent un rôle important dans la réponse immunitaire et c'est pour cette raison que nous nous intéresserons aux cellules

double et triples sécrétrices de ces cytokines (Fig. 38). L'injection du MVA-hIL7-Fc augmente significativement la proportion de CD8 et CD4 excréteurs contrairement au contrôle MVA-Vide. Les souris CLP traitées par notre candidat ont un pourcentage de CD4 producteurs de TNFα, IFNɣ/TNFα, IL-2/TNFα, IFNɣ/TNFα/IL-2 et de CD8 producteurs d'IFNɣ, IFNɣ/TNFα, IL-2/TNFα, IFNɣ/TNFα/IL-2 augmenté. Nous n'observons pas d'augmentation avec le MVA-Vide. Ces observations mettent en évidence la capacité de notre candidat MVA-hIL7-Fc à produire des lymphocytes T multi-fonctionnels contrairement au MVA-Vide.

c) Capacité de prolifération des lymphocytes T

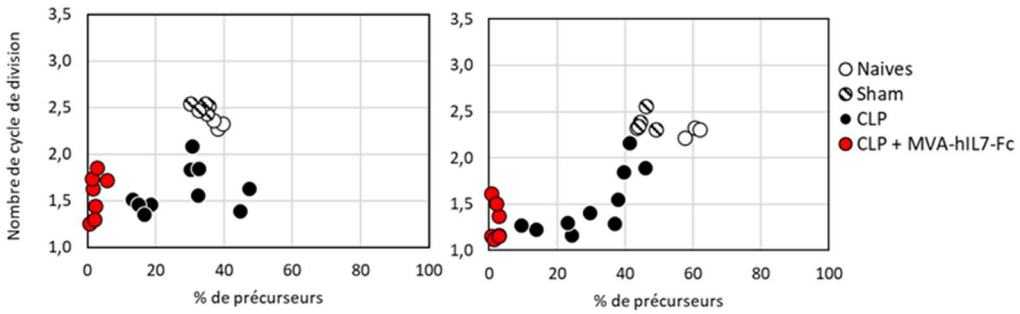


Figure 39 : Prolifération des lymphocytes T après traitement des souris CLP. *Des splénocytes (5x10^5 cellules/puits) de souris Naïves (blanc), Sham (rayé), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^{8}PFU) (rouge) et CLP+MVA-Vide (10^{8}PFU) (bleu) ont été stimulés avec un anticorps anti-CD3 coaté (1 µg/mL) pendant 72h. La prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 a ensuite été analysée par cytométrie en flux. % de Précurseurs = (Somme des parents avec CFSE dilué / Parents totaux) x 100. Indice de prolifération = (Somme du nombre total de divisions) / (Nombre de cellules qui sont entrées en division).*

La capacité de prolifération des lymphocytes T CD8 et T CD4 est fortement altérée chez les CLP par rapport aux groupe Sham et Naïve (Fig. 39). De manière plus surprenante, l'injection de notre candidat semble inhiber encore d'avantage cette capacité de prolifération. Un grand nombre d'hypothèses ont été soulevées pour expliquer cette inhibition comme l'apparition dans le modèle CLP de cellules myéloïdes suppressives (MDSC pour myeloid-derived suppressor cells) qui sont identifiées chez l'homme et chez la souris comme des cellules immatures capables d'inhiber les fonctions des lymphocytes T. Ces cellules ont été retrouvées dans les rates des souris CLP et ont fait l'objet d'autres analyses dans le laboratoire. Nous nous sommes également questionnées sur la durée post-injection de 3 jours, était-ce trop tôt ou trop tard pour voir un effet de notre candidat ? Ce protocole n'a été réalisé que deux fois et nous avons été contraint de l'arrêter au profit des autres tests immunologiques présentés dans ce document.

3) Comparaison de l'activité du MVA-hIL7-Fc vs la protéine rhIL7

Après avoir démontré les propriétés immunostimulatrices de notre traitement combiné MVA-hIL7-Fc par rapport au MVA-Vide, nous avons eu besoin de nous rapprocher de la dose adaptée à l'humain dans la perspective d'une étude clinique future. Pour cela,

en nous basant sur les directives de la FDA (U.S. Food and Drug Administration), nous avons d'abord évalué la dose clinique maximale que nous pourrions utiliser en fonction du rendement attendu dans la production du lot clinique de virus et nous avons ensuite adapté cette dose au modèle murin. Nous avons donc baissé la dose de traitement injecté à 10^7PFU par souris et nous avons comparé notre traitement à la protéine recombinante seule (rhIL7-Fc) à une dose équivalente à la dose humaine utilisée en clinique pour traiter l'immunodépression du patient septique (François, 2018). De cette manière nous pouvons mettre en évidence l'apport de la vectorisation de l'hIL7-FC dans le MVA par rapport à la protéine soluble.

A/ Paramètres sanguins

a) Hématocrite

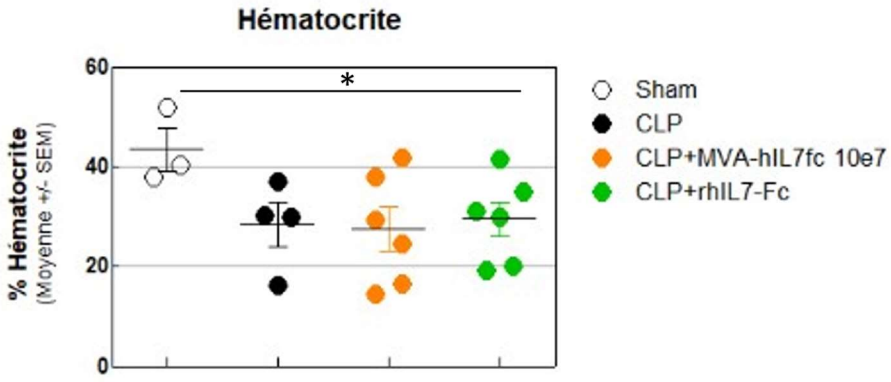


Figure 40 : Hématocrite *Le taux d'hématocrite a été déterminé à parti du sang hépariné prélevé aux souris Naïves (blanc), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^7PFU) (orange) et CLP+rhIL7-Fc (5µg/souris) (vert)*

La détermination du taux d'hématocrite n'a pas permis de démontrer une action de notre traitement MVA-hIL7-Fc ou de la protéine recombinante seule sur la forte baisse du taux d'hématocrite des souris CLP 7 jours après la chirurgie (Fig. 40).

b) Phénotypage

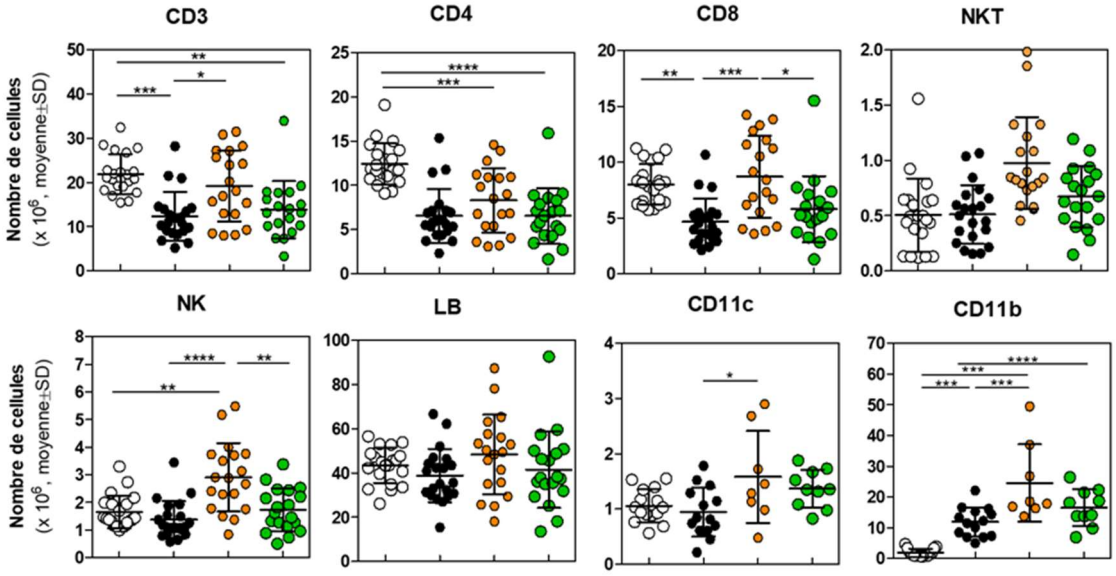


Figure 41 : Populations cellulaires des splénocytes des souris Sham, CLP et CLP traitées. *Les splénocytes ont été prélevés 7 jours post-opératoires sur des souris Naïves (blanc), Sham (rayé), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^7PFU) (orange) et CLP+rhIl7-Fc (5µg/souris) (vert). Les sous-ensembles de cellules vivantes ont ensuite été analysés par cytométrie en flux en utilisant les combinaisons suivantes de marqueurs de surface cellulaire : lymphocytes B : Live dead-CD45+CD3-CD19+NK1.1-, lymphocytes T CD3 (CD4 ou CD8): Live dead-CD45+CD3+CD19-NK1.1-CD4+ or CD8+, NK : Live dead-CD45+CD3-CD19-NK1.1+, Cellules dendritiques : Live dead-CD45+CD3-CD19-CD11b-CD11c +Ly6c-Ia/Ie+ ou CD3-CD19-CD11c+Ia/Ie+), NKT : Live dead-CD45+CD3+CD19-NK1.1. Cinq expériences réalisées, Test U de Mann-Whitney : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.*

La lymphopénie, caractéristique du modèle CLP, est à nouveau mise en évidence par la diminution signification du nombre des lymphocytes T, plus particulièrement les CD8 (Fig. 41). Le traitement par la protéine recombinante n'induit aucun changement dans ces populations contrairement au traitement par le MVA-hIL7-Fc qui augmente significativement le nombre de CD8 et de NK. Les populations myéloïdes sont aussi impactées avec une augmentation significative des cellules, CD11c et CD11b.

c) Analyses biochimiques

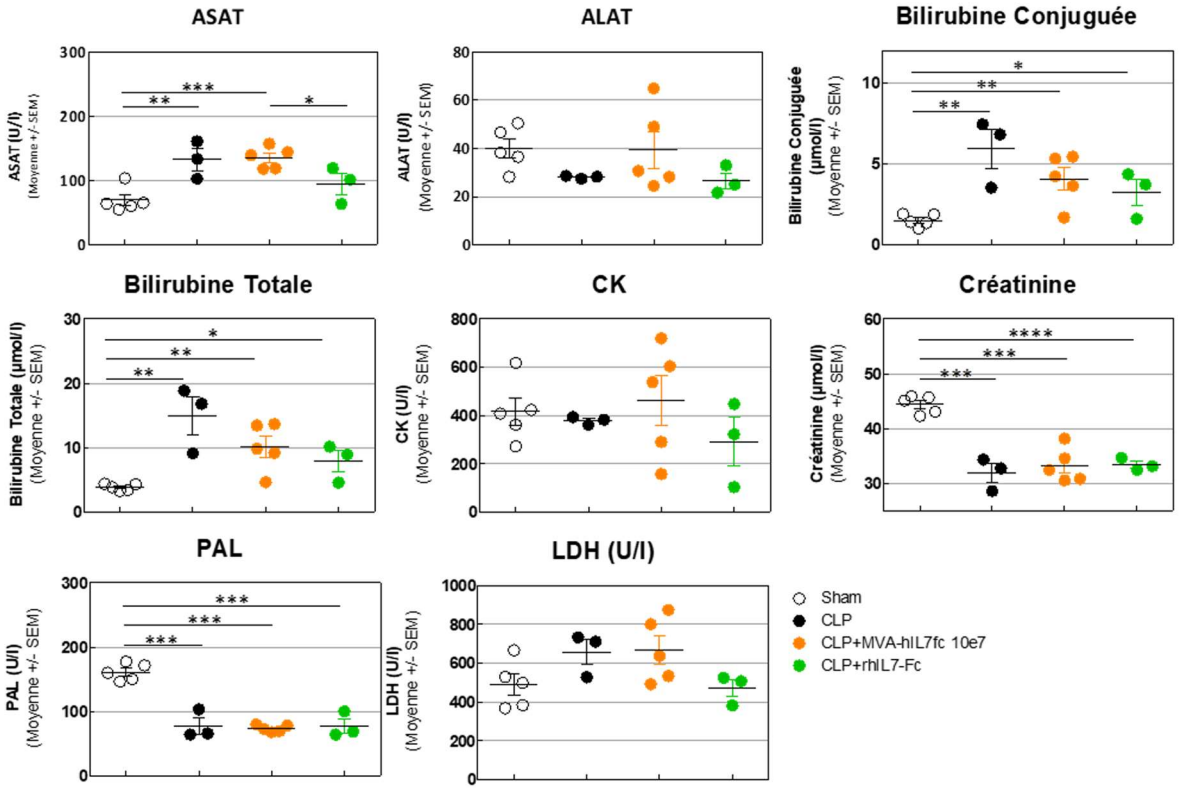


Figure 42 : Analyses biochimiques du sérum des souris Sham, CLP et CLP traitées. *Du sang de souris Naïves (blanc), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^7PFU) (orange) et CLP+rhIL7-Fc (5µg/souris) (vert) a été prélevé 7 jours après la chirurgie, 3 jours après le traitement et les dosages suivants ont été réalisés dans un laboratoire d'analyses vétérinaires (IODOLAB) : ASAT (Aspartate aminotransférase), ALAT (alanine transaminase, Bilirubine Conjuguée, Bilirubine Totale, Gamma GT (gamma-glutamyltranspeptidase) non dosable, données non présentées, Créatinine, CK (créatine kinase), PAL (phosphatases alcalines), LDH (lactate déshydrogénase).*

Le dosage des paramètres biochimique sanguins révèle une légère élévation des ALAT et des ASAT reflétant que l'atteinte hépatique dans le modèle CLP n'est pas exacerbée par le traitement, 3 jours après l'injection de MVA-hIL7-Fc. La bilirubine Totale et Conjuguée est augmentée dans notre modèle et légèrement diminuée avec le traitement par notre candidat ou la protéine, mais de manière non significative, sans doute à cause du faible nombre de souris par groupe. La créatinine et la phosphatase alcaline sont significativement diminuées dans le modèle, ce qui ne reflète pas une atteinte rénale mais plutôt multiviscérale, une atteinte hépatique ou une perte musculaire (Ostermann, 2016). Leurs taux restent inchangés dans les deux groupes traités. Enfin, la CK (créatine kinase) élevée en cas de la défaillance cardiaque récente, et la LDH (lactate déshydrogénase) ne sont impactées ni par le modèle CLP, ni par les différents traitements.

B/ Réponse cytokinique des lymphocytes T

a) Stimulation TCR, sécrétion dans le surnageant

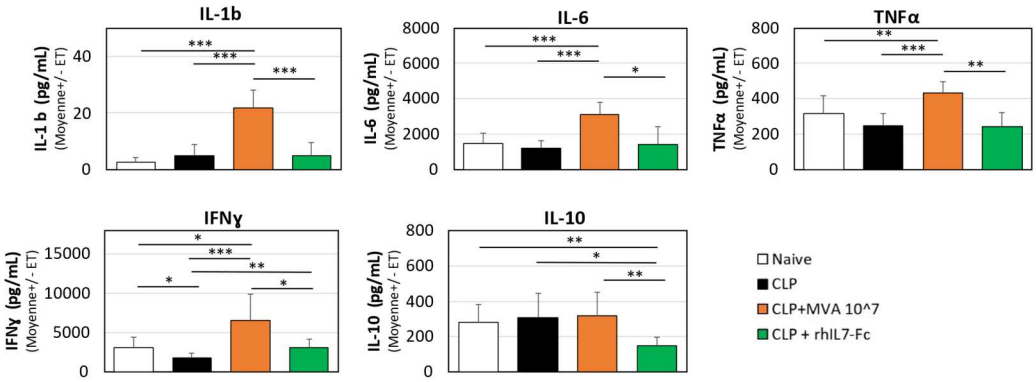
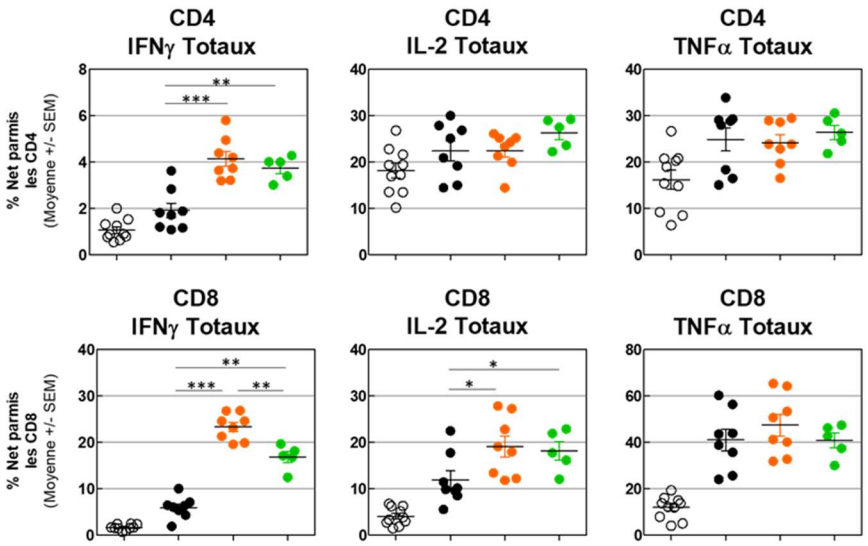


Figure 43 : réponse cytokinique à une stimulation anti-CD3 des souris Sham, CLP et CLP traitées. *Des splénocytes (5x10^5 cellules/puits) de souris Naïves (blanc), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^{7}PFU) (Orange) et CLP+rhIL7-Fc (5µg/souris) (vert) ont été stimulés avec un anticorps anti-CD3 coaté (1 µg/mL) pendant 24h et les cytokines libérées dans le surnageant ont été mesurées par U-PLEX Multiplex (MSD). Naives : 10 souris/groupe, CLP : 8 souris/groupe, CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^{7}PFU): 8 souris/groupe, CLP+hhIL7 (5µg/souris) : 6 souris/groupe Deux expériences réalisées, Test U de Mann-Whitney *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0,0001.*

Le traitement par le MVA-hIL7-Fc à la dose de 10^{7}PFU/souris augmente significativement la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6, TNFα, IFNɣ, à la suite d'une stimulation par un anti-CD3 par rapport au groupe CLP (Fig. 43). L'IL10 n'est pas augmentée par rapport au groupe Naïve ou CLP. La protéine seule injectée une seule fois ne permet pas d'obtenir cette augmentation de l'immunocompétence des lymphocytes T. Elle permet seulement une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10.

b) Stimulation TCR et identification des cellules sécrétrices par cytométrie



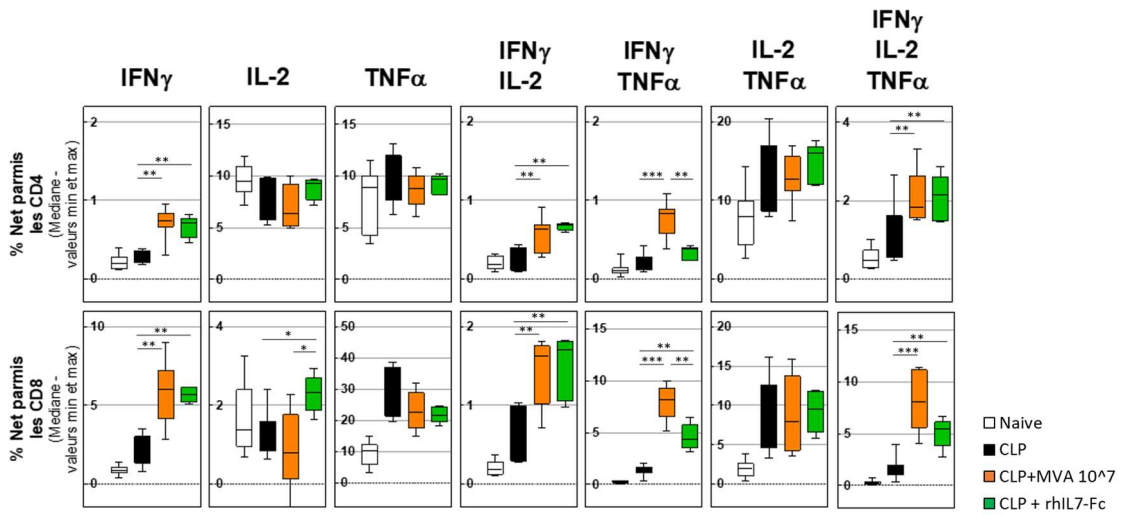


Figure 44 : Réponse cytokinique IFNɣ, TNFα, IL-2, « Intracellular cytokine staining (ICS) » des souris Sham, CLP et CLP traitées. *Les splénocytes ont été prélevés 7 jours post-opératoires sur des souris Naïves (blanc), Sham (rayé), CLP (noir), CLP+ MVA-hIL7-Fc (10^7PFU) (orange) et CLP+rhIL7-Fc (5µg/souris) (vert) puis $5x10^5$ cellules/puits ont été stimulées 4 h avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (1 mg/ml) en présence d'un inhibiteur du transport des protéines (contenant de la bréfeldine A). Les sous-ensembles de cellules vivantes récoltées ont ensuite été analysés par cytométrie en flux en utilisant des marqueurs de surface (CD4, CD8) et intracellulaires (CD3, IFN-ɣ, TNFα, IL-2). Trois expériences réalisées, Test U de Mann-Whitney uniquement pour comparer les groupe CLP/ CLP+MVA-hIL7-Fc/ CLP+rhIL7-Fc : *, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001 ; ****, p<0, 0001.*

La figure 44 montre qu'après une stimulation TCR de 4h par un anti-CD3 et un anti-CD28, les deux produits, MVA-hIL-7-Fc et la rhIL-7-Fc, démontrent une capacité à induire des lymphocytes T polyfonctionnelles, comparé au groupe CLP non-traité. Cette capacité est globalement plus forte sur les CD8+ comparée aux CD4+.

En particulier, le pourcentage de CD4 et de CD8 sécrétant de l'IFNɣ (cellules simple productrices), les double secréteurs IFNɣ/TNFα et IFNɣ/IL-2, ainsi que les triples excréteurs IFNɣ/TNFα /IL-2 est augmenté à la suite du traitement par le MVA-hIL7-Fc par rapport aux souris CLP non traitées

La protéine recombinante à dose clinique équivalente induit également une augmentation de la fréquence de producteurs d'IFNɣ simple, de double excréteur IFNɣ/IL2 et triple excréteurs, mais de manière significativement moindre pour l'IFNɣ/TNFα et non significative pour les triples producteurs, en faveur du MVA-hI7-Fc.

CONCLUSION

VI/ CONCLUSION

1/ Comparaison de l'activité du MVA-hIL7-Fc vs le MVA-Vide dans le modèle CLP

Le traitement des souris par le MVA-hIL7-Fc à la dose élevée de 10^8PFU/souris, 4 jours après la chirurgie, entraîne une immunostimulation supérieure à celle obtenue avec l'injection du MVA-Vide à la même dose.

Nous avons évalué la capacité du traitement par MVA-hIL7-Fc à améliorer la survie des souris immunosupprimées. Notre modèle CLP murin présente un taux de mortalité de 30% environ 7 jours après la CLP. Nous avons démontré que cette chirurgie entrainait une tolérance au LPS détectable dans la rate au moins jusqu'au troisième jour après la chirurgie ainsi qu'une lymphopénie dans les 4 premiers jours après la chirurgie et un défaut de réponse cytokinique des lymphocytes T. Nous avons également démontré que les souris CLP présentaient une réponse adaptative altérée de longue durée, caractérisée par une capacité réduite des lymphocytes T à proliférer pendant au moins 13 jours après la CLP mettant en évidence des cinétiques et des persistances de l'immunosuppression induite différentes suivant l'activité étudiée.

Les souris ont donc été traitées par le MVA-hIL7-Fc et son contrôle MVA-vide le 4ème jour après la CLP, temps pour lequel l'immunosuppression a été démontrée. Dans les groupes contrôle CLP et CLP+MVA-Vide la mortalité est de 30% et 33% respectivement. Les groupes de souris Sham et traitées par le MVA-hIL7-Fc ne subissent aucune perte, démontrant donc l'effet protecteur de notre traitement par le MVA-hIL7-Fc sur la mortalité dans le modèle CLP par rapport au contrôle MVA-Vide.

Trois jours après l'injection du MVA-hIL7-Fc et de son contrôle, le MVA-Vide, nous avons pu doser dans le sérum des souris CLP une augmentation des cytokines pro et anti-inflammatoires circulantes. On observe une tendance vers une plus forte concentration de TNFα, IFNγ et IL-10 après l'injection du MVA-hIL7-Fc par rapport au MVA-Vide, sans atteindre la significativité.

Le nombre de lymphocytes T et de lymphocytes B diminue significativement dans les rates des souris CLP par rapport au groupe contrôle Sham 7 jour après la CLP. La lymphopénie retrouvée suite à la CLP est due à une diminution du nombre de CD8. À la suite du traitement, 7 jours après la chirurgie et 3 jours après l'injection, on constate une restauration partielle et significative du nombre de lymphocytes T CD8, et une tendance à l'augmentation du nombre de CD4 et de NKT et NK. La restauration est identique dans le groupe MVA-hIL7-Fc et le groupe MVA-Vide.

Les cytokines pro et anti-inflammatoires produites par les lymphocytes T après une stimulation TCR augmentent significativement (IL-1β, IL-6, TNFα, IFNγ, et IL-10) dans le

groupe de souris traitées par le MVA-hIL7-Fc par rapport aux souris CLP non traitées. Malgré l'augmentation du nombre des lymphocytes mise en évidence par le phénotypage dans le groupe MVA-Vide, on observe une moindre augmentation de secrétions de cytokine dans ce groupe contrôle.

L'analyse de la fonctionnalité des lymphocytes par ICS de l'IFNɣ, de TNFα, de l'IL-2 a montré une augmentation des lymphocytes T CD4 et CD8 polysécréteurs à la suite du traitement par le MVA-hIL7-Fc. La fréquence des cellules excrétrices d'IL-2 n'est pas impacté (CD4), voir diminué (CD8) au profit d'une forte augmentation de cellules excrétrices d'IFNɣ, simple ou en combinaison double et triple avec le TNFα. L'injection du MVA-Vide entraine une augmentation moindre du pourcentage de cellules polysécrétrices et dans des proportions significativement plus faibles qu'avec le MVA-hIL7-Fc.

La capacité de prolifération des lymphocytes T CD8 et T CD4 est fortement altérée chez les CLP par rapport aux groupe Sham et Naïve. L'injection du MVA-hIL7-Fc inhibe encore d'avantage cette capacité de prolifération à la suite de stimulation de 72h par un anticorps anti-CD3. Dans ce protocole nous n'avons pas de données sur l'impact qu'aurait eu le MVA-Vide sur la prolifération des lymphocytes T.

Ces données suggèrent que la composante MVA seule induit une restauration de la fonction immunitaire, et que l'ajout de la vectorisation de l'hIL-7-Fc augmente cette réponse et semble être nécessaire pour permettre une immunorestauration de la fonctionnalité des lymphocytes T.

2/ Comparaison de l'activité du MVA-hIL7-Fc vs la protéine rhIL7

La diminution de la dose de traitement (10^7PFU/souris), 4 jours après la chirurgie, entraine une immunostimulation supérieure à celle obtenue avec l'injection de la protéine recombinante rhIL7-Fc à dose équivalente (5µg/souris).

Le taux d'hIL-7Fc circulant 3 jours après le traitement par le MVA-hIL7-Fc est près de 14 fois plus élevé par rapport à la protéine recombinante seule. Ce résultat semble indiquer une pharmacocinétique, en faveur de notre candidat au jour 3 jours après l'injection. Le traitement n'a cependant pas d'effet sur la forte diminution de l'hématocrite due à la CLP.

La lymphopénie caractéristique du modèle CLP est à nouveau mise en évidence par la diminution significative du nombre des lymphocytes T, plus particulièrement les CD8. Le traitement par la protéine recombinante n'induit aucun changement dans ces populations, contrairement au traitement par le MVA-hIL7-Fc qui augmente significativement le nombre de CD8 et de NK. Les populations myéloïdes sont aussi partiellement restaurées avec une augmentation significative des CD11c et CD11b.

La légère élévation des ALAT et des ASAT reflétant une atteinte hépatique dans le modèle CLP n'est pas exacerbée 3 jours après l'injection du traitement par le MVA-hIL7-Fc. La bilirubine Totale et Conjuguée est augmentée par le modèle et légèrement diminuée avec le traitement par notre candidat ou la protéine, mais de manière non significative sûrement à cause du faible nombre de souris par groupe. La créatinine et la phosphatase alcaline sont significativement diminuées dans le modèle ce qui ne reflète pas une atteinte rénale mais plutôt multiviscérale, et leurs taux reste inchangés dans les deux groupes traités. Enfin, la CK (créatine kinase) élevée en cas de la défaillance cardiaque récente, et la LDH (lactate déshydrogénase) ne sont impactées ni par le modèle CLP, ni par les différents traitements.

Le traitement par le MVA-hIL7-Fc à la dose de 10^7PFU/souris augmente significativement la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6, TNFα, IFNɣ, excrétées à la suite d'une stimulation TCR par rapport au groupe CLP. L'IL10 n'est pas augmenté par rapport au groupe Naïve ou CLP. La protéine seule injectée une seule fois ne permet pas d'obtenir cette augmentation de l'immunocompétence des lymphocytes T. Elle permet toutefois une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Par rapport à la dose de traitement de 10^8PFU la sécrétion est diminuée ce qui était attendu, mais elle reste significativement plus élevée que dans le groupe contrôle avec la protéine seule. Ceci démontre que même à dose faible, la combinaison MVA et protéine IL7-Fc confère à notre candidat une plus forte capacité immunostimulatrice que la protéine seule.

La fonctionnalité des lymphocytes polysécréteurs est augmentée à la suite du traitement par le MVA-hIL7-Fc par rapport aux souris CLP non traitées. Ils présentent une forte augmentation de cellules excrétrices d'IFNɣ, simple ou en combinaison double et triple avec le TNFα. La protéine recombinante à dose clinique équivalente augmente également la fréquence de producteurs d'IFNɣ simple, de double excréteur IFNɣ/IL2 et triple excréteurs, mais de manière significativement moindre, en faveur du MVA-hI7-Fc.

La diminution de la dose de MVA-hIL7-Fc injectée aux souris CLP était nécessaire pour se rapprocher de la dose humaine qui sera utilisée lors des futurs protocoles de recherche clinique. Malgré cette baisse, la capacité d'immunostimulation par notre candidat reste supérieure à la protéine recombinante injectée seule.

DISCUSSION

VII/ DISCUSSION

1/ Le modèle murin dans le sepsis, limites, avantages et alternatives

Nous savons aujourd'hui que le sepsis est caractérisé par des éléments à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et que ces réponses se produisent tôt et simultanément dans la septicémie (Torres, 2021 ; Peters, 2018). Classiquement, on observe une réaction pro-inflammatoire rapide, au cours de laquelle la libération excessive de cytokines pro-inflammatoires et l'hyperactivation des systèmes du complément, de coagulation et endothélial, entrainent des lésions organiques au stade précoce de la maladie qui sont provoqués par la libération des PAMP et des DAMP, (van der Poll, 2017 ; Hamers, 2015). L'apparition concomitante d'un phénotype anti-inflammatoire adaptatif modifie le statut des cellules immunitaires innées et induit également une apoptose massive et l'anergie des lymphocytes T. Celle-ci conduit à long terme à une immunosuppression caractéristique de la septicémie et entraîne une augmentation des infections secondaires chez le patient.

Si la phase hyper-inflammatoire est assez facile à reproduire dans le modèle murin, il est en revanche, plus difficile d'obtenir une immunosuppression se rapprochant de la pathologie humaine. Les modèles non chirurgicaux tels que l'injection de LPS sont largement utilisés pour induire une inflammation dans des modèles animaux expérimentaux. Cependant, les études utilisant des doses élevées de LPS ne sont pas pertinentes en raison de la cinétique rapide et de l'inflammation extrême conduisant à un collapsus cardiovasculaire immédiat, qui sont radicalement différents de la septicémie humaine qui provient d'une infection localisée (Stortz, 2017). Il existe cependant un modèle d'injection répétée de doses sublétales de LPS induisant une paralysie du système immunitaire associée à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et à la régulation négative de l'expression lymphocytaire du HLA-DR (Biswas, 2009). Cependant, certaines études suggèrent que les fonctions phagocytaire et cytotoxique des monocytes et des macrophages dans ce modèle sont améliorées (van der Poll, 2021). Ce modèle peut donc permettre d'explorer certains mécanismes de l'immunosuppression mais ne permet pas de reproduire toutes les spécificités de la pathologie humaine. Cette différence peut être expliquée par l'absence de la composante polymicrobienne de cette infection, qui est souvent présente dans le sepsis chez l'homme.

Il existe actuellement plusieurs modèles de sepsis mono ou polymicrobien, comme l'injection d'un pathogène seul (par ex. Candida albicans, Escherichia coli) ou d'excréments contenant une grande variété microbienne (Stortz, 2017). Les modèles chirurgicaux permettent de provoquer une infection locale par l'altération chirurgicale des parois viscérales, ce qui provoque une infection polymicrobienne locale et une septicémie. La ligature et ponction cæcale (CLP) est un modèle largement utilisé pour mimer

l'immunosuppression induite par la septicémie, y compris l'apoptose des splénocytes (Grailer, 2015), la lymphopénie (Durand, 2022), l'augmentation du nombre des Tregs (de Lima, 2022) et des MDSC (Ruan, 2020). Ces caractéristiques ont également été retrouvées dans le modèle CLP tel que nous l'avons mis en place dans notre laboratoire (Lélu, 2022). Le modèle CLP est un modèle de simple infection qui peut être combiné à une infection secondaire, afin de reproduire le tableau clinique d'une infection secondaire post-sepsis chez l'homme.

Le choix de la souche de souris utilisée porte lui aussi à discussion. Les souris C57B6 sont des souris consanguines, jeunes, élevées en laboratoire dans un milieu exempt d'organismes pathogènes, ce qui implique un défaut de lymphocytes T effecteurs mémoire du fait de la faible exposition à des pathogènes au cours de leur vie (Beura, 2016). La faible diversité interindividuelle et la réponse immunitaire modifiée de ces souris ne font peut-être pas d'elles les meilleures candidates par rapport à des lignées non consanguines, élevées dans un environnement conventionnel, des souris âgées ou porteuses de comorbidités, plus semblables au profil clinique des patients sepsis. Bien entendu, augmenter la variabilité dans le modèle animal signifierait aussi augmenter le nombre d'animaux pour obtenir une puissance statistique suffisante, ce qui est contraire aux règles d'éthique appliquées aujourd'hui de réduction du nombre d'animaux impliqués dans des protocoles dits « sévères » d'expérimentation.

Une alternative à la chirurgie serait l'utilisation d'immunosuppresseurs tels que le cyclophosphamide ou la cyclosporine, qui induisent une immunosuppression chez la souris. Cependant, un statut immunosuppresseur préexistant peut ne pas reproduire avec précision l'évolution naturelle et la gravité de l'immunoparalysie induite par le sepsis. La libération de médiateurs pro-inflammatoires, par exemple, reste constamment faible dans ce type de modèle, et la transition de l'hyper inflammation vers l'immunosuppression, comme on le voit dans le sepsis humain, n'est pas observée (Kong, 2018). De plus, la cyclosporine altère principalement l'activité des lymphocytes T, plutôt que de supprimer la réponse immunitaire globale, ce qui diffère également de l'immuno-pathologie rencontrée dans la septicémie.

Malgré la sévérité du protocole, le modèle CLP est reconnu pour sa pertinence dans l'étude du sepsis. Nous sommes donc autorisés par le comité d'éthique à pratiquer cette chirurgie, mais sur un nombre restreint d'animaux et en appliquant tous les moyens possibles pour limiter la souffrance animale. A ce jour, il n'existe malheureusement pas d'alternative au modèle animal dans l'étude des mécanismes de la maladie et des traitements contre le sepsis. Des outils mathématiques de modélisation existent, mais le sepsis est une pathologie extrêmement complexe et multifactorielle ce qui rend très compliquée l'utilisation d'un outil informatique. Les perspectives d'évolution de notre modèle animal actuellement en place sont nombreuses, en apportant par exemple la possibilité d'une infection secondaire (après une chirurgie CLP) par *Candida albicans*.

L'utilisation de souris âgées ou porteuses de comorbidités (diabète), serait également pertinente pour se rapprocher au mieux de la pathologie humaine.

2/ Caractérisation d'une immunothérapie innovante pour le traitement de l'immunosuppression induite par le sepsis

Lors de cette étude nous avons démontré que la septicémie induite par la chirurgie CLP conduisait, dans notre modèle murin, à une immunoparalysie transitoire jusqu'à 4 jours après la CLP. En nous basant sur cette cinétique, nous avons injecté notre candidat MVA-hIL7-Fc 4 jours après la chirurgie et analysé les paramètres immunologiques sur le sang et la rate, 3 jours après l'injection du traitement. Nos données ont montré que la composante MVA seule induit une restauration efficace de la fonction immunitaire, et que l'ajout de la vectorisation de l'hIL-7-Fc augmente cette réponse et semble être nécessaire pour permettre une immunorestauration de la fonctionnalité des lymphocytes T.

La plateforme virale MVA a été choisie pour sa capacité à induire directement la restauration et/ou la stimulation de certains paramètres immunologiques.

Le vecteur MVA est connu pour être un puissant inducteur de l'immunité innée, capable de cibler spécifiquement les CPA, en particulier les CDs, et à activer fortement l'immunité innée (Pascutti, 2011) via la signalisation de l'IFNγ. Des études ont décrit que ces cytokines pro-inflammatoires sont produites *in vitro* et *in vivo* en réponse au MVA dans le sang total, les PBMC, les monocytes humains primaires et les macrophages (Delaloye, 2009 ; Price, 2013 ; Sanchez, 2020 ; Lehmann, 2009). Nos études ont permis de mettre en évidence une réponse cytokinique pro-inflammatoire due au MVA dans notre modèle murin CLP (Lélu, 2022). Il induit plus particulièrement la production d'IFNɣ qui est une cytokine pro-inflammatoire nécessaire à l'activation du système immunitaire de l'hôte.

D'autre part, l'hIL-7 recombinante a montré une efficacité protectrice dans les modèles CLP lorsqu'elle est injectée plusieurs fois (2 ou 3 fois) et immédiatement après la chirurgie par voie sous-cutanée (Unsinger, 2010). La perte massive de cellules immunitaires (les cellules T, B, NK et dendritiques, les monocytes/macrophages) ainsi que l'altération de leurs fonctions (par exemple : la prolifération, la capacité à produire des cytokines) est une caractéristique de l'immunosuppression induite par le sepsis (Hotchkiss, 2013). L'apoptose cellulaire décrite dans des modèles précliniques, entraine une lymphopénie due à la diminution du nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Hotchkiss, 1999). Nos données ont montré que la protéine seule injectée une seule fois ne permet pas d'obtenir d'augmentation du nombre de lymphocytes mais elle permet toutefois une diminution de la concentration de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et une augmentation du nombre de lymphocytes polysécréteurs.

La diminution de la dose de MVA-hIL7-Fc injectée aux souris CLP était nécessaire pour se rapprocher de la dose humaine qui sera utilisée lors des futurs protocoles de

recherche clinique. Malgré cette baisse, la capacité d'immunostimulation par notre candidat reste supérieure à la protéine recombinante injectée seule.

Les résultats présentés dans ce mémoire sont ceux auxquels j'ai plus particulièrement participé, pour la mise en place des tests immunologiques, pour la réalisation des protocoles et l'analyses des résultats. Ils ne représentent qu'une partie de l'ensemble du travail réalisé par les équipes du programme ImmunResQ.

En effet les études précliniques ayants permis de déposer notre brevet ont également été menées sur la rate des souris naïves, comme déjà évoqué dans ce rapport, mais également sur d'autres organes comme le poumon ou dans d'autres modèles de sepsis (*Candida albicans*). Les études menées sur les souris naïves et les données collectées sur les poumons de souris CLP, ont montré que le MVA-hIL-7-Fc augmente le nombre de lymphocytes B, T et NK totales et activées (CD69+), mais aussi les sous-populations myéloïdes dans les poumons et la rate. Le vecteur MVA a contribué de manière significative à l'activation des cellules immunitaires, en particulier des cellules NK. Le MVA-hIL-7-Fc a conféré un avantage de survie significatif dans les modèles de septicémie à *Candida albicans* (Lélu, 2022).

Une originalité de notre approche réside dans l'utilisation de la voie IV, alors que les MVA sont classiquement injectés en clinique par voie Intramusculaire ou sous-cutanée. Celle-ci a été originellement choisie afin de permettre une distribution optimale du virus chez l'hôte injecté (infection de plusieurs organes et cellules) et donc une production maximale de l'Il7 exprimée. Nous avons montré que la voie IV résultait chez la souris en une pharmacocinétique de l'hIL-7-Fc exprimée par notre MVA ainsi qu'à une stimulation de la réponse immunitaire plus favorable en comparaison avec la voie IM (Lélu, 2022).

Des études précliniques antérieures sur des MVA recombinants injectés en IV dans des modèles de souris ont été rapportées illustrant la capacité du MVA à infecter plusieurs organes/cellules de l'hôte, (Fend, 2014, Ramirez, 2003). Une récente étude chez l'homme, utilisant la voie d'injection veineuse (de Maria, 2021), rapporte une bonne tolérance du vaccin MVA-BN-brachyurie-TRICOM injecté par cette voie dans des indications oncologiques. Par ailleurs, un autre vaccin préventif à base de MVA contre le paludisme et utilisant la voie IV chez des volontaires sains est en cours d'évaluation actuellement (NCT03707353, NCT03084289, NCT04009096) suggérant qu'il n'y a pas d'anticipation d'effets secondaires majeurs avec cette voie. Dans ce contexte et afin d'obtenir des premières données avec notre MVA-hIL-7-Fc injecté par la voie IV dans une espèce animale supérieure, nous avons réalisé en 2022 une étude exploratoire de sécurité et de collecte de données biologiques sur quatre macaques Cynomolgus. Ils ont reçu une injection intraveineuse du MVA-hIL-7-Fc utilisé à la dose clinique et les résultats sont en cours de soumission (Coupet, soumis). Dans ce modèle, nous avons démontré une bonne pharmacocinétique de production de l'hIL-7 et que le produit est très bien toléré dans une espèce plus proche de l'homme.

Afin de consolider nos données dans l'optique d'un développement clinique, deux études ont été réalisées *ex vivo* sur des prélèvements de sang de patients en soins intensifs. La première étude porte sur des patients en choc septique ou atteints de COVID-19 et des donneurs sains (Crausaz, 2022). Les résultats obtenus montrent que les surnageants cellulaires contenant de l'hIL-7-Fc produite via par le MVA-hIL7-Fc ont déclenché la voie de l'IL-7 dans les lymphocytes T (augmentation de la phosphorylation de STAT5 dans les cellules CD3+). On retrouve également une amélioration de la production d'IFNγ et/ou de TNFα et de la prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ après stimulation par le TCR chez les patients atteints de septicémie bactérienne et virale.

La seconde étude, dont les résultats sont également en cours de soumission porte sur des prélèvements sanguins de patients âgés ayant subi une fracture traumatique de la hanche. Le but était de démontrer l'impact de notre candidat sur la fonctionnalité des lymphocytes T immunosénescents (Marton, en rédaction).

Chacune de ces études a permis de démontrer la capacité de notre nouvelle virothérapie à base de MVA-hIL-7-Fc à restaurer ou stimuler les fonctions immunitaires dans 3 modèles animaux : les souris naïves, les souris porteuses d'une immunosuppression induite par la CLP et les primates Cynomolgus. Lors de cette dernière étude, la cinétique de production de l'hIL-7, des preuves d'activité et les premiers éléments d'innocuité du produit ont été démontrés dans une espèce proche de l'homme. Dans un même temps, deux projets de stimulation *ex vivo* de leucocytes de patients en soins intensifs atteints de septicémie et de COVID-19 ou de patients âgés ayant subi une fracture traumatique sont venus apporter des données soutenant la capacité du MVA-hIL7-Fc à entrer en développement clinique.

En conclusion, l'ensemble des données générées avec le MVA-hIL-7 soutiennent le développement clinique de cette nouvelle immunothérapie prometteuse pour le traitement des patients atteints de septicémie ou immunosupprimés.

- Bibliographie -

ANSM rapport. 2015. https://www.omedit-grand-est.ars.sante.fr/system/files/2017-08/ATBC-antibiotiques-critiques-actualisation2015.pdf

Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, et al. 1998. The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison with Other Orthopoxviruses. Virology 244, 365–396.

Beura LK, Hamilton SE, Bi K, et al. 2016. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. Nature. 532(7600):512–6.

Biswas SK, Lopez-Collaxo. 2009. E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. Trends Immunol. 30:475–87.

Bo L, Wang F, Zhu J, et al. 2011. Granulocyte-colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. Crit Care. 15:R58.

Boomer JS, To K , Chang KC, et al. 2011. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. JAMA. 306(23): 2594–2605.

Borgel D, Vieillard A. 2011. La protéine C activée. Sciences 2011. 27 : 501-7

Bruhns P, Jonsson F. 2015. Mouse and human FcR effector functions. Immunol. ev. 268: 25 51.

Castelino DJ, McNair P, Kay TW. 1997. Lymphocytopenia in a hospital population-what does it signify? Aust NZ J Med. 27 : 170-4.

Web Side Effects of Smallpox Vaccination-Smallpox-CDC. 2019. https://www.cdc.gov/smallpox/vaccine-basics/vaccination-effects.html.

Chougnet C, Thacker R, Shehata H, et al. 2015. Loss of Phagocytic and Antigen Cross-Presenting Capacity in Aging Dendritic Cells Is Associated with Mitochondrial Dysfunction J Immunol. 15;195(6):2624-32.

Claushuis TA, van Vught LA, Scicluna BP, et al. 2016. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response incritically ill sepsis patients. Blood. 2015- 11-680744.

Coupet CA, Dubois C, Evlachev A, Kehrer N, Baldazza M, Hofman S, Vierboom M, Martin P, Inchauspe G. 2022. Intravenous injection of a novel viral immunotherapy encoding human interleukin-7 in non-human primates is safe and increases absolute lymphocytes count. submission accepted with minor corrections.

Crausaz M, Monneret G, Conti F, et al. 2022. A novel virotherapy encoding human interleukin-7 improves ex vivo T lymphocyte functions in immunosuppressed patients with septic shock and critically ill COVID-19. Front Immunol. 15;13:939899.

Delaloye J, Roger T, Steiner-Tardivel Q-G, et al. 2009. Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. PLoS Pathog. 5(6):e1000480.

Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino FJ. 2010. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. Blood. 115, 1121–1130.

de Lima M, Hiroki CH, de Fatima BV, et al 2022. Sepsis-induced immunosuppression is marked by an expansion of a highly suppressive repertoire of FOXP3+ T-regulatory cells expressing TIGIT. J Infect Dis. 225(3):531–41.

de Maria PJ, Lee-Wisdom K, Donahue RN, et al. 2021. Phase 1 open-label trial of intravenous administration of MVA-BN-brachyury-TRICOM vaccine in patients with advanced cancer. Journal for immunotherapy of cancer. 9(9):e003238.

de Roquetaillade C, Monneret G, Gossez M, Venet F. 2018. IL-7 and its benefcial role in sepsis-induced T lymphocyte dysfunction. Crit Rev Immunol. 38(6):433–51.

Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. 2011. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? Trends Microbiol. 19: 198208.

Dekkers G, Bentlage AEH, Stegmann TC, et al. 2017. Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. Mabs. 9: 767 773.

Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. 2004. Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee: Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Crit Care Med. 32:858–873.

Deria A, Jezek Z, Markvart K, Carrasco P, Weisfeld J. 1980. The world's last endemic case of smallpox: surveillance and containment measures. Bull. World Health Organ. 58, 279–283.

Durand M, Hagimont E, Louis H,et al. 2022. The beta1-adrenergic receptor contributes to sepsis-induced immunosuppression through modulation of regulatory T-cell inhibitory function. Crit Care Med. 1;50(9):e707-e718.

Engelmann B, Massberg S. 2012. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat Rev Immunol. 10.1038/nri3345.

Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, et al. 2016. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. Curr. Opin. Immunol. 41, 47–54.

Fend L, Gatard-Scheikl T, Kintz J, et al. 2014. Intravenous injection of MVA virus targets CD81 lymphocytes to tumors to control tumor growth upon combinatorial treatment with a TLR9 agonist. Cancer Immunol. Res. 2: 1163.1174.

Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, et al. 2016. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. Dtsch Arztebl Int. 113:159–66.

Flohe SB, Agrawal H, Flohe S, et al. 2008. Diversity of interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in restoring immune dysfunction of dendritic cells and macrophages during polymicrobial sepsis. Mol Med. 14:247–56.

Francois B, Jeannet R, Daix T, et al. 2018. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. JCI Insight 3: e98960.

Fry TJ, Macall CL. 2005. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. J Immunol. 174:6571–6.

Gómez CE, Nájera JL, Krupa, M, and Esteban M. 2008. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. Curr. Gene Ther. 8, 97–120.

Grailer JJ, Fattahi F, Dick RS, Zetoune FS, Ward PA. 2015. Cutting edge: critical role for C5aRs in the development of septic lymphopenia in mice. J Immunol. 194(3):868–72.

Guignant C, Lepape A, Huang X, et al. 2011. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nasocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. Crit Care. 15:R99.

Guo RF, Ward PA. 2005. Role of C5A in inflammatory responses. Annu rev.immunol.23.021704.115835.

Hamers L, M Kox, Pickkers P. 2015. Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options. Minerva Anestesiol. 81(4):426-39.

Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, et al. 2007. Interleukin-18 restores immune suppression in patients with nonseptic surgery, but not with sepsis. Am J Surg. 193:676–80.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med. 1999;27:1230–51.

Hotchkiss RS, Schmieg RE, Swanson PE, et al. 2000. Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock. Crit Care Med. 28:3207–17.

Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med. 348 : 138-50.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. 2009. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. N Engl J Med. 361:1570–83(031).

Hotchkiss RS, Opal SM. 2010. Immunotherapy for Sepsis: a new approach against an ancient foe. N Engl J Med. 363(1): 87–89.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. Nat Rev Immunol. 13(12):862-74.

Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, et al. 2016. Sepsis and septic shock. Nat Rev Dis Primers. 2:16045.

Hynninen M, Pettila V, Takkunen O, et al. 2003. Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interkeukin04 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. Shock. 20:1.

Ikuta S, Ono S, Kinoshita M, et al. 2003. Interleukin-18 concentration in the peritoneal fluid correlates with the severity of peritonitis. Am J Surg. 185:550–5.

Inoue S, Unsinger J, Davis CG, et al. 2010. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. J Immunol. 184:1401–9.

Inoue S, Suzuki-Utsunomiya K, Okada Y, et al. 2013. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. Crit Care Med. 41 : 810-9.

Johnson SE, Shah N, Panoskaltsis-Mortari A, and LeBien TW. 2005. Murine and human IL-7 activate STAT5 and induce proliferation of normal human Pro-B cells. J. Immunol. 175: 7325–7331.

JustSaySepsis. 2015. https://www.nc epod.org.uk/2015report2/downloads/JustSaySepsis_FullReport.pdf

Kong X, Zhang J, Huo J, et al. 2018. A systematic investigation on animal models of cyclosporine a combined with escherichia coli to simulate the immunosuppressive status of sepsis patients before onset. Int Immunopharmacol. 62:67–76.

Landelle C, Lepape A, Voirin N, et al. 2010. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. Intensive Care Medicine volume 36, pages1859–1866.

Lehmann MH, Kastenmuller W, Kandemir JD, Brandt F, Suezer Y, Sutter G. 2009. Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. J Virol. 83(6):2540–52.

Lélu K, Dubois C, Evlachev A, Crausaz M, Baldazza M, Kehrer N, Brandely R, Schlesinger Y, Silvestre N, Marchand JB, Bastien B, Leung-Theung-Long S, Unsinger J, Martin P, Inchauspé G. 2022. Viral Delivery of IL-7 Is a Potent Immunotherapy Stimulating Innate and Adaptive Immunity and Confers Survival in Sepsis Models. J Immunol. 1;209(1):99-117. (Annexe 3)

Levi M, Van der Poll T. 2017. Coagulation and sepsis. Thromb Res. 149:38-44

Liu L, Chavan R, Feinberg MB. 2008. Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by Modified Vaccinia Virus Ankara and play a key role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo. BMC Immunol. 15;9:15.

Lundstrom W, Fewkes NM, Mackall CL. 2021. IL-7 in human health and disease. Semin Immunol. 24 : 218-24

Mackall CL, Fry TJ, Gress RE, 2011, Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. Nat Rev Immunol. 11 : 330-42.

Marton C, Minaud a, Coupet C-A, Vallet H, Boddaert J, Kehrer N, Inchauspe G, Barraud L, Sauce D. A novel virotherapy encoding human interleukin-7 enhances ex vivo human immune functions in immunosenescent hip fracture trauma patients. Unpublished results.

Maslove DM, Tang B, Shankar-Hari M, et al. 2022. Redefining critical illness. Nat Med. 28(6):1141-1148.

Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al. 2009. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. Am J Respir Crit Care Med. 180:640–648.

Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, et al. 2015. Complement system part II: role in immunity. Front. Immunol. 6, 257.

Metcalf TU, Cubas RA, Ghneim K, et al. 2015. Global analyses revealed age-related alterations in innate immune responses after stimulation of pathogen recognition receptors. Aging Cell 14, 421–432.

Monneret G, Debard AL, Venet F, et al. 2003. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. Crit Care Med. 31:2068–71.

Monneret G, Finck ME, Venet F, et al. 2004. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. Immunol Lett. 95:193–8.

Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. 2006. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. Intensive Care Med. 32:1175–1183.

Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. 2008. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. Mol Med. 14: 64-78.

Monneret G, Villars-Méchin A, Demaret J, Foray AP, Venet F. 2014. L'interleukine7 comme thérapeutique immuno-adjuvante dans le traitement du choc septique. Médecine/sciences. 30: 160-5.

Moss B .2011. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. Immunol. Rev. 239, 8.

Munford RS, Pugin J. 2001. Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. Am J Respir Crit Care Med Vol 163. pp 316–321

Nakamori Y, Park EJ, Shimaoka M. 2021. Immune Deregulation in Sepsis and Septic Shock: Reversing Immune Paralysis by Targeting PD-1/PD-L1 Pathway 1. Front Immunol. 17; 11:624279.

Nieman MT. 2016. Protease-activated receptors in hemostasis. Blood. 128, 169–177.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. 2002. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. Crit Care Med. 30:S58–63.

Ono S, Kimura A, Hiraki S, et al. 2013. Removal of increased circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with septic shock using hemopefusion with polymyxin B-immobilized fibers. Surgey. 153:262–71.

Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Aosasa S. 2018. Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis Ann Gastroenterol Surg, 24;2(5):351-358.

Ostermann M, Kashani K, Forni LG. 2016. The two sides of creatinine: both as bad as each other? J Thorac Dis. 8(7): E628–E630.

Overton ET, Stapleton J, Frank I, et al. 2015. Safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara-Bavarian Nordic smallpox vaccine in vaccinia-naive and experienced human immunodeficiency virus-infected individuals: an open-label, controlled clinical phase II trial. Open Forum Infect Dis. 3(1):ofv183.

Papayannopoulos V. 2018. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nature Reviews Immunology. volume 18, 134–147.

Pascutti MF, Rodríguez AM, Falivene J, et al. 2011. Interplay between Modified Vaccinia Virus Ankara and Dendritic Cells: Phenotypic and Functional Maturation of Bystander Dendritic Cells. J Virol. 85, 5532–5545.

Pawlinski R, Mackman N. 2010. Cellular Sources of Tissue Factor in Endotoxemia and Sepsis. Thromb Res. 125S1: S70–S73.

Peters VTA, Kox M, Abdo WF, Pickkers P. 2018. Precision immunotherapy for sepsis. Front Immunol. 9:1926.

Price PJR, Torres-Domínguez LE, Brandmüller C, Sutter G, Lehmann MH. 2013. Modified Vaccinia virus Ankara: innate immune activation and induction of cellular signalling. Vaccine. 31(39):4231–34.

Prescott HC, Angus DC. 2018. Enhancing recovery from sepsis: a review. JAMA. 319(1):62-75.

Ramirez JC, Finke D, Esteban M, Kraehenbuhl JP, Acha-Orbea H. 2003. Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration. Arch Virol. 148(5):827–39.

Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, et al. 2017. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. N Engl J Med 377:414–417.

Restagno D, Venet F, Paquet C, et al. 2016. Mice survival and plasmatic cytokine secretion in a "two hit" model of sepsis depend on intratracheal Pseudomonas aeruginosa bacterial load. PLoS One. 11: e0162109.

Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. 2001. Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med. 345:1368–1377.

Ruan WS, Feng MX, Xu J, et al. 2020. Early activation of myeloid-derived suppressor cells participate in sepsis-induced immune suppression via PD-L1/PD-1 axis. Front Immunol. 11:1299.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 155:1151–64.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. 2006. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunological Reviews. Vol. 212: 8–27

Sanchez J, Gonçalves E, Llano A, Gonzáles P, et al. 2020. Immune Profiles Identification by Vaccinomics After MVA Immunization in Randomized Clinical Study. Front Immunol. 11:586124.

Seki S, Osada S, Ono S, et al. 1998. Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in IFN-gamma and IL-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. Infect Immun. 66:5286–94.

Seymour CW, Rea TD, Kahn JM, et al. 2012. Severe sepsis in prehospital emergency care: analysis of incidence, care, and outcome. Am J Respir Crit Care Med. 186:1264–1271.

Shannon O. 2020. The role of platelets in sepsis. Res Pract Thromb Haemost. 5:27–37.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 315:801–10.

Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, et al. 2017. Murine models of sepsis and trauma: Can we bridge the gap? Ilar J. 58(1):90–105.

Thampy LK, Remy KE, Walton AH, et al. 2018. Restoration of T Cell function in multi-drug resistant bacterial sepsis after interleukin-7, anti-PD-L1, and OX-40 administration. PLoS One. 13: e0199497.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. 366:2443–54.

Torio CM, Moore BJ. 2013. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer. Statistical Brief. 204. 2006.

Torres LK, Pickkers P, Van der Poll T. 2021. Sepsis-Induced Immunosuppression. Annu Rev Physiol. 10; 84:157-181.

Tsujimoto H, Ono S, Hiraki S, et al. 2004. Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers reduced the number of CD16+ CD14+ monocytes in patients with septic shock. J Endotoxin Res. 10:229–37.

Unsinger J, McDonough JS, Shultz LD, Ferguson TA, Hotchkiss RS. 2009. Sepsis-induced human lymphocyte apoptosisand cytokine production in "humanized" mice. J Leukoc Biol. 86(2): 219–227.

Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, et al. 2010. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. J. Immunol. 184: 3768–3779.

Unsinger J, Burnham CA, McDonough J, et al. 2012. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. J Infect Dis. 206(4):606–16.

van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, et al. 2017. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. Nat Rev Immunol. 17:407–420.

van der Poll T, Shankar-Hari M, Wiersinga WJ. 2021. The immunology of sepsis. Immunity. 54(11):2450–64.

Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al. 2006. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. J Immunol. 177:6540–7.

Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al. 2009. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. Intensive Care Med. 35:678–86.

Venet F, Davin F, Guignant C, et al.2010. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. Shock. 34 : 358-63.

Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, et al. 2012. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. J Immunol. 189(10):5073–81.

Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, et al. 2013. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approachto administration of immunoadjuvant therapies. Curr Opin Immunol. 25(4): 477–483.

Venet F, Demaret J, Blaise BJ, et al. 2017. IL-7 restores T lymphocyte immunometabolic failure in septic shock patients through mTOR activation. J Immunol. 199(5):1606–15.

Venet F, and Monneret G. 2018. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. Nat. Rev. Nephrol. 14, 121–137.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I .1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature.390:350–1.

Volz A, Sutter G. 2017. Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development. Adv. Virus Res. 97, 187–243.

WHO, World Health Organization. 2020. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334216/9789240010789-eng.pdf

Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, and Van der Poll T. 2014. Host innate immune responses to sepsis. Virulence. 5:1, 36–44

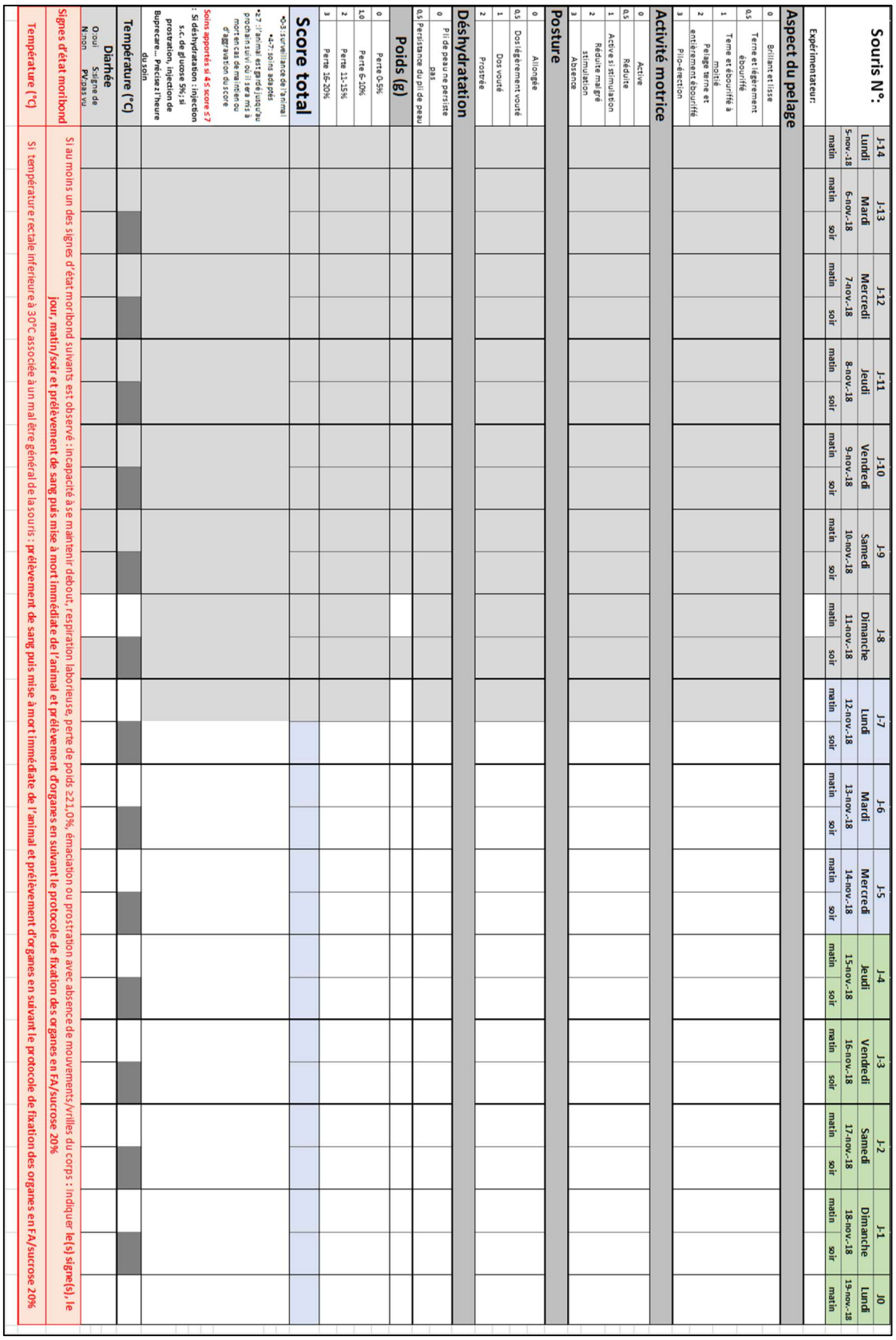
Wilson L, Cleary P. 1995. Linking clinical variables with health-related quality of life: a conceptual model of patient outcomes. JAMA. 273(1):59–65.

Xu WH, Mo LC, Shi MH, et al. 2022. Correlation between thrombopoietin and inflammatory factors, platelet indices, and thrombosis in patients with sepsis: A retrospective study. World J Clin Cases. 10(13):4072-4083.

Zitzmann-Roth E, von Sonnenburg F, de la Motte S, et al. 2015. Cardiac safety of Modified Vaccinia Ankara for vaccination against smallpox in a young, healthy study population. PLoS One. 16;10(4):e0122653.

- Annexes -

Annexe 1 : Fiche de suivi des animaux Version 2018



Souris N°:		J-14		J-13		J-12		J-11		J-10		J-9		J-8		J-7		J-6		J-5		J-4		J-3		J-2		J-1		J0
		Lundi		Mardi		Mercredi		Jeudi		Vendredi		Samedi		Dimanche		Lundi		Mardi		Mercredi		Jeudi		Vendredi		Samedi		Dimanche		Lundi
		5-nov.-18		6-nov.-18		7-nov.-18		8-nov.-18		9-nov.-18		10-nov.-18		11-nov.-18		12-nov.-18		13-nov.-18		14-nov.-18		15-nov.-18		16-nov.-18		17-nov.-18		18-nov.-18		19-nov.-18
		matin		matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin
Expérimentateur:																														
Aspect du pelage																														
	0 Brillant et lisse																													
	0.5 Terne et légèrement ébouriffé																													
	1 Terne et ébouriffé à moitié																													
	2 Pelage terne et entièrement ébouriffé																													
	3 Poil-o-érection																													
Activité motrice																														
	0 Active																													
	0.5 Réduite																													
	1 Active si stimulation																													
	2 Réduite malgré stimulation																													
	3 Absence																													
Posture																														
	0 Allongée																													
	0.5 Dos légèrement voûté																													
	1 Dos voûté																													
	2 Prostrée																													
Déshydratation																														
	0 Pli de peau ne persiste pas																													
	0.5 Persistance du pli de peau																													
Poids (g)																														
	0 Perte 0-5%																													
	1.0 Perte 6-10%																													
	2 Perte 11-15%																													
	3 Perte 16-20%																													
Score total																														
	*0-1 surveillance de l'animal																													
	*2-7 : la souris est prise en charge jusqu'à prochain suivi ou il sera mis à mort en cas de maintien ou d'aggravation du score																													
	Soins apportés si 4≤ score ≤7																													
	: Si déshydratation : injection s.c. de glucose 5%; si prostration; injection de Buprecare... Préciser l'heure du soin																													
Température (°C)																														
Diarhée																														
O:oui N:non	Signe de PV:pas vu																													
Signes d'état moribond		Si au moins un des signes d'état moribond suivants est observé : incapacité à se maintenir debout, respiration laborieuse, perte de poids ≥21,0%, émaciation ou prostration avec absence de mouvements/vrilles du corps : indiquer le(s) signe(s), le jour, matin/soir et prélèvement de sang puis mise à mort immédiate de l'animal et prélèvement d'organes en suivant le protocole de fixation des organes en FA/sucrose 20%																												
Température (°C)		Si température rectale inférieure à 30°C associée à un mal être général de la souris : prélèvement de sang puis mise à mort immédiate de l'animal et prélèvement d'organes en suivant le protocole de fixation des organes en FA/sucrose 20%																												

Injections :	J-14	J-13		J-12		J-11		J-10		J-9		J-8		J-7		J-6		J-5		J-4		J-3		J-2		J-1		J0	
	Lundi	Mardi		Mercredi		Jeudi		Vendredi		Samedi		Dimanche		Lundi		Mardi		Mercredi		Jeudi		Vendredi		Samedi		Dimanche		Lundi	
	5-nov.-18	6-nov.-18		7-nov.-18		8-nov.-18		9-nov.-18		10-nov.-18		11-nov.-18		12-nov.-18		13-nov.-18		14-nov.-18		15-nov.-18		16-nov.-18		17-nov.-18		18-nov.-18		19-nov.-18	
	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	soir	matin	
Buprénorphine														50µl															
Glucose 5%																													
Antibiotiques																													
Doliprane change bib																													

Suivi Post Op : 7h et 19h

Ouvrir la cage et observer le comportement des souris
Scorer l'activité motrice, l'aspect du pelage et la posture
Peser la souris et reporter le poids et la perte de poids en % dans le tableau de scoring (voir l'abaque)
Le matin uniquement: Prendre la température rectale de la souris et reporter la valeur à la fin du tableau au recto

Traitements matin et soir:

Reporter tous les volumes injectés dans le tableau "injections" ci dessus

Buprénorphine (Buprécare) : Aliquot à 0,03mg/mL à récupérer auprès du PBES
Injecter **100µL** (0,1mg/kg) en **sous-cutanée (SC)** dans le pli de peau du cou

Antibiotiques (Tienam) : aliquots de poudre en tube à reprendre en glucose 5% **préchauffé à 37°C**

- Utiliser une ampoule neuve de glucose stockée dans l'armoire à 30°C (ou boite à 37°C)
- Reprendre l'antibiotique dans le volume de glucose 5% correspondant noté sur la feuille dans le sachet
  Si besoin passer en Falcon 15ml
- Jeter le reste de glucose
- Injecter 25mg/kg de la solution en IP

voir la correspondance volume / poids dans le tableau ci contre :

poids souris (g)	volume ATB à injecter (µL)
18	300
19	317
20	333
21	350
22	367
23	383
24	400
25	417
26	433
27	450
28	467
29	483
30	500

Suivi Classique : matin et soir

NE PAS DEPASSER 1 mL / jour de volume injecté à la souris. Tous traitements confondus

Ouvrir la cage et observer le comportement des souris
Scorer l'activité motrice, l'aspect du pelage et la posture
Peser la souris et reporter le poids et la perte de poids en % dans le tableau de scoring (voir l'abaque)
Le matin uniquement: Prendre la température rectale de la souris et reporter la valeur à la fin du tableau

Soins : Reporter chaque volume injecté dans le tableau "injections" en haut de la feuille

Si signes de souffrance :
Buprénorphine (Buprécare) **:** Aliquot à 0,03mg/mL à récupérer auprès du PBES
Injecter **100µL** (0,1mg/kg) en **sous-cutanée (SC)** dans le pli de peau du cou

!! Si injection combinée de Bupré et de glucose, faire la Bupré en SC et le glucose en IP

Si déshydratation +/- perte de poids > 15%
Glucose 5% à 37°C
Utiliser une ampoule neuve de Glucose 5% **préchauffé**, injecter en **sous-cutanée (SC)** dans le pli de peau du cou le volume correspondant au poids de la souris (se référer au tableau ci-dessus)

Doliprane : Sirop au frigo pièce du fond + eau adoucie autoclavée (bouteilles en verre) + biberon propre
Biberon à changer tous les 3 jours
Pour 3 jours : 3,75mL doliprane + 150mL eau adoucie
Pour 1 jour : 2,5mL de doliprane + 100mL d'eau adoucie

Si sacrifice en cours de protocole: !! Prévoir de le faire à un moment permettant de respecter l'incubation d'une heure !!
Prélèvement de sang en retro orbital (microvette 200ZGel), mise à mort par dislocation cervicale puis prélèvement des organes suivants : Cœur, foie, rein, rate, extrémité ligaturée du caecum et suivre le protocole de fixation des organes en FA/sucrose 20%

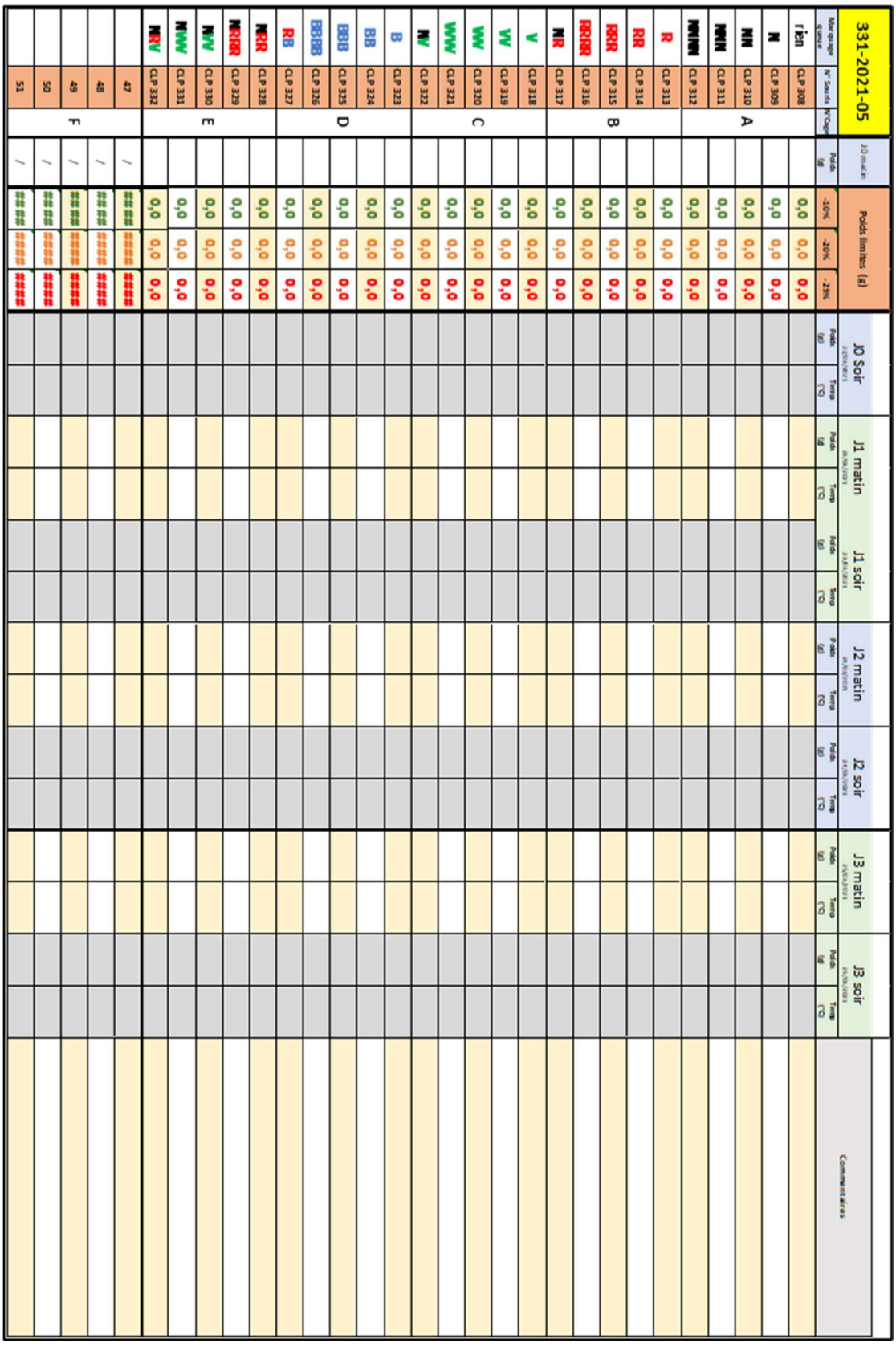
Suivi Post Op
Suivi Classique
Change doliprane

Heure de début de chirurgie :

Réveil ok ☐

Notes :

Annexe 2 : Fiche de suivi des animaux 2021



Annexe 3: Viral Delivery of IL-7 Is a Potent Immunotherapy Stimulating Innate and Adaptive Immunity and Confers Survival in Sepsis Models.

Lélu K, Dubois C, Evlachev A, Crausaz M, Baldazza M, Kehrer N, Brandely R, Schlesinger Y, Silvestre N, Marchand JB, Bastien B, Leung-Theung-Long S, Unsinger J, Martin P, Inchauspé G. 2022. J Immunol. 1;209(1):99-117.

The Journal of Immunology

This information is current as of June 7, 2022.

Viral Delivery of IL-7 Is a Potent Immunotherapy Stimulating Innate and Adaptive Immunity and Confers Survival in Sepsis Models

Karine Lélu, Clarisse Dubois, Alexei Evlachev, Morgane Crausaz, Marie Baldazza, Nadine Kehrer, Renée Brandely, Yasmin Schlesinger, Nathalie Silvestre, Jean-Baptiste Marchand, Bérangère Bastien, Stéphane Leung-Theung-Long, Jacqueline Unsinger, Perrine Martin and Geneviève Inchauspé

J Immunol published online 6 June 2022
http://www.jimmunol.org/content/early/2022/06/05/jimmunol.2101145

Supplementary Material **http://www.jimmunol.org/content/suppl/2022/06/05/jimmunol.2101145.DCSupplemental**

Why *The JI*? Submit online.

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: http://jimmunol.org/subscription

Permissions Submit copyright permission requests at: http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html

Author Choice Freely available online through *The Journal of Immunology* Author Choice option

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: http://jimmunol.org/alerts

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2022 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

Published June 6, 2022, doi:10.4049/jimmunol.2101145

Viral Delivery of IL-7 Is a Potent Immunotherapy Stimulating Innate and Adaptive Immunity and Confers Survival in Sepsis Models

Karine Lélu,* Clarisse Dubois,* Alexei Evlachev,* Morgane Crausaz,* Marie Baldazza,* Nadine Kehrer,* Renée Brandely,† Yasmin Schlesinger,† Nathalie Silvestre,† Jean-Baptiste Marchand,† Bérangère Bastien,‡ Stéphane Leung-Theung-Long,*,[1] Jacqueline Unsinger,§,¶,‖ Perrine Martin,*,[2] and Geneviève Inchauspé*

Persistence of an immunosuppressive state plays a role in septic patient morbidity and late mortality. Both innate and adaptive pathways are impaired, pointing toward the need for immune interventions targeting both arms of the immune system. We developed a virotherapy using the nonpropagative modified vaccinia virus Ankara (MVA), which harbors the intrinsic capacity to stimulate innate immunity, to deliver IL-7, a potent activator of adaptive immunity. The rMVA–human IL-7 (hIL-7)–Fc encoding the hIL-7 fused to the human IgG2-Fc was engineered and shown to express a dimeric, glycosylated, and biologically active cytokine. Following a single i.v. injection in naive mice, the MVA–hIL-7–Fc increased the number of total and activated B, T, and NK cells but also myeloid subpopulations (Ly6C^{high}, Ly6C^{int}, and Ly6C^{neg} cells) in both lung and spleen. It triggered differentiation of T cells in central memory, effector memory, and acute effector phenotypes and enhanced polyfunctionality of T cells, notably the number of IFN-γ–producing cells. The MVA vector contributed significantly to immune cell activation, particularly of NK cells. The MVA–hIL-7–Fc conferred a significant survival advantage in the cecal ligation and puncture (CLP) and *Candida albicans* sepsis models. It significantly increased cell numbers and activation in both spleen and lung of CLP mice. Comparatively, in naive and CLP mice, the rhIL-7–Fc soluble counterpart overall induced less vigorous, shorter lasting, and narrower immune activities than did the MVA–hIL-7–Fc and favored TNF-α–producing cells. The MVA–hIL-7–Fc represents a novel class of immunotherapeutic with clinical potential for treatment of septic patients. ***The Journal of Immunology*****, 2022, 209: 1–19.**

Host-directed therapies (HDTs) aim at reinforcing host defenses postinfection (p.i.) in a pathogen-agnostic fashion by targeting host factors. Immunotherapies are part of the HDT arsenal. Their goal is to modulate host immune mechanisms either in a positive (e.g., restoring altered immune pathways) or negative (e.g., decreasing immune-inflammatory pathways) fashion. During the last 20 y, the field of cancer immunotherapies has developed at fast speed, and diverse platforms have been brought to the clinic, including mAbs, recombinant molecules, recombinant viruses, and cell-based therapies (1, 2). The recent success of checkpoint inhibitors targeting inhibitory pathways linked to expression of CTLA-4 (anti–CTLA-4) and to programmed cell death protein-1 (PD-1)/programmed death ligand-1 (PD-L1) (3) has further convinced the scientific community to more aggressively develop immune HDT in infectious disease (4). Although HDT for chronic infectious disease dates back to earlier attempts to try and improve treatment of tuberculosis (5), it has subsequently attracted increasing attention to provide ways to circumvent antimicrobial resistance, in particular via immunotherapy-based approaches (6, 7).

One complex infectious-related healthcare challenge is sepsis. Sepsis is defined by a life-threatening organ dysfunction that is caused by a dysregulated host response to infection (8). It remains the leading cause of death among critically ill patients. Forty-nine million estimated cases of sepsis were recorded worldwide in 2017, leading to 11 million sepsis-related deaths (9). In intensive care units, it is globally estimated that 20–30% of septic patients of age >65 y will still die within 30 d after disease onset, and up to 60–74% between 1 and 5 y later (10–12). An initial dominant hyperinflammatory phase is responsible for widespread organ damage and early mortality. In most surviving patients a prolonged state of immune suppression establishes increasing susceptibility to secondary infections, contributing to poor organ recovery and playing an important role in late mortality (13, 14). Etiology of this immune suppression has been intensively studied during the last 15 y, and investigations have established alteration of multiple immune pathways both

*Department of Infectious Diseases, Transgene SA, Lyon, France; †Department of Vectorology, Transgene SA, Illkirch-Graffenstraden, France; ‡Department of Medical Affairs, Transgene SA, Illkirch-Graffenstraden, France; §Department of Anesthesiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO; ¶Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO; and ‖Department of Surgery, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO

[1]Current address: Department of In Vitro Biology and Immuno-Oncology, Evotec SAS, Toulouse, France.

[2]Current address: GenOway, Lyon, France.

ORCIDs: 0000-0003-4696-7586 (N.S.), 0000-0002-4057-8689 (B.B.).

Received for publication January 4, 2022. Accepted for publication April 25, 2022.

This work was supported in part by Agence Nationale Recherche Technologie Grant 2019/0650 (Ph.D. training for M.C.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Geneviève Inchauspé, ImmuResQ Department, Transgene SA, 317 Avenue Jean Jaures, 69007 Lyon, France. E-mail address: inchauspe@transgene.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ADCC, Ab-dependent cellular cytotoxicity; AE, acute effector; CEF, chicken embryo fibroblast; CLP, cecal ligation and puncture; HDT, host-directed therapy; hIL-7, human IL-7; ICS, intracellular cytokine staining; i.n., intranasal; M-empty, empty MVA vector; MFI, mean fluorescence intensity; MVA, modified vaccinia virus Ankara; PB-1, pre-B murine-1; PD-1, programmed cell death protein-1; PD-L1, programmed death ligand-1; p.i., postinfection; PMH, primary murine hepatocyte; TCM, T central memory; TEM, T effector memory.

This article is distributed under The American Association of Immunologists, Inc., Reuse Terms and Conditions for Author Choice articles.

Copyright © 2022 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/22/$37.50

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

from the innate and adaptive systems. These include lymphocyte exhaustion and apoptosis, macrophage and T lymphocyte dysfunctions, Ag presentation decline, and increased myeloid-derived suppressor and regulatory T cells (14–16). Only a handful of immune HDTs have been tested in the sepsis clinic: injection of GM-CSF and IFN-γ was evaluated for the restoration of innate functions, while administration of anti–PD-1/PD-L1 mAbs and soluble IL-7 was tested to restore adaptive immunity (17–20). These early clinical trials (phase 1/2) have demonstrated a good safety profile and signs of immune activity of the injected immune HDT typically associated with restoration of monocyte HLA-DR expression and an increase of lymphocyte counts. IL-7 displays many attractive features: its high safety profile documented in various chronic infectious situations as well as in oncology (21–24), its capacity to stimulate T cell proliferation and function, and its ability to increase mucosal-associated invariant T cells as well as to counteract cell apoptosis (25–27). However, because of its short circulating half-life, multiple injections of rIL-7 formulations are typically required (28–30). In addition, the cytokine appears to marginally trigger innate immunity (31).

In this study, we describe the engineering and preclinical characterization of a novel immune HDT aimed at restoring immune homeostasis in immunosuppressed septic patients. We used a powerful and safe viral platform based on the nonpropagative modified vaccinia virus Ankara (MVA) (32) to deliver the IL-7 cytokine directly in a broad range of organs and cells of the injected host. Because MVA harbors an intrinsic capacity to stimulate innate immunity (33–35), we speculated that a rMVA expressing IL-7 will display a broader mechanism of action than a soluble IL-7. The rMVA–human IL-7 (hIL-7)–Fc was designed to express an hIL-7 fused to human IgG2-Fc and tested in naive and sepsis mouse models. Immunological and survival proof-of-concept studies were performed, including side-by-side comparison with the rhIL-7–Fc protein counterpart.

Materials and Methods

Engineering of the MVA–hIL-7–Fc

The MVA–hIL-7–Fc (research lot MVATG18897) is based on the highly attenuated MVA (36). A synthetic gene coding for the fusion of the hIL-7 sequence and the sequence of the human IgG2-Fc was synthesized (GeneArt, Regensburg, Germany) with the aim to increase the half-life of the cytokine. The human IgG2-Fc was selected because it displays the lowest effect on murine and human immune cells when bound to Fcγ receptors compared with other IgG Fcs (37, 38). A Kozak sequence (ACC) was added before the ATG starting codon, and a 3′-TTTTTNT transcriptional terminator sequence was added immediately after the stop codon. This sequence was cloned in a shuttle plasmid containing the pH5R early-late promoter, surrounded by portions of the MVA 164R and 165R genes, which allows homologous recombination in the MVA deletion III. The rMVA was generated in primary chicken embryo fibroblasts (CEFs). Briefly, cells were infected with a parental MVA vector containing an mCherry expression cassette in deletion III and transfected with the recombinant shuttle plasmid. Selection of recombinant, nonfluorescent clones was done by multiple rounds of plaque purification. After generation of the recombinant virus, sequence of the inserted DNA and viral purity were verified. Absence of parental virus was checked by PCR analysis. The rMVATG18897 and the virus MVATGN33.1 (empty MVA) were grown in CEF cells, and viral titers in PFU were assessed on the continuous DF-1 cell line of chicken embryo fibroblasts (ATCC CRL-12203).

Cell culture and infections

The human lung carcinoma cell line A549 (ATCC CCL-185) and DF-1 cell line were cultured according to the manufacturer's instructions and as previously described (39). Primary CEFs were prepared from chicken embryo obtained from fertilized eggs (Charles River SPAFAS, Mohac, Hungary) as previously described (39). Primary murine hepatocytes from CD1 mice were purchased from Biopredic International and cultured as recommended by the manufacturer. Primary murine hepatocytes and A549 cells were infected with the MVA–hIL-7–Fc or MVATGN33.1 at a multiplicity of infection of 10 and 5, respectively, and the supernatant was harvested 24 h later and the secreted hIL-7–Fc was quantified by ELISA.

ELISA quantification of the MVA–hIL-7–Fc-produced hIL-7–Fc

The hIL-7–Fc secreted in supernatants of in vitro–infected cells or found in blood of in vivo–infected mice was quantified using the hIL-7 DuoSet ELISA development system from R&D Systems according to the provider's instructions (no cross-detection of murine IL-7). The concentration of IL-7 in each sample was calculated using a standard curve established with the IL-7 standard provided by R&D Systems.

rhIL-7–Fc production and purification

hIL-7 has been shown to bind and signal via the murine IL-7 receptor and is hence typically used for evaluation in murine models (40). The hIL-7–Fc sequence was cloned in expression vector, expressed in Chinese hamster ovary cells, and the produced cytokine was purified by GeneArt (Regensburg, Germany). Briefly, ExpiCHO cells were transiently transfected with expression vector and cultured in 250 ml of culture medium for 6 d. Culture medium was then harvested and loaded on protein A resin (MabSelect, Cytiva), and protein was eluted following the provider's instructions. The rhIL-7–Fc was further purified by preparative size-exclusion chromatography using HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (Cytiva) equilibrated in PBS. The main peak corresponding to dimeric rhIL-7–Fc was collected, and protein concentration was determined by absorption at 280 nm. The rhIL-7–Fc protein, representing the counterpart of the hIL-7–Fc produced by the MVA–hIL-7–Fc, was aliquoted at 1 mg/ml and stored at −80°C until use. The sequence used in the production of the soluble hIL-7–Fc is 100% identical to that used in the construction of the MVA–hIL-7–Fc.

Western blot analysis

Deglycosylation of proteins was performed using PNGase F (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions and using supernatants from MVA–hIL-7–Fc-infected primary murine hepatocytes and A549 cells or purified rhIL-7–Fc counterpart. Treated samples were loaded on 4–15% Criterion TGX stain-free gel (Bio-Rad) at final hIL-7–Fc quantities of 0.75, 2.5, and 1.15 ng, respectively. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad) using the Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad) and the Turbo Midi high m.w. preset program. Membrane hybridization was performed overnight at 4°C using an iBind Flex Western system (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. A primary rabbit anti–hIL-7 (Abcam) Ab and an anti-rabbit HRP-conjugated (Dako) Ab were used to detect IL-7. HRP activity was detected using the ECL Prime Western blotting detection reagent (Amersham Biosciences). Chemiluminescence was recorded with a ChemiDoc XRS molecular imager (Bio-Rad).

hIL-7–Fc bioactivity assessment on pre-B murine-1 cell line

Functionality of hIL-7–Fc was assessed as previously described using the pre-B murine-1 (PB-1) cell line (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) dependent on IL-7 for growth (41). Serial dilutions of the culture supernatant from A549 cells and primary murine hepatocytes (PMHs) infected with MVA–hIL-7–Fc or MVATGN33.1, as well as serial dilutions of the rhIL-7–Fc, were incubated for 72 h with PB-1 cell line. The cellular proliferation was measured using MTT to determine effective doses (i.e., ED_{10}, ED_{50}, and ED_{90}). Assays were performed in duplicates.

Mice

Specific pathogen-free female (protocols in naive healthy mice) and male (cecal ligation and puncture [CLP] protocols) C57BL/6J mice between 6 and 8 wk of age were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). They were maintained in ventilated cages on standard rodent food and water ad libitum at the Plateau de Biologie de la Souris (Lyon, France). Experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethics Evaluation Committee CECCAPP (Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de Transit de l'ENS, au Plateau de Biologie de la Souris et au Laboratoire P4). Protocols in the sepsis *Candida albicans* model were performed at Washington University School of Medicine. Eight- to 10-wk-old male C57BL/6J mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All animal studies were approved by the Animal Studies Committee and all American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care guidelines were followed (42).

Treatment

Following anesthesia, healthy or CLP mice received a single injection of 10^7 or 10^8 PFU of MVA–hIL-7–Fc (M) or empty MVA vector (M-empty) or 5 μg of rhIL-7–Fc protein in 100 μl of buffer (10 mM Tris, 5% sucrose [w/v], 10 mM sodium glutamate, 50 mM sodium chloride [pH 8]) or PBS. MVA–hIL-7–Fc was injected either by the i.v. route through the retro-orbital sinus or by the i.m. route in the hindlimb, and the rhIL-7–Fc was injected by

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

the i.v. or s.c. route on the side, depending on the experiments performed. Mice were euthanized at the time indicated in the figure legends, and organs and blood were harvested.

CLP sepsis model

For induction of polymicrobial sepsis, mice were subjected to CLP as previously described (43). Briefly, mice were anesthetized with a mix of xylazine and ketamine. Laparotomy was performed and the cecum was isolated, ligated at its external third, and punctured twice with a 21G needle to create two single holes. A small amount of feces was extruded to induce a mild-grade sepsis (~40% mortality at day 4). Controls were healthy mice. All operated mice received analgesia (buprenorphine) prior to the surgery. At the end of the surgery, all operated mice received a s.c. injection of 5% glucose (Lavoisier) solution. ~6 h following surgery and then every 12 h for the next 2 d, all operated mice received an i.p. injection of antibiotics (imipenem + cilastatin [Tienam]) diluted in 5% glucose and a s.c. injection of buprenorphine (100 μl at 0.03 mg/ml per injection per mouse) to manage pain. Two days after CLP, buprenorphine was stopped and replaced by paracetamol at 2.4% in autoclaved drinking water (0.6 mg/ml) until the end of the experiment. Four days after CLP, that is, at time of established immunosuppression (K. Lélu, unpublished observations), surviving mice were separated through randomization according to body weight loss and received treatment as described above (CLP, CLP + MVA–hIL-7–Fc, CLP + MVATGN33.1, CLP + rhIL-7–Fc). Animals were euthanized 7 d after surgery and organs and blood were harvested.

C. albicans *sepsis infection model*

C. albicans (ATCC MYA-2430) was grown overnight in Difco Sabouraud dextrose broth medium, harvested, washed, and suspended in saline to obtain an OD of 0.3 A_{600}. Mice received 50 μl of the *Candida* suspension retro-orbitally. CFU/ml were determined after mouse inoculation by growing serial dilutions of the *C. albicans* preparation on blood agar plates (Hardy Diagnostics) for 24–36 h at room temperature or at 37°C overnight. Animals were observed for 10 d.

Serum preparation

At the end of protocols, blood was collected from the retro-orbital sinus into Microvette CB 200 Z-Gel (Sarstedt). Blood samples were kept for ~1 h at 4°C after sampling and centrifuged (10,000 rpm for 5 min at 4°C). Sera were thereafter collected in new tubes and stored at −20°C for ELISA or multiplex analysis.

Determination of blood-circulating cytokines/chemokines

Anti-inflammatory and proinflammatory molecules were assessed in sera using the U-PLEX multiplex electrochemiluminescence assay from Meso Scale Discovery according to the provider's instructions. The following molecules were tested: IL-1β, IL-6, IL-10, IL-21, TNF-α, IP-10, KC/GRO, and MCP-1. The concentrations of the different molecules were calculated using a standard curve established with calibrators provided by Meso Scale Discovery. Samples were read on a MESO QuickPlex SQ 120 reader. The level of IFN-γ was determined using the mouse ELISA MAX deluxe sets from BioLegend according to the provider's instructions. The concentration of each sample was calculated using a standard curve established with the control IFN-γ protein provided by BioLegend. The OD (450 nm) was measured on a Tecan SparkControl 1 plate reader.

Determination of cytokine levels after ex vivo stimulation

Proinflammatory cytokines were assessed in supernatant of cultured splenocytes or lung cells following 24 h of stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 Abs. Measurement of IL-1β, IL-5, IL-6, TNF-α, and IFN-γ was performed using the U-PLEX multiplex assay from Meso Scale Discovery and according to the manufacturer's instructions and as described above.

Flow cytometry analysis of spleen and lung cells

Spleens were harvested and dissociated. Cell suspensions were obtained after lysis of RBCs using RBC lysing buffer (Sigma-Aldrich). Lungs were collected after an intracardiac perfusion and were dissociated using the a lung dissociation kit (mouse) from Miltenyi Biotec according to the provider's instructions. Cell suspensions were obtained after lysis of RBCs using RBC lysing buffer. Thereafter, cells were washed twice with PBS–1% FCS and resuspended in αMEM (Life Technologies) supplemented with 10% FCS (Life Technologies), 80 U/ml penicillin + 80 μg/ml streptomycin (Life Technologies), 2 mM L-glutamine (Life Technologies), 1× nonessential amino acids (Life Technologies), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 1mM sodium pyruvate (Life Technologies), and 50 μM 2-ME (Life Technologies). Cellular suspensions were filtered through 40-μm nylon filters and the absolute number of cells was then determined using a cell counter (Guava Muse cell analyzer, Millipore). The percentage of each cell population was first defined by flow cytometry using the gating strategy described below and illustrated in Supplemental Fig. 1. Thereafter, the absolute number of each cell population was estimated by reporting the percentage to the total number of splenocytes or lung cells determined previously using the cell counter. Myeloid cells were all gated on live/dead$^-$CD45$^+$CD3$^-$CD19$^-$NK1.1$^-$ cells or live/dead$^-$B220$^-$NK1.1$^-$ cells (Supplemental Fig. 1A). Ly6C^{neg} monocytes were characterized as CD11b^{high}CD11c$^-$Ly6G$^-$Ly6C^{neg} cells. Ly6C^{int} monocytes were characterized as CD11b^{high}CD11c$^-$Ly6G$^-$Ly6C^{int} cells. Ly6C^{high} monocytes were characterized as CD11b^{high}CD11c$^-$Ly6G$^-$Ly6C^{high} cells. Neutrophils were characterized as CD11b^{high}CD11c$^-$Ly6G^{high} cells. T cells were identified as live/dead$^-$(CD45$^+$)CD3$^+$CD19$^-$NK1.1$^-$ CD4$^+$ or CD8$^+$ and the subtype of T cells as live/dead$^-$CD3$^+$ CD4$^+$ or CD8$^+$ CD44$^-$CD62L$^+$ (naive) CD44$^+$CD62L$^+$ (T central memory [TCM]), CD44$^+$CD62L$^-$ (T effector memory [TEM]), and CD44$^-$CD62L$^-$ (acute effector [AE]) cells (Supplemental Fig. 1B). B cells were identified as live/dead$^-$(CD45$^+$) CD3$^-$CD19$^+$NK1.1$^-$ cells. NK cells were identified as live/dead$^-$(CD45$^+$) CD3$^-$CD19$^-$NK1.1$^+$ cells. NKT cells were identified as live/dead$^-$ (CD45$^+$)CD3$^+$CD19$^-$NK1.1$^+$ cells. Cell activation was assessed by the expression of CD69. CD127 and Bcl-2 (intracytoplasmic staining) were used for assessing IL-7 functionality, and Ki67 (intranuclear staining) was used for assessing T cell proliferation. For this particular staining, fixation and permeabilization of cells was performed for 1 h in ethanol at −20°C. Directly conjugated Abs were used for FITC, PE, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5, allophycocyanin, allophycocyanin-H7, allophycocyanin-Cy7, and V500. Samples were acquired on a FACSCanto II cytometer and analyzed using the BD Biosciences FACSDiva software.

Intracellular IFN-γ/IL-2/TNF-α cytokine staining assay

One hundred microliters of splenocyte or lung cell suspension (from 0.5×10^6 to 2.5×10^6 cells per well in flat-bottom 96-well plates) was stimulated for 4 h with anti-CD3 and anti-CD28 Abs (1 μg/ml each) in the presence of GolgiPlug. After incubation, cells were washed, stored overnight at 4°C, and stained using the following Abs and reagents: Fc block solution (CD16/32), anti–CD4-V500/allophycocyanin-H7, anti–CD8-allophycocyanin-H7/V500, viability marker (live/dead LV450). Incubation with Fc block solution was performed prior to incubation with Abs. After washings, cells were fixed and permeabilized for 15 min in the dark at 4°C with Cytofix/Cytoperm and washed twice with Perm/Wash solution. An intracellular cytokine staining (ICS) assay was performed with the following Abs: anti–CD3-PerCP (Pala 2000), anti–IFN-γ-Alexa Fluor 488, anti–TNF-α-allophycocyanin, and anti–IL-2-PE for 30 min in the dark at 4°C (Supplemental Fig. 1C). Samples were then washed and run on a BD Biosciences FACSCanto II cytometer, and data were analyzed using the BD Biosciences FACSDiva software. The analyses were represented as stacked graphs showing the cumulative proportion of cytokine-producing cells in each group.

Statistical analysis

Data were reported as mean ± SD. To study immunological parameters, mixed models were built by general linear models with group as the fixed effect and experiment as the random effect with unstructured covariance structure. When a group effect was found to be significant, post hoc comparisons were done with a Tukey multiplicity adjustment. In survival studies, data were analyzed using Prism software (GraphPad Software). Significance was accepted at $p < 0.05$ (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$).

Results

The MVA vectorized hIL-7–Fc is dimeric, glycosylated, and biologically active

The hIL-7–Fc expressed by either A549 human pneumocytes or PMHs infected by the MVA–hIL-7–Fc was characterized in vitro. The later cells were selected as a key cell type expected to be infected after in vivo injection of the MVA–hIL-7–Fc by the i.v. route (44). Using a specific ELISA, concentrations of 20 and 200 ng/ml hIL-7–Fc were respectively detected in supernatants of PMHs and of A549 cells infected by the MVA–hIL-7–Fc, whereas no hIL-7–Fc was detected following infection with the empty MVA vector (Fig. 1A). Western blot analysis of supernatants of infected cells was performed under reducing or nonreducing conditions with or without a prior treatment by PNGase (Fig. 1B). Under reducing conditions, the PNGase treatment induced a clear shift in the apparent molecular mass of the hIL-7–Fc from 55 to 45 kDa, with the latter mass corresponding approximately to the calculated mass of

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

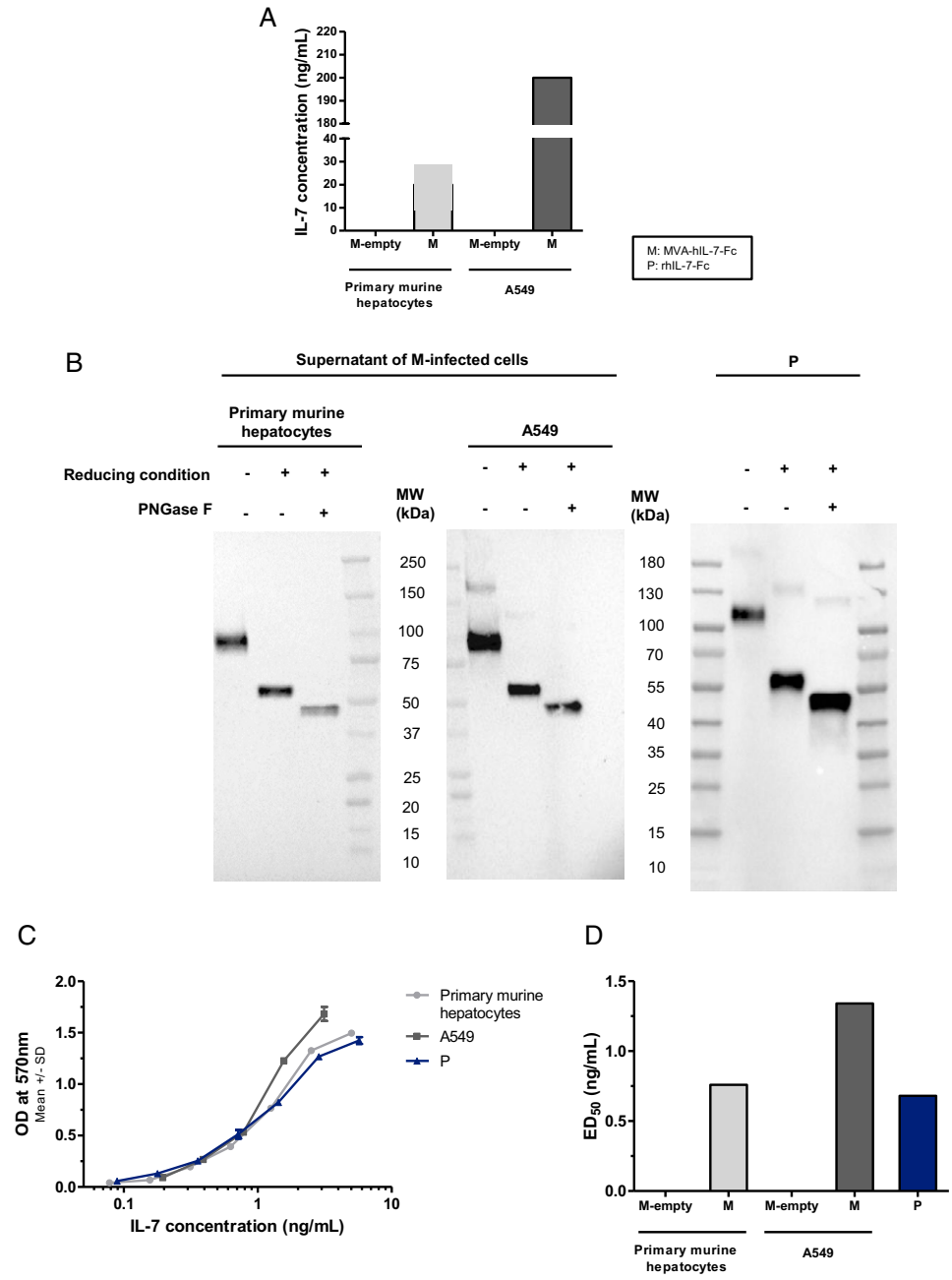


FIGURE 1. Western blot analysis and biological activity of the secreted hIL-7–Fc produced in vitro following infection with the MVA–hIL-7–Fc. A549 cells and primary murine hepatocytes were infected in vitro by the MVA–hIL-7–Fc (M) or the MVATGN33.1 (M-empty) and culture supernatants were harvested. (**A**) ELISA quantification of the secreted hIL-7–Fc in culture supernatants. (**B**) Western blot analysis of the M-produced hIL-7–Fc or the rhIL-7–Fc (P) following PNGase treatment (*N*-glycosylation analysis) and under reducing conditions (dimerization studies). (**C**) ED_{50} of the M-produced hIL-7–Fc or the rhIL-7–Fc (P) determined using the proliferation of murine PB-1 cells. (**D**) ED_{50} of the M-produced hIL-7–Fc or the rhIL-7–Fc (P).

the unmodified molecule (i.e., 43 kDa; predicted from the primary structure). These results demonstrate that the hIL-7–Fc produced by the infected cells is *N*-glycosylated expectedly on the four known glycosylation sites (three on the IL-7 sequence and one on the Fc sequence). Under nonreducing conditions, the hIL-7–Fc molecule migrated with an apparent 100 kDa molecular mass that corresponds approximately to the mass of the glycosylated dimer. This result indicates that the hIL-7–Fc produced by infected cells formed disulfide-linked dimers as expected for a Fc-containing molecule. Similar dimerization and *N*-glycosylation patterns were observed for the rhIL-7–Fc counterpart (Fig. 1B, right panel). Biological activity of the cytokine was determined using the PB-1 cell line dependent on IL-7 for growth. Serial dilutions of the hIL-7–Fc-containing supernatants from PMHs and A549-infected cells were used as well as the counterpart rhIL-7–Fc (Fig. 1C). The MVA-produced hIL-7–Fc was found biologically active with an ED_{50} of 0.76 and 1.34 ng/ml using supernatants from PMHs or A549-infected cells, respectively (Fig. 1D). The detected activity was similar to that observed with the rhIL-7–Fc (ED_{50} of 0.68 ng/ml). No IL-7 activity was detected in supernatants of cells infected with the empty MVA.

Injection of the MVA–hIL-7–Fc by the i.v. route results in more favorable IL-7–Fc pharmacokinetics and promotes higher numbers of activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in spleen and lung of naive mice than by the i.m. route

To select the injection route of the MVA–hIL-7–Fc triggering optimal pharmacokinetics and immune stimulation, we compared in naive mice the classical i.m. route often used in the clinic for rMVAs (one or three injections) and the i.v. route expected to allow for broader distribution of the virus (one injection). Three analyses were performed: the pharmacokinetics of circulating hIL-7–Fc, the detection of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells expressing the CD127 IL-7 receptor (45) expected to rapidly be downregulated after IL-7 signaling (46), and the evaluation of the number of total and activated

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

T cells in spleen and lung (Supplemental Fig. 2). A single i.v. injection resulted in systemically higher levels of hIL-7–Fc starting at 6 h p.i. up to day 4 compared with one or three i.m. injections (Supplemental Fig. 2A). One i.v. as well as three i.m. administrations of the MVA–hIL-7–Fc led to a similar significant decrease in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells expressing CD127 in spleen and lung at day 3 p.i. (except for lung $CD8^+$ cells) when compared with the CD127 expression in T cells from healthy control mice. A single i.m. injection had no significant impact on cell numbers (Supplemental Fig. 2B). Significant increases of the number of total $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were mainly seen with the i.v. route at day 3 and/or day 9 in spleens whereas the i.m. route (three injections only) yielded a small yet significant increase of both cell types only in lungs and at day 9. Strikingly, a single i.v. injection resulted in a significantly higher number of $CD69^+$ cells when compared with healthy mice and mice injected by the i.m. route following one or three injections (Supplemental Fig. 2C). Overall, these data led to the selection of the i.v. route for evaluation of the MVA–hIL-7–Fc in subsequent studies.

The MVA backbone contributes to immune stimulation in healthy mice

The MVA backbone significantly increases the number of total and activated NK cells observed in spleen and lung whereas MVA–hIL-7–Fc has additional broader effects on lymphocytes. Having demonstrated that MVA–hIL-7–Fc is able to increase the number of T cells and their activation status through CD69 expression, we aimed to expand these observations to other cell types (B and NK cells) as well as to explore the contribution of the MVA backbone to the observed effects. Healthy control mice were infected with the empty MVA and the MVA–hIL-7–Fc, and the total number of $CD4^+$ T, $CD8^+$ T, B, and NK cells as well as the number of activated $CD69^+$ cells were assessed at 1, 3, or 9 d p.i. in spleen and at 3 and 9 d p.i. in lung (Fig. 2A).

In spleen, at day 1 p.i., the number of analyzed cell types typically decreased, suggesting cell migration out of the spleen. Cell numbers significantly increased for all four cell types, that is, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, B cells, and NK cells, following injection of the MVA–hIL-7–Fc compared with healthy untreated mice at day 3 and/or day 9 p.i. Although more limited, a significant increase of $CD4^+$ T (day 9) and of NK cells (day 3) was also observed p.i. of the empty MVA. The number of CD69-expressing $CD4^+$ T, $CD8^+$ T, and B cells was significantly increased at day 1 for both MVAs, suggesting that the MVA backbone alone can trigger potent lymphocyte activation. The number of activated cells decreased thereafter and returned to normal at day 9 except for $CD4^+$ T cells that remained significantly elevated for the MVA–hIL-7–Fc compared with untreated mice or mice receiving the backbone MVA. In contrast and for both MVAs, an increase of CD69-expressing NK cells was transiently detected at day 3 p.i., and it was more significant for the MVA–hIL-7–Fc compared with the MVA backbone.

In lung, the total number of $CD4^+$ T, $CD8^+$ T, and NK cells was significantly increased at day 3 p.i. of the MVA–hIL-7–Fc, whereas the empty MVA resulted in a significant increase of $CD8^+$ T cells at day 3 p.i. and most significantly of NK cells. Globally, both MVAs resulted in a significant increase of all analyzed cell types typically seen at day 3 p.i. (except for the trend increase of activated B cells only observed p.i. of the MVA-hIL-7–Fc). Activated $CD4^+$ T and $CD8^+$ T cells could still be observed at day 9 p.i. mostly for the MVA–hIL-7–Fc. The number of activated NK cells observed with the empty MVA was the most noticeable.

Overall, these data indicate that the MVA vector contributes to the increase of cell number and cell activation observed p.i. of the MVA–hIL-7–Fc, most significantly of NK cells and in both spleen and lung of treated mice.

The MVA backbone contributes only marginally to the significant increase of myeloid cells in both spleen and lung. We investigated the effect of the two MVAs on myeloid cells in spleen and lung of injected mice at different time points p.i. (day 1 and/or day 3 and day 9, Fig. 2B). Three cell populations were defined based on expression of the Ly6C marker: $Ly6C^{high}$, $Ly6C^{int}$, and $Ly6C^{neg}$ cells assimilated to proinflammatory and phagocytosis myeloid cells, proinflammatory myeloid cells, and patrolling myeloid cells, respectively (47). In spleen, both MVAs caused a decrease in numbers of the three cell types at day 1 as seen for T and NK cells, suggesting again migration of the cells out of the organ. This decrease was followed by a significant increase of all cell types for the MVA–hIL-7–Fc at day 3 ($Ly6C^{high}$) or day 9 ($Ly6C^{neg}$) or days 3 and 9 ($Ly6C^{int}$). In the lung, a significant increase was also seen p.i. of the MVA–hIL-7–Fc at day 3 ($Ly6C^{high}$ and $Ly6C^{int}$) or day 9 ($Ly6C^{neg}$). The empty MVA triggered a more limited yet significant increase of the $Ly6C^{high}$ or $Ly6C^{int}$ cell populations and only in spleen.

The frequency of polyfunctional T cells in both spleen and lung was improved by the MVA backbone and amplified by the hIL-7–Fc arming. The MVA–hIL-7–Fc aims to improve immunosuppressed sepsis patients' immunity to accelerate resolution of the initial infection and/or limit occurrence of secondary ones. Restoring the capacity of patients' T cells to produce inflammatory cytokines such as IFN-γ, TNF-α, and/or IL-2 is of importance, as these are known to play a role in control of infection, particularly the triple cytokine–producing cells. We examined the function of T cells by ICS assay for the three cytokines using flow cytometry following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 Abs (Fig. 2C). When compared with noninjected healthy mice, both MVAs triggered a significant increase of the percentage of cytokine-producing $CD4^+$ T and/or $CD8^+$ T cells in both spleen and lung. For both MVAs an optimal significant cumulative increase of cytokine-producing $CD4^+$ T cells was seen at day 9 p.i. in both organs whereas for $CD8^+$ T cells it was rather detected at day 3 p.i. A difference in the cumulative CD4 and/or CD8 T cell increase was detected between the two organs. Although the spectrum of cytokines detected was globally identical for the two MVAs, the relative abundance of the different cytokine-producing cell population differed.

For splenic $CD4^+$ T cells, a typical increase of the percentage of IL-2–, IL-2–TNF-α-, and TNF-α–IFN-γ–IL-2-producing cells was seen p.i. of the MVA–hIL-7–Fc compared with healthy mice or empty MVA-treated mice. At day 3 p.i. of the MVA–hIL-7–Fc, the increase of the cumulative percentages of all multicytokine producing cells was 2.8-fold and 2.3-fold compared with healthy or empty MVA-treated mice, respectively. For splenic $CD8^+$ T cells, the percentage of TNF-α–, IFN-γ–, IFN-γ–IL-2-, TNF-α–IL-2-, and triple TNF-α–IFN-γ–IL-2-producing cells was typically increased p.i. of the MVA–hIL-7–Fc. At day 3 p.i. the increase of the cumulative percentages of all cytokine-producing cells was 27.1-fold and 3.4-fold in comparison with healthy or empty MVA-treated mice, respectively.

For $CD4^+$ T cells from lung, a typical increase of IFN-γ-, IFN-γ–IL-2-, and triple TNF-α–IFN-γ–IL-2-producing cells was observed p.i. of the MVA–hIL-7–Fc compared with healthy mice or empty MVA-treated mice. At day 9 p.i., the increase of the cumulative percentages of all cytokine-producing cells was 2.6-fold in comparison with healthy mice (no increase was observed with the empty MVA). For $CD8^+$ T cells, an increase of IFN-γ–, IFN-γ–TNF-α-, and TNF-α–IFN-γ–IL-2-producing cells was observed. At day 9 p.i. the increase of the cumulative percentages of all cytokine-producing cells was 2.9-fold in comparison with healthy mice (no increase observed with the empty MVA).

Overall, these data demonstrate the capacity of both MVAs to induce polyfunctional T cells in both spleen and lung. The fold increases of polyfunctional response observed were globally superior

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

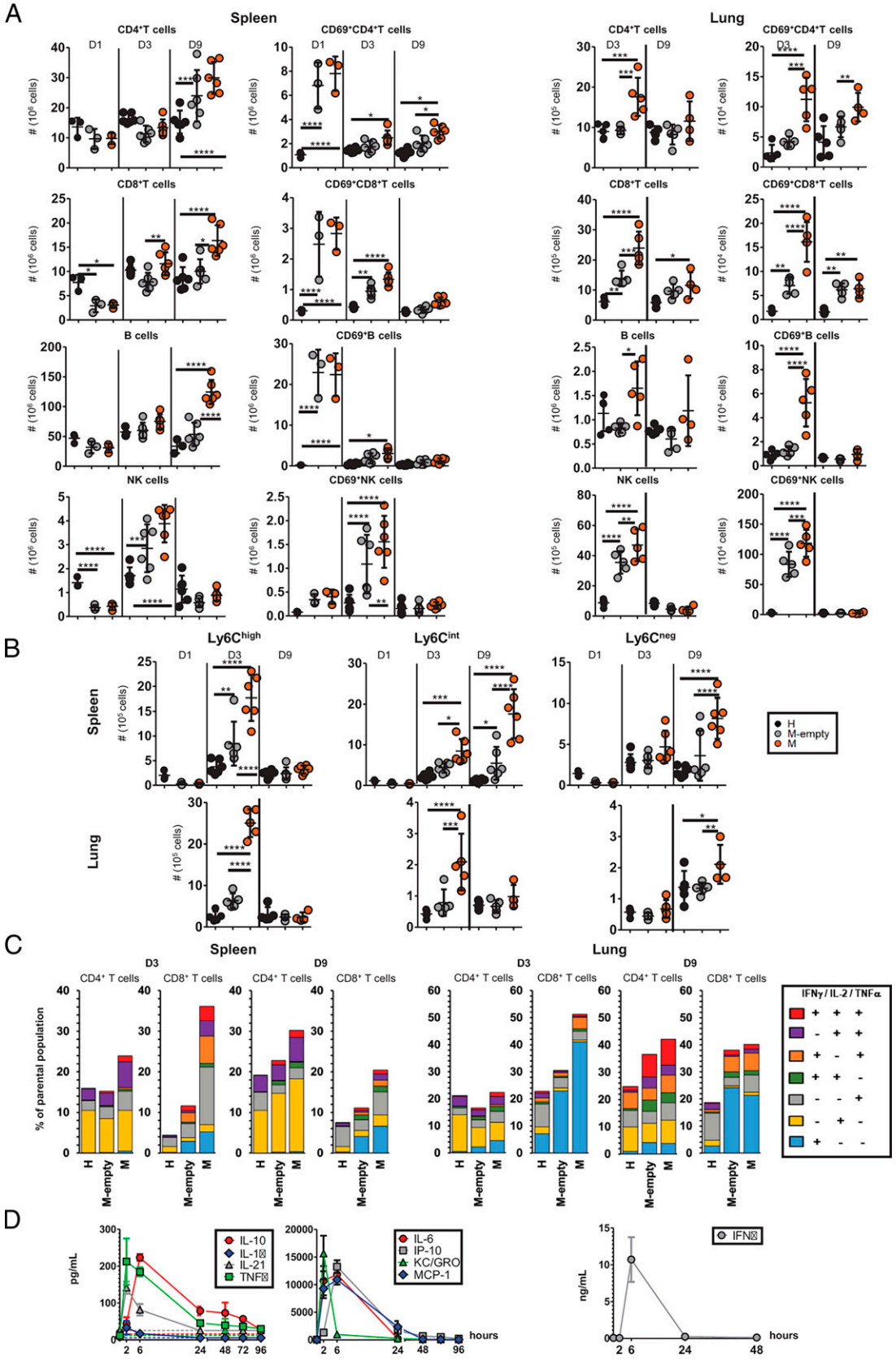


FIGURE 2. The MVA backbone contributes to specific immune activities observed with the MVA–hIL-7–Fc in spleen and lung of naive mice. C57BL/6J mice were injected with 10^8 PFU of MVA–hIL-7–Fc (M, $n = 10–18$) or MVATGN33.1 (M-empty, $n = 10–18$) or left untreated (H, $n = 10–15$). Spleens were harvested at days 1, 3, and 9 p.i. and lungs at days 3 and 9 p.i. (**A**) Each symbol represents the mean value ± SD of the absolute number of total and activated $CD4^+$ T, $CD8^+$ T, B, and NK cells in spleen and lung (three mice per group at day 1; five control mice (H) and six mice per group of interest (M-empty and M) at days 3 and 9). Results represent one experiment. (**B**) Each symbol represents the mean value ± SD of the absolute number (10^5) of total monocyte populations. Results represent two independent experiments (one experiment per organ). For spleens, at day 1, three mice per group were used, and at days 3 and 9, five mice for the control (H) group and six mice per group of interest (M-empty and M) were used. For lungs, six and five mice for treated and untreated groups, *(Figure legend continues)*

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

with the MVA–hIL-7–Fc except for increases observed in the lung, which were similar for the two vectors.

The MVA backbone induces an early and transient production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and chemokines. Studies have previously shown that MVA preferentially targets APCs (48), secreting several signaling molecules after in vitro infection or in vivo administration (34). To clarify the capacity of the MVA backbone to contribute to early adjuvant signaling when injected by the i.v. route, we assessed the production of a panel of cytokines and chemokines (IL-10, IL-1β, TNF-α, IL-21, IL-6, IP-10, KC/GRO, MCP-1, IFN-γ) at different times p.i. of the empty MVA in the sera of mice (Fig. 2D). All solutes were readily detected as early as 2 h p.i. except IFN-γ, which became detectable at 6 h p.i. The peak production was observed at 2 or 6 h p.i., and molecules became thereafter undetectable from 24 to 72 h p.i. except for IP-10, KC/GRO, MCP-1, IL-10, and TNF-α, which remained detectable until 96 h p.i.

MVA–hIL-7–Fc confers a survival advantage in two sepsis models

The capacity of the MVA–hIL-7–Fc to improve survival of mice in the context of sepsis-induced immunosuppression was evaluated. The first model used was that of CLP, which is well described and mimics traumatic injury leading to peritonitis in humans (49). As illustrated in Supplemental Fig. 3, under our experimental conditions a mortality up to 30% is typically observed at day 7 in CLP mice when compared with sham animals (Supplemental Fig. 3A). A time-course analysis of the impact of surgery on immune cell number from day 1 up to day 13 postsurgery revealed the establishment of a state of immunosuppression characterized by a significant decreased number of $CD3^+$ T, NK, and dendritic cells globally observed from day 2 to day 4 in CLP compared with sham mice (Supplemental Fig. 3B). The number of B cells stayed stable or displayed fluctuating increases. This state was also associated with an impairment of T cell proliferation (data not shown). Immune defects were no longer observed at day 7 (or only marginally) or at day 13. The MVA–hIL-7–Fc was injected at day 4 postsurgery, that is, when immunosuppression was established (over two to three time points).

Briefly, a starting pool of healthy mice underwent CLP at day 0, and at day 4 surviving mice were allocated in different groups, based on the equivalent mean of weight loss, to receive treatment or not. In a first study, mice were split to receive the MVA–hIL-7–Fc or were left untreated (Fig. 3A, survival 1). In a second study, animals received the MVA–hIL-7–Fc or the empty MVA (Fig. 3A, survival 2). In both studies, a control group of healthy (non-operated) mice was included and survival was followed until day 7 after CLP. Mice left untreated or that received the empty MVA continued to die with a mortality rate of 30 and 33%, respectively, observed at day 7. In contrast, no mortality was observed in the groups treated with the MVA–hIL-7–Fc, similar to healthy mice.

In a second model, sepsis was induced by i.v. injection of *C. albicans* (50). In a first study, at 3 d p.i., mice received the MVA–hIL-7–Fc or were left untreated (Fig. 3B, survival 1). In a second study, they received the empty MVA or were left untreated (Fig. 3B, survival 2). Survival was monitored until day 10 p.i. In both studies, a high mortality rate was observed in the untreated animals, as only 30 and 40% of mice survived in the survival 1 and 2 study, respectively. In contrast, up to 60% of the MVA–hIL-7–Fc-treated mice survived (a significant difference with untreated mice, survival 1). Mice receiving the empty MVA had only a low survival rate not significantly different from that seen in untreated mice (20 and 40%, respectively, survival 2).

Heterogeneity of the sepsis models used implied including an important number of mice at day 0 to obtain sufficient surviving animals at day 4, hence rendering difficult inclusion of all controls in a single protocol. Importantly, the data generated in two distinct sepsis models are concordant. They support the capacity of the MVA–hIL-7–Fc to confer a survival advantage in immunosuppressed sepsis contexts.

Injection of the rhIL-7–Fc by the i.v. route results in more favorable hIL-7–Fc pharmacokinetics and promotes higher numbers of activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and their proliferation in spleen and/or in lung compared with the s.c. route

Before performing comparative studies between the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc protein counterpart, we performed a preliminary in vivo study to evaluate activities of the rhIL-7–Fc when injected by the i.v. route, an approach that has not been reported to our knowledge in the preclinical literature for a rhIL-7. Comparison was performed with the s.c. route, which has been used in sepsis clinical trials using the rhIL-7 CYT-107 cytokine (NCT02797431, NCT02640807) (Supplemental Fig. 4). The pharmacokinetics of circulating hIL-7–Fc, the number of total and activated T cells (both $CD4^+$ and $CD8^+$), and the induction of T cell proliferation measured via expression of Ki67 in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were analyzed in spleen of naive mice following a single injection of the soluble rhIL-7–Fc in comparison with healthy, untreated mice. The i.v. route resulted in higher level and longer detectability of the circulating cytokine. It also led to a stronger increase of the number of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and that of activated cells ($CD69^+$) than for the s.c. route when compared with naive animals (Supplemental Fig. 4A, 4B). A significant increase of Ki67-specific mean fluorescence intensity (MFI) in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells was observed with the i.v. but not with the s.c. route (Supplemental Fig. 4C). Overall, these data led to the selection of the i.v. route for comparative studies using the rhIL-7–Fc.

The MVA–hIL-7–Fc systemically induces a more favorable pharmacokinetic as well as broader and longer lasting spectrum of immune activities compared with the soluble rhIL-7–Fc in spleen and lung of naive mice

Comparative analysis was performed between mice treated with the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc, both used at clinical dose equivalents, that is, 10^7 PFU for the MVA product and 5 μg for the rhIL-7–Fc (19) (Fig. 4).

The MVA–hIL-7–Fc results in more favorable hIL-7–Fc pharmacokinetics than observed with the rhIL-7–Fc. Both products were injected in healthy mice, and pharmacokinetics of circulating hIL-7–Fc were analyzed (Fig. 4A). Whereas injection of the rhIL-7–Fc resulted in slightly earlier (2 versus 6 h p.i.) and higher (12.05 versus 0.35 ng/ml and 5.85 versus 3.33ng/ml at 2 and 6 h p.i., respectively) levels of detected hIL-7–Fc compared with the MVA–hIL-7–Fc, the decrease of circulating hIL-7–Fc was sharper p.i. of the recombinant cytokine. The circulating cytokine remained detectable up to 120 h p.i. for both products. However, the biological effective hIL-

respectively, were used. (**C**) Production of IFN-γ, TNF-α, and IL-2 by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells after TCR stimulation measured by an ICS assay (six and five mice for treated and untreated groups, respectively). Each bar represents the cumulative percentage of the detected subpopulations of cytokine-producing cells. Results represent one experiment. (**D**) Serum measurement of cytokines/chemokines p.i. of 10^8 PFU of the MVATGN33.1 (M-empty). Murine IL-6, IL-1β, IL-10, IL-21, TNF-α, IP-10, KC/GRO, and MCP-1 were measured by an electrochemiluminescence assay or an IFN-γ-specific ELISA assay. Each symbol represents the mean value of cytokine concentration (pg/ml or ng/ml for IFN-γ) ± SD of three mice per group. Results represent one experiment. The dotted lines show the limit of detection of each protein. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, for differences between two groups. D, day.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

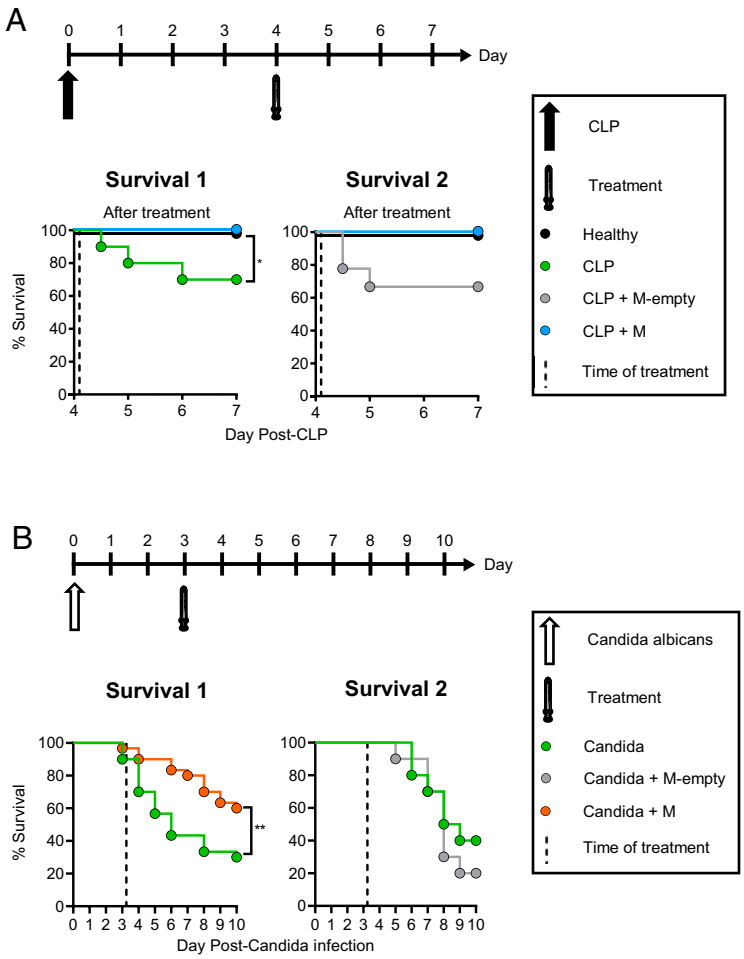


FIGURE 3. MVA–hIL-7–Fc improves survival in sepsis mouse models. (**A**) Survival in the CLP model. CLP was performed in C57BL/6J mice at day 0, and at day 4 different schemes of interventions were performed in two independent studies. In survival 1, a pool of 35 mice underwent CLP surgery at day 0, and surviving mice were split at day 4 to receive either 10^8 PFU of the MVA–hIL-7–Fc (CLP + M, $n = 15$) or left untreated (CLP, $n = 10$). A control of untreated healthy mice (H, $n = 10$) was included. Results represent two cumulated experiments. In survival 2, a pool of 25 mice underwent CLP surgery at day 0, and surviving mice were split at day 4 to receive either 10^8 PFU of MVA–hIL-7–Fc (CLP + M, $n = 9$) or MVA-empty (CLP + M-empty, $n = 9$). A control group of untreated healthy mice was added (H, $n = 5$). Results represent one experiment. Survival was recorded up to day 7. (**B**) Survival in the *Candida albicans* model. C57BL/6J mice were infected by *C. albicans* at day 0, and at day 3 different schemes of intervention were performed. In survival 1, septic mice were injected with 10^7 PFU of the MVA–hIL-7–Fc (*Candida* + M, $n = 30$) or received PBS (*Candida*, $n = 30$). Results represent three cumulated experiments. In survival 2, mice were injected with 10^7 PFU of the MVA-empty (*Candida* + M-empty, $n = 10$) or received PBS (*Candida*, $n = 10$). Results represent one experiment. Survival was recorded for 10 d. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, for difference between two groups.

7–Fc concentration (between ED_{10} and ED_{90} values) was systematically higher for the MVA–hIL-7–Fc between 6 and 72 h p.i.

The MVA–hIL-7–Fc results in the production of a hIL-7–Fc capable of engaging its receptor in a more significant way than observed with the rhIL-7–Fc. At day 3 p.i., when compared with untreated mice, administration of the MVA–hIL-7–Fc led to a strong decrease of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell numbers expressing CD127 in spleen and lung. Cell numbers returned to preinjection values or were superior to those at day 9 p.i. (Fig. 4B). The day 9 p.i. observation is consistent with the fact that at that later time the MVA-expressed hIL-7–Fc was not detected anymore (Fig. 4A), hence allowing for return of CD127 expression to homeostasis. In contrast, injection of the rhIL-7–Fc did not decrease the number of $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells expressing CD127 or rather it induced an increase of those cells in both organs at either day 3 or 9 p.i. Analysis of the CD127 MFI globally corroborated that of cell numbers.

The MVA–hIL-7–Fc globally promotes a higher number of total T cells in spleen and of activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in spleen and lung of naive mice compared with the rhIL-7–Fc. The number of total T cells and of activated ones ($CD69^+$) was measured p.i. of the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc in spleen and lung (Fig. 4C). In spleen, a sharp increase of $CD4^+$ T cell number was observed at day 9 p.i. principally following injection of the MVA–hIL-7–Fc. For $CD8^+$ T cells, a significant increase was observed following injection of both products at day 3. The increase persisted up to day 9 p.i. for the MVA–hIL-7–Fc, whereas the cell number returned to near normal at day 9 p.i. for the rhIL-7–Fc. Finally, an increase of the number of CD69-expressing $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells was significantly detected at day 3 and in the two organs p.i. of the MVA–hIL-7–Fc. Levels remained thereafter globally constant or slightly decreased at day 9 p.i. In contrast, injection of the rhIL-7–Fc resulted in no or a very limited increase of activated cells except at day 9 p.i. in spleen where a significant increase of activated $CD8^+$ T cells was observed when compared with the untreated group. This increase was nonetheless significantly lower to that seen with the MVA–hIL-7–Fc.

TCM cell, TEM cell, and AE T cell phenotypes are more strongly induced by the MVA–hIL-7–Fc in both spleen and lung and for a longer duration than by rhIL-7–Fc. Exogenous treatment with the IL-7 cytokine has been shown to trigger naive $CD4^+$ T cells to acquire a TCM phenotype and naive $CD8^+$ T cells both a TCM and TEM phenotype (51). We analyzed the capacity of the MVA-encoded hIL-7–Fc and that of the rhIL-7–Fc to trigger T cell differentiation through CD44 and CD62L staining in both spleen and lung of treated mice (Fig. 4D).

In spleen, for $CD4^+$ T cells, both treatments similarly increased the percentage of TEM cells at day 3 p.i. (21 versus 18% in MVA–hIL-7–Fc- versus rhIL-7–Fc-treated mice, respectively) when compared with untreated mice (13%). At day 9 p.i., the increase further raised for the MVA–hIL-7–Fc (up to 30%). The observed increase was to the detriment of the naive population only in the MVA–hIL-7–Fc-treated group. For the two products, other $CD4^+$ T populations (TCM and AE) did not change or only marginally changed. For $CD8^+$ T cells, the percentage of all cell subpopulations (TEM, TCM, AE) was increased at day 3 p.i. and remained stable (except for AE) at day 9 p.i. of the MVA–hIL-7–Fc (15 and 14% versus 2 and 3% in untreated mice for TEM cells at days 3 and 9 p.i. respectively; 18 and 14% versus 10 and 9% in untreated mice for TCM cells at days 3 and 9 p.i.,

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

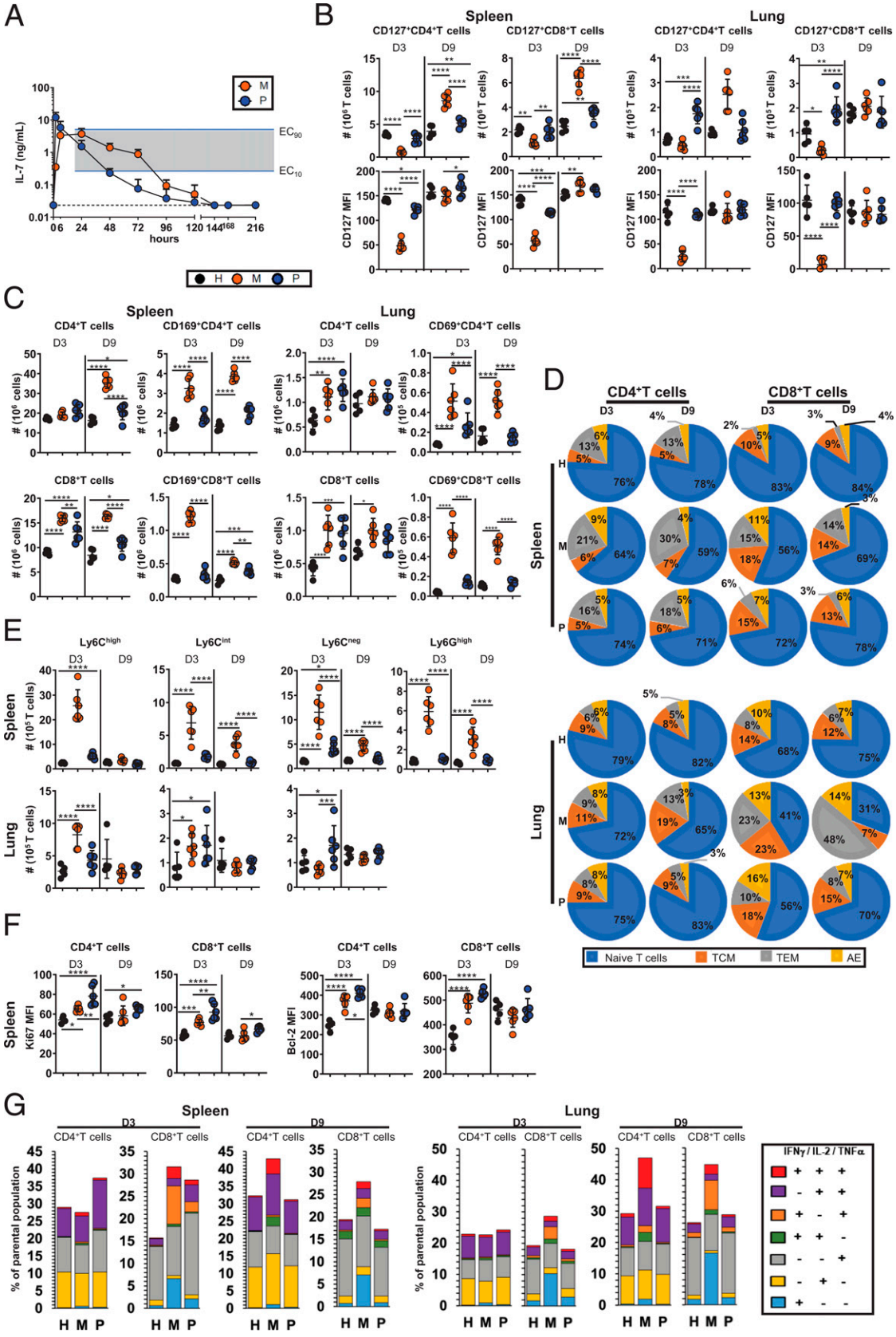


FIGURE 4. Comparative pharmacokinetic and immune activities between the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc in naive mice. C57BL/6J mice were injected with 10^7 PFU of MVA–hIL-7–Fc (M, $n = 48$) or with 5 μg of rhIL-7–Fc protein (P, $n = 48$) or left untreated (healthy mice [H], $n = 20$), and sera, spleens, and lungs were harvested at different time points. (**A**) Serum ELISA quantification of hIL-7–Fc. Area in gray indicates the ED_{10}–ED_{90} range of the rhIL-7–Fc biological activity. Each symbol represents the mean value of hIL-7–Fc (ng/ml) ± SD of six mice measured at each indicated time point except for 72 and 216 h that included 12 mice. The dotted line represents the limit of quantification of hIL-7. Results represent a pool of two experiments (58 animals per experiment). (**B**) Each symbol represents the mean value ± SD of the absolute number (10^6) and the mean fluorescence intensity (MFI) of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells expressing the IL-7 receptor (CD127). (**C**) Each symbol represents the mean value ± SD of the absolute number (10^6) of total and activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. (**D**) Each symbol represents the mean *(Figure legend continues)*

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

respectively; and 11 and 3% versus 5 and 4% in untreated mice for AE cells at days 3 and 9 p.i., respectively). The cell increase observed was to the detriment of the naive population. In contrast, the rhIL-7–Fc only marginally increased these cells at day 3. It increased TCM $CD8^+$ T cells to a similar level than seen with the MVA–hIL-7–Fc (15 and 13% at days 3 and 9 p.i., respectively), but it did not improve, or only marginally improved, the percentage of TEM and AE cells.

In lung, for $CD4^+$ T cells, no change in the different cell populations was observed or was only marginally observed p.i. of either product at day 3. Interestingly, the percentage of TCM and TEM populations increased at day 9 p.i. after the MVA–hIL-7–Fc treatment (19 and 13%, respectively, versus 8 and 5% in naive mice), to the detriment of the naive population. The rhIL-7–Fc had no impact on these populations. For $CD8^+$ T cells, both products resulted in a cell increase at day 3. The increase was more robust for the MVA–hIL-7–Fc and to the detriment of the naive population. Percentages overall returned to normal values for the rhIL-7–Fc whereas for two populations (AE and TEM) they remained strongly increased (or continued to increase) for the MVA–hIL-7–Fc. Specifically, an increase of 23% versus 8 and 14% was observed for TEM and TCM populations in comparison with untreated mice at day 3 p.i., whereas the increase of TEM cells reached 48% at day 9 p.i. in comparison with 6% observed for naive mice.

Overall, whether in spleen or lung, a greater decrease was seen for naive T cells and a greater increase of other subpopulations was observed with the MVA–hIL-7–Fc compared with the rhIL-7–Fc. The most striking differences were observed in lung and for the TEM cell population.

The MVA–hIL-7–Fc results in a significant increase of splenic and lung myeloid cells whereas the rhIL-7–Fc had a marginal effect. Myeloid cell populations defined by the expression of the Ly6C marker ($Ly6C^{high}$, $Ly6C^{int}$, and $Ly6C^{neg}$) and expected principally to be monocytes/macrophages were analyzed in spleen and lung, whereas neutrophils (Ly6G) were only measured in spleen (Fig. 4E). In spleen, the MVA–hIL-7–Fc induced a significant increase of all cell subpopulations compared with untreated mice, with a peak increase observed at day 3 p.i. Levels lowered thereafter (day 9 p.i.) or returned to baseline ($Ly6C^{high}$ cells). No cell increase or only a minor (albeit significant) cell increase of the $Ly6C^{neg}$ population was observed p.i. of the rhIL-7–Fc. In lung, both products triggered a small albeit significant increase of $Ly6C^{int}$ cells seen at day 3 p.i. In addition, the MVA–hIL-7–Fc significantly increased $Ly6C^{high}$ cells while the rhIL-7–Fc triggered an increase of $Ly6C^{neg}$ cells at day 3 p.i.

Both the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc promote the proliferation and antiapoptotic activity of splenic T cells. T cell proliferation and the level of antiapoptotic protein expression were analyzed p.i. of the two products through evaluation of Ki67- and Bcl-2–specific MFI in both splenic $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (not performed on lung) (Fig. 4F). Activities were mostly observed at day 3 and returned to normal or near normal at day 9 p.i. Although both products induced a significant Ki67-specific MFI increase compared with untreated mice, the increase was slightly more robust with the rhIL-7–Fc (e.g., 78 and 65 for the rhIL-7–Fc and the MVA–hIL-7–Fc, respectively, versus 54 for untreated mice on $CD4^+$ T cells at day 3 p.i.). Both products triggered a significant increase of the Bcl-2–specific MFI at day 3 p.i. compared with untreated mice. Increases observed were globally similar between the two products (e.g., 410 and 370 for the rhIL7-Fc and the MVA–hIL-7–Fc, respectively, versus 247 for untreated mice $CD4^+$ T cells).

The rhIL-7–Fc improves the frequency of polyfunctional T cells principally in spleen early postinjection whereas the MVA–hIL-7–Fc triggers significant percentages of polyfunctional T cells in both spleen and lung at later times p.i. The function of T cells was analyzed p.i. of the two products by ICS assays for IFN-γ, IL-2, and TNF-α using flow cytometry (Fig. 4G).

For $CD4^+$ T cells, the rhIL-7–Fc increased the percentage of cells producing cytokines at day 3 p.i. only in the spleen of treated mice (37% versus 29 and 27.5% compared with untreated and MVA–hIL-7–Fc-treated mice, respectively). The rhIL-7–Fc triggered detectable yet minor changes in lung. For the MVA–hIL-7–Fc, a significant increase of cytokine-expressing $CD4^+$ T cell percentages was observed at day 9 p.i. in both spleen and lung. In spleen, the increase was 42.9% versus 32 and 31% compared with untreated and rhIL-7–Fc-treated mice respectively. In lung, it was 47% versus 29 and 31.5% compared with untreated and rhIL-7–Fc-treated animals, respectively. Whether in spleen or lung, the observed increases were mainly related to improved percentages of single IL-2–, single TNF-α–, as well as double IL-2–TNF-α-producing cells. Detection of triple-producing $CD4^+$ T cells was most significantly observed following injection of the MVA–hIL-7–Fc in both organs. As seen in naive mice, increase of functional $CD4^+$ T cells in spleen were typically observed at an earlier time p.i. than those observed in lung.

For $CD8^+$ T cells, an increased percentage of cytokine-producing cells was also principally observed at day 3 p.i. in spleen for the rhIL-7–Fc (28.7% versus 15.7% when compared with untreated mice, respectively). For the MVA–hIL-7–Fc, the increase was observed at both day 3 and day 9 p.i. in spleen (31.6% at day 3 p.i., and 27.9% versus 19.4 and 17.2% at day 9 p.i. compared with untreated mice and rhIL-7–Fc-treated mice, respectively) but also in lung (28.6% versus 19.2 and 18% at day 3 p.i., and 44.7% versus 26.2 and 28.7% at day 9 p.i. compared with untreated mice and rhIL-7–Fc-treated mice, respectively). In spleen, the principal cytokine-producing $CD8^+$ T cells induced by the MVA–hIL-7–Fc were triple-producing cells, double TNF-α–IFN-γ-producing and single IFN-γ–producing ones, whereas the rhIL-7–Fc triggered essentially single TNF-α cells. Globally, most of the IFN-γ–producing cells (single, double, and triple) detected in both organs were triggered by the MVA–hIL-7–Fc and notably by $CD8^+$ cells at both time points analyzed. However, significant triple-producing $CD4^+$ cells could also be detected at day 9. In contrast, the rhIL-7 protein was more prone to induce TNF-α–producing cells. Overall data confirmed the potent and superior functionality of cells induced by the MVA–hIL-7–Fc in both spleen and lung compared with the cells triggered by the rhIL-7–Fc.

An overview of all significant differences observed for the two products in healthy mice is summarized in Fig. 5. As shown in the figure and except for a couple of readouts, one injection of the MVA–hIL-7–Fc typically results in more robust immune activities

proportion (%) value ± SD of naive, T central memory (TCM), T effector memory (TEM), and acute effector (AE) cells in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. (**E**) Each symbol represents the mean value ± SD of absolute number (10^6) of total monocyte populations and neutrophils (spleen only). (**F**) Each symbol represents the mean MFI value ± SD of nuclear Ki67 and intracellular Bcl-2 in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. (**G**) Production of IFN-γ, TNF-α, and IL-2 by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells after TCR stimulation measured by an ICS assay (six mice per treated group and five mice for the untreated group). Each bar represents the cumulative percentage of the different subpopulations of cytokine-producing cells. For (B)–(G), results represent two independent experiments (one experiment per organ) including five control mice (H) and six mice per group of interest (M and P) at days 3 and 9 p.i. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, for difference between two groups. D, day.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

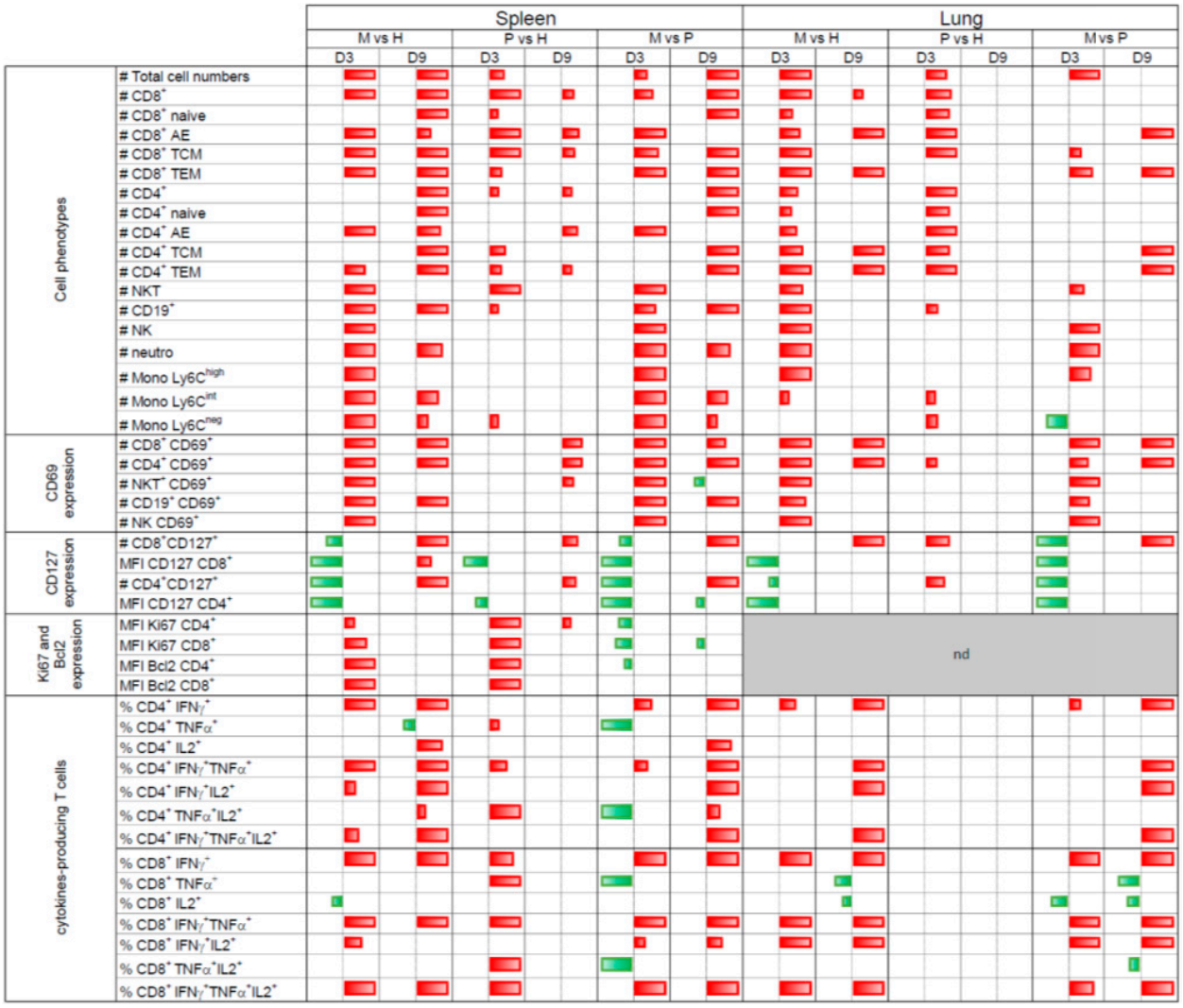


FIGURE 5. MVA–hIL-7–Fc globally improves more significantly immune activities than does the rhIL-7–Fc in spleen and lung of healthy mice. For the different immune readouts performed, the table shows the differences found significant between treated (MVA–hIL-7–Fc [M] and rhIL7-Fc [P]) versus naive healthy (H) mice as well as between the two treatment groups, in both spleen and lung and at days 3 and 9 p.i. Pairwise comparisons are shown. In red, *p* values are higher in the first group compared with the second group. In green, *p* values are lower in the first group compared with the second group. The longer the bar is, the more significant is the difference between the two groups. D, day; nd, not done.

and/or longer lasting ones than observed with one injection of the rhIL-7–Fc. The rhIL-7–Fc triggered a superior induction of Ki67 expression in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. In addition, it promoted $CD8^+$ T cells producing single TNF-α, single IL-2, or double TNF-α–IL-2 compared with the MVA counterpart.

The MVA–hIL-7–Fc treatment results in a higher level of circulating hIL-7–Fc and induces a broader and more significant spectrum of immune activities compared with the rhIL-7–Fc counterpart in spleen in CLP mice

In contrast to naive mice, only one time point was analyzed in the CLP model at day 3 p.i. of the products (Fig. 6).

The MVA–hIL-7–Fc results in higher levels of circulating hIL-7–Fc than does the rhIL-7–Fc. Products were injected once 4 d after CLP surgery, and the level of circulating hIL-7–Fc was analyzed 72 h later (Fig. 5A). Injection of the MVA–hIL-7–Fc resulted in 13.7-fold higher circulating hIL-7–Fc than observed with rhIL-7–Fc (1.51 versus 0.11 ng/ml, respectively).

The MVA–hIL-7–Fc increases the cell number ($CD8^+$ T and NK cells) in spleen as well as the number of activated cells ($CD4^+$ T, $CD8^+$ T, NK, and B cells) in both spleen and lung (excepted for B cells) of treated mice whereas the counterpart rhIL-7–Fc has no effect. The number of $CD4^+$ T, $CD8^+$ T, NK, and B cells as well as that of activated ($CD69^+$) counterparts was assessed in spleen and lung p.i. of the two products (Fig. 6B).

In spleen and as discussed earlier (Supplemental Fig. 3), at day 7 after CLP (i.e., day 3 p.i. of the products), some decrease of immune cell numbers could be observed in CLP mice compared with healthy animals. The most robust decrease was observed for $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (46.8 and 41.3%, respectively), whereas only a moderate decrease of NK cells (17.6%) and B cells (10.4%) was seen. These decreases did not reach significance except for $CD4^+$ cells ($p < 0.05$), in agreement with the fact that in our model, at day 7 after CLP, mice are typically no longer in a state of immunosuppression. Compared with untreated CLP mice, cell numbers increased p.i. of the MVA–hIL-7–Fc but not of the rhIL-7–Fc. The increase was significant for $CD8^+$ T and NK cells (46 and 50%, respectively). It was moderate (trends) for $CD4^+$ T and B

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

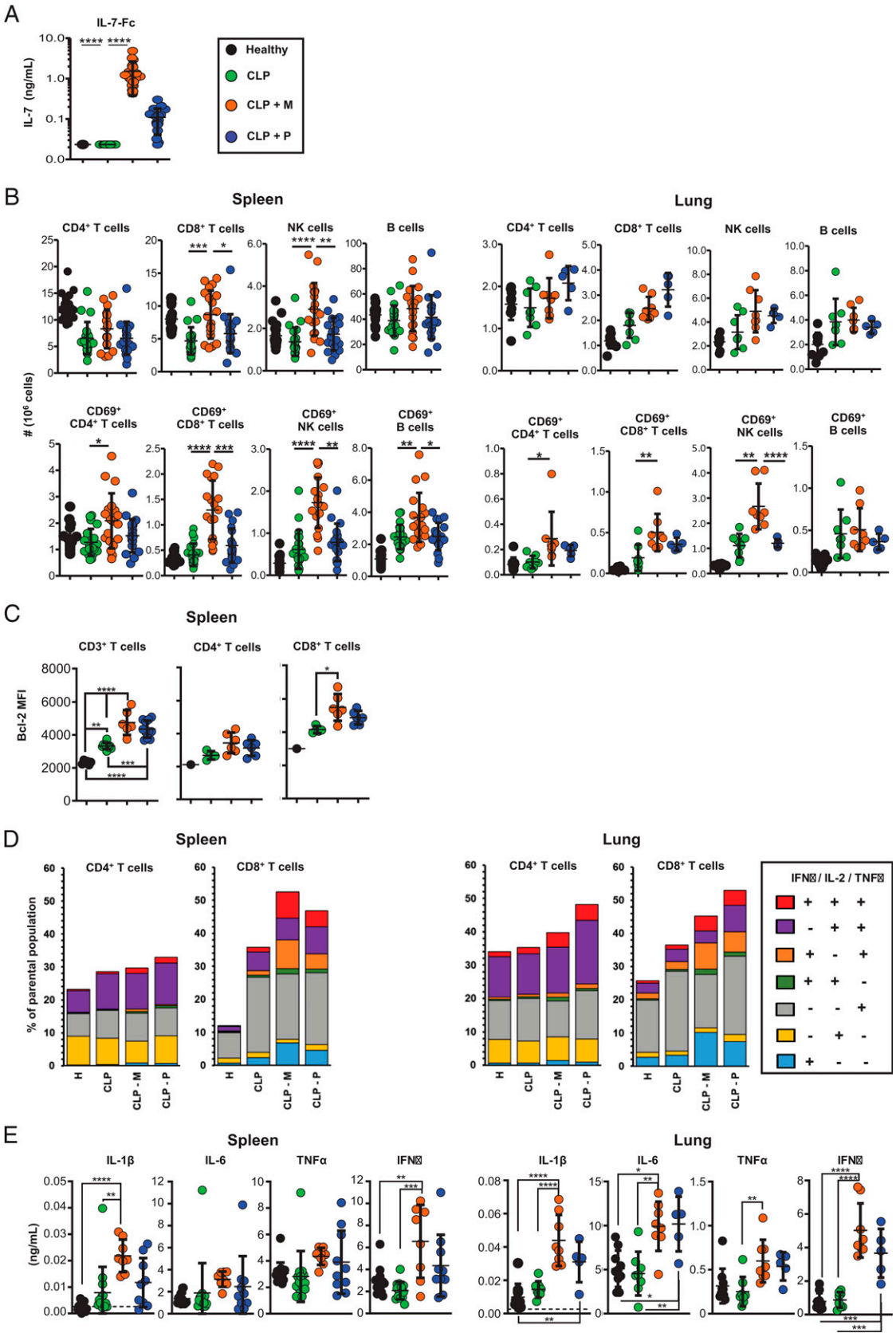


FIGURE 6. Comparative hIL-7–Fc serum detection and immune activities between the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc in CLP mice. A pool of mice underwent CLP surgery at day 0, and surviving mice were split into different treatment groups at day 4, receiving 10^7 PFU of the MVA–hIL-7–Fc (CLP + M), or 5 μg of the rhIL-7–Fc (CLP + P), or left untreated (CLP). Untreated healthy mice (H) were used as control. Posttreatment analyses were conducted at 3 d. (**A**) Serum ELISA quantification of hIL-7–Fc. Results represent five experiments corresponding to 16–21 mice/group. (**B**) Absolute number (10^6) of total and activated ($CD69^+$) lymphocytes in spleen and lung. Results represent five (spleen) and two (lung) experiments, corresponding to $n = 19–21$ and 5–10 mice/group, respectively. (**C**) MFI of intracellular Bcl-2 in $CD3^+$, $CD4^+$, and $CD8^+$ T cells. Results represent two experiments for $CD3^+$ T cells corresponding *(Figure legend continues)*

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

cells (31.4 and 31.1%, respectively). Compared with CLP untreated mice, the MVA–hIL-7–Fc resulted in a systematic significant increase of all four activated ($CD69^+$) cell populations whereas the rhIL-7–Fc had no effect on cell activation status.

In lung, total cell numbers were similar between CLP and healthy mice. Although cell increases were observed p.i. of both products compared with untreated CLP mice, these were not significant. In contrast, the MVA–hIL-7–Fc triggered a significant increase of activated $CD4^+$ T, $CD8^+$ T, and NK cells (but not B cells) compared with untreated CLP animals, whereas the rhIL-7–Fc had no effect on cell activation.

Both the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc promotes the antiapoptotic activity of splenic T cells. The level of antiapoptotic protein expression was also analyzed p.i. of the two products through evaluation of the Bcl-2–specific MFI in splenic $CD3^+$, $CD4^+$, and $CD8^+$ T cells (not performed on lung, Fig. 6C). The MVA–hIL-7–Fc triggered a significant increase of the Bcl-2–specific MFI in $CD3^+$ and $CD8^+$ T cells whereas the rhIL-7–Fc triggered significant increase of the Bcl-2–specific MFI only when measured in $CD3^+$ T cells when compared with untreated CLP mice or healthy mice. Increases observed were globally similar between the two products (e.g., 4750 and 4353 versus 2985 for the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc, respectively, compared with untreated CLP mice).

Both the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc increase the relative frequency of polyfunctional $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in spleen and lung, with the MVA–hIL-7–Fc increasing more significantly INF-γ-producing cells whereas the rhIL-7–Fc increased more strongly TNF-α–producing cells. The function of T cells was analyzed by ICS assays for IFN-γ, IL-2, and TNF-α using flow cytometry (Fig. 6D). Polyfunctional $CD4^+$ T cells were increased following injection of both products in the two organs tested, although to different levels. The cumulative percentage of cell increase observed was higher p.i. of the rhIL-7–Fc: in spleen, increases of 32.9% versus 28.6 and 29.7% in comparison with untreated and MVA–hIL-7–Fc-treated mice, respectively, were seen; in lung, increases of 48.2% versus 35.2 and 39.8% in comparison with untreated and MVA–hIL-7–Fc-treated mice, respectively, were observed. In both spleen and lung and for both products an equivalent increase of triple TNF-α–IFN-γ–IL-2-producing cells was observed whereas the rhIL-7–Fc triggered a higher increase of double IL-2–TNF-α cells.

For $CD8^+$ T cells, the increased percentage of cytokine-producing cells was greater following injection of the MVA–hIL-7–Fc in spleen (52.5% versus 35.8 and 46.8% in comparison with untreated and rhIL-7–Fc-treated mice, respectively). An increase was also observed with both products in lung; however, it was a higher increase for the rhIL-7–Fc (53% versus 36.5 and 45.2% in comparison with untreated and MVA–hIL-7–Fc-treated mice, respectively). A noticeable and equivalent increase of triple TNF-α–IFN-γ–IL-2-producing cells was observed for both products in both organs but notably in the spleen for the MVA–hIL-7–Fc (24.7% versus 18.8 and 15.2% in comparison with rhIL-7–Fc and untreated mice, respectively). An increase of single IFN-γ- and double TNF-α–IFN-γ-producing cells was stronger for the MVA product, whereas that of single TNF-α and double TNF-α–IL-2 cells was higher for the recombinant cytokine.

Overall data indicate that both products have the capacity to increase the frequency of cytokine-producing cells in CLP mice. The differences observed between the two products were smaller than seen in naive mice (Fig. 4H), perhaps as evaluations were restricted to a single time point in the CLP model (day 3 p.i.).

The MVA–hIL-7–Fc is capable of inducing proinflammatory cytokines measured after TCR stimulation in supernatants of spleen and lung cells whereas induction by the rhIL-7–Fc was only observed in lung. Proinflammatory cytokines produced by T cells were assessed in the supernatant of splenocytes or lung cells activated 24 h with anti-CD3 and anti-CD28 Abs (Fig. 6E). In splenocyte supernatants from mice injected with the MVA–hIL-7–Fc, a significant increase of IL-1β and IFN-γ was observed in comparison with untreated mice (0.022 versus 0.008 ng/ml and 6.55 versus 2.07 ng/ml, respectively). No impact on the production of proinflammatory cytokines was observed for the rhIL-7–Fc. In lung cell supernatants, both MVA–hIL-7–Fc- and rhIL-7–Fc treatments triggered a significant increase (or strong trend) of all four tested cytokines compared with untreated mice. Respectively for the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc versus untreated mice, the following variations were observed: 0.044 and 0.031 ng/ml versus 0.014 ng/ml for IL-1β; 9.92 and 10.17 ng/ml versus 4.55 ng/ml for IL-6; 0.598 and 0.538 ng/ml versus 0.250 ng/ml for TNF-α; and 5.02 and 3.66 ng/ml versus 0.87 ng/ml for IFN-γ. No increase of the anti-inflammatory cytokine IL-10 could be documented with either treatment (data not shown).

Comparative survival and weight loss in CLP mice following one injection of the MVA–hIL-7–Fc and of the rhIL-7–Fc

Multiple injections of hIL-7 have been shown to improve survival of CLP mice when injected early (6 h) postsurgery (52). In a preliminary experiment, we assessed CLP survival following a single injection of either the MVA–hIL-7–Fc or the rhIL-7–Fc given at the time of established immunosuppression, that is, day 4. As observed earlier with the higher 10^8 PFU dose of MVA–hIL-7–Fc (Fig. 3A), 100% of mice that received the MVA product were still alive at day 7 (identical to healthy mice) whereas only 80% were alive in the untreated CLP group and 60% were alive for mice treated with the rhIL-7–Fc (Supplemental Fig. 5A). Weight loss was monitored on the pool of surviving mice up to day 4 but also thereafter in the different groups from day 4–6 (Supplemental Fig. 5B). In our model and as previously observed (K. Lélu, unpublished data), untreated CLP mice loose weight until day 4 (average loss of 19.3%), and thereafter survivors slowly start to regain mass. In this study, the weight of mice treated with the hIL-7–Fc remained stable whereas a sharp decrease was observed in animals receiving the MVA–hIL-7–Fc (maximal loss of 22.2%). Weight of the MVA-treated animals slowly started to increase at day 6. This transient weight loss was not associated with additional distress signs. These data are encouraging and in line with our immunological observations, that is, a global superior immune stimulation observed with the MVA-hIL-7–Fc. However, they warrant further consolidation to confirm that a single injection of the rhIL-7–Fc may not be sufficient to confer protection in a CLP model in contrast to a single injection of the MVA–hIL-7–Fc.

An overview of all significant differences observed in CLP mice with the two products is summarized in Fig. 7. Globally, whether

to 6–11 mice/group and one experiment for $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells corresponding to 1–6 mice/group. (**D**) Production of IFN-γ, TNF-α, and IL-2 by splenic and lung $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells after TCR stimulation measured by an ICS assay. Each bar represents the cumulative percentage of the different subpopulations of cytokine-producing cells. (**E**) Mouse IL-1β, IL-6, TNF-α, and IFN-γ concentration measured by electrochemiluminescence in supernatant of splenocyte or lung cells after TCR stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 Abs. Results correspond to cytokine production of three (spleen) and two (lung) experiments, corresponding to $n = 8–15$ and 5–10 mice/group, respectively. The dotted lines represent the limit of detection of each cytokine. For (A)–(C) and (E), each symbol represents the mean value of measures ± SD. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, for differences between groups.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

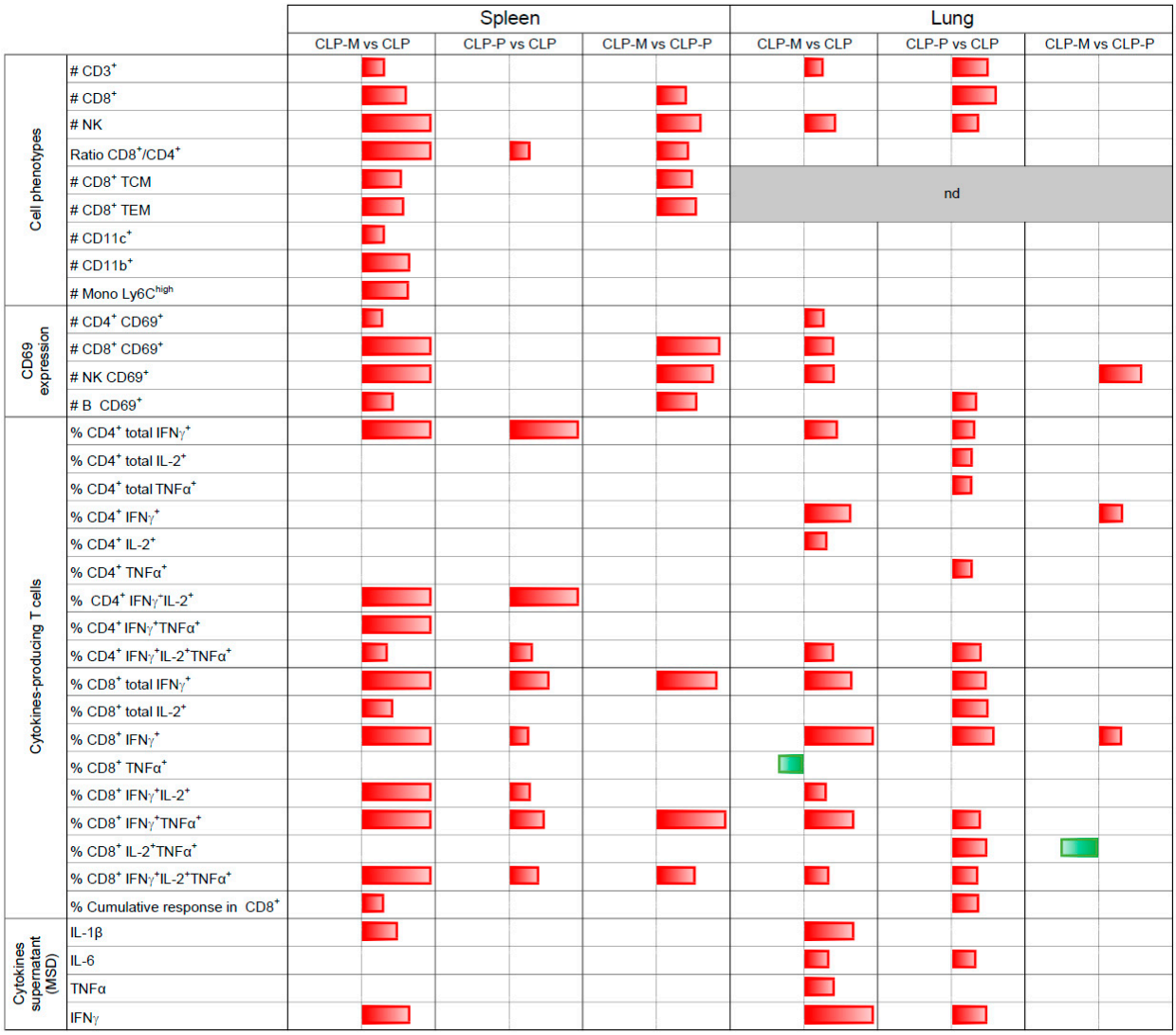


FIGURE 7. MVA–hIL-7–Fc globally improves more significantly immune activities than does the rhIL-7–Fc in spleen and lung of CLP mice. Table shows differences found significant between treated (MVA–hIL-7–Fc [M] and rhIL7-Fc [P]) versus CLP mice as well as between the two treatment groups in both spleen and lung and at day 3 p.i. Pairwise comparisons are shown. In red, *p* values are higher in the first group compared with the second group. In green, *p* values are lower in the first group compared with the second group. The longer the bar is, the more significant is the difference between the two groups. nd, not done.

compared with CLP untreated mice or mice treated with the rhIL-7–Fc, mice that received the MVA–hIL-7–Fc overall displayed a more robust immune cell increase and cell activation, notably for NK and $CD8^+$ T splenic cells. The increase of cytokine-producing T cell frequency and particularly of triple-producing $CD8^+$ T cells was also superior for the MVA–hIL-7–Fc. Differences between the two IL-7 products were more limited in lung than in spleen. The rhIL-7–Fc was found to increase more significantly double TNF-α–IL-2-producing $CD8^+$ T cells in lung.

Discussion

We have demonstrated in this study that a nonpropagative rMVA expressing a hIL-7–Fc cytokine displays strong immunomodulatory activities and confers protection in established sepsis mouse models. Comparative analysis with the rhIL-7–Fc protein counterpart representing the classical formulation tested in the clinic globally illustrates the capacity of the MVA–hIL-7–Fc to trigger broader and longer-lasting immune activation in both spleen and lung of healthy and/or sepsis mice. In addition, early data suggest that the MVA–hIL-7–Fc compared with the soluble cytokine can increase survival of CLP sepsis mice.

Following a single i.v. injection of the MVA–hIL-7–Fc, whether in naive and/or sepsis mice, the number of most immune cells as well as that of activated ones increased. Cell numbers were increased for T lymphocytes, both $CD4^+$ and $CD8^+$ (including memory subpopulations), B cells, and NK cells, but also for myeloid subpopulations (monocytes/macrophages and neutrophils). The MVA–hIL-7–Fc was found, following T cell activation, to significantly improve the percentage of functional $CD8^+$ T cells as well as $CD4^+$ T cells (albeit to lower level) as measured by their capacity to produce cytokines. Cells producing IFN-γ were predominantly detected and included triple-producing cells (IFN-γ–TNF-α–IL-2-producing cells). In naive mice, although most of the induced activities were observed 3 d p.i., of the MVA–hIL-7–Fc, some continued to increase up to day 9, that is, the last day of tissue harvest in both spleen and lung (e.g., numbers of $CD69^+$ $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and $CD4^+$ and $CD8^+$ TEM and TCM cells). In the CLP model,

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

persistence of the effects was not studied, as animals were sacrificed at a single time point (day 3 p.i. of the MVA–hIL-7–Fc). Nevertheless, most observations made in naive animals at day 3 p.i. of the product remained valid in CLP mice; however, they tended to be less differentiating in the lung compartment (Fig. 5B–D), perhaps due to the more limited number of mice used in lung protocols. A prolonged increase of activated, differentiated, and functional lymphocytes in lungs of MVA–hIL-7–Fc-treated mice is expected to contribute to survival in clinical settings such as sepsis for which most infections are linked to lung-invading pathogens (53, 54). Although we focused our study on single-hit sepsis models (CLP and infection by *C. albicans*), both models have been described to ultimately trigger infections that disseminate broadly and reach the lung (55–57). In our experimental conditions, one single injection of the MVA–hIL-7–Fc, but not of the empty MVA, conferred protection in both models (Fig. 3). Other immunotherapies have been tested in the *C. albicans* single-hit fungus model such as checkpoint inhibitors (anti–PD-1/PD-L1 and anti–CTLA-4); however, survival advantages for this class of therapeutics are typically seen after multiple injections of the compounds (58). Similarly, rhIL-7 has shown protective efficacy in single-hit CLP models when injected multiple times (2, 3) and early postsurgery (i.e., immediately or 90 min after CLP) by the s.c. route (52). Massive loss of immune cells (including T, B, NK, and dendritic cells, monocytes/macrophages) as well as alteration of their functions (e.g., activation, proliferation, capacity to produce cytokine) are hallmarks of sepsis-induced immunosuppression (59). In particular, the extensive loss of both $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes in many tissues has been reported and linked to cell apoptosis as shown in various preclinical sepsis models (60, 61). Our data show an increase in the detection of the antiapoptotic Bcl-2 factor in splenic (in naive and CLP mice) and lung (naive mice) $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells following a single injection of the MVA–hIL-7–Fc.

Three key elements contribute to the performances of the MVA–hIL-7–Fc: the use of a viral vector as a delivery platform, the choice of the i.v. injection route, and that of IL-7 as an immune-activating molecule. The classical use of the MVA platform, beyond its original application in vaccination campaigns against smallpox, has been in the development of recombinant vaccines both prophylactic and therapeutic. Described rMVA vaccines aim to mount B and/or T cell–mediated responses specific to the expressed viral, bacterial, parasitic, or tumor Ags (62, 63). In some developments, rMVAs have also been engineered to coexpress an immunostimulating agent such as a cytokine or a costimulatory molecule with the aim to increase the induced immune responses to the vaccine-expressed immunogens (64–66). In this study, we used the MVA platform to deliver an immune HDT (IL-7) in multiple organs and cells to broadly reverse the treated host-altered immune pathways. MVA displays a broad tropism as it infects cells through passive membrane fusion or endocytosis (61). Key targeted cells by MVA include dendritic cells, monocytes, and macrophages capable of triggering innate immunity (34, 67, 68). In naive mice, Lehmann et al. (69) reported the induction of CCCL2 by MVA and its role in the recruitment of leukocytes to the lung. Although we did not measure levels of CCL2 in our study, different cell types were increased in the lungs of naive mice treated with the empty MVA. These include $CD8^+$ T cells, NK cells, and monocytes/macrophages with proinflammatory/phagocytosis capacity (Fig. 2A, 2B). The prominent induction of NK cells in lung p.i. of the MVA vector is in agreement with an earlier study by Lehmann et al. (69). Because NK cells have been shown to be suppressed during sepsis (70), the implementation of immunotherapies capable of restoring NK cell numbers and levels of activation is attractive. NK cells have been reported to have dual effects, either enhancing the development of a cellular immune response against an Ag or dampening it when cell stimulation is above a given threshold (71). Careful monitoring of potential side effects generated by high levels of MVA–hIL-7–Fc-induced NK cells in lungs of treated patients will be important to perform during clinical development. Alternatively, patients with high baseline lung inflammation should be excluded from the trial.

We detected a panel of circulating proinflammatory cytokines/chemokines (IL-1β, IL-6, IL-21, IFN-γ, IP-10, and KC/GRO) and an anti-inflammatory cytokine (IL-10) typically within the first 12–24 h postinjection of the empty MVA (Fig. 2D), confirming the capacity the MVA vector itself to sense the host immune system when injected by the i.v. route. These immune modulators have been described in various ex vivo and vitro models after MVA injection and are part of the inherent vector-associated innate immunity (34, 72). In addition, using intracellular staining performed on $CD8^+$ and $CD4^+$ T following TCR stimulation, we show that IFN-γ–producing cells (single, double, and triple producers) could be detected p.i. of the MVA backbone, although levels were significantly increased with the armed MVA–hIL-7–Fc vector (Fig. 2C). IFN-γ secretion is impaired in splenocytes of sepsis patients in response to ex vivo stimulation compared with critically ill patients with no sepsis (73). Soluble IFN-γ has reached the market and is used for the treatment of immunosuppressed patients with chronic granulomatous disease (74). More recently it has also been used in small clinical studies and shown to restore, after multiple injections, HLA-DR expression on monocytes of immunosuppressed sepsis patients, including patients suffering from fungal infections (75, 76). Hence, contribution of the MVA backbone to the production of IFN-γ represents an attractive asset of the MVA–hIL-7–Fc. A recombinant form of hIL-7 was recently administered multiple times in a patient suffering from an aggressive fungal infection refractory to treatment and shown to result in clinical improvement and clearance of the infection (77). Fungal infections, whether in immunocompromised or noncompromised patients, represent a fast-growing medical need as treatment-resistant strains are disseminating. Combining activation of innate and adaptive immunity as achieved by the MVA–hIL-7–Fc offers a potent weapon in the fight against this challenge.

The IL-7 cytokine was selected to arm the MVA because of its established safety profile and earlier demonstration of immune activation in clinical trials. A number of trials have confirmed the capacity of rhIL-7 to restore T lymphocytes, for example, in lymphopenic metastatic breast cancer patients (24), HIV carriers (78), sepsis patients (19, 77), or patients with COVID-19 (79). In these trials, the used rhIL-7s were typically injected multiple times by the i.m. or s.c. route. In a recent ongoing study, the soluble CYT-107 is being tested in lymphopenic septic patients by the i.v. route (NCT03821038). To our knowledge, this study is the first using the i.v. route for a rhIL-7 in a clinical study. We did not identify preclinical studies that have reported the use of the i.v. route for a soluble form of IL-7. This route is interesting because lung infections are the main cause of sepsis (53). Accelerating the clearance of a primo pulmonary infection to prevent a second infectious episode and/or the development of a systemic infection is valuable and may be better achieved by a therapy capable to quickly reshape lung-resident immune cells. An earlier study by Ramirez et al. (80) reported that s.c., i.p., and i.n. administration routes can lead to the distribution of MVA in lungs of naive mice. Fend et al. (44) later reported that the distribution of a MVA luciferase in the lung after i.v. injection was more potent than observed after the s.c. route. Although the typical administration of rMVAs in the clinic has been by the i.m., s.c. or i.d. route, the i.v. route has recently be documented by DeMaria et al. (81). The authors report on good tolerance of the MVA-BN-brachyury-TRICOM vaccine in advanced solid tumor

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

indications. Two other ongoing clinical studies are reporting the use of the i.v. route for a rMVA malaria preventive vaccine in healthy volunteers (NCT03707353, NCT03084289, NCT04009096). We showed in our study that a single i.v. injection of the MVA–hIL-7–Fc compared with an i.m. injection leads to a more favorable pharmacokinetics and higher numbers of T cells and their activation, both in the spleen and lung of treated animals (Supplemental Fig. 2). Taken together, these data support the use of the i.v. route for the clinical development of the MVA–hIL-7–Fc.

Comparative analyses were performed between the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc soluble counterpart both in vitro and in vivo to identify the distinct features of the vectorized formulation. Although no major differences between the two products could be detected in in vitro studies (similar glycosylation, dimerization, cell proliferation; Fig. 1), in vivo studies performed both in naive and sepsis mouse models revealed multiple significant differentiating elements (summarized in Figs. 5 and 7). Experiments performed in naive mice allowed a more in-depth comparison of the two products notably with respect to the kinetics and the longevity of the induced responses (in naive mice two time points were analyzed, days 3 and 9 p.i, versus a single one, day 3, in the CLP model). Unfortunately, in CLP septic mice the return to immune homeostasis starts as early as 7 d postsurgery (Supplemental Fig. 3 and Ref. 82). Hence, although the MVA–hIL-7–Fc and the soluble rhIL-7 were injected at the time of established immunosuppression (day 4), their impact on the activity of immune cells measured at day 7 should rather be considered as boosting impacts rather than immunorestoring ones. In spleen, activities observed with the rhIL-7–Fc injected by the i.v. route were to some degree divergent from those observed in an earlier reported study in CLP mice using a soluble IL-7 (52). In contrast to observations made by Unsinger et al. (52), we did not observe an increase in the number of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and their memory subtypes when compared with untreated CLP animals. However, as observed by Unsinger et al., we describe a decrease in the percentage of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells expressing the CD127 molecule indicative of an interaction of the rhIL-7–Fc with its receptor. As reported by these authors we also observed an increase of $CD4^+$ T cells expressing the Bcl-2 molecule. The differences between the Unsinger et al. study and ours may be attributed to distinct experimental conditions used including the injection route (i.v. versus s.c.), the timing of injection of the cytokine (4 d versus typically 6 h after CLP), and the number of injections (one versus three). In naive mice, most of the T cell–induced immune activation observed with the rhIL-7–Fc was similar to that reported recently by Aloufi et al. (83) who used the i.p. injection route to administer multiple times a soluble IL-7.

We show in the present study that a single i.v. administration of rhIL-7–Fc results in a sustained increased number of all $CD8^+$ T cells, notably terminally differentiated ones (AE) and central memory ones, but also of all $CD4^+$ T cells, notably effector memory ones. In addition, increased numbers of activated $CD8^+$ T cells, $CD4^+$ T cells, and NKT cells were also observed. Activated T cells expressed higher levels of the proliferation marker Ki67 and of the antiapoptotic marker Bcl-2. Interestingly, the i.v. injection also increased the numbers of TNF-α–producing $CD4^+$ T cells and IFN-γ- as well as TNF-α–producing $CD8^+$ T cells (Fig. 4H). Although the MVA–hIL-7–Fc and the rhIL-7–Fc expectedly resulted in the induction of common immune activities, our data point to important differences both at the quantitative (significance of increases) and the qualitative (broadness of functionalities, duration of effects) levels, which favor the MVA-hIL-7–Fc. Although both products induced immune activation in the lung, the increase in cell numbers and activation were moderate and short lived with the rhIL-7–Fc. In addition, the recombinant cytokine was unable to induce/recruit cytokine-producing T cells to the lung. The induction of a sustained robust immune response by the MVA–hIL-7–Fc in the lung of naive mice is an attractive feature and could be exploited for the prophylaxis of pulmonary infections, a setting that we have not tested in our study. Successful prophylaxis using rmIL-7–Fc administered by the i.n. route has been reported by Kang et al. (84) in a pulmonary lethal influenza A virus model. In this model, protection was linked to the recruitment of T cells from the circulation and their subsequent residency as tissue-resident memory-like T cells. In the spleen of CLP mice, the MVA–hIL-7–Fc resulted in a superior increase in numbers of $CD8^+$ T cells, central and effector memory $CD8^+$ T cells, and NK cells, but also of an increased cell activation and cell capacity to produce IFN-γ (Figs. 5, 7). Activation was more limited in the lung of CLP animals. The MVA–hIL-7–Fc resulted essentially in more activated T and NK cells whereas the rhIL7-Fc was comparatively inert. As observed in naive mice, both products induced cytokine-producing cells in CLP animals. The MVA–hIL-7–Fc mostly triggered IFN-γ–producing $CD8^+$ and/or $CD4^+$ T cells whereas the rhIL-7–Fc induced higher levels of double IL-2/TNF-α–producing $CD8^+$ T cells. Finally, although preliminary, our data suggest that a single i.v. injection of the rhIL-7–Fc, in contrast to a single injection of the MVA–hIL-7–Fc, does not confer protection in the CLP model (Supplemental Fig. 5A). Further studies are warranted to consolidate this observation.

Taken together, our data illustrate numerous differentiating elements between the two products and globally support a broader mechanism of action of the MVA–hIL-7–Fc compared with the protein counterpart. In addition to broader immune activities, we have observed a different pharmacokinetic between the vectorized and nonvectorized hIL-7–Fc in favor of the MVA formulation, particularly in the CLP model. It would be of interest to run additional studies to precisely define whether multiple injections of the hIL-7–Fc may improve global performances of the soluble form as well as to expand follow-up periods in the survival models to gain a broader appreciation of the two therapeutics.

One important consideration in our study is whether some of the immunomodulatory effects observed could be mediated through the Fc portion of the MVA-expressed hIL-7–Fc. The hIL-7–Fc fusion molecule has, unlike Abs, no Ag binding domain and was specifically selected to be a human IgG2 isotype. This isotype displays the lowest effect on murine and human immune cells when bound to Fcγ receptors compared with other IgG-Fc (37, 38). Although human IgG2-Fc presents no affinity for mFcγRI and mFcγRIV, it has been shown to bind mFcγRIIb and mFcγRIII, resulting in weak induction of Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) but no induction of Ab-dependent cellular phagocytosis with mouse macrophages. Induction of potent ADCC with mouse NK cells and polymorphonuclear leukocytes has nonetheless been reported. Interestingly, in a CLP rat model (85) and in septic shock patients (86), a fusion between a human IgG1-Fc, well known to be a strong inducer of phagocytosis and ADCC, with the P-selectin glycoprotein ligand-1 or with TNF-αR was evaluated in survival studies. For both products, studies failed to document a favorable effect on survival and/or bacterial clearance, suggesting that the Fc portion of the products did not confer protection in these sepsis contexts. Overall, absence of the Ag binding domain and the weak affinity for the Fc receptor argue for an unlikely biological activity in vivo of the IgG2-Fc portion of the MVA-encoded hIL-7–Fc.

A potential limitation of poxvirus-based prophylactic and/or therapeutic interventions is linked to the fact that a proportion of the adult human population, particularly the elderly, has an immunity against the vaccine vector due to smallpox vaccination campaigns performed until the late 1970s. The impact of anti-poxvirus neutralizing Abs on the efficacy of rMVAs is yet ambiguous. Studies in

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

animal models have reported that experimentally induced anti-poxvirus pre-existing immunity has no impact (87) or, on the contrary, negatively influence the level of Ag-specific humoral and/or cellular immune responses induced by the tested rMVA vaccines. However, in these studies, protection against infectious challenges appear to be maintained (88–90). In humans, an influenza vaccine based on a rMVA was shown to be immunogenic even in the elderly expected to have poxvirus-specific immunity (91). More recently, a rMVA-based therapeutic vaccine against hepatitis C virus (TG4040) was injected multiple times in chronically infected patients under pegylated IFN-α with ribavirin treatment. The vaccine was immunogenic and had a favorable impact on the primary clinical endpoint of the study compared with patients receiving the standard of care alone (92). The potential impact of pre-existing anti-MVA immunity on the MVA–hIL-7–Fc-induced activities remains to be studied.

The proof-of-concept data generated in healthy mice has recently been confirmed in an exploratory nonhuman primate study (C.-A. Coupet, manuscript in preparation). Additional analyses are warranted to decipher further the role of the different induced cell subtypes and functions following administration of the MVA–hIL-7–Fc with respect to the survival results observed in the sepsis models (e.g., use of depleting Abs, knockout mouse models). In conclusion, our study opens the door to the development of a novel generation of vectorized-based immune HDT for the treatment of sepsis-induced immunosuppression and the conduct of a first-in-human clinical trial with the MVA–hIL-7–Fc.

Acknowledgments

We are most thankful to Richard Hotchkiss for fruitful discussion during the course of this work. We thank Charles-Antoine Coupet, Nathalie Bruck, Thibaut Dufayet, and Eric Quemeneur for continuous support. We give special thanks to Guillaume Monneret and Fabienne Vennet for advice on the CLP model.

Disclosures

K.L., C.D., A.E., M.C., M.B., N.K., R.B., Y.S., N.S., J.-B.M., B.B., S.L.-T.-L., P.M., and G.I. were employees of Transgene when the work was performed. Transgene SA is a publicly traded French biopharmaceutical company with Institut Merieux as major share holder. The other author has no financial conflicts of interest.

References

1. Marin-Acevedo, J. A., A. E. Soyano, B. Dholaria, K. L. Knutson, and Y. Lou. 2018. Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. *J. Hematol. Oncol.* 11: 8.
2. Riley, R. S., C. H. June, R. Langer, and M. J. Mitchell. 2019. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18: 175–196.
3. Bagchi, S., R. Yuan, and E. G. Engleman. 2021. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance. *Annu. Rev. Pathol.* 16: 223–249.
4. Rao, M., D. Valentini, E. Dodoo, A. Zumla, and M. Maeurer. 2017. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. *Int. J. Infect. Dis.* 56: 221–228.
5. Zumla, A., M. Rao, S. K. Parida, S. Keshavjee, G. Cassell, R. Wallis, R. Axelsson-Robertsson, M. Doherty, J. Andersson, and M. Maeurer. 2015. Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies. *J. Intern. Med.* 277: 373–387.
6. Zumla, A., M. Rao, R. S. Wallis, S. H. E. Kaufmann, R. Rustomjee, P. Mwaba, C. Vilaplana, D. Yeboah-Manu, J. Chakaya, G. Ippolito, et al.; Host-Directed Therapies Network consortium. 2016. Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects. *Lancet Infect. Dis.* 16: e47–e63.
7. Opal, S. M. 2016. Non-antibiotic treatments for bacterial diseases in an era of progressive antibiotic resistance. *Crit. Care* 20: 397.
8. Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. M. Coopersmith, et al. 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 315: 801–810.
9. Rudd, K. E., S. C. Johnson, K. M. Agesa, K. A. Shackelford, D. Tsoi, D. R. Kievlan, D. V. Colombara, K. S. Ikuta, N. Kissoon, S. Finfer, et al. 2020. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 395: 200–211.
10. Prescott, H. C., J. J. Osterholzer, K. M. Langa, D. C. Angus, and T. J. Iwashyna. 2016. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ* 353: i2375.
11. Rahmel, T., S. Schmitz, H. Nowak, K. Schepanek, L. Bergmann, P. Halberstadt, S. Hörter, J. Peters, and M. Adamzik. 2020. Long-term mortality and outcome in hospital survivors of septic shock, sepsis, and severe infections: the importance of aftercare. *PLoS One* 15: e0228952.
12. Schmidt, K., J. Gensichen, C. Fleischmann-Struzek, V. Bahr, C. Pausch, Y. Sakr, K. Reinhart, H. C. Vollmar, P. Thiel, A. Scherag, et al. 2020. Long-term survival following sepsis. *Dtsch. Arztebl. Int.* 117: 775–782.
13. Venet, F., and G. Monneret. 2018. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* 14: 121–137.
14. Hotchkiss, R. S., L. L. Moldawer, S. M. Opal, K. Reinhart, I. R. Turnbull, and J.-L. Vincent. 2016. Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2: 16045.
15. van der Poll, T., F. L. van de Veerdonk, B. P. Scicluna, and M. G. Netea. 2017. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* 17: 407–420.
16. Venet, F., T. Rimmelé, and G. Monneret. 2018. Management of sepsis-induced immunosuppression. *Crit. Care Clin.* 34: 97–106.
17. Hotchkiss, R. S., E. Colston, S. Yende, E. D. Crouser, G. S. Martin, T. Albertson, R. R. Bartz, S. C. Brakenridge, M. J. Delano, P. K. Park, et al. 2019. Immune checkpoint inhibition in sepsis: a phase 1b randomized study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of nivolumab. *Intensive Care Med.* 45: 1360–1371.
18. Grimaldi, D., O. Pradier, R. S. Hotchkiss, and J.-L. Vincent. 2017. Nivolumab plus interferon-γ in the treatment of intractable mucormycosis. *Lancet Infect. Dis.* 17: 18.
19. Francois, B., R. Jeannet, T. Daix, A. H. Walton, M. S. Shotwell, J. Unsinger, G. Monneret, T. Rimmelé, T. Blood, M. Morre, et al. 2018. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 3: e98960.
20. Meisel, C., J. C. Schefold, R. Pschowski, T. Baumann, K. Hetzger, J. Gregor, S. Weber-Carstens, D. Hasper, D. Keh, H. Zuckermann, et al. 2009. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180: 640–648.
21. Sereti, I., R. M. Dunham, J. Spritzler, E. Aga, M. A. Proschan, K. Medvik, C. A. Battaglia, A. L. Landay, S. Pahwa, M. A. Fischl, et al.; ACTG 5214 Study Team. 2009. IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood* 113: 6304–6314.
22. Sheikh, V., B. O. Porter, R. DerSimonian, S. B. Kovacs, W. L. Thompson, A. Perez-Diez, A. F. Freeman, G. Roby, J. Mican, A. Pau, et al. 2016. Administration of interleukin-7 increases CD4 T cells in idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Blood* 127: 977–988.
23. Alstadhaug, K. B., T. Croughs, S. Henriksen, C. Leboeuf, I. Sereti, H. H. Hirsch, and C. H. Rinaldo. 2014. Treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy with interleukin 7. *JAMA Neurol.* 71: 1030–1035.
24. Trédan, O., C. Ménétrier-Caux, I. Ray-Coquard, G. Garin, C. Cropet, E. Verronèse, T. Bachelot, P. Rebattu, P. E. Heudel, P. Cassier, et al. 2015. ELYPSE-7: a randomized placebo-controlled phase IIa trial with CYT107 exploring the restoration of $CD4^+$ lymphocyte count in lymphopenic metastatic breast cancer patients. *Ann. Oncol.* 26: 1353–1362.
25. Fry, T. J., and C. L. Mackall. 2001. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol.* 22: 564–571.
26. Leeansyah, E., J. Svärd, J. Dias, M. Buggert, J. Nyström, M. F. Quigley, M. Moll, A. Sönnerborg, P. Nowak, and J. K. Sandberg. 2015. Arming of MAIT cell cytolytic antimicrobial activity is induced by IL-7 and defective in HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 11: e1005072.
27. Zaunders, J. J., Y. Lévy, and N. Seddiki. 2014. Exploiting differential expression of the IL-7 receptor on memory T cells to modulate immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25: 391–401.
28. Komschlies, K. L., T. A. Gregorio, M. E. Gruys, T. C. Back, C. R. Faltynek, and R. H. Wiltrout. 1994. Administration of recombinant human IL-7 to mice alters the composition of B-lineage cells and T cell subsets, enhances T cell function, and induces regression of established metastases. *J. Immunol.* 152: 5776–5784.
29. Pellegrini, M., T. Calzascia, J. G. Toe, S. P. Preston, A. E. Lin, A. R. Elford, A. Shahinian, P. A. Lang, K. S. Lang, M. Morre, et al. 2011. IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. *Cell* 144: 601–613.
30. Ruan, S., D. R. Samuelson, B. Assouline, M. Morre, and J. E. Shellito. 2015. Treatment with interleukin-7 restores host defense against *Pneumocystis* in $CD4^+$ T-lymphocyte-depleted mice. *Infect. Immun.* 84: 108–119.
31. Shindo, Y., A. G. Fuchs, C. G. Davis, T. Eitas, J. Unsinger, C. D. Burnham, J. M. Green, M. Morre, G. V. Bochicchio, and R. S. Hotchkiss. 2017. Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Leukoc. Biol.* 101: 543–554.
32. Verheust, C., M. Goossens, K. Pauwels, and D. Breyer. 2012. Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. *Vaccine* 30: 2623–2632.
33. Waibler, Z., M. Anzaghe, H. Ludwig, S. Akira, S. Weiss, G. Sutter, and U. Kalinke. 2007. Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor-independent type I interferon responses. *J. Virol.* 81: 12102–12110.
34. Liu, L., R. Chavan, and M. B. Feinberg 2008. Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by modified vaccinia virus Ankara and play

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

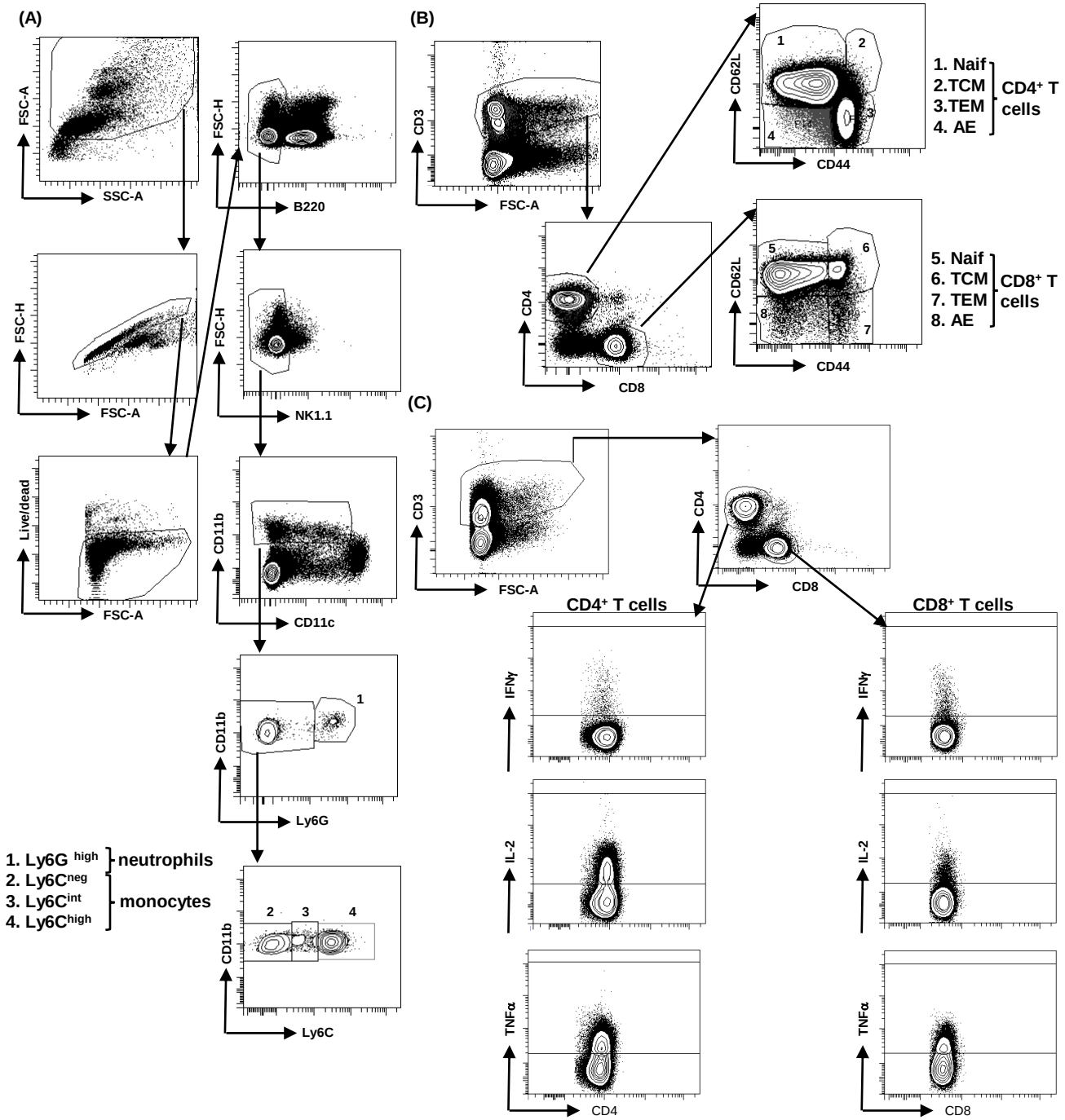
a key role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo. *BMC Immunol.* 9: 15.
35. Price, P. J. R., L. E. Torres-Domínguez, C. Brandmüller, G. Sutter, and M. H. Lehmann. 2013. Modified vaccinia virus Ankara: innate immune activation and induction of cellular signalling. *Vaccine* 31: 4231–4234.
36. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr. 1991. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 72: 1031–1038.
37. Dekkers, G., A. E. H. Bentlage, T. C. Stegmann, H. L. Howie, S. Lissenberg-Thunnissen, J. Zimring, T. Rispens, and G. Vidarsson. 2017. Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *MAbs* 9: 767–773.
38. Bruhns, P., and F. Jönsson. 2015. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* 268: 25–51.
39. Erbs, P., A. Findeli, J. Kintz, P. Cordier, C. Hoffmann, M. Geist, and J. M. Balloul. 2008. Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 15: 18–28.
40. Johnson, S. E., N. Shah, A. Panoskaltsis-Mortari, and T. W. LeBien. 2005. Murine and human IL-7 activate STAT5 and induce proliferation of normal human pro-B cells. *J. Immunol.* 175: 7325–7331.
41. Mire-Sluis, A. R., L. Healey, S. Griffiths, D. Hockley, and R. Thorpe. 2000. Development of a continuous IL-7-dependent murine pre-B cell line PB-1 suitable for the biological characterisation and assay of human IL-7. *J. Immunol. Methods* 236: 71–76.
42. American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care. 2021. Regulations & resources. Available at: https://www.aaalac.org/resources/regulations-resources/. Accessed June 25, 2021.
43. Restagno, D., F. Venet, C. Paquet, L. Freyburger, B. Allaouchiche, G. Monneret, J.-M. Bonnet, and V. Louzier. 2016. Mice survival and plasmatic cytokine secretion in a "two hit" model of sepsis depend on intratracheal *Pseudomonas aeruginosa* bacterial load. *PLoS One* 11: e0162109.
44. Fend, L., T. Gatard-Scheikl, J. Kintz, M. Gantzer, E. Schaedler, K. Rittner, S. Cochin, S. Fournel, and X. Préville. 2014. Intravenous injection of MVA virus targets $CD8^+$ lymphocytes to tumors to control tumor growth upon combinatorial treatment with a TLR9 agonist. *Cancer Immunol. Res.* 2: 1163–1174.
45. Park, L. S., D. J. Friend, A. E. Schmierer, S. K. Dower, and A. E. Namen. 1990. Murine interleukin 7 (IL-7) receptor. Characterization on an IL-7-dependent cell line. *J. Exp. Med.* 171: 1073–1089.
46. Park, J.-H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes, and A. Singer. 2004. Suppression of IL7Rα transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21: 289–302.
47. Yang, J., L. Zhang, C. Yu, X.-F. Yang, and H. Wang. 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2: 1.
48. Altenburg, A. F., C. E. van de Sandt, B. W. S. Li, R. J. MacLoughlin, R. A. M. Fouchier, G. van Amerongen, A. Volz, R. W. Hendriks, R. L. de Swart, G. Sutter, et al. 2017. Modified vaccinia virus Ankara preferentially targets antigen presenting cells *in vitro, ex vivo* and *in vivo. Sci. Rep.* 7: 8580.
49. Dejager, L., I. Pinheiro, E. Dejonckheere, and C. Libert. 2011. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* 19: 198–208.
50. Spellberg, B., A. S. Ibrahim, J. E. Edwards, Jr., and S. G. Filler. 2005. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *J. Infect. Dis.* 192: 336–343.
51. Moniuszko, M., T. Fry, W.-P. Tsai, M. Morre, B. Assouline, P. Cortez, M. G. Lewis, S. Cairns, C. Mackall, and G. Franchini. 2004. Recombinant interleukin-7 induces proliferation of naive macaque $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells *in vivo. J. Virol.* 78: 9740–9749.
52. Unsinger, J., M. McGlynn, K. R. Kasten, A. S. Hoekzema, E. Watanabe, J. T. Muenzer, J. S. McDonough, J. Tschoep, T. A. Ferguson, J. E. McDunn, et al. 2010. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* 184: 3768–3779.
53. Vincent, J.-L., Y. Sakr, C. L. Sprung, V. M. Ranieri, K. Reinhart, H. Gerlach, R. Moreno, J. Carlet, J.-R. Le Gall, and D. Payen; Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. 2006. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* 34: 344–353.
54. Pereira, J. M., J. Gonçalves-Pereira, O. Ribeiro, J. P. Baptista, F. Froes, and J. A. Paiva. 2018. Impact of antibiotic therapy in severe community-acquired pneumonia: data from the Infauci study. *J. Crit. Care* 43: 183–189.
55. Matuschak, G. M., and A. J. Lechner. 1997. The yeast to hyphal transition following hematogenous candidiasis induces shock and organ injury independent of circulating tumor necrosis factor-alpha. *Crit. Care Med.* 25: 111–120.
56. Petraitis, V., R. Petraitiene, A. H. Groll, K. Roussillon, M. Hemmings, C. A. Lyman, T. Sein, J. Bacher, I. Bekersky, and T. J. Walsh. 2002. Comparative antifungal activities and plasma pharmacokinetics of micafungin (FK463) against disseminated candidiasis and invasive pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1857–1869.
57. Lee, J. H., A. Liu, J.-H. Park, H. Kato, Q. Hao, X. Zhang, L. Zhou, and J.-W. Lee. 2020. Therapeutic effects of hyaluronic acid in peritonitis-induced sepsis in mice. *Shock* 54: 488–497.
58. Chang, K. C., C. A. Burnham, S. M. Compton, D. P. Rasche, R. J. Mazuski, J. S. McDonough, J. Unsinger, A. J. Korman, J. M. Green, and R. S. Hotchkiss. 2013. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care* 17: R85.
59. Hotchkiss, R. S., G. Monneret, and D. Payen. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 862–874.
60. Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, C. M. Knudson, K. C. Chang, J. P. Cobb, D. F. Osborne, K. M. Zollner, T. G. Buchman, S. J. Korsmeyer, and I. E. Karl. 1999. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* 162: 4148–4156.
61. Iwata, A., V. M. Stevenson, A. Minard, M. Tasch, J. Tupper, E. Lagasse, I. Weissman, J. M. Harlan, and R. K. Winn. 2003. Over-expression of Bcl-2 provides protection in septic mice by a *trans* effect. *J. Immunol.* 171: 3136–3141.
62. Gómez, C. E., J. L. Nájera, M. Krupa, and M. Esteban. 2008. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* 8: 97–120.
63. Boukhebza, H., N. Bellon, J. M. Limacher, and G. Inchauspé. 2012. Therapeutic vaccination to treat chronic infectious diseases: current clinical developments using MVA-based vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 8: 1746–1757.
64. Abaitua, F., J. R. Rodríguez, A. Garzón, D. Rodríguez, and M. Esteban. 2006. Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing *Env* and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Res.* 116: 11–20.
65. Kolibab, K., A. Yang, S. C. Derrick, T. A. Waldmann, L. P. Perera, and S. L. Morris. 2010. Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. *Clin. Vaccine Immunol.* 17: 793–801.
66. Medina-Echeverz, J., M. Hinterberger, M. Testori, M. Geiger, R. Giessel, B. Bathke, R. Kassub, F. Gräbnitz, G. Fiore, S. T. Wennier, et al. 2019. Synergistic cancer immunotherapy combines MVA-CD40L induced innate and adaptive immunity with tumor targeting antibodies. *Nat. Commun.* 10: 5041.
67. Flechsig, C., Y. Suezer, M. Kapp, S. M. Tan, J. Löffler, G. Sutter, H. Einsele, and G. U. Grigoleit. 2011. Uptake of antigens from modified vaccinia Ankara virus-infected leukocytes enhances the immunostimulatory capacity of dendritic cells. *Cytotherapy* 13: 739–752.
68. Paul, S., D. Snary, J. Hoebeke, D. Allen, J. M. Balloul, N. Bizouarne, K. Dott, M. Geist, J. Hilgers, M. P. Kieny, et al. 2000. Targeted macrophage cytotoxicity using a nonreplicative live vector expressing a tumor-specific single-chain variable region fragment. *Hum. Gene Ther.* 11: 1417–1428.
69. Lehmann, M. H., W. Kastenmuller, J. D. Kandemir, F. Brandt, Y. Suezer, and G. Sutter. 2009. Modified vaccinia virus Ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression. *J. Virol.* 83: 2540–2552.
70. Ono, S., H. Tsujimoto, S. Hiraki, and S. Aosasa. 2018. Mechanisms of sepsis-induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 2: 351–358.
71. Cong, J., and H. Wei. 2019. Natural killer cells in the lungs. *Front. Immunol.* 10: 1416.
72. Pascutti, M. F., A. M. Rodríguez, J. Falivene, L. Giavedoni, I. Drexler, and M. M. Gherardi. 2011. Interplay between modified vaccinia virus Ankara and dendritic cells: phenotypic and functional maturation of bystander dendritic cells. *J. Virol.* 85: 5532–5545.
73. Boomer, J. S., K. To, K. C. Chang, O. Takasu, D. F. Osborne, A. H. Walton, T. L. Bricker, S. D. Jarman II, D. Kreisel, A. S. Krupnick, et al. 2011. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306: 2594–2605.
74. Gallin, J. I., J. M. Farber, S. M. Holland, and T. B. Nutman. 1995. Interferon-γ in the management of infectious diseases. *Ann. Intern. Med.* 123: 216–224.
75. Payen, D., V. Faivre, J. Miatello, J. Leentjens, C. Brumpt, P. Tissières, C. Dupuis, P. Pickkers, and A. C. Lukaszewicz. 2019. Multicentric experience with interferon gamma therapy in sepsis induced immunosuppression. A case series. *BMC Infect. Dis.* 19: 931.
76. Delsing, C. E., M. S. Gresnigt, J. Leentjens, F. Preijers, F. A. Frager, M. Kox, G. Monneret, F. Venet, C. P. Bleeker-Rovers, F. L. van de Veerdonk, et al. 2014. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect. Dis.* 14: 166.
77. Turnbull, I. R., M. B. Mazer, M. H. Hoofnagle, J. P. Kirby, J. M. Leonard, C. Mejia-Chew, A. Spec, J. Blood, S. M. Miles, E. M. Ransom, et al. 2021. IL-7 immunotherapy in a nonimmunocompromised patient with intractable fungal wound sepsis. *Open Forum Infect. Dis.* 8: ofab256.
78. Levy, Y., C. Lacabaratz, L. Weiss, J.-P. Viard, C. Goujard, J.-D. Lelièvre, F. Boué, J.-M. Molina, C. Rouzioux, V. Avettand-Fénoêl, et al. 2009. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J. Clin. Invest.* 119: 997–1007.
79. Laterre, P. F., B. François, C. Collienne, P. Hantson, R. Jeannet, K. E. Remy, and R. S. Hotchkiss. 2020. Association of interleukin 7 immunotherapy with lymphocyte counts among patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Netw. Open* 3: e2016485.
80. Ramirez, J. C., D. Finke, M. Esteban, J. P. Kraehenbuhl, and H. Acha-Orbea. 2003. Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration. *Arch. Virol.* 148: 827–839.
81. DeMaria, P. J., K. Lee-Wisdom, R. N. Donahue, R. A. Madan, F. Karzai, A. Schwab, C. Palena, C. Jochems, C. Floudas, J. Strauss, et al. 2021. Phase 1 open-label trial of intravenous administration of MVA-BN-brachyury-TRICOM vaccine in patients with advanced cancer. *J. Immunother. Cancer* 9: e003238.
82. Muenzer, J. T., C. G. Davis, K. Chang, R. E. Schmidt, W. M. Dunne, C. M. Coopersmith, and R. S. Hotchkiss. 2010. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect. Immun.* 78: 1582–1592.
83. Aloufi, N. A., A. K. Ali, S. C. Burke Schinkel, B. Molyer, P. O. Barros, J. E. McBane, S.-H. Lee, and J. B. Angel. 2021. Soluble CD127 potentiates IL-7 activity *in vivo* in healthy mice. *Immun. Inflamm. Dis.* 9: 1798–1808.
84. Kang, M. C., D.-H. Choi, Y. W. Choi, S. J. Park, H. Namkoong, K. S. Park, S.-S. Ahn, C. D. Surh, S.-W. Yoon, D.-J. Kim, et al. 2015. Intranasal introduction of

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

Fc-fused interleukin-7 provides long-lasting prophylaxis against lethal influenza virus infection. *J. Virol.* 90: 2273–2284.
85. Opal, S. M., J. P. Sypek, J. C. Keith, Jr., R. G. Schaub, J. E. Palardy, and N. A. Parejo. 2001. Evaluation of the safety of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin G fusion protein in experimental models of localized and systemic infection. *Shock* 15: 285–290.
86. Fisher, C. J., Jr., J. M. Agosti, S. M. Opal, S. F. Lowry, R. A. Balk, J. C. Sadoff, E. Abraham, R. M. Schein, and E. Benjamin; The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med.* 334: 1697–1702.
87. Ramírez, J. C., M. M. Gherardi, D. Rodríguez, and M. Esteban. 2000. Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector. *J. Virol.* 74: 7651–7655.
88. Altenburg, A. F., S. E. van Trierum, E. de Bruin, D. de Meulder, C. E. van de Sandt, F. R. M. van der Klis, R. A. M. Fouchier, M. P. G. Koopmans, G. F. Rimmelzwaan, and R. D. de Vries. 2018. Effects of pre-existing orthopoxvirus-specific immunity on the performance of modified vaccinia virus Ankara-based influenza vaccines. *Sci. Rep.* 8: 6474.
89. Kannanganat, S., P. Nigam, V. Velu, P. L. Earl, L. Lai, L. Chennareddi, B. Lawson, R. L. Wilson, D. C. Montefiori, P. A. Kozlowski, et al. 2010. Preexisting vaccinia virus immunity decreases SIV-specific cellular immunity but does not diminish humoral immunity and efficacy of a DNA/MVA vaccine. *J. Immunol.* 185: 7262–7273.
90. Brewoo, J. N., T. D. Powell, J. C. Jones, N. A. Gundlach, G. R. Young, H. Chu, S. C. Das, C. D. Partidos, D. T. Stinchcomb, and J. E. Osorio. 2013. Cross-protective immunity against multiple influenza virus subtypes by a novel modified vaccinia Ankara (MVA) vectored vaccine in mice. *Vaccine* 31: 1848–1855.
91. Antrobus, R. D., P. J. Lillie, T. K. Berthoud, A. J. Spencer, J. E. McLaren, K. Ladell, T. Lambe, A. Milicic, D. A. Price, A. V. S. Hill, and S. C. Gilbert. 2012. A T cell-inducing influenza vaccine for the elderly: safety and immunogenicity of MVA-NP+M1 in adults aged over 50 years. *PLoS One* 7: e48322.
92. Di Bisceglie, A. M., E. Janczweska-Kazek, F. Habersetzer, W. Mazur, C. Stanciu, V. Carreno, C. Tanasescu, R. Flisiak, M. Romero-Gomez, A. Fich, et al. 2014. Efficacy of immunotherapy with TG4040, peg-interferon, and ribavirin in a phase 2 study of patients with chronic HCV infection. *Gastroenterology* 147: 119–131.e3.

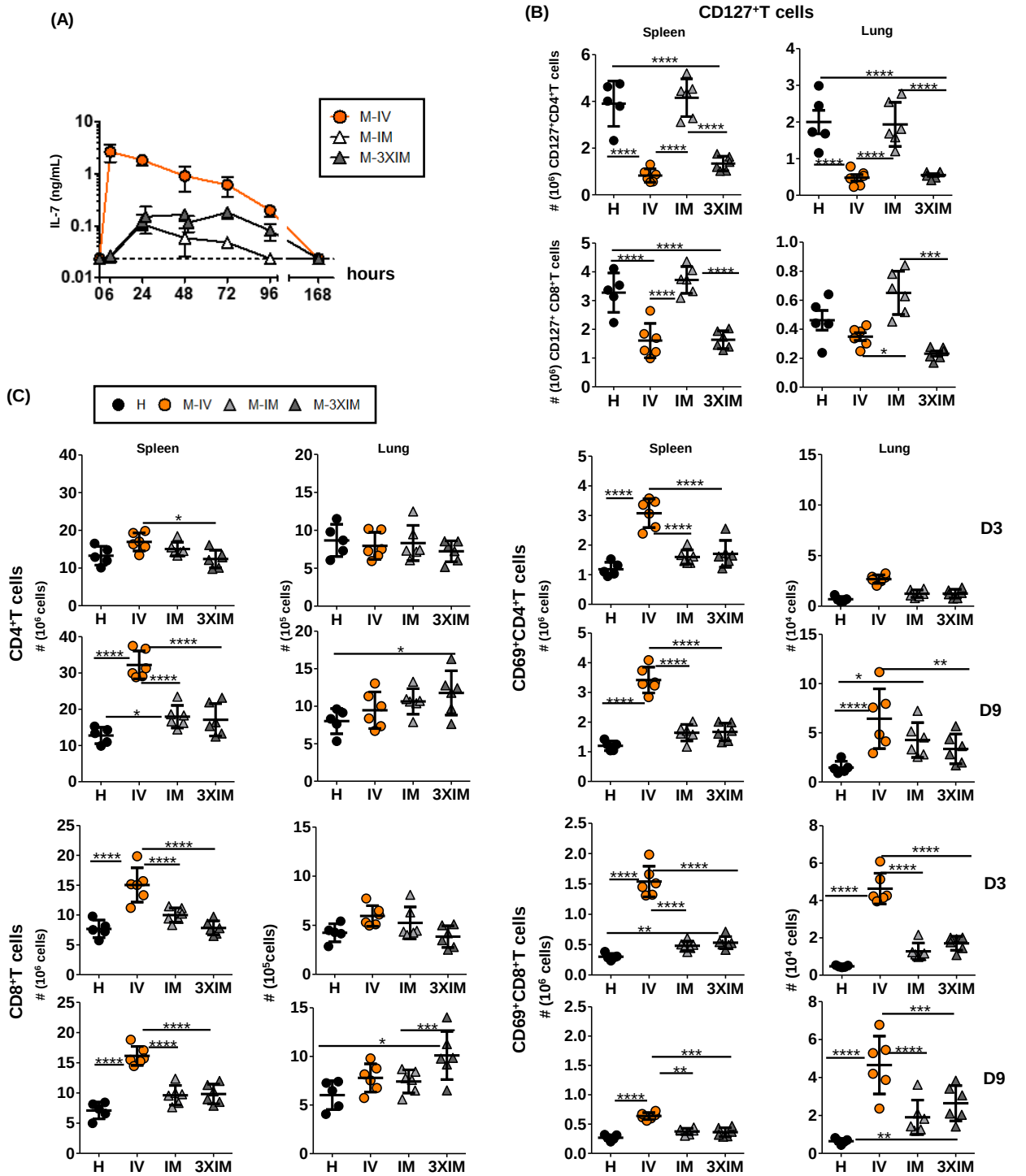
Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at Transgene-Doc on June 7, 2022

Supplemental Figure 1



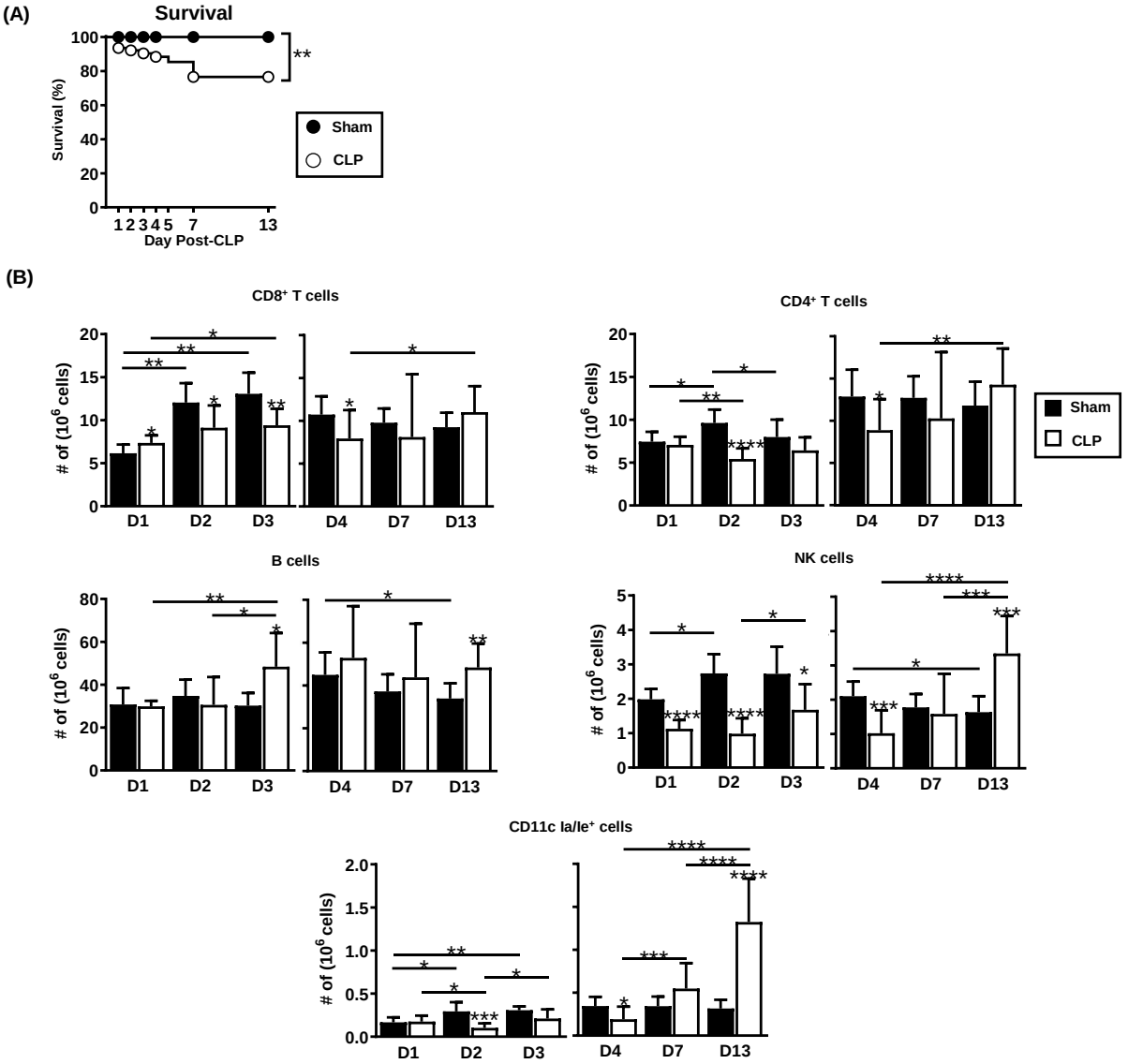
SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Gating strategy for flow cytometry analysis of different cell populations in spleen. Total mouse splenocytes from C57BL/6J mice were prepared as described in Materials and methods. Debris (FSC-A vs SSC-A) and doublets (FSC-H vs FSC-A) excluded. Live-dead discrimination was determined using the amine reactive dye violet (violet live/dead vs FSC-A). (A) For the first cocktail, $CD11b^{+}CD11c^{neg/low}$ cells (gated out using B220 and NK1.1) were sub-gated on $CD11b^{+}Ly6G^{neg/low}$ and $CD11b^{+}$ $Ly6G^{high}$ (population 1). Three populations were identified from $CD11b^{+}Ly6G^{neg/low}$ cells: $CD11b^{+}Ly6G^{neg/low}Ly6C^{neg}$ (population 2), $CD11b^{+}Ly6G^{neg/low}Ly6C^{int}$ (population 3) and $CD11b^{+}Ly6G^{neg/low}Ly6C^{high}$ (population 4). (B) For the second cocktail, $CD3^{+}$ cells (gated out using CD19 and NK1.1) were sub-gated on $CD3^{+}$ $CD4^{+}$ and $CD3^{+}$ $CD8^{+}$ and T cell subsets assessed for the expression of CD62L and CD44 in order to differentiate naive (population 1 and 5: $CD62L^{low}CD44^{high}$), central memory (population 2 and 6: $CD62L^{high}CD44^{high}$), effector memory (population 3 and 7: $CD62L^{low}CD44^{high}$) and acute effector (population 4 and 8: $CD62L^{low}CD44^{low}$) cells. (C) For intracellular cytokine staining assays $CD3^{+}$ cells were sub-gated on $CD3^{+}$ $CD4^{+}$ and $CD3^{+}$ $CD8^{+}$ and assessed for the expression of IFNγ, IL-2 and TNFα. Cell positive for each tested cytokine were gated as shown and Boolean-gating was realized to determine number of cells positive for two or three cytokines

Supplemental Figure 2



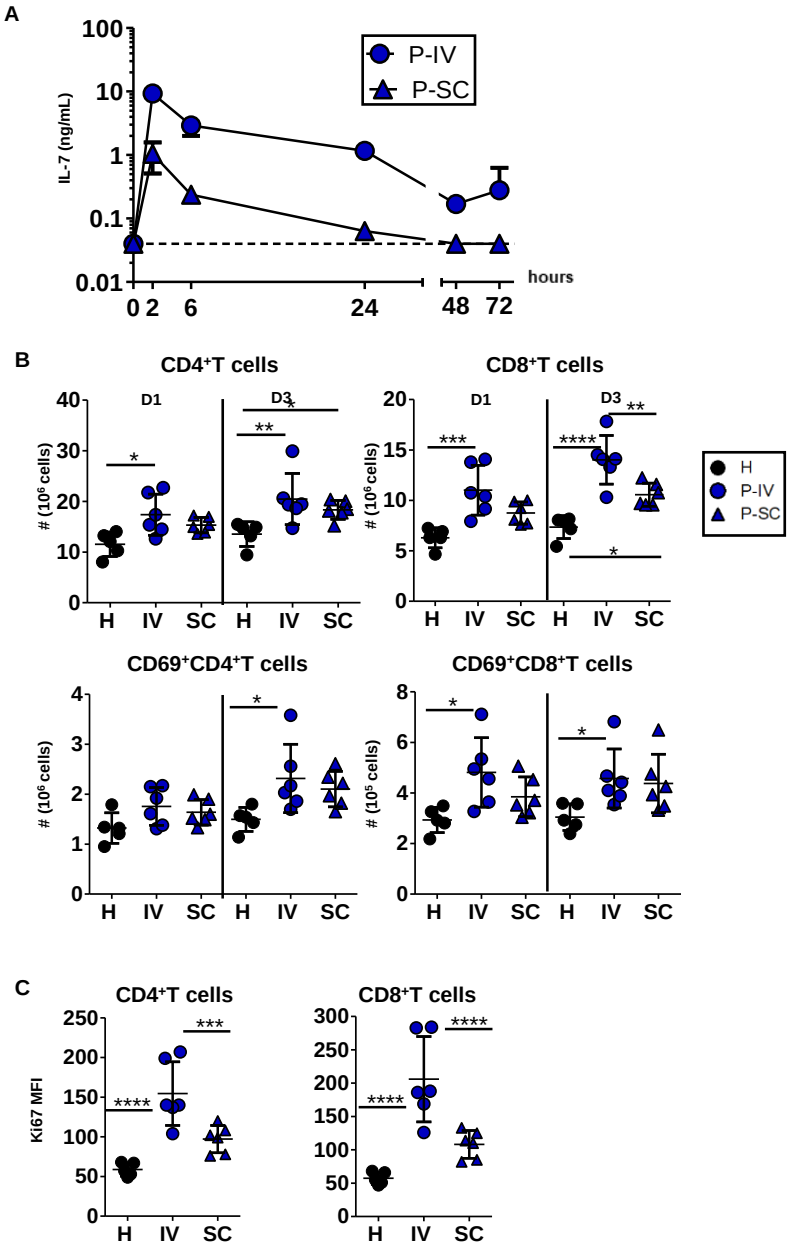
SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Intravenous (IV) injection of the MVA-hIL-7-Fc induces higher serum concentration of hIL-7-Fc and absolute number of total and activated CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells than intramuscular (IM) delivery in spleen and lung of naive mice. C57BL/6J mice were injected once with the MVA-hIL-7-Fc (M-IV, n= 18) at a dose of 10^7 pfu or a single time or daily for three days by the IM route (M-IM, M-3xIM, n= 18 and 24, respectively). Healthy untreated (H, n= 10) mice were added as control group. (A) Serum hIL-7-Fc concentration. Each symbol represents the mean value of hIL-7-Fc (ng/mL) +/- SD of 3 mice measured at each indicated time point except for 24hr and 72hr that included 6 mice. The dotted line represents the limit of detection. Results are representative of 4 experiments (IV route) and one experiment (IM route). (B) Each symbol represents the mean value +/- SD of the absolute number (10^6) of CD127-expressing CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells in spleen and lung at D3 p.i.. (C) Each symbol represents the mean value +/- SD of absolute number (10^6) of total and activated CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells in spleen and lung at D3 and D9 p.i. (6 mice per treated group and 5 for the untreated one). Star symbols indicate a statistical difference between two groups.

Supplemental Figure 3



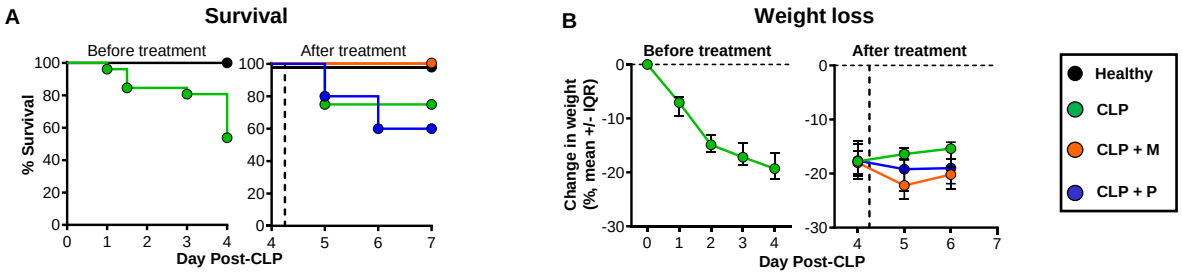
SUPPLEMENTAL FIGURE 3. Time course of the survival and immune status of CLP mice compared with sham-operated mice post-surgery. A pool of mice underwent CLP surgery (CLP, n= 78) or underwent laparotomy with only exposition of cecum without CLP (Sham, n= 45). (A) Survival. (B) Absolute number of splenic immune cells. Mice were sacrificed at D1 (Sham, n= 6; CLP, n= 9), D2 (Sham, n= 6; CLP, n= 9), D3 (Sham, n= 6; CLP, n= 9), D4 (Sham, n= 9; CLP, n= 13), D7 (Sham, n= 8; CLP, n= 15) and D13 (Sham, n= 8; CLP, n= 11) and cell number defined. Each bar represents the mean value +/- SD of absolute number (10^6) of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, NK cells, B cells and DC cells. A total of 3 experiments were realized for the D1/D2/D3 (n= 1) and D4/D7/D13 (n= 2) period. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism software: Log-rank (Mantel-Cox) test was used for survival study and Mann Whitney Unpaired T test was used for absolute number of cells study. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

Supplemental Figure 4



SUPPLEMENTAL FIGURE 4. IV injection of the rhIL-7-Fc induces higher concentration of hIL-7-Fc in serum and absolute number of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and Ki67 expression compared to the subcutaneous (SC) route in spleen of naive mice. C57BL/6J mice were injected once IV with 5µg of the rhIL-7-Fc protein (P-IV, n=.12) or once SC (P-SC, n= 12). Healthy untreated (H, n= 10) mice were added as control group. (A) Serum hIL-7-Fc concentration. Symbol represents the mean value of hIL-7-Fc (ng/mL) +/- SD of 3 mice measured at each indicated time point except for 24hr and 72hr that included 6 mice. The dotted line represents the limit of detection. (B) Each symbol represents the mean value +/- SD of the absolute number (10^6) of total and activated splenic $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. For (A) and (B), results are representative of 3 (IV route) and one (SC route) experiments. (C) Flow cytometry analysis of intranuclear Ki67 expression from splenic $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, measured at D3 post-injection. Each symbol represents the mean MFI value +/- SD of Ki67. Results represent 1 experiment. Star symbols indicate a statistical difference between two groups.

Supplemental Figure 5



SUPPLEMENTAL FIGURE 5. Comparative survival between the MVA-hIL-7-Fc and the rhIL-7-Fc in CLP mice. A pool of mice (n= 26) underwent CLP surgery at D0 and surviving mice (n= 14) were split in different treatment groups at D4 to receive 10^7 pfu of the MVA-hIL-7-Fc (CLP + M, n= 5), or 5µg of the rhIL-7-Fc (CLP + P, n= 5) or left untreated (CLP, n= 4). Untreated healthy mice (H, n= 5) were used as control. (A) Survival and (B) weight loss, before and after treatment.

École Pratique
des Hautes Études

PSL

Les Patios Saint-Jacques, 4-14, rue Ferrus 75014 Paris – Tél. : +33 (0)1 53 63 61 20
www.ephe.psl.eu

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

Mise en place d'un modèle murin du sepsis et caractérisation d'une immunothérapie innovante pour le traitement de l'immunosuppression associée à ce syndrome

Marie Baldazza

Soutenu le 17 novembre 2022

RÉSUMÉ
L'immunodépression induite par le sepsis est caractérisée par des réponses immunitaires innées et adaptatives altérées. Le premier candidat d'immunothérapie développé contre cette pathologie par la société Transgene est basé sur un virus de la Vaccine Ankara Modifié (MVA) codant pour une cytokine : l'interleukine 7 humaine (hIL7-Fc), portant une région Fc (Fragment cristallisable).
Dans le modèle de ligature et ponction cæcale (CLP ou Cecal Ligation Puncture) récemment introduit dans notre Laboratoire, nous observons une tolérance au LPS (lipopolysaccharide), une réponse cytokinique à une stimulation TCR réduite et une inhibition de la capacité de prolifération des lymphocytes T. L'intérêt de la combinaison MVA-hIL7-Fc est de stimuler à la fois les systèmes immunitaires inné et adaptatif.
L'activation de la première ligne de défense non spécifique contre les agents pathogènes étrangers est induite par le MVA et le système immunitaire adaptatif par l'hIL7-Fc. À la suite d'une seule injection intraveineuse chez des souris CLP, le MVA-hIL7-Fc a augmenté le nombre et la fonctionnalité des lymphocytes B, T et NK dans la rate et conféré un avantage de survie significatif dans le modèle CLP. Le contrôle par la protéine soluble de rhIL7-Fc ou le MVA-Vide a induit des activités immunitaires moins complètes que le MVA hIL7-Fc. Le MVA-hIL-7-Fc a donc un fort potentiel comme nouvelle immunothérapie pour le traitement des patients septiques immunodéprimés.

MOTS-CLÉS
Sepsis, immunothérapie, immunité innée, immunité adaptative, MVA, virus de la Vaccine Ankara Modifié, cytokine, IL-7, CLP, Cecal Ligation Puncture