Développement de pseudo-particules rétrovirales comme vaccin tolérogène et application dans l'allergie alimentaire

Pierre-Axel Vinot

▶ **To cite this version:**

Pierre-Axel Vinot. Développement de pseudo-particules rétrovirales comme vaccin tolérogène et application dans l'allergie alimentaire. Immunologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS268 . tel-02868484

HAL Id: tel-02868484
https://theses.hal.science/tel-02868484

Submitted on 15 Jun 2020

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.

Sorbonne Université

École doctorale Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique (ED394)

Laboratoire d'Immunologie, Immunopathologie, Immunothérapie

Sorbonne Université / INSERM UMRS 959

Équipe immunoThérapie

Développement de pseudo-particules rétrovirales comme vaccin tolérogène et application dans l'allergie alimentaire

Par Pierre-Axel Vinot

Thèse de doctorat ès Sciences

Spécialité Immunologie

Dirigée par le Professeur Bertrand Bellier

Présentée et soutenue publiquement le 16/11/2018

Devant un jury composé de :

Président :	Dr. Benoit Salomon
Rapporteurs :	Pr. Marie-Christophe Boissier
	Dr. Roberto Mallone
Examinateurs :	Pr. Véronique Godot
	Pr. Christophe Dupont
	Dr. Vincent Dioszeghy
Directeur de Thèse :	Pr. Bertrand Bellier

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

RESUME

L'incidence croissante des désordres immunitaires a motivé le développement de nouvelles approches permettant l'induction d'une tolérance immunitaire spécifique et maintenue dans le temps. S'inscrivant dans ce cadre, la vaccination tolérogène exploite les propriétés innées du système immunitaire pour rétablir la tolérance en visant spécifiquement les acteurs majeurs que sont les cellules dendritiques et les lymphocytes T régulateurs. Ce concept se confronte néanmoins à certaines limitations dues au besoin d'apporter l'antigène sous une forme particulière ou de manière combinée avec un signal de tolérance. En exploitant les propriétés natives des pseudo-particules dérivées de rétrovirus, nous avons mis au point une plateforme permettant de répondre à ces problématiques propres à la vaccination tolérogène. Par ce travail de thèse, l'objectif fut de démontrer la faisabilité de cette approche, en produisant et caractérisant des VLP exprimant l'ovalbumine au sein de la capside et présentant des molécules de CTLA-4 à leur surface. Par une étude fonctionnelle sur les cellules dendritiques et sur des cellules présentant une spécificité réactionnelle pour l'ovalbumine, nous avons mis en exergue les propriétés tolérogènes de ces VLP. Ces propriétés ont par la suite été confirmées dans un modèle d'allergie alimentaire induite à l'ovalbumine chez la souris. Les résultats obtenus démontrent pour la première fois que ces VLP tolérogènes permettent le contrôle de l'allergie alimentaire de manière spécifique et à long terme et fournissent la preuve de concept de leur utilisation. Les travaux entrepris permettent d'autre part d'envisager l'utilisation de ces particules dans d'autres champs d'application et notamment les maladies auto-immunes.

ABSTRACT

The increasing incidence of immune disorders has motivated the development of innovative approaches allowing the induction of a specific and long-lasting immune tolerance. Tolerogenic vaccination stands as one of those new therapies and exploits the innate properties of the immune system to restore tolerance by specifically targeting major players such as dendritic cells and regulatory T cells. Nevertheless, this concept faces certain limitations due to the need to provide the antigen in a particular form or in combination with a tolerance signal. By exploiting the native properties of pseudo-particles derived from retroviruses, we have developed a platform to answer those needs. With this thesis research, the objective was to highlight the feasibility of this approach by producing and characterizing VLPs expressing ovalbumin within the capsid and presenting CTLA-4 molecules on their surface. By functional studies on dendritic cells and on ovalbumin specific T cells, we highlight the tolerogenic properties of these VLPs. These properties were subsequently confirmed in a model of ovalbumin-induced food allergy in mice. The obtained results demonstrate for the first time that these tolerogenic VLPs allow the control of food allergy in a specific and long-lasting manner, thus supporting the proof of concept of their use. Additional work also makes it possible to consider the use of these particles in other fields of application and in particular autoimmune diseases.

LISTE DES ABBREVATIONS

APC : Cellule présentatrice d'antigène
Breg : Lymphocyte B régulateur
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CTLA4Ig : CTLA-4 fusionné à un fragment constant d'immunoglobuline
DC : Cellule Dendritiques
DT1 : Diabète de type I
EAE : Encéphalomyélite expérimentale auto-immune
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
EPIT : Immunothérapie épicutanée
Foxp3 : Forkhead box protein 3
GPI : Glycosyl phosphatidyl inositol
HBsAg : Antigène de surface du virus de l'hépatite B
iDC : Cellule dendritique immature
IFN-g : Interféron g
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ITS : Immunothérapie spécifique
LAG-3 : Lymphocyte activation protein 3
LAP : Latency-associated peptide
LC : Cellules de Langerhans
LyB : Lymphocyte B
LyT : Lymphocyte T
MAI : Maladies auto-immunes
MBP : Protéine basique de myéline
mDC : Cellule dendritique mature
MOG : Glycoprotéine de myéline des oligodendrocytes
NP : Nanoparticule
OIT : Immunothérapie orale
PD-1 : Programmed cell death protein 1
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde
PR : Polyarthrite rhumatoïde
SCIT : Immunothérapie sous-cutanée
sCTLA-4 : CTLA-4 soluble
SEP : Sclérose en plaques
SLIT : Immunothérapie sublinguale
TCR : Récepteur Cellulaire T
Teff : Lymphocyte T effecteur
Tfh : Lymphocyte T folliculaire auxiliaire
TGF-b : Transforming Growth Factor b
TIM-3 : T-cell immunoglobulin-3
TNF-a : Tumour Necrosis Factor a
tolDC : Cellule dendritique tolérogène
tolNP : Nanoparticule tolérogène
tolVLP : Virus-like-particles tolérogènes
Treg : Lymphocyte T régulateur
VHB : Virus de l'hépatite B
VLP : Virus-like-particles
VSV : Virus de la stomatite vésiculeuse
VSVG : Protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse

SOMMAIRE

RESUME 2

ABSTRACT 2

LISTE DES ABBREVATIONS 3

SOMMAIRE 4

INTRODUCTION 7

HISTORIQUE ET CONCEPT DE LA VACCINATION TOLEROGENIQUE 8

PARTIE I : LES ACTEURS CLES DE LA VACCINATION TOLEROGENIQUE 11

1. LES CELLULES DENDRITIQUES (DC) : TOLERANCE, AUTO-IMMUNITE ET CARACTERISATION 11

1.1. LES CELLULES DENDRITIQUES INITIATRICES DE LA TOLERANCE IMMUNE 11
1.2. CELLULES DENDRITIQUES ET PATHOLOGIES AUTO-IMMUNES 13
1.3. CARACTERISATION DES CELLULES DENDRITIQUES TOLEROGENES (TOLDC) 15
1.4. LES CELLULES DENDRITIQUES TOLEROGENES *IN SITU* 17
1.4.1. LES CELLULES DENDRITIQUES CIRCULANTES 18
1.4.2. LES MUQUEUSES, UN SITE PRIVILEGIE DE LA TOLERANCE 19
1.4.3. LA TOLERANCE INITIEE PAR LA PEAU 20

2. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS 22

2.1. LES TREG FOXP3+ 23
2.1.1. CARACTERISATION ET ROLE DES TREG FOXP3+ 23
2.1.2. MECANISMES D'ACTION DES TREG FOXP3+ 24
2.2. LES TREG SECRETEURS D'INTERLEUKINE-10 (TR1) 27
2.2.1. FONCTIONS DES TR1 28
2.2.2. INDUCTION DE TR1 28
2.3. LES TREG SECRETEURS DE TGF-β (TH3) 29

PARTIE 2 : LES STRATEGIES VACCINALES TOLEROGENES 31

1. LES PREMIERES APPROCHES AVEC LES VACCINS CELLULAIRES ET ADN 31

2. LA GENERATION DE DC TOLEROGENES 32

2.1. AGENTS PHARMACOLOGIQUES 34
2.1.1. VITAMINE D3 34
2.1.2. IMMUNOSUPPRESSEURS 34

2.1.3. SIMVASTATINE 35
2.1.4. ASPIRINE 36
2.2. AGENTS BIOLOGIQUES 36
2.2.1. INTERLEUKINE-10 (IL-10) 36
2.2.2. TRANSFORMING GROWTH FACTOR β (TGF-β) 37
2.2.3. TUMOR NECROSIS FACTOR-α (TNF-α) 37
2.3. THERAPIE GENIQUE 38
2.4. UTILISATION DE MICROORGANISMES 39

3. LES NANOPARTICULES 39

3.1. LE DEVELOPPEMENT DES NP SYNTHETIQUES 40
3.2. APPROCHES THERAPEUTIQUES BASEES SUR DES NP 42
3.2.1. APPROCHES EXPLOITANT LES PROCESSUS TOLEROGENES PREEXISTANTS 44
3.2.2. APPROCHES CIBLANT DES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS LA TOLERANCE 45
3.2.3. APPROCHES UTILISANT DES AGENTS PHARMACOLOGIQUES INHIBITEURS 46

PARTIE 3 : POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRES ET TOLERANCE 48

1. LES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRE 48

1.1. CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE ASSOCIATED PROTEIN 4 (CTLA-4) 48
1.1.1. STRUCTURE ET EXPRESSION 48
1.1.2. MECANISME D'ACTION 51
1.1.3. ISOFORMES ET POLYMORPHISMES DU CTLA-4 57
1.2. PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN 1 (PD-1) 58
1.2.1. STRUCTURE ET EXPRESSION 58
1.2.1. MECANISME D'ACTION ET ROLE DANS LA TOLERANCE 59
1.3. AUTRES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRES 61
1.3.1. LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE 3 (LAG-3) 62
1.3.2. T CELL IMMUNOGLOBULIN-3 (TIM-3) 63

2. QUELLES THERAPIES AUJOURD'HUI POUR LES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRE 65

2.1. THERAPIES BASEES SUR LA MOLECULE CTLA-4 65
2.1.1. ABATACEPT (ORENCIA®) 68
2.1.2. BELATACEPT (NULOJIX®) 69
2.2. THERAPIES BASEES SUR LA MOLECULE PD-1 70

OBJECTIFS ET PRINCIPES EXPERIMENTAUX 72

RESULTATS 76

ARTICLE : RETROVIRUS DERIVED VIRUS-LIKE PARTICLE AS TOLEROGENIC VACCINES FOR FOOD ALLERGY PREVENTION 77

CONCLUSIONS DE L'ARTICLE 120

DISCUSSION 121

1. LES DEVELOPPEMENTS DES VLP : DE L'IMMUNISATION A LA TOLERANCE 122

1.1. LES PREMIERS DEVELOPPEMENTS VACCINAUX UTILISANT LES VLP 122
1.2. LES PSEUDO-PARTICULES RETROVIRALES ET LEUR OPTIMISATION 124
1.3. LES VLP POUR INDUIRE UNE TOLERANCE 126

2. MECANISMES DE TOLERANCE INDUITS PAR L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE DANS L'ALLERGIE ALIMENTAIRE ET PLACE DES VLP TOLEROGENES DANS L'ARSENAL THERAPEUTIQUE 129

2.1. DESENSIBILISATION 130
2.1.1. MODULATION PAR LES ITS 130
2.1.2. MODULATION PAR LES TOLVLP 131
2.2. IMPACT SUR LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE 132
2.2.1. MODULATION PAR LES ITS 132
2.2.2. MODULATION PAR LES TOLVLP 133
2.3. IMPACT SUR LES LYMPHOCYTES T ET LES TREG 133
2.3.1. MODULATION PAR LES ITS 133
2.3.1. MODULATION PAR LES TOLVLP 134
2.4. IMPACT SUR LES LYMPHOCYTES B 135
2.4.1. MODULATION PAR LES ITS 135
2.4.1. MODULATION PAR LES TOLVLP 136

3. QUELS FUTURS DEVELOPPEMENTS POUR LES VLP TOLEROGENES ? 137

3.1. L'UTILISATION D'AUTRES SIGNAUX DE TOLERANCE 137
3.1.1. LES AUTRES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRE 138
3.1.2. LE TGF-β ET IL-10 138
3.1.3. L'INTERLEUKINE-2 141
3.2. L'APPLICATION DES VLP TOLEROGENES DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES 144

CONCLUSION 147

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 150

ANNEXES 171

ARTICLE ANNEXE N°1: PHARMACODYNAMICS OF REGULATORY T CELLS IN MICE AND HUMANS TREATED WITH LOW-DOSE INTERLEUKIN-2 172

ARTICLE ANNEXE N°2 : CIBLES ET IMMUNOTHERAPIES INNOVANTES DANS LE TRAITEMENT DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE 189

VALORISATION SCIENTIFIQUE 200

INDEX DES FIGURES ET DES TABLES 202

REMERCIEMENTS 205

INTRODUCTION

Historique et concept de la vaccination tolérogénique

En 1796, Edward Jenner pose les premières bases du concept de la vaccination en s'attelant à proposer un traitement préventif pour lutter contre l'infection par le virus de la variole. Par la suite, Louis Pasteur adapte les concepts fondamentaux de la vaccination et développe la vaccination à large échelle, bâtissant ainsi le socle d'une protection quasi universelle et remarquablement efficace pour plus d'une dizaine d'infections virales ou bactériennes. L'efficacité de la vaccination traditionnelle s'appuie à la fois sur de nombreuses propriétés du système immunitaire ainsi que sur les faiblesses propres à chaque pathogène. On peut définir ce concept par la capacité de stimuler le système immunitaire d'un individu afin qu'il puisse reconnaitre un agent pathogène, le neutraliser et enfin se « souvenir » de ce pathogène afin de répondre efficacement et rapidement par la suite. Ces trois qualités essentielles d'un vaccin ne suffisent pas néanmoins à définir complètement un vaccin. En effet, les notions de sécurité, de balance bénéfice / risque et de protection à long terme restent essentielles et conditionnent le développement et l'utilisation des vaccins actuels. Les mécanismes immunitaires mis en jeu durant la vaccination sont variés, allant de l'immunité cellulaire adaptative à l'immunité humorale en passant par des systèmes annexes. Le choix de l'antigène, la cinétique d'administration, les molécules adjuvantes ou encore la voie d'administration sont des critères déterminants pour l'efficacité d'un vaccin.

Cet apprentissage des formulations antigéniques a non seulement permis la génération de vaccins plus efficaces et plus sûrs, mais aussi la possibilité d'envisager la vaccination afin d'induire une tolérance immunitaire. Ces concepts se sont développés dès les années 1990 devant l'augmentation croissante de l'incidence des désordres immunitaires depuis les années 1950 et grâce à la diminution progressive du nombre global de personnes atteintes de pathologies infectieuses. Plusieurs approches thérapeutiques sont rapidement mises en place pour répondre à ces enjeux de santé publique. Dans cet ensemble, la plupart sont des thérapies non spécifiques qui s'attellent

à moduler les acteurs de l'immunité en agissant sur leur état d'activation ou sur leur nombre. On retrouve au sein de cette classe les thérapies médiées par des anticorps déplétants avec une action, soit sur le compartiment des lymphocytes B (LyB) par exemple grâce aux anti-CD20 (Hauser et al., 2008), soit sur le compartiment des lymphocytes T (LyT) avec les anti-CD3 (Herold et al., 2002), soit de manière encore moins spécifique avec les anti-CD52 ciblant une molécule exprimée par l'ensemble des lymphocytes matures mais également certaines cellules dendritiques (DC) ou monocytes. (Investigators, 2008). Ces thérapies présentent l'avantage d'être relativement efficaces, mais sont malheureusement caractérisées par une toxicité importante (*i.e.* immunodépression) et par le besoin d'une réadministration fréquente et à long terme. En parallèle du développement de ces anticorps ciblant les cellules de l'immunité, des approches s'attèlent à réguler l'immunité par l'intermédiaire de médiateurs moléculaires avec les cytokines en chefs de file. Au sein de cette catégorie, on retrouve notamment certaines des thérapies les plus utilisées dans les désordres immunitaires (*e.g* anticorps anti-interleukine 6 (IL-6) ou anticorps anti-tumor necrosis factor α (TNF-α)) mais qui sont également les plus coûteuses ; ceci démontrant bien la difficulté inhérente au développement de ces approches. De manière similaire aux anticorps déplétants, ces médicaments sont non spécifiques d'une pathologie, potentiellement toxiques et leurs effets s'estompent à l'arrêt du traitement. En définitive, ce sont ces profils d'utilisation et de sécurité parfois contraignants ainsi que l'adaptation de l'héritage légué par Jenner et Pasteur qui ont permis de poser les bases du développement de la « vaccination inverse » ou « vaccination tolérogénique ».

Cette « vaccination tolérogénique », terme qui a l'avantage par rapport celui de « vaccination inverse » ou « vaccination négative » de définir clairement la notion de tolérance immunitaire comme objectif, reprend donc les concepts fondateurs de la vaccination classique. L'objectif est d'apporter un antigène, identifié comme initiateur des mécanismes pathologiques, sous une formulation spécifique afin de mettre en place des mécanismes de régulation et ainsi abroger les manifestations délétères. Les défis de la vaccination tolérogène demeurent, de fait, similaires à ceux de la vaccination classique. Le premier est celui du choix de l'antigène avec une difficulté certaine à

identifier les antigènes majeurs impliqués dans ces désordres immunitaires et la nécessité de prendre en compte la variabilité individuelle inhérente à ces pathologies. Le deuxième est bien évidemment l'induction de tolérance, complexe dans l'identification des molécules et cellules l'opérant mais également dans le risque de développer à l'inverse une suppression trop grande du système immunitaire. Le troisième est celui de la mémoire donc du maintien de cette tolérance effective à long terme. Devant cette complexité du concept de vaccination tolérogénique, le développement de thérapies ne peut se faire sans la caractérisation fine des acteurs majeurs de la tolérance au sein du système immunitaire.

Partie I : Les acteurs clés de la vaccination tolérogénique

Bien que la tolérance immunitaire implique l'ensemble des acteurs de l'immunité aussi bien cellulaire qu'humorale, ainsi qu'innée ou adaptative, les enseignements de la vaccination classique mettent les cellules dendritiques au cœur des processus de tolérance. D'autre part, la compréhension des mécanismes expliquant les désordres immunitaires souligne bien souvent un défaut tant qualitatif que quantitatif des lymphocytes T régulateurs (Treg) indépendamment de leur phénotype. De ce fait, l'accent au sein de cette description des cellules cibles de la tolérance sera porté sur ces deux types cellulaires en décrivant leur place tout autant dans les processus de tolérance que dans les phénomènes d'auto-immunité sans oublier d'évoquer les moyens d'action disponibles pour les moduler.

1. Les cellules dendritiques (DC) : tolérance, auto-immunité et caractérisation

1.1. Les cellules dendritiques initiatrices de la tolérance immune

Les cellules dendritiques constituent une famille hétérogène de cellules présentatrices d'antigènes (APC) avec un rôle clé dans l'activation de réponses cellulaires et humorales. Ces « chefs d'orchestre » de la réponse immunitaire ont un rôle majeur de sentinelle pour prendre en charge les antigènes issus aussi bien du soi, que d'organismes pathogènes ou de processus tumoraux. Le rôle majeur de ces cellules est donc de présenter l'ensemble des antigènes après internalisation, grâce à des phénomènes de migration au sein des organes lymphoïdes primaires, secondaires et même tertiaires. Ces structures, dédiées à la maturation et à la régulation du système immunitaire, permettent le dialogue nécessaire entre initiateurs et effecteurs de l'immunité. En contexte inflammatoire, de cause infectieuse ou tumorale, les DC sont responsables de

l'initiation des réponses cellulaires et humorales adaptatives. A l'inverse, dans un microenvironnement particulier, dont la définition varie grandement en fonction de l'organe dans lequel elles se trouvent, les DC initient des phénomènes de tolérance. Cette action tolérogène est d'ailleurs fondamentale pour garantir l'homéostasie de l'individu, comme l'atteste le développement d'auto-immunité parfois létale lors de la déplétion de ces cellules (Ohnmacht et al., 2009).

Le rôle des DC dans la tolérance s'opère principalement à deux niveaux et se caractérise par un dialogue privilégié avec les LyT (Figure 1). Le premier niveau d'interaction est illustré par la délétion, au sein du thymus, des clones lymphocytaires présentant une affinité forte pour des antigènes du soi. Cette tolérance centrale s'opère par des mécanismes d'apoptose en empêchant pour la majeure partie de ces clones lymphocytaires de pouvoir par la suite évoluer en périphérie et initier des réponses délétères. D'autre part, ces DC sont également essentielles dans la génération de Treg, cellules qui reconnaissent, elles aussi, des antigènes du soi mais qui exercent à l'inverse une modulation des réponses immunitaires en périphérie. Ces mécanismes ne peuvent néanmoins pas permettre de se dispenser d'une tolérance périphérique. Ce deuxième niveau de tolérance est caractérisé en premier lieu par des phénomènes d''apoptose induite après une activation (Chen et al., 2006). Deuxièmement, des phénomènes d'anergie caractérisés par l'absence de réactivité des LyT sont retrouvés (Mahnke et al., 2002). Ce mécanisme serait déclenché par la régulation de l'expression de l'un ou de l'autre des deux signaux essentiels pour permettre l'activation des LyT. Le premier signal est fourni par la liaison entre le récepteur cellulaire T (TCR) avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présentant un peptide. Le deuxième est issu de la fixation de molécules de costimulation présentes sur les DC et les LyT. Le dernier mécanisme, également décrit en périphérie, est celui de l'induction de LyT présentant des fonctions suppressives et classiquement dénommés Treg (Sakaguchi et al., 2008). Au sein de cette catégorie de cellules, on retrouve les Treg exprimant le Foxp3+, les Treg sécrétant de fortes quantités d'IL-10 dénommés Th1 ou encore les LyT dits Th3 et caractérisés par une forte production de « transforming growth factor β » (TGF-β).

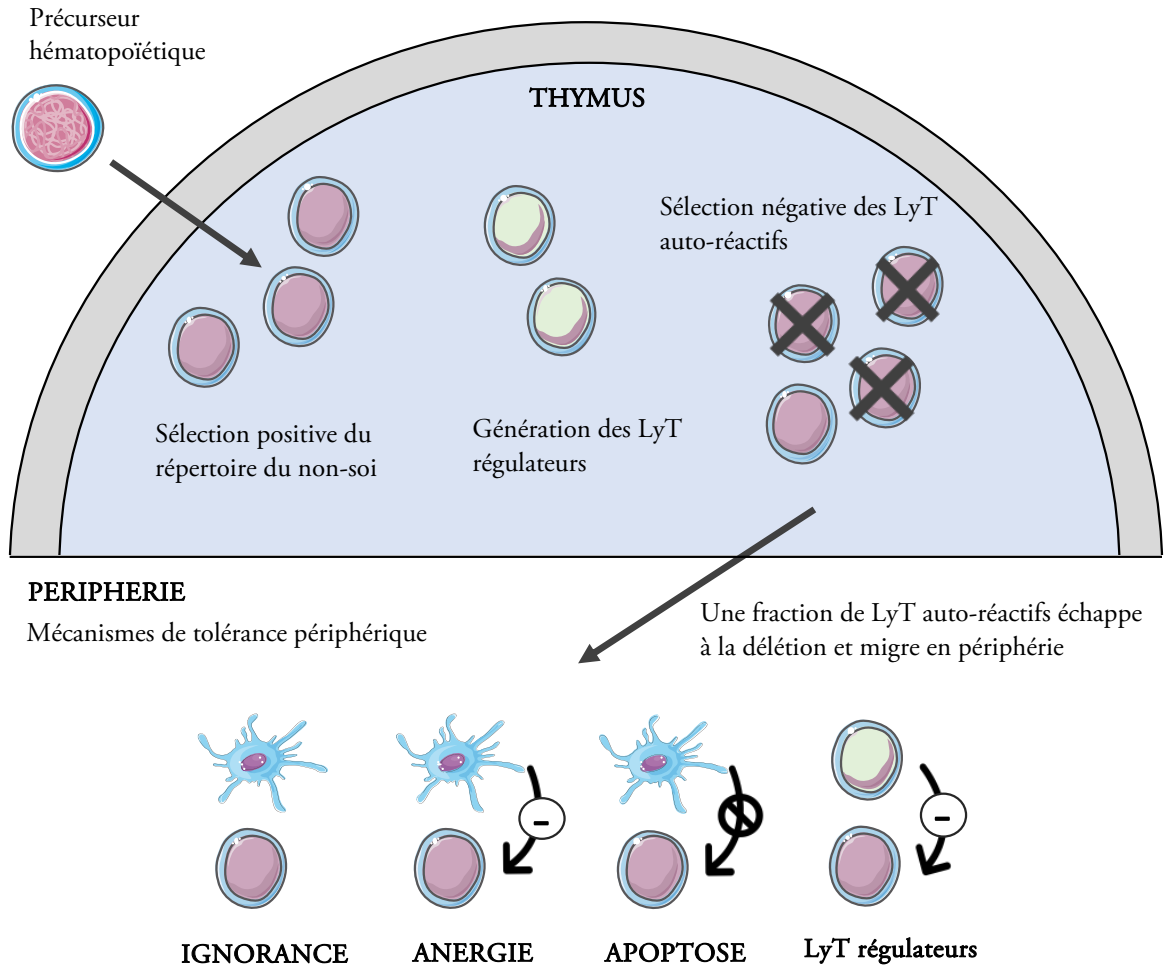


Figure 1. Mécanismes de tolérance centrale et périphérique des lymphocytes T. Au niveau central, la tolérance s'opère par la sélection positive des clones T réagissant contre des antigènes exogènes, l'élimination de clones lymphocytaires T autoréactifs ainsi que par la génération de clones T régulateurs (Treg). En périphérie, l'ignorance, l'anergie, l'apoptose et l'induction de Treg contribuent au contrôle de l'auto-immunité. D'après Walker L.S.K & Abbas A.K. *Nature Reviews Immunology* (2002).

1.2. Cellules dendritiques et pathologies auto-immunes

De nombreux arguments sont aujourd'hui disponibles pour effectuer le lien entre DC et auto-immunité. En effet, si leur rôle dans la tolérance est clairement démontré (Audiger et al., 2017), il est relativement simple d'émettre l'hypothèse que ces cellules sont également impliquées dans les processus d'auto-immunité. D'ailleurs, la présence de DC au niveau des sites tissulaires caractérisés par une inflammation dans les pathologies auto-immunes (*e.g* polyarthrite rhumatoïde (PR) et sclérose en plaques (SEP)) renforce l'idée de ce rôle primordial et continu dans la physiopathologie (Nuyts et al., 2013; Yu and Langridge, 2017).

Les manifestations auto-immunes sont reliées aux DC par des mécanismes principalement cellulaires et accessoirement moléculaires. Au sein des mécanismes cellulaires, les défauts fonctionnels impliquant les DC dans l'établissement des tolérances centrale et périphérique sont les premiers mécanismes identifiés dans les désordres immunitaires et notamment la diminution de production de molécules tolérogènes comme l'IL-10 et le TGF-β. En deuxième lieu, nous retrouvons la capacité de forte présentation d'autoantigènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires ou encore la promotion de la génération de structures lymphoïdes *in situ*. Ce mécanisme est particulièrement impliqué dans les processus de diabète auto-immun (DT1) au sein du pancréas (Ludewig et al., 1998; Sagar et al., 2012). Les environnements cytokinique et cellulaire responsables de cette présentation antigénique forte au niveau tissulaire restent encore peu décrits à l'heure actuelle, mais des particularités génétiques, influençant notamment la présentation de certains peptides du soi par des cellules dendritiques sentinelles, sont soulignées. L'importance de la dose de l'autoantigène ou de l'allergène est un autre mécanisme fréquemment avancé. En effet, les autoantigènes, en conditions non pathologiques, sont en permanence présentés par les APC mais à de faibles niveaux et en l'absence de signaux moléculaires activateurs (molécules de costimulation), ce qui ne permet pas d'activer les LyT. Cette notion sera développée par la suite, dans l'étude plus précise des points de contrôle immunitaires. Au-delà d'une certaine limite, la barrière de la tolérance serait rompue permettant l'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre ces autoantigènes. Là encore, aucune étude ne démontre clairement la véracité de cette hypothèse, mais plusieurs observations *in vitro* étayent cette théorie (Ludewig et al., 2001). Enfin, le dernier mécanisme cellulaire avancé est celui d'une présentation d'antigènes exogènes à la suite d'une infection bactérienne, virale ou fongique, avec la possibilité d'activation « bystander » des LyT. Cette activation non spécifique s'effectuerait par l'intermédiaire de la reconnaissance par le TCR de peptides du non-soi présentant des similarités structurales avec des antigènes du soi. De ce fait, les DC induiraient l'activation de ces LyT autoréactifs et participeraient en conséquence au développement de désordres immunitaires.

Concernant les mécanismes moléculaires, l'insuffisance ou l'absence d'expression de certains motifs comme par exemple des intégrines ou autres chimiokines nécessaires

pour le recrutement des Treg est avancée (Travis et al., 2007). Ces phénomènes peuvent d'ailleurs apparaître alors même que la capacité de sécrétion de cytokines tolérogènes est conservée. D'autre part, la production excessive de cytokines pro-inflammatoires, et en particulier le TNF-α, peut être extrêmement délétère au niveau de certains tissus sensibles comme par exemple les articulations dans la PR.

Ces mécanismes impliqués dans la tolérance ou dans l'auto-immunité sont potentiellement exercés par l'ensemble des DC. Néanmoins, certains sous types de cellules dendritiques semblent plus propices à l'instauration de la tolérance, donnant naissance à la définition de DC tolérogènes (tolDC). Toutefois, l'hétérogénéité à la fois dans le phénotype, la génération et la localisation des DC, contribue à la difficulté d'identification de ces acteurs. De ce fait, énoncer une définition claire de ces tolDC reste toujours à l'heure actuelle relativement complexe. En réalité, les tolDC sont plus qu'une sous-population de DC exprimant un ensemble de marqueurs, mais vraisemblablement des cellules caractérisées par leur fonction et leur profil de sécrétion cytokinique permettant d'initier des réponses tolérogènes.

1.3. Caractérisation des cellules dendritiques tolérogènes (tolDC)

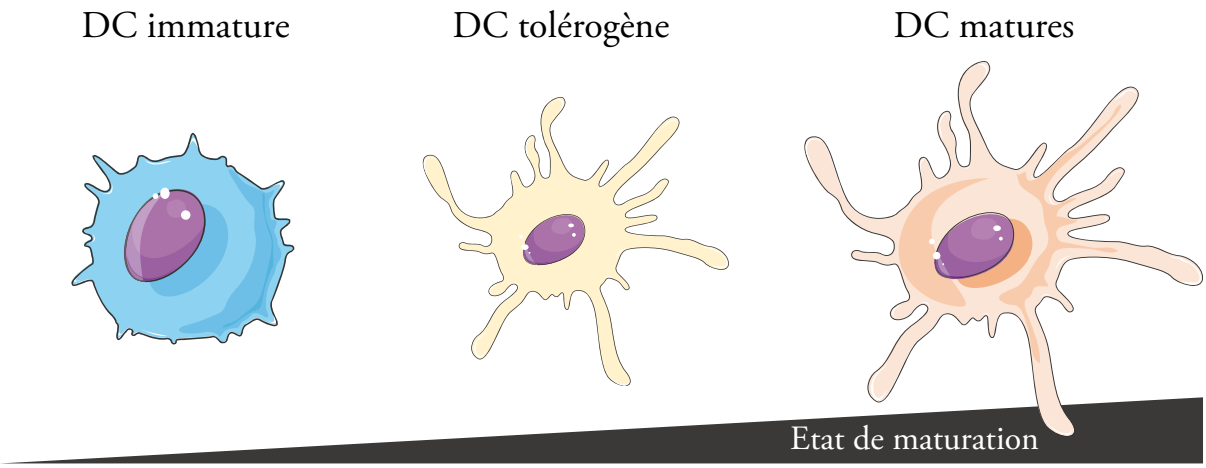
La définition de DC tolérogènes a donc nécessité de nombreuses recherches et à l'heure actuelle aucun consensus n'est réellement établi pour les définir, d'autant plus que de nombreux agents ou techniques sont disponibles pour les générer. Néanmoins, les DC immatures ou iDC sont fréquemment décrites comme des tolDC par excellence (Steinman et al., 2003). Cette définition ne peut se suffire à elle-même, d'une part car des iDC sont observées dans l'ensemble des DC qu'elles soient d'origine myéloïde ou plasmacytoïdes, et d'autre part car les iDC sont définies par leur état de maturation alors que des tolDC immatures et matures sont présentes chez l'Homme.

Un des premiers mécanismes avancés pour expliquer la capacité des iDC à induire la tolérance est de présenter de manière traditionnelle un antigène en l'absence d'un fort niveau d'expression des molécules de costimulation telles que le CD80 et le CD86. Cette

particularité engendre au sein du LyT le premier signal d'activation issu du TCR et du CD3, mais l'absence de signal de costimulation classiquement délivré par le CD28 empêche l'activation complète de la cellule. De ce fait, le LyT se retrouve classiquement en état anergique ; état défini par la réfraction aux stimulations antigéniques ultérieures mais réversible par l'interleukine-2 (IL-2). Cependant ce mécanisme ne semble pas suffisant à lui tout seul car des DC maintenues en culture et mises en présence de TNF-α ou d'interféron-γ (IFN-γ) présentent d'importants niveaux d'expression des molécules CD80 et CD86 tout en permettant l'induction préférentielle de Treg (Wang et al., 2006). D'autre part, la capacité des tolDC d'induire la tolérance au niveau des organes lymphoïdes secondaires requiert l'expression de certains récepteurs aux chimiokines comme le CCR7. Ce récepteur permettant de lier les chimiokines CCL19 et CCL21 est classiquement exprimé après maturation des DC. Ce phénomène de migration et d'induction de tolérance périphérique est d'ailleurs mis fréquemment en lumière dans des études de tolérance orale aux allergènes où l'absence de CCR7 déclenche la prolifération importante de cellules spécifiques de l'allergène avec des manifestations allergiques localisées et systémiques (Jang et al., 2006; Worbs et al., 2006).

D'autres équipes décrivent les tolDC comme un état intermédiaire entre les iDC et les DC matures (mDC), leur permettant d'exprimer des niveaux modérés de CD80 et CD86 tout en étant capables de migrer à souhait au niveau des organes lymphoïdes secondaires après avoir pris en charge les antigènes et d'initier les réponses tolérogènes au sein de ces structures (Flórez-Grau et al., 2018)(Figure 2). Ce statut intermédiaire de maturation est notamment retrouvé dans le cadre d'induction de tolDC par l'usage de divers agents pharmacologiques. Ces cellules présentent là encore une expression intermédiaire des molécules de costimulation ainsi que des marqueurs de maturation CD83 et CD40. Elles sont en revanche caractérisées par une forte production et sécrétion d'interleukine-10 (IL-10), une des cytokines tolérogènes avec un rôle majeur sur de nombreux effecteurs. Par ailleurs, ces cellules produisent de fortes quantités de TGF-β (Maldonado and Andrian, 2010), la molécule majoritairement identifiée dans la génération au niveau périphérique de Treg exprimant le facteur « forkhead box protein 3 » (Foxp3). En termes de particularités transcriptomiques, plusieurs études ont permis de comparer ces tolDC induites avec les différents sous types de DC classiquement

décrits. On observe que l'activité transcriptionnelle est très fortement dépendante de l'agent utilisé pour induire ces tolDC et qu'elle ne permet de pas de définir un ensemble homogène de tolDC partageant des caractéristiques majeures avec un seul sous-groupe de DC (García-González et al., 2017; Sim et al., 2016) .



CD80	+	++	+++
CD86	++	++	+++
CD83	+	++	+++
MHC-II	++	++	+++
CD40	+	++	+++
IL-12	+/-	+	+++
IL-23	+/-	+	+++
IL-10	+/-	+++	+/-

Figure 2. Les DC tolérogènes présentent un phénotype distinct des DC matures ou immatures. Les DC tolérogènes caractérisées par une expression intermédiaire des molécules de costimulation CD80, CD86, CD83 et des molécules de présentation antigénique de classe II et du marqueur de maturation CD40. La sécrétion importante d'interleukine-10 associée à une sécrétion faible d'IL-12 et d'IL-23 complète la définition de ces cellules. D'après Florez-Grau G. *et al. Frontiers in Immunology* (2018).

1.4. Les cellules dendritiques tolérogènes *in situ*

De la même manière qu'il est difficile de définir le phénotype de la cellule dendritique tolérogène par excellence, il est extrêmement compliqué d'identifier les tolDC opérant *in situ* que ce soit au niveau systémique comme tissulaire. Il est important de rappeler que ces cellules sont très hétérogènes et se localisent dans de multiples sites.

D'autre part, en fonction des signaux micro-environnementaux, elles sont capables grâce à leur plasticité phénotypique d'initier tout autant des réponses immunitaires fortes que d'induire une tolérance durable.

1.4.1. Les cellules dendritiques circulantes

Les cellules dendritiques circulantes sont classiquement catégorisées chez l'homme et la souris en fonction de leur provenance. On décrit d'un côté les cellules myéloïdes avec au sein de cette classe, les cellules renommées cDC1 et cDC2 chez la souris, et d'autres part les DC plasmacytoïdes.

1.4.1.1. Cellules dendritiques myéloïdes

Chez la souris, les cDC1 correspondent aux DC conventionnelles exprimant le CD8 mais très peu le CD11b et représentent environ 20% des DC dans la rate. Très peu de données sont disponibles chez l'Homme sur un potentiel rôle tolérogène de ces cellules au niveau systémique. Néanmoins, une étude souligne un possible rôle dans la génération de Treg (Chu et al., 2012) en utilisant des DC générées *in vitro* et présentant ce phénotype. Les cDC2 chez la souris correspondent aux 80% de cellules restant dans la rate et qui n'expriment pas le CD8. De manière globale, ces cellules sont caractérisées par le phénotype suivant CD11c+ CMH-II+ CD45RloCD8alpha- et CD11b+ (Shortman and Heath, 2010). En termes de tolérance et de la même manière que les cDC1, peu de données sont disponibles sur les cDC2 au niveau systémique. Cependant, elle pourraient participer à la délétion des clones autoréactifs CD4+ (Proietto et al., 2008).

1.4.1.2. Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ont été caractérisées pour la première fois en 1999 chez la souris et sont définies par le phénotype $CD11c_{dim}$ $CD45RA_{hi}$ $CD45R_{hi}$, CD317+, $MHCII_{low}$, CD172+ et CD11b-. Un des rôles importants des pDC est celui de la tolérance. En effet, ces cellules présentent peu de capacités à induire l'activation cellulaire T même après activation et cette absence d'effet est en partie médiée par une faible présentation antigénique. De plus, ces cellules seraient capables d'induire la tolérance par l'intermédiaire de la production d'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO).

Cette enzyme catabolisant le tryptophane serait responsable de l'anergie lymphocytaire T et du recrutement de Treg. D'autres voies d'action pour initier la tolérance comme la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β sont également débattues. De plus, une équipe a démontré une co-localisation tissulaire entre les LyT et les pDC au niveau ganglionnaire, alors qu'une autre propose un modèle de transfert de présentation antigénique entre les pDC et les DC résidentes au niveau de ces mêmes ganglions. Ces différences mécanistiques pourraient être entre autres expliquées par l'hétérogénéité de ces pDC au niveau tissulaire. D'autre part, en contexte tumoral des pDC exprimant de fort niveau d'IDO sont retrouvées, et leur présence est corrélée avec une évolution clinique défavorable (Sisirak et al., 2012). Les travaux qui permettent de conclure sur le rôle des pDC se sont concentrés sur les conséquences d'une délétion des pDC par utilisation d'anticorps spécifique anti CD317. Cette déplétion induit des exacerbations dans des modèles murins d'allergie et entraine une rupture de tolérance dans un modèle de greffe cardiaque (de Heer et al., 2004; Ochando et al., 2006), ce qui assure le rôle de ces DC dans la génération d'une tolérance périphérique.

1.4.2. Les muqueuses, un site privilégié de la tolérance

Les cellules dendritiques des muqueuses représentent un intérêt certain dans la compréhension des maladies auto-immunes (MAI). En effet, ces cellules sont en première ligne pour prendre en charge des antigènes exogènes et initier les réponses immunitaires. De fait, ces cellules sont plus fréquemment décrites comme responsables d'une activation immunitaire qu'elle soit polarisée vers une immunité cellulaire (Th1) ou humorale (Th2). Néanmoins, des DC issues de muqueuses diverses (*e.g.* plaques de Peyer et *lamina propria* au niveau intestinal, épithélium pulmonaire) produisent de fortes quantités d'IL-10 tout en polarisant les réponses immunitaires vers un profil Th2 (Kelsall and Rescigno, 2004). L'hypothèse expliquant cette double fonction des DC mucosales serait de permettre une tolérance relative aux organismes commensaux situés au niveau des muqueuses en évitant toute immunité cellulaire. Les trois types de DC (cDC1, cDC2 et pDC) sont retrouvés au niveau de l'intestin. En premier lieu, les cDC2 induisent des Treg (Watchmaker et al., 2014), et la présence importante du CD5 à leur surface semble être corrélée avec le taux de Treg induits. Ces cDC2 expriment le CX3CR1 et induisent

une tolérance locale grâce à l'absence d'expression de CCR7 et donc leur incapacité de migrer dans les ganglions mésentériques (Schulz et al., 2009). A l'inverse, les cDC1 participent de leur côté à l'induction de Treg via la mise en jeu de l'acide rétinoïque (Coombes et al., 2007). Ces DC expriment majoritairement le CD103+, migrent au niveau de ces ganglions et permettent l'induction de tolérance de manière plus systémique.

La muqueuse orale est un site d'induction de tolérance privilégiée notamment aux aliments. L'étude de ce tissu révèle la présence de 4 types de cellules impliquées dans la tolérance (Hovav, 2014; Mascarell et al., 2008). Premièrement, des cellules de Langerhans minoritaires sont observées et leurs mécanismes d'action seront détaillés dans la description des cellules dendritiques de la peau. On retrouve également des DC CD11b+ CD11c+, des macrophages CD11b+ CD11c- et des pDC induisant le recrutement des Treg par l'expression de l'IFN-γ et de l'IL-10.

1.4.3. La tolérance initiée par la peau

Les DC de la peau sont d'une importance cruciale dans la tolérance immunitaire. De manière similaire aux DC de la muqueuse, elles sont situées au sein d'un tissu particulièrement exposé aux antigènes extérieurs ainsi qu'aux stimuli inflammatoires. D'autre part, la peau est le siège d'un renouvellement constant des kératinocytes et mélanocytes qui s'engagent dans un processus d'apoptose. Cette plasticité tissulaire est responsable d'une exposition forte aux composants cellulaires et membranaires de ces cellules et nécessite donc l'établissement d'une tolérance (Larregina and Falo, 2005) . Le rôle prépondérant de la peau est particulièrement illustré dans la physiopathologie de l'allergie alimentaire, car à la fois responsable des processus de sensibilisation (Johnston et al., 2014) et des processus de désensibilisation avec le traitement par immunothérapie épicutanée (Viaskin®, DBV Technologies) (Dioszeghy et al., 2018). Dans ce mécanisme, les cellules de Langerhans (LC) prennent une part très importante car elles sont situées au niveau de la couche la plus externe dénommée l'épiderme. Le processus par lequel ces cellules induisent une tolérance aux antigènes du soi demeure flou, néanmoins leur capacité de prise en charge des antigènes couplée à leur migration dans les ganglions lymphatiques en exprimant de faibles niveaux de molécules de costimulation semble primordial (Geissmann et al., 2002). D'autre part, les LC stimulent la production d'IL-10

et de TGF-β par la sécrétion d' « α-melanocyte stimulating hormone » (Grabbe et al., 1996) et pourraient également agir par l'intermédiaire d'IDO. De nombreux travaux complètent cette description de la tolérance par la découverte de l'implication de la vitamine D3 et du besoin d'activation par les rayons ultraviolets pour induire le recrutement de Treg (Mora et al., 2008). Cet effet est retrouvé après culture *in vitro* (Unger et al., 2009) sur des LC qui présentent toujours un phénotype plus proche de DC immatures que matures.

Au niveau du derme, des cellules dendritiques présentant une forte hétérogénéité phénotypique sont retrouvées. Leur fonction primaire demeure celle d'activer le système immunitaire et d'initier les réponses cellulaires mais surtout humorales par l'intermédiaire de la polarisation des LyT CD4+ naïfs en LyT folliculaires auxiliaires (Tfh) indispensables pour la maturation des LyB (Klechevsky et al., 2008). Cependant plusieurs revues de la littérature remettent en question les conditions d'induction ou de sélection des cellules dendritiques de la peau et posent l'hypothèse que la tolérance au niveau de cette interface pourrait être aussi bien induite par les LC que par les DC du derme.

L'étude des DC dans la tolérance présente de nombreuses contraintes pour la compréhension globale des processus. L'hétérogénéité phénotypique forte de ces cellules et la difficulté de pouvoir les isoler et les cultiver de manière simple sont les principales limitations. Malgré ces défis, leur rôle essentiel reste incontestable que l'on s'attache à regarder la tolérance centrale ou périphérique. De manière indépendante du phénotype, ces cellules exercent leurs fonctions régulatrices à la fois par leur modulation des signaux d'activation, leur sécrétion cytokinique et leurs capacités de migration et de présentation. Les particularités tissulaires renforcent malheureusement la complexité du système, cependant le point commun de toutes ces cellules reste leur capacité à induire efficacement des cellules régulatrices avec en chef de file les Treg. Ces cellules régulatrices constituent donc, de fait, le deuxième acteur clé de la tolérance immunitaire.

2. Les lymphocytes T régulateurs

En faisant écho à l'ensemble des données publiées à ce jour dans le domaine de la tolérance, les Treg indépendamment de leur phénotype prennent une part considérable dans les mécanismes immunitaires clés de la tolérance. Dès le début des années 70, ces cellules LyT CD4+ ayant des propriétés immunosuppressives ont été mises en évidence. Ce domaine d'étude franchit un pas de géant en 1995 quand Shimon Sakaguchi démontre pour la première fois que des CD4+ exprimant le CD25 (ou récepteur α pour l'IL-2) sont des cellules clés dans la tolérance immunitaire (Sakaguchi et al., 1995). Ces travaux correspondent à la première description de ce que seront appelés par la suite les Treg au sens le plus couramment décrit. Par la suite, à nouveau l'équipe de Sakaguchi ainsi que l'équipe de Rudensky démontrent le lien entre le facteur nucléaire Foxp3 et les Treg par l'intermédiaire de l'étude des patients atteints du syndrôme IPEX et du parallèle chez la souris avec la souche « scurfy » (Fontenot et al., 2005; Hori et al., 2003). Simultanément, des cellules Foxp3- dénommées Tr1 et sécrétant de l'IL-10 ainsi que les LyT Th3 agissant de manière presque exclusive par l'intermédiaire du TGF-β seront décrites comme cellules suppressives. Depuis ces découvertes, la recherche ciblant les Treg à la fois dans le domaine de la cancérologie comme celui des MAI n'a cessé de mieux comprendre l'implication de ces cellules et de paver le chemin pour le développement de pistes thérapeutiques.

2.1. Les Treg Foxp3+

2.1.1. Caractérisation et rôle des Treg Foxp3+

Bien qu'il existe plusieurs types de Treg Foxp3+ comprenant les Treg CD4+, CD8+ ou encore possédant un TCRγδ, nous ne détaillerons ici que les Treg CD4+ Foxp3+ qui sont les principaux représentants de cette classe de cellules régulatrices. Ces cellules, exprimant le facteur Foxp3+, sont des cellules caractérisées par des marqueurs clairs, même si chez la souris, leur identification est plus simple que chez l'homme. Ces cellules sont CD4+, $CD45RB_{low}$ et expriment le CD25 qui est la chaine α du récepteur à l'interleukine-2. En association à la chaine β (CD122) et à la chaine γ (CD132), le CD25 confère au Treg un récepteur avec une forte affinité alors même que le récepteur uniquement composé du CD25 ne possède qu'une faible affinité. Cette particularité phénotypique leur permet d'être particulièrement sensibles à l'IL-2 même administrée à faible dose, ce qui ouvre un champ thérapeutique extrêmement vaste pour l'utilisation de cette cytokine en tant que thérapie immunorégulatrice (Klatzmann and Abbas, 2015). Néanmoins, la dynamique des Treg sous IL-2 propre à chaque espèce ainsi que les variations individuelles en complexifient l'utilisation standardisée à des doses fixes (Churlaud et al., 2018) (Article n°2). Chez l'homme, à l'inverse des souris élevées en conditions exemptes de pathogènes spécifiques, on retrouve plus de LyT CD4+ exprimant le CD25 sans être pour autant des Treg, ce qui est très probablement la conséquence d'une exposition constante à des stimulus environnementaux. Néanmoins, le Foxp3 ainsi que l'absence d'expression du récepteur à l'interleukine-7 (CD127) restent des outils efficaces afin d'identifier et d'isoler les Treg chez l'homme. Les Treg Foxp3+ sont générés en premier lieu lors des phases de sélection clonale au sein du thymus et vont par la suite migrer en périphérie pour exercer leur fonction régulatrice. En dehors de ce mécanisme, les Treg FOPX3+ peuvent être également induits en périphérie à partir de LyT CD4+ naïfs par l'intermédiaire d'une faible exposition à un antigène ainsi que de la présence dans le microenvironnement d'IL-2 et de TGF-β.

Le développement de désordres immunitaires qu'il s'agisse de MAI ou d'allergie est fortement régulé par le rôle des Treg et plus particulièrement la balance entre les LyT effecteurs (Teff) et les Treg. En effet, on retrouve fréquemment une dérégulation de

cette balance dans des MAI systémiques ou dans le diabète (Long et al., 2010). D'autre part, la restauration de l'équilibre Teff/Treg permet une amélioration clinique certaine par exemple dans l'arthrite ou l'allergie (Morgan et al., 2005; Yamashita et al., 2012). De manière globale, ce déséquilibre peut être acquis soit par leur perte de fonction suppressive, soit par la diminution du nombre de Treg. C'est notamment le cas dans le syndrome IPEX avec l'absence d'expression de Foxp3 qui est essentiel pour le maintien de l'expression du CD25, du CTLA-4 ou encore de GITR (Hori et al., 2003). La délétion de ces cellules est également impliquée dans la perte de tolérance orale avec pour conséquence l'établissement d'une forte immunité de type Th2 et spécifique aux allergènes (Hadis et al., 2011). Concernant la perte de fonction suppressive, elle est retrouvée dans de nombreuses pathologies chez l'homme (*e.g.* DT1, SEP, PR, psoriasis). Néanmoins sa mise en évidence reste compliquée car elle s'effectue exclusivement par des cultures *in vitro* et ne constitue pas toujours le reflet de ce qui s'opère chez l'individu.

2.1.2. Mécanismes d'action des Treg Foxp3+

Les Treg Foxp3+ agissent par de multiples différences à la différence des autres populations de Treg (Figure 3). Cette polyvalence d'action leur permet d'agir à leur guise sur des effecteurs variés tout comme de modifier l'amplitude des réponses immunitaires à la base par leur action sur les DC.

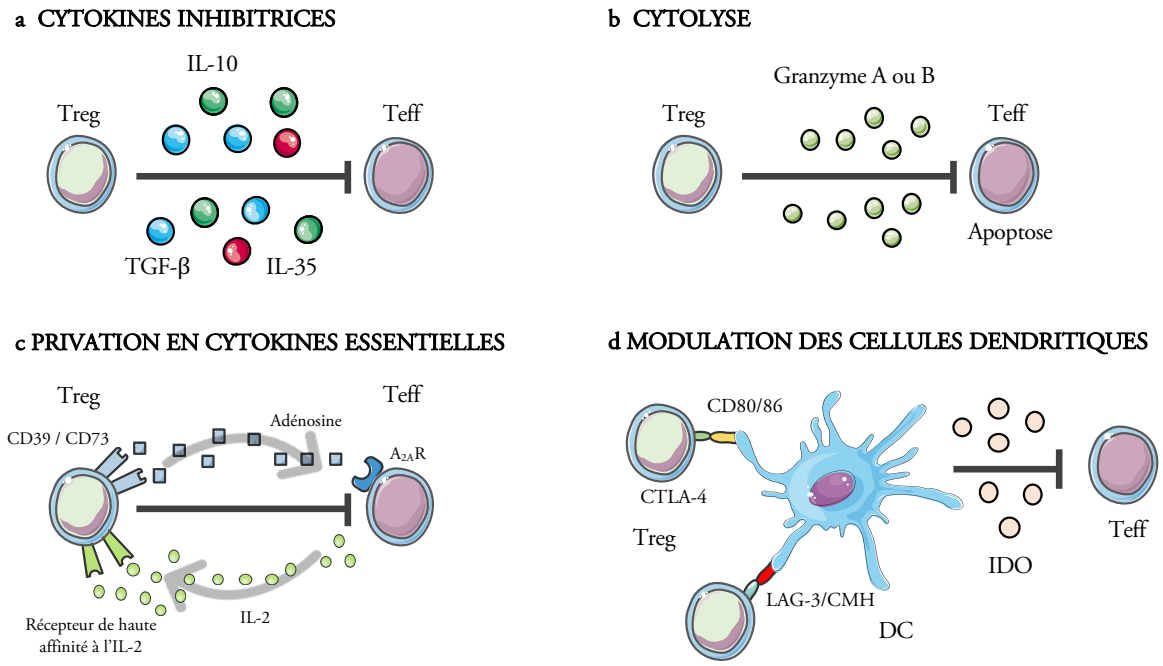


Figure 3. Les mécanismes d'action des Treg. a) Les Treg agissent de manière paracrine avec la sécrétion de TGF-β, d'IL-10 et d'IL-35. b) Les Treg possèdent une capacité cytolitique médiée par la sécrétion de granzymes de type A ou B. c) La captation de l'Il-2 dans le milieu par l'intermédiaire du récepteur de haute affinité, associée à la production d'adénosine induisent une anergie des Teff. d) Les Treg exercent une modulation des DC par l'intermédiaire de LAG-3 et du CTLA-4. Cette modulation induit la sécrétion de l'enzyme IDO et *in fine* l'anergie des Teff. D'après Vignaly A. *et al. Nature Reviews Immunology* (2008).

2.1.2.1. Production de cytokines inhibitrices

Lorsque l'on regarde les Treg Foxp3+ thymiques, le rôle de l'IL-10 et du TGF-β dans leur efficacité suppressive semble mineur. En effet, dans des expériences *in vitro,* on observe une suppression maintenue même après déplétion de ces cytokines par utilisation d'anticorps spécifiques ou en utilisant des cellules incapables de produire ces cytokines (Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001). A l'inverse, des expériences *in vivo* en contexte pathologique, semblent démontrer que ces deux cytokines restent indispensables dans l'activité des Treg (Hawrylowicz and O'Garra, 2005; Joetham et al., 2007). Ces observations effectuées dans le contexte de l'asthme allergique démontrent néanmoins que ce mécanisme ne peut se suffire pour induire une tolérance efficace. En effet, le transfert adoptif de Treg déficients pour l'IL-10 ne permet pas d'abroger l'effet protecteur. En définitive, ces données supportent donc un rôle paracrine de l'IL-10 sur les Treg Foxp3+ pour leur permettre de contrôler l'allergie et des recherches ultérieures

ont démontré que ces Treg ne produisaient pas eux même cette cytokine à un niveau suffisant pour être suppresseurs (Rubtsov et al., 2008).

Le rôle du TGF-β demeure flou en partie à cause de sa présence sous deux formes : à la fois membranaire et soluble. Sous forme soluble, le TGF-β est impliqué à la fois dans le développement des Treg induits mais aussi dans le maintien de leur fonction suppressive. A l'inverse, sous forme membranaire, le TGF-β n'exerce pas ce rôle (Piccirillo et al., 2002) mais permet un contrôle direct des LyT CD8+ infiltrants le pancréas dans le diabète (Green et al., 2003). De plus, on retrouve le TGF-β à nouveau sous forme membranaire dans des exosomes en contexte tumoral avec un rôle dans l'accroissement des propriétés immunosuppressives des Treg. En définitive, cette molécule, quelle que soit sa forme, reste majeure dans l'action des Treg.

En dernier lieu, l'IL-35 semble elle aussi jouer un rôle dans la prolifération et le maintien des fonctions suppressives des Treg (Collison et al., 2007). Cette cytokine est un membre de la famille de l'IL-12. Néanmoins, on remarque un manque important de recherches évaluant cette cytokine en conditions pathologiques et il n'est pas retrouvé d'action sur les Treg issus de l'Homme (Bardel et al., 2008).

2.1.2.2. Cytolyse

Loin d'être l'apanage seul des cellules cytotoxiques comme les NK ou les LyT CD8+ cytotoxiques (CTL), les Treg sont également décrits comme doués d'une capacité de cytolyse avec la présence de granules de granzyme A, de granzyme B et de perforine qui peuvent être relargués suite à la fixation du CD18 (Grossman et al., 2004). Ces mécanismes de cytolyse sont mis en jeu notamment dans la suppression de l'activité cellulaire des LyB ainsi que des NK et CTL et en particulier dans un contexte tumoral (Vignali et al., 2008).

2.1.2.3. Privation en cytokines essentielles

Un des premiers rôle des Treg avancés après leur identification était de pouvoir capturer l'IL-2 grâce à leur très forte expression membranaire du CD25 (Thornton and Shevach, 1998). Cette observation précoce fut confirmée en 2007 (Pandiyan et al., 2007) où la privation en IL-2 dans le milieu est identifiée comme responsable de l'apoptose des LyT effecteurs (Teff), puis partiellement infirmée en avançant que ce mécanisme ne peut suffire à lui seul (Oberle et al., 2007). En dehors de ce mécanisme historique, on reporte également l'implication d'une voie médiée par l'adénosine et les ectoenzymes CD39 et CD73. L'adénosine permettrait de supprimer les Teff à travers le récepteur adénosine 2A mais également d'induire plus de Treg par diminution de sécrétion d'IL-6 et hausse du TGF-β (Deaglio et al., 2007).

2.1.2.4. Action sur les cellules dendritiques

Les interactions entre les Treg et les DC sont au cœur des modulations essentielles de l'activité immunitaire. Dans ce cadre, le CTLA-4 prend une part importante dans ce dialogue. Cette molécule fortement exprimée par les Treg permet une action primaire sur les DC par la liaison aux molécules de costimulation CD80 et CD86 en empêchant l'activation médiée par le CD28. Cette liaison est également responsable de modifications enzymatiques au sein du microenvironnement de la DC. De la même manière, LAG-3 joue un rôle sur les DC en bloquant leur maturation. L'ensemble de ces moyens d'action sera détaillé plus précisément dans la description des points de contrôle immunitaires.

2.2. Les Treg sécréteurs d'interleukine-10 (Tr1)

Les cellules Tr1 sont décrites pour la première fois en 1997, dans les travaux de Maria Grazia Roncarolo, comme des LyT CD4+ capables de supprimer des réponses antigènes spécifiques et n'exprimant pas le Foxp3 (Groux et al., 1997). Ces cellules étaient à l'époque majoritairement caractérisées par leur sécrétion cytokinique propre, puis à la suite d'un consensus international, par le phénotype CD4+ CD49b+ LAG-3+ CD226- (Abbas et al., 2013). Ces cellules restent néanmoins caractérisées par une production

importante d'IL-10. En revanche, aucun facteur de transcription propre ne peut être associé à ces cellules malgré le fait que l'on retrouve une expression importante mais non spécifique du répresseur de GATA3 (ROG) à la fois chez l'homme et chez la souris (Cobbold et al., 2003).

2.2.1. Fonctions des Tr1

A la différence des Treg Foxp3+, les Tr1 ne sont pas ou peu retrouvés au niveau systémique et leur présence est conditionnée par la présence d'un antigène spécifique, ce qui en fait des acteurs importants de la régulation immune locale (Zeng et al., 2015). De ce fait, l'étude des Tr1 s'est faite principalement en contexte pathologique et a permis d'identifier quatre mécanismes d'action principaux. Premièrement les Tr1 suppriment les Teff et modulent les DC par leur sécrétion d'IL-10. Sur les DC, l'IL-10 induit l'augmentation de l'expression de transcrits comme l'« Immunoglobulin-Like Transcript » 3 et 4 (ILT3 & ILT4) ainsi que la diminution d'expression des molécules de costimulation et de présentation antigénique. Les trois autres mécanismes retrouvés sont quant à eux partagés avec les Treg. Le deuxième est la production ainsi que le relargage de granzyme B et de perforine lors de contacts avec les APC par l'intermédiaire entre autres du couple CD2 (LFA-2)/CD58 (LFA-3) (Magnani et al., 2011). Troisièmement, les Tr1 expriment les molécules CTLA-4, PD-1 et ICOS et peuvent donc moduler l'activation des LyT naïfs par l'intermédiaire des DC (Gregori et al., 2012). En dernier, les Tr1 expriment les CD39 et CD73 et de ce fait modulent l'adénosine tri-phosphate extracellulaire et induisent un microenvironnement appauvri pour les Teff (Schuler et al., 2014). Cette propriété n'est cependant retrouvée que dans un contexte tumoral.

2.2.2. Induction de Tr1

Plusieurs techniques sont disponibles pour induire ces Tr1 dans une visée thérapeutique et pouvoir exploiter leur capacité suppressive ainsi que leur propension à migrer au sein des tissus. Ces techniques sont majoritairement réalisées *in vitro*, car la génération de Tr1 *in vivo* semble extrêmement complexe à cause de la nécessité d'une multitude de cytokines et de signaux d'activation d'intensité appropriée. L'étape clé dans

la génération de ces cellules à partir de LyT CD4+ naïfs réside dans l'utilisation de certains sous-types de DC et particulièrement les iDC, les pDC ou les DC sécrétrices d'IL-10. Dans cette optique et que ce soit chez l'homme ou chez la souris, il est possible d'utiliser des DC cultivées avec de la vitamine D3 et de la dexaméthasone (Barrat et al., 2002).Une seule étude fait état de la génération de Tr1 à partir de LyT CD4+ naïfs sans l'aide d'APC mais requiert l'utilisation de vecteurs viraux conférant la capacité de production de doses importantes d'IL-10 (Andolfi et al., 2012). L'étude qui parait la plus intéressante sur la génération deTr1 est celle publiée en 2016 qui évalue la génération de ces cellules *in vivo* par l'utilisation de nanoparticules vectorisant des complexes CMH-II-peptides et de ce fait stimulant les cellules sans besoin de DC. Cette nanoparticule induit des cellules Tr1-like spécifiques de l'antigène, qui par la suite permettent de contrôler efficacement les manifestations auto-immunes dans différents modèles auto-immuns (encéphalomyélite expérimentale autoimmune (EAE), diabète, arthrite). Cette technique peut, par ailleurs, permettre de générer des Tr1-like spécifiques pour chaque antigène d'intérêt en créant les nanoparticules correspondantes (Clemente-Casares et al., 2016). En plus de contrôler les réponses cellulaires T, ces Tr1 sont également capables d'induire des LyB régulateurs (Breg) par l'intermédiaire de l'IL-10. Le rôle de ces Breg n'est pas clairement identifié mais reste cependant intéressant notamment dans des pathologies caractérisées par l'implication forte des immunoglobulines dans la pathologie. C'est notamment le cas dans l'allergie où ces Breg, par leur production d'IgG de type 4 contrôlent partiellement la réactivité aux allergènes.

2.3. Les Treg sécréteurs de TGF-β (Th3)

Les Treg polarisés vers un profil Th3 sont une population de cellules régulatrices très peu décrites en comparaison aux Treg Foxp3+ et aux Tr1. Ces cellules, identifiées pour la première fois au sein des ganglions mésentériques, sont impliquées dans la tolérance orale aux antigènes du soi (Chen et al., 1994). Par la suite, une meilleure caractérisation de ces cellules sera possible grâce aux travaux de recherche soulignant la dépendance au TGF-β pour leur action régulatrice et à l'expression membranaire en association avec le « latency-associated peptid » ou LAP à la surface de ces Th3 (Oida et al., 2003). Grâce à cette identification phénotypique claire (CD4+ CD25-LAP+), les Th3 sont étudiés dans

plusieurs modèles de pathologies auto-immunes comme la colite ou l'EAE, qui est le parallèle murin de la SEP. De manière intéressante, ces cellules sont retrouvées chez l'Homme à la fois en contexte physiologique (Gandhi et al., 2010) mais également en contexte tumoral (Scurr et al., 2014). Si en situation classique, ces cellules permettent un contrôle fin des réponses immunitaires, en contexte tumoral les Th3 sont clairement délétères avec même un rôle suppresseur supposé supérieur à celui des Treg. Il reste cependant une grande inconnue dans le mécanisme d'action des Th3, dans la mesure où la relation entre leur effet suppresseur et les Treg Foxp3+ n'est pas renseignée. En effet, le rôle majeur du TGF-β reste celui d'induire des Treg Foxp3+ à partir de LyT CD4+ naïfs. De plus, l'absence de facteurs de transcription identifiés pour les Th3, à la différence des Th1, Th2 et Treg avec respectivement T-bet, GATA3 ou Foxp3, complexifie la caractérisation complète de ces cellules. C'est donc probablement pour l'ensemble de ces raisons, que les développements de vaccination tolérogénique détaillés par la suite se concentrent principalement sur l'induction de Treg Foxp3+ et Tr1.

Pour clore cette description des acteurs clés de la vaccination tolérogénique, il est important de rappeler les deux principaux maitres d'œuvre de la tolérance immunitaire que sont les DC et les Treg. Bien qu'il reste encore de nombreuses voies d'action encore non décrites, il est aisé de se rendre compte du rôle primordial des molécules de costimulation, des cytokines et autres molécules régulatrices modulées par les cellules dendritiques. De leur côté, les Treg s'appuient sur des mécanismes divers, à la fois par contact et à distance des cellules effectrices. Ce système complexe représente une voie d'action thérapeutique majeure pour la vaccination tolérogène. En effet, la majorité des développements spécifiques d'un antigène vont s'atteler à moduler les DC avec en ligne de mire une action sur les Treg.

Partie 2 : Les stratégies vaccinales tolérogènes

Le développement des stratégies vaccinales tolérogènes présente de fortes analogies avec la vaccination classique. Grâce aux développements des techniques de biologie moléculaire, d'ingénierie génétique, cellulaire et moléculaire et à l'amélioration des procédés de synthèse de biomatériaux, de nombreuses approches sont à ce jour disponibles. Cette diversité n'est cependant pas superflue, tant il est complexe d'arriver à induire un signal de tolérance spécifique d'un antigène ainsi que d'y adjoindre la notion de mémoire de la tolérance et donc d'un maintien à long terme. C'est avec la meilleure caractérisation de la physiopathologie de l'auto-immunité, de la mise en lumière des particularités propres à chaque maladie et l'identification des motifs incriminés que les débuts de la vaccination tolérogénique ont pu voir le jour. Ce besoin d'un effort considérable de caractérisation de l'ensemble des peptides impliqués dans chaque pathologie est encore aujourd'hui nécessaire mais l'utilisation de techniques d'analyse à large échelle, comme les « microarray » permet de multiplier les pistes thérapeutiques à investiguer.

1. Les premières approches avec les vaccins cellulaires et ADN

Parmi toutes les approches disponibles, la plus ancienne découle naturellement du développement des vaccins classiques et demeure celle de l'administration de LyT induits par l'EAE mais inactivés par irradiation ou traitement pharmacologique avec la mitomycine C (Ben-Nun et al., 1981). Cette approche permettait la génération de réponses immunitaires dirigées contre ces LyT spécifiques de l'antigène majeur impliqué dans l'EAE, la protéine basique de myéline (MBP), et en conséquence de diminuer la fréquence de ces clones délétères. Par la suite, la technique de vaccination par ADN nu fut utilisée en exploitant les propriétés inhérentes de transfection au sein de cellules. Dès 1996, un premier vaccin ADN est développé chez la souris à nouveau dans l'EAE (Waisman et al., 1996). L'objectif n'était plus d'augmenter les réponses immunitaires mais de préférentiellement réorienter les réponses médiées par les LyT Th1, considérées

comme délétères, en réponses humorales de profil Th2. De manière efficace, l'administration de ce plasmide, codant pour une région variable du TCR des LyT impliqués dans la physiopathologie de l'EAE chez la souris (domaine Vβ8.2), a permis une réduction importante de la sécrétion de cytokines de type Th1 (majoritairement l'IFN-γ). A l'inverse, une augmentation de la production de cytokines de type Th2, avec en tête de file l'IL-4, a été observée. Malheureusement, ce type de vaccination ADN ciblant directement les acteurs cellulaires impliqués s'est heurté très rapidement au challenge des réarrangements du récepteur cellulaire T au cours de la maladie mis en place pour échapper à la tolérance induite. D'autre part, l'efficacité demeurait partielle car l'EAE ne peut être seulement définie par le rôle des LyT Th1 et la diversité des réponses immunitaires fragilisait la protection. Par la suite, l'utilisation de vaccins ADN s'est préférentiellement concentrée sur l'utilisation de plasmides codant les antigènes du soi décrits dans la physiopathologie de la maladie en les associant avec des molécules modulant l'équilibre Th1/Th2 des LyT. Ces développements ont principalement évalué l'utilisation de l'IL-4 ou de motifs nucléotidiques de type CpG (Steinman, 2010). L'utilisation de ces vaccins ADN codant des antigènes du soi a permis de remettre en avant l'importance des DC et la nécessité d'un adressage effectif. En effet, à la différence des vaccins ciblant directement les effecteurs, l'efficacité de ces vaccins reste limitée si l'intégration au niveau des APC est faible, et cette intégration constitue une barrière pour l'utilisation de ces vaccins tels quels *in vivo*.

2. La génération de DC tolérogènes

Devant l'intérêt grandissant de l'utilisation de DC capables d'induire la tolérance, de nombreux protocoles ont été élaborés afin de générer ces DC. La grande majorité des travaux sur le sujet évalue l'utilisation de ces techniques de génération en association avec la présentation d'un peptide et en conséquence conférant une spécificité de tolérance. Néanmoins, certaines équipes ont pris le parti de s'orienter vers une génération de DC tolérogènes en l'absence d'une spécificité de présentation antigénique. Plusieurs techniques sont disponibles, avec en premier lieu l'utilisation d'agents pharmacologiques classiques, mais également l'utilisation de molécules biologiques, d'agents pathogènes ou encore l'utilisation de la thérapie génique (Tableau 1).

Agent modulateur	Modèle	Auto-antigen	Route of injection	Timing	Mécanisme d'action	Référence
Agents biologiques et pharmacologiques						
TNF-α	CIA	Collagène	IV	Prophylactique	Polarisation Th2	van Duivenvoorde *et al.* *Arthritis & Rheumatism*. 2004
	CIA	Collagène	IP	Prophylactique	Expansion des Tregs CD49b+	Charbonnier *et al.* *J Immunol*. 2006
	CIA	Collagène	SC	Prophylactique / Post-immunisation	Induction d'IL-10 et inhibition de l'IFNγ	Healy *et al.* *Open Rheumatol J*. 2008
IL-10	CIA	Collagène	SC	Thérapeutique	Induction de Treg FOXP3+	Lim *et al.* *Eur J Immunol*. 2009
	EAE	MOG	IV	Prophylactique	Induction de Treg sécréteurs d'IL-10	Menges *et al.* *J Exp Med*. 2002
	CIA	Collagène	IV	Prophylactique	Polarisation Th2	van Duivenvoorde *et al. J Immunol*. 2007
	IBD	Extrait d'entérobactéries	IP	Prophylactique	Production de cytokines anti-inflammatoires	Pedersen *et al.* *Immunology*. 2007
	Athérosclérose	ApoB100 humaine	IV	Prophylactique	Diminution de l'inflammation et de l'infiltrat lymphocytaire	Hermansson *et al.* *Circulation*. 2011
Dexaméthasone & Vit D3	CIA	Collagène	IV	Thérapeutique	Induction de Tregs sécréteurs d'IL-10 et inhibition des Th17	Stoop *et al.* *Arthritis Rheum*. 2010
Dexaméthasone & GM-CSF	AA	Extrait de *B. Tropicalis*	IV	Prophylactique	Induction de Tregs et baisse de la polarisation Th2	Aragão-França *et al.* *AAIR*. 2018
Thérapie génique						
IL-4	CIA	Non	IV, IP et SC	Post-immunisation	Polarisation Th2	Morita *et al.* *J Clin Invest*. 2001
	CIA	Non	IV	Thérapeutique	Polarisation Th2	Kim *et al.* *J Immunol*. 2001
IL-10	EAE	Non	IP	Thérapeutique	Induction de Treg FOXP3+	Matsuda *et al.* *Invest Ophtalmol Vis Sci*. 2012
TGF-β	IBD	Non	IP	Thérapeutique	Induction de Tregs	Cai *et al.* *Cell Mol Immunol*. 2010
IDO	CIA	Non	IV	Thérapeutique	Activation des Tregs	Bianco *et al.* *Arthritis Rheum*. 2007
CTLA-4	CIA	Non	IV	Thérapeutique	Activation des Tregs	Bianco *et al.* *Arthritis Rheum*. 2007
Probiotiques & parasites						
Schistosoma Japonicum					Induction de Tregs	Wang *et al.* *Eur J Immunol*. 2009
Candida Albicans					Induction de Tregs	Bonifaz *et al.* *Mucosal Immunol* 2009
Helminthes	CIA	Non	IV	Thérapeutique	Induction de Treg FOXP3+	Carranza *et al.* *PLoS One*. 2012

CIA : Arthrite induite au collagène
EAE : Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
IBD : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
AA : Asthme Allergique

Tableau 1. Modalités de génération des DC tolérogènes. La génération des DC tolérogènes peut nécessiter l'usage d'agents biologiques et pharmacologiques, la thérapie génique ou encore l'utilisation de probiotiques et de parasites. Le potentiel tolérogène est par la suite évalué dans des modèles de désordres immunitaires en parallèle de l'identification des mécanismes d'induction de tolérance. D'après Van Brussel *et al. Autoimmunity Reviews* (2014).

2.1. Agents pharmacologiques

L'utilisation d'agents pharmacologiques présente l'avantage de pouvoir induire des tolDC de manière rapide et reproductible de par la simplicité d'utilisation et de caractérisation de ces molécules. La liste des molécules abordées par la suite n'est certes pas exhaustive mais se concentre sur les principales molécules utilisées par le passé et à l'heure actuelle pour générer ces cellules tolérogènes.

2.1.1. Vitamine D3

La vitamine D3 est classiquement utilisée dans les désordres métaboliques touchant l'homéostasie du calcium et des os. Sous forme active (1-25 dihydroxyvitamine D3), cette molécule peut aussi moduler les cellules dendritiques (Adorini and Penna, 2009; Szeles et al., 2009). En effet, en cultivant des DC et en ajoutant cette vitamine dans le milieu de culture, on retrouve un effet sur l'augmentation de la production d'IL-10 de manière concomitante avec une diminution de production de l'IL-12. Néanmoins, une des limitations de l'utilisation de la vitamine D3 réside dans le besoin important en TNFα à la fois sous forme soluble et membranaire pour la génération de Treg par les tolDC (Kleijwegt et al., 2010). Il apparaît donc essentiel de prendre en compte cette limitation chez les patients recevant des anti-TNFα avec un potentiel effet inhibiteur pour la génération de réponses tolérogènes.

2.1.2. Immunosuppresseurs

Les immunosuppresseurs sont classiquement utilisés dans de nombreuses pathologies inflammatoires ou auto-immunes. Les corticostéroïdes demeurent les premiers représentants de cette classe médicamenteuse et induisent une diminution générale de l'activité métabolique des acteurs de l'immunité. Cependant cette action reste généralisée et de nombreux effets secondaires sont observés à la fois à court terme et à long terme. Néanmoins, cet effet reste intéressant afin d'induire des tolDC car on retrouve une baisse d'expression du CD86 et de l'expression des molécules de CMH de classe II à la surface. Après coculture de LyT CD4+ naïfs en présence de ces tolDC induites, il est observé une diminution de la capacité d'activation des LyT sans atteinte de celle des Treg. Le mécanisme avancé serait celui d'une diminution générale du

métabolisme de ces DC avec une baisse de l'expression des molécules de co-stimulation. De plus, l'expression de CCR7 est maintenue à la surface des DC ce qui permet le maintien des capacités de migration dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans la classe des corticoïdes, la dexaméthasone demeure l'agent le plus couramment utilisé, cependant l'ensemble des recherches effectuées ne s'accorde pas sur l'efficacité de cet agent. En effet, certaines études démontrent une faible efficacité notamment par rapport à la vitamine D3 (Ferreira et al., 2012). A l'inverse, d'autres travaux démontrent une efficacité importante de la dexaméthasone avec des modifications transcriptionnelles caractéristiques (García-González et al., 2017). Bien que n'appartenant pas à la classe des immunosuppresseurs, la metformine, molécule utilisée en diabétologie pour permettre un contrôle modéré de la glycémie, a démontré son efficacité dans la génération de tolDC en modulant les voies métaboliques au même titre que la rapamycine (Sim et al., 2016).

2.1.3. Simvastatine

La simvastatine est un inhibiteur de l'enzyme HMG-CoA réductase utilisée couramment dans le traitement des hypercholestérolémies. Le mécanisme d'action par lequel cette molécule agirait sur les DC reste à l'heure actuelle peu décrit mais, de manière similaire aux corticostéroïdes, l'hypothèse d'une diminution du métabolisme général des DC reste la plus probable. Les effets observés après traitement de DC issues de patients atteints de sclérose en plaques sont une baisse de production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1b, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-21 et l'IL-23. Comme pour les corticostéroïdes, on retrouve également une augmentation de l'IL-10 (Zhang et al., 2013) ainsi qu'une baisse de l'expression des molécules de classe I et de costimulation (CD80 et CD86).

2.1.4. Aspirine

L'aspirine est une très ancienne molécule utilisée depuis l'antiquité avec une action sur le cycle des prostaglandines induisant entre autres une diminution de la fièvre, des processus de coagulation ou encore une baisse de la réactivité et de la capacité régulatrice des LyT. Lorsqu'elle est utilisée sur des DC, l'aspirine permet une baisse d'expression des molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86) ainsi qu'une augmentation du facteur « immunoglobulin-like-transcript-3 (ILT-3) (Buckland et al., 2006). Il en résulte une plus faible capacité d'activation des LyT naïfs sans diminution de l'induction de Treg Foxp3+. De plus, ces effets sont maintenus même après stimulation par LPS ou cytokines activatrices.

Plus récemment, des agents modulant les facteurs de transcription ont été utilisés avec en premier la modulation de la voie Nrf2 qui permet d'influencer sur la balance Th1,Th2 et Th17 (Wei et al., 2018). Ces modulations permettent une régulation fine de la sécrétion cytokinique des DC avec en finalité une possibilité d'augmentation de la production de l'IL-4, de l'IL-10 et du TGF-β mais également une baisse du TNF-α, de l'IFN-γ et de l'IL-12.

2.2. Agents biologiques

2.2.1. Interleukine-10 (IL-10)

L'utilisation de l'interleukine dans la génération de DC à partir de progéniteurs permet d'induire des iDC et permet une maturation faible des DC même en cas de stimulation. L'induction de ces iDC, également appelée DC-10, est réalisée par l'activation de cascades de signalisation intracellulaire médiées par JAK et phosphoSTAT3 qui permet la répression des gènes associés à la maturation des DC (Steinbrink et al., 1997). Grâce à ces modifications, ces DC sont efficaces dans le contrôle des réponses délétères dans plusieurs modèles pathologiques comme l'arthrite (Van Brussel et al., 2014; Comi et al., 2018).

2.2.2. Transforming Growth Factor β (TGF-β)

La biologie du TGF-β et de ses différentes isoformes (TGF-β1 à 4) demeure relativement complexe compte tenu des cibles variées et des nombreux acteurs intermédiaires. Dans ce contexte, l'activité de cette molécule sur les DC n'est pas fermement démontrée, mais une action par hétérodimérisation de Smad2, Smad4 et un recrutement de NF-κB est décrite, avec pour effet l'inhibition de la maturation des DC de la même manière que l'IL-10.

Les résultats les plus intéressants pour la génération de tolDC semblent cependant nécessiter l'utilisation simultanée de l'IL-10 et du TGF-β. En effet, même si l'utilisation de l'une ou de l'autre de ces molécules permet l'induction de LyT suppresseurs, la combinaison des deux permet une efficacité plus importante dans l'anergie induite chez des LyT (Torres-Aguilar et al., 2010a). Ces DC induites ont par la suite été testées en coculture avec des LyT mémoire spécifiques de l'insuline et issus de patients atteints de DT1. Les tolDC induites ont permis en premier lieu de réduire la prolifération des LyT mémoire de manière antigène spécifique. D'autre part, les LyT ayant proliféré présentaient un phénotype bien distinct avec une faible capacité de production de l'IL-2 et de l'IFN-γ mais à l'inverse une forte capacité de production de l'IL-10 (Torres-Aguilar et al., 2010b).

2.2.3. Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)

De manière contradictoire avec les observations faites chez l'Homme dans les MAI où le TNF-α est largement décrit comme contributeur dans la physiopathologie de ces maladies, cette cytokine peut être utilisée de manière bénéfique dans la génération de DC modifiées et de l'utilisation de ces dernières en contexte pathologique. En effet, plusieurs études démontrent l'intérêt de ces DC dans la modification de polarisation observée au niveau du compartiment des LyT. Dans un contexte d'arthrite au collagène, on retrouve une modification phénotypique des CD4+ vers un profil Th2 moins délétère dans cette pathologie (Van Duivenvoorde et al., 2004), une augmentation de la sécrétion d'IL-10 (Healy et al., 2008) ou encore l'expansion de Treg exprimant le CD49b (Charbonnier et al., 2006).

2.3. Thérapie génique

La thérapie génique représente une approche très intéressante dans la génération de tolDC. En effet, à la différence de l'induction de ces cellules par l'intermédiaire d'agents pharmacologiques ou biologiques, la thérapie génique permet théoriquement une expression stable du phénotype de ces tolDC après réinjection avec une visée curative à long terme. Malheureusement, les processus d'infection et de culture de ces DC limitent encore à l'heure actuelle l'utilisation à large échelle de ce type de technique. Au sein du concept de l'utilisation de thérapie génique, plusieurs techniques sont différentiables. Les premiers essais ont évalué l'ajout d'information génétique pour des molécules de tolérance. Dans ce cadre, l'IL-10, le CTLA-4, IDO ou encore le TGF-β ont été utilisés avec des résultats précliniques positifs majoritairement obtenus dans l'arthrite induite au collagène. Les mécanismes sous-jacents dans la protection obtenue sont identiques à ceux des DC générées par ces mêmes agents biologiques : une orientation de la polarisation des CD4+ vers un profil Th2 pour l'IL-4, une induction de Treg pour l'IL-10 et le TGF-β. IDO et le CTLA-4 semblent quant à eux jouer sur l'activation des Treg *in fine*.

L'utilisation de la thérapie génique permet d'autre part d'interférer sur le profil des DC par l'utilisation d'ARN sous différentes formes (miRNA ou siRNA). Dans ce cadre, des travaux intéressants dans l'allergie à l'ovalbumine ont évalué l'utilisation de miRNA (pour « microRNA ») comme le miR-23B qui accroissent les propriétés tolérogéniques par l'intermédiaire d'une inhibition de la voie Notch/NF-κB. On retrouve après traitement une diminution de l'expression des molécules de costimulation (CD80 et CD86) ainsi que celles de CMH-II (Zheng et al., 2012). Une autre approche très semblable est celle de l'utilisation de siRNA (pour « small interfering RNA ») afin de réduire directement la production d'une cytokine comme l'IL-12 ou une voie d'activation. Les limitations inhérentes à ce genre de technique restent entre autres la toxicité potentielle d'une telle inhibition à long terme, mais également la persistance de cet effet après réinjection chez l'individu.

2.4. Utilisation de microorganismes

L'utilisation de microorganismes et notamment certaines bactéries est grandissante de par les effets bénéfiques observés non seulement dans les pathologies liées au système digestif (Maladie de Crohn et Rectocolite hémorragique) mais également dans d'autres maladies systémiques comme le lupus où la composante du microbiote intestinal devient majeure. Dans cette optique, plusieurs travaux ont montré l'impact d'une coculture de bactéries et de DC ou d'une administration intra gastrique de ces bactéries dans l'induction de DC tolérogènes et de Treg. Ces effets sont observés aussi bien avec l'utilisation de parasites comme *Schistosoma* et de *Fasciola hepatica* mais également avec certaines levures comme *Candida albicans* (Van Brussel et al., 2014). D'autre part, le genre *lactobacillus* a été et reste largement utilisé avec une action à la fois sur le statut de maturation des DC (baisse de l'expression de CD80 et CD86) mais aussi par une augmentation de sécrétion de l'IL-10 (de Moreno de LeBlanc et al., 2011).

3. Les nanoparticules

Les nanoparticules (NP) qu'elles soient d'origine synthétique ou virale sont un outil de choix dans l'induction de tolérance, notamment grâce à une captation préférentielle par les APC (Irvine et al., 2013). Cette structure particulaire inférieure à 1 µm leur permet, d'une part de diffuser jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires mais également dans le foie et d'autre part d'être phagocytées par l'ensemble des APC. Le processus de présentation antigénique de ces NP répond aux mêmes lois que celui de la présentation des antigènes particulaires ou agrégés (Tostanoski and Jewell, 2017). De ce fait, l'utilisation de ces particules pour permettre une stimulation du TCR sans molécules de costimulation représente un moyen d'induction de tolérance très intéressant.

Cette approche a été utilisée d'une manière similaire avec l'administration de cellules exprimant un ou plusieurs antigènes par l'intermédiaire d'une liaison synthétique (Miller et al., 2007). L'action tolérogène ainsi obtenue peut être à la fois initiée directement par ces cellules artificiellement présentatrices mais aussi après l'apoptose et la prise en charge de ces cellules avec *in fine* une réorientation des réponses

immunitaires. Après plusieurs développements précliniques dans des modèles d'EAE, de transplantation ou d'allergie (Smarr et al., 2011), cette approche a été étudiée chez l'Homme dans un essai de phase I en 2013 (Lutterotti et al., 2013). L'injection de ces cellules combinées à 7 peptides identifiés comme pathogènes dans la SEP a permis de combiner une diminution des réponses cellulaires spécifiques des antigènes à une très bonne tolérance du traitement. Cette tolérance fut confirmée par la suite avec l'absence d'induction d'anticorps spécifiques dirigés contre ces antigènes présentés à la surface (Peschl et al., 2015).

A la suite de ces recherches évaluant le couplage antigène-cellule, de nombreux travaux ont exploité ces mécanismes d'induction de tolérance en utilisant des nanoparticules. D'une part, les NP peuvent être produites plus rapidement et facilement que la culture et la modification de cellules humaines. D'autre part, l'avantage de cet outil est la versatilité, avec la possibilité de vectoriser n'importe quel antigène à la surface ou au sein de la NP, mais également d'y adjoindre des composants tant pour augmenter les réponses que pour, à l'inverse, induire un signal de tolérance. Actuellement, très peu de développements de NP d'origine virale ont été ou sont en cours d'évaluation clinique. La description des développements et des approches qui va suivre s'attachera donc à décrire les NP synthétiques, tandis que les NP d'origine biologique seront abordées dans la discussion de ce manuscrit. Néanmoins, les approches décrites par la suite sont hypothétiquement transposables en tout point aux NP d'origine biologique et permettent d'évaluer le chemin parcouru dans ce domaine.

3.1. Le développement des NP synthétiques

Au cours du temps, plusieurs matériaux ont été successivement utilisés comme composants principaux des NP. Cet aspect structural demeure essentiel dans la production de ces NP, tant sur le plan de la sécurité d'utilisation que sur l'optimisation de la présentation antigénique. Les premières NP ont été produites en utilisant des métaux avec l'avantage de pouvoir combiner des antigènes, des ligands ou des agents thérapeutiques à la surface. Ces NP ont un profil de stabilité très important au cours du temps mais demeurent potentiellement toxiques. En effet, il est démontré une absence

de biodégradation au sein des organismes ce qui soulève la question de la toxicité à long terme de ce type de particules.

A la suite de ces NP métalliques, les propriétés naturelles des liposomes ont à leur tour été exploitées pour la génération de nouvelles NP. Leur structure permissive par la présence de cholestérol membranaire pour l'intégration de molécules dans la membrane fait de ces particules une option encore aujourd'hui utilisée et étudiée. Ces propriétés permettent également la création de zones de forte expression membranaire pour faciliter la prise en charge et la liaison aux cellules cibles (Macauley et al., 2013). L'autre avantage des liposomes est de pouvoir intégrer en leur sein un antigène qui sera relargué après endocytose dans le cytoplasme ou dans les vésicules lysosomales. Ces NP présentent néanmoins un inconvénient majeur qui est celui de la cinétique de relargage. Il existe très peu de données dans la littérature sur les cinétiques exactes de relargage au sein des cellules cibles des molécules embarquées. L'étude de ces processus apparait complexe en condition *in vivo,* et la réalisation de ces expériences *in vitro* est un biais non négligeable pour réaliser de telles études.

A l'heure actuelle, les NP les plus utilisées sont produites à partir de polymères synthétiques ou naturels. Au sein de cette catégorie, on peut citer entre autres l'acide polylactique (PLA), les polyacides lactiques-co-glycoliques (PLGA), le polystyrène, le dextran ou encore le chitosan. On préférera utiliser parmi ces différentes possibilités des polymères biodégradables afin d'éviter les risques de toxicité communs avec les NP métalliques. A la différence des liposomes, les NP de polymères créent une matrice emprisonnant l'antigène ou la molécule que l'on souhaite vectoriser. Il est donc possible d'embarquer sans distinction des molécules hydrophobes ou hydrophiles, la seule différence résidant dans la méthode de préparation de ces NP. L'avantage de ce type de NP réside dans la forte capacité à modifier le relargage des molécules en fonction du processus de préparation utilisé et de ce fait de connaître parfaitement la cinétique de ces particules (Gu et al., 2008).

Quel que soit le type de NP utilisé, plusieurs critères sont également à prendre en compte pour envisager leur usage dans l'induction d'une tolérance spécifique.

Premièrement la charge électrique est un critère non négligeable. En effet, les particules chargées positivement (cationiques) auront préférentiellement une visée pro-inflammatoire. A l'inverse, les particules chargées négativement (anioniques) auront une immunogénicité réduite et une circulation systémique plus importante. Dans la même optique, il est possible d'utiliser du polyéthylèneglycol (PEG) pour diminuer l'agrégation des NP entre elles ou avec les protéines sériques (Gref et al., 2000). Le deuxième critère à prendre en compte pour l'utilisation de ces particules est la taille de celles-ci et donc en conséquence le site d'injection. Il est fréquemment décrit que des NP de petite taille (< à 100 nm) diffusent plus largement au niveau systémique et dans la circulation lymphatique. A l'inverse, les NP de grande taille auront besoin d'une prise en charge préalable par les APS afin d'infiltrer les organes lymphoïdes secondaires. En dernier lieu, la combinaison de plusieurs molécules d'intérêt peut poser certains problèmes de compatibilité et d'agrégation avec les NP polymériques. Afin d'éviter ces complications, il est parfois préférable d'utiliser deux NP différentes et d'influencer sur le ratio entre celles-ci avant injection.

3.2. Approches thérapeutiques basées sur des NP

De la même manière qu'il existe plusieurs types de NP, il existe autant si ce n'est plus de types d'approches les utilisant pour induire une tolérance spécifique. Si certaines approches prennent le parti d'exploiter les processus tolérogènes préexistants, d'autres prennent le contre-pied et utilisent des agents immunorégulateurs pour arriver à contrôler les réponses délétères (Figure 4).

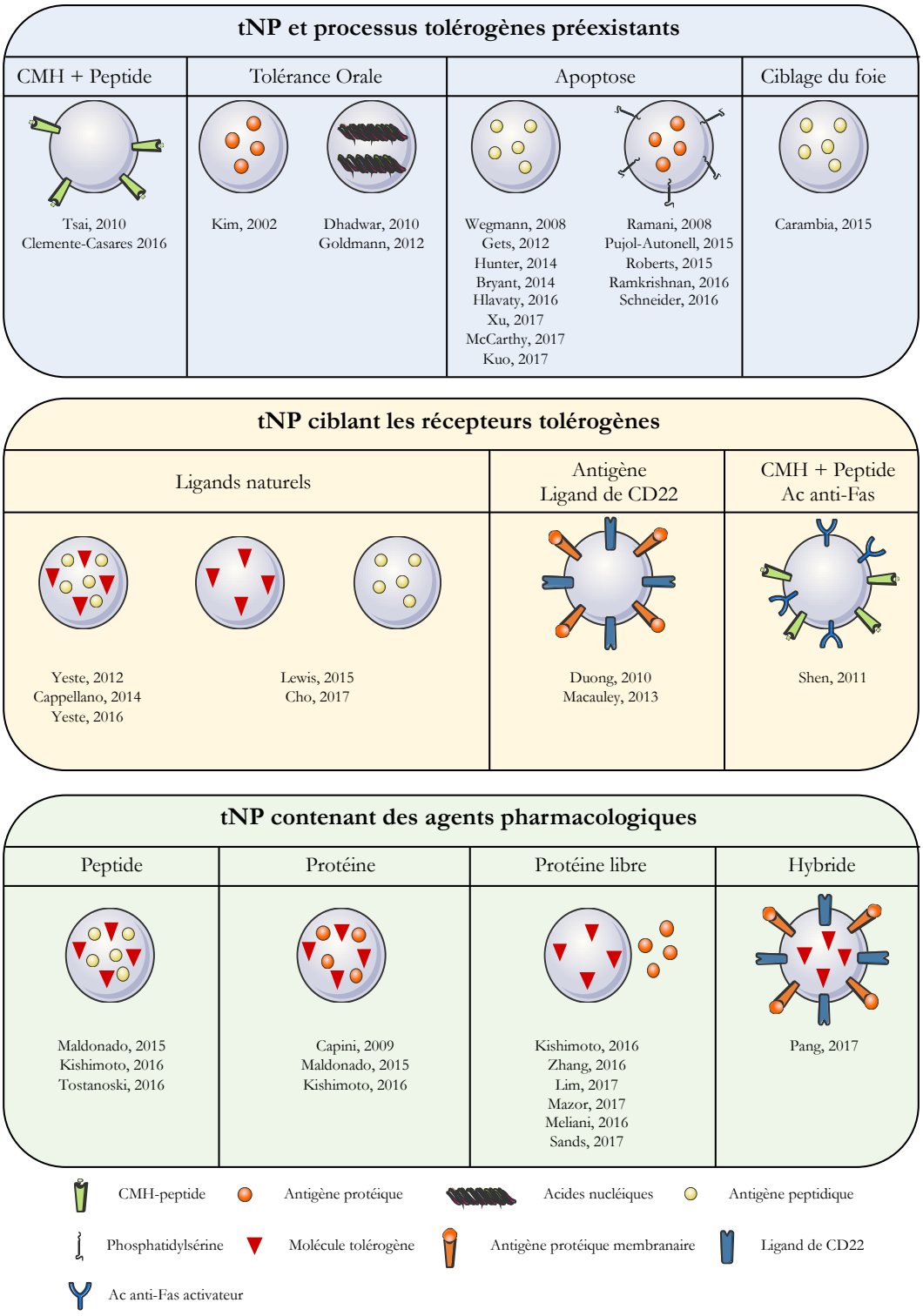


Figure 4. Développements thérapeutiques utilisant des nanoparticules d'origine synthétique. Trois principes d'utilisation des NP en vaccination tolérogène sont développés à l'heure actuelle : ceux exploitant les processus tolérogènes préexistants, ceux ciblant des récepteurs de la tolérance et enfin ceux utilisant des agents pharmacologiques. Au sein de ces trois classes, on retrouve des NP vectorisant des antigènes sous forme d'ADN, de protéines, de peptides ou associés aux molécules du CMH. La présence de protéines membranaires, telles que la phosphatidylsérine, des ligands de CD22 ou des Ac anti-Fas permet également de diversifier les mécanismes d'action. D'après Kishimoto T.K. et Maldonado R.A. *Frontiers in Immunology* (2018).

3.2.1. Approches exploitant les processus tolérogènes préexistants

3.2.1.1. tNP présentant un complexe CMH + peptide

Le concept de ce type de NP tolérogènes (tNP) est d'exploiter le principe qu'une présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe I ou II et sans molécules de costimulation permet d'induire la tolérance. Cette approche a été testée premièrement avec les molécules HLA de classe I afin de supprimer les LyT CD8+ autoréactifs et d'induire un phénotype anergique voire régulateur. Le phénotype obtenu pour ces LyT CD8+ semble d'ailleurs stable dans le temps avec l'établissement d'une protection lorsque l'on transfère ces cellules dans un modèle murin de diabète (NOD) (Tsai et al., 2010). La même équipe de recherche a appliqué cette approche aux molécules HLA de classe II avec cette fois ci l'induction de cellules Tr1. Ces cellules ont permis l'établissement d'une tolérance spécifique que ce soit en administration préventive ou thérapeutique dans plusieurs modèles pathologiques (Clemente-Casares et al., 2016).

3.2.1.2. Tolérance orale

La voie orale est historiquement connue pour induire une tolérance spécifique avec des mécanismes néanmoins partiellement décrits mais où l'implication des LyT CD4+ Th3 semble être nécessaire. Cette population de cellules régulatrices exerce son activité suppressive majoritairement via une sécrétion importante de TGF-β. Plusieurs études utilisent des NP en vectorisant soit directement l'antigène, soit l'ADN codant pour la protéine. Les résultats obtenus avec les NP vectorisant le collagène sous forme protéique ont permis une réduction des symptômes dans un modèle d'arthrite induite au collagène (Kim et al., 2002). Dans le cadre des NP vectorisant l'ADN, deux modèles ont été étudiés : un premier modèle d'allergie à l'ovalbumine avec des résultats mitigés (Goldmann et al., 2012), et dans un deuxième temps un modèle d'hémophilie avec l'utilisation de NP délivrant le facteur VIII sous forme plasmidique (Dhadwar et al., 2010). Ces travaux n'ont pas été adaptés chez l'Homme, probablement à cause d'un besoin encore présent d'une meilleure caractérisation des mécanismes impliqués dans l'établissement de la tolérance.

3.2.1.3. Autres

Plusieurs possibilités d'utilisation des NP peu conventionnelles ont été testées toujours en exploitant des processus tolérogènes physiologiques. La première consiste en l'utilisation des mécanismes associés à l'apoptose avec la constitution d'un microenvironnement propice à la tolérance. Dans ce cadre, les NP sont utilisées pour délivrer un antigène et faciliter les phénomènes d'apoptose de manière limitée afin d'initier les réponses tolérogènes. Cette utilisation pose néanmoins plusieurs questions de sécurité et d'efficacité à long terme en comparaison aux autres approches disponibles. La dernière possibilité est d'exploiter les processus de tolérance observés au niveau oral, intestinal et hépatique (Weiner et al., 2011). En effet, la délivrance d'antigènes au sein du foie pourrait représenter une piste intéressante mais une caractérisation complète de l'ensemble des mécanismes spécifiques de cet organe est nécessaire avant d'envisager toute translation chez l'homme.

3.2.2. Approches ciblant des récepteurs impliqués dans la tolérance

De la même manière que pour générer des tolDC *in vitro*, l'utilisation de molécules, mais cette fois-ci par l'intermédiaire de NP pour un adressage spécifique, apparait comme évidente. En reprenant les molécules les plus couramment utilisées pour induire ces tolDC, l'étude de NP vectorisant à la fois un antigène combiné avec de l'IL-10, du TGF-β ou encore de la vitamine D3 a été réalisée. Malgré un potentiel d'utilisation dans un large choix de modèles pathologiques, l'ensemble des travaux réalisés n'a pu évaluer cette approche que dans des modèles d'EAE avec l'utilisation de peptides ou de la protéine complète MOG (Kishimoto and Maldonado, 2018). Mais devant l'efficacité observée, il serait intéressant d'étudier ce type de tNP dans d'autres modèles auto-immuns ainsi que dans l'allergie.

Une autre possibilité plus récemment étudiée a été d'induire l'anergie et l'apoptose des LyB par coexpression sur des NP de l'antigène et de ligand du marqueur CD22 (appartement à la famille SIGLEC) (Macauley et al., 2013). L'action thérapeutique visée est l'abrogation des réponses anticorps par les LyB et les résultats ont été concluants dans un modèle d'hémophilie au facteur FVIII. Enfin, l'utilisation du système Fas/Fas-L pour induire à nouveau l'apoptose, mais cette fois-ci préférentiellement des LyT en utilisant des NP exprimant des complexes CMH-peptide et du Fas à leur surface, demeure intéressante particulièrement pour une utilisation en prévention de rejet de greffe.

3.2.3. Approches utilisant des agents pharmacologiques inhibiteurs

La troisième et dernière catégorie de tNP exploite la prise en charge des NP pour délivrer des agents tolérogènes au contact des APC. On retrouve au sein de cette catégorie l'utilisation d'inhibiteurs de NF-κB responsables d'une induction de Treg Foxp3+ ou encore les inhibiteurs de mTOR avec la rapamycine permettant la génération de iDC, de Treg Foxp3+, et l'inhibition des effecteurs. Pour ces deux agents intégrés au sein de NP, leur efficacité a été démontrée dans des modèles thérapeutiques d'EAE. De plus, des effets sont retrouvés sur l'activation et la différenciation des LyB et des plasmocytes avec une réduction du taux d'anticorps dirigés contre l'antigène au niveau systémique. Ce mécanisme d'action accessoire représente cependant une autre application potentielle pour le traitement de maladies, notamment celles caractérisées par des anticorps dirigés contre les traitements (*e.g* anti-TNF-α, facteurs de coagulation).

De manière générale, l'utilisation de tNP dans l'induction de tolérance spécifique représente un formidable outil à la fois polyvalent dans sa capacité à s'adapter à la pathologie, mais également ubiquitaire par le fait que les DC en sont les cellules cibles et qu'elles sont les cellules clés pour ce type de pathologie. Plusieurs essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours de réalisation chez l'Homme. Actuellement, le recul sur ce type de thérapies n'est pas assez important pour permettre de conclure sur les futurs

développements. Néanmoins, et même en cas d'inefficacité pour certaines pathologies, de nouvelles approches restent envisageables, comme par exemple la combinaison de deux actions tolérogènes avec la combinaison d'anti CD22 à la surface et de rapamycine au sein de la NP. L'utilisation de NP d'origine biologique comme les pseudo-particules virales ou « Virus-Like Particles » (VLP) pourrait être également une alternative intéressante, tant par leurs propriétés structurales que par leurs capacités naturelles à moduler le système immunitaire.

PARTIE 3 : Points de contrôle immunitaires et tolérance

1. Les points de contrôle immunitaire

Les points de contrôle ont pris une part très importante dans le développement de thérapies modulant le système immunitaire. Le très récent décernement du prix Nobel 2018 de Physiologie et Médecine à James P. Allison et Tajuku Honjo, pour leurs travaux sur les points de contrôle immunitaires et leur régulation en cancérologie, en est le parfait exemple. Qu'il s'agisse d'induire un signal fort de tolérance ou à l'inverse d'augmenter drastiquement les réponses immunitaires, ces motifs moléculaires présentent un rôle clé dans l'homéostasie de l'immunité et sont des voies d'action thérapeutique majeures. Au sein de cette classe, on retrouve plusieurs motifs donc le plus ancien et le plus décrit demeure le CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4). Cette molécule est, à l'heure actuelle, la seule à être utilisée couramment chez l'Homme aussi bien en tant que suppresseur immunitaire sous forme soluble, qu'en tant que thérapie anti-cancéreuse par l'intermédiaire d'un anticorps la ciblant. Même si moins utilisées dans l'induction de tolérance, d'autres molécules comme PD-1 restent néanmoins intéressantes à étudier. Afin de comprendre les possibilités thérapeutiques d'utilisation et de combinaison de ces molécules, une description des modes d'action et des développements actuels et futurs ciblant ces points de contrôle immunitaire semble indispensable, en s'attachant plus spécifiquement au CTLA-4.

1.1. Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4 (CTLA-4)

1.1.1. Structure et expression

Modérateur de l'activation cellulaire des LyT, le CTLA-4, également dénommé CD152, possède un rôle primordial dans l'établissement de la voie régulatrice nécessaire au fonctionnement optimal du système immunitaire. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines, d'une longueur de 223 acides aminés et qui fut découverte pour la première fois sous forme d'ADN

complémentaires extraits de LyT CD8+ en 1987 (Brunet et al., 1987). Son domaine extracellulaire est caractérisé par une structure appartenant à la superfamille des immunoglobulines et commune à de nombreuses autres molécules de surface. Ce domaine contient le site de fixation spécifique pour les ligands CD80 et CD86 présents sur les APC. Le site de fixation entre le CTLA-4 et le CD80 diffère de celui du CD86, néanmoins l'avidité de fixation pour ces deux molécules est identique (Linsley et al., 1994). A l'inverse, les cinétiques de fixation diffèrent entre les deux ligands, notamment car le CD80 semble préférentiellement se fixer sur CTLA-4 alors que le CD86 serait légèrement plus affin pour le CD28. Ces données sont néanmoins sujettes à caution, car ces expériences requièrent l'utilisation de ligands solubles ne présentant pas forcément la même structure quaternaire ou le même état de dimérisation que des molécules insérées dans la membrane.

La forme constitutive du récepteur est homodimérique, tout comme le CD28 ou le CD80, avec un poids moléculaire avoisinant les 42 kilos Dalton (kDa). Cette dimérisation permet la création et le maintien d'une structure en maillage lors de la fixation au CD80/86 et confère une stabilité au complexe formé (Figure 5). De plus, elle est permise par la présence de résidus cystéine en position 157 et par des N-glycosylations en position 113 et 145 (Linsley et al., 1995) au sein du domaine intracellulaire. Le CTLA-4 n'a pas besoin d'être sous forme d'homodimère pour pouvoir se fixer à ses ligands et en particulier le CD80, cependant la dimérisation permet d'augmenter fortement cette affinité (Greene et al., 1996). En revanche même sous forme monomérique, le CTLA-4 présente une affinité plus forte que le CD28 pour le CD80. A la suite d'une fixation avec ses ligands, il n'est pas observé de modifications structurales de la partie intra ou extracytoplasmique du CTLA-4 (Stamper et al., 2001).

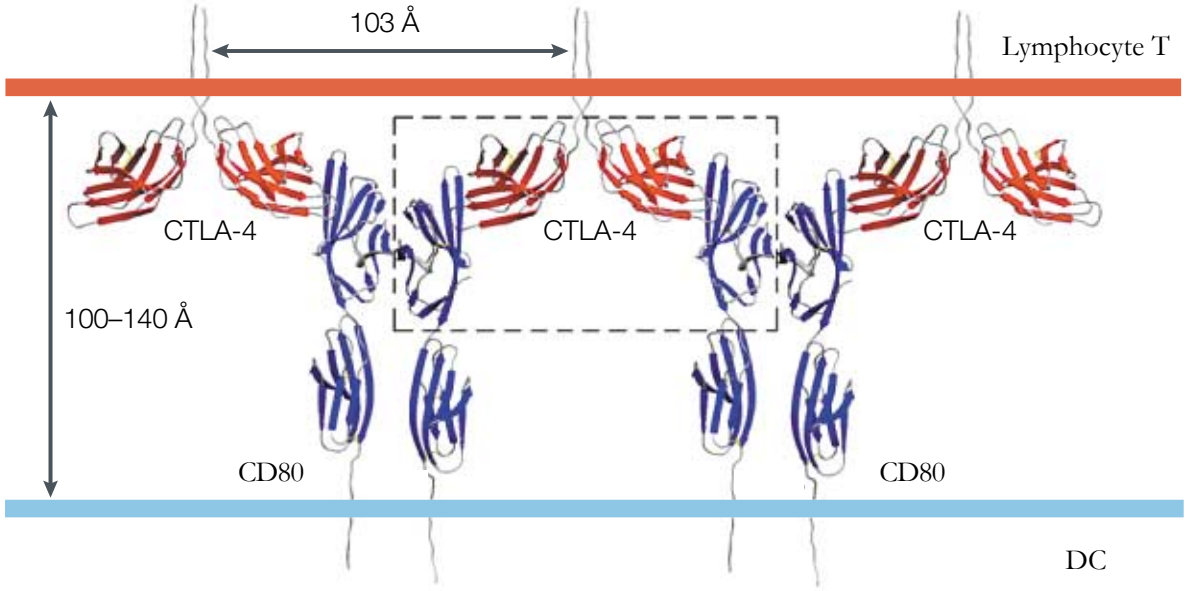


Figure 5. Représentation schématique de la liaison du CTLA-4 au CD80. Les homodimères de CTLA-4 présents à la surface des LyT se lient aux homodimères de CD80 présents sur les DC. Cette structure particulière permet la stabilité du complexe formé. D'après Alègre *et al. Nature Reviews Immunology* (2001).

A la différence du CD28, le CTLA-4 est majoritairement retrouvé au niveau intracellulaire des LyT au sein de vésicules associées ou non à l'appareil de Golgi. En cas d'activation par la fixation du TCR sur le complexe CMH – peptide, l'expression du CTLA-4 est augmentée jusqu'à être détectée pour environ 30% des LyT chez l'Homme (Lindsten et al., 1993). Cependant les Treg expriment de manière constitutivement plus importante le CD152 à la surface et ceci sans besoin d'activation au préalable. En dehors des LyT, quelques autres types cellulaires expriment de faibles niveaux de CTLA-4, notamment certains sous types de LyB et de DC.

Une fois à la surface, le CTLA-4 est soumis à endocytose par l'intermédiaire de vésicules mantelées composées essentiellement de clathrine. Le devenir du CD152 est ensuite dichotomique avec en premier lieu un réadressage vers la membrane plasmique ou alors une dégradation lysosomale. Ces phénomènes d'endocytose, de recirculation et de rétention intra-vésiculaire du CTLA-4 sont par ailleurs très largement dépendants du domaine intracellulaire de la molécule. Le CTLA-4 possède une partie intra-cytoplasmique de 35 acides aminés dépourvue d'activité enzymatique et qui ne présente pas de domaine de signalisation de type Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition

Motif ou ITIM (Teft et al., 2006). Cette partie contient également deux résidus tyrosines (en position 201 et 218) ainsi qu'une région enrichie en proline, qui permettent les phénomènes d'adressage de la molécule à la surface, de recyclage ou de dégradation lysosomale (Figure 6).

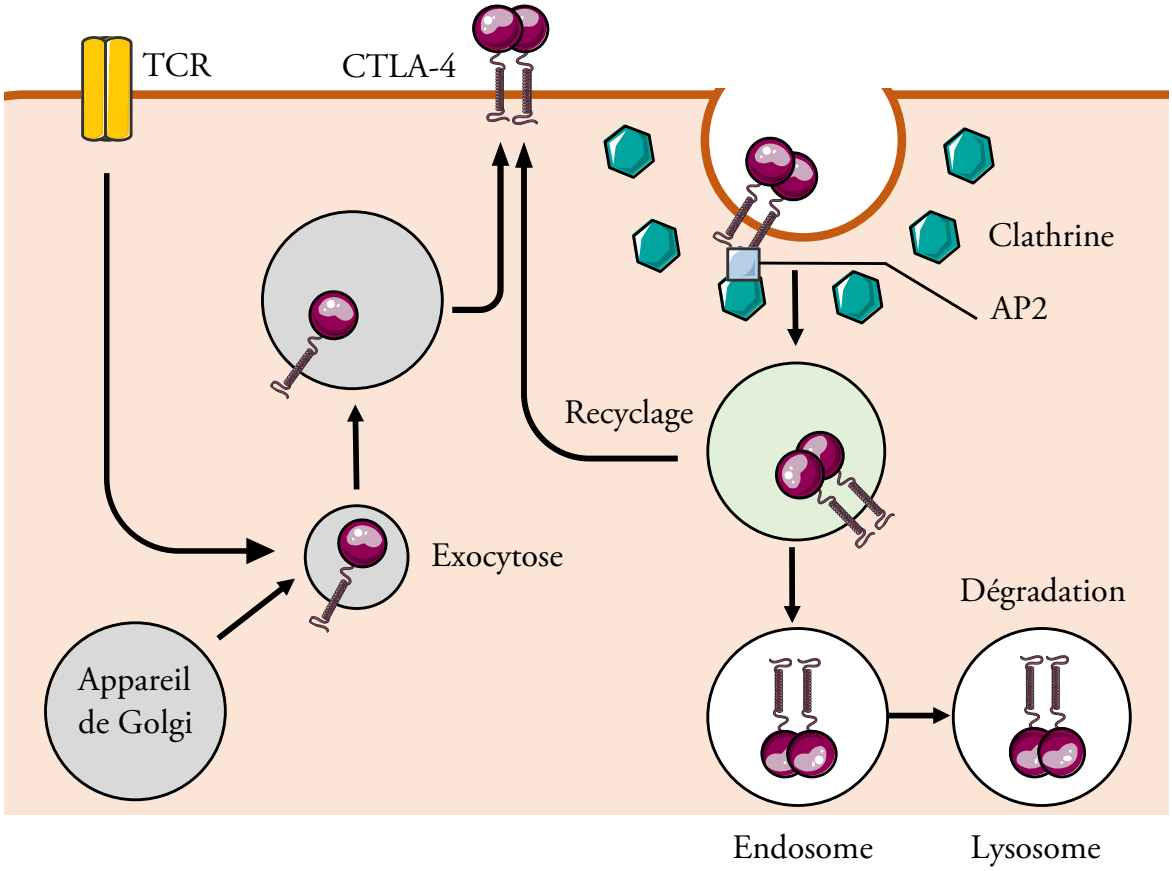


Figure 6. Cycle intracellulaire du CTLA-4. L'adressage membranaire des vésicules contenant du CTLA-4 est dépendant de signaux activateurs tels que ceux médiés par le TCR. Après expression membranaire, le CTLA-4 est soumis à une endocytose médiée par la clathrine et par la protéine AP2. Le devenir de ces endosomes est double, avec un recyclage membranaire ou avec une dégradation au sein de lysosomes. D'après Walker *et al. Nature Reviews Immunology* (2011).

1.1.2. Mécanisme d'action

Les différents mécanismes d'action du CTLA-4, bien que pour la plupart largement décrits, restent encore débattus quant à leur réel impact dans l'immunomodulation. Lors des premières recherches sur le sujet, le CTLA-4 pouvait tout aussi bien agir par un mécanisme actif que passif. En effet, les premières cocultures cellulaires de LyT, d'APC et de CTLA-4 solubles démontraient une diminution de la prolifération lymphocytaire. Malheureusement ces résultats ne permettaient pas de

différencier un blocage du couple CD28/CD80-CD86 (mécanisme passif) de l'absence de signalisation médiée par le CTLA-4 membranaire (mécanisme actif). Le rôle inhibiteur a été par la suite confirmé avec deux recherches indépendantes qui ont mis en lumière le phénotype délétère et auto-immun de souris déficientes pour la molécule (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). En effet, le développement de syndromes lymphoprolifératifs et en conséquence de destruction tissulaire chez des souris déficientes confirmait la nécessité du CTLA-4 pour contrôler les réponses immunitaires et non l'inverse.

Un des premiers mécanismes d'action décrit dans les années 1990 pour le CTLA-4 fut la déphosphorylation de la chaîne ζ du corécepteur CD3 par l'intermédiaire d'une phosphatase (SHP-2). Cette modification entrainerait l'incapacité de transduire le signal initié par la fixation du TCR sur le complexe CMH-peptide. Malheureusement, cette voie d'action fut par la suite infirmée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases (Calvo et al., 1997; Lee et al., 1998). De la même façon, l'impact sur la diminution de la formation de microclusters de ZAP70, formations nécessaires à la transmission du signal déclenché par le TCR, fut également réfuté puis remis en lumière dans les années 2000 (Calvo et al., 1997; Schneider et al., 2008). D'autres voies d'action, telles que PI3K, AKT ou SHP-1 et 2 ont été mises en avant avec une remise en cause par la suite sans exception (Walker and Sansom, 2015). Enfin, un effet médié par la régulation intracellulaire de l'expression des gènes a été souligné. Cette régulation aurait pour conséquence la diminution de production de l'interleukine-2 (IL-2), une cytokine essentielle pour la survie et la prolifération des LyT et en particulier des Treg, ainsi que le blocage des LyT en phase G1 du cycle cellulaire (Krummel and Allison, 1995) (Figure 6).

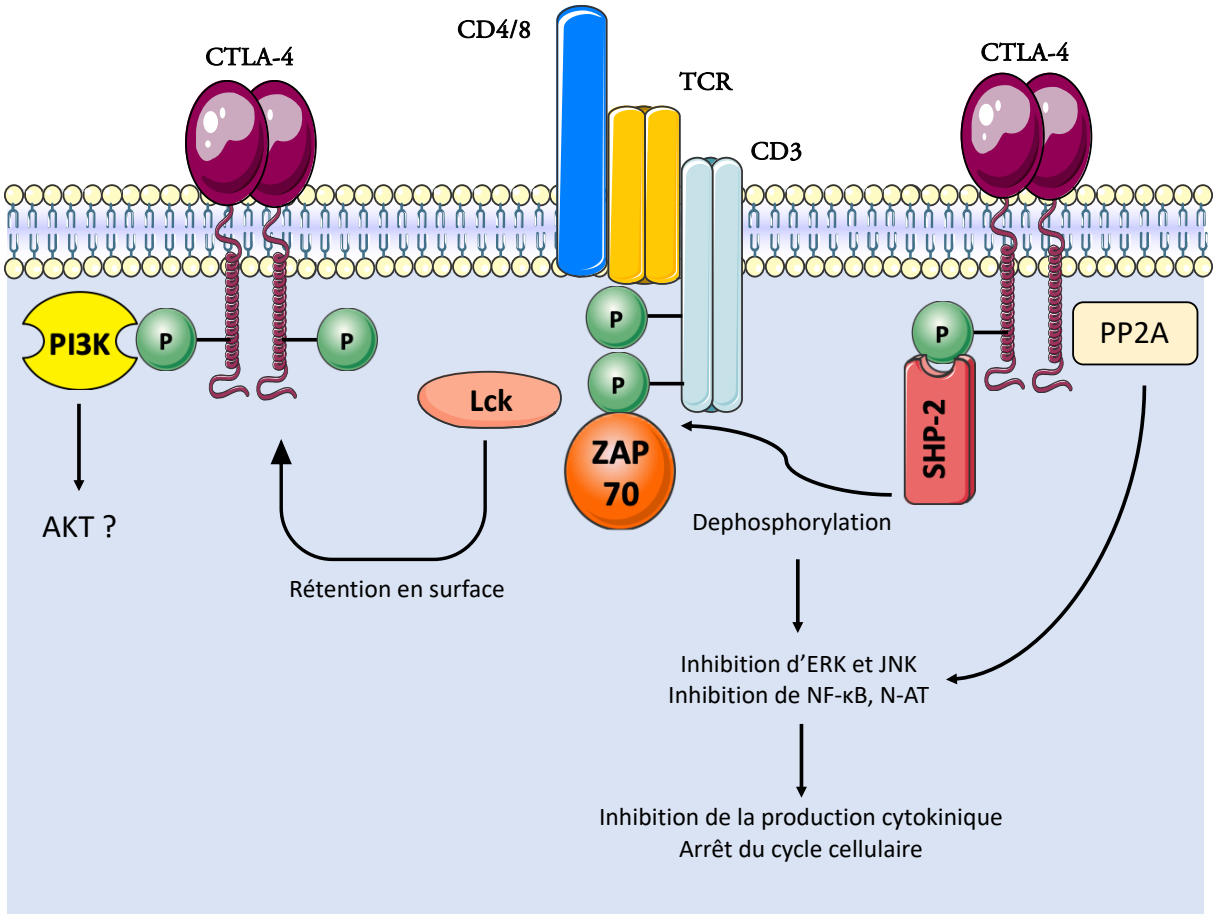


Figure 7. Mécanismes d'action intracellulaires du CTLA-4. Le CTLA-4 pourrait inhiber le signal induit par le CD3 par l'intermédiaire de SHP-2 en déstabilisant les microclusters de ZAP70. D'autre part, les voies médiées par PI3K et par PP2A pourraient inhiber la production cytokinique et la prolifération cellulaire en modulant les cascades de signalisation intracellulaires. D'après Alègre *et al. Nature Reviews Immunology* (2001).

L'ensemble des données actuelles semble cependant montrer que l'effet majoritaire du CTLA-4 n'est pas lié d'une manière ou d'une autre à une voie d'activation intracellulaire à travers sa partie intra-cytoplasmique. En effet, la liaison du CTLA-4 à son ligand n'entraîne pas de modifications transcriptomiques notables au sein des lymphocytes l'exprimant en comparaison à des LyT déficients pour le CTLA-4 ou des LyT naïfs activés par un anti-CD28 (Friedline et al., 2009; Wakamatsu et al., 2013). De plus, les travaux de *Kataoka et al* montrent que l'amputation de ce domaine ne semble pas avoir d'impact sur l'activité des Treg dans des études *in vitro* (Kataoka et al., 2005). Pour nuancer ce propos, une étude américaine a cependant mis en évidence, par l'intermédiaire d'une mutation du CTLA-4 au niveau de l'un des deux résidus tyrosine (Y201V), le rôle de la partie intra-cytoplasmique du CTLA-4 dans l'activité suppressive des Treg en cas de pathologie auto-immune induite (Stumpf et al., 2014).

La principale voie d'action du CTLA-4 serait donc la compétition de liaison avec le CD28 sur leurs ligands communs, à savoir le CD80 et le CD86 présents sur les cellules présentatrices d'antigènes (Figure 8a). Cette compétition est très largement en faveur du CD152 qui présente une affinité environ 100 fois supérieure à celle du CD28 (Linsley et al., 1995). En réalité, le CTLA-4 présenterait une affinité préférentielle pour le CD80 tandis que le CD28 se lie plus facilement au CD86 (Bhatia et al., 2005). D'autre part, la liaison du CTLA-4 avec ses ligands permettrait la diminution du CD80 et du CD86 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Les travaux de l'équipe de Shimon Sakaguchi confirment cette hypothèse avec de l'étude des LyT régulateurs, cellules présentant une expression du CTLA-4 importante comparativement aux LyT conventionnels (Onishi et al., 2008).

Concernant les modifications observées au sein des APC, les mécanismes déclenchés par la fixation du CTLA-4 et les voies d'action intracellulaires issues de CD80 et CD86 sont peu décrits. Néanmoins, la voie PI3K par l'intermédiaire de la protéine Notch 1 semble être impliquée (Koorella et al., 2014). Cette signalisation est responsable d'une augmentation de production de l'IL-6 ainsi que de l'enzyme indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) (Fallarino et al., 2003) (Figure 8b) . En effet, des DC mises en culture avec des Treg produisent plus d'IDO et par conséquent augmentent le catabolisme du tryptophane au niveau extracellulaire et diminuent la disponibilité de cet acide aminé dans le milieu. Cet effet est confirmé par la baisse de production d'IDO après ajout d'un anticorps anti-CTLA-4 ou par l'utilisation de cellules exprimant peu le CTLA-4. La conséquence de cette diminution du tryptophane est : (i) responsable d'une anergie des LyT dans l'environnement de ces APC par diminution des capacités de division cellulaire, et (ii) l'augmentation de la sécrétion de TGF-ß par les DC (Munn and Mellor, 2007). Cette altération de l'environnement cytokinique et nutritionnel serait propice à l'induction et à l'activation des Treg, cellules clés dans l'établissement d'une tolérance immunitaire (Figure 8c). Ces effets sont également retrouvés avec l'utilisation des molécules de CTLA-4 solubles (Grohmann et al., 2002). D'autre part, une diminution de l'ordre de 50% de l'expression des molécules de costimulation après fixation est observée et pourrait être expliquée par l'internalisation du complexe CTLA-4/CD80 ou CD86 une

fois la liaison effectuée (Qureshi et al., 2011) (Figure 8d). En effet, sous forme non phosphorylée, l'ensemble des résidus tyrosine et proline au niveau intra-cytoplasmique permet l'association avec la protéine AP50 qui est une des sous-unités de l'adaptateur pour la clathrine. Le devenir du complexe formé serait alors la dégradation au sein des vésicules d'endocytose qui par la suite présentent une activité lysosomale. Ce mécanisme n'est pas retrouvé pour la molécule CD28 du fait de l'absence de domaines intracytoplasmiques permettant cette signalisation intracellulaire. Enfin, la liaison du CTLA-4 à son ligand serait un signal déclencheur de la motilité du LyT engagé, avec pour conséquence une instabilité au niveau de la synapse immunologique (Schneider et al., 2006). Cette action reste elle aussi sujette à controverses, les travaux de l'équipe de Jeffrey Bluestone ayant attribué cette augmentation de mobilité cellulaire au couple PD-1/PD-L1 (Fife et al., 2009).

En conclusion et compte tenu des résultats contradictoires ces 30 dernières années, les rôles supposés du domaine intra-cytoplasmique du CTLA-4, seraient mineurs et ceci même si des motifs impliqués dans des voies d'endocytose sont décrits. A l'inverse, le domaine extracellulaire, véritable interface avec les APC, jouerait un rôle prépondérant dans l'action modulatrice de manière dépendante de la quantité et de la dynamique de l'expression de la molécule à la surface des LyT. Par ailleurs, l'ensemble des études à visée thérapeutique décrivant l'utilisation de molécules de CTLA-4 solubles et l'étude des patients présentant des mutations hétéro ou homozygotes pour le CTLA-4 au niveau du site de fixation s'accordent pour confirmer cette dépendance entre dose, dynamique et effet.

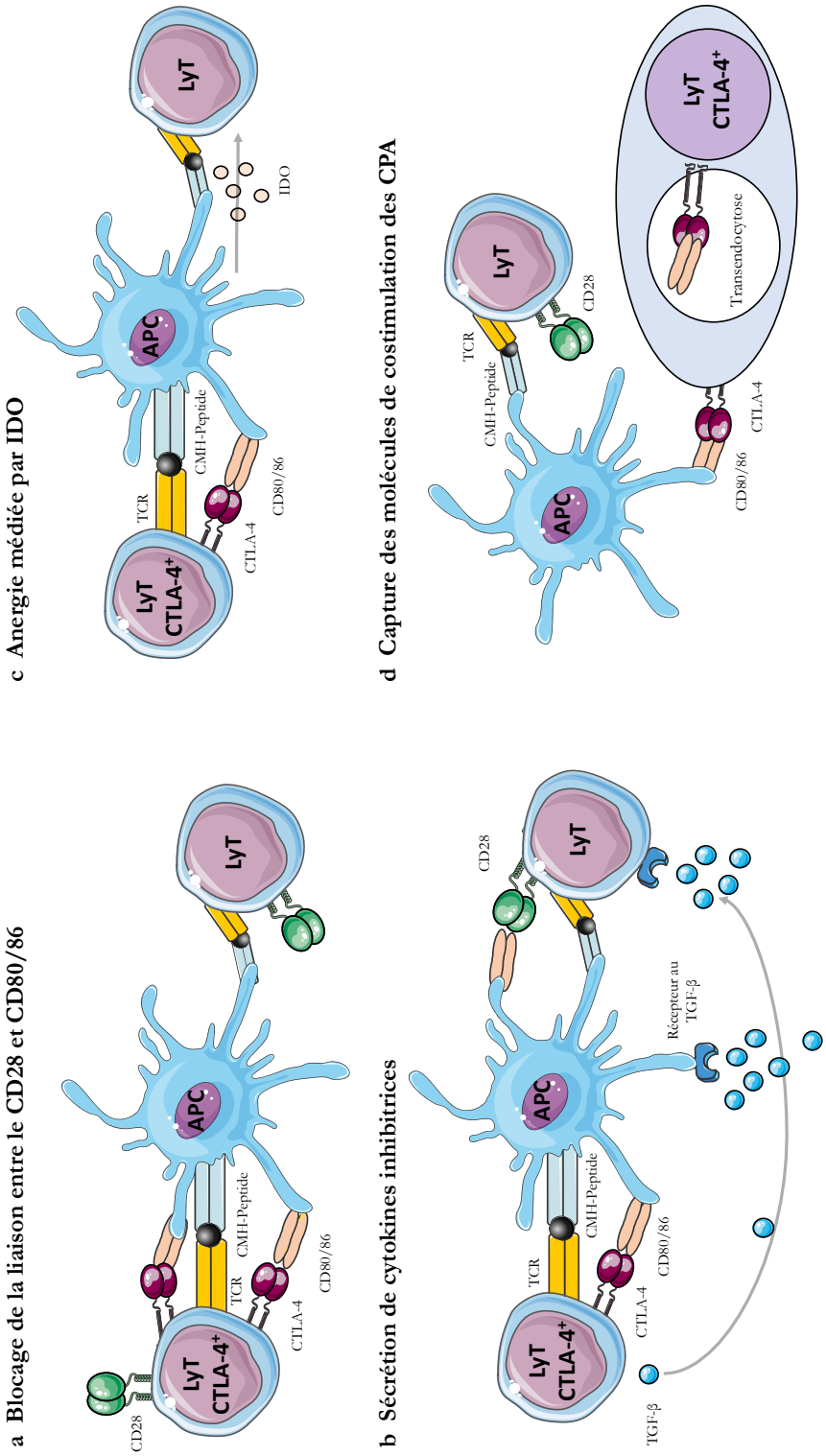


Figure 8. Mécanismes d'action extrinsèques du CTLA-4. a) Le CTLA-4 en se liant au couple CD80/86 diminue la disponibilité pour le CD28 ce qui empêche l'induction du signal de costimulation. b) Suite à la liaison avec le CD80/86, le CTLA-4 induit la sécrétion de cytokines inhibitrices avec majoritairement le TGF-β. c) Le CTLA-4 induit au niveau des APC la production et la sécrétion d'IDO. Cette enzyme en catabolisant le tryptophane induit l'anergie des LyT présent dans le microenvironnement. d) Des phénomènes de transendocytose, observés principalement au niveau des Treg, participent à la diminution de l'expression des molécules de costimulation à la surface des APC. D'après Walker *et al. Nature Reviews Immunology* (2011).

1.1.3. Isoformes et polymorphismes du CTLA-4

Deux isoformes du CTLA-4 sont décrites dans la littérature. La première forme, décrite précédemment et majoritaire, est composée du peptide d'initiation, du domaine de liaison au CD80 et CD86, du domaine transmembranaire et enfin d'un domaine intra-cytoplasmique. Cette forme retrouvée à la surface des LyT a également été retrouvée, dans des expériences *in vitro,* à la surface d'exosomes issus de LyT CD4+ (Esposito et al., 2014). Ces vésicules riches en CD63 peuvent être sécrétées par plusieurs types cellulaires dont les DC. Ces observations n'ont néanmoins pas été confirmées *in vivo* avec l'absence de détection de ces vésicules dans le sérum de donneurs sains. La deuxième isoforme dénommée sCTLA-4 pour CTLA-4 soluble, déficiente pour le domaine transmembranaire, a été observée chez l'homme et la souris. Cette forme minoritaire est retrouvée sous forme de monomères à la suite d'une activation des LyT CD4+ (Esposito et al., 2014). Son rôle reste encore à confirmer mais ce sCTLA-4 serait un des moyens de contrôler l'activation des LyT et d'empêcher une activation inadaptée et rémanente du système immunitaire.

Le gène codant pour le CTLA-4 est situé sur le chromosome 2q33, entre le gène codant le CD28 et celui codant ICOS. Cette distance génétique faible avec ces autres motifs complexifie l'étude des polymorphismes. Plusieurs mutations d'un seul acide aminé sont retrouvées dans les régions promotrices (Wang et al., 2002) ou les régions codantes. Fréquemment, ces mutations sont associées avec le développement de pathologies comme la maladie de Graves, le diabète de type 1, la colite ou encore le lupus. Néanmoins après étude approfondie, ces mutations ne sont pas les seules associées au développement de ces pathologies et le lien direct de causalité ne peut être affirmé (Gough et al., 2005; Liu and Zhang, 2013). Les dernières recherches sur le sujet soulignent cependant certaines associations entre CTLA-4 et des formes de néphropathies spécifiques (Jacob et al., 2018), de pancréatite mais également dans l'asthme allergique (Munthe-Kaas et al., 2004). Bien que les travaux publiés sur les néphropathies et la pancréatite souffrent d'un manque de puissance compte tenu du nombre de patients inclus, ceux étudiant l'association entre polymorphismes du CTLA-4 et allergie sont plus intéressants car réalisés dans 3 pays sur 364 patients asthmatiques. Un total de 7

polymorphismes sont décrits avec une influence sur les niveaux d'IgE sériques, la positivé à au moins un test de provocation cutanée ou la fonction respiratoire. Ces résultats ont par ailleurs été renforcés par une méta-analyse récemment publiée qui démontre un corrélation entre la mutation +49A/G et le risque de développement de l'asthme chez plus de 9000 patients atteints ou non (Zheng et al., 2018).

1.2. Programmed cell Death protein 1 (PD-1)

Tout comme le CTLA-4, la molécule PD-1 (Programmed cell Death protein 1) est une molécule clé dans la régulation du système immunitaire ce qui en fait un « point de contrôle » immunitaire. Ce motif, autrement dénommé PDCD1 ou encore CD279 est engagé suit à l'activation cellulaire T d'un lymphocyte et permet d'inhiber les signaux activateurs émis suite à la liaison du TCR avec le complexe CMH-peptide et la molécule CD28 avec le CD80 ou le CD86. Cette molécule fait l'objet de nombreuses recherches et développements dans le domaine de la cancérologie, néanmoins l'accent dans cette description sera porté majoritairement sur son rôle et son utilisation en tant qu'immunosuppresseur.

1.2.1. Structure et expression

La molécule PD-1 est exprimée majoritairement par les LyT notamment les LyT tolérants, les Treg, les Tfh, les Tfr, les LyT mémoire. A l'inverse, on ne retrouve pas d'expression de ce motif à la surface des LyT naïfs mais son apparition fait suite à la liaison TCR et du complexe CMH-peptide. En cas de disparition ou de diminution de la présentation d'un antigène, l'expression de PD-1 diminue ce qui n'est pas le cas lors d'une infection chronique ou dans le contexte du cancer. En dehors des LyT, on retrouve également cette molécule sur les LyB, les NK, ainsi que les cellules myéloïdes sans pour autant avoir défini de rôle.

Au niveau structural, cette molécule est caractérisée par deux motifs tyrosines, présents au sein du domaine intra-cytoplasmique, qui sont phosphorylés après liaison à un ligand. Cette phosphorylation entraîne la fixation de protéines de type « protein tyrosine phosphatase » (PTP), comme par exemple SHP2. Ces PTP peuvent déphosphoryler des kinases essentielles dans l'activation d'un LyT et donc antagoniser

les signaux issus du CD3 et du CD28, en agissant en aval sur le couple PI3K-AKT, RAS, ERK, VAV ou encore la phospholipase Cγ (Hui et al., 2016; N et al., 2012; Yokosuka et al., 2012). Les mécanismes définissant une action préférentielle, soit sur la cascade d'activation du CD28, soit sur celle du TCR, demeurent flous. Néanmoins, le besoin récurrent d'une stimulation par l'antigène pour ces T effecteurs définirait le potentiel régulateur de PD-1 et serait donc un de ces moyens d'action principaux (Figure pd1 a).

La molécule PD-1 possède plusieurs ligands, majoritairement PD-L1 (autrement dénommé CD274 ou B7-H1) et PD-L2 (autrement dénommé CD273 ou B7-DC). PD-L1 est une molécule assez ubiquitaire retrouvée au niveau des cellules hématopoïétiques (LyT, LyB, DC et macrophages) mais aussi au niveau de cellules non issues de lignées hématopoïétiques (cellules endothéliales stromales et vasculaires, îlots pancréatiques, trophoblastes placentaires, et kératinocytes).

1.2.1. Mécanisme d'action et rôle dans la tolérance

Au niveau moléculaire, les mécanismes d'action de PD-1 sont encore débattus mais un lien est décrit entre PD-1 et l'activité métabolique des LyT. En effet, cette molécule pourrait inhiber l'augmentation du métabolisme du glucose et de la glutamine induits après activation par le TCR et le CD28. Cette inhibition permettrait de bloquer le passage à la glycolyse anaérobie qui est une des transitions nécessaires pour la prolifération et la différenciation des LyT. On retrouve également après liaison une augmentation de la lipolyse et de l'oxydation des acides gras dans les LyT CD4+ (Parry et al., 2005; Patsoukis et al., 2015)

Chez des souris déficientes pour PD-1, on observe une plus forte propension au développement de pathologies auto-immunes avec l'apparition de syndromes mimant le lupus, le développement de cardiomyopathies, ou encore une plus forte maladie chez des souris développant un diabète spontané (fond génétique NOD pour « non obese diabetic mice ») (Nishimura et al., 1999, 2001; Wang et al., 2005). Chez l'homme, dans le cas de mutations uniques pour le locus PDCD1, il est observé une association avec des pathologies auto-immunes (Keir et al., 2008). Cependant, la nature de cette relation n'a jamais été déterminée, qu'il s'agisse d'une causalité ou d'une simple corrélation. La

molécule PD-1 est aussi grandement impliquée dans les processus de délétion clonale s'opérant au sein du thymus. En effet, la perte de PD-1 à ce stade est responsable d'un plus fort taux de LyT double positifs pour le CD8 et le CD4 au niveau systémique. Malheureusement, les mécanismes sous-jacents pour cette modification de sélection clonale sont peu définis (Nishimura et al., 2000). Au niveau périphérique, PD-1 permet de restreindre l'activation de LyT CD4+ et CD8+ autoréactifs au niveau des organes lymphoïdes secondaires, mais également de moduler l'expression des récepteurs aux chimiokines à la surface de ces LyT afin de diminuer la capacité migratoire dans les tissus cibles (Pauken et al., 2013). Elle participe également à l'induction de Treg à partir de LyT CD4+ Foxp3- en périphérie (Francisco et al., 2009). D'autre part, le rôle suppresseur des Tfr et donc le contrôle des réponses adaptatives serait lui aussi dépendant d'une signalisation induite par PD-1 (Sage and Sharpe, 2016).

En conclusion, le rôle global de PD-1 chez l'individu sain peut se définir comme modérateur de l'amplitude initiale de la réponse T. Ce rôle modérateur s'exerce à trois niveaux dans la définition de cette réponse. Le premier niveau d'action s'opère au sein du thymus tandis que le deuxième est observé au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Enfin, le troisième permet un contrôle affiné de la réponse immunitaire au sein des tissus cibles (Figure 9). De plus, PD-1 permet d'affiner la différenciation et le devenir des LyT responsables de l'établissement de la mémoire immunitaire. Cependant cette molécule ne peut être considérée comme simplement un marqueur d'exhaustion car elle est exprimée par de nombreuses cellules impliquées dans la tolérance.

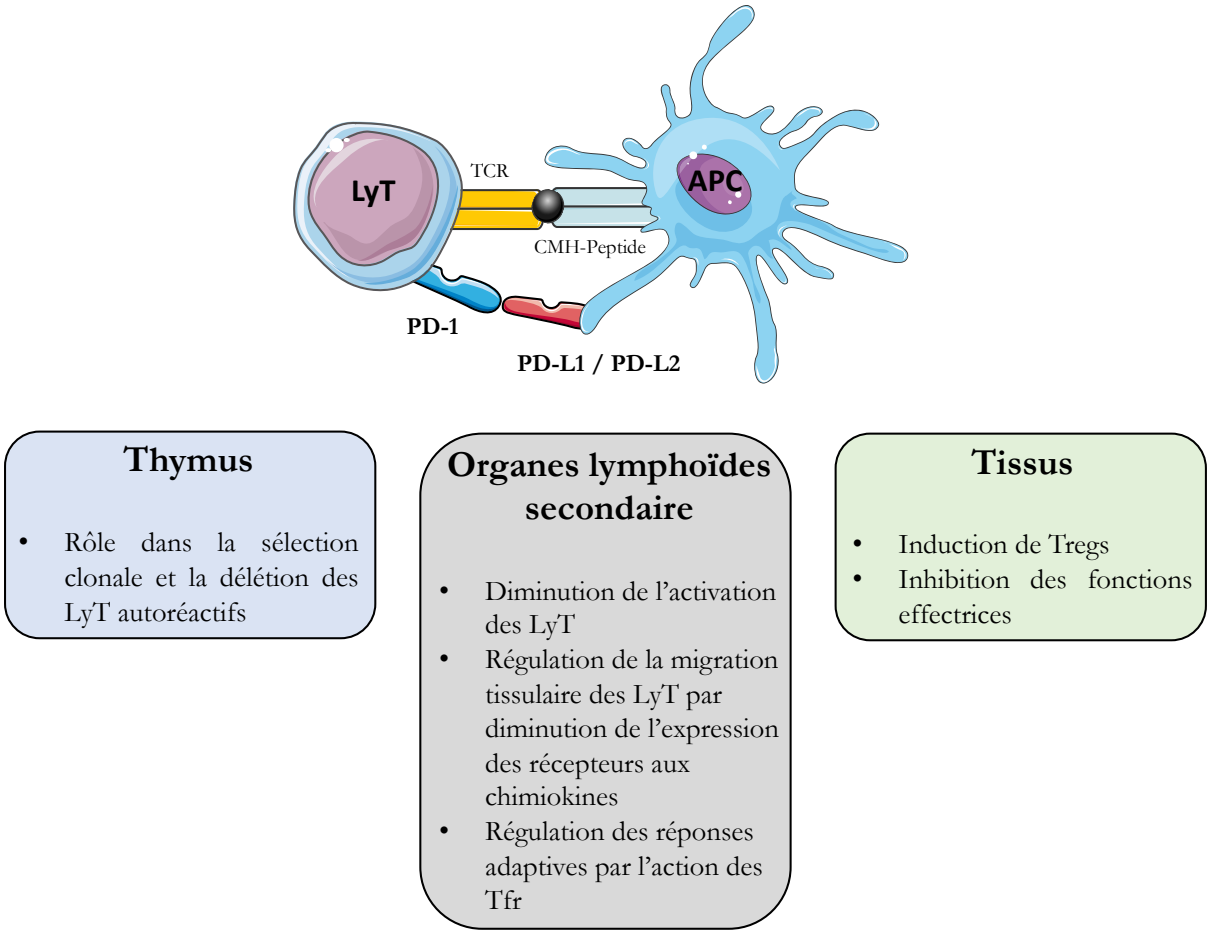


Figure 9. Rôle de PD-1 dans la tolérance immunitaire. PD-1 participe à l'établissement de la tolérance dès la sélection clonale dans le thymus. En périphérie, PD-1 est impliqué dans le contrôle des réponses auto-immunes par la diminution de l'activation des LyT, le contrôle de leur migration et participe à l'action des Tfr. Le dernier niveau d'action est tissulaire et comprend le contrôle de l'activation des LyT et l'induction de Treg.

1.3. Autres points de contrôle immunitaires

En dehors de ces deux points de contrôle majeurs au sein de la synapse immunologique, de nombreuses autres molécules sont mises en jeu. Parmi elles, certaines sont responsables de signaux inhibiteurs tout comme PD-1 et CTLA-4. Dans cette catégorie, on retrouve LAG-3, TIM-3, TIGIT, les KIR, ainsi que des molécules induisant une activation comme GITR et ICOS (Tableau 2). Devant l'absence de thérapies tolérogènes exploitant leurs propriétés, ces molécules ne seront que succinctement décrites afin d'entrevoir les possibilités de leur utilisation.

Point de contrôle immunitaire	Autres dénominations	Expression cellulaire	Ligands	Mécanisme d'action
LAG-3 Lymphocyte activation gene 3	CD223	Tregs, CD4+ et CD8+ activés	CMH-II LSECtin	Blocage du CD3 Augmentation des fonctions suppressives des Tregs
TIM-3 T Cell Immunoglobulin-3		CD4+ Th1, CD8+ et Tregs	Galectine9 PtdSer HMGB1 Ceacam-1	Inhibition des signaux déclenchés par l'activation via le TCR
TIGIT (immune suppressive checkpoint)	WUCAM Vstm3	Tr1, Tfh et Treg thymiques, NK	CD112 CD155	Inhibition des signaux déclenchés par l'activation via le TCR en modulant la PLCgamma
KIRs (immune suppressive or activating checkpoint)	CD158	Majoritairement les NK, CPA et LyT CD8+ associés à la tumeur	CMH-I	Inhibition de l'activation cellulaire par liaison au CMH-I présentant des peptides du soi
4-1BB (immune activating checkpoint)	CD137	CD4+ et CD8+ activés, NK activés, Tregs, DCs, neutrophiles	4-1BB-L	Activation de NF-kB, c-Jun et p38 après liaison au ligand. Activation cellulaire et induction d'un phenotype pro-inflammatoire
GITR (immune activating checkpoint)	CD357	Tregs, CD4+ activés et CD8+	GITRL	Atténuation des fonctions suppressives des Tregs et augmentation des réponses T effectrices
ICOS (immune activating checkpoint	CD278	CD4+ et CD8+ activés, Tregs	ICOS-L	Activation de PIK3R, PI3KC et de la voie médiée par AKT

Tableau 2. Points de contrôle immunitaire annexes. Au sein de cette catégorie, des points de contrôle activateurs (4-1BB, GITR, ICOS) et inhibiteurs (LAG-3, TIM-3, TIGIT) sont décrits. Les activateurs accroissent les fonctions des LyT, qu'elles soient suppressives ou effectrices tandis que les inhibiteurs modulent les signaux d'activation induits par la fixation entre le TCR et les molécules du CMH.

1.3.1. Lymphocyte activation Gene 3 (LAG-3)

La molécule LAG-3 (« Lymphocyte activation gene 3 ») ou CD223 a été découverte pour la première fois en 1990, très rapidement après la caractérisation du CTLA-4 (Triebel et al., 1990). Cette molécule est principalement retrouvée sur les LyT activés (CD4+ et CD8+) et sur les Treg qu'ils soient thymiques ou périphériques (Huang et al., 2004). Ce sont les Tr1 qui expriment le plus fortement cette molécule et sont d'ailleurs couramment définis par la coexpression de LAG-3 et du CD49b (Gagliani et al., 2013). La structure tridimensionnelle de LAG-3 est analogue à celle du corécepteur CD4 avec la présence de 4 domaines extracellulaires de type immunoglobulines à l'exception d'une expression membranaire sous forme dimérique. Cette analogie structurelle permet néanmoins sa fixation sur le CMH-II avec une affinité plus forte que le CD4 (Huard et al., 1995).

Les moyens par lesquels LAG-3 agit soit sur les LyT activés ou les Treg demeurent encore peu connus. Le mécanisme d'action historiquement décrit est celui d'une liaison au domaine extracellulaire du CD3, ce qui empêche l'activation, la prolifération, la production de cytokines et les mouvements de flux calciques au sein du LyT (Hannier et al., 1998). Cette observation est basée sur l'utilisation d'anticorps anti-LAG-3 est reste encore sujette à débat à l'heure actuelle. Les mécanismes internes de LAG-3 sont dépendants de motifs cytoplasmiques conservés car une seule mutation au niveau de

cette région abroge les capacités régulatrices liées à la molécule. Cependant, les protéines ou enzymes requises en amont ou en aval ne sont pas encore définies.

De manière étonnante, un déficit seul en LAG-3 chez la souris ne prédispose pas les animaux à un développement spontané d'auto-immunité. Néanmoins, LAG-3 semble indispensable pour l'activité suppressive des cellules régulatrices, car le blocage par un anti-LAG3 en situation pathologique entraine la perte des fonctions suppressives des Treg (Workman and Vignali, 2005). Cet effet est démontré chez des souris LAG-3 « knock-out ». Après administration de super antigènes comme l'entérotoxine du staphylocoque du groupe B (SEB), on observe une expansion incontrôlée de clones cellulaires T présentant un TCR avec une chaîne ß commune (Vb8) ainsi qu'une splénomégalie (Workman et al., 2004). Cette observation a été reproduite dans un modèle antigène spécifique avec l'utilisation de cellules spécifiques pour l'ovalbumine déficientes pour LAG-3 et restimulées avec de l'ovalbumine (Workman et al., 2004) ou dans un modèle induit de diabète de type 1 (Bettini et al., 2011). L'étude la plus intéressante sur le sujet date de 2014 et démontre le rôle de cette molécule dans la génération de LyT régulateurs spécifiques des autoantigènes de manière synchrone avec PD-1, TIM-3 et TIGIT (Burton et al., 2014). Ces cellules agiraient majoritairement par la sécrétion d'IL-10, ce qui laisse penser qu'il s'agit majoritairement de Tr1. L'utilisation simultanée d'anticorps anti-LAG-3 et anti-PD-1 renforce cette idée de synergie car elle permet une meilleure clairance de l'infection (Blackburn et al., 2009)

1.3.2. T Cell Immunoglobulin-3 (TIM-3)

Découverte en 2002, la molécule T cell immunoglobulin-3 (TIM-3) a été initialement décrite comme sélectivement exprimée sur des cellules productrices d'IFN-γ (LyT CD4+ Th1 et LyT CD8+) (Monney et al., 2002). Ce n'est que récemment que TIM-3 a été également mis en évidence sur Treg. En dehors d'une fixation débattue sur la galectine 9 (Gonçalves Silva et al., 2017; Leitner et al., 2013), TIM-3 se lie à la phosphatidyl serine ou PtdSer de manière non spécifique. Cette interaction intervient majoritairement sur les cellules dendritiques avec une augmentation de la prise en charge des composants apoptotiques dans le milieu et sur la cross-présentation (Nakayama et al., 2009). Deux autres ligands sont décrits, avec premièrement le « high

mobility group protein B1 » (HMGB1) (Chiba et al., 2012) qui jouerait un rôle dans la diminution de l'activation lymphocytaire, et deuxièmement Ceacam-1 (Huang et al., 2015). Ce dernier est co-exprimé à la surface des LyT CD4+ lors d'induction de tolérance et sur des LyT CD8+ infiltrant des tumeurs et présentant des marqueurs phénotypiques d'épuisement ou de perte fonctionnelle.

TIM-3, par l'intermédiaire de phosphorylations de kinases, agit par inactivation des signaux émis après la liaison entre le TCR et les molécules de CMH (Lee et al., 2011). De ce fait, TIM-3 est décrit comme appartenant à une famille de molécules impliquées dans les processus d'auto-immunité comme l'asthme, l'allergie et l'atopie. Les premières études fonctionnelles de TIM-3 suggèrent un rôle régulateur des réponses Th1 avec une exacerbation des symptômes de l'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE) dans des modèles murins de traitement par anti-TIM-3 (Monney et al., 2002). Ces données ont été confirmées par l'utilisation de souris déficientes pour TIM-3 ou par l'utilisation de protéines de fusion TIM-3-Ig de manière similaire au CTLA-4. Dans l'ensemble de ces études, une augmentation de la proportion d'animaux atteints de manifestations auto-immunes a été observée (Sabatos et al., 2003; Sánchez-Fueyo et al., 2003). L'inactivation de TIM-3 est également responsable d'une activation forte et incontrôlée des macrophages sans pour autant influer sur les LyT Th17 (Monney et al., 2002). D'autre part, TIM-3 semble essentiel dans l'efficacité thérapeutique de certaines molécules dans le cadre de l'auto-immunité. En effet, on observe qu'un traitement par IFN-ß induit non seulement plus de sécrétion d'IL-10 par les LyT mais également plus d'expression de TIM-3 (Zhu et al., 2015). Cette observation renforce les données chez l'homme où la thérapie IFN-ß chez des patients atteints de sclérose en plaques semble également augmenter l'expression de TIM-3. C'est également le cas chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, chez qui l'augmentation de TIM-3 est corrélée à une meilleure réponse aux traitements par méthotrexate ou tocilizumab ainsi qu'une activité de la maladie plus faible (Liu et al., 2010).

A l'inverse, des points de contrôle activateurs sont également présents et permettent une activation importante et maintenue des acteurs de l'immunité après contact avec leurs ligands. Dans cette catégorie, on retrouve les molécules 4-1BB, GITR

et ICOS. 4-1 BB appartient à la famille des récepteurs aux « tumor necrosis factor » (TNF) et permet le maintien de l'activation cellulaire dans les LyT CD4+, CD8+ et lymphocytes NK. D'autre part, ce récepteur est impliqué dans la polarisation de ces acteurs vers un profil pro-inflammatoire. Le « glucocorticoid induced TNFR-related protein » (GITR), tout comme 4-1BB, appartient à la famille des récepteurs aux TNF. Cette molécule exprimée par les Treg, les LyT CD8+ et les CD4+ activés est impliquée dans l'atténuation des fonctions suppressives des Treg et l'augmentation des capacités effectrices des LyT après fixation à son ligand (GITRL). Enfin, le troisième et non moins essentiel point de contrôle activateur est le « inducible T-cell costimulator » (ICOS). Autrement dénommé CD278, il est exprimé par les LyT activés qu'ils soient CD4+ ou CD8+ ainsi que les Treg. Après fixation à son ligand, l'activation de la voie médiée par les facteurs AKT et PI3K permet d'augmenter les capacités suppressives dans le cas des Treg et effectrices dans le cas des LyT conventionnels. Cette régulation fine, complexe et mettant en jeu de nombreux acteurs représente une voie d'action thérapeutique importante, que l'on se place dans un contexte purement inflammatoire, auto-immun ou tumoral. Cependant, les modifications transcriptionnelles et phénotypiques, à la fois sur les cellules exprimant ces points de contrôle mais également sur les cellules exprimant les ligands, rend l'utilisation d'agents bloquants ou activateurs délicate afin de pas induire une trop forte activation ou suppression.

2. Quelles thérapies aujourd'hui pour les points de contrôle immunitaire

2.1. Thérapies basées sur la molécule CTLA-4

Compte tenu du rôle crucial du CTLA-4 sur l'activation et la régulation des réponses immunitaires médiées par les LyT, l'utilisation d'agents pharmacologiques ayant une action aussi bien bloquante qu'activatrice a vu le jour dès les années 1990. Les connaissances sur les molécules CD28, CD152 et leurs ligands CD80 et CD86, ont permis premièrement l'utilisation d'anticorps ciblant le CD28 afin d'activer le système immunitaire. En premier lieu, l'objectif était d'activer les LyT de manière indépendante d'une stimulation antigénique. De manière surprenante, l'effet observé était une

activation préférentielle des Treg. Le développement de ces anticorps s'est donc poursuivit avec la création de deux anticorps candidats (TGN11112 et TGN1412). Cependant le premier essai clinique de phase I utilisant l'anticorps TGN1412 fut un échec avec l'apparition d'une activation massive des LyT conventionnels ainsi que d'un relargage important de cytokines et de chimiokines. Cette activation importante, qualifiée de choc cytokinique, a provoqué l'apparition de symptômes allant de la fièvre à la nécrose des extrémités chez 6 volontaires sains (Suntharalingam et al., 2006). Ces résultats ont grandement ralenti la recherche d'agents thérapeutiques agissant sur le CD28. Malgré cet échec, la recherche d'agents bloquants a cependant continué avec le sc28AT. Cet anticorps monovalent a démontré une efficacité modérée lors de transplantations allogéniques cardiaques et rénales dans un modèle de primate non humain. En combinaison avec des inhibiteurs de calcineurine (CNI), les effets thérapeutiques étaient améliorés et une augmentation de la fonction régulatrice des Treg était observée (Poirier et al., 2010).

L'autre possibilité thérapeutique évidente pour induire une immunosuppression est d'exploiter les mécanismes d'action du CTLA-4. L'usage de protéines de fusion combinant le CTLA-4 avec un fragment d'immunoglobuline (CTLA4-Ig) fut donc très rapidement développé. Cette approche présentait l'avantage par rapport aux anticorps anti-CD28 d'éviter tous risques d'activation trop importante du système immunitaire. Les premières recherches utilisant cette protéine de fusion ont vu le jour au début des années 1990 et ont mis en évidence un potentiel thérapeutique dans de nombreuses pathologies (Finck et al., 1994; Larsen et al., 1996; Linsley et al., 1992). On peut citer notamment les excellents résultats obtenus dans le cadre du lupus chez la souris (Linsley et al., 1992). Ces travaux ont mis en lumière une diminution des réponses cellulaires médiées par les LyT mémoires. A l'inverse, les LyT sécrétant de l'interleukine 17 (IL-17) et exprimant le CCR6, définissant les lymphocytes T Th17, semblaient résistants à ce traitement. Cette absence d'effet sur les lymphocytes Th17 pourrait être un frein dans certaines maladies car ces cellules sont des acteurs importants de l'inflammation tissulaire. Un autre aspect clé dans l'utilisation de formes solubles du CTLA-4 réside dans la proportion initiale de précurseurs T spécifiques d'un antigène. La présence de cette spécificité cellulaire semble être critique dans l'efficacité régulatrice d'un

traitement par CTLA4-Ig (Ford et al., 2007). Cette notion essentielle permet d'entrevoir les possibilités ainsi que les limites d'une telle thérapie.

La majorité des résultats publiés chez la souris concernent l'utilisation du CTLA4-Ig dans des modèles de MAI qu'elles soient systémiques ou d'organe (Tableau 3). De plus, des études ont évalué son potentiel chez la souris et chez l'Homme dans l'asthme allergique. Malgré des résultats très positifs chez la souris avec l'abrogation des signes cliniques de l'asthme même après l'arrêt de la thérapie, les résultats chez l'Homme ont été très décevants (Parulekar et al., 2013). Seule une faible diminution non statistique du nombre d'éosinophiles récupérés dans les lavages broncho-alvéolaires était observée. Cet échec du CTLA4-Ig chez l'Homme dans l'allergie n'est pas isolé. En effet, pour de nombreuses pathologies auto-immunes (*e.g.* lupus, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, uvéite, SEP) les résultats des essais passés ou toujours en cours d'évaluation chez l'Homme ont été très inférieurs à ceux obtenus avec les modèles précliniques. Quelques exceptions sont cependant là pour rappeler l'intérêt d'utiliser ces thérapies. En effet, un essai dans le diabète de type I démontre un début de reprise de sécrétion d'insuline chez des patients récemment diagnostiqués (Orban et al., 2011). Par ailleurs, les très bons résultats obtenus dans la PR ainsi que dans la prévention du rejet de greffe ont permis la délivrance d'une autorisation d'utilisation pour ces deux indications.

Pathologie		Année	Journal	Nom	Hôte
Rejet de greffe	Xenogreffe pancréatique	1992	Science	Lenschow et al.	Souris
	Allogreffe de peau et de cœur	1996	Nature	Larsen et al.	Souris
Lupus érythémateux systémique		1994	Science	Finck et al.	Souris
		2014	Arthritis and Rheumatism	Fury et al.	Homme
	Glomérulonéphrite	2010	Arthritis and Rheumatism	Merrill et al.	Homme
Diabète de type I		1995	Journal of Experimental Medicine	Lenschow et al.	Souris
		2011	The Lancet	Orban et al.	Homme
Sclérose en plaques	Administration i.p.	1999	Internation Immunology	Ratts et al.	Souris
	Administration i.v.	1999	Internation Immunology	Ratts et al.	Souris
		1995	Journal of Clinical Investigation	Cross et al.	Souris
		1999	Neuroimmunology	Cross et al.	Souris
Uvéite		2015	Experimental Eye Research	Iwahashi et al.	Souris
Allergie	Asthme allergique	1997	American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	Van Oosterhout et al.	Souris
		2013	Americal Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	Parukelar et al.	Homme
Arthrite	Arthrite	1994	Science	Finck et al.	Souris
	Polyarthrite rhumatoïde	2005	New England Journal of Medicine	Genovese et al.	Homme
Colite		2002	International Immunopharmacolgy	Davenport et al.	Souris

Tableau 3. Développement du CTLA-4 sous forme soluble (CTLA4-Ig). Le CTLA4-Ig a été testé dans de nombreux désordres immunitaires chez l'Homme et la souris comprenant les maladies auto-immunes, la transplantation et l'allergie.

Chez l'Homme, le CTLA4-Ig fut développé sous le nom d'abatacept et combine la molécule CTLA-4 avec un fragment constant d'IgG1. A ce jour, deux médicaments sont autorisés : l'abatacept (Orencia®) et le belatacept (Nulojix®). Ces deux médicaments développés par le laboratoire Bristol-Myers Squibb ont été commercialisés afin de pallier un manque de thérapies sûres et efficaces pour des pathologies altérant grandement la qualité de vie des patients.

2.1.1. Abatacept (Orencia®)

L'abatacept est aujourd'hui utilisé principalement dans la PR dans les formes modérées à sévères. Cette pathologie multifactorielle, qui est la plus fréquente parmi les rhumatismes inflammatoires chroniques, est en partie caractérisée par le recrutement intra-articulaire de monocytes et de macrophages sécrétant plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines sont responsables du recrutement des lymphocytes T et d'autres cellules immunitaires menant à une inflammation importante au niveau articulaire ainsi qu'à une destruction tissulaire. Au niveau clinique, cette maladie est classiquement évaluée par une grille de score issue de l'American College of Rheumatology (ACR) permettant d'évaluer l'état global physique et psychique du patient. De cette grille découlent les notions d'ACR20, ACR50 et ACR70. Ces valeurs correspondent respectivement à une amélioration du score ACR d'environ 20%, 50%, ou 70% par rapport à une mesure préalable. D'autres scores, comme le « Health Assessment Questionnaire » (HAQ), sont également utilisés pour évaluer la pathologie. Plusieurs thérapies sont disponibles actuellement pour le traitement de la PR avec en tête de file les « disease-modifying antirheumatic drug ». Cette classe de médicaments comprend entre autres des immunosuppresseurs comme l'azathioprine, le cyclophosphamide ou d'autres molécules anti-inflammatoires comme l'hydroxychloroquine. L'abatacept comme option thérapeutique n'est arrivé qu'après l'obtention des autorisations de mise sur le marché américain en 2005 et européen en 2007, dix ans après le début des recherches chez la souris.

C'est l'essai ATTAIN, qui a permis de motiver l'autorisation délivrée pour utiliser

l'abatacept chez des patients atteints de PR évolutive et réfractaires aux autres thérapies (Genovese et al., 2005). Dans cet essai, les patients traités par abatacept présentent une amélioration largement supérieure de leur état clinique. Cette amélioration est attestée par l'augmentation du nombre de patients positifs pour le critère ACR70, ACR50 ou ACR20. De plus, le pourcentage de patients positifs pour le critère ACR20 s'est maintenu, et ce même après 1 mois sans traitement par abatacept. Malgré une utilisation moindre notamment en comparaison aux anti-TNFα, l'abatacept reste efficace et prescrit en première ligne de traitement dans certaines formes actives de la PR. D'autre part son efficacité permet dans certains cas de pouvoir améliorer significativement la qualité de vie des patients même en l'absence d'autres traitements.

2.1.2. Belatacept (Nulojix®)

L'augmentation de l'incidence de pathologies telles que le diabète a eu un impact majeur sur le nombre de transplantations notamment rénales. Malgré l'amélioration des techniques chirurgicales, le besoin de nouvelles thérapies et/ou optimisations pour maintenir une tolérance après la greffe restait nécessaire en partie par la multiplication des transplantations de donneurs allogéniques. L'utilisation de l'abatacept dans ce cadre paraissait très intéressante. Cependant, les résultats obtenus après traitement par abatacept ont été modestes et ont motivé l'utilisation de variants avec notamment le LEA29Y, autrement dénommé belatacept. Cette molécule, décrite pour la première fois en 2005, diffère de l'abatacept par une modification de deux acides aminés (L104E et A29Y) responsable d'une dissociation plus faible avec le CD80 et le CD86. Dans les expériences *in vitro*, l'activité de la molécule était 10 fois supérieure à celle de première génération (Larsen et al., 2005). Dans les premières études précliniques chez le primate, le belatacept a été comparé à l'abatacept et a démontré sa supériorité dans l'allongement de la survie des greffons rénaux. Cette amélioration clinique était accompagnée d'un allongement de la durée entre la greffe et l'augmentation de la créatinine dans le sérum (20,5 jours pour l'abatacept contre 71 jours pour le belatacept). Ceci témoigne d'une meilleure reprise de l'activité fonctionnelle du greffon après traitement par belatacept.

Chez l'homme, deux essais, BENEFIT et BENEFIT-EXT, ont évalué l'abatacept en comparaison à la cyclosporine avec comme critères d'évaluation les taux de survie des greffons et des patients (Durrbach et al., 2016; Vincenti et al., 2016). Ces deux essais qui ont duré 7 ans avec des analyses intermédiaires à 3 et 5 ans ont tous les deux mis en évidence l'avantage du belatacept dans la reprise fonctionnelle d'activité du greffon. Néanmoins, l'essai BENEFIT-EXT ne montre pas de supériorité pour le belatacept au niveau des critères principaux à l'inverse de l'essai BENEFIT. Cette dualité de résultats est due en partie au fait que les critères de don de rein étaient élargis dans l'essai BENEFIT-EXT et que les greffons étaient donc plus aptes à être rejetés. A l'heure actuelle, le belatacept est très peu utilisé sur le long terme chez les patients transplantés car aucune étude le comparant au tacrolimus n'a été effectuée alors que ce dernier est dorénavant le traitement de référence.

2.2. Thérapies basées sur la molécule PD-1

L'utilisation de PD-1 ou PD-L1 en thérapeutique est largement développée dans le domaine des thérapies cancéreuses. Le développement d'approches dans le traitement des désordres immunitaires présente également un grand intérêt. En effet, en prenant en compte le postulat que seuls les LyT activés expriment PD-1, développer de telles thérapies permettrait d'apporter une immunomodulation sélective à l'inverse des autres thérapies conventionnelles comme les corticostéroïdes ou la cyclosporine. En effet, là où les corticostéroïdes induisent des effets systémiques avec des effets secondaires parfois graves et la ciclosporine induit une dépression globale des lymphocytes T, des thérapies ciblant PD-1 ou PD-L1 permettraient de limiter les risques secondaires. Cependant très peu d'approches sont à ce jour développées dans ce sens, et la limitation principale réside dans le besoin d'une co-fixation entre PD-1 et PD-L1 ainsi qu'entre le TCR et le complexe CMH-peptide de manière co-localisée afin d'induire un blocage de ces LyT.

Une première approche développée en 2005 fut d'utiliser des cellules dendritiques modifiées afin de co-exprimer le peptide MOG35-55 ainsi que PD-L1 à leur surface (Hirata et al., 2005). Les effets de cette transfection ont été évalués, d'une part par des expériences *in vivo* de prolifération spécifique de LyT CD4+, d'autre part par

l'étude du développement de l'EAE chez des souris immunisées. L'utilisation de ces DC modifiées et administrées de manière préventive ou thérapeutique (après le déclenchement de la maladie) a permis de réduire la sévérité de la maladie. Cette efficacité clinique a été accompagnée de signes biologiques avec la réduction de l'infiltrat lymphocytaire au sein de la moelle épinière.

La deuxième approche possible est d'utiliser des vecteurs viraux afin de transduire des cellules au site d'intérêt et d'induire une immunosuppression par l'intermédiaire du PD-L1. En 2006, cette approche a été testée dans un modèle spontané d'auto-immunité chez des souris BXSB (Ding et al., 2006). L'utilisation de ces adénovirus (AdPD-L1) a induit une diminution des dépôts d'immunoglobulines, de l'infiltrat lymphocytaire et inflammatoire, ainsi que de l'atteinte histologique au niveau rénal. Ces résultats ont été en partie confirmés par des expériences *in vitro* qui ont mis en lumière l'impact de PD-L1 dans l'activation et dans la production d'anticorps par les LyB en 2016, avec en visée thérapeutique l'utilisation dans un contexte de transplantation (Buermann et al., 2016).

Une des principales limitations de l'utilisation d'agonistes de PD-1 ou de PD-L1 est également le risque d'effets secondaires graves et notamment d'infections. En effet, comme PD-1 est impliqué dans l'établissement d'une tolérance lymphocytaire mais également dans la modulation fine du répertoire des LyT, il est impératif d'exclure tout risque d'aggravation d'infections bactériennes, virales ou fongiques avec l'utilisation de ce type de molécules.

Concernant les autres points de contrôle immunitaires décrits précédemment, l'ensemble des essais précliniques et cliniques en cours ou passés ont tous exploité ces molécules afin d'accroître les réponses anti-tumorales. A l'heure actuelle, les travaux les plus avancés sont ceux évaluant LAG-3, soit sous forme soluble soit par l'intermédiaire d'anticorps dirigés contre LAG-3. Cependant, ces développements se heurtent principalement à une trop faible efficacité lorsqu'administrés seuls.

OBJECTIFS ET PRINCIPES EXPERIMENTAUX

Ce travail de thèse s'inscrit dans la lignée des recherches au sein du laboratoire, à savoir la mise au point de nouvelles thérapies dans le traitement des désordres immunitaires. L'utilisation de VLP) comme vecteur de signal de tolérance exploite le savoir-faire préexistant de l'équipe au sein de la structure tout en apportant un caractère hautement novateur en s'éloignant des applications vaccinales conventionnelles. Les objectifs initiaux de ce projet étaient multiples : (i) développer la production de VLP vectorisant un antigène par l'intermédiaire d'une fusion avec les protéines de capside mais également d'y adjoindre un signal immunorégulateur par l'intermédiaire de protéines de surface. Le CTLA-4 est à notre sens un candidat intéressant justifié par un réel recul d'utilisation dans de nombreuses MAI chez la souris et chez l'Homme et dans la possibilité de développer de nombreux tests de caractérisation et de comparaison grâce aux outils préexistants. (ii) évaluer cette thérapie sur les cellules cibles et mesurer la capacité à inhiber des réponses antigènes spécifiques et/ou induire des acteurs de la tolérance, (iii) définir l'efficacité dans des modèles murins de pathologies. Dans ce cadre, l'allergie alimentaire représente une pathologie intéressante car définie par une physiopathologie causée par des allergènes (antigènes) parfaitement caractérisés mais aussi par une exacerbation des réponses lymphocytaires Th2. Le choix de l'allergie alimentaire, pour laquelle peu de solutions existent, permet également l'action de ces VLP en utilisant des modèles d'allergies croisées. (iv) caractériser les acteurs et les mécanismes de l'établissement de la tolérance immunitaire. Au-delà de l'utilisation des VLP tolérogènes dans l'allergie alimentaire, l'objectif *in fine* de ce projet est d'entrevoir la possibilité de translation de cette thérapie dans le domaine des MAI.

Production et caractérisation des VLP

La production des VLP a été réalisée selon les mêmes procédés que ceux présentés dans plusieurs travaux de recherches publiés (Garrone et al., 2011a; Pitoiset et al., 2017). Par l'intermédiaire de cellules productrices humaines de type HEK293T, les VLP ont été générées par transfection de plasmides codant pour les protéines Gag ou Gag-Pol, les protéines de fusion Gag-eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) et Gag-OVA ainsi que pour les différentes molécules natives ou chimériques de CTLA-4. Ce recours à des formes modifiées du CTLA-4 a été effectué afin de contourner le problème de faible

expression de cette molécule causée par un signal de rétention intracellulaire présent dans la partie intra-cytoplasmique. La purification de ces particules s'est opérée à l'aide d'ultracentrifugation sur gradient de densité et a précédé la quantification et la caractérisation des constituants ainsi que la validation des lots produits. Ces dernières étapes ont été réalisées entre autres par technique de dosage BCA, ELISA, Western-Blot et par cytométrie en flux.

Étude d'efficacité des VLP tolérogènes sur les cellules cibles

Afin d'étudier le potentiel tolérogène de ces VLP, des expériences de coculture avec des DC ont été réalisées et ont permis une étude du phénotype de ces cellules en conditions activatrices ou non. Dans le but de renforcer les données obtenues, nous avons également réalisé ces analyses avec d'une part des DC issues de la rate et d'autre part des DC différenciées à partir de la moelle osseusse. Enfin, pour permettre d'envisager dans le futur un développement chez l'Homme, ces expériences ont été reproduites avec des DC dérivées de monocytes sanguins humains. Quelle que soit la condition, les analyses effectuées ont consisté en l'analyse du phénotype et de la sécrétion cytokinique ou enzymatique de ces cellules par cytométrie en flux et par quantification ELISA des surnageants de culture. La conséquence de cette modulation des DC est illustrée par les capacités d'inhibition de prolifération spécifique d'un antigène. Cette étude a été réalisée *in vitro* par la coculture de LyT et d'APC issues de souris ayant un TCR spécifique pour l'ovalbumine (souris OT-II).

Efficacité des VLP tolérogènes dans un modèle murin d'allergie alimentaire à l'ovalbumine

L'utilisation du modèle d'allergie alimentaire présente de nombreux avantages pour répondre à la question de la pertinence des VLP tolérogènes dans les désordres immunitaires et notamment celui d'avoir déjà été utilisé au sein du laboratoire dans la recherche de nouvelles thérapies immunorégulatrices (Bonnet et al., 2016). Dans le cadre de nos recherches, nous avons choisi d'administrer les VLP tolérogènes chez des souris sensibilisées à l'allergène et avant le développement des symptômes cliniques. La dose

ainsi que le schéma d'administration utilisé ont été relativement empiriques en s'appuyant essentiellement sur les données obtenues avec l'utilisation de VLP en vaccination classique. Par la suite, l'évaluation de la sévérité de la maladie s'est appuyée sur les travaux déjà publiés avec l'évaluation clinique des animaux (aspect du poil, présence ou absence de diarrhées, température corporelle), mais également par des critères biologiques (*e.g.* taux sériques d'IgE, d'IgG2a, metalloprotéases). La mise en lumière des acteurs impliqués *in vivo* dans la protection a été réalisée par le transfert de LyT régulateurs issus de souris traitées ou non par des VLP tolérogènes. Ces cellules ont ensuite été injectées à des souris naïves qui furent sensibilisées et challengées successivement. En dernier lieu, et pour répondre aux interrogations sur la spécificité d'action de ces nanoparticules, un modèle croisé d'allergie à l'ovalbumine et à la cacahuète a été mis au point.

RESULTATS

ARTICLE : Retrovirus derived Virus-like particle as tolerogenic vaccines for food allergy prevention

En attente de soumission pour Science Translational Medicine

Recombinant Virus-Like Particles displaying the CTLA-4 immune checkpoint as tolerogenic vaccines for food allergy treatment

Pierre-Axel Vinot[1,2], James Vigneron[1], Béatrice Levacher[1], Thomas Vazquez[1], Fabien Pitoiset[1,2], Faustine Brimaud[1], David Klatzmann[1,2], Bertrand Bellier[1,2*]

[1] Sorbonne Université, INSERM, Laboratoire i3 Immunologie-Immunopathologie-Immunothérapie, UMRS_959, F-75013, Paris, France

[2] Centre d'Investigation Clinique BioThérapies (CIC-BTi), APHP Pitié-Salpêtrière CHUPS-CFX, Paris, France

Corresponding author: bertrand.bellier@sorbonne-universite.fr

Background

Virus-like particles (VLPs) led to enormous progress in the field of vaccine development with several ones currently commercialized worldwide. Lately, chimeric VLP-based technology emerged and offered new therapeutic options. A variety of diverse VLP types have been proposed as vaccine platforms, and their interaction with the innate immune system is of major importance for the adaptive immune response they induce.

Objective

Here, we aimed at designing recombinant retrovirus-derived VLPs as tolerogenic vaccines. We investigated their immune-modulating properties and their efficacy to control the allergen-specific immune response.

Methods

Tolerogenic VLPs displaying the CTLA-4 immune checkpoint on their surface (tVLPs) were designed and modified to express ovalbumin (OVA) into the core ($tVLP^{OVA}$). After production and validation of the particles, we assessed their tolerogenic effect on murine and human monocyte-derived dendritic cells (DCs) by analyzing activation and maturation markers by flow cytometry and we evaluated the consequences on the antigen-specific T cell priming. The therapeutic potential of $tVLP^{OVA}$ was characterized in a mouse model of ovalbumin-induced food allergy and we questioned the importance of Tregs in the immunosuppressive effect.

Results

We demonstrated that tVLPs efficiently block upregulation of CD80 and CD86 on murine and human activated DCs and inhibit the proliferation of OVA-specific TCR-transgenic CD4+ T cells in murine model. Immunoregulatory profiles were induced by tVLPs in DCs as shown by

the IL-10 secretion or IDO expression. tVLP^{OVA} vaccination also prevented the onset of allergic symptoms and inflammation in a mouse model of OVA-induced intestinal allergy. This therapeutic effect was antigen-specific, long-lasting and supported by Foxp3^{+} Tregs as illustrated by the induction of protective effect in naïve mice after transfer of Tregs purified from vaccinated mice.

Conclusion

Recombinant retrovirus-derived VLPs can be designed to express immunomodulatory molecules and used as tolerogenic vaccines. These tVLPs open new therapeutic perspective for the treatment of allergy or autoimmune models.

Introduction

Allergic disorders are characterized by increased dysregulated immune responses driven by Th2 cell cytokines, such as interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13), which are known to be leading actors in the effector phase of the response and to be sufficient to induce the main manifestations of allergic disease. By processing and presenting antigens to naïve T cells, dendritic cells (DCs) play a key role in triggering polarization of naïve T cells into a Th2 phenotype secreting cytokines. However, DCs have also the capacities to prevent and control allergic reactions by inducing T cell hyporesponsiveness and/or regulatory T cells (Treg) (Ruiter and Shreffler, 2012). One of the potential causes of these dysregulated immune responses to harmless antigens has been attributed to a failure of Treg-mediated tolerance (Ling et al., 2004). To note, allergy is one of the clinical manifestations of patients with the immune dysregulation, polyendocrinopathy X-linked syndrome (IPEX), a Treg deficit due to a mutation of the Foxp3 (Torgerson et al., 2007). On the contrary, the induction of Tregs has been also demonstrated in successful allergen-specific immunotherapy (AIT), where they suppressed almost all aspects of Th2-mediated hypersensitivity (Chinthrajah et al., 2016; Fujita et al., 2012). As a result, alternative treatments to enhance Treg responses might be useful in prevention and treatment of allergic diseases (Bonnet et al., 2016, 2017).

Among the different forms of immunosuppressive mechanisms exploited by DCs, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) has been identified as one of the key molecular components responsible for DC-induced tolerogenesis (Pallotta et al., 2011). IDO has been shown to dominantly control the functional status of Tregs in response to inflammatory stimuli (Baban et al., 2009). Moreover, expression of IDO in immature DCs reduced Th2 cell activation and allergic airway inflammation in OVA-sensitized mice (An et al., 2011). Thus, intervention in the antigen-presenting process and/or activation of the DCs is a strategy for allergic inflammation

modulation (Lombardi and Akbari, 2009). These tolerogenic DCs show decreased expression of costimulatory molecules, such as CD80 and CD86, and reduced production of proinflammatory cytokines. The downregulation of those costimulatory molecule expression on DCs is one of the mechanisms used by Tregs through cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) to suppress immune responses. Thus, mutations of the gene encoding CTLA-4 have been associated with various autoimmune diseases (Waterhouse et al., 1995) and recent meta-analysis results suggested that specific CTLA-4 polymorphisms constitute an important risk factor for asthma susceptibility (Zheng et al., 2018). In contrast, the fusion molecule CTLA-4–immunoglobulin (CTLA4-Ig) has been shown to induce immunological tolerance in autoimmunity and allograft transplantation by blocking T cell co-stimulation and induction of IDO (Grohmann et al., 2002; Rudd and Schneider, 2003). Interestingly, it was shown in a mouse model of ovalbumin-driven asthma that CTLA4–Ig acts as a potent adjuvant to augment the therapeutic effects of allergen immunotherapy (AIT) (Maazi et al., 2013).

Currently, AIT is limited by the extracts preparation and their potentially induced harmful side effects. Indeed, the administration of soluble Ag to sensitized patients bears a considerable risk of adverse reactions, thereby necessitating slow dose escalation or coadministration of therapies that minimize anaphylaxis. Thus, there is a need for novel treatments or novel ways of antigen administration to safely induce antigen-specific tolerance. Those new therapies must answer the need of long lasting, safe and effective treatment for allergic patients. Nanoparticles and especially virus-like particles (VLPs) are ideal candidates to target DCs and deliver a tolerogenic signal that initiates allergen-specific tolerance induction. Here, we describe a tolerogenic retrovirus-derived VLP (tVLP) carrying shielded version of ovalbumin as allergen and express chimeric form of CTLA-4 on their surface.

We evaluated the capacity of tolerogenic VLPs to modulate the phenotype of DCs, their cytokine secretion profile and thus inhibit antigen-specific response initiation. Finally, we wondered if these tVLPs are effective in allergy protection in an experimental mouse model of ovalbumin food allergy.

Material and methods

Plasmids (listed in Appendix.1). pGag-pol encoding for core proteins from Murine Leukemia Virus (MuLV) is derived from pHIT60 (Soneoka et al., 1995) by promoter substitution with a minimal CMV promoter using the SacII/Xba1 unique restriction sites. pcppT.CMV-Gag/OVA is a human cytomegalovirus (hCMV) promoter driven expression lentiviral plasmid producing MLV Gag-OVA fusion protein and the ampicillin resistance protein. The OVA sequence was inserted at the C-term of Gag using the unique MluI site of restriction (Position 8683; made by Genscript®). pGag-OVA, previously described (Pitoiset et al., 2017), derives from pcDNA3.1 mammalian vector and encodes the Gag-Ova fusion protein under hCMV promoter. The pCTLA-4_{WT} plasmid encodes the wild type mCTLA-4 protein inserted in the pIRES backbone (Clontech®) using the unique EcoRI site of restriction (Position 1102). The pCTLA-4_{TM} encodes mCTLA-4 in which the transmembrane and intracytoplasmic domains were substituted with those of the vesicular stomatitis virus-derived G (VSV_G) protein and separate to extracellular of mCTLA-4 domain by the Gly-Gly-Gly-Gly-Ser flexible linker. The pCTLA-4_{GPI} encodes mCTLA-4 in which the transmembrane and intracytoplasmic domains were substituted with those of the CD59 molecule as anchoring system.

Cell lines. Human embryo kidney cells (HEK 293T; CRL-1573, ATCC), were cultured at 37 °C in 5% CO2 in DMEM medium supplemented with 2 mM of L-glutamin, 100 U/ml of penicillin and streptomycin and 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (all from

Thermo Fischer Scientific). 293T-GagGFP cells (DD7) were obtained after infection of HEK 293T cells with the recombinant lentiviral vector encoding Gag-GFP previously described. 293T-GagOVA cells were obtained after infection of HEK 293T cells with a recombinant lentiviral vector encoding GagOVA. Clonal cell line was established by both ampicillin resistance selection and limiting dilution. Positive clone for expression of eGFP or GagOVA were selected by flow cytometry based on GFP fluorescence or using anti-OVA (Agro-Bio®) and anti-MuLV Gag (clone R187, CRL-1912 cells; ATCC) mAbs after cell permeabilization.

VLP production and purification. Non-recombinant or OVA-recombinant VLPs were produced in 293T or 293T-GagOVA, respectively. Cells were seeded in 175-cm^3 culture flasks (15 x 10^6 cells per flask) and cotransfected 24 h later with 50 µg of plasmid DNA including pGag-pol added or not with pCTLA-4_{TM} or pCTLA-4_{GPI} at pre-determined ratio (2:1 pGag-pol / pCTLA-4 for tolerogenic VLPs (tVLPs); 1:2 pGag-pol / pCTLA-4 for $tVLP^{OVA}$) using calcium phosphate transfection protocol. To obtain GFP-recombinant VLPs, DD7 cells were seeded according to the same protocol as HEK 293T and cotransfected with 50 µg of pCTLA-4_{TM} or pCTLA-4_{GP}. The protocol for VLP production and purification has been previously described (Pitoiset et al., 2017), however the purification of VLP was realized by ultracentrifugation through a 3 mL 30%-50% sucrose gradient (Sigma-Aldrich). The production of VLP was quantified by protein measurement according to the bicinchoninic acid Assay method (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific).

Immunoprecipitation & immunoblot analysis. For immunoprecipitation experiments, samples (30 µg of total protein) were incubated with 1 µg of anti-mouse-CTLA-4 mAbs (clone 14D3, eBiosciences) at 4°C during 30 minutes, then mixed with 10 µL of pre-washed protein G Dynabeads (Thermo Fischer Scientific) during 1 hr. The bead-VLP complexes were washed

and beads were removed using glycine buffer (pH = 2.6; Sigma Aldrich) before Western-Blot analysis. For Western Blot analysis, samples (10 µg of total protein for VLPs or 10 ng of OVA) were mixed with LDS Sample and LDS Reducing Buffer and analyzed by electrophoresis in a 4-12% Bis Tris Gel according to manufacturer's instructions (Thermo Fischer Scientific). After protein transfer into PDVF membrane, immunostaining was performed in Tween 0.05% PBS. Antibodies used for detection were rat mAbs (clone R187, CRL-1912 cells; ATCC) recognizing the MuLV p30 Gag capsid protein, polyclonal rabbit anti-OVA (Agro-Bio). Biotinylated secondary Abs and Streptavidine-Qdot (Thermo Fischer Scientific) were used for the secondary staining. Signals were detected with a Quantum ST4-3026 (Vilber Lourmat). The amount of CTLA-4 was detected on the surface of VLPs by homemade sandwich ELISA using mAb anti-CD152 (0.2 µg/mL, clone 14D3, eBioscience) and anti-CD152 mAbs (UC10-4B9, eBioscience) and CTLA-4 His Tag (Sino Biologicals) was used as standard.

DC activation assay. Murine DCs were isolated from spleens or produced from bone marrow (BMDC) of BALB/c mice. Spleen were harvested and digested during 30 min in 10% FCS RPMI (Life technologies) with 0.1 mg/mL DNAse and Collagenase IV (Sigma Aldrich). CD3+, CD19+ and Ter119+ cells were eliminated using magnetic separation with specific biotinylated antibodies (eBiosciences) and anti-Biotin beads (30 µL/ 1.10^8 cells; Miltenyi). The remaining cells were stained for CD11c and I-A/I-E then purified using FACS® sorting (FACS-Aria, BD) by selecting $CD11c^{+}MHC\text{-}II^{hi}$ cells. Bone marrow cells were cultured for 8 days in RPMI medium supplemented with 2 mM L-Glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% heat inactivated FCS and 20 ng/mL GM-CSF. Fresh medium was added every 3 days. At day 8 for BMDC and just after sorting for the splenic DCs, the cells were plated (50.000 cells/ wells) and incubated during 24 h with 10% FCS RPMI and 20 ng/mL of GM-CSF (Miltenyi) +/- 10 µg/mL LPS (Sigma Aldrich) +/- VLPs at several concentrations.

The expression of activation markers (CD80, CD86, CD40, MHC-II) was analyzed by flow cytometry and cytokine secretion was assessed in culture supernatants by ELISA assays.

Monocytes derived dendric cells from peripheral blood of healthy donors from the Etablissement Français du Sang (EFS), APHP Saint Antoine Paris were purified from PBMC isolated on Percoll (Sigma-Aldrich) and positively selected using CD14 Human Microbeads and LS Columns (Miltenyi). CD14+ cells were then cultured during 5 days at 37°C, 5% CO_2 in RPMI (Gibco) supplemented with 2 mM L-Glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% heat inactivated FCS, rIL-4 (20 ng/mL) and rGM-CSF (100 ng/mL). On day 5, moDC were activated or not with TNF-α (100 ng/mL) +/- tVLP. After 24 hours, moDC were analyzed by flow cytometry using HLA-DR-FITC, CD86-APC, CD80-PE, CD11c-PEVio615 (Miltenyi) and IDO-PC7 (intracellular staining - Thermo Fischer Scientific).

In vitro proliferation of antigen specific CD4+ T cells. Spleens and mesenteric lymph nodes (mLN) cells were collected from OT-II Foxp3-GFP mice. Non-Treg T cells (Tconv) were isolated from spleen and mLN by negative selection using biotin-conjugated antibodies specific for Ter119, CD19 and CD8 (all from BD Biosciences) and anti-biotin microbeads (30 µL/ 1.10^8 cells; Miltenyi). $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ cells were then selected by fluorescence activating cell sorting (FACS ARIA, BD). Prior to culture, irradiated splenocytes (25 Gy) were incubated with either peptide $OVA\text{-}II_{323\text{-}339}$ (5 µg/mL, Genscript) or protein OVA (200 µg/mL, Sigma Aldrich) during respectively 1 or 4 hours and OT-II cells stained with CellTrace Violet (CTV, Thermo Fischer Scientific) according to the manufacturer's recommandations. In a 96-well plate, 10^5 OT-II CTV+ cells were cultured in RPMI medium supplemented 20 ng/mL of GM-CSF (Miltenyi) and 10% heat-inactivated FCS, with 5.10^5 pre-incubated splenocytes in presence of 1, 5 or 10 µg/mL of VLPs +/- mCTLA-4, or medium in controls. After 2 and 3 days, proliferation and activation of CTV^+ Tconv cells were analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry. Isolated cells were stained with the following Abs at predetermined optimal dilutions for 20 min at 4˚C: Live Dead-e780, CD11c-PE, I-A/I-E – v500, CD80-e450, CD86-PeCy7, and CD40-APC to analyze mouse dendritic cells, HLA-DR-FITC, CD86-APC, CD80-PE, CD11c-PEVio615 (Miltenyi) for human dendritic cells, CD3-PETR, CD8-Alexa700, CD25-PeCy7 (eBioscience), CD4-HorizonV500 (BD) to analyze T cells. Intracellular detection of IDO-PeCy7 (eBioscience) was performed on fixed and permeabilized cells using a CytoFix/CytoPerm kit buffer (eBioscience). All cytometry experiments were performed on a BD LSRII or a Cytoflex S (Beckman Coulter) cytometer and data were analyzed using FlowJo Software (Treestar Inc). For flow cytometry analysis of VLPs, 20 µg of VLPs were incubated with 5 µL of 4 µm diameter aldehyde/sulfate latex beads (Thermo Fischer Scientific) for 15 min at room temperature, and washed with PBS (qsp 1 mL) during 1 h. Blocking solution was added (20 µL of FCS) for 30 min and after three washings, anti-CD152-PE (eBiosciences) was added in 2% BSA in PBS for 1 h. For intra-VLP staining, beads were incubated in Triton 1% PBS during 1 h and then incubated with primary antibodies (anti-MuLV p30 and anti-OVA previously mentionned) and secondary antibodies in 0.1% Triton PBS. Finally, beads were washed and resuspended in 200 µL PBS for flow cytometry analysis using a LSRII (Beckton Dickinson).

ELISA assays. OVA-specific IgE and IgG_{2A} titers were quantified in sera of sensitized mice using homemade ELISA. OVA (500 ng/well; Sigma Aldrich) was coated in flat-bottom 96-well plates (Nunc, Denmark) at 4°C overnight. After washing and blocking nonspecific binding sites with 1% BSA PBS for 1 h at RT, 100 µL of diluted serum samples were added to each well and incubated for 2 h at RT. OVA-specific IgE and IgG_{2A} were detected with specific biotinylated antibodies (Southern Biotech) and revealed with peroxidase-conjugated

streptavidin (Sigma-Aldrich) and TMB at room temperature for 5 min. The reaction was stopped by adding 100 µL HCl (1M) and the OD was read at 450 nm using an automatic ELISA plate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter). mMCPT-I levels were measured using Ready Set Go ELISA assays (Thermo Fischer Scientific) according to the manufacturer's recommendations.

Mice. Seven-week-old BALB/C (AnNR/j) female mice were purchased from Janvier Labs. OT-II mice (B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J) were bred with C57BL/6 Foxp3+ (C57BL/6-Tg(Foxp3-GFP) mice in the Centre d'Expérimentation Fonctionnelle UMS28. Mice were maintained in our animal facility (CEF UMS28) under specific pathogen-free conditions in agreement with current European Union legislation on animal care, housing, and scientific experimentation. All procedures were approved by the local ethics animal committee.

Food allergy model and treatment. Mice were sensitized twice at 1-wk interval by *i.p.* injection of 10 µg of OVA (A5503; Sigma-Aldrich) mixed with 500 µg aluminum hydroxide (Imject Alum; Thermo Fischer Scientific). Three days after sensitization, mice were injected with 30 µg of VLPs (total protein) every day for 5 days. Allergy was then induced 3 days later by OVA *p.o* administrations (20 mg/mouse) every two to three days. Severity of allergic response was assessed 30-45 min after the last induction by measuring changes in body temperature using a rectal thermometer (Bioseb) and by evaluating clinical score as previously described (Bonnet et al., 2016). Mice sera were collected at different time points and stored at -80°C until their analysis by ELISA for immunoglobulins.

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated with GraphPad Prism (GraphPad Software) using Mann-Whitney U test (comparison of rank, unpaired, nonparametric test, two-tailed, α *risk = 5%*) with **p*<0,05 taken as statistical significance (**p<0,01; ***p<0,001).

Results

Design and characterization of tolerogenic VLP

As a candidate vaccine for the treatment of immune disorders, we designed MLV-derived pseudo-particles carrying ovalbumin (OVA) as antigen and displaying CTLA-4 on their surface ($tVLP^{OVA}$) (Fig. 1a). To this end, fusion GagOVA gene sequence was designed and used for cell transfection as described in *Material and Methods* in association with GagPol and GagPol/mCTLA-4 plasmid DNA for VLP^{OVA} and $tVLP^{OVA}$ production, respectively. In order to increase the amount of CTLA-4 expressed on VLPs, we compared either the native or two chimeric forms of CTLA-4 that express heterologous anchoring domains derived from the G protein of vesicular stomatitis virus (VSV_G) or the transmembrane glycosylphosphatidylinositol (GPI) domain of $CD59_b$.

The ability of GagOVA to self-assemble into VLPs was validated by Western blot analysis of transfected cell supernatant after density gradient centrifugation. Specific antibody reacting against the capsid of MuLV (anti-p30) recognizes all three major proteins (p30 and the two uncleaved combined form of p12 and p15 at respectively 30, 42 and 67 kDa) in the VLP^- preparation (Fig. 1b). With the VLP^{OVA} batch, a higher main band corresponding to the GagOVA fusion protein was observed in addition to the major forms of Gag. It was confirmed with anti-OVA antibody that reveals two specific bands at 45 and 75 kDa corresponding to

respectively unbound OVA and the GagOVA fusion protein. Moreover, when VLP^{OVA} were analyzed by flow cytometry, both OVA and Gag proteins were detected after permeabilization of the particles (Fig E1a). The expression of CTLA-4 on the surface of tVLPs was formally demonstrated by immunoprecipitation, revealing Gag proteins on Western blot of anti-CTLA-4 immunoprecipitated tVLP samples (Fig. 1c), but not with VLP^{-}.

As we wanted to select the most potent tolerogenic VLPs, we compared the level of expression of the different chimeric form of CTLA-4, analyzing both the VLPs and the producing cells by flow cytometry. While native CTLA-4 (CTLA-4_{wt}) was expressed poorly both on cells and VLPs, the replacement of the transmembrane and intracellular domains by either those of VSV-G (CTLA-4_{TM}) or CD59b (CTLA-4_{GPI}) proteins significantly boosted the CTLA-4 expression (Fig. 1d). Interestingly, the GPI domain of CD59b was the anchoring system allowing the highest expression of CTLA-4 among other tested and was selected for further studies (2.5 -fold increase for GPI anchoring *vs* VSV_G). We also quantified the CTLA-4 by ELISA and measured an average percentage of 13% ± 2% for $tVLP^{OVA}$ and 8% ± 0.3% for tVLP of CTLA-4 among the total proteins, corresponding to a mean dose of 150 µg/mL of CTLA-4 for both tVLP and $tVLP^{OVA}$ (Fig. 1F).

tVLP controls mouse dendritic cell activation and cytokine secretion

To study the effect of tVLPs on DC activation, we incubated tVLP expressing GFP ($tVLP^{GFP}$) with mouse splenic DCs exposed to LPS. We confirmed that $tVLP^{GFP}$ were uptaken by DCs since 99.4% of the cells are GFP+ (Fig. 2a). After 24h, LPS resulted in an up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules as compared to medium that was blocked by tVLPs (Fig. 2b). Indeed, a strong decreased expression of costimulatory molecules (*ie.* CD80

and CD86) was observed, even reaching lower level of expression than without activation signals, as shown by the fold changes of the geometric mean fluorescence intensity (gMFI) of CD80 and CD86 molecules (Fig. 2c). Interestingly, tVLPs have no significant impact or slightly increase the expression of MHC-II and CD40 in comparison to the LPS condition (Fig. 2c).

Similar experiments were renewed with bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) (Fig. 2d). To note, the level of expression of CD80 after LPS activation was much higher in BMDCs than in splenic DCs, nonetheless tVLPs were still effective to block significantly this increase (5.8 *vs* 1.5-fold increase). However, the LPS-induced upregulation of CD86 was only partially inhibited by tVLPs (11.8 *vs* 8-fold increase; p=0.083). We also confirmed that tVLPs had no effect on the fluctuation of MHC-II (2.1 *vs* 2.3-fold increase) and CD40 (8.2 *vs* 8.2-fold increase) expression (Fig. 2d). Importantly, we demonstrated a dose-dependent effect of tVLPs on costimulatory molecules with mild regulation starting from the range of 1 µg/mL (Fig. 2e). Cytokine secretion was also analyzed by ELISA and no significant specific alteration was observed for IL-4 and IL-12 with tVLPs when BMDC were activated with LPS. However, IL-10 was drastically increased when LPS-activated DCs were cultured with tVLPs, suggesting a tolerogenic phenotype (Fig. 2f).

tVLP controls human dendritic cell activation

To further investigate the potential of tVLPs to induce tolerance in humans, we translated the previous experiments by using human monocytes-derived DCs activated or not by TNF-α. We observed a decreased expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules when we added tVLPs regardless of the presence or not of the activation signal (Fig. 3a). Indeed, expression of CD80 and CD86 was increased with TNF-α but was totally inhibited

when tVLPs were added (2.0 *vs* 0.5-fold increase of CD80 gMFI; 1.6 *vs* 0.5-fold increase of CD86 gMFI). tVLPs also slightly diminished the HLA-DR expression (0.8-fold change for tVLP and tVLP + TNF-α) while TNF-α had no significant effect (Fig. 3c). Since DCs expressing low levels of CD80 and CD86 are frequently described as tolerogenic cells, we assessed the ability of tVLPs to induce this type of cells. We analyzed the proportions of $CD80^{low}CD86^{low}$ DC cells and observed that tVLPs significantly increased the proportion of tolerogenic DCs even with TNF-α, whereas TNF-α alone increased the proportion of activated $CD80^{hi}CD86^{hi}$ DCs (69,37% vs 40.6% in control group) (Fig. 3b).

We also investigated the ability of our tolerogenic vaccine to induce IDO production that has been shown to compromise T cell proliferation, promote T cell anergy and Tregs. The proportion of IDO^{+} DCs was significantly increased when cells were incubated with tVLPs and TNF-α, but not when either tVLPs or TNF-α were added (Fig. 3d and 3e). Since other antigen presenting cells (APC) such as B cells can take in charge and process VLPs, we assessed the effect of tVLPs on $CD19^{+}$ cells. Upon activation signals (*ie* CpG and CD40L), a significant increase of CD86 was observed on B cells that was fully abrogated in presence of tVLPs (Fig. Supp. 3). However, no impact of tVLPs was observed on CD80 and IDO expression in B cells (Fig Supp 3).

tVLP inhibits antigen-specific CD4+ T cells proliferation

Given the striking inhibition of APCs activation with tVLPs, we next sought to determine the vaccine efficacy to block antigen specific responses. Thus, OVA-specific naïve CD4+ T cells isolated from OT-II transgenic mice were further stained by CellTraceViolet® and cultured with APCs loaded with $OVA_{323-339}$ peptide or OVA protein in the presence or absence of tVLPs. After 2 days of culture with $OVA_{323-339}$ peptide, OT-II cells proliferated with

a maximum of 5 divisions (Figure 4A) that can be improved when control VLPs$^-$ (without CTLA-4) were added in the culture. In contrast tVLPs significantly blocked this proliferation as shown by the lower percentage of divided cells, and more efficiently than CTLA4-Ig used as control. We calculated the suppression index for each condition and assessed the dose-response relation between tVLP and suppression after 2 or 3 days of culture (Figure 4B-C). Using OVA peptide or protein, we confirmed that tVLPs efficiently suppress in a dose-dependent manner the T-cell proliferation, even if the overall suppression was lower with the peptide. In all conditions, the supremacy of tVLPs to control T-cell priming was reported.

tVLP protects against severe allergic reactions in a murine model of OVA-specific food-induced anaphylaxis

Investigating the therapeutic potential of our vaccine to induce immune tolerance required its application in a murine model of food allergy. Therefore, we treated sensitized mice with daily injections of tVLPs were for 5 days, after immunization with OVA in alum adjuvant, followed by multiple cycles of oral challenges with OVA to induce anaphylaxis (Fig.5a). A 5 days-course of tVLP^{OVA} injections significantly inhibited the OVA-induced anaphylaxis throughout the multiple challenge cycles (Fig E3a). When we focus on dates at which the highest allergic reactions were measured in control mice (days 24, 33 and 160), we observed a significant decrease of the clinical symptoms (*i.e.* piloerection and diarrhea) but also less prone body temperature drops in tVLP^{OVA}-treated mice compared to VLP$^-$ controls (Fig. 5b and Fig E3b). This long-term modulation of allergen reaction was correlated with a lower increase of OVA-specific IgE titers in treated mice compared to controls at day 160 (Fig. 5c). We also demonstrated a dose-depend protective effect of vaccination since mice injected once or three

times with tVLP^{OVA} had significantly higher symptoms and temperature drops than mice treated with the 5-day course of vaccination (Fig. 5d).

Importantly, neither CTLA-4^{+} VLPs lacking OVA (tVLP^{-}) nor OVA^{+} VLPs lacking CTLA-4 (VLP^{OVA}) were able to induce a significant protection in challenged mice both on clinical symptoms and body temperature drops (Fig. E3a). The specificity of the therapy was formally addressed by sensitizing and challenging OVA-protected mice with peanut allergens. Thus, mice were successively OVA-sensitized, tVLP^{OVA}-vaccinated and OVA-challenged and then sensitized and i.v. challenged with peanut. No protection against peanut anaphylaxis was observed in tVLP^{OVA}-vaccinated mice, after body temperature drop measurement and comparison with placebo vaccination (Fig. 5e). However, when an ultimate OVA i.v. challenge was performed, tVLP^{OVA}-vaccinated mice showed lower body temperature decrease, highlighting the specificity of the protection provided by tVLP vaccination.

tVLP induces a Treg-dependent immunomodulation of allergy

We next evaluated if Tregs are associated with the suppressive effect of tVLPs. CD4^{+}CD25^{hi} T cells were isolated from tVLP^{OVA} vaccinated mice, which were protected after two cycles of p.o. OVA challenges (Fig. 6a), and then transferred into naïve mice before the beginning of the induction protocol for OVA specific anaphylaxis. During the following 3 cycles of allergy, mice transferred with Tregs from tVLP^{OVA} donors developed a significant less severe allergy with lower clinical scores and no body temperature loss, in contrast to mice who received Tregs from VLP^{-}-treated mice (Fig. 6b).

Discussion

We here show for the first time at our knowledge that VLP carrying shielded versions of allergen and expressing CTLA-4 as tolerogenic signal might be of interest in the long-term and specific prevention of allergy. VLP represents a novel and versatile platform for the in vivo delivery of allergens and prevent allergies. Strategies that express allergens either inside the particles (Kratzer et al., 2018) or at the surface (Engeroff et al., 2018) have been recently described but neither in association with immunoregulatory molecules. Despite the fact that expressing allergens on the surface of the particles triggers the production of allergen-specific IgG and thus be effective to inhibit IgE-binding on mast cells or basophils, VLPs carrying allergens inside the capside features an interesting way to deliver a tolerogenic signal. The main advantage to carry allergen inside the particle is to avoid their recognition by preformed IgE bound to FcERI and thus mast cell degranulation. Thereby, recombinant VLP elude the risk of inducing anaphylaxis when applied to sensitized individuals in vivo. However, additional signals of tolerance seem to be required in order to induce a strong, long lasting and therapeutic effect in food allergy, as shown by the poor efficacy of the VLPOVA vaccine compared to the tVLPOVA candidate to control anaphylaxis in OVA-induced food allergy model. While retrovirus-derived enveloped VLPs (eVLPs) were initially proposed for standard vaccination (Pitoiset et al., 2015) and reach successfully phase I clinical trials, here we first highlighted the ability to specifically design eVLP for tolerogenic vaccination. By linking CTLA-4 on the particles, we modify their immune properties and their immunogenicity as show in the proliferative assays (Figure 4). However, using native form of CTLA-4 was not efficient to display sufficient quantity of molecules on the surface of the VLPs, therefore underlying the need of genetically engineered anchoring domain. New systems such as the Spy catch technology (Brune et al., 2016) have been recently described to easily display molecules, but not applicable for retrovirus-derived VLP. Thus, we decided to use GPI based anchoring system that allow strong expression and stability (Wojta-Stremayr et al., 2015). Moreover, GPI domain

are known to be expressed in lipid rafts region of the cell membrane, where the VLP budding occurs (Chazal and Gerlier, 2003). By using this anchoring system, we were able to display high amount of CTLA-4 on the surface and effectively target DCs (Figure 2). We report that tVLPs modulate DCs by decreasing expression of CD80 and CD86 and thus inducing one of the key characteristics of the iDC or tolDC phenotype (Maldonado and Andrian, 2010). On the contrary, CD40 on DCs was not modulated by tVLPs, but its specific role in tolerance induction is still controversial (Flórez-Grau et al., 2018; Tuettenberg et al., 2010). Moreover, IL-10 production remains the main characteristic of tolDCs (Comi et al., 2018) as it is a powerful anti-inflammatory cytokine that plays an essential role in dampening immune responses and in preventing chronic inflammatory pathologies including allergy (Akdis and Akdis, 2014). By increasing IL-10 production without modulating IL-4 secretion, tVLPs alleviated DC cytokine production to promote tolerance. Indeed, DC producing high levels of IL-10 have been highlighted as potent inducer of Tr1 cells and therefore dampen autoimmune disorders (Comi et al., 2018). Moreover, we highlighted the role of tVLPs to increase IDO production in human moDC. This modulation mediated by CTLA-4 binding may also be of interest in tolerance induction by promoting anergy through increased tryptophan catabolism (Platten et al., 2012) and Tregs induction (Baban et al., 2009). Indeed, anergic modulation of IDO contributes to tolerance induction during subcutaneous allergen immunotherapy by reducing Th2 cytokines production (Taher et al., 2008). Overall, the results on both murine and human DCs suggest a strong tolerogenic role for tVLPs that was confirmed by the inhibition of antigen-specific cell priming in our in vitro experiments.

To assess the ability to effectively control food allergy, we vaccinated mice after the sensitization with a 5-day course of complete and incomplete VLPs. Only the VLP expressing both the allergen and CTLA-4 (tVLPOVA) was able to induce long-term protection against anaphylaxis as shown by low clinical symptoms and absence of severe body temperature drop

in contrast to other control VLPs (tVLP, VLPOVA). Despite previous report showing that VLPs expressing only antigen have protective effects in a preventive model of pollen allergy (Kratzer et al., 2018), here we show the requirement to combine VLPs with immunoregulatory signal to provide efficient and long-term therapeutic effect in food allergy model. Interestingly, VLPs expressing CTLA-4 alone were also ineffective to control anaphylaxis in our model, highlighting the specificity of action of this therapy. Indeed, we showed that treating mice with tVLPOVA was ineffective in the prevention of other food allergies. The underlying mechanisms of this antigen-specific long-term protection are not fully characterized, though previous study suggests that VLP are subject of uptake by natural pro tolerogenic dendritic cells that induce Foxp3+ Tregs (Kratzer et al., 2018). We here confirm the Treg mediated effect of VLP as the protection can be transferred to naïve mice. However, this modulation was not responsible for a significant decreased level of IgE, nor an increased level of protective IgG2A (data not shown). Thus, other mechanisms, such as Tr1 induction and or T cell phenotypic skewing, need to be further investigated for future development.

References

Akdis, C.A., and Akdis, M. (2014). Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs. J. Clin. Invest. 124, 4678–4680.

An, X., Bai, C., Xia, J., Dang, T., and Qian, P. (2011). Immature Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Suppress Ovalbumin-Induced Allergic Airway Inflammation in Mice. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 21, 185–192.

Baban, B., Chandler, P.R., Sharma, M.D., Pihkala, J., Koni, P.A., Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2009). IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like T Cells. J. Immunol. 183, 2475–2483.

Bonnet, B., Vigneron, J., Levacher, B., Vazquez, T., Pitoiset, F., Brimaud, F., Churlaud, G., Klatzmann, D., and Bellier, B. (2016). Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell-Mediated Control of Experimental Food Allergy. J. Immunol.

Bonnet, B., Vinot, P.A., and Bellier, B. (2017). Cibles et immunothérapies innovantes dans le traitement de l'allergie alimentaire. Rev. Fr. Allergol. 57, 327–336.

Brune, K.D., Leneghan, D.B., Brian, I.J., Ishizuka, A.S., Bachmann, M.F., Draper, S.J., Biswas, S., and Howarth, M. (2016). Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. Sci. Rep. 6, 19234.

Chazal, N., and Gerlier, D. (2003). Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 226–237.

Chinthrajah, R.S., Hernandez, J.D., Boyd, S.D., Galli, S.J., and Nadeau, K.C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. J. Allergy Clin. Immunol. 137, 984–997.

Comi, M., Amodio, G., and Gregori, S. (2018). Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells. Front. Immunol. 9, 682.

Engeroff, P., Caviezel, F., Storni, F., Thoms, F., Vogel, M., and Bachmann, M.F. (2018). Allergens displayed on virus-like particles are highly immunogenic but fail to activate human mast cells. Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol. 73, 341–349.

Flórez-Grau, G., Zubizarreta, I., Cabezón, R., Villoslada, P., and Benitez-Ribas, D. (2018). Tolerogenic dendritic cells as a promising antigen-specific therapy in the treatment of multiple sclerosis and neuromyelitis optica from preclinical to clinical trials. Front. Immunol. 9, 1–10.

Fujita, H., Soyka, M.B., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2012). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Clin. Transl. Allergy 2, 2.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat. Immunol. 3, 1097–1101.

Kratzer, B., Köhler, C., Hofer, S., Smole, U., Trapin, D., Iturri, J., Pum, D., Kienzl, P., Elbe-Bürger, A., Gattinger, P., et al. (2018). Prevention of allergy by virus-like nanoparticles (VNP) delivering shielded versions of major allergens in a humanized murine allergy model.

Ling, E.M., Smith, T., Nguyen, X.D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V.A., and Robinson, D.S. (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. Lancet 363, 608–615.

Lombardi, V., and Akbari, O. (2009). Dendritic cell modulation as a new interventional approach for the treatment of asthma. Drug News Perspect. 22, 445–451.

Maazi, H., Shirinbak, S., den Boef, L.E., Fallarino, F., Volpi, C., Nawijn, M.C., and van Oosterhout, A.J.M. (2013). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4-immunoglobulin G is a potent adjuvant for experimental allergen immunotherapy. Clin. Exp. Immunol. 172, 113–120.

Maldonado, R., and Andrian, U. Von (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells.

Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. Nat. Immunol. 12, 870–878.

Pitoiset, F., Vazquez, T., and Bellier, B. (2015). Enveloped virus-like particle platforms: vaccines of the future? Expert Rev. Vaccines 14, 913–915.

Pitoiset, F., Vazquez, T., Levacher, B., Nehar-Belaid, D., Dérian, N., Vigneron, J., Klatzmann, D., and Bellier, B. (2017). Retrovirus-Based Virus-Like Particle Immunogenicity and Its Modulation by Toll-Like Receptor Activation. J. Virol. 91, 1–14.

Platten, M., Wick, W., and Van Den Eynde, B.J. (2012). Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. Cancer Res. 72, 5435–5440.

Rudd, C.E., and Schneider, H. (2003). Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 3, 544–556.

Ruiter, B., and Shreffler, W.G. (2012). The role of dendritic cells in food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 129, 921–928.

Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M., and Kingsman, A.J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. Nucleic Acids Res. 23, 628–633.

Taher, Y.A., Piavaux, B.J.A., Gras, R., van Esch, B.C.A.M., Hofman, G.A., Bloksma, N., Henricks, P.A.J., and van Oosterhout, A.J.M. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model. J. Allergy Clin. Immunol. 121, 16–18.

Torgerson, T.R., Linane, A., Moes, N., Anover, S., Mateo, V., Rieux-Laucat, F., Hermine, O., Vijay, S., Gambineri, E., Cerf-Bensussan, N., et al. (2007). Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the Foxp3 gene. Gastroenterology 132, 1705–1717.

Tuettenberg, A., Fondel, S., Steinbrink, K., Enk, A.H., and Jonuleit, H. (2010). CD40 signalling induces IL-10-producing, tolerogenic dendritic cells. Exp. Dermatol. 19, 44–53.

Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, a, Shahinian, a, Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science 270, 985–988.

Wojta-Stremayr, D., Neunkirchner, A., Srinivasan, B., Trapin, D., Schmetterer, K.G., and Pickl, W.F. (2015). CD8+ T Cell Fate and Function Influenced by Antigen-Specific Virus-Like Nanoparticles Co-Expressing Membrane Tethered IL-2. PLoS One 10, e0126034.

Zheng, Y., Wang, H., Luo, L., Liao, L., You, L., Wang, J., and Li, Q. (2018). A meta-analysis of the association between CTLA-4 genetic polymorphism and susceptibility of asthma. Medicine (Baltimore). 97, e11380.

Acknowledgements

We thank the staff at Centre d'Experimentation Fonctionnelle (UMS 28 – Sorbonne Université Site Pitié-Salpêtrière) for taking care of the mice, Gwladys Fourcade for mice breeding assistance,Wing Yan Yuen and Bruno Gouritin for technical assistance.

Disclosures

The authors declare no financial conflitcs of interest

Figure 1

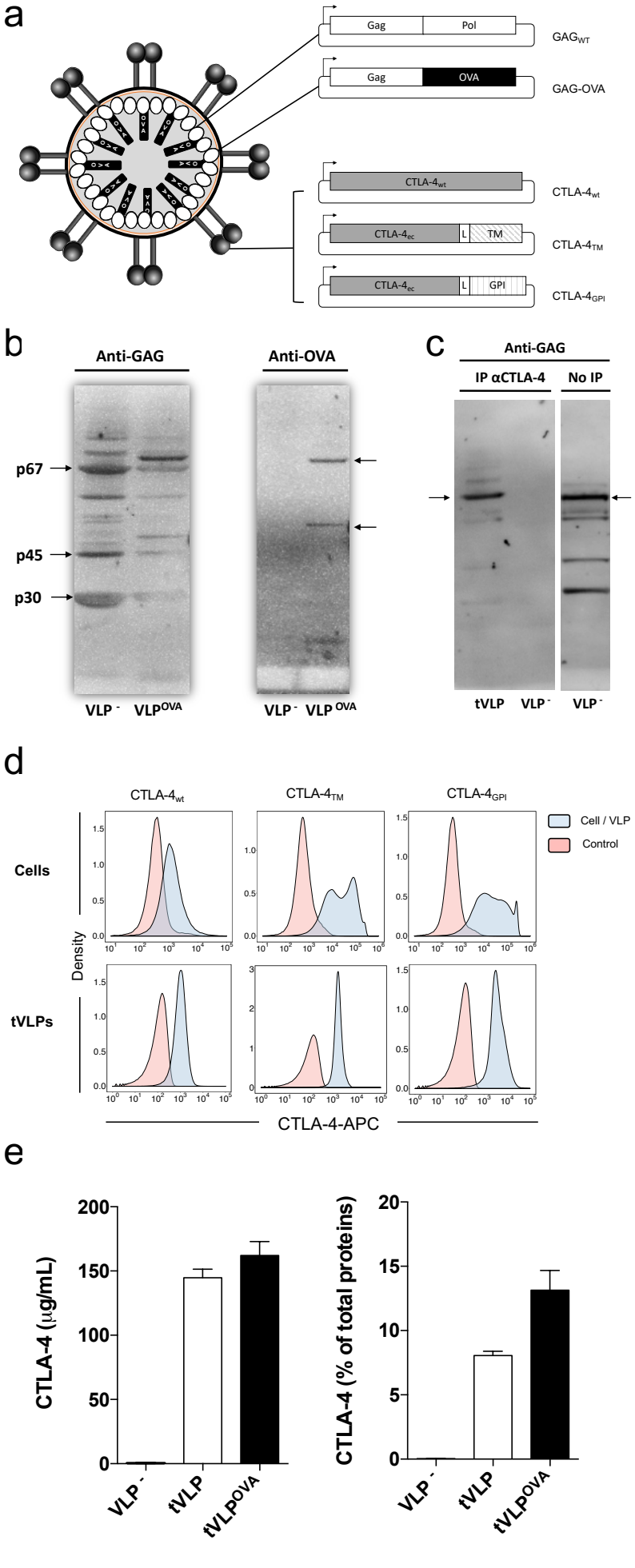

a
Gag
Pol
GAG$_{WT}$
Gag
OVA
GAG-OVA
CTLA-4$_{wt}$
CTLA-4$_{wt}$
CTLA-4$_{ec}$
L
TM
CTLA-4$_{TM}$
CTLA-4$_{ec}$
L
GPI
CTLA-4$_{GPI}$
b
Anti-GAG
Anti-OVA
p67
p45
p30
VLP$^-$
VLP^{OVA}
VLP$^-$
VLP^{OVA}
c
Anti-GAG
IP αCTLA-4
No IP
tVLP
VLP$^-$
VLP$^-$
d
CTLA-4$_{wt}$
CTLA-4$_{TM}$
CTLA-4$_{GPI}$
Cell / VLP
Control
Cells
tVLPs
Density
CTLA-4-APC
e
CTLA-4 (μg/mL)
200
150
100
50
0
VLP$^-$
tVLP
tVLP^{OVA}
CTLA-4 (% of total proteins)
20
15
10
5
0
VLP$^-$
tVLP
tVLP^{OVA}

Figure 2

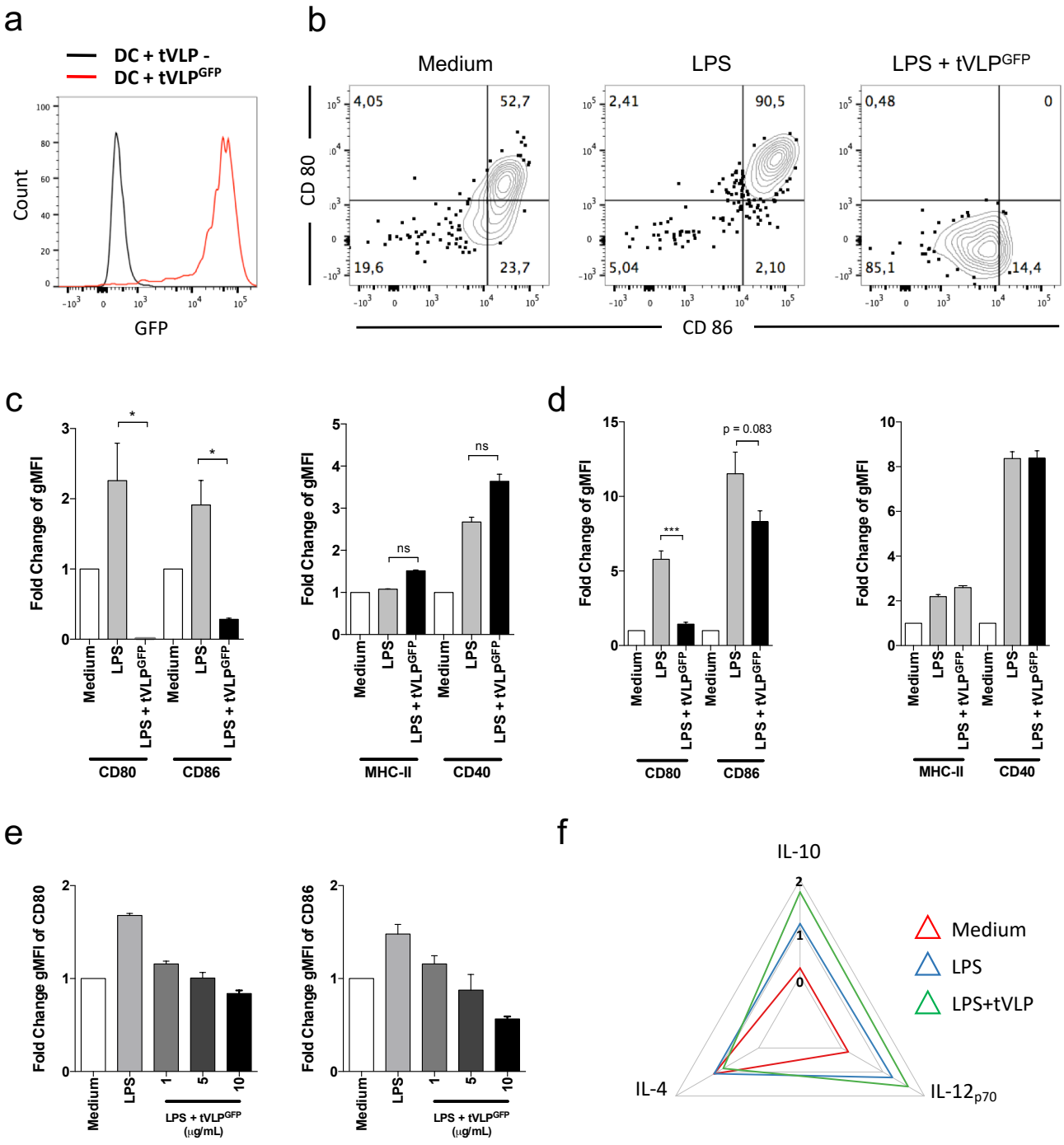

a
DC + tVLP -
DC + tVLP^GFP
Count
GFP
b
Medium
LPS
LPS + tVLP^GFP
CD 80
CD 86
4,05
52,7
19,6
23,7
2,41
90,5
5,04
2,10
0,48
0
85,1
14,4
c
Fold Change of gMFI
Medium
LPS
LPS + tVLP^GFP
CD80
CD86
MHC-II
CD40
ns
d
p = 0.083
***
e
Fold Change gMFI of CD80
Fold Change gMFI of CD86
LPS + tVLP^GFP (µg/mL)
f
IL-10
IL-4
IL-12p70
Medium
LPS
LPS+tVLP

Figure 3

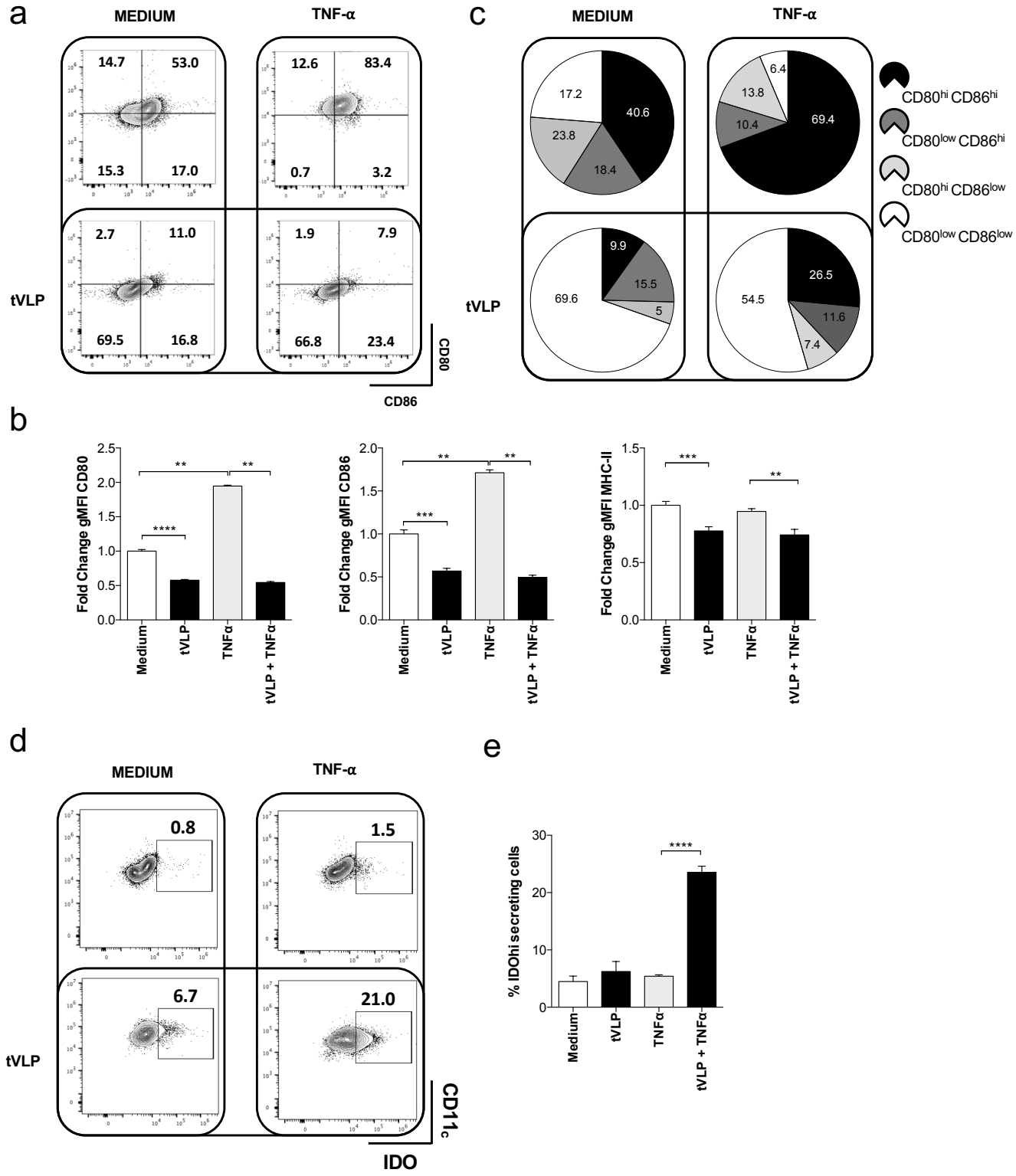
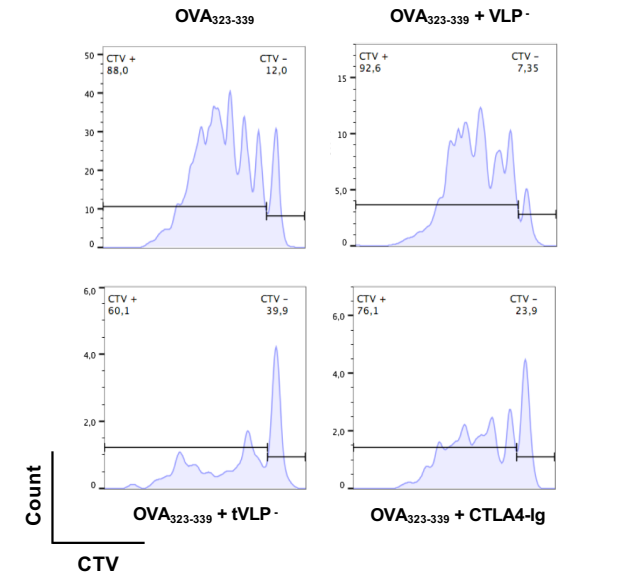
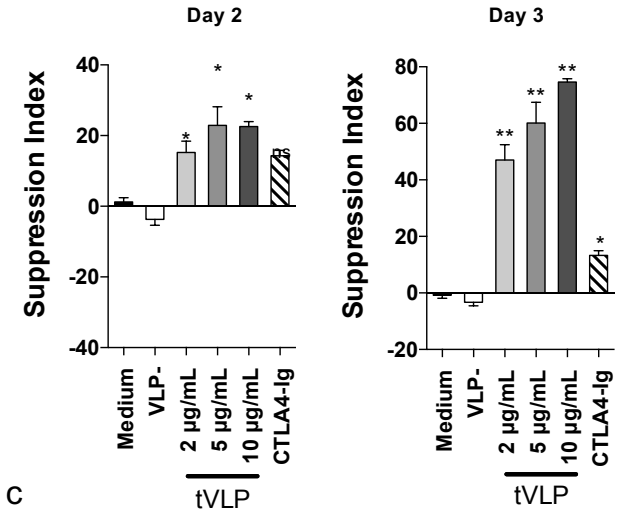

a
MEDIUM
TNF-α
14.7
53.0
15.3
17.0
12.6
83.4
0.7
3.2
tVLP
2.7
11.0
69.5
16.8
1.9
7.9
66.8
23.4
CD80
CD86
c
MEDIUM
TNF-α
17.2
40.6
23.8
18.4
6.4
13.8
10.4
69.4
CD80hi CD86hi
CD80low CD86hi
CD80hi CD86low
CD80low CD86low
tVLP
9.9
15.5
69.6
5
26.5
54.5
11.6
7.4
b
Fold Change gMFI CD80
Fold Change gMFI CD86
Fold Change gMFI MHC-II
Medium
tVLP
TNFα
tVLP + TNFα
d
MEDIUM
TNF-α
0.8
1.5
tVLP
6.7
21.0
CD11c
IDO
e
% IDOhi secreting cells

Figure 4


a
OVA323-339
OVA323-339 + VLP-
CTV +
88,0
CTV -
12,0
CTV +
92,6
CTV -
7,35
CTV +
60,1
CTV -
39,9
CTV +
76,1
CTV -
23,9
Count
CTV
OVA323-339 + tVLP-
OVA323-339 + CTLA4-Ig


b
Day 2
Day 3
Suppression Index
Medium
VLP-
2 µg/mL
5 µg/mL
10 µg/mL
CTLA4-Ig
tVLP

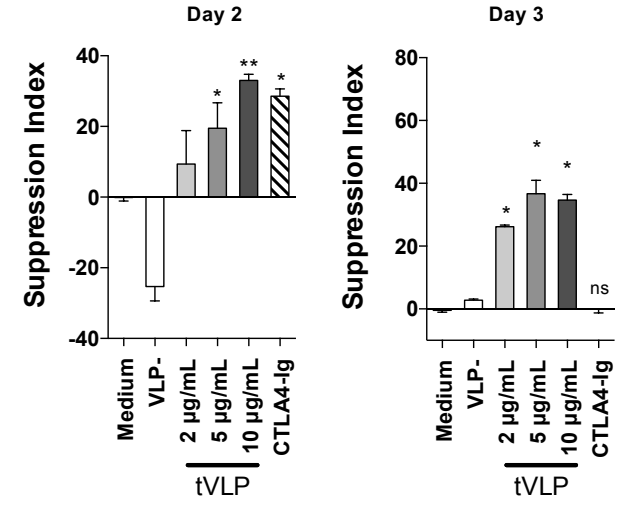

c
Day 2
Day 3
Suppression Index
Medium
VLP-
2 µg/mL
5 µg/mL
10 µg/mL
CTLA4-Ig
tVLP
ns

Figure 5

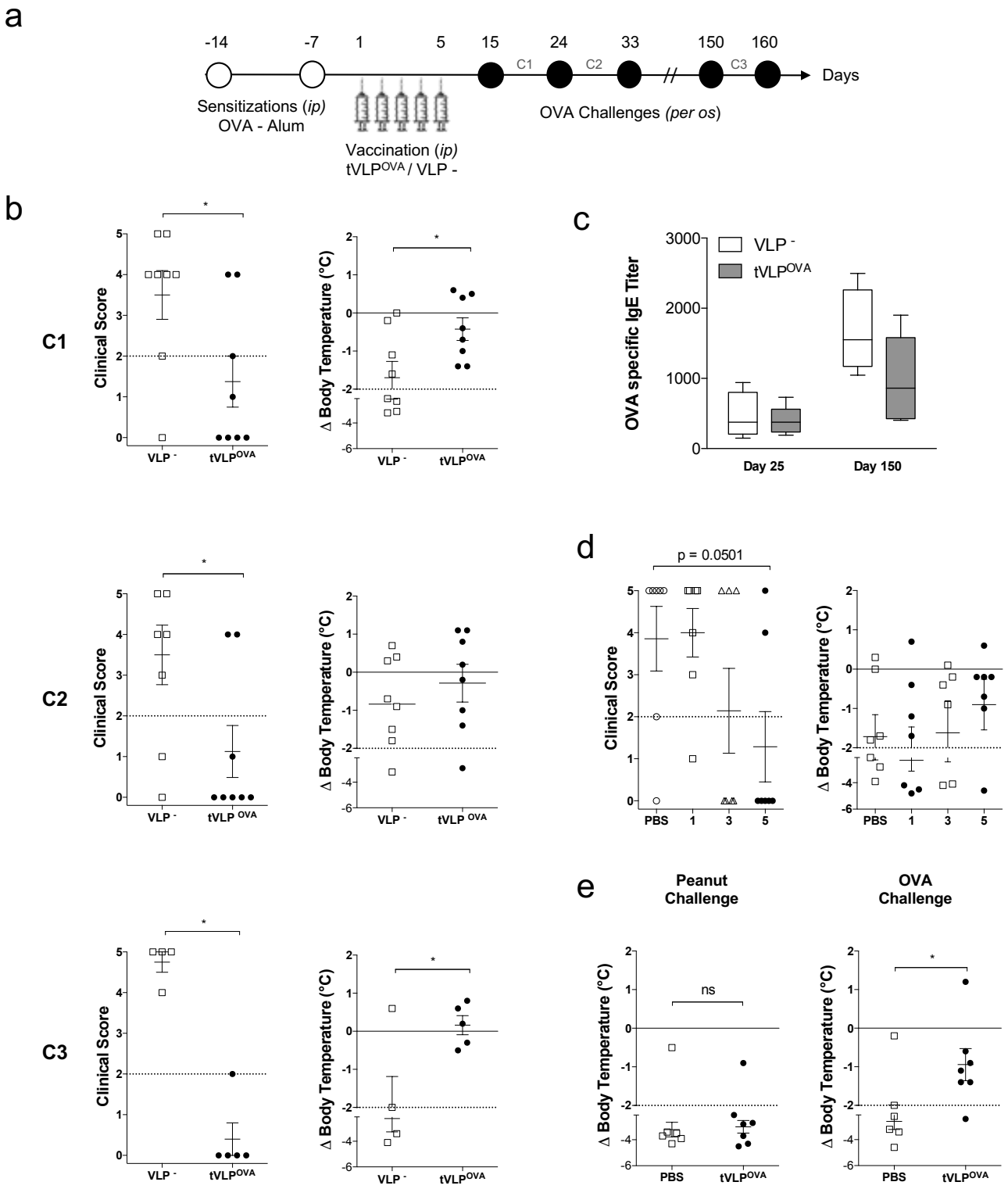
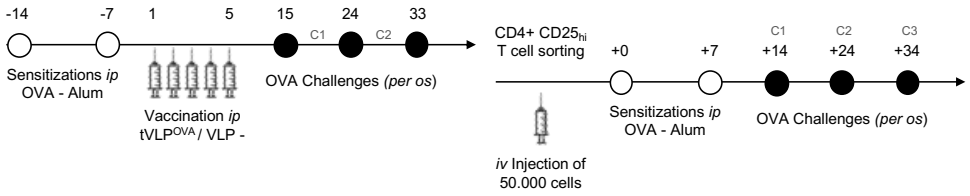
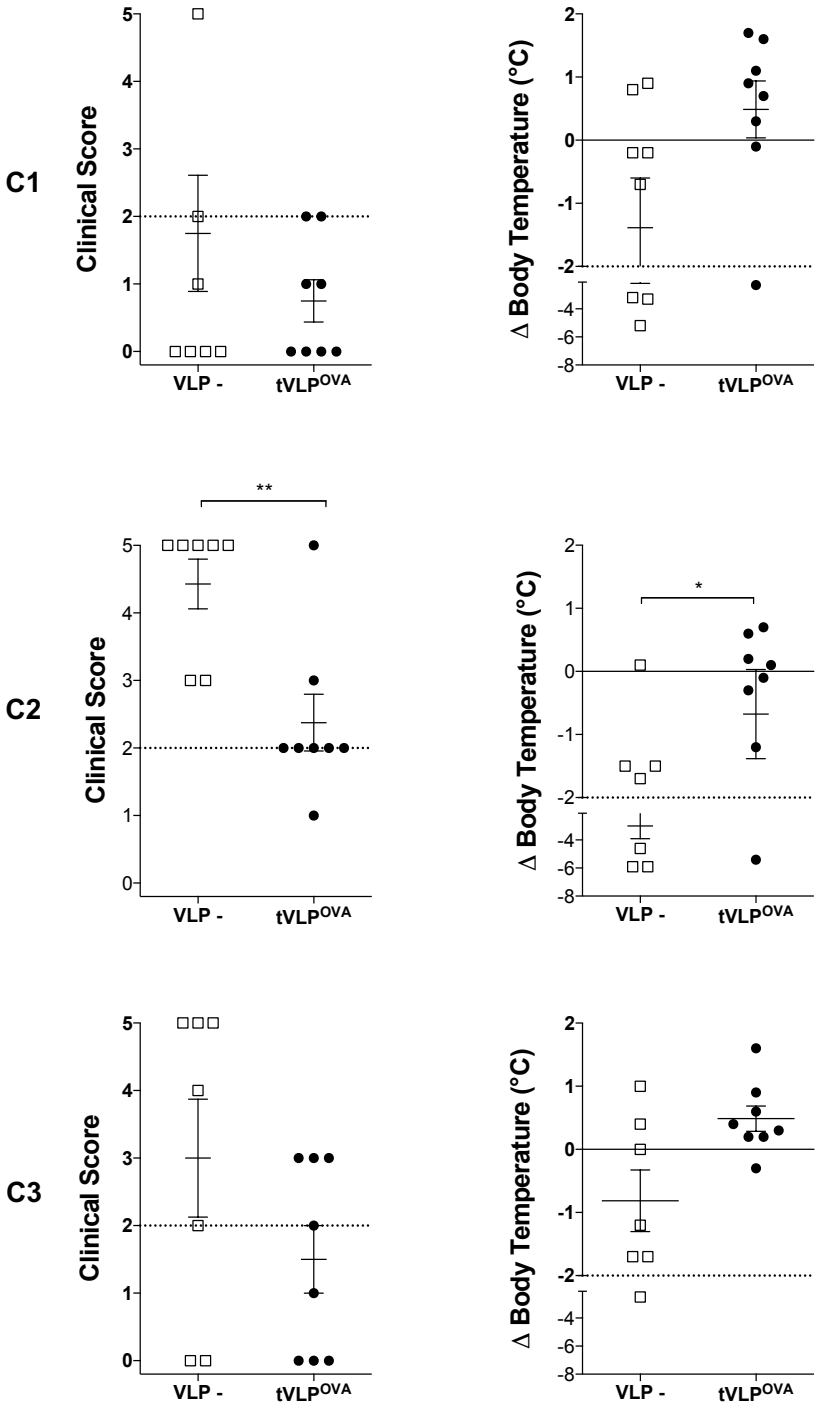

a
-14
-7
1
5
15
24
33
150
160
C1
C2
C3
Days
Sensitizations (ip)
OVA - Alum
Vaccination (ip)
tVLP^OVA / VLP -
OVA Challenges (per os)
b
C1
C2
C3
Clinical Score
Δ Body Temperature (°C)
VLP -
tVLP^OVA
c
OVA specific IgE Titer
VLP -
tVLP^OVA
Day 25
Day 150
d
p = 0.0501
PBS
1
3
5
e
Peanut Challenge
OVA Challenge
ns
PBS
tVLP^OVA

Figure 6

a


-14
-7
1
5
15
24
33
C1
C2
Sensitizations ip
OVA - Alum
Vaccination ip
tVLP^OVA / VLP -
OVA Challenges (per os)
CD4+ CD25hi
T cell sorting
+0
+7
C1
+14
C2
+24
C3
+34
iv Injection of
50.000 cells
Sensitizations ip
OVA - Alum
OVA Challenges (per os)

b


C1
C2
C3
Clinical Score
Δ Body Temperature (°C)
VLP -
tVLP^OVA
**
*

Legends Figure

Figure 1. Characterization of tolerogenic VLPs

(a) Structure of OVA-recombinant tolerogenic VLPs ($tVLP^{OVA}$) and scheme of plasmid constructions used for the VLP production. WT Gag capsid plasmid DNA is used to produce control VLP^{-} while GagOVA fusion protein encoding sequence is added for recombinant VLP^{OVA} production. CTLA-4_{TM} and CTLA-4_{GPI} derived from the native CTLA-4_{WT} by switching the transmembrane and intracytoplasmic domains with those from the glycoprotein of the vesicular stomatitis virus (TM) or the GPI anchor of CD59b molecule (GPI) and linked by a glycine linker (L) to the extracellular domain of CTLA-4. (b) Validation of OVA expression in recombinant VLPs (VLP^{OVA}) by specific Gag (anti-p30 MuLV) and OVA Western Blot analysis. Control VLPs (VLP^{-}) made of WT Gag are used in control. (c) Validation of CTLA-4 expression onto tVLPs by immunoprecipitation with anti-CTLA-4 antibodies and immunoblotting using anti-p30 antibody. (d) Comparison of the expression level of CTLA-4 expressing WT, TM-VSV-G or GPI anchor domains on transfected cells (up panels) or onto VLPs coated beads analyzed by flow cytometry (lower panels). Non-transfected cells or VLP^{-} coated beads were used as negative controls (blank histograms). (e) Quantitation of CTLA-4 on tVLP, $tVLP^{OVA}$ or VLP^{-} using specific ELISA (left panel) and expressed as relative quantity among total proteins measured with BCA assay (right panel). Results are means ± SEM and representative of 3 independent experiments.

Figure 2. Effects of tVLPs on dendritic cell phenotype and cytokine profile

(a) Uptake of tVLPs expressing eGFP by purified splenic DCs assessed by flow cytometry analysis of GFP+ cells after 24 hours of culture (red line). DC culture alone were used as negative control (black line). (b-e) Flow cytometry analysis of splenic (b-c) or bone marrow derived DCs (d) after coculture with medium added or not with 1 µg/mL of LPS and in presence or not of 15 µg/mL of $tVLP^{GFP}$. Live cells with positive expression of $CD11_c$ and MHC-II were gated and CD80, CD86, CD40 and MHC-II expression was measured. Representative dot-plots showing CD80 and CD86 expression on splenic DCs (b) and expression level of surface molecules on splenic dendritic cells (c) and bone-marrow derived DCs (d) is represented as the relative gMFI compared to medium. (e) Analysis of dose-dependent effect of $tVLP^{GFP}$ added at 1, 5 or 10 µg/mL on splenic DCs represented as the relative gMFI of costimulatory molecules compared to medium. (f) Cytokines production by splenic DCs after 24 hours of coculture. Results are expressed as relative variation from the mean amount for all the samples detected in the supernatants by specific IL-4, IL-10 and $IL\text{-}12_{p70}$ ELISA. All results are representative of 3 independent experiments.

Figure 3. Modulation of human dendritic cell activation by tVLPs

Monocyte-derived dendritic cells (moDcs) were differenciated from PBMC of healthy donors after 5 days of culture with GM-CSF and IL-4. moDCs were then cocultured with medium added or not with 100 ng/mL of TNF-α and 15 μg/mL of tVLPs for 24 hours and analyzed by flow cytometry. Live cells with positive expression of $CD11_c$ and MHC-II were gated and CD80, CD86 and MHC-II expression was measured. Representative dot-plots showing CD80 and CD86 expression on moDCs (a) and respective expression levels expressed as relative gMFI compared to medium control (b) are shown. (c) Proportion of moDCs coexpressing high or low levels of CD86 and CD80 in presence or absence of activation signals (TNF-α) and tVLPs. (d-e) Effect of tVLPs on IDO production in MoDCs. Representative dot-plots showing IDO expression in moDCs (d) and the percentages of moDC secreting high levels of IDO (e) are shown. Results are means ± SEM and representative of 2 independent experiments.

Figure 4. Blockade of antigen-specific OT-II CD4+ T cell proliferation induced by tVLPs

Sorted and CTV-stained $CD4^+CD25^-$ T cells from OT-IIxFoxp3 GFP^+ mice were cultured during 2 or 3 days with irradiated splenocytes loaded with either $OVA_{323-339}$ peptide or OVA in presence or not of 10 µg/mL of $tVLP^-$, VLP^- or CTLA-4-equivalent dose of abatacept (Orencia®) and then analyzed by flow cytometry. (a) Representative CTV dilution dot plots at day 3 and the percentages of undivided and divided OT-II $CD4^+$ T cells in the different cell culture conditions are shown. Suppression indexes based on the division profiles were calculated for OT-II cells cocultured with $OVA_{323-339}$ peptide (b) or OVA (c) loaded splenocytes for two (left panels) or three days (right panels). Results are means ± SEM and representative of 3 independent experiments.

Figure 5. tVLP vaccination prevents severe allergic reactions in a mouse model of ovalbumin-induced food allergy.

(a) Experimental setup. Mice were sensitized at days -14 and -7 with OVA / alum, then treated daily with 30 µg/mouse of either $tVLP^{OVA}$ or VLP at days 1 to 5. Ten days after, mice were then 1^{st} challenged (C1) with OVA p.o. administrated every two to three days until obtaining a score higher than 4 for 80% in control mice. A 2^{nd} challenge (C2) was initiated 9 days later and a 3^{rd} challenge (C3) was performed in a late manner 150 days after the vaccination. (b) Clinical score and body temperature loss measured 30 min after the last OVA gavage for the three challenges (C1, C2 and C3) are shown. (c) OVA-specific IgE levels assessed by ELISA after the first (Day 25) and the last (Day 150) OVA challenges. Results are mean +/- SD (d) Dose-dependent effect. Clinical score and body temperature loss of mice treated with either 1, 3 or 5 injections of $tVLP^{OVA}$ after the 1^{st} OVA challenge. (e) Specificity of the induced-protection against allergy reactions. Mice sensitized to both peanut and OVA were vaccinated with $tVLP^{OVA}$ or not (PBS) and then sequentially challenged i.p. with 1 mg of peanut crude extract at day X and 250 µg of OVA at day Y. The body temperature losses were measured 30 min after i.p. injection. Symbols represent individual mice and bars indicate the mean ± SEM. Dashed lines represent the threshold discriminating severe from moderate clinical symptoms and body temperature loss. Results are one experiment representative of 3 independent experiments

Figure 6. Tregs from tVLP-vaccinated mice prevent severe allergic reactions.

(a) Experimental setup. Mice were sensitized with OVA and vaccinated with $tVLP^{OVA}$ or VLP^{-} as previously described. After 2 cycles of oral challenges, $CD4^{+}CD25^{hi}$ T cells were sorted from spleens and mesenteric lymph node and 50.000 cells were reinjected *iv* into naïve mice. Starting from the day of the T cell transfer, mice were sensitized and 3 successive cycles of challenges were performed. (b) Clinical score and body temperature loss 30 min after the last OVA gavage for the three challenges (C1, C2 and C3) are shown. Symbols represent individual mice and bars indicate the mean ± SEM. Dashed lines represent the threshold discriminating severe from moderate clinical symptoms and body temperature loss. Results are one experiment representative of 3 independent experiments.

Figure E1

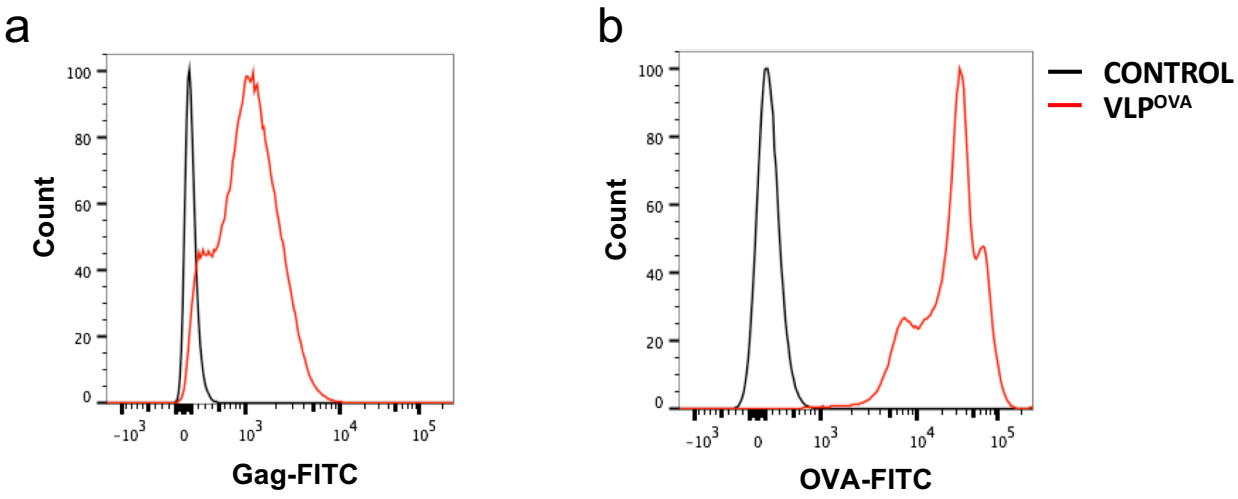
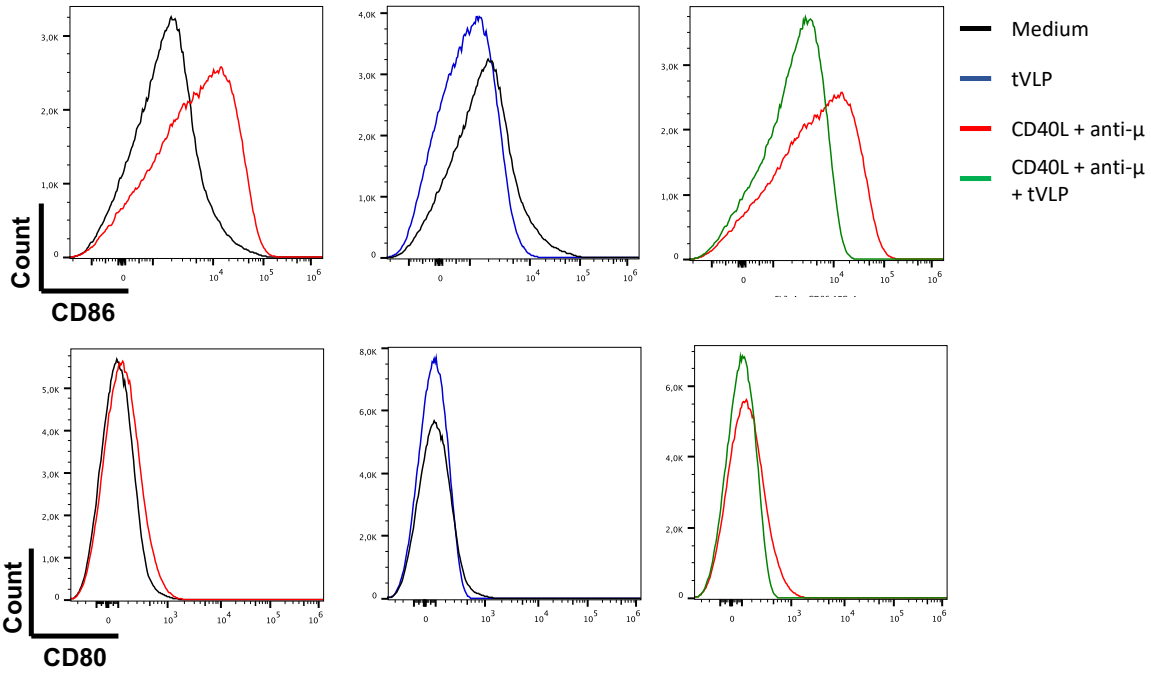


Figure E2

a


Medium
tVLP
CD40L + anti-μ
CD40L + anti-μ + tVLP
Count
CD86
Count
CD80

b

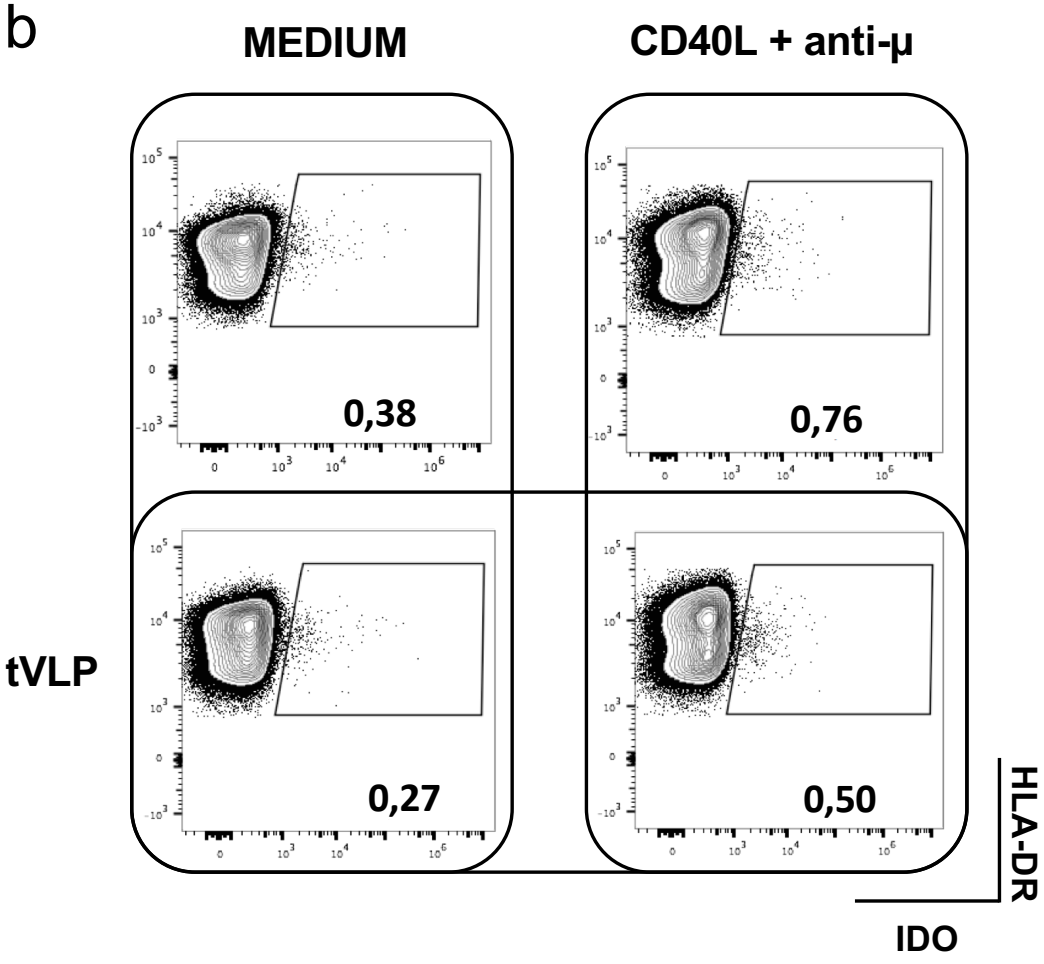
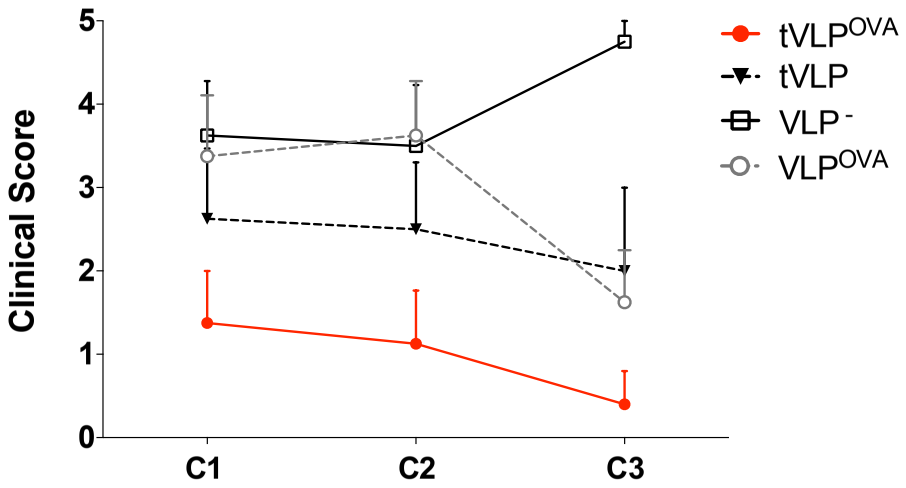

MEDIUM
CD40L + anti-μ
tVLP
0,38
0,76
0,27
0,50
HLA-DR
IDO

Figure E3

a


Clinical Score
5
4
3
2
1
0
C1
C2
C3
tVLP^OVA
tVLP
VLP⁻
VLP^OVA

b

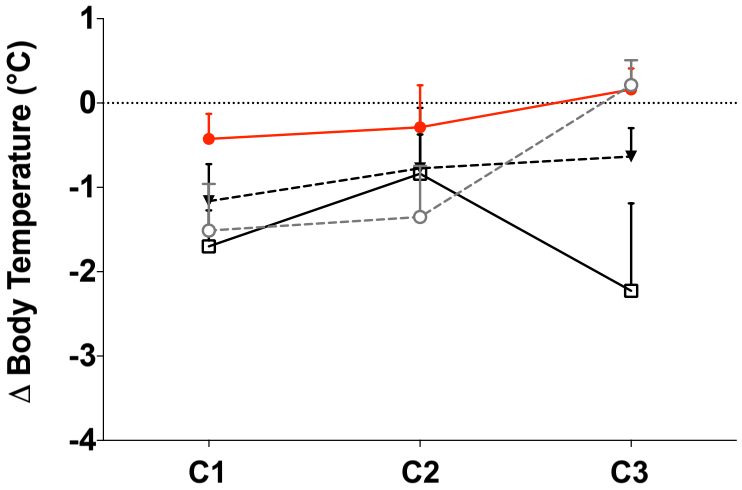

Δ Body Temperature (°C)
1
0
-1
-2
-3
-4
C1
C2
C3

Figure E1. Flow cytometry detection of GAG and OVA proteins in recombinant VLP^{OVA} after intracellular staining.

Expression of Gag (a) and OVA (b) after permeabilization of VLP^{OVA} coated on beads and analyzed by flow cytometry (red histograms). Secondary antibodies alone were used a negative control (black histograms).

Figure E2. Modulation of human B cell activation by tVLPs

B cells were sorted from PBMC of healthy donors upon positive selection on CD19. After 24 hours of culture with medium added or not with CD40L and anti-μ antibodies (activation signal) and in presence or not of 15 μg/mL of tVLPs, B cells were gated on $CD19^+$ cells and analyzed for CD80, CD86 and MHC-II expression. (a) Representative histograms showing CD80 and CD86 expression levels on B cells cultured without (black histograms) or with activation signals (red histograms) in presence or not of tVLP (blue and green histograms). (b) Effect of tVLPs on IDO production in human B cells. Representative dot-plots showing IDO expression in B cells are shown. Results are representative of 2 independent experiments.

Figure E3. Effect of the tVLPs and the different control vaccines on the severe allergic reactions in a mouse model of ovalbumin-induced food allergy.

Mice were sensitized at days -14 and -7 with OVA / alum, then treated daily with 30 µg/mouse of either $tVLP^{OVA}$, tVLP, VLP^{OVA} or VLP- at days 1 to 5. Ten days after, mice were then 1st challenged (C1) with OVA p.o. administrated every two to three days until obtaining a score higher than 4 for 80% in control mice. A 2nd challenge (C2) was initiated 9 days later and a 3rd challenge (C3) was performed in a late manner 150 days after the vaccination. (a) Clinical score and (b) body temperature loss measured 30 min after the last OVA gavage for the three challenges (C1, C2 and C3) are shown.

Conclusions de l'article

Nos résultats démontrent tout d'abord la capacité des VLP dérivées de rétrovirus à vectoriser un antigène, ici l'ovalbumine, au sein de la capside par l'intermédiaire d'une protéine de fusion GAG-OVA. De plus, l'utilisation d'une protéine chimérique associant le domaine extracellulaire du CTLA-4 et un domaine transmembranaire de type glycosylphosphatidylinositol, nous a permis d'augmenter significativement la quantité de molécules présentées à la surface de ces VLP et ainsi leur conférer une forte capacité tolérogène.

Lorsqu'elles sont mises en présence de DC murines, d'origine splénique ou différenciées à partir de la moelle, ces VLP tolérogènes inhibent l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 induite après une activation. Cette modulation dépendant de la dose de VLP est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion d'IL-10 qui est une des cytokines majeures dans la régulation du système immunitaire. L'étude parallèle réalisée à partir de DC dérivées de monocytes humains a permis de confirmer ces résultats et d'identifier une augmentation de production de l'enzyme IDO induite par ces VLP. Cette modulation des DC permet, *in fine,* de bloquer efficacement la prolifération de LyT spécifique d'un antigène (OVA).

L'administration de VLP tolérogènes (tolVLP) chez des souris sensibilisées à l'ovalbumine, antigènes modèle à l'origine d'une allergie alimentaire, a permis une réduction des signes cliniques observés et de la chute de température corporelle après réadministration de l'allergène par voie orale. Cette efficacité observée dès les premières administrations de l'antigène s'est par ailleurs maintenue dans le temps jusqu'à 160 après le premier jour de traitement. De plus, une spécificité d'action vis à vis de l'antigène est démontrée par l'absence de protection dans un autre modèle d'allergie et par l'inefficacité de VLP ne vectorisant par l'OVA. Les mécanismes de tolérance impliqués dans cette protection demeurent encore partiellement caractérisés, néanmoins le rôle des Treg a pu être souligné par des expériences de transfert de protection à la suite d'un transfert adoptif de ces cellules à partir de souris vaccinées. L'implication d'autres cellules régulatrices comme les Tr1 ou les lymphocytes B régulateurs reste cependant à définir. En définitive, ces résultats constituent à ce jour la preuve d'efficacité d'un vaccin tolérogène de type VLP dans un modèle d'allergie alimentaire.

DISCUSSION

1. Les développements des VLP : de l'immunisation à la tolérance

La vaccination a dû, au fil du temps et des innovations thérapeutiques, adapter son arsenal afin de permettre une protection plus sûre et plus efficace de la population. On peut citer entre autres dans ce cadre le développement des vaccins inactivés, sous-unitaires ou encore conjugués. Les VLP font également partie de ces innovations et ont non seulement permis la mise au point de vaccins pour des infections jusqu'alors sans option thérapeutique, mais ont également facilité le développement de nouveaux vaccins plus surs et tout autant efficaces dans la prévention de l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB). Ces particules, découvertes pour la première fois en 1968 dans le sérum de patients infectés par le (VHB), présentent l'avantage de mimer la structure tridimensionnelle des virus natifs tout en étant incapables de pouvoir infecter l'hôte. La vaccination classique a donc exploité la présence de ces motifs répétitifs à la surface ainsi que le mimétisme structurel (*e.g.* taille et présence d'une capside) de cette particule afin d'activer les réponses immunitaires adaptatives et innées (Bachmann and Jennings, 2010). L'autre avantage de ces VLP réside dans la sécurité de leur usage en exploitant l'absence de matériel génétique et donc l'impossibilité de pouvoir se répliquer au sein d'un individu. De plus, il est possible de produire ces particules dans de nombreux systèmes d'expression qu'ils soient eucaryotes, d'origine animale ou végétale, ou procaryotes. Ce choix du système d'expression est d'ailleurs une étape clé dans la production de VLP, car il conditionne la nature et la complexité de la VLP produite en déterminant par exemple la présence ou non d'une enveloppe à la surface.

1.1. Les premiers développements vaccinaux utilisant les VLP

Suite à la découverte de ces pseudo-particules lors de l'infection par le VHB, les premiers développements vaccinaux se sont axés sur la prévention de cette infection. En 1986, le premier vaccin VLP autorisé chez l'homme se base sur des VLP produites en cellules humaines ou en levures et exprimant des antigènes de surface du VHB (HBsAg), adsorbés sur un gel d'hydroxyde d'aluminium (Alum). En 2006 et 2007, deux vaccins contre le papillomavirus humain (HPV) composés de pentamères de protéines de capside L1 furent développés (*i.e.* Gardasil® et Cervarix®). Que ce soit pour le VHB ou le

HPV, ces vaccins ont permis de poser les bases pour le développement à plus large échelle de thérapies vaccinales utilisant les VLP. Leurs propriétés immunogènes on conduit à utiliser les VLP comme plateforme de présentation d'antigènes. Aujourd'hui, 137 essais cliniques évaluant l'efficacité de vaccins VLP sont répertoriés sur la base de données *ClinicalTrials.gov*. Parmi ces essais cliniques, de nombreuses infections sont ciblées incluant le virus Chikungunya mais aussi le virus de l'immunodéficience humaine, bien qu'une grosse partie des essais en cours s'intéresse au virus de la grippe (24 essais répertoriés). Le développement de ces nombreuses thérapies utilisant les VLP, à la différence des vaccins contre le VHB ou le HPV, est possible grâce à l'utilisation de VLP exprimant des antigènes chimériques à leur surface. Ce chimérisme autrement dénommé pseudotypage est permis par l'utilisation de protéines de fusion couplant l'antigène désiré à des protéines de capside ou par l'utilisation de VLP enveloppées. Un très bon exemple des possibilités de ce pseudotypage reste le vaccin RTS,S/AS01 ou Mosquirix®. Ce vaccin est constitué de VLP exprimant un antigène de *Plasmodium falciparum* combiné à la protéine HBsAg (The RTS, 2011). Par cette technique, un vaccin dirigé contre un parasite a pu être développé et autorisé par la majorité des instances règlementaires pour la première fois chez l'Homme.

La polyvalence des VLP et les techniques de pseudotypages a permis l'utilisation de cette plateforme en dehors de la prévention des maladies infectieuses. En effet, le développement des vaccins basés sur les VLP s'est fait dans d'autres champs thérapeutiques comme la cancérologie ou la cardiologie (Tableau 4). En effet, on retrouve en 2012 une étude évaluant un candidat vaccin dans le traitement du mélanome. L'objectif était d'induire une forte réponse immunitaire dirigée contre les cellules exprimant les antigènes tumoraux dérivant de la protéine MART-1 exprimée par les mélanoblastes. Par l'intermédiaire d'une VLP dérivée de bactériophages Qβ et exprimant des oligonucléotides immunostimulants (CpG) ainsi que ces antigènes tumoraux, une augmentation du nombre de LyT cytotoxiques recrutés au site d'injection a été observée. Cette même approche thérapeutique fut utilisée en cardiologie avec des VLP issues de bactériophages Qβ et présentant le peptide de l'angiotensine II à leur surface. Le développement de réponses immunitaires contre ce peptide a permis par la suite une réduction du taux sérique de cette hormone au niveau systémique avec en

conséquence finale la diminution de la pression sanguine chez des souris hypertendues (Ambühl et al., 2007). Ces développements démontrent la polyvalence d'utilisation de ces VLP dans d'autres domaines que la prévention des maladies infectieuses et permettent d'envisager le développement d'approches vaccinales dans une pléthore de champs d'application. Malheureusement, aucune suite de développement n'est à ce jour annoncée pour ces nouvelles thérapies.

Application	Institution	Administration	Système d'expression	Plateforme	Antigène	Développement
Rhinoconjonctivite et asthme	Cytos Biotechnology	SC	E. coli	Qß Non enveloppé	CpG	Phase 2
Maladie d'alzheimer	Cytos Biotechnology	SC - IM	E. coli	Qß Non enveloppé	Aß1-6	Phase 2
Diabète de type 2	Cytos Biotechnology	SC	E. coli	Qß Non enveloppé	IL1ß	Phase I
Hypertension	Cytos Biotechnology	SC	E. coli	Qß Non enveloppé	Ang II	Phase 2
Mélanome métastatique	Cytos Biotechnology	IM	E. coli	Qß Non enveloppé	Melan-4, CpG	Phase 2
Addiction à la nicotine	Cytos Biotechnology	SC	E. coli	Qß Non enveloppé	Nictoine	Phase 2

Tableau 4. Développements vaccinaux utilisant des VLP en dehors de la prévention ou du traitement des maladies infectieuses. D'après Kuschnir *et al. Vaccine* (2012).

1.2. Les pseudo-particules rétrovirales et leur optimisation

Afin de permettre l'utilisation des VLP dans de nombreuses pathologies et d'améliorer leur capacité à moduler le système immunitaire, de nouvelles structures virales constituant les VLP ont été utilisées. Dans ce cadre, l'utilisation de VLP dérivées de rétrovirus oncogènes prend tout son sens. Ce type de VLP issues de virus enveloppés présente plusieurs avantages par rapport aux autres plateformes virales. En premier lieu, la simplicité et la caractérisation complète du génome viral de ces pseudo-particules permet de générer facilement des VLP recombinantes. Deuxièmement, la présence d'une enveloppe permet l'intégration de molécules à la surface avec des intensités d'expression variables. Ce pseudotypage, tout comme les VLP basées sur des protéines Qβ, peut être utilisé soit pour présenter des antigènes contre lesquels on souhaite induire des réponses immunitaires, soit présenter des molécules facilitant l'adressage aux APC. La preuve de principe d'utilisation de ces pseudo-particules fut apportée en 2006 (Bellier et al., 2006) et par la suite appliquée à la vaccination contre le virus de l'hépatite C (Garrone et al., 2011b; Huret et al., 2013) ou contre le HPV (Lescaille et al., 2013). Ces études ont d'autre part soulevé la problématique de la conformation des

antigènes à la surface des pseudo-particules ainsi que l'importance de l'efficacité de l'ancrage conditionnant l'expression des antigènes à la surface.

Au sein du laboratoire, le domaine transmembranaire de la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV_G) a très vite été retenu. Ce domaine présente des peptides signaux facilitant l'adressage à la membrane plasmique et permet une expression forte de protéines en définitive sur les VLP produites (Garrone et al., 2011a). En dehors de ce motif, on retrouve aussi les domaines glycosylphosphatidylinositol (GPI) très fréquemment utilisés, dont celui issu du CD59. Le CD59 est une protéine régulatrice présente de manière ubiquitaire qui protège d'une lyse systématique par le système du complément. Son expression doit donc être la plus large possible, et le domaine GPI remplit parfaitement cette fonction. Plusieurs travaux mentionnent l'utilisation de ce domaine afin d'induire une expression membranaire forte (Paulick and Bertozzi, 2008), y compris pour ancrer les protéines sur les VLP (Wojta-Stremayr et al., 2015). Bien évidemment, d'autres systèmes sont disponibles afin d'exprimer à la surface des VLP tous types de molécules. Le système SpyCatcher / SpyTag reste une alternative extrêmement intéressante dans cette optique (Brune et al., 2016). Ce système, similaire à l'utilisation de molécules combinées à la biotine ou la streptavidine, consiste en l'utilisation d'un motif dénommé SpyCatcher lié à la VLP et permettant l'accrochage de l'antigène d'intérêt par l'intermédiaire d'une liaison via un motif complémentaire dénommé SpyTag. Ce système a notamment l'avantage de pouvoir dissocier d'une part la production de VLP et d'autre part la présentation d'antigène d'intérêt. Malgré ces avantages, ce système reste néanmoins contraignant par la nécessité d'inclure le SpyCatcher au sein de la VLP soit par l'utilisation de protéines de fusion (méthode possible avec les VLP Qβ), soit par l'utilisation d'ancrage membranaire sur des VLP enveloppées et donc ne résout pas le problème. De plus, ce système requiert la production de l'antigène ou de la molécule d'intérêt couplée au SpyTag. Dans le cadre de nos recherches, nous avons évalué l'efficacité de l'ancrage membranaire par l'utilisation des domaines d'ancrage issus de VSV_G, du CD59b et du CD16. Nos résultats ainsi que ceux comparant l'utilisation de l'ancrage du CD16 ou CD59b confirment la meilleure efficacité de l'ancrage GPI issu du CD59b pour l'expression de molécules à la surface des VLP (Wojta-Stremayr et al., 2015). Cet ancrage fut par ailleurs utilisé par

plusieurs autres équipes dans le développement de VLP présentant des molécules en surface (Feng et al., 2015; Skountzou et al., 2007).

Un autre avantage des VLP dérivées des rétrovirus par rapport à d'autres types de particules et notamment des VLP Qβ est de pouvoir embarquer des protéines et molécules à l'intérieur de la capside par l'intermédiaire de protéines de fusion. Cette capacité de transport des antigènes de manière masquée ou protégée, pour reprendre les termes de l'étude de Kratzer *et al.*, est particulièrement intéressante dans de nombreux champs thérapeutiques. Cette possibilité peut être exploitée pour apporter aux cellules prenant en charge ces VLP une information génétique, une enzyme, une molécule inductrice d'apoptose, un marqueur permettant le suivi ou encore un antigène (Kaczmarczyk et al., 2011). Cette capacité de transport couplée aux effets médiés par des molécules de surface élargit d'autant plus les possibilités et les champs thérapeutiques correspondants. De manière globale, les VLP dérivées de rétrovirus constituent un formidable outil de développement vaccinal, dans l'efficacité de l'induction de réponses immunes mais également dans l'adaptation possible à d'autre champs thérapeutiques que la vaccination conventionnelle. C'est notamment le cas dans l'induction de tolérance dans l'allergie, où les VLP permettent d'apporter un allergène à l'intérieur de la capside, ceci limitant les réactions immédiates, tout en agissant par l'intermédiaire des molécules en surface.

1.3. Les VLP pour induire une tolérance

Les travaux présentés dans ce manuscrit font partie des premières recherches utilisant les VLP dans un processus de vaccination tolérogène. Plusieurs revues de la littérature ont relevé le potentiel rôle de ces particules dans la capacité à moduler les réponses immunitaires de manière tolérogène (Pitoiset et al., 2015; Valenta et al., 2016). Cependant, c'est en 2009 que les premières VLP sont développées dans l'allergie en utilisant des VLP Qβ qui expriment des allergènes à leur surface, notamment Fel d1 qui est un allergène issu du chat (Schmitz et al., 2009a). Cette stratégie radicalement différente de celle de nos VLP tolérogènes prend le parti de vouloir induire de fortes quantités d'Ig de type G en orientant les réponses lymphocytaires vers un profil Th1. Ces

immunoglobulines vont par la suite bloquer la fixation des IgE délétères et ainsi empêcher le relargage de médiateurs inflammatoires. Cette inhibition est médiée notamment par le récepteur FcγRIIb qui possède une affinité forte pour les IgG et qui diminue la signalisation médiée par le récepteur des IgE : le FcεRI (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Cette stratégie permet, en conséquence, la prévention du choc anaphylactique chez ces souris, ainsi que la réduction de la perméabilité péritonéale après challenge par injection intra-péritonéale de l'allergène. Cette approche a également été transposée dans le cadre de l'allergie alimentaire avec, pour l'instant, la même efficacité (Bachmann, 2018).

Bien que cette approche semble prometteuse, la question du risque de l'utilisation de cette thérapie se pose. En effet, un des risques majeurs des immunothérapies actuelles dans l'allergie est le risque de réactions anaphylactiques suite à l'exposition volontaire à l'allergène. Afin de répondre à ces interrogations, l'équipe de recherche ayant développé ces VLP a effectué des tests afin de démontrer l'absence de réactivité avec leur utilisation (Schmitz et al., 2009b). Ces tests ont été réalisés en analysant la dégranulation des basophiles sanguins isolés à partir de prélèvements de sang de patients allergiques pour Fel d1. Les résultats montrent clairement que la présentation de Fel d1 associé aux VLP limite la réactivité par rapport à l'allergène soluble. Néanmoins, pour des doses élevées, on remarque une dégranulation des basophiles sanguins. L'autre option thérapeutique, qui semble de prime abord moins à risque de déclencher des réactions anaphylactiques, est celle de vectoriser l'allergène à l'intérieur des VLP. Ce choix, que nous avons fait, a aussi été sélectionné par une équipe autrichienne qui a développé des VLP vectorisant l'ovalbumine sans présenter à la surface de molécules immunorégulatrices. De manière similaire à notre approche, ces travaux ont analysé l'efficacité de VLP basées sur le MLV dans la prévention de l'allergie respiratoire au pollen d'armoise (Art v1) chez des souris humanisées. En contradiction avec l'étude des VLP Qβ - Fel D1, une dégranulation des basophiles est observée lorsque l'allergène Art v1 est exprimé à la surface des VLP alors que ce n'est pas observé lorsque l'allergène est exprimé au sein de la capside. Nos résultats confirment ces observations, mais des expériences d'administrations de nos VLP par voie iv et de suivi de l'apparition d'un choc anaphylactique est prévu par la suite. Les VLP vectorisant Art v1 au sein de la capside sont donc hypoallergéniques à la

différence de celles exprimant l'allergène en surface. Cette étude a d'autre part permis d'identifier les cellules prenant majoritairement en charge les VLP par voie nasale. Ce sont en premier les macrophages alvéolaires et en deuxième les DC CD103+ qui capturent les VLP. Ces résultats corroborent des observations faites au sein du laboratoire (Vazquez *et al*. Manuscrit en préparation), avec cependant la nuance que les cellules prenant en charge les VLP possèdent chacune une cinétique d'apparition bien spécifique. En effet, les macrophages alvéolaires semblent précocement capturer les VLP, alors que les DC sont identifiées par la suite. Cette capacité de prise en charge par les DC CD103+ place donc ces VLP contenant l'allergène au centre des processus de tolérance.

Devant ces résultats, on peut se poser la question de l'analyse de la prise en charge des VLP après injection intrapéritonéale ou par d'autres voies d'administration. Il apparaît donc essentiel de tester d'autres voies d'administration des VLP et d'attester de l'efficacité de ces voies en ciblant majoritairement les muqueuses riches en cellules CD103+. Ces expériences seront d'autant plus intéressantes que ces muqueuses, considérées comme un lieu clé de la génération de tolérance, sont fréquemment mises en évidence par des approches similaires à la nôtre (Pei et al., 2018). La réalisation de ces analyses pourra être réalisée à l'aide de VLP vectorisant des marqueurs de suivi et l'analyse de la prise en charge pourra s'effectuer par immuno-histochimie ou par cytométrie en flux. D'autre part, la mise en évidence de l'augmentation des Treg tissulaires du poumon après traitement par VLP Art v1 ajoute un élément clé dans le mécanisme d'action de cette thérapie (Kratzer et al., 2018). Afin d'objectiver l'induction de Treg après administration intrapéritonéale de tolVLP, il sera intéressant de regarder au niveau systémique et local, en particulier au niveau intestinal avec les plaques de Peyer et la *lamina propria*, mais aussi au niveau des ganglions mésentériques les modifications globales phénotypiques des LyT. Par ailleurs, l'utilisation de LyT spécifiques de l'ovalbumine (cellules OT-II) pourrait permettre de renforcer les données sur la spécificité d'action des VLP tolérogènes. L'injection de ces cellules préalablement à un traitement par tolVLP dans des souris naïves permettra d'attester une modification de ce compartiment de cellules spécifiques. Cette expérience sera néanmoins limitée par la capacité de diffusion et de migration des cellules OT-II injectées. En conclusion, notre

étude comme celle des VLP Art v1 place l'utilisation des VLP dans le traitement de l'allergie comme une alternative extrêmement prometteuse mais souligne néanmoins le besoin d'une meilleure caractérisation des mécanismes associés à la protection.

2. Mécanismes de tolérance induits par l'immunothérapie spécifique dans l'allergie alimentaire et place des VLP tolérogènes dans l'arsenal thérapeutique

Le développement des immunothérapies spécifiques de l'allergie alimentaire a permis, par le biais d'analyses biologiques durant et à l'issue des traitements, d'observer l'induction de mécanismes de tolérance. Ces mécanismes peuvent être par la suite mis en relation avec une amélioration clinique et ainsi définir de nouveaux corrélats de protection vis-à-vis de l'allergie alimentaire. Il apparait donc essentiel pour toute nouvelle thérapie d'analyser les modifications induites au niveau des acteurs clés de l'allergie alimentaire et de faire le parallèle avec les développements existants. Dans cette discussion, nous analyserons donc les résultats obtenus avec le développement des immunothérapies spécifiques et détaillerons les possibilités et les limites de l'utilisation des VLP tolérogènes dans l'allergie alimentaire.

Les premières utilisations de l'immunothérapie spécifique (ITS) sont reportées dès 1908 avec les prémices de l'immunothérapie par voie orale (OIT). La technique consistait en l'administration récurrente de faibles quantités d'œuf par voie orale chez un enfant présentant une allergie à cet aliment. Par la suite, d'autres voies d'administrations sont explorées et notamment la voie sous cutanée (SCIT). Malgré un potentiel risque de réaction diminué par l'évitement de la voie orale, la SCIT s'est avérée moins sure que l'OIT de manière générale (Nelson et al., 1997). En effet, la SCIT peut être source de réactions systémiques avec pour facteurs de risques l'absence préalable de contrôle de l'asthme dans l'allergie respiratoire ou des erreurs de dosage dans l'allergie alimentaire (James and Bernstein, 2017). Les mécanismes sous-jacents de ces réactions généralisées ne sont pas réellement caractérisés, cependant il semblerait que ces réactions soient dues au passage au niveau systémique des allergènes après injection.

Cette sécurité d'utilisation moindre de la SCIT a néanmoins participé au développement des immunothérapies par voie sublinguale (SLIT) et par voie épicutanée (EPIT). Ces deux dernières voies d'administration, à l'inverse de la SCIT présentent une sécurité d'utilisation supérieure en comparaison à l'OIT, avec moins d'effets indésirables gastro-intestinaux (Bégin et al., 2016) mais une plus faible capacité de tolérance finale d'un aliment par rapport à une OIT (Chinthrajah et al., 2016). Ces ITS sont donc considérées comme efficaces, mais leur effet durable reste discuté et la sécurité d'utilisation reste fortement dépendante de la voie d'administration. Les mécanismes induits par l'ensemble des processus d'ITS peuvent être séparés en 3 catégories en fonction de leur délai d'apparition et du compartiment lymphocytaire principal affecté ; nous retrouvons donc en premier lieu les mécanismes de désensibilisation rapidement induits après le traitement, ceux modulant les réponses cellulaires LyT et enfin ceux modulant les réponses cellulaires LyB.

2.1. Désensibilisation

2.1.1. Modulation par les ITS

Concernant les mécanismes immédiats, ils ont été définis initialement dans la rhinite allergique et dans les hypersensibilités aux piqûres d'insectes puis confirmés à la suite de protocoles OIT dans le cadre d'allergies aux protéines de lait ou à la cacahuète. On retrouve en premier lieu une diminution de l'activation des basophiles sanguins et des mastocytes tissulaires (Burks et al., 2012; Jones et al., 2009). Cette hyposensibilité est attestée par l'augmentation de la dose d'allergène nécessaire pour activer le relargage des médiateurs inflammatoires et augmenter l'expression de CD63 membranaire à l'aide de tests d'activation *in vitro* (test d'activation des basophiles ou TAB). Une des causes avancées pour cette baisse d'activation est la diminution du nombre d'IgE dirigées contre l'antigène, que ces Ig soient circulantes (Vickery et al., 2013a) ou à la surface des cellules (Oka et al., 2013). Cette diminution d'activation des basophiles ne serait pas cependant le mécanisme majoritaire pour l'établissement de la tolérance, car un traitement OIT chez la souris permet une tolérance gastro-intestinale sans modification de l'activation des basophiles (Leonard et al., 2012). L'autre hypothèse probable reste celle de la déplétion faible et progressive des médiateurs inflammatoires par

l'administration de l'allergène qui reste toujours sous le seuil de déclenchement des réactions anaphylactiques. Tout comme la diminution des IgE sur les effecteurs, cette hypothèse n'est observée que dans un nombre limité d'études.

2.1.2. Modulation par les tolVLP

Concernant les mécanismes de désensibilisation rapide objectivés après le traitement par VLP tolérogènes, nous n'observons pas de diminution du taux d'IgE après un premier cycle d'allergie. Cette observation n'apparait cependant pas contradictoire avec une efficacité, car les souris traitées sont statistiquement moins atteintes que les souris traitées par VLP vides. D'autre part, cette absence de différence peut aussi s'expliquer par le fait que les souris ont été traitées après la sensibilisation et que les mécanismes régulant la production d'IgE n'ont pas eu le temps de se mettre en place. Néanmoins, ce taux d'IgE semble au fil des cycles d'induction d'allergie croître de manière plus réduite chez les souris traitées par les VLP tolérogènes (augmentation d'un facteur 3,5 chez les souris traitées par VLP- contre 2,4 chez les souris traitées par $tVLP^{OVA}$). Ces résultats supposent donc que l'action des $tVLP^{OVA}$ permet de contrôler l'allergie de manière précoce certes, mais qu'elle induit également des mécanismes à long terme responsables d'un contrôle de la production d'IgE. Ces résultats nécessitent néanmoins une confirmation et pourra permettre d'identifier notamment une modulation des basophiles et des mastocytes ou une induction de Breg. Par ailleurs, nous n'observons pas de différence significative entre les deux groupes dans le dosage sérique de mMCPT-1. Ces résultats sont cependant à prendre avec précaution, car pour des raisons éthiques les souris les plus malades n'ont pas été prélevées pour réaliser ce dosage. Or c'est bien dans le groupe traité par les VLP - que la moitié des animaux présente un score d'allergie maximal. Et d'autre part, nous avons pu précédemment observer que ce dosage chez la souris est malheureusement caractérisé par une variation importante entre les individus d'un même groupe (Bonnet et al., 2016).

A l'avenir, l'étude de l'impact d'un traitement par $tVLP^{OVA}$ sur les cellules effectrices de l'allergie sera nécessaire. Cette étude devra répondre à la modulation ou non des éosinophiles et des basophiles sanguins ainsi qu'aux taux de mastocytes retrouvés au niveau des tissus cibles. Par ailleurs, l'étude de l'état d'activation des basophiles par TAB

donnera également des informations sur la susceptibilité de libération des médiateurs inflammatoires. A ce jour, aucune étude ne répond à ces questions qu'il s'agisse de VLP présentant l'allergène à la surface ou à l'intérieur de la capside. La difficulté réside cependant dans l'identification des cinétiques et de la localisation de l'action des VLP. Nous pourrions néanmoins nous appuyer sur les résultats obtenus dans l'étude de l'IL-2 à faible dose où des modifications significatives sont obtenues 3 jours après le dernier challenge oral (Bonnet et al., 2016). C'est donc après un traitement successif aux sensibilisations et dans les quelques jours suivant le dernier challenge allergique qu'il serait intéressant de regarde l'activation des basophiles ou de prélever et de marquer une portion de l'intestin afin d'identifier les mastocytes.

2.2. Impact sur les cellules présentatrices d'antigène

2.2.1. Modulation par les ITS

Le deuxième type cellulaire identifié comme cible des ITS dans l'allergie alimentaire est celui des APC. Au sein de cette classe de cellules, les cellules de Langerhans sont une des cibles principales et leur recrutement est observé, après OIT, au niveau de la muqueuse orale (Allam et al., 2010). Ces cellules sont entre autres responsables de l'établissement de la tolérance au travers de leur sécrétion d'IL-10 et de TGF-β. Concernant la SCIT, l'étude après restimulation *in vitro* de leucocytes sanguins isolés révèle que l'action serait en partie médiée par la modulation des monocytes, l'augmentation de production d'IL-10 et la dégradation accrue du tryptophane (Bussmann et al., 2010). D'autre part, on retrouve à la surface des monocytes l'augmentation de l'expression de récepteurs à certains transcrits (ILT3 et ILT4) ; ces récepteurs étant indispensables pour le développement des fonctions tolérogènes des monocytes et corrélés avec le recrutement de Treg (Brenk et al., 2009) . En dernier lieu, les recherches sur l'EPIT soulignent le rôle primordial des LC de la peau, qui migrent par la suite dans les ganglions drainants et vont induire la prolifération de Treg Foxp3+ et de Treg LAP+ qui retourneront au niveau intestinal pour prévenir les manifestations allergiques (Tordesillas et al., 2017).

2.2.2. Modulation par les tolVLP

Au cours de nos recherches, nous n'avons pas évalué l'impact des tolVLP sur les DC en condition *in vivo*. Une part très importante de nos recherches fut dédiée à l'étude de la modulation des DC dans des expériences *in vitro*. Dans ces expériences, nous avons pu démontrer l'induction d'un phénotype proche de celui généralement décrit pour les tolDC. En effet, la diminution importante de l'expression des molécules de costimulation, l'augmentation de production de l'IL-10 et d'IDO permettent d'objectiver l'efficacité des tolVLP. L'étude de l'expression des récepteurs ILT3 et ILT4 ainsi que de PD-L1 et PD-L2 serait également intéressante à réaliser par la suite afin d'apporter une confirmation supplémentaire sur la capacité d'induction de tolérance de ces DC. Néanmoins, cette caractérisation n'apportera pas d'informations nouvelles sur les mécanismes conduisant à cette tolérance. A la place, une étude transcriptomique à la fois sur des DC humaines et murines mises en présence de tolVLP permettrait de définir de manière plus fine les modifications induites et de pouvoir comparer ces données avec celles issues de protocoles d'induction par l'intermédiaire d'autres agents biologiques (Gueguen et al., 2015). Cette étude prochaine ne dispensera pas cependant de réaliser d'autres études de caractérisation des APC tissulaires et en particulier au niveau intestinal à l'issue d'un traitement par tolVLP exprimant la GFP et permettant ainsi l'étude de la prise en charge de ces particules. En définitive, la meilleure caractérisation des modifications phénotypiques et transcriptomiques des DC ne pourra que faciliter l'identification des cibles secondaires de ces tolVLP et principalement renseigner sur l'état d'activation du compartiment des LyT.

2.3. Impact sur les lymphocytes T et les Treg

2.3.1. Modulation par les ITS

De manière générale, les ITS vont permettre une action globale sur les LyT, à la fois en diminuant les LyT effecteurs et notamment Th2, et en augmentant le nombre de LyT anergiques ou en promouvant les Treg soit par leur nombre, soit par leur fonction. C'est donc majoritairement un rééquilibre de la balance Th2/Treg qui est nécessaire afin de rétablir une tolérance (Akdis et al., 2004). Ce rééquilibre est mis en évidence après une

OIT (Smaldini et al., 2015), avec l'implication de l'IL-10 et du TGF-B, mais aussi avec une SCIT (Aslam et al., 2010) ou une EPIT (Dioszeghy et al., 2011). L'utilisation de complexes tétramères CMH-peptide permet d'affiner cette analyse en se concentrant uniquement sur les réponses spécifiques. Ces analyses supplémentaires confirment les résultats observés sur le compartiment des LyT, avec une augmentation franche des Treg Foxp3+ spécifiques de l'allergène et sécrétant de l'IL-10 (Aslam et al., 2010). D'autre part, la longueur du traitement par OIT semble influencer la capacité à induire une tolérance au long terme, par l'intermédiaire de l'induction de LyT anergiques et par la persistance de LyT spécifiques de l'allergène qu'ils soient naïfs ou mémoire (Ryan et al., 2016). Enfin, on retrouve également des modifications épigénétiques à l'issue d'OIT ou d'EPIT particulièrement au niveau des Treg sans mécanisme d'action identifié. C'est une hypométhylation qui est observée au niveau du facteur Foxp3+, tandis que GATA-3, un des facteurs nucléaires essentiel dans la caractérisation des LyT Th2, est hyperméthylé (Mondoulet et al., 2018; Syed et al., 2014). Ces observations coïncident avec le rééquilibre de la balance Treg/Th2, illustré par une meilleure transcription de Foxp3+ permise par son hypométhylation, et à l'inverse la répression de GATA-3 par son hyperméthylation.

2.3.1. Modulation par les tolVLP

L'ensemble des mécanismes induits par les ITS au niveau des LyT présentés précédemment n'ont pu être testés au sein de ces recherches, principalement par manque de temps. Néanmoins, l'accent a été porté sur la modulation des Treg induite après vaccination avec les tolVLP. Au cours des challenges oraux avec l'allergène, une tendance à l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation ICOS a pu être observée au niveau sanguin chez les Treg issus des souris traitées. En revanche, aucune modification n'a été attestée sur les niveaux d'expression de CTLA-4, Foxp3 ou sur le taux de Treg Foxp3+ en lui-même. D'autre part, l'étude d'un transfert de Treg de souris traitées vers des souris naïves renforce le rôle de ces cellules dans le contrôle de l'allergie. Il demeure cependant essentiel d'identifier les cinétiques ainsi que les localisations de l'établissement de la tolérance. L'étude de Kratzer *et al.* est intéressante dans ce domaine car elle objective une augmentation des Treg au niveau pulmonaire 40 jours après l'injection des VLP par voie nasale et après un challenge allergique (Kratzer et al., 2018).

D'autres expériences peuvent être intéressantes dans le renforcement du rôle des Treg dans la protection médiée par les tolVLP. La déplétion de ces cellules à l'aide d'anticorps déplétants les cellules CD25+ permettrait d'apporter une nouvelle confirmation qu'ils soient utilisés en amont des challenges oraux ou après l'apparition de la protection. Concernant l'étude de leur spécificité, l'absence de tétramères fonctionnels de classe II pour l'OVA complexifie cette recherche. Néanmoins le transfert de cellules issues de souris exprimant le TCR spécifique pour l'OVA ainsi que la GFP de manière conditionnelle avec le Foxp3+ permettra d'attester l'activation ou l'induction de cellules régulatrices spécifiques de l'antigène. Enfin, l'identification de l'origine de ces Treg, à savoir l'action préférentielle des Treg thymiques ou induits en périphérie, modulant l'action des tolVLP apparaît importante. Cette question peut être abordée de deux manières, soit en analysant le phénotype des Tregs à l'aide de marqueur d'origine thymique tels que Helios ou Nrp1, soit en transférant en périphéries des LyT présentant des marqueurs congéniques et en étudiant leur conversion vers un profil régulateur.

2.4. Impact sur les lymphocytes B

2.4.1. Modulation par les ITS

Bien que les modifications de la balance Treg/Th2 ou du niveau d'activation des basophiles soient essentielles pour permettre d'induire une tolérance dans l'allergie, l'action sur les LyB semble tout autant essentielle surtout lorsque l'on rappelle leur rôle dans la physiopathologie de l'allergie. Chez les patients allergiques et traités par OIT à long terme, on observe une augmentation du taux d'immunoglobulines de type G4 (IgG_4) associée à une réduction du taux d'IgE (Vickery et al., 2013b). D'autres études confirment l'augmentation des IgG_4 et rapportent également la présence plus importante de LyB spécifiques de l'allergène (Hoh et al., 2016). Ces LyB présentent majoritairement un phénotype mémoire sans pour autant exprimer des marqueurs de plasmoblastes et expriment préférentiellement des IgG ou des IgA. Malgré ces résultats en faveur d'une action bénéfique des IgG_4, leur relevance dans la tolérance aux allergènes est souvent remise en question (Williams et al., 2012). Une étude anglo-portugaise récente répond cependant de manière claire à cette interrogation en mettant en lumière le rôle des IgG_4 dans le contrôle de l'activation des basophiles et mastocytes pour la

cacahuète et ceci même en présence d'IgE spécifiques (Santos et al., 2015). Cette inactivation s'opérerait très certainement par l'intermédiaire des récepteurs Fcγ inhibiteurs précédemment décrits avec l'utilisation de VLP exprimant l'allergène à la surface. En définitive, leur rôle est très certainement bénéfique mais leur présence n'est pas forcément requise pour observer des améliorations cliniques. En ce qui concerne les IgA, il semblerait qu'une augmentation des IgA soit détectée chez des patients tolérants après une OIT, et qu'elles agissent en diminuant le passage intestinal des allergènes (Konstantinou et al., 2014). Enfin, le dernier mécanisme d'action médié par les LyB à l'issue d'une ITS serait le recrutement de LyB avec des propriétés régulatrices et notamment sécrétant de l'interleukine-10. Plusieurs études viennent étayer cette hypothèse et présentent ces LyB régulateurs comme acteurs de la tolérance par le recrutement de Treg, par l'inhibition de maturation des DC et enfin par la modulation des LyT folliculaires auxiliaires (Tfh) en favorisant la production d'IgG4 (van de Veen et al., 2016).

2.4.1. Modulation par les tolVLP

De la même manière que pour les mécanismes liés au lymphocytes T, nous n'avons pas pu étudier en détail les modulations induites au niveau du compartiment lymphocytaire B. Concernant les IgG2A qui sont le parallèle des IgG4 chez l'homme, nous n'observons aucune différence ou tendance dans leur taux que nous regardions après vaccination et ceci, à un temps précoce (Jour 25) ou tardif (Jour 150) après les sensibilisation. Cette absence d'effet pourrait être traduite par l'absence de modulation du compartiment des LyB ou de la génération de Breg. Cependant, l'apparition des IgG2a dans les ITS chez la souris augmentent fréquemment après de multiples administrations et l'administration d'une seule cure de tVLPova en début de protocole pourrait ne pas suffire pour induire la production de ces immunoglobulines. L'absence d'induction d'IgG2a est également observée après traitement par VLP vectorisant l'allergène Art-1 (Kratzer et al., 2018). Une des réflexions possibles serait de privilégier l'utilisation de VLP exprimant l'allergène à l'extérieur pour augmenter le taux d'IgG global dirigées contre l'allergène, comprenant les IgG2a chez la souris ou les IgG4 chez l'homme. Cependant, l'essai clinique réalisé chez l'homme pour évaluer la tolérance des VLP Qβ exprimant

Derp1 a certes permis une augmentation du taux d'IgG spécifiques de l'allergène mais ces immunoglobulines appartenaient quasi exclusivement aux sous-types 1 et 3 (Kündig et al., 2006).

3. Quels futurs développements pour les VLP tolérogènes ?

3.1. L'utilisation d'autres signaux de tolérance

Le développement futur de ces VLP tolérogènes exprimant le CTLA-4 ne doit pas occulter la possibilité de substituer le CTLA-4 par d'autres signaux de tolérance ou de développer la spécificité d'adressage aux APC. Cependant, dans l'optique de garder cette structure des VLP tolérogènes telle que nous l'avons envisagée à l'heure actuelle, il est essentiel de conserver la capacité de transport des antigènes au sein de la capside. Une des alternatives pour développer une thérapie permettant la tolérance pour plusieurs allergènes serait d'injecter un mélange de VLP plutôt que de vouloir intégrer au sein de la capside ces allergènes. Il est raisonnable de penser qu'un encombrement stérique trop important puisse gêner le bourgeonnement de ces VLP et donc la capacité de les produire de manière compatible avec une utilisation dans des modèles animaux ou chez l'Homme. C'est d'ailleurs le cas aujourd'hui avec le vaccin Cervarix®, le vaccin Gardasil® ou encore le Gardasil9® qui contiennent chacun un mélange de 2, 4 ou 9 sérotypes de VLP dérivées du HPV. Concernant les molécules de substitution, les principales candidates sont bien évidemment celles déjà testées dans la génération des DC tolérogènes avec en tête de file l'IL-10, ou le TGF-β. La molécule PD-1, bien qu'elle n'ait jamais été utilisée à ces fins et qu'elle présente un mécanisme d'action bien distinct du CTLA-4, reste une option intéressante. D'autre part, il est également possible d'agir directement sur d'autres types cellulaires comme les Treg avec l'utilisation de VLP exprimant l'interleukine-2. Cette approche qui avait été initialement envisagée au sein de notre projet de recherche sera détaillée dans la suite de cette discussion. En dernier lieu, l'utilisation d'autres molécules au sein des VLP peut être intéressante dans la modification de la polarisation des réponses des LyT. En effet, il est possible d'insérer au sein de la capsides des ARN non codants afin d'augmenter les réponses immunitaires et les orienter vers un profil Th1 (Pitoiset et al., 2017). Cette stratégie nécessite néanmoins la possibilité de combiner un allergène ainsi que ces ARN au sein de la VLP.

3.1.1. Les autres points de contrôle immunitaire

L'utilisation d'autres points de contrôle en dehors du CTLA-4, pour apporter le signal de tolérance, reste à l'heure actuelle moins prometteuse. En effet, bien que la liaison entre PD-1 et PD-L1 ou PD-L2 semble induire au niveau des monocytes une diminution du métabolisme avec une production potentielle d'IL-10 (Said et al., 2010), ces modifications n'ont jamais été reproduites avec des DC et il n'existe pas de données suggérant cette voie d'action comme suffisante pour induire un phénotype de tolDC. D'autre part, diminuer l'expression de la molécule PD-L1 à la surface des APC peut hypothétiquement avoir des conséquences opposées à l'induction de tolérance. En effet, PD-1 influe grandement au niveau intracellulaire sur l'état d'activation des LyT, et d'autre part certaines cellules tissulaires expriment de grandes quantités de PD-L1, ceci contribuant à l'absence de réaction immunitaire. L'utilisation de VLP exprimant à la surface la molécule PD-1 pourrait donc de manière délétère favoriser l'apparition de manifestations auto-immunes en régulant cette expression de PD-1. A l'inverse, l'utilisation de VLP exprimant à la surface un ligand de PD-1 pourrait permettre l'induction d'une tolérance au niveau des LyT. L'ajout d'un antigène au sein de la VLP pourrait permettre alors de combiner le déclenchement de mécanismes de tolérance au sein d'un microenvironnement de DC exprimant l'antigène en question. Cette approche pourrait d'autre part être exploitée avec l'utilisation de ligands pour les molécules TIM-3 et LAG-3. Leur effet immunomodulateur presque exclusivement opéré au sein des cellules exprimant ces deux molécules pourrait être exploité de manière intéressante. Malgré ces possibilités de développement, l'utilisation du CTLA-4 nous est néanmoins apparue comme la meilleure approche au sein des points de contrôle immunitaire en combinaison aux VLP pour apporter un signal de tolérance.

3.1.2. Le TGF-β et IL-10

Comme nous l'avons vu précédemment, le TGF-β est une molécule intéressante car elle permet l'induction préférentielle des Treg Foxp3+ et stabilise leur phénotype suppresseur. Deux développements de NP utilisant cette cytokine ont été réalisés et

soulignent le potentiel hautement tolérogène de cette combinaison. Le plus récent évalue l'administration de NP de PLGA conjuguées avec de la lipophiline (PLP) et du TGF-β (Casey et al., 2018). Ces NP, administrées par voie sous cutanée, induisent en premier lieu d'importants taux de Treg à partir de LyT naïfs (87,3% après 4 jours de culture avec de l'IL-2 et un anti-CD3). De plus, la combinaison du TGF-β avec la PLP permet uniquement l'induction de Treg spécifiques de l'antigène incorporé au sein de la nanoparticule. Malheureusement, ces NP ne permettent pas d'éviter l'apparition des signes cliniques initiaux dans un modèle d'EAE récurrente rémittente induite (Casey et al., 2018). Seule une diminution de la sévérité des rechutes est observée en dépit de la mise en évidence d'une augmentation des Treg dans le foie. D'autre part, on retrouve dans la littérature l'étude de McHugh et al, qui a évalué l'impact de NP co-délivrant du TGF-β et de l'IL-2 afin d'induire des Treg (McHugh et al., 2015). De manière intéressante, l'utilisation de ces NP en conditions *in vitro* a permis le doublement du nombre de Treg (CD25+ Foxp3+) par rapport à l'utilisation de facteurs solubles à la même concentration. De plus, ces Treg Foxp3+ induits possèdent une capacité suppressive plus forte que ceux générés avec les médiateurs solubles et maintiennent le phénotype Foxp3+ de manière plus stable dans le temps même après exposition à l'IL-6, cytokine qui oriente préférentiellement les LyT vers un phénotype Th17. La conclusion de ces travaux est la démonstration de l'induction de Treg dans la rate, les ganglions mésentériques et axillaires, 5 jours après une injection intraveineuse de ces NP. Ces deux études soulignent le potentiel du TGF-β dans la vaccination tolérogène en ciblant préférentiellement les Treg. Il est donc possible d'envisager d'exploiter le potentiel des VLP en exprimant à la surface du TGF-β et l'antigène au sein de la capside. Le développement de ces VLP est d'autant plus intéressant que les DC expriment elles aussi le récepteur au TGF-β. Bien que très peu d'études publiées évaluent cette cytokine seule dans la génération de tolDC, les modulations induites au niveau des APC par le TGF-β permettent le maintien d'un statut de maturation intermédiaire tout en conservant des capacités migratrices (Esebanmen and Langridge, 2017).

L'IL-10 reste la deuxième molécule très largement utilisée pour l'induction d'acteurs de la tolérance, dont les tolDC. A ce titre, il est très facile d'envisager son utilisation en association avec les VLP. Au sein de l'équipe, nous avons déjà étudié cette

combinaison par l'intermédiaire de l'administration de plasmide codant pour la VLP exprimant l'ovalbumine au sein de la capside mais sans CTLA-4 en surface, et associé au plasmide codant pour l'IL-10 (données non publiées). Cette association, testée dans le même modèle d'allergie alimentaire que celui utilisé au cours de mes recherches, n'a pas permis de moduler statistiquement la sévérité des signes cliniques observés sur l'ensemble des challenges. Cependant, une baisse du score clinique attribué a pu être observée lorsque l'on regarde indépendamment chaque cycle de challenge oral. En effet, lors du deuxième et du troisième cycle de challenge, une efficacité a été observée. L'administration de VLP, à la place de plasmides codant ces VLP, pourrait accroitre cette efficacité en délivrant ces signaux de tolérance à un niveau plus local.

Dans la littérature, seule une étude évalue l'usage de NP vectorisant de l'IL-10 en association avec des NP vectorisant la protéine MOG (Cappellano et al., 2014). Bien que significative, la baisse du score clinique observée après administration préventive ou thérapeutique reste très faible. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette efficacité modérée avec premièrement l'absence de libération des composés au niveau du site tissulaire. Cependant cette hypothèse peut être écartée, car les résultats démontrent une très bonne diffusion au niveau cérébral. Les autres hypothèses évoquées peuvent être l'absence de libération simultanée de l'IL-10 et de la protéine MOG ou alors la faible demi-vie des composants relargués. Dans cette optique, l'exploitation des propriétés de transport des VLP pourrait être intéressante car elle permettrait une délivrance simultanée aux cellules cibles.

Une des limites qui apparait avec la combinaison de molécules tolérogènes sous forme membranaire reste celle de l'absence de relargage dans le microenvironnement et donc une action potentielle plus localisée qu'avec l'utilisation des NP synthétiques. Cependant, cette expression membranaire peut au contraire être bénéfique pour augmenter la durée de demi-vie de ces molécules *in vivo* et permettre une action sur les cellules cibles. Les travaux sur l'IL-2 à la surface des VLP et leur capacité à moduler le phénotype de LyT CD8+ en augmentant leur fonction soutiennent cette conception (Wojta-Stremayr et al., 2015).

3.1.3. L'interleukine-2

L'IL-2 est un piste thérapeutique majeure dans l'immunosuppression actuellement. Cette interleukine initialement utilisée dans le domaine de la cancérologie (*i.e.* carcinome métastatique rénal et mélanome métastatique) à forte dose (18 millions d'UI par injection) ne permettait d'obtenir que des améliorations cliniques mineures et ne reste aujourd'hui prescrite que très rarement en cas d'échec pour l'ensemble des autres traitements disponibles. La caractérisation des Treg Foxp3+ et de leur expression constitutive du CD25 a permis d'ouvrir un nouveau champ thérapeutique pour l'IL-2 en l'utilisant à faible dose dans le but d'expandre préférentiellement ces Treg. C'est dans les vascularites induites à la suite d'une infection par le virus de l'hépatite C que la preuve de concept de l'IL-2 à faible dose (IL-2fd) fut démontrée (Saadoun et al., 2011). Par la suite, plusieurs essais cliniques ont été initiés, à la fois pour définir précisément les cinétiques optimales d'utilisation ainsi que les pathologies susceptibles d'être traitées. Récemment, les travaux réalisés au sein du laboratoire ont révélé une efficacité aussi bien de manière préventive que thérapeutique dans l'allergie alimentaire (Bonnet et al., 2016). Ces résultats ont motivé le lancement d'un essai clinique chez l'homme dans la rhinite allergique (PHRC 15-15-0395 : RHINIL-2) ainsi que le développement de VLP tolérogènes présentant l'IL-2 à leur surface. Ce développement permet d'envisager une administration simultanée d'IL-2 et d'un allergène avec l'idée d'induire des Treg spécifiques de cet allergène. La question de la spécificité des Treg dans l'allergie fait notamment écho aux résultats observés avec l'IL-2fd. En effet, aucune augmentation statistique du nombre de Treg n'est retrouvée à distance du traitement, néanmoins l'efficacité clinique est conservée laissant supposer la génération d'un nombre restreint mais suffisant de Treg spécifiques.

Nous avons donc développé au laboratoire les outils pour produire des VLP exprimant l'IL-2 à leur surface (VLP-IL2) et l'ovalbumine au sein de la capside. En premier lieu, nous avons caractérisé ces VLP selon les mêmes procédés que pour les VLP exprimant le CTLA-4. A l'aide d'un anticorps spécifique de l'IL-2, nous avons pu mettre en évidence la présence de l'IL-2 au sein des échantillons produits. En comparaison à l'IL-2 murine native qui présente un poids moléculaire d'environ 16kDa, l'IL-2 retrouvée

sur les VLP présente un poids moléculaire plus élevé, probablement relié à la présence d'un domaine d'ancrage membranaire (Figure 10a). Cet ancrage membranaire a été sélectionné sur la base de la comparaison entre la protéine VSV_G et le domaine GPI du $CD59_b$ et de manière similaire au CTLA-4, l'ancrage membranaire GPI a permis une meilleure expression de l'IL-2 à la fois sur les cellules productrices et sur les VLP. Malgré cet ancrage, on remarque que l'expression de l'IL-2 à la surface demeure très faible comparativement au CTLA-4 (Figure 10b). Cette faible expression est confirmée par les dosages de la cytokine par ELISA. Une concentration moyenne de 1,2 ng/ml est retrouvée pour des échantillons contenant 1 mg/mL de protéines totales. (Figure 10c).

Afin de vérifier les propriétés fonctionnelles de cette IL-2, nous avons recouru à des cellules dépendantes de l'IL-2 (CTLL-2 ATCC ® TIB-214). Ces cellules ont été mises en culture durant 8 jours en présence d'une gamme croissante d'IL-2 murine recombinante, de VLP-IL2 ou sans IL-2 et la survie ainsi que la prolifération ont été évaluées par comptage au bleu trypan. En termes de survie, les VLP-IL2 permettent d'obtenir une cinétique comparable à celle obtenue avec un milieu contenant 25 à 50 UI/mL. Lorsque l'on regarde la cinétique de prolifération des CTTL-2, les résultats obtenus permettent d'évaluer une activité des échantillons de VLP-IL2 comprise entre 12,5 et 25 UI/mL (Figure 10d). Rapportées à la concentration protéique totale des échantillons de VLP de 50 µg/mL, ces valeurs sont très inférieures à celles espérées. En effet, en considérant un volume d'injection de 200 µL par souris, l'activité de l'IL-2 administrée ne sera au maximum que de 300 UI. En comparaison, certaines études montrent une efficacité dans l'EAE dès 10000 UI (Rouse et al., 2013), tandis que la majorité des études évaluent des quantités de 25000 à 50000 UI par injection. En définitive, ces résultats ne nous ont pas encouragé à tester en efficacité thérapeutique ces VLP-IL2 dans des modèles précliniques, mais soulignent au contraire un besoin certain d'optimisation afin d'accroitre la quantité d'IL-2 exprimée à la surface. Néanmoins, il serait intéressant de regarder si malgré cette faible concentration d'interleukine-2, l'induction de Treg à partir de LyT naïfs pourrait être possible.

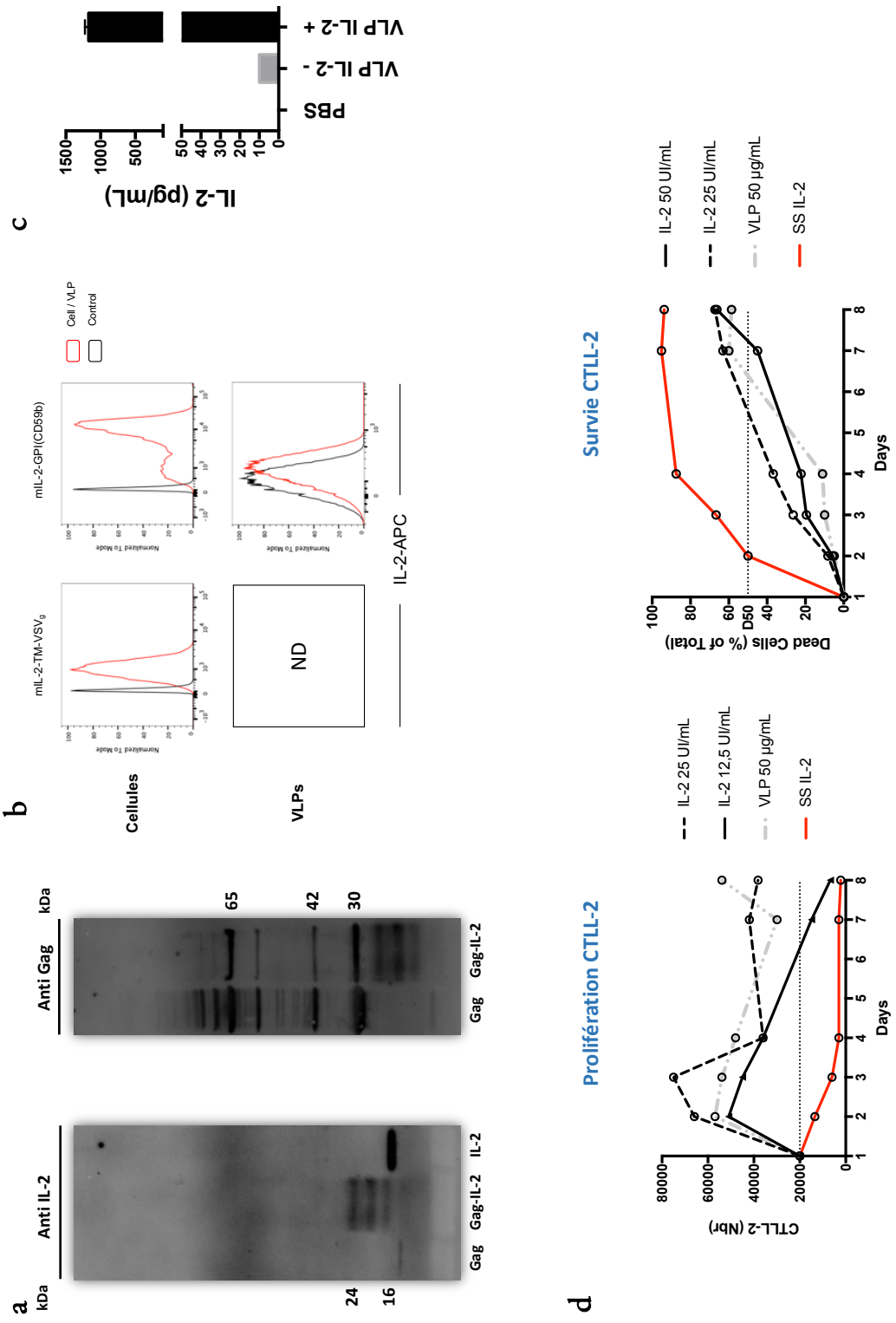


Figure 10. Caractérisation des VLP exprimant l'IL-2 à leur surface (VLP-IL2). a) Analyse des composants des VLP-IL2 par Western Blot avec une révélation par anticorps anti-IL-2 et anti-gagp30. b) Analyse de l'impact de l'ancrage membranaire par cytométrie en flux et utilisation de billes fixant les VLP. c) Détection de la quantité moyenne d'IL-2 par ELISA dans les échantillons de VLP-IL2. d) Analyse de l'activité de l'IL-2 à la surface des VLP par étude de la prolifération et de la survie de cellules CTLL-2 en comptage au bleu trypan.

3.2. L'application des VLP tolérogènes dans les maladies auto-immunes

L'allergie alimentaire est certes une pathologie grave avec un risque d'anaphylaxie létale et une incidence en augmentation constante, cependant le champ des MAI représente également une grande opportunité d'application pour les tolVLP. Il est donc rationnel de vouloir développer cet outil dans ces maladies, d'autant plus que le mécanisme d'action des tolVLP, par l'intermédiaire de la modulation des DC et du compartiment des LyT, semble compatible. Parmi l'ensemble des modèles décrits au cours de ce travail de recherche, il est aisé de remarquer l'omniprésence de l'EAE pour évaluer des thérapies immunosuppressives. Ce modèle présente en effet pour avantage d'être rapide (durée d'évaluation clinique moyenne de 30 jours entre les premières immunisations et la stagnation ou la rémission des symptômes), simple (pas de nécessité de souche de souris particulière) et relativement peu couteux. L'inconvénient majeur reste cependant la variabilité des signes cliniques de la maladie entre différentes expériences et ce principalement à cause de la complexité de préparation des immunisations. Malgré cette seule contrainte majeure, nous avons décidé d'utiliser ce modèle pour développer l'approche des tolVLP dans les MAI.

Afin de pouvoir développer ce versant de l'approche, nous avons créé et produit les outils nécessaires et en premier lieu des VLP exprimant la protéine MOG sous forme fusionnée avec la protéine gag, de manière similaire à l'ovalbumine. Le choix de MOG est basé essentiellement sur la pléthore d'essais précliniques l'utilisant, par rapport aux données relativement peu abondantes pour la lipophiline (PLP). Selon les mêmes procédés que ceux utilisés précédemment, nous avons produit et caractérisé ces VLP^{MOG} et mis en évidence la présence des composants caractéristiques. Après étude par Western-Blot, nous observons la bande caractéristique de la protéine à 25 kDa ainsi qu'une forme conjuguée avec la protéine gag à 90 kDa (Figure 11a). La présence de MOG est confirmée d'autre part en cytométrie en flux tout comme la présence de CTLA-4 à la surface sur les $tVLP^{MOG}$ (Figure 11b). Nous avons démontré par la suite la capacité des tVLP à inhiber la prolifération de cellules spécifiques de MOG. Pour se faire, nous avons trié des DC et des LyT CD4+ naïfs issus de souris transgéniques 2D2 exprimant un TCR

CMH-II restreint pour le peptide MOG_{35-55} (souris C57BL/6-Tg(Tcra2D2, Tcrb2D2) 1Kuch/J). Après incubation avec le peptide MOG_{35-55}, les DC ont été mises en culture avec les LyT CD4+ 2D2 avec ou sans tVLP. A l'issue de la culture, l'effet inhibiteur des tVLP a pu être observé (Figure 11c) avec une suppression moyenne de l'ordre de 65%. A l'inverse dans les conditions avec des VLP vides ou sans VLP, une prolifération d'au moins 75% des cellules 2D2 est observée (Figure 11d) au bout de 7 jours. D'autre part, l'effet dose dépendant des tVLP a été mis en évidence par l'index de suppression et sur l'expression membranaire du marqueur d'activation CD25 par les cellules 2D2 (Figure 11e). Les évaluations des tolVLP dans le modèle d'EAE sont actuellement en cours d'évaluation et devraient rendre leurs résultats très prochainement. Dans l'éventualité de résultats positifs, le potentiel tolérogène des tolVLP serait grandement amélioré en démontrant non seulement une efficacité dans une pathologie très marquée par une polarisation Th2 comme l'allergie, mais aussi à l'inverse dans une pathologie préférentiellement causée par une hyperactivation des lymphocytes Th1.

Lors du choix des modèles de MAI pour évaluer les tolVLP, nous avons également envisagé une étude dans le diabète de type I. La disponibilité de souris développant spontanément un diabète (NOD) au sein du laboratoire ainsi que l'expertise acquise de ce modèle avec l'étude de l'IL-2fd étaient des avantages pour son utilisation. Néanmoins, la robustesse moyenne ainsi que le délai important d'apparition des symptômes ont été des freins et nous ont préférentiellement orienté vers l'EAE. D'autre part, de nombreux antigènes sont identifiés dans ce modèle et le choix de l'antigène incorporé dans les VLP peut être problématique. Nous avions cependant sélectionné en priorité les antigènes GAD_{65} et l'insuline car ce sont les deux antigènes majoritaires déjà étudiés dans le développement de thérapies tolérogènes. Malgré ces contraintes, ce modèle reste cependant intéressant et pourrait être à l'avenir utilisé pour conforter le potentiel tolérogène des tolVLP.

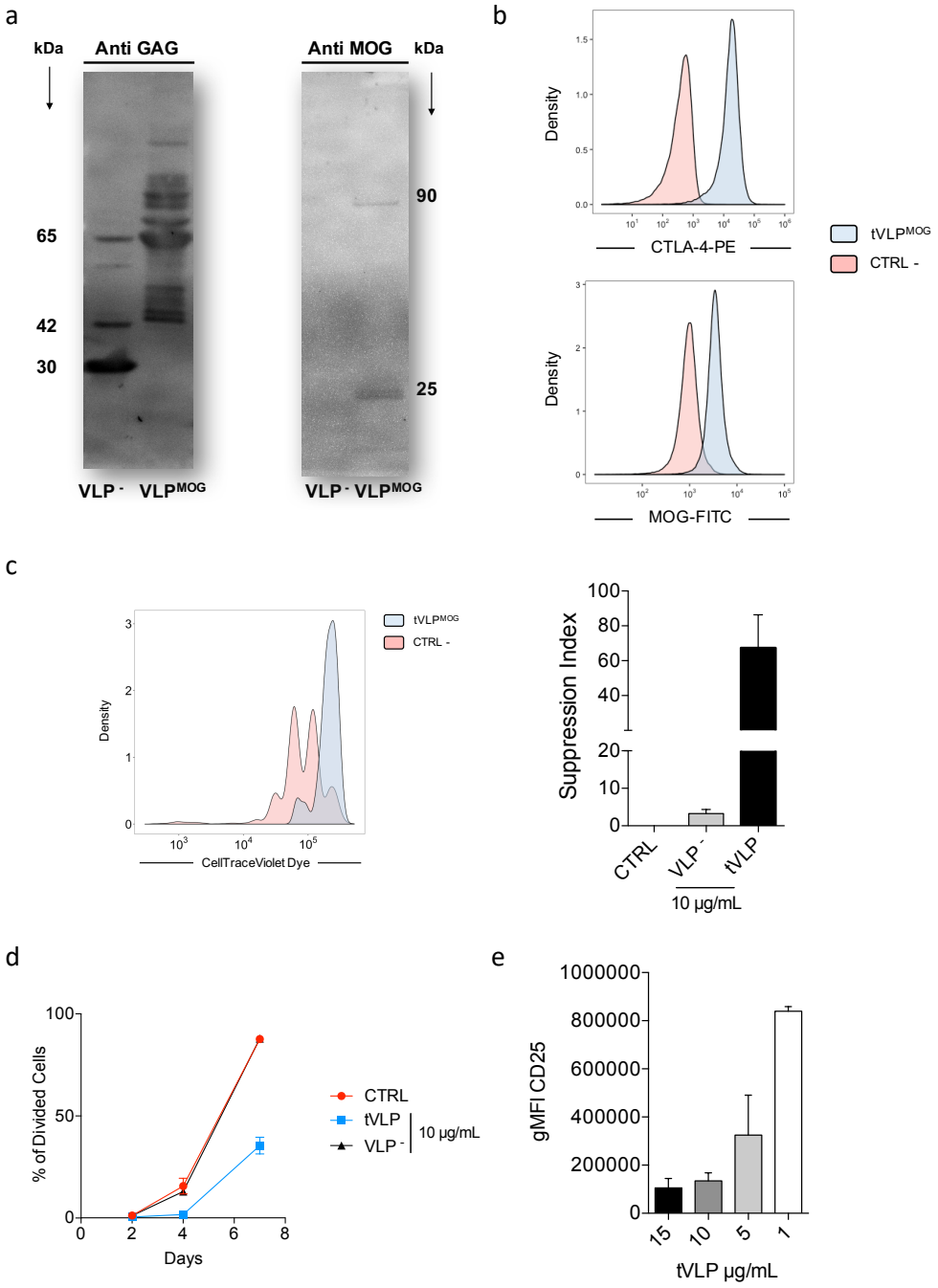


Figure 11. Développement des tVLP^{MOG}. a) Caractérisation des VLP^{MOG} par Western Blot. La présence des protéines GAG et MOG est révélée par l'utilisation d'anticorps anti-gag p30 et anti-MOG. b) Caractérisation des tVLP^{MOG} par cytométrie en flux. La présence de la protéine MOG à l'intérieur et du CTLA-4 à l'extérieur des tVLP^{MOG} est révélée par l'analyse des VLP conjuguées à des billes de latex . c) d) e) Des LyT CD4+ spécifiques du peptide MOG$_{35-55}$ marqués au CellTraceViolet® ont été cultivés en présence de DC chargées avec le peptide MOG$_{35-55}$ avec ou sans tVLP. La prolifération a été ensuite analysée par cytométrie en flux sur 7 jours. c) Inhibition de la prolifération des cellules 2D2 par les tVLP et calcul des index de suppression correspondants d) Pourcentage de cellules divisées durant les 7 jours de culture. e) L'action inhibitrice des tVLP est dose dépendante. Mesure de l'intensité de fluorescence du CD25 en fonction des concentrations de tVLP utilisées en culture.

CONCLUSION

L'incidence grandissante des désordres immunitaires, combinée avec le contrôle progressif d'un grand nombre de maladies infectieuses par la vaccination, a permis le développement d'approches vaccinales tolérogènes. Ces approches thérapeutiques complexes ont nécessité l'identification des mécanismes et des acteurs clés de la tolérance comprenant entre autres les DC ainsi que les Treg. Les points de contrôle immunitaires, largement exploités dans les thérapies anticancéreuses, sont également des leviers cibles majeurs dans la volonté d'induction de tolérance. Cependant ces thérapies souffrent d'une insuffisance d'effets thérapeutiques durables chez l'Homme, malgré une efficacité en modèle préclinique. En exploitant ces concepts, la majorité des développements actuels ont pour objectif final d'induire une tolérance spécifique, sans effets secondaires et de manière durable dans le temps. Le « graal » dans ce champ thérapeutique serait donc la caractérisation d'un outil efficace et polyvalent, que l'on souhaite l'utiliser dans des MAI systémiques, d'organes, dans l'allergie ou dans la prévention du rejet en transplantation. Pour répondre à cette demande, la génération de DC tolérogènes ou l'utilisation de nanoparticules quelle qu'en soit l'origine représente une approche intéressante car elle permet de combiner l'apport d'un antigène tout en y adjoignant un signal tolérogène. Cet intérêt est souligné par la conduite de 8 essais cliniques actuellement en cours de recrutement pour la majorité dans la sclérose en plaques. Cependant, dans ces développements ainsi que dans les nombreux travaux précliniques publiés dans ce domaine, le besoin de nouvelles approches reste toujours présent et motive la recherche de nouvelles combinaisons tolérogènes.

Dans ce cadre, l'utilisation de VLP, vectorisant un antigène et exprimant en surface des molécules immunorégulatrices telles que le CTLA-4, est porteuse d'espoir. Après avoir démontré l'efficacité de cette thérapie pour moduler les DC et induire un phénotype tolérogène, nous avons souligné les capacités d'inhibition du blocage de la prolifération de LyT spécifiques de cet antigène. La vaccination de souris sensibilisées à l'ovalbumine a permis la réduction significative des signes cliniques de l'allergie lors des challenges oraux avec l'allergène ainsi qu'une perte de température corporelle réduite. Cette sensibilité réduite à l'anaphylaxie fut maintenue dans le temps jusqu'à 160 jours après les premières sensibilisations. Les mécanismes de tolérance impliqués dans cette

protection demeurent encore peu identifiés, néanmoins le rôle prépondérant des Treg est souligné. En effet, le transfert de Treg issus de souris protégées dans d'autres souris, chez qui l'allergie est induite par la suite, permet à nouveau une réduction des symptômes cliniques observés. La notion de spécificité de la protection induite est également démontrée, car un traitement par des VLP exprimant l'ovalbumine ne permet pas une protection contre l'apparition de symptômes après la sensibilisation par un autre allergène comme la cacahuète. En définitive, ces résultats définissent la preuve de principe de l'efficacité des tolVLP dans l'allergie alimentaire chez la souris. Le futur de ce nouveau concept dans l'allergie alimentaire sera modelé très certainement par la caractérisation fine des mécanismes induits et par la définition des cinétiques de tolérance. Pour répondre à ces interrogations, l'utilisation d'agents déplétant un type cellulaire spécifique comme les Treg, les LyB ou certains sous-types de cellules dendritiques sera très certainement nécessaire et permettra d'identifier le rôle de chacun.

Compte tenu de la polyvalence de cette approche et de sa transposition dans les MAI, des travaux de recherche ont été entrepris dans le traitement de l'EAE. A l'heure actuelle la caractérisation des tolVLP et de leur efficacité à inhiber des cellules spécifiques de l'antigène MOG a été réalisée. Des études d'efficacité *in vivo* ont été entreprises et permettront de statuer sur l'intérêt de continuer ce développement dans les MAI. L'optique futur de ce projet continue sur cette lancée avec des études dans d'autres modèles de MAI, notamment le lupus ou le diabète de type 1. Malgré les inconvénients inhérents à ces modèles (*e.g.* faible représentativité de l'ensemble des mécanismes s'opérant chez l'homme et durée importante pour observer le déclenchement de la maladie), la démonstration d'une efficacité sera un atout majeur pour entrevoir un passage à l'usage chez l'Homme. Enfin, l'exploitation de la polyvalence de cet outil se doit d'être réalisée de manière approfondie avec la production et l'étude de nouvelles particules tolérogènes vectorisant d'autres points de contrôle immunitaire, ainsi que d'autres signaux de tolérance tels que des cytokines régulatrices.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbas, A.K., Benoist, C., Bluestone, J.A., Campbell, D.J., Ghosh, S., Hori, S., Jiang, S., Kuchroo, V.K., Mathis, D., Roncarolo, M.G., et al. (2013). Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature. Nat. Immunol. *14*, 307–308.

Adorini, L., and Penna, G. (2009). Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists. Handb. Exp. Pharmacol. 251–273.

Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Crameri, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., et al. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. J. Exp. Med. *199*, 1567–1575.

Allam, J.P., Würtzen, P.A., Reinartz, M., Winter, J., Vrtala, S., Chen, K.W., Valenta, R., Wenghoefer, M., Appel, T., Gros, E., et al. (2010). Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-β1 and IL-10-producing properties. J. Allergy Clin. Immunol. *126*, 638–646.

Ambühl, P.M., Tissot, A.C., Fulurija, A., Maurer, P., Nussberger, J., Sabat, R., Nief, V., Schellekens, C., Sladko, K., Roubicek, K., et al. (2007). A vaccine for hypertension based on virus-like particles: preclinical efficacy and phase I safety and immunogenicity. J. Hypertens. *25*, 63–72.

Andolfi, G., Fousteri, G., Rossetti, M., Magnani, C.F., Jofra, T., Locafaro, G., Bondanza, A., Gregori, S., and Roncarolo, M.-G. (2012). Enforced IL-10 Expression Confers Type 1 Regulatory T Cell (Tr1) Phenotype and Function to Human CD4+ T Cells. Mol. Ther. *20*, 1778–1790.

Aslam, A., Chan, H., Warrell, D.A., Misbah, S., and Ogg, G.S. (2010). Tracking Antigen-Specific T-Cells during Clinical Tolerance Induction in Humans. PLoS One *5*.

Audiger, C., Rahman, M.J., Yun, T.J., Tarbell, K. V., and Lesage, S. (2017). The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. J. Immunol. *198*, 2223–2231.

Bachmann, M.F. (2018). Using Virus-like particles for peanut allergy. EAACI Congr. 2018.

Bachmann, M.F., and Jennings, G.T. (2010). Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. Nat. Rev. Immunol. *10*, 787–796.

Bardel, E., Larousserie, F., Charlot-Rabiega, P., Coulomb-L'Hermine, A., and Devergne, O. (2008). Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. J.Immunol. *181*, 6898–6905.

Barrat, F.J., Cua, D.J., Boonstra, A., Richards, D.F., Crain, C., Savelkoul, H.F., de Waal-Malefyt, R., Coffman, R.L., Hawrylowicz, C.M., and O'Garra, A. (2002). In Vitro Generation of Interleukin 10–producing Regulatory CD4 $^{+}$ T Cells Is Induced by Immunosuppressive Drugs and Inhibited by T Helper Type 1 (Th1)– and Th2-inducing Cytokines. J. Exp. Med. *195*, 603–616.

Bégin, P., Winterroth, L.C., Dominguez, T., Wilson, S.P., Bacal, L., Mehrotra, A., Kausch, B., Trela, A., Hoyte, E., O'Riordan, G., et al. (2016). Erratum to: Safety and feasibility of oral immunotherapy to multiple allergens for food allergy [Allergy,

Asthma & Clinical Immunology 2014, 10:1]. Allergy, Asthma Clin. Immunol. *12*, 1–8.

Bellier, B., Dalba, C., Clerc, B., Desjardins, D., Drury, R., Cosset, F.L., Collins, M., and Klatzmann, D. (2006). DNA vaccines encoding retrovirus-based virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant. Vaccine *24*, 2643–2655.

Ben-Nun, a, Wekerle, H., and Cohen, I.R. (1981). Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. Nature *292*, 60–61.

Bettini, M., Szymczak-Workman, A.L., Forbes, K., Castellaw, A.H., Selby, M., Pan, X., Drake, C.G., Korman, A.J., and Vignali, D.A.A. (2011). Cutting Edge: Accelerated Autoimmune Diabetes in the Absence of LAG-3. J. Immunol. *187*, 3493–3498.

Bhatia, S., Edidin, M., Almo, S.C., and Nathenson, S.G. (2005). Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2: Implications for signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. *102*, 15569–15574.

Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. Nat. Immunol. *10*, 29–37.

Bonnet, B., Vigneron, J., Levacher, B., Vazquez, T., Pitoiset, F., Brimaud, F., Churlaud, G., Klatzmann, D., and Bellier, B. (2016). Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell-Mediated Control of Experimental Food Allergy. J. Immunol.

Brenk, M., Scheler, M., Koch, S., Neumann, J., Takikawa, O., Hacker, G., Bieber, T., and von Bubnoff, D. (2009). Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4+CD25+ Foxp3+ T Regulatory Cells. J. Immunol. *183*, 145–154.

Brune, K.D., Leneghan, D.B., Brian, I.J., Ishizuka, A.S., Bachmann, M.F., Draper, S.J., Biswas, S., and Howarth, M. (2016). Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. Sci. Rep. *6*, 19234.

Brunet, J.-F., Denizot, F., Luciani, M.-F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.-G., and Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. Nature *328*, 267–270.

Van Brussel, I., Lee, W.P., Rombouts, M., Nuyts, A.H., Heylen, M., De Winter, B.Y., Cools, N., and Schrijvers, D.M. (2014). Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: Can the unattainable dream turn into reality? Autoimmun. Rev. *13*, 138–150.

Buckland, M., Jago, C.B., Fazekasova, H., Scott, K., Tan, P.H., George, A.J.T., Lechler, R., and Lombardi, G. (2006). Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells. Am. J. Transplant. *6*, 2046–2059.

Buermann, A., Römermann, D., Baars, W., Hundrieser, J., Klempnauer, J., and Schwinzer, R. (2016). Inhibition of B-cell activation and antibody production by triggering inhibitory signals via the PD-1/PD-ligand pathway. Xenotransplantation *23*, 347–356.

Burks, A.W., Jones, S.M., Wood, R.A., Fleischer, D.M., Sicherer, S.H., Lindblad, R.W., Stablein, D., Henning, A.K., Vickery, B.P., Liu, A.H., et al. (2012). Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children. N. Engl. J. Med. *367*, 233–243.

Burton, B.R., Britton, G.J., Fang, H., Verhagen, J., Smithers, B., Sabatos-Peyton, C.A., Carney, L.J., Gough, J., Strobel, S., and Wraith, D.C. (2014). Sequential transcriptional changes dictate safe and effective antigen-specific immunotherapy. Nat. Commun. *5*, 1–13.

Bussmann, C., Xia, J., Allam, J.P., Maintz, L., Bieber, T., and Novak, N. (2010). Early markers for protective mechanisms during rush venom immunotherapy. Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol. *65*, 1558–1565.

Calvo, C.R., Amsen, D., and Kruisbeek, A.M. (1997). Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) Interferes with Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) and Jun NH2-terminal Kinase (JNK) Activation, but Does Not Affect Phosphorylation of T Cell Receptor ζ and ZAP70. J. Exp. Med. *186*.

Cappellano, G., Woldetsadik, A.D., Orilieri, E., Shivakumar, Y., Rizzi, M., Carniato, F., Gigliotti, C.L., Boggio, E., Clemente, N., Comi, C., et al. (2014). Subcutaneous inverse vaccination with PLGA particles loaded with a MOG peptide and IL-10 decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. Vaccine *32*, 5681–5689.

Casey, L.M., Pearson, R.M., Hughes, K.R., Liu, J.M.H., Rose, J.A., North, M.G., Wang, L.Z., Lei, M., Miller, S.D., and Shea, L.D. (2018). Conjugation of Transforming Growth Factor Beta to Antigen-Loaded Poly(lactide- co -glycolide) Nanoparticles Enhances Efficiency of Antigen-Specific Tolerance. Bioconjug. Chem. *29*, 813–823.

Charbonnier, L.-M., van Duivenvoorde, L.M., Apparailly, F., Cantos, C., Han, W.G.H., Noel, D., Duperray, C., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., Jorgensen, C., et al. (2006). Immature Dendritic Cells Suppress Collagen-Induced Arthritis by In Vivo Expansion of CD49b+ Regulatory T Cells. J. Immunol. *177*, 3806–3813.

Chen, M., Wang, Y.-H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y.-J., and Wang, J. (2006). Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. Science *311*, 1160–1164.

Chen, Y., Kuchroo, V., Inobe, J., Hafler, D., and Weiner, H. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science (80-.). *265*, 1237–1240.

Chiba, S., Baghdadi, M., Akiba, H., Yoshiyama, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Fujioka, Y., Ohba, Y., Gorman, J. V., Colgan, J.D., et al. (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. Nat. Immunol. *13*, 832–842.

Chinthrajah, R.S., Hernandez, J.D., Boyd, S.D., Galli, S.J., and Nadeau, K.C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. J. Allergy Clin. Immunol. *137*, 984–997.

Chu, C.-C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Grys, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., et al. (2012). Resident CD141 (BDCA3) $^{+}$ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. J. Exp. Med. *209*, 935–945.

Churlaud, G., Abbara, C., Vinot, P.-A., Fourcade, G., Ritvo, P.-G., Lorenzon, R., Rosenzwajg, M., Diquet, B., and Klatzmann, D. (2018). Pharmacodynamics of regulatory T cells in mice and humans treated with low-dose interleukin-2. J. Allergy Clin. Immunol. *0*.

Clemente-Casares, X., Blanco, J., Ambalavanan, P., Yamanouchi, J., Singha, S., Fandos, C., Tsai, S., Wang, J., Garabatos, N., Izquierdo, C., et al. (2016). Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity. Nature *530*, 434–440.

Cobbold, S.P., Nolan, K.F., Graca, L., Castejon, R., Le Moine, A., Frewin, M., Humm, S., Adams, E., Thompson, S., Zelenika, D., et al. (2003). Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation tolerance: molecular markers and mechanisms. Immunol. Rev. *196*, 109–124.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature *450*, 566–569.

Comi, M., Amodio, G., and Gregori, S. (2018). Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells. Front. Immunol. *9*, 682.

Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103 $^{+}$ DCs induces Foxp3 $^{+}$ regulatory T cells via a TGF-β– and retinoic acid–dependent mechanism. J. Exp. Med. *204*, 1757–1764.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J. Exp. Med. *204*, 1257–1265.

Dhadwar, S.S., Kiernan, J., Wen, J., and Hortelano, G. (2010). Repeated oral administration of chitosan/DNA nanoparticles delivers functional FVIII with the absence of antibodies in hemophilia A mice. J. Thromb. Haemost. *8*, 2743–2750.

Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex Vivo Isolation and Characterization of Cd4 $^{+}$ Cd25 $^{+}$ T Cells with Regulatory Properties from Human Blood. J. Exp. Med. *193*, 1303–1310.

Ding, H., Wu, X., Wu, J., Yagita, H., He, Y., Zhang, J., Ren, J., and Gao, W. (2006). Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice. Clin. Immunol. *118*, 258–267.

Dioszeghy, V., Mondoulet, L., Dhelft, V., Ligouis, M., Puteaux, E., Benhamou, P.-H., and Dupont, C. (2011). Epicutaneous Immunotherapy Results in Rapid Allergen Uptake by Dendritic Cells through Intact Skin and Downregulates the Allergen-Specific Response in Sensitized Mice. J. Immunol. *186*, 5629–5637.

Dioszeghy, V., Mondoulet, L., Laoubi, L., Dhelft, V., Plaquet, C., Bouzereau, A., Dupont, C., and Sampson, H. (2018). Antigen Uptake by Langerhans Cells Is Required for the Induction of Regulatory T Cells and the Acquisition of Tolerance During Epicutaneous Immunotherapy in OVA-Sensitized Mice. Front. Immunol. *9*, 1–10.

Van Duivenvoorde, L.M., Louis-Plence, P., Apparailly, F., Van Der Voort, E.I.H., Huizinga, T.W.J., Jorgensen, C., and Toes, R.E.M. (2004). Antigen-specific immunomodulation of collagen-induced arthritis with tumor necrosis factor-stimulated dendritic cells. Arthritis Rheum. *50*, 3354–3364.

Durrbach, A., Pestana, J.M., Florman, S., del Carmen Rial, M., Rostaing, L., Kuypers, D., Matas, A., Wekerle, T., Polinsky, M., Meier-Kriesche, H.U., et al. (2016). Long-Term Outcomes in Belatacept- Versus Cyclosporine-Treated Recipients of Extended Criteria Donor Kidneys: Final Results From BENEFIT-EXT, a Phase III Randomized Study. Am. J. Transplant. *16*, 3192–3201.

Esebanmen, G.E., and Langridge, W.H.R. (2017). The role of TGF-beta signaling in dendritic cell tolerance. Immunol. Res. *65*, 987–994.

Esposito, L., Hunter, K.M.D., Clark, J., Rainbow, D.B., Stevens, H., Denesha, J., Duley, S., Dawson, S., Coleman, G., Nutland, S., et al. (2014). Investigation of Soluble and Transmembrane CTLA-4 Isoforms in Serum and Microvesicles. J. Immunol. *193*, 889–900.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nat. Immunol. *4*, 1206–1212.

Feng, H., Zhang, H., Deng, J., Wang, L., He, Y., Wang, S., Seyedtabaei, R., Wang, Q., Liu, L., Galipeau, J., et al. (2015). Incorporation of a GPI-anchored engineered cytokine as a molecular adjuvant enhances the immunogenicity of HIV VLPs. Sci. Rep. *5*, 11856.

Ferreira, G.B., Kleijwegt, F.S., Waelkens, E., Lage, K., Nikolic, T., Hansen, D.A., Workman, C.T., Roep, B.O., Overbergh, L., and Mathieu, C. (2012). Differential protein pathways in 1,25-dihydroxyvitamin d(3) and dexamethasone modulated tolerogenic human dendritic cells. J. Proteome Res. *11*, 941–971.

Fife, B.T., Pauken, K.E., Eagar, T.N., Obu, T., Wu, J., Tang, Q., Azuma, M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2009). Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. Nat. Immunol. *10*, 1185–1192.

Finck, B.K., Linsley, P.S., and Wofsy, D. (1994). Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. Science (80-.). *265*, 1225–1227.

Flórez-Grau, G., Zubizarreta, I., Cabezón, R., Villoslada, P., and Benitez-Ribas, D. (2018). Tolerogenic dendritic cells as a promising antigen-specific therapy in the treatment of multiple sclerosis and neuromyelitis optica from preclinical to clinical trials. Front. Immunol. *9*, 1–10.

Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. Immunity *22*, 329–341.

Ford, M.L., Koehn, B.H., Wagener, M.E., Jiang, W., Gangappa, S., Pearson, T.C., and Larsen, C.P. (2007). Antigen-specific precursor frequency impacts T cell proliferation, differentiation, and requirement for costimulation. J. Exp. Med. *204*, 299–309.

Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function

of induced regulatory T cells. J. Exp. Med. *206*, 3015–3029.

Friedline, R.H., Brown, D.S., Nguyen, H., Kornfeld, H., Lee, J., Zhang, Y., Appleby, M., Der, S.D., Kang, J., and Chambers, C.A. (2009). CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. J. Exp. Med. *206*, 421–434.

Gagliani, N., Magnani, C.F., Huber, S., Gianolini, M.E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D.R., Bulfone, A., Trentini, F., et al. (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. Nat. Med. *19*, 739–746.

Gandhi, R., Farez, M.F., Wang, Y., Kozoriz, D., Quintana, F.J., and Weiner, H.L. (2010). Cutting Edge: Human Latency-Associated Peptide+ T Cells: A Novel Regulatory T Cell Subset. J. Immunol. *184*, 4620–4624.

García-González, P.A., Schinnerling, K., Sepúlveda-Gutiérrez, A., Maggi, J., Mehdi, A.M., Nel, H.J., Pesce, B., Larrondo, M.L., Aravena, O., Molina, M.C., et al. (2017). Dexamethasone and monophosphoryl lipid a induce a distinctive profile on monocyte-derived dendritic cells through transcriptional modulation of genes associated with essential processes of the immune response. Front. Immunol. *8*.

Garrone, P., Fluckiger, A.C., Mangeot, P.E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., Cangialosi, A., Du Chéné, I., LeGrand, R., Mangeot, I., et al. (2011a). A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. Sci. Transl. Med. *3*.

Garrone, P., Fluckiger, A.-C., Mangeot, P.E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., Cangialosi, A., Du Chene, I., LeGrand, R., Mangeot, I., et al. (2011b). A Prime-Boost Strategy Using Virus-Like Particles Pseudotyped for HCV Proteins Triggers Broadly Neutralizing Antibodies in Macaques. Sci. Transl. Med. *3*, 94ra71-94ra71.

Geissmann, F., Dieu-Nosjean, M.C., Dezutter, C., Valladeau, J., Kayal, S., Leborgne, M., Brousse, N., Saeland, S., and Davoust, J. (2002). Accumulation of Immature Langerhans Cells in Human Lymph Nodes Draining Chronically Inflamed Skin. J. Exp. Med. *196*, 417–430.

Genovese, M.C., Becker, J.-C., Schiff, M., Luggen, M., Sherrer, Y., Kremer, J., Birbara, C., Box, J., Natarajan, K., Nuamah, I., et al. (2005). Abatacept for Rheumatoid Arthritis Refractory to Tumor Necrosis Factor a Inhibition. N. Engl. J. Med. *353111353*, 1114–1123.

Goldmann, K., Ensminger, S.M., and Spriewald, B.M. (2012). Oral gene application using chitosan-DNA nanoparticles induces transferable tolerance. Clin. Vaccine Immunol. *19*, 1758–1764.

Gonçalves Silva, I., Yasinska, I.M., Sakhnevych, S.S., Fiedler, W., Wellbrock, J., Bardelli, M., Varani, L., Hussain, R., Siligardi, G., Ceccone, G., et al. (2017). The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. EBioMedicine *22*, 44–57.

Gough, S.C.L., Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2005). CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. Immunol. Rev. *204*, 102–115.

Grabbe, S., Bhardwaj, R.S., Mahnke, K., Simon, M.M., Schwarz, T., and Luger, T.A. (1996). alpha-Melanocyte-stimulating hormone induces hapten-specific tolerance in mice. J. Immunol. *156*, 473–478.

Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H., and Flavell, R.A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 10878–10883.

Greene, J.L., Leytze, G.M., Emswiler, J., Peach, R., Cosand, W., and Linsley, P.S. (1996). Covalent Dimerization of CD28 / CTLA-4 and Oligomerization of CD80 / CD86 Regulate T Cell Costimulatory Interactions. J. Biol. Chem. *271*, 26762–26771.

Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., and Müller, R.H. (2000). "Stealth" corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. Colloids Surfaces B Biointerfaces *18*, 301–313.

Gregori, S., Goudy, K.S., and Roncarolo, M.G. (2012). The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. Front. Immunol. *3*, 1–12.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat. Immunol. *3*, 1097–1101.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., Ley, T.J., and Ctls, C.T. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. Analysis *104*, 2840–2848.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature *389*, 737–742.

Gu, F., Zhang, L., Teply, B.A., Mann, N., Wang, A., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R., and Farokhzad, O.C. (2008). Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 2586–2591.

Gueguen, C., Bouley, J., Moussu, H., Luce, S., Duchateau, M., Chamot-Rooke, J., Pallardy, M., Lombardi, V., Nony, E., Baron-Bodo, V., et al. (2015). Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. J. Allergy Clin. Immunol.

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+Regulatory T Cells in the Lamina Propria. Immunity *34*, 237–246.

Hannier, S., Tournier, M., Bismuth, G., and Triebel, F. (1998). CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. J. Immunol. *161*, 4058–4065.

Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. N. Engl. J. Med. *358*, 676–688.

Hawrylowicz, C.M., and O'Garra, A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat. Rev. Immunol. *5*, 271–283.

Healy, L.J., Collins, H.L., and Thompson, S.J. (2008). Systemic administration of tolerogenic dendritic cells ameliorates murine inflammatory arthritis. Open Rheumatol. J. *2*, 71–80.

de Heer, H.J., Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A.M., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Essential Role of Lung Plasmacytoid Dendritic Cells in Preventing Asthmatic Reactions to Harmless Inhaled Antigen. J. Exp. Med. *200*, 89–98.

Herold, K.C., Hagopian, W., Auger, J.A., Poumian-Ruiz, E., Taylor, L., Donaldson, D., Gitelman, S.E., Harlan, D.M., Xu, D., Zivin, R.A., et al. (2002). Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. N Engl J Med *346*, 1692–1698.

Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Uemura, Y., and Nishimura, Y. (2005). Prevention of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Transfer of Embryonic Stem Cell-Derived Dendritic Cells Expressing Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Peptide along with TRAIL or Programmed Death-1 Ligand. J. Immunol. *174*, 1888–1897.

Hoh, R.A., Joshi, S.A., Liu, Y., Wang, C., Roskin, K.M., Lee, J.Y., Pham, T., Looney, T.J., Jackson, K.J.L., Dixit, V.P., et al. (2016). Single B-cell deconvolution of peanut-specific antibody responses in allergic patients. J. Allergy Clin. Immunol. *137*, 157–167.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science *299*, 1057–1061.

Hovav, A.H. (2014). Dendritic cells of the oral mucosa. Mucosal Immunol. *7*, 27–37.

Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. Immunity *21*, 503–513.

Huang, Y.H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A.C., Gandhi, A., Russell, A., Dougan, S.K., Petersen, B.S., Melum, E., Pertel, T., et al. (2015). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. Nature *517*, 386–390.

Huard, B., Prigent, P., Tournier, M., Bruniquel, D., and Triebel, F. (1995). CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. Eur. J. Immunol. *25*, 2718–2721.

Hui, E., Zhu, J., Cheung, J., Su, X., Taylor, M.J., Kim, J.M., Mellman, I., and Vale, R.D. (2016). The T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target of PD-1 mediated inhibition. Science (80-.). *4*, 1–14.

Huret, C., Desjardins, D., Miyalou, M., Levacher, B., Amadoudji Zin, M., Bonduelle, O., Combadière, B., Dalba, C., Klatzmann, D., and Bellier, B. (2013). Recombinant retrovirus-derived virus-like particle-based vaccines induce hepatitis C virus-specific cellular and neutralizing immune responses in mice. Vaccine *31*, 1540–1547.

Investigators, T.C.T. (2008). Alemtuzumab vs. Interferon Beta-1a in Early Multiple Sclerosis. N. Engl. J. Med. *359*, 1786–1801.

Irvine, D.J., Swartz, M.A., and Szeto, G.L. (2013). Engineering synthetic vaccines using

cues from natural immunity. Nat. Mater. *12*, 978–990.

Jacob, M., Ohl, K., Goodarzi, T., Harendza, S., Eggermann, T., Fitzner, C., Hilgers, R.-D., Bolte, A., Floege, J., Rauen, T., et al. (2018). CTLA-4 Polymorphisms in Patients with IgA Nephropathy Correlate with Proteinuria. Kidney Blood Press. Res. *43*, 360–366.

James, C., and Bernstein, D.I. (2017). Allergen immunotherapy: an updated review of safety. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. *17*, 55–59.

Jang, M.H., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Yang, B.-G., et al. (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. J. Immunol. *176*, 803–810.

Joetham, A., Takada, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.-H., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. (2007). Naturally Occurring Lung CD4+CD25+ T Cell Regulation of Airway Allergic Responses Depends on IL-10 Induction of TGF- . J. Immunol. *178*, 1433–1442.

Johnston, L.K., Chien, K.B., and Bryce, P.J. (2014). The immunology of food allergy. J. Immunol. *192*, 2529–2534.

Jones, S.M., Pons, L., Roberts, J.L., Scurlock, A.M., Perry, T.T., Kulis, M., Shreffler, W.G., Steele, P., Henry, K.A., Adair, M., et al. (2009). Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. J. Allergy Clin. Immunol. *124*, 292–300.e97.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and Functional Characterization of Human $Cd4^{+}$ $Cd25^{+}$ T Cells with Regulatory Properties Isolated from Peripheral Blood. J. Exp. Med. *193*, 1285–1294.

Kaczmarczyk, S.J., Sitaraman, K., Young, H. a, Hughes, S.H., and Chatterjee, D.K. (2011). Protein delivery using engineered virus-like particles. Pnas *108*, 16998–17003.

Kataoka, H., Takahashi, S., Takase, K., Yamasaki, S., Yokosuka, T., Koike, T., and Saito, T. (2005). CD25+CD4+ regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. Int. Immunol. *17*, 421–427.

Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. Annu. Rev. Immunol. *26*, 677–704.

Kelsall, B.L., and Rescigno, M. (2004). Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation. Nat. Immunol. *5*, 1091–1095.

Kim, W.-U., Lee, W.-K., Ryoo, J.-W., Kim, S.-H., Kim, J., Youn, J., Min, S.-Y., Bae, E.-Y., Hwang, S.-Y., Park, S.-H., et al. (2002). Suppression of collagen-induced arthritis by single administration of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles entrapping type II collagen: a novel treatment strategy for induction of oral tolerance. Arthritis Rheum. *46*, 1109–1120.

Kishimoto, T.K., and Maldonado, R.A. (2018). Nanoparticles for the induction of antigen-specific immunological tolerance. Front. Immunol. *9*.

Klatzmann, D., and Abbas, A.K. (2015). The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. Nat. Rev. Immunol. *15*, 283–294.

Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L.A., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., et al. (2008). Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+Dermal Dendritic Cells. Immunity *29*, 497–510.

Kleijwegt, F.S., Laban, S., Duinkerken, G., Joosten, A.M., Zaldumbide, A., Nikolic, T., and Roep, B.O. (2010). Critical Role for TNF in the Induction of Human Antigen-Specific Regulatory T Cells by Tolerogenic Dendritic Cells. J. Immunol. *185*, 1412–1418.

Konstantinou, G.N., Nowak-Wegrzyn, A., Bencharitiwong, R., Bardina, L., Sicherer, S.H., and Sampson, H.A. (2014). Egg-white-specific IgA and IgA2 antibodies in egg-allergic children: Is there a role in tolerance induction? Pediatr. Allergy Immunol. *25*, 64–70.

Koorella, C., Nair, J.R., Murray, M.E., Carlson, L.M., Watkins, S.K., and Lee, K.P. (2014). Novel regulation of CD80/CD86-induced phosphatidylinositol 3-kinase signaling by NOTCH1 protein in interleukin-6 and indoleamine 2,3-dioxygenase production by dendritic cells. J. Biol. Chem. *289*, 7747–7762.

Kratzer, B., Köhler, C., Hofer, S., Smole, U., Trapin, D., Iturri, J., Pum, D., Kienzl, P., Elbe-Bürger, A., Gattinger, P., et al. (2018). Prevention of allergy by virus-like nanoparticles (VNP) delivering shielded versions of major allergens in a humanized murine allergy model.

Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. J. Exp. Med. *182*, 459–465.

Kündig, T.M., Senti, G., Schnetzler, G., Wolf, C., Prinz Vavricka, B.M., Fulurija, A., Hennecke, F., Sladko, K., Jennings, G.T., and Bachmann, M.F. (2006). Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults. J. Allergy Clin. Immunol. *117*, 1470–1476.

Larregina, A.T., and Falo, L.D. (2005). Changing paradigms in cutaneous immunology: Adapting with dendritic cells. J. Invest. Dermatol. *124*, 1–12.

Larsen, C.P., Elwood, E.T., Alexander, D.Z., Ritchie, S.C., Hendrix, R., Tucker-Burden, C., Cho, H.R., Aruffo, A., Hollenbaugh, D., Linsley, P.S., et al. (1996). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. Nature *381*, 434–438.

Larsen, C.P., Pearson, T.C., Adams, A.B., Tso, P., Shirasugi, N., Strobert, E., Anderson, D., Cowan, S., Price, K., Naemura, J., et al. (2005). Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. Am. J. Transplant. *5*, 443–453.

Lee, J., Su, E.W., Zhu, C., Hainline, S., Phuah, J., Moroco, J.A., Smithgall, T.E., Kuchroo, V.K., and Kane, L.P. (2011). Phosphotyrosine-Dependent Coupling of Tim-3 to T-Cell Receptor Signaling Pathways. Mol. Cell. Biol. *31*, 3963–3974.

Lee, K.M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D.K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L.E., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. Science (80-.). *282*, 2263–2266.

Leitner, J., Rieger, A., Pickl, W.F., Zlabinger, G., Grabmeier-Pfistershammer, K., and

Steinberger, P. (2013). TIM-3 Does Not Act as a Receptor for Galectin-9. PLoS Pathog. *9*.

Leonard, S.A., Martos, G., Wang, W., Nowak-Wegrzyn, A., and Berin, M.C. (2012). Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. J. Allergy Clin. Immunol. *129*, 1579–1587.

Lescaille, G., Pitoiset, F., Macedo, R., Baillou, C., Huret, C., Klatzmann, D., Tartour, E., Lemoine, F.M., and Bellier, B. (2013). Efficacy of DNA vaccines forming e7 recombinant retroviral virus-like particles for the treatment of human papillomavirus-induced cancers. Hum. Gene Ther. *24*, 533–544.

Lindsten, T., Lee, K.P., Harris, E.S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P.J., Lombard, D.B., Freeman, G.J., Nadler, L.M., Gray, G.S., et al. (1993). Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. J Immunol *151*, 3489–99.

Linsley, P.S., Wallace, P.M., Johnson, J., Gibson, M.G., Greene, J.L., Ledbetter, J. a, Singh, C., and Tepper, M. a (1992). Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. Science (80-.). *257*, 792–795.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., and Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. Immunity *1*, 793–801.

Linsley, P.S., Nadler, S.G., Bajorath, J., Peach, R., Leung, H.T., Rogers, J., Bradshaw, J., Stebbins, M., Leytze, G., Brady, W., et al. (1995). Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4): A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. J. Biol. Chem. *270*, 15417–15424.

Liu, J., and Zhang, H.-X. (2013). *CTLA-4* Polymorphisms and Systemic Lupus Erythematosus: A Comprehensive Meta-Analysis. Genet. Test. Mol. Biomarkers *17*, 226–231.

Liu, Y., Shu, Q., Gao, L., Hou, N., Zhao, D., Liu, X., Zhang, X., Xu, L., Yue, X., Zhu, F., et al. (2010). Increased Tim-3 expression on peripheral lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis negatively correlates with disease activity. Clin. Immunol. *137*, 288–295.

Long, S.A., Cerosaletti, K., Bollyky, P.L., Tatum, M., Shilling, H., Zhang, S., Zhang, Z., Pihoker, C., Sanda, S., Greenbaum, C., et al. (2010). Defects in IL-2R Signaling Contribute to Diminished Regulatory T-Cells of Type 1 Diabetic Subjects. Diabetes *59*, 407–415.

Ludewig, B., Odermatt, B., Landmann, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1998). Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. J. Exp. Med. *188*, 1493–1501.

Ludewig, B., Junt, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2001). Dendritic cells in autoimmune diseases. Curr. Opin. Immunol. *13*, 657–662.

Lutterotti, A., Yousef, S., Sputtek, A., Stürner, K.H., Stellmann, J.P., Breiden, P., Reinhardt, S., Schulze, C., Bester, M., Heesen, C., et al. (2013). Antigen-specific tolerance by autologous myelin peptide-coupled cells: A phase 1 trial in multiple sclerosis. Sci. Transl. Med. *5*, 1–12.

Macauley, M.S., Pfrengle, F., Rademacher, C., Nycholat, C.M., Gale, A.J., Von Drygalski, A., and Paulson, J.C. (2013). Antigenic liposomes displaying CD22 ligands induce antigen-specific B cell apoptosis. J. Clin. Invest. *123*, 3074–3083.

Magnani, C.F., Alberigo, G., Bacchetta, R., Serafini, G., Andreani, M., Roncarolo, M.G., and Gregori, S. (2011). Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. Eur. J. Immunol. *41*, 1652–1662.

Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A.H., and Jonuleit, H. (2002). Immature, but not inactive: The tolerogenic function of immature dendritic cells. Immunol. Cell Biol. *80*, 477–483.

Maldonado, R., and Andrian, U. Von (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells.

Mascarell, L., Lombardi, V., Louise, A., Saint-Lu, N., Chabre, H., Moussu, H., Betbeder, D., Balazuc, A.M., Van Overtvelt, L., and Moingeon, P. (2008). Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+T cells. J. Allergy Clin. Immunol. *122*.

McHugh, M.D., Park, J., Uhrich, R., Gao, W., Horwitz, D.A., and Fahmy, T.M. (2015). Paracrine co-delivery of TGF-β and IL-2 using CD4-targeted nanoparticles for induction and maintenance of regulatory T cells. Biomaterials *59*, 172–181.

Miller, S.D., Turley, D.M., and Podojil, J.R. (2007). Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. Nat. Rev. Immunol. *7*, 665–677.

Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Busato, F., Plaquet, C., Dhelft, V., Bethune, K., Leclere, L., Daviaud, C., Ligouis, M., Sampson, H., et al. (2018). *Gata3* hypermethylation and *Foxp3* hypomethylation are associated with sustained protection and bystander effect following epicutaneous immunotherapy in peanut-sensitized mice. Allergy *33*, 0–3.

Monney, L., Sabatos, C.A., Gaglia, J.L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E.A., Coyle, A.J., Sobel, R.A., et al. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. Nature *415*, 536–541.

Mora, J.R., Iwata, M., and Von Andrian, U.H. (2008). Vitamin effects on the immune system: Vitamins A and D take centre stage. Nat. Rev. Immunol. *8*, 685–698.

de Moreno de LeBlanc, A., del Carmen, S., Zurita-Turk, M., Santos Rocha, C., van de Guchte, M., Azevedo, V., Miyoshi, A., and LeBlanc, J.G. (2011). Importance of IL-10 Modulation by Probiotic Microorganisms in Gastrointestinal Inflammatory Diseases. ISRN Gastroenterol. *2011*, 1–11.

Morgan, M.E., Flierman, R., Van Duivenvoorde, L.M., Witteveen, H.J., Van Ewijk, W., Van Laar, J.M., De Vries, R.R.P., and Toes, R.E.M. (2005). Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. Arthritis Rheum. *52*, 2212–2221.

Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. J. Clin. Invest. *117*, 1147–1154.

Munthe-Kaas, M.C., Håkon Carlsen, K., Helms, P.J., Gerritsen, J., Whyte, M., Feijen,

M., Skinningsrud, B., Main, M., Ng Man Kwong, G., Lie, B.A., et al. (2004). CTLA-4 polymorphisms in allergy and asthma and the TH1/ TH2 paradigm. J. Allergy Clin. Immunol. *114*, 280–287.

N, P., J, B., V, P., F, L., L, L., and VA., B. (2012). Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways … Sci Signal *5*, 1–15.

Nakayama, M., Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2009). Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. Blood *113*, 3821–3830.

Nelson, H.S., Lahr, J., Rule, R., Bock, A., and Leung, D. (1997). Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. J. Allergy Clin. Immunol. *99*, 744–751.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nat. Rev. Immunol. *8*, 34–47.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity *11*, 141–151.

Nishimura, H., Honjo, T., and Minato, N. (2000). Facilitation of Selection and Modification of Positive Selection in the Thymus of Pd-1-Deficient Mice. J. Exp. Med. *191*, 891–898.

Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., et al. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science *291*, 319–322.

Nuyts, A.H., Lee, W.P., Bashir-Dar, R., Berneman, Z.N., and Cools, N. (2013). Dendritic cells in multiple sclerosis: Key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies? Mult. Scler. J. *19*, 995–1002.

Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C.S., Krammer, P.H., and Suri-Payer, E. (2007). Rapid Suppression of Cytokine Transcription in Human CD4+CD25- T Cells by CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells: Independence of IL-2 Consumption, TGF- , and Various Inhibitors of TCR Signaling. J. Immunol. *179*, 3578–3587.

Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., et al. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. Nat. Immunol. *7*, 652–662.

Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B.S., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. J. Exp. Med. *206*, 549–559.

Oida, T., Zhang, X., Goto, M., Hachimura, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S., and Weiner, H.L. (2003). CD4+CD25- T Cells That Express Latency-Associated Peptide on the Surface Suppress CD4+CD45RBhigh-Induced Colitis by a TGF- -Dependent Mechanism. J. Immunol. *170*, 2516–2522.

Oka, T., Rios, E.J., Tsai, M., Kalesnikoff, J., and Galli, S.J. (2013). Rapid desensitization induces internalization of antigen-specific IgE on mouse mast cells. J. Allergy Clin. Immunol. *132*, 922–932.e16.

Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 10113–10118.

Orban, T., Bundy, B., Becker, D.J., DiMeglio, L.A., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Greenbaum, C.J., Marks, J.B., Monzavi, R., et al. (2011). Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet *378*, 412–419.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nat. Immunol. *8*, 1353–1362.

Parry, R. V, Chemnitz, J.M., Frauwirth, K. a, Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Sumire, V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., Riley, L., Kobayashi, S. V, et al. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms †. Mol. Cell. Biol. *25*, 9543–9553.

Parulekar, A.D., Boomer, J.S., Patterson, B.M., Yin-Declue, H., Deppong, C.M., Wilson, B.S., Jarjour, N.N., Castro, M., and Green, J.M. (2013). A randomized controlled trial to evaluate inhibition of T-cell costimulation in allergen-induced airway inflammation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *187*, 494–501.

Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L.N., Karoly, E.D., Freeman, G.J., Petkova, V., Seth, P., et al. (2015). PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. Nat. Commun. *6*, 1–13.

Pauken, K.E., Jenkins, M.K., Azuma, M., and Fife, B.T. (2013). PD-1, but not PD-L1, expressed by islet-Reactive CD4+ T cells suppresses infiltration of the pancreas during type 1 diabetes. Diabetes *62*, 2859–2869.

Paulick, M.G., and Bertozzi, C.R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. Biochemistry *47*, 6991–7000.

Pei, W., Wan, X., Shahzad, K.A., Zhang, L., Song, S., Jin, X., Wang, L., Zhao, C., and Shen, C. (2018). Direct modulation of myelin-autoreactive CD4+and CD8+T cells in EAE mice by a tolerogenic nanoparticle co-carrying myelin peptide-loaded major histocompatibility complexes, CD47 and multiple regulatory molecules. Int. J. Nanomedicine *13*, 3731–3750.

Peschl, P., Reindl, M., Schanda, K., Sospedra, M., Martin, R., and Lutterotti, A. (2015). Antibody responses following induction of antigen-specific tolerance with antigen-coupled cells. Mult. Scler. J. *21*, 651–655.

Piccirillo, C.A., Letterio, J.J., Thornton, A.M., McHugh, R.S., Mamura, M., Mizuhara, H., and Shevach, E.M. (2002). $CD4^+CD25^+$ Regulatory T Cells Can Mediate Suppressor Function in the Absence of Transforming Growth Factor β1 Production and Responsiveness. J. Exp. Med. *196*, 237–246.

Pitoiset, F., Vazquez, T., and Bellier, B. (2015). Enveloped virus-like particle platforms: vaccines of the future? Expert Rev. Vaccines *14*, 913–915.

Pitoiset, F., Vazquez, T., Levacher, B., Nehar-Belaid, D., Dérian, N., Vigneron, J., Klatzmann, D., and Bellier, B. (2017). Retrovirus-Based Virus-Like Particle Immunogenicity and Its Modulation by Toll-Like Receptor Activation. J. Virol. *91*, 1–14.

Poirier, N., Azimzadeh, A.M., Zhang, T., Dilek, N., Mary, C., Nguyen, B., Tillou, X., Wu, G., Reneaudin, K., Hervouet, J., et al. (2010). Inducing CTLA-4–Dependent Immune Regulation by Selective CD28 Blockade Promotes Regulatory T Cells in Organ Transplantation. Sci. Transl. Med. *2*, 17–10.

Proietto, A.I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., et al. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 19869–19874.

Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. Science *332*, 600–603.

Rouse, M., Nagarkatti, M., and Nagarkatti, P.S. (2013). The role of IL-2 in the activation and expansion of regulatory T-cells and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunobiology *218*, 674–682.

Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., et al. (2008). Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. Immunity *28*, 546–558.

Ryan, J.F., Hovde, R., Glanville, J., Lyu, S.-C., Ji, X., Gupta, S., Tibshirani, R.J., Jay, D.C., Boyd, S.D., Chinthrajah, R.S., et al. (2016). Successful immunotherapy induces previously unidentified allergen-specific CD4+ T-cell subsets. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, E1286–E1295.

Saadoun, D., Rosenzwajg, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., and Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. N. Engl. J. Med. *365*, 2067–2077.

Sabatos, C.A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sánchez-Fueyo, A., Zheng, X.X., Coyle, A.J., Strom, T.B., Freeman, G.J., and Kuchroo, V.K. (2003). Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. Nat. Immunol. *4*, 1102–1110.

Sagar, D., Lamontagne, A., Foss, C.A., Khan, Z.K., Pomper, M.G., and Jain, P. (2012). Dendritic cell CNS recruitment correlates with disease severity in EAE via CCL2 chemotaxis at the blood-brain barrier through paracellular transmigration and ERK activation. J. Neuroinflammation *9*, 1–15.

Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2016). T follicular regulatory cells. Immunol. Rev. *271*, 246–259.

Said, E.A., Dupuy, F.P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., Hill, B.J., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., et al. (2010). Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4 + T cell activation during HIV infection. Nat. Med. *16*, 452–459.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. *155*, 1151–1164.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Cell *133*, 775–787.

Sánchez-Fueyo, A., Tian, J., Picarella, D., Domenig, C., Zheng, X.X., Sabatos, C.A., Manlongat, N., Bender, O., Kamradt, T., Kuchroo, V.K., et al. (2003). Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. Nat. Immunol. *4*, 1093–1101.

Santos, A.F., James, L.K., Bahnson, H.T., Shamji, M.H., Couto-Francisco, N.C., Islam, S., Houghton, S., Clark, A.T., Stephens, A., Turcanu, V., et al. (2015). IgG4inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. J. Allergy Clin. Immunol. *135*, 1249–1256.

Schmitz, N., Dietmeier, K., Bauer, M., Maudrich, M., Utzinger, S., Muntwiler, S., Saudan, P., and Bachmann, M.F. (2009a). Displaying Fel d1 on virus-like particles prevents reactogenicity despite greatly enhanced immunogenicity: a novel therapy for cat allergy. J. Exp. Med. *206*, 1941–1955.

Schmitz, N., Dietmeier, K., Bauer, M., Maudrich, M., Utzinger, S., Muntwiler, S., Saudan, P., and Bachmann, M.F. (2009b). Displaying Fel d1 on virus-like particles prevents reactogenicity despite greatly enhanced immunogenicity: a novel therapy for cat allergy. J. Exp. Med. *206*, 1941–1955.

Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B.H., Rush, C., Brewer, J.M., Wei, B., Hogg, N., Garside, P., and Rudd, C.E. (2006). Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4. Science (80-.). *313*, 1972–1975.

Schneider, H., Smith, X., Liu, H., Bismuth, G., and Rudd, C.E. (2008). CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. Eur. J. Immunol. *38*, 40–47.

Schuler, P.J., Saze, Z., Hong, C.-S., Muller, L., Gillespie, D.G., Cheng, D., Harasymczuk, M., Mandapathil, M., Lang, S., Jackson, E.K., et al. (2014). Human $CD4^+$ $CD39^+$ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with $CD73^+$ exosomes or $CD73^+$ cells. Clin. Exp. Immunol. *177*, 531–543.

Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. J. Exp. Med. *206*, 3101–3114.

Scurr, M., Ladell, K., Besneux, M., Christian, A., Hockey, T., Smart, K., Bridgeman, H., Hargest, R., Phillips, S., Davies, M., et al. (2014). Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP+ Foxp3– T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3+ regulatory T cells. Mucosal Immunol. *7*, 428–439.

Shortman, K., and Heath, W.R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. Immunol. Rev. *234*, 18–31.

Sim, W.J., Ahl, P.J., and Connolly, J.E. (2016). Metabolism Is Central to Tolerogenic

Dendritic Cell Function. Mediators Inflamm. *2016*.

Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyet, G., Labidi-Galy, S.I., Goddard-Leon, S., et al. (2012). Impaired IFN- Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Favors Regulatory T-cell Expansion That May Contribute to Breast Cancer Progression. Cancer Res. *72*, 5188–5197.

Skountzou, I., Quan, F.-S., Gangadhara, S., Ye, L., Vzorov, A., Selvaraj, P., Jacob, J., Compans, R.W., and Kang, S.-M. (2007). Incorporation of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Granulocyte- Macrophage Colony-Stimulating Factor or CD40 Ligand Enhances Immunogenicity of Chimeric Simian Immunodeficiency Virus-Like Particles. J. Virol. *81*, 1083–1094.

Smaldini, P.L., Delgado, M.L.O., Fossati, C.A., and Docena, G.H. (2015). Orally-induced intestinal CD4+ CD25+ FoxP3+ treg controlled undesired responses towards oral antigens and effectively dampened food allergic reactions. PLoS One *10*, 1–14.

Smarr, C.B., Hsu, C.-L., Byrne, A.J., Miller, S.D., and Bryce, P.J. (2011). Antigen-Fixed Leukocytes Tolerize Th2 Responses in Mouse Models of Allergy. J. Immunol. *187*, 5090–5098.

Stamper, C.C., Zhang, Y., Tobin, J.F., Erbe, D. V, Ikemizu, S., Davis, S.J., Stahl, M.L., Seehra, J., Somers, W.S., and Mosyak, L. (2001). Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. Nature *410*, 608–611.

Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J Immunol *159*, 4772–4780.

Steinman, L. (2010). Inverse vaccination, the opposite of Jenner's concept, for therapy of autoimmunity: Foresight. J. Intern. Med. *267*, 441–451.

Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic Dendritic Cells. Annu. Rev. Immunol. *21*, 685–711.

Stumpf, M., Zhou, X., Chikuma, S., and Bluestone, J.A. (2014). Tyrosine 201 of the cytoplasmic tail of CTLA-4 critically affects T regulatory cell suppressive function. Eur. J. Immunol. *44*, 1737–1746.

Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., and Panoskaltsis, N. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N. Engl. J. Med. *355*, 1018–1028.

Syed, A., Garcia, M.A., Lyu, S.C., Bucayu, R., Kohli, A., Ishida, S., Berglund, J.P., Tsai, M., Maecker, H., O'Riordan, G., et al. (2014). Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). J. Allergy Clin. Immunol. *133*, 500–510.e11.

Szeles, L., Keresztes, G., Torocsik, D., Balajthy, Z., Krenacs, L., Poliska, S., Steinmeyer, A., Zuegel, U., Pruenster, M., Rot, A., et al. (2009). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is an Autonomous Regulator of the Transcriptional Changes Leading to a Tolerogenic Dendritic Cell Phenotype. J. Immunol. *182*, 2074–2083.

Teft, W.A., Kirchhof, M.G., and Madrenas, J. (2006). A Molecular Perspective of Ctla-4 Function. Annu. Rev. Immunol. *24*, 65–97.

The RTS, S.C.T.P. (2011). First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in

African Children. N. Engl. J. Med. *365*, 1863–1875.

Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J. Exp. Med. *188*, 287–296.

Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity *3*, 541–547.

Tordesillas, L., Mondoulet, L., Blazquez, A.B., Benhamou, P.H., Sampson, H.A., and Berin, M.C. (2017). Epicutaneous immunotherapy induces gastrointestinal LAP+regulatory T cells and prevents food-induced anaphylaxis. J. Allergy Clin. Immunol. *139*, 189–201.e4.

Torres-Aguilar, H., Aguilar-Ruiz, S.R., González-Pérez, G., Munguía, R., Bajaña, S., Meraz-Ríos, M.A., and Sánchez-Torres, C. (2010a). Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory $CD4^+$ T Cells. J. Immunol. *184*, 1765–1775.

Torres-Aguilar, H., Sánchez-Torres, C., Jara, L.J., Blank, M., and Shoenfeld, Y. (2010b). IL-10/TGF-β-treated dendritic cells, pulsed with insulin, specifically reduce the response to insulin of CD4+ effector/memory T cells from type 1 diabetic individuals. J. Clin. Immunol. *30*, 659–668.

Tostanoski, L.H., and Jewell, C.M. (2017). Engineering self-assembled materials to study and direct immune function. Adv. Drug Deliv. Rev. *114*, 60–78.

Travis, M.A., Reizis, B., Melton, A.C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J.M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L.F., et al. (2007). Loss of integrin αvβ8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. Nature *449*, 361–365.

Triebel, F., Jitsukawa, S., Baixeras, E., Roman-Roman, S., Genevee, C., Viegas-Pequignot, E., and Hercend, T. (1990). LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. J. Exp. Med. *171*, 1393–1405.

Tsai, S., Shameli, A., Yamanouchi, J., Clemente-Casares, X., Wang, J., Serra, P., Yang, Y., Medarova, Z., Moore, A., and Santamaria, P. (2010). Reversal of Autoimmunity by Boosting Memory-like Autoregulatory T Cells. Immunity *32*, 568–580.

Unger, W.W.J., Laban, S., Kleijwegt, F.S., Van Der Slik, A.R., and Roep, B.O. (2009). Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1. Eur. J. Immunol. *39*, 3147–3159.

Valenta, R., Campana, R., Focke-Tejkl, M., and Niederberger, V. (2016). Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. J. Allergy Clin. Immunol. *137*, 351–357.

van de Veen, W., Stanic, B., Wirz, O.F., Jansen, K., Globinska, A., and Akdis, M. (2016). Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. J. Allergy Clin. Immunol. *138*, 654–665.

Vickery, B.P., Lin, J., Kulis, M., Fu, Z., Steele, P.H., Jones, S.M., Scurlock, A.M.,

Gimenez, G., Bardina, L., Sampson, H.A., et al. (2013a). Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4responses to major peanut allergens. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 128–134.e3.

Vickery, B.P., Lin, J., Kulis, M., Fu, Z., Steele, P.H., Jones, S.M., Scurlock, A.M., Gimenez, G., Bardina, L., Sampson, H.A., et al. (2013b). Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4responses to major peanut allergens. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 128–134.e3.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. Nat. Rev. Immunol. *8*, 523–532.

Vincenti, F., Rostaing, L., Grinyo, J., Rice, K., Steinberg, S., Gaite, L., Moal, M.-C., Mondragon-Ramirez, G.A., Kothari, J., Polinsky, M.S., et al. (2016). Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. N. Engl. J. Med. *374*, 333–343.

Waisman, A., Ruiz, P.J., Hirschberg, D.L., Gelman, A., Oksenberg, J.R., Brocke, S., Mor, F., Cohen, I.R., and Steinman, L. (1996). Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T–cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity. Nat. Med. *2*, 899–905.

Wakamatsu, E., Mathis, D., and Benoist, C. (2013). Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 1023–1028.

Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2015). Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. Trends Immunol. *36*, 63–70.

Wang, J., Yoshida, T., Nakaki, F., Hiai, H., Okazaki, T., and Honjo, T. (2005). Establishment of NOD-Pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type I diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. *102*, 11823–11828.

Wang, X.B., Zhao, X., Giscombe, R., and Lefvert, A.K. (2002). A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. Genes Immun. *3*, 233–234.

Wang, Z., Hong, J., Sun, W., Xu, G., Li, N., Chen, X., Liu, A., Xu, L., Sun, B., and Zhang, J.Z. (2006). Role of IFN- gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4 + CD25 - T cells to CD4 + Tregs. J. Clin. Invest. *116*, 2434–2441.

Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. Nat. Immunol. *15*, 98–108.

Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, a, Shahinian, a, Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science *270*, 985–988.

Wei, H.-J., Gupta, A., Kao, W.-M., Almudallal, O., Letterio, J.J., and Pareek, T.K. (2018). Nrf2-mediated metabolic reprogramming of tolerogenic dendritic cells is protective against aplastic anemia. J. Autoimmun. 0–1.

Weiner, H.L., da Cunha, A.P., Quintana, F., and Wu, H. (2011). Oral tolerance. Immunol. Rev. *241*, 241–259.

Williams, J.W., Tjota, M.Y., and Sperling, A.I. (2012). The Contribution of Allergen-Specific IgG to the Development of Th2-Mediated Airway Inflammation. J. Allergy *2012*, 1–9.

Wojta-Stremayr, D., Neunkirchner, A., Srinivasan, B., Trapin, D., Schmetterer, K.G., and Pickl, W.F. (2015). CD8+ T Cell Fate and Function Influenced by Antigen-Specific Virus-Like Nanoparticles Co-Expressing Membrane Tethered IL-2. PLoS One *10*, e0126034.

Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. J. Exp. Med. *203*, 519–527.

Workman, C.J., and Vignali, D.A.A. (2005). Negative Regulation of T Cell Homeostasis by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223). J. Immunol. *174*, 688–695.

Workman, C.J., Cauley, L.S., Kim, I.-J., Blackman, M.A., Woodland, D.L., and Vignali, D.A.A. (2004). Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo. J. Immunol. *172*, 5450–5455.

Yamashita, H., Takahashi, K., Tanaka, H., Nagai, H., and Inagaki, N. (2012). Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. Allergy *67*, 201–209.

Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., and Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. J. Exp. Med. *209*, 1201–1217.

Yu, M.B., and Langridge, W.H.R. (2017). The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis. Rheumatol. Int. *37*, 1043–1051.

Zeng, H., Zhang, R., Jin, B., and Chen, L. (2015). Type 1 regulatory T cells: A new mechanism of peripheral immune tolerance. Cell. Mol. Immunol. *12*, 566–571.

Zhang, X., Tao, Y., Wang, J., Garcia-Mata, R., and Markovic-Plese, S. (2013). Simvastatin inhibits secretion of Th17-polarizing cytokines and antigen presentation by DCs in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. Eur. J. Immunol. *43*, 281–289.

Zheng, J., Jiang, H.Y., Li, J., Tang, H.C., Zhang, X.M., Wang, X.R., Du, J.T., Li, H.B., and Xu, G. (2012). MicroRNA-23b promotes tolerogenic properties of dendritic cells in vitro through inhibiting Notch1/NF-κB signalling pathways. Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol. *67*, 362–370.

Zheng, Y., Wang, H., Luo, L., Liao, L., You, L., Wang, J., and Li, Q. (2018). A meta-analysis of the association between CTLA-4 genetic polymorphism and susceptibility of asthma. Medicine (Baltimore). *97*, e11380.

Zhu, C., Sakuishi, K., Xiao, S., Sun, Z., Zaghouani, S., Gu, G., Wang, C., Tan, D.J., Wu, C., Rangachari, M., et al. (2015). An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction. Nat. Commun. *6*, 1–11.

ANNEXES

ARTICLE ANNEXE N°1: Pharmacodynamics of regulatory T cells in mice and humans treated with low-dose interleukin-2

Journal of Allergy and Clinical Immunology
2018

Accepted Manuscript

Pharmacodynamics of regulatory T cells in mice and humans treated with low-dose interleukin-2

Guillaume Churlaud, PharmD PhD, Chadi Abbara, PharmD PhD, Pierre-Axel Vinot, MSc, Gwladys Fourcade, PhD, Paul-Gydeon Ritvo, PhD, Roberta Lorenzon, MD, Michelle Rosenzwajg, MD PhD, Bertrand Diquet, PharmD PhD, David Klatzmann, MD PhD

PII: S0091-6749(18)30859-5

DOI: 10.1016/j.jaci.2018.06.006

Reference: YMAI 13479

To appear in: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*

Received Date: 13 December 2017

Revised Date: 29 May 2018

Accepted Date: 1 June 2018

Please cite this article as: Churlaud G, Abbara C, Vinot P-A, Fourcade G, Ritvo P-G, Lorenzon R, Rosenzwajg M, Diquet B, Klatzmann D, Pharmacodynamics of regulatory T cells in mice and humans treated with low-dose interleukin-2, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2018), doi: 10.1016/j.jaci.2018.06.006.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Letter to the Editor

Pharmacodynamics of regulatory T cells in mice and humans treated with low-dose interleukin-2

Short title: Treg pharmacodynamics upon ld-IL2 administration

Authors: Guillaume Churlaud[1,2†] PharmD PhD, Chadi Abbara[3†] PharmD PhD, Pierre-Axel Vinot[1,2] MSc; Gwladys Fourcade[2] PhD, Paul-Gydeon Ritvo[2] PhD, Roberta Lorenzon[1,2] MD, Michelle Rosenzwajg[1,2] MD PhD, Bertrand Diquet[3] PharmD PhD and David Klatzmann[1,2*] MD PhD

Affiliations:

[1]AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (i2B), F-75651, Paris, France

[2]Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S 959, Immunology-Immunopathology- Immunotherapy (I3); F-75005, Paris, France

[3]Université d'Angers, CHU Angers, Angers Cedex F-49045, France.

†: contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed: David Klatzmann, Department of Inflammation-Immunopathology-Biotherapy (I2B), Clinical Investigation Center for Biotherapies (CIC-BTi), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), 83 Bd de l'Hôpital, Paris F-75013, France, e-mail: david.klatzmann@sorbonne-universite.fr, Phone : +33142177461, Fax : +33141277441

Funding: The project was funded by the LabEx Transimmunom (ANR-11-IDEX-0004-02) and ERC Advanced Grant TRiPoD (322856) to DK. GC was supported by the Académie Nationale de Médecine.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Disclosure of potential conflict of interest: MR and DK are inventors in a patent application related to the therapeutic use of ld-IL2 for treating autoimmune-related or inflammatory disorders, which belongs to their academic institutions and has been licensed to ILTOO pharma. GC, MR and DK hold shares in ILTOO pharma.

Short Summary

We have developed and validated a mathematical model depicting and predicting the effect of low-dose interleukin-2 on Treg expansion in mice and humans. This model should help in the design of optimal therapeutic schemes for the long-term treatment of various chronic autoimmune, inflammatory or allergic diseases.

Key Words: Immunotherapy; biotherapy; pharmacokinetics; tolerance; allergy

Abbreviations

AIDs: Autoimmune diseases
FOXP3: Forkhead box protein 3
IL-2: Interleukin-2
IDs: Inflammatory diseases
IU: International Units
ld-IL-2: low-dose IL-2
Teff: Effector T cell
Tfh: T follicular helper cell
Treg: Regulatory T cell

ACCEPTED MANUSCRIPT

To the editor:

Interleukin-2 (IL-2) is the major cytokine controlling regulatory T cell (Treg) homeostasis and function [1]. At low dose, IL-2 specifically activates Tregs and improves autoimmunity in mice and humans [2–4]. As autoimmune diseases (AIDs) intrinsically reveal Treg insufficiency [2], IL-2 has broad potential for their treatment. As Tregs control all immune responses and inflammation, ld-IL2 also has therapeutic potential for inflammatory diseases (IDs) [2], allergy [5] and in the field of transplantation [2,6]. However, given the pleiotropic effects of IL-2 on other immune cell types that also respond to IL-2 at higher doses, such as $CD4^+$ and $CD8^+$ Teffs, Natural Killer cells and group 2 innate lymphoid cells [2], and given its short half-life [7], finding a dose and schedule of administration that maintain a proper Treg/Teff balance over time is key to the therapeutic use of ld-IL2. We aimed to rationally define IL-2 doses and schemes of administration that will lead to long-term improvement of the Teff/Treg balance.

We first investigated the dynamics of immune cells in C57BL/6 mice receiving an "induction" dosage of IL-2 aimed at a brisk stimulation of Tregs, consisting of a 5-day course of daily intraperitoneal injection of 25 000, 50 000 or 100 000 IU (Fig 1A) from day 0 to day 4. The percentage of blood Tregs (defined as $CD25^+$ $FOXP3^+$ cells among $CD4^+$ T cells [6,8]) was assessed 24 hours after each administration and results are expressed as relative variation compared with the PBS-treated group. The maximum increase in Tregs was observed at day 5 and was dependent on the cumulative dose received. We also analyzed the effects of IL-2 on blood Tregs at 2 hours after IL-2 injections in the same mice. Blood Treg proportions were decreased at 2 hours (See Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). This suggested a recirculation of Tregs immediately after IL-2 injection and prompted us to study the dynamics of Tregs in secondary lymphoid organs. In spleen, Treg proportions were increased at 2 hours (See Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Collectively, these results indicate that there is an early recirculation or margination of blood Tregs upon ld-IL2 administration. We then assessed what would be the effects of a "maintenance" dosage aimed at sustaining a long-term effect on Tregs, administered as repeated single IL-2 administrations given after an induction course (See Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). The 50 000 IU IL-2 induction course resulted in a 1.71 ± 0.04-fold increase of blood %Tregs ($p<0.0001$) that was down to a 1.16 ± 0.03-fold increase at day 8 ($p=0.02$). A single reinjection of IL-2 at day 8 increased the Treg proportion 24 hours thereafter 1.17 ± 0.02-fold ($p=0.004$). Further injections every three days sustained elevated levels of Tregs over baseline values throughout the treatment period (from 1.16- to 1.33-fold increase). Spacing the injections every 7 or 15 days led to reduced Treg increase during maintenance treatment.

We used these *in vivo* data to model the dose/scheme effects of IL-2 on Tregs in mice during the induction and maintenance phases. Data of Treg expansion versus time were modeled and simulated using the NLME R package (R version 3.1.3, R development core team). A single-compartment model with first-order input and output was chosen. The evaluation of goodness of fit graphs showed that this model fitted the data well (Fig 1B). We then used this model to simulate *in silico* reinjections every 3 days (Fig 1C). The prediction fitted very well the actual in vivo data obtained using this treatment scheme (Fig 1C).

We then aimed to adapt this model validated in mice to modeling human data. We used data from our previous study of ld-IL2 in type 1 diabetes (NCT01353833) that assessed the effects of a 5-day course of daily IL-2 injections[8,9]. The expansion of blood Tregs for each dose is presented in Fig 2A and was modeled using the model developed for mouse studies (See Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Results are expressed as delta variation of Treg frequency in $CD4^+$ T cells, i.e. % of Tregs in $CD4^+$ of the day minus % of Tregs in $CD4^+$ at Day 0 and vertical dotted lines represent IL-2 injection. We then predicted

in silico the potential effects of different doses and the periodicities of IL-2 reinjections given after an induction course (See Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). For example, with 1 MIU IL-2 "virtual" injections every 3 days, Tregs were expected to remain stable with a delta variation of %Tregs ranging from 3 to 4 (i.e. a 60-80% increase); with 3 MIU every 3 days, %Tregs were predicted to increase continuously; with reinjections every 15 days, Tregs were expected to (i) return to their baseline approximately at day 20 with 0.33 MIU; (ii) be stable with a delta variation of %Tregs ranging from 0.5 to 1.5 (i.e. 10-30% increase) with 1 MIU; and (iii) to be stable with a delta variation of % of Tregs ranging from 2.5 to 3.5 (i.e. 50-70% increase) using 3 MIU.

Based on safety data from our previous clinical trials and our modeling, we chose the dose of 1 MIU/injection, with once-a-fortnight injections during the maintenance course to perform a novel clinical trial of ld-IL2 in patients with mild forms of various autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Behcet's disease, Wegener's granulomatosis, Takayasu's disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, autoimmune hepatitis, sclerosing cholangitis, Gougerot-Sjögren syndrome, Transreg clinical trial: NCT01988506). Treg dynamics over time in the first 40 treated patients is presented in Fig 2B. Note that Treg evaluations were always made just prior to an IL-2 injection, thus 14 days away from the last injection. These values therefore underestimate the overall effect during the 14-day period. As predicted from above, %Treg was increased during the maintenance phase in treated patients (delta of 1.12 ± 0.25 %, $p<0.0001$ at day 31, and 1.32 ± 0.33%, $p<0.0001$ at day 91), representing a minimum 20% increase for a prediction that was between 10 and 30%.

Thus, we have defined and validated a model for predicting the dynamic Treg response to IL-2 that should help navigate its use in numerous therapeutic targets, from various AIDs to transplantation and allergy. Our pharmacodynamic model can predict the effects of any

ACCEPTED MANUSCRIPT

combination of any of the treatment parameters: dose, length of the induction phase, timing of maintenance injections. Also, our results show that the response to IL-2 is predictable across multiple autoimmune diseases and that we have validated a therapeutic scheme that provides long-term improvement of the Teff/Treg balance.

Guillaume Churlaud[1,2†] PharmD PhD,
Chadi Abbara[3†] PharmD PhD,
Pierre-Axel Vinot[1,2] MSc,
Gwladys Fourcade[2] PhD,
Paul-Gydeon Ritvo[2] PhD,
Roberta Lorenzon[1,2] MD,
Michelle Rosenzwajg[1,2] MD PhD,
Bertrand Diquet[3] PharmD PhD,
David Klatzmann[1,2*] MD PhD

[1]AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (i2B), F-75651, Paris, France

[2]Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S 959, Immunology-Immunopathology- Immunotherapy (I3); F-75005, Paris, France

[3]Université d'Angers, CHU Angers, Angers Cedex F-49045, France.

Authorship contributions: GC, GF, PGR and MR performed the experiments. RL performed the clinical follow-up of patients. CA and BD conceived the modeling. DK conceived and supervised the overall study. All authors analyzed the data. GC, PAV and DK wrote the manuscript, which was revised by all authors.

Acknowledgments

We are grateful to Alice Barrateau for excellent technical assistance. We thank the animal care team members Christelle Enond, Bocar Kane, Olivier Bregerie and Serban Morosan from the Centre d'Exploration Fonctionnelle, UPMC Paris 06. We thank the entire DF-IL2 and Transreg study groups for the performance of the clinical trials that contributed to this study (Groups listed in Online Repository).

ACCEPTED MANUSCRIPT

References

[1] Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the iterface between tolerance and immunity. Immunity 2010;33:153–65. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.004.

[2] Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol 2015;15:283–94. doi:10.1038/nri3823.

[3] Yu A, Snowhite I, Vendrame F, Rosenzwajg M, Klatzmann D, Pugliese A, et al. Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. Diabetes 2015;64:2172–83. doi:10.2337/db14-1322.

[4] Saadoun D, Rosenzwajg M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. N Engl J Med 2011;365:2067–77. doi:10.1056/NEJMoa1105143.

[5] Bonnet B, Vigneron J, Levacher B, Vazquez T, Pitoiset F, Brimaud F, et al. Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell-Mediated Control of Experimental Food Allergy. J Immunol 2016. doi:10.4049/jimmunol.1501271.

[6] Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, et al. Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease. N Engl J Med 2011;365:2055–66. doi:10.1056/NEJMoa1108188.

[7] Konrad MW, Hemstreet G, Hersh EM, Mansell PW, Mertelsmann R, Kolitz JE, et al. Pharmacokinetics of recombinant interleukin 2 in humans. Cancer Res 1990;50:2009–17.

[8] Rosenzwajg M, Churlaud G, Mallone R, Six A, Dérian N, Chaara W, et al. Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. J Autoimmun 2015;58:48–58. doi:10.1016/j.jaut.2015.01.001.

[9] Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, Jacqueminet S, Bourron O, Nicolas N, et al. Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol 2013;1:295–305. doi:10.1016/S2213-8587(13)70113-X.

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

195 **Figure legends.**

196

197 **Figure 1. Dynamics and modeling of Tregs in mice treated with IL2.**

198 (**A**) Dynamics of Tregs in blood during a 5-day course of IL-2 (Pool of 3 different
199 experiments (n = 10)) (**B**) Observed and *in silico* modeling of Treg dynamics in blood after a
200 5-day course of daily injections of 50 000 IU of IL-2, and (**C**) followed by reinjections of
201 50 000 IU of IL-2 every 3 days.

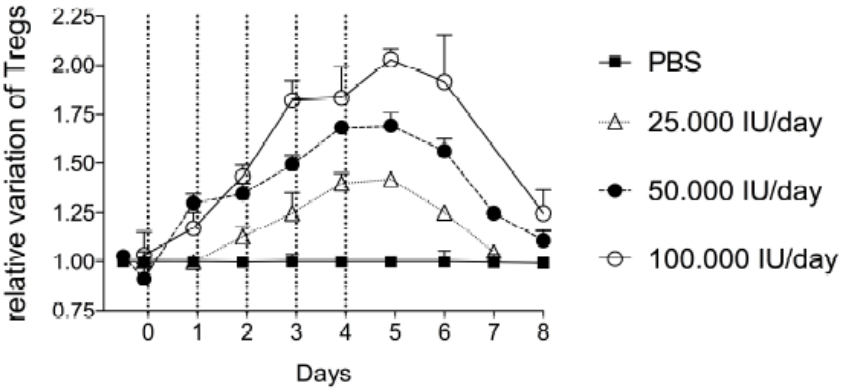
202 **Figure 2. Dynamics and modeling of CD4+ Tregs in humans after ld-IL2.**

203 (**A**) Observed Treg dynamics in humans after a 5-day course of ld-IL2 (doses ranging from
204 0.33 million IU/day to 3 MIU/day) (n = 6 patients/treatment). (**B**) Comparison of in silico
205 modeling and real Treg dynamics (n=40) after reinjections of 1 MIU of IL-2 every 15 days
206 after a 5-day course of IL-2.

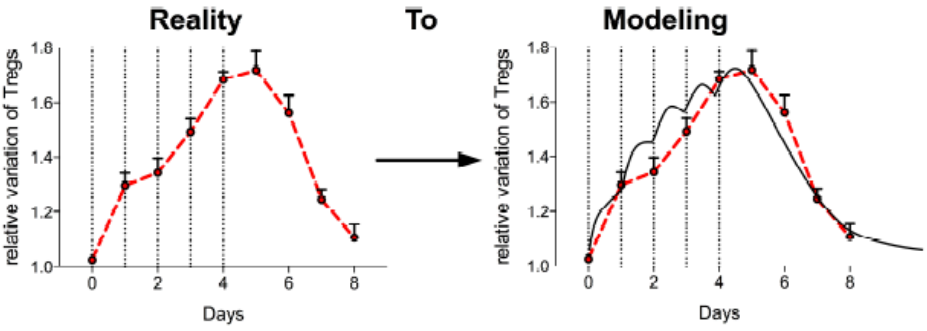
207

ACCEPTED MANUSCRIPT

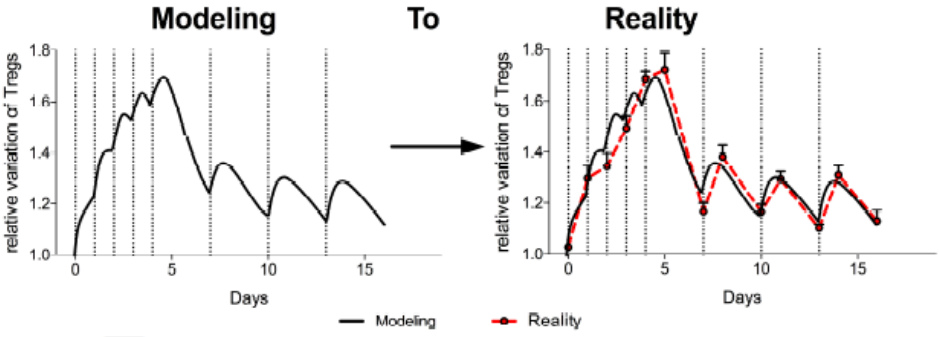
A

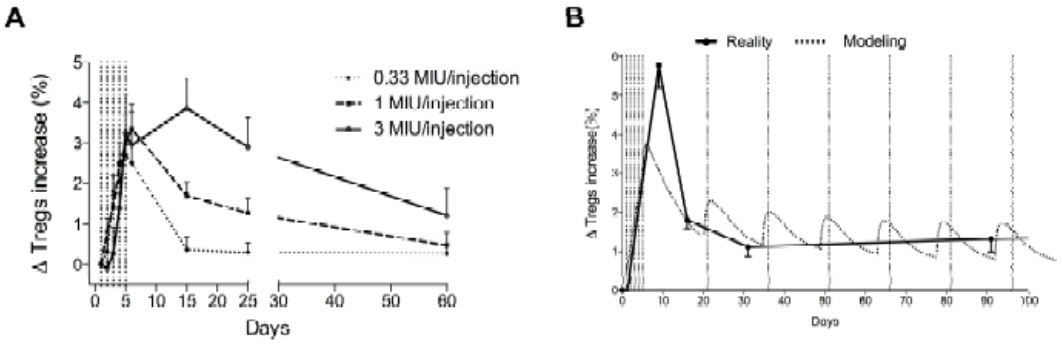

relative variation of Tregs
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0 1 2 3 4 5 6 7 8
Days
PBS
25.000 IU/day
50.000 IU/day
100.000 IU/day

B


Reality
To
Modeling
relative variation of Tregs
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0 2 4 6 8
Days

C


Modeling
To
Reality
relative variation of Tregs
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0 5 10 15
Days
Modeling
Reality



ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

Online Repository

The TRANSREG study group

Principal Investigator: Prof D Klatzmann MD, PhD

Methodologist: Prof. E Vicaut, MD, PhD

Principal Clinical Investigator: R Lorenzon MD

Clinical Investigations Center-Centre d'Investigation Clinique Paris-Est CIC-1421 Pitié-Salpêtrière Paris France : Prof C. Funck-Brentano MD, J-E Salem, Md, PhD

Biological Investigation: M Rosenzwajg MD

Modeling and Interim Analysis Clinical Pharmacology, Angers Hospital, Angers, France: Prof B. Diquet PharmD, C. Abbara PharmD

Regulatory affairs and Monitoring: Clinical Research and Development Department, APHP, Paris, France (K. Seymour-Inamo)

Clinical Research Unit Lariboisière, APHP, Paris, France (V. Jouis, A. Mekouo-Tagne)

Treatment Management Pharmacy, EST GH St Antoine, APHP, Paris, France: V. Quiniou PharmD, PA Vinot PharmD, A Daguenel Nguyen PharmD

Clinicians and recruiting centers - Department of Gastroenterology, AP-HP, Saint Antoine Hospital (Prof L Beaugerie MD, PhD) Department of Hepatology AP-HP, Saint Antoine Hospital (Prof O Chazouilleres MD, PhD) – Department of Rheumatology, AP-HP, Saint Antoine Hospital (Prof F Berenbaum MD, PhD) – Department of Internal Medicine, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital (Prof P Cacoub MD, PhD) - Department of Rheumatology, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital (Prof B Fautrel MD, PhD) -Department of Dermatology, AP-HP, Cochin Hospital (Prof S Aractingi MD, PhD) - Department of Internal Medicine, AP-HP, Saint Antoine Hospital (Prof O Fain MD, PhD)

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

The DF-IL2 study group

Principal Investigator: Prof D Klatzmann MD, PhD

Principal Clinical Investigator: Prof A Hartemann MD

Methodologist: G Bensimon MD

Data management & Statistical Analysis: C A Payan MD

Clinical Investigations Center-Centre d'Investigation Clinique Paris-Est Hôpital de La Pitié-Salpêtrière Paris France: Prof C. Funck-Brentano MD, B. Charbit MD, N Nicolas MD, S Delroise MD

Biological Investigation: M Rosenzwajg MD, M Fontfrede PharmD

Safety committee: Prof P Bougneres MD, Prof C Boitard MD

Scientific watch: E Piaggio PhD

Modeling and Interim Analysis Clinical Pharmacology, Angers Hospital, Angers, France: Prof B. Diquet PharmD, C. Abbara PharmD

Biometry, Curie Institute, Paris, France: Prof B Asselain MD, Dr Y de Rycke PhD

Regulatory affairs and Monitoring: Clinical Research and Development Department, APHP, Paris, France (V. Millul PhD) Clinical Research Unit Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France (N Dedise CRA, D Wenjie Gu CRT)

Randomization Clinical Research Unit- EST GH St Antoine, APHP, Paris, France: A Rousseau PhD

Treatment Management Pharmacy, Pitié-Salpêtrière Hospital, APHP, Paris, France: MH Fievet PharmD, G. Churlaud PharmD, PhD

Clinicians at recruiting centers - Department of Endocrinology-Diabetology, AP-HP, Ambroise Paré Hospital, Boulogne, France - Univ Versailles SQY, Versailles, France (M-L Raffin-Sanson, MD) - Department of Diabetology, AP-HP, Hotel-Dieu Hospital, Paris, France (D Dubois-Laforgue, MD) - Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Prof A Hartemann, O Bourron MD, S Jacqueminet MD) - Department of Internal Medicine, AP-HP, Henri Mondor Hospital, Creteil, France (G Lagadec, MD) - Department of Internal Medicine, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France (C Deybach, MD) - Centre Hospitalier de Rambouillet, Department of Internal Medicine, France, (M Popelier MD) - Department of Endocrinology-Diabetology, AP-HP, Saint Antoine Hospital, Paris, F-75012, France (N Bourcigaux, MD, E Laroche MD, S Christin-Maitre MD) - Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition, AP-HP, Jean Verdier Hospital, Bondy, France (E Cosson MD, B Donadille, MD, B Lormeau, MD)

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure Legends

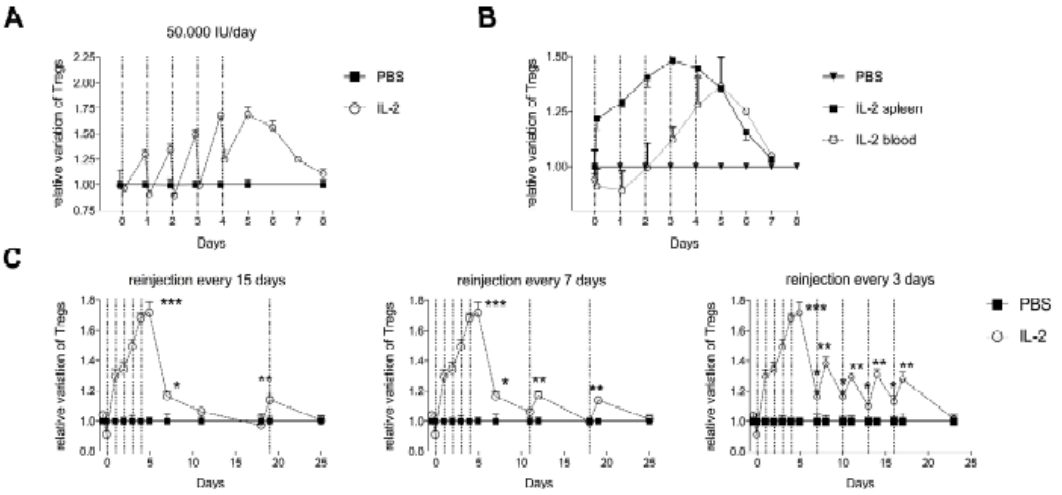
Figure E1. Dynamics and modeling of Tregs in mice treated with IL2.

(**A**)(**B**)(**C**) Results are expressed as relative variation compared with the PBS-treated group. These data are from a pool of 3 different experiments (n = 10) using C57BL/6 mice. (**A**) Treg dynamics in blood at 2 and 24 hours post-injection and (**B**) Treg dynamics in blood and spleen at 2 hours post-injection, during a 5-day course of 50 000 IU/day of IL-2. (**C**) Dynamics of Tregs in blood during a 5-day course of 50 000 IU of IL-2 and then reinjection every 3, 7 or 15 days with 50 000 IU of IL-2. Comparison between IL-2 and PBS group was done using the Mann-Whitney test (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***,$p \leq 0.0001$).

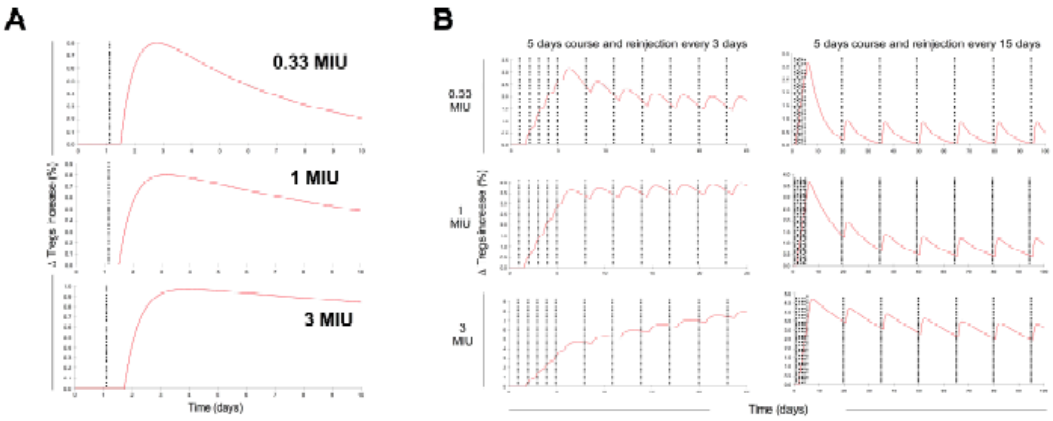
Figure E2. Dynamics and modeling of CD4+ Tregs in humans after ld-IL2.

(**A**)(**B**) Vertical dotted lines represent IL-2 injection. Blood sampling was performed just before IL-2 injection. Results are expressed as delta variation of Treg frequency in $CD4^+$ T cells, i.e. % of Tregs in $CD4^+$ of the day minus % of Tregs in $CD4^+$ at Day 0. (**A**) Modeling of the results obtained in humans after a 5-day course of ld-IL2 (doses ranging from 0.33 million IU/day to 3 MIU/day). (**B**) In silico modeling of Treg dynamics after injections of ld-IL2 every 3 or 15 days following a 5-day course of ld-IL2, using 0.33, 1 or 3 MIU/injection.

ACCEPTED MANUSCRIPT



ACCEPTED MANUSCRIPT



ACCEPTED MANUSCRIPT

ARTICLE ANNEXE N°2 : Cibles et immunotherapies innovantes dans le traitement de l'allergie alimentaire

Revue Française d'allergologie
2017

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Revue française d'allergologie 57 (2017) 327–336

Revue de la littérature

Cibles et immunothérapies innovantes dans le traitement de l'allergie alimentaire

Targets and innovative immunotherapies for the treatment of food allergy

B. Bonnet[a,b,c], P.A. Vinot[a,b,c], B. Bellier[a,b,c,*]

[a] *Sorbonne universités, UPMC université Paris 06, UMRS_959, I[3], 75013 Paris, France*
[b] *Inserm, UMRS_959, I[3], 75013 Paris, France*
[c] *Service de biothérapies, centre d'investigation clinique de biothérapies, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP–HP, 75013 Paris, France*

Reçu le 10 octobre 2016 ; accepté le 12 novembre 2016
Disponible sur Internet le 9 février 2017

Résumé

Les pathologies allergiques constituent un problème de santé publique actuel majeur en raison d'une constante augmentation de leur prévalence dans les pays industrialisés. L'absence de traitement curatif efficace et le risque accru de choc anaphylactique suite à une nouvelle exposition à l'allergène font craindre une recrudescence des cas d'hospitalisation et des interventions médicales, en particulier pour les allergies alimentaires. Le développement de nouvelles thérapies permettant de prévenir et traiter les allergies alimentaires apparaît donc comme une réelle nécessité. La connaissance approfondie et grandissante des mécanismes physiopathologique des réactions allergiques permet d'offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent un parfait exemple. Un déficit quantitatif et/ou qualitatif de ces cellules a été observé chez les patients allergiques, pouvant expliquer en partie cette hypersensibilité aux allergènes. Ainsi, la stratégie consistant à recruter et activer in vivo des cellules aux fonctions suppressives offre une nouvelle piste thérapeutique. Dans cette optique, l'interleukine 2 (IL-2) est un candidat de choix puisque présentant des propriétés immunosuppressives lorsqu'elle est utilisée à faible dose. Les résultats cliniques obtenus récemment dans le cadre des maladies auto-immunes ainsi que le profil de sécurité associé motivent son évaluation chez l'homme pour d'autres dysfonctionnements immunitaires, y compris l'allergie alimentaire. Au travers d'une revue de la littérature détaillant les principaux problèmes médico-épidémiologiques, les bases physiopathologiques de l'allergie alimentaire et les thérapies disponibles et à venir, nous détaillons l'intérêt de l'utilisation de faibles doses d'IL-2 en thérapie en exposant notamment les preuves de concepts et les différents essais cliniques réalisés à ce jour.
© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allergie alimentaire ; Immunothérapie ; Cibles ; Innovation ; Treg ; IL-2

Abstract

Allergic diseases are a major public health problem today due to the constant increase in their prevalence in industrialized countries. The absence of effective curative treatment coupled with the increased risk of anaphylactic shock following renewed allergen exposure could result in a resurgence of hospitalizations and medical interventions, especially for food allergies. The development of new therapies to prevent and treat food allergies thus appears to be a pressing need. The extensive and growing knowledge of the pathophysiological mechanisms of allergic reactions have opened up new therapeutic perspectives. Regulatory T cells (Tregs) are a perfect example. A quantitative and/or qualitative deficit of these cells was observed in allergic patients, which may partly explain their allergen hypersensitivity. Thus, the strategy to recruit and activate Tregs in vivo offers a new therapeutic path. In this context, interleukin 2 (IL-2) is a promising candidate having immunosuppressive properties when used in

* Auteur correspondant. Inserm UMRS959, laboratoire d'immunologie-immunopathologie-immunothérapie, bat CERVI, hôpital Pitié-Salpêtrière, 83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.
Adresse e-mail : bertrand.bellier@upmc.fr (B. Bellier).

http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2016.11.003
1877-0320/© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

low-doses. The clinical results obtained recently in the context of autoimmune diseases and the associated safety profile suggests the need for its evaluation in humans for other immune dysfunctions, including food allergy. Through a literature review detailing the pathophysiological bases of food allergy, as well as currently available and future therapies, we show therapeutic value of the use of low-dose IL-2 with particular emphasis on proof of concepts and the different clinical trials to date.
© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Food allergy; Immunotherapy; Targets; Innovation; Treg; IL-2

1. Épidémiologie, aspects économiques et traitements actuels de l'allergie alimentaire

L'allergie, aussi appelée hypersensibilité, est une réaction clinique observée lors d'une réponse immunitaire anormale contre un agent de provocation non pathogène appelé allergène. L'allergie alimentaire, manifestation clinique contre un allergène alimentaire (trophallergène), constitue un enjeu de santé publique majeur en raison d'une prévalence en constante augmentation comme les autres pathologies allergiques, mais également de la gravité éventuelle des signes cliniques et d'un arsenal thérapeutique pauvre.

1.1. Épidémiologie

Les plus fortes prévalences d'allergies alimentaires sont observées au sein des pays industrialisés et concernent majoritairement les populations jeunes. Si l'allergie peut apparaître à tout âge, elle reste plus fréquente chez l'enfant avec une prévalence de 7,1 % [1] à 8 % [2] dont 2,4 % souffrant d'allergies alimentaires multiples [1] et 3 % présentant des réactions sévères [1]. Parmi la population adulte des pays industrialisés, entre 3 % et 6,6 % [2,3] des personnes souffrent d'allergies alimentaires. Alors que les données sur la prévalence de ces allergies dépendent avant tout de la définition des cas, aujourd'hui, différents éléments d'appréciation montrent que le nombre de personnes atteintes d'allergies alimentaires est en augmentation [4]. Le nombre de patients atteints d'allergie alimentaire est estimé entre 200 et 250 millions de personnes dans le monde [3] et le nombre de formes sévères nécessitant une hospitalisation aurait été multiplié par 5 dans certains pays [5]. En Europe, les allergies alimentaires constituent la cause principale d'anaphylaxie chez les enfants de 0 à 14 ans. Plus particulièrement en France, les déclarations d'anaphylaxies alimentaires sévères ont connu un accroissement de 28 % entre 2001 et 2006 [6]. Ces nombres laissent présager la crainte d'une forte augmentation sur les prochaines années de cas graves avec risque de décès suite à un choc anaphylactique et conduisant à une augmentation des dépenses de santé dans ce domaine.

1.2. Aspect économique

La mesure de l'impact économique des allergies alimentaires est complexe en raison d'un défaut d'études économico-sanitaires fiables en Europe. En plus des coûts directs liés à la prise en charge médicale des patients, les coûts indirects alourdissent significativement l'impact économique de cette pathologie, prenant en compte l'absentéisme au travail et le manque de productivité du patient ou de ses proches.

Aux États-Unis, le coût global des allergies (concernant 50 millions d'individus selon le « Centers for Disease Control and Prevention ») est estimé autour de plusieurs milliards de dollars par an. Les allergies alimentaires, quant à elles, représentent une perte de 225 millions et de 115 millions de dollars en coûts directs et indirects respectivement [7]. En Europe, 80 millions d'individus sont atteints d'une des manifestations cliniques de l'allergie. L'impact financier est estimé autour de 100 milliards d'euros par an. L'essor de nouvelles thérapies pourrait donc avoir un réel impact financier.

1.3. Traitements actuels de l'allergie

Outre les traitements d'appoints, il existe dans le cadre des allergies alimentaires deux grands types de traitement prescrits aujourd'hui : le traitement reposant sur le régime d'éviction et le traitement du choc anaphylactique. L'immunothérapie spécifique (ou désensibilisation spécifique), qui est un traitement fréquemment utilisé dans le cadre des allergies respiratoires, est actuellement restreinte à peu d'indications de l'allergie alimentaire et n'est pratiquée que par certains services spécialisés.

1.3.1. Traitements symptomatiques

Les divers traitements pharmacologiques existants ne permettent qu'une prise en charge symptomatique de l'allergie. Parmi ces traitements, on retrouve en premier les antihistaminiques qui peuvent être prescrits dans différentes manifestations cliniques de l'allergie alimentaire : prurit, urticaire, eczéma, etc. Des médicaments anti-inflammatoires, dont les corticoïdes, sont également disponibles mais le plus souvent réservés aux manifestations sévères.

Dans le cadre des chocs anaphylactiques, l'adrénaline (ou épinéphrine), une catécholamine vasopressive est préconisée sous forme de stylos auto-injectables. La plupart des patients souffrant d'allergies graves sont informés du risque d'un potentiel choc anaphylactique et de la nécessité d'avoir à disposition immédiate un stylo auto-injecteur d'adrénaline. Il y a cependant beaucoup d'obstacles au succès de son utilisation, malgré des recommandations claires. Selon les études, entre 62 % et 87 % des patients ne l'utilisent pas correctement [8] en raison d'une incapacité à reconnaître les symptômes d'anaphylaxie ou d'un manque de compréhension de la façon d'utiliser le stylo. Les patients sont également souvent porteurs d'un stylo périmé en raison de la faible fréquence d'utilisation.

Devant le peu de traitement disponible, l'anxiété générée et le mésusage de l'adrénaline, il est préférable d'agir sur la prévention de l'allergie. À ce jour, l'éviction de l'allergène est la seule approche préventive massivement possible.

1.3.2. Éviction stricte de l'allergène

L'éviction de l'allergène consiste en la stricte élimination de la consommation du ou des allergènes responsables de l'allergie alimentaire. Elle semble de principe simple, mais nécessite en pratique, plusieurs étapes avec notamment l'identification parfaite du ou des allergènes impliqués, l'éducation des patients, mais également dans le cas d'un enfant l'éducation des parents et du personnel des établissements scolaires méconnaissant souvent l'existence et les risques du choc anaphylactique [9]. Toutefois, la prise en charge de l'allergie alimentaire par la stricte éviction de l'allergène est loin d'être la meilleure option thérapeutique. Dans l'enfance, les besoins nutritionnels pour assurer une bonne croissance et une bonne santé limitent les indications de cette stratégie et l'application d'un régime d'éviction peut entraîner de sévères malnutritions [10–12]. Il est donc nécessaire de développer des alternatives thérapeutiques moins contraignantes et impactant de façon moindre la qualité de vie. Seule une meilleure connaissance de la physiopathologie allergique et des mécanismes immunologiques impliqués ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

2. Nouvelles thérapies de l'allergie alimentaire

De nouvelles biothérapies, et plus spécifiquement des immunothérapies, sont aujourd'hui en cours de développement. Elles ont toutes pour but de contrôler les réponses immunitaires exacerbées dirigées contre l'allergène mais ciblent différents mécanismes associés à la physiopathologie des allergies.

2.1. Physiopathologie et cibles thérapeutiques potentielles

La réponse allergique se caractérise par une hyperpolarisation de la réponse cellulaire T vers une réponse de type Th2 médiée par l'IL-5, l'IL-4 et l'IL-13. Ce mécanisme est associé à la production d'immunoglobuline (Ig) de type E (IgE) après activation des lymphocytes B (LyB) par l'allergène. Ces cytokines sont par ailleurs responsables d'une augmentation du nombre de cellules effectrices dans les tissus cibles et le sang (mastocytes, basophiles et éosinophiles). Ceci constitue la phase de sensibilisation qui a lieu généralement au niveau du tractus digestif [13].

Les signes cliniques de l'allergie s'expliquent par la réintroduction et la reconnaissance de l'allergène par les IgE spécifiques préalablement fixées sur les effecteurs (mastocytes, basophiles) puis au pontage de ces immunoglobulines induisant la dégranulation de ces cellules. Ce phénomène d'exocytose, rapide et brutal, conduit à la sécrétion des médiateurs préformés (histamine, sérotonine, tryptase...) et néoformés (leucotriènes, prostaglandines et chimiokines), responsables des signes cliniques de l'allergie.

En dehors de ces mécanismes communs aux autres allergies, plusieurs facteurs spécifiques de l'allergie alimentaire sont néanmoins décrits. On peut citer notamment l'implication probable de la vitamine D dans l'apparition de la pathologie de par son effet dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale au niveau intestinal [14]. Cette relation a été confirmée par la corrélation observée entre une carence de cette vitamine et l'apparition d'allergies à l'arachide dans une population infantile australienne. De plus, les enfants carencés présentaient également une plus forte probabilité de développement d'allergies alimentaires multiples [15].

Le microbiote au niveau intestinal semble également un facteur déterminant dans le développement de l'allergie alimentaire. Des modifications de la flore commensale pourraient déclencher l'apparition de pathologies allergiques alors qu'à l'inverse un enrichissement en *Clostridia* jouerait un rôle dans l'absence de sensibilisation et dans la restauration d'une tolérance orale [16]. Ces données sont confortées par l'observation d'une hausse des allergies alimentaires au lait chez les enfants traités par plusieurs antibiothérapies durant la petite enfance et pendant la grossesse [17].

À ce jour, plusieurs biothérapies tendent à exploiter les propriétés régulatrices du système immunitaires afin de prévenir et traiter les allergies alimentaires. Parmi les cellules aux propriétés immunosuppressives, les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une population cellulaire essentielle dans le maintien de la tolérance immunitaire aux antigènes du soi et le contrôle des maladies auto-immunes et allergiques. Les Treg sont une sous-population de lymphocytes T CD4+ exprimant le CD25 et le facteur de transcription Foxp3. Il a été rapporté qu'un défaut de Treg est souvent associé à des manifestations auto-immunes ou allergiques [13]. Pour preuve, l'allergie est l'une des manifestations cliniques retrouvées chez les patients atteints du syndrome IPEX, caractérisé par un défaut de Treg en lien avec une mutation dans le gène codant pour Foxp3 [18]. Un défaut qualitatif et quantitatif de Treg a également été reporté chez les patients allergiques en particulier chez les enfants à haut risque d'allergie (basé sur les prédispositions familiales notamment l'atopie maternelle) comparé aux enfants à faible risque [19]. L'importance des Treg s'illustre par ailleurs dans leur rôle pour la mise en place de la tolérance aux allergènes alimentaires et dans la résolution spontanée des allergies au lait de l'enfant [20,21]. Dans le cadre de protocoles d'immunothérapie spécifique, une induction et une activation des Treg en lien avec l'efficacité thérapeutique confirme leur rôle dans le contrôle de l'allergie [22–24]. Dans les modèles murins d'allergie alimentaire, l'élimination des Treg entraîne une exacerbation des signes cliniques de l'allergie alimentaire, démontrant leur rôle indispensable dans la régulation de ces manifestations [25–27]. De même, l'administration préalable de Treg à des souris sensibilisées puis rendues allergique à l'ovalbumine s'est montrée très efficace quant à la prévention des signes cliniques de l'allergie alimentaire constituant la première démonstration de l'utilisation des Treg comme outil thérapeutique dans l'allergie alimentaire [25].

Plusieurs mécanismes sont décrits dans la régulation des allergies par les Treg (Fig. 1). En premier lieu, les Treg limitent la présentation de l'allergène aux lymphocytes Th2 spécifiques [28,29] et aux lymphocytes B [30], contrôlant notamment l'accessibilité aux molécules de co-stimulation via la molécule

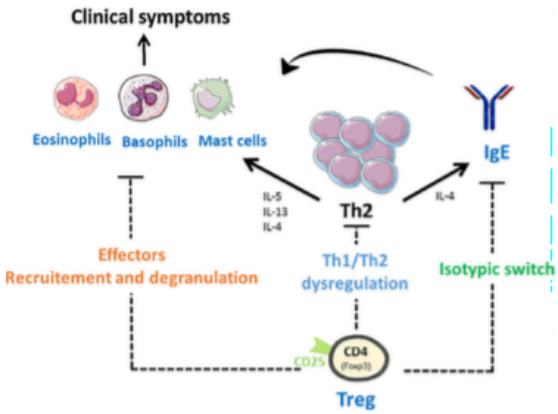


Fig. 1. Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T CD4+ Foxp3+ agissent à différents niveaux de la mise en place des réponses allergiques : de façon précoce agissant sur le compartiment Th2 associé à la sensibilisation ou de façon plus tardive agissant sur les cellules effectrices associées aux symptômes de l'allergie. Les différents mécanismes de suppression peuvent être également la cible de biothérapies.

CTLA-4 qu'ils expriment à leur surface [31]. Les Treg entraînent aussi une déviation de la production des IgE spécifiques vers la production d'IgG4 décrites comme protectrices [32]. Les Treg inhibent le recrutement des cellules effectrices au niveau du site inflammatoire [13] et diminuent la dégranulation des mastocytes [33] ou de l'expression de FcεRI [34].

Ainsi, ces différents « checkpoints » de la physiopathologie de l'allergie constituent de nouvelles pistes de développement de biothérapies. Différentes approches sont proposées, comprenant les anticorps monoclonaux, la vaccination tolérogène, ou bien encore les immunothérapies immunomodulatrices.

2.2. *Avancées thérapeutiques de l'allergie alimentaire*

2.2.1. *Reconsidération de l'immunothérapie spécifique (ITS)*

L'ITS, communément appelée désensibilisation, constitue le pilier actuel du traitement de l'allergie sévère. Elle est la seule méthode actuelle permettant de prévenir et traiter durablement la maladie allergique notamment les allergies respiratoires mais les travaux actuels laissent à penser qu'elle pourra être proposée dans le futur pour l'allergie alimentaire.

L'ITS consiste à réduire la sensibilité de l'organisme à l'allergène en modulant progressivement la réponse immunitaire vis-à-vis de cet allergène notamment en rééquilibrant la balance Th1/Th2 via la diminution de la réponse Th2 et l'induction de la réponse T régulateurs [35]. Pour cela, l'allergène est administré à dose croissante pour atteindre une dose efficace et permettre l'induction d'une tolérance spécifique. Plusieurs voies d'administration de l'allergène peuvent être utilisées dans le cadre de l'allergie alimentaire, présentant chacune un profil de tolérance et d'efficacité différent.

L'ITS par voie sous-cutanée (SCIT) est sujette à controverse et n'est plus utilisée actuellement en raison d'un profil de sécurité insatisfaisant. De plus, seule une étude testant la SCIT dans le cadre d'une allergie aux poissons a été concluante avec l'utilisation de protéines recombinantes hypoallergéniques [36]. Cette voie a donc logiquement été abandonnée et n'est plus proposée en routine clinique. Des considérations pratiques et logistiques ont également favorisé le développement d'alternatives moins contraignantes avec l'utilisation de la voie orale et sublinguale.

L'immunothérapie par voie orale (OIT) consiste en l'administration quotidienne à doses croissantes de l'allergène, sous forme de comprimé ou d'aliment natif, jusqu'à un maximum toléré. L'OIT est une technique très efficace augmentant significativement le seuil de la dose maximale tolérée lors d'un test de provocation oral chez 55 % [37] des patients, à plus de 80 % [38–40] selon les études et l'allergène. L'efficacité à long terme de l'OIT dépend fortement de l'allergène étudié et de la durée du traitement. Plus de 40 % des patients réagissent de nouveau aux protéines de lait après 6 semaines d'OIT [40] alors que qu'après 5 ans de traitement 50 % des patients sont toujours désensibilisés 1 mois après arrêt de l'OIT aux arachides, soulignant les limites actuelles de l'efficacité à long terme de ces approches. Concernant la sécurité, 10 à 20 % des patients enrôlés dans les essais cliniques d'OIT arrêtent le traitement en raison de réactions secondaires associées [41]. Ces effets indésirables sont dans la plupart des réactions de grade I ou II [42,43]. De plus, la récente caractérisation des œsophagites à éosinophile réversibles après traitement a contribué à l'augmentation du nombre de réactions graves [44]. Ces études démontrent clairement que l'OIT est efficace dans la désensibilisation, cependant la fréquence des réactions systémiques reste encore importante. De plus, un traitement prolongé, voire ininterrompu, semble nécessaire pour maintenir une efficacité à long terme satisfaisante.

L'immunothérapie par voie sublinguale (SLIT) présent l'avantage de cibler la muqueuse sublinguale qui constitue la première zone de contact avec le trophallergène, et est dite « pro-tolérogène » en raison de sa teneur en cellules dendritiques spécifiques capables d'induire des Treg. La SLIT consiste donc à administrer l'allergène en très faible quantité (de l'ordre du microgramme allant jusqu'au milligramme) à dose croissante sous la langue. Des concentrés d'extraits allergéniques en solution ou en tablettes sublinguales sont proposés [45]. Les protocoles de désensibilisation sont très similaires à ceux de l'OIT [46]. Les essais cliniques menés pour la plupart dans le cadre de l'allergie aux arachides ont été conduits durant 1 à 4 ans [47,48] afin d'atteindre une dose maximale tolérée satisfaisante. En termes d'efficacité et comparativement à l'OIT, la SLIT présente une efficacité plus faible que l'OIT, néanmoins la sécurité d'emploi de la SLIT est supérieure à l'OIT avec un taux plus faible de réactions systémiques [49]. Cependant, la SLIT n'a pas démontrée d'efficacité thérapeutique préventive tant sur le plan clinique que biologique [50].

La voie épicutanée est une voie récemment explorée qui a montré des résultats encourageants. En effet, les études suggérant que la peau constituait un site probable de sensibilisation aux allergènes alimentaires [51–53] ont conduit au développement d'une nouvelle voie d'administration de l'ITS. L'administration épicutanée de l'allergène, à l'aide de patch, a

clairement montré son potentiel tolérogénique dans des modèles animaux [54,55]. Chez l'homme, différents essais cliniques sont en cours et les premiers résultats apparaissent prometteurs. Une étude pilote visant à démontrer la sécurité d'emploi de l'ITS par voie épicutanée (EPIT) lors d'un traitement de courte durée (90 jours) des allergies au lait a démontré une très bonne tolérance avec seulement comme effet secondaire des signes cutanés et gastro-intestinaux bénins [56]. Un essai clinique de phase IIb a également testé l'efficacité des patchs Viaskin Peanut® dans le cadre de l'allergie à la cacahuète, mettant en évidence une très bonne observance ainsi qu'une efficacité atteignant un taux de réponse de 40 % chez les patients traités passant à 67 % si l'analyse se concentre sur les enfants de 5 à 11 ans [41,57]. Ces premiers résultats soulignent l'efficacité de l'EPIT, qui est actuellement en étude de phase III, mais les taux d'efficacité rapportés restent similaires à ceux de la SLIT et inférieurs à ceux de l'OIT.

Globalement, l'ITS reste encore à être validée dans le cadre de l'allergie alimentaire et est de ce fait peu utilisée en routine clinique. L'efficacité relative, le manque de données économiques probantes lors des études coût–efficacité et l'hétérogénéité des protocoles d'immunothérapies constituent les limites actuelles, sans compter les risques associés à la réintroduction de l'allergène qui a conduit à délaisser cette thérapie durant ces dernières décennies.

2.2.2. *Anti-IgE*

Les thérapies visant à bloquer les IgE, acteur central dans les phénomènes allergiques, présentent un intérêt certain dans l'allergie alimentaire. Cependant une étude américaine évaluant l'omalizumab (anti-IgE) en monothérapie chez des patients atteints d'allergies à l'arachide fut interrompue suite aux réactions observées lors de challenges oraux [58]. Malgré cet arrêt prématuré, des tendances de diminution d'IgE sériques chez les patients traités ont été observées. Aujourd'hui, l'omalizumab est souvent proposé en combinaison avec l'OIT afin de réduire les éventuelles réactions sévères liées à la réintroduction de l'allergène lors de la phase d'escalade de dose. Chez des patients présentant une allergie aux protéines de lait ou aux arachides et non-répondeurs à une première OIT, il a pu être montré que l'omalizumab administré comme adjuvant à une seconde OIT permettait de tolérer une dose d'allergène plus importante, de diminuer les effets indésirables de l'OIT ou encore de réduire le temps de désensibilisation. Cependant les résultats n'ont pas montré d'amélioration du taux de désensibilisation [3,59,60]. Enfin, une thérapie innovante visant à bloquer des IgE a été proposée par Pagovich et al. Cette thérapie génique qui consiste en l'administration de vecteurs viraux autorisant l'expression d'anti-hIgE a démontré son efficacité dans un modèle préventif d'allergie à l'arachide chez des souris humanisées. Cette efficacité s'est traduite par la diminution des taux sériques d'IgE ainsi que la moindre sévérité des signes cliniques observés [61]. Au final, l'utilisation d'anti-IgE semble être prometteuse même si des optimisations sont encore requises avant une utilisation à plus large échelle.

2.2.3. *Adjuvants pro-Th1*

De nouveaux protocoles d'ITS se développent associant l'administration de l'allergène avec des adjuvants pro-Th1, ciblant notamment les récepteurs *toll-like receptor* (TLR). Ces ITS adjuvantées ont pour but de favoriser le rééquilibre des réponses Th1/Th2 en renforçant les réponses Th1 [62–64]. Parallèlement à ces stratégies qui continuent d'inclure l'allergène, il a été testé l'administration simple d'antigène Mycobactérien, favorisant la réponse Th1, avec de l'ADN non-codant utilisé comme adjuvant pro-Th1 [65,66]. Ces immunothérapies qui s'affranchissent de la réintroduction de l'allergène, pratique considérée comme à risque chez les sujets allergiques, constituent un axe intéressant de recherche et pourrait bientôt intéresser les allergies alimentaires.

2.2.4. *Anti-IL-5*

L'IL-5 fut longtemps considérée comme une cible intéressante dans la régulation des réponses allergiques. Impliquée dans le recrutement des populations responsables de l'inflammation locale allergique, sa neutralisation représente donc une piste prometteuse.

Les premiers essais utilisant les anticorps ciblant l'IL-5 (historiquement le mépolizumab) ont mis en avant son action bénéfique dans les crises d'asthme à éosinophiles réfractaire ainsi que dans la baisse du nombre d'éosinophiles sériques [67,68]. Ces effets thérapeutiques n'ont cependant pas été accompagnés d'amélioration de la fonction respiratoire et de plus n'ont pas été retrouvés chez des patients présentant de faibles taux d'éosinophiles [68]. Par ailleurs, le mépolizumab a été étudié dans l'œsophagite à éosinophiles, maladie présentant des caractéristiques communes avec l'allergie alimentaire comme la présence d'IgE ou encore la disparition des symptômes après éviction de l'aliment incriminé. Une diminution significative des éosinophiles dans l'œsophage a été observée chez les patients traités par mépolizumab durant quelques jours [69]. Néanmoins cette baisse ne s'est pas accompagnée d'une amélioration clinique ou d'une modification d'autres marqueurs biologiques. De ce fait, de nouvelles formulations visant à optimiser l'action de cet anticorps notamment par association à un autre anticorps ciblant l'IL-4 et/ou l'IL-13 (dupilumab) pourraient permettre de réévaluer son utilisation dans l'allergie alimentaire.

2.2.5. *Abatacept*

Les molécules de l'activation des lymphocytes T et plus particulièrement les molécules de co-stimulation ont un rôle important dans l'initiation et l'entretien des réponses allergiques. Différentes stratégies ciblant ces molécules sont déployées, notamment le CD28, molécule de surface des lymphocytes T qui se lie aux CD80 et CD86 présents sur les cellules présentatrices d'antigènes et qui peut être bloqué par la molécule régulatrice CTLA-4. Les travaux de Van Wijk et al. ont permis de montrer chez la souris l'importance de cette voie d'activation dans la génération d'une tolérance à la cacahuète [31]. Ces recherches ont permis d'envisager l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie dans le traitement des allergies. L'abatacept, molécule couplant le CTLA-4 à un domaine constant d'IgG humaine,

constitue une approche thérapeutique intéressante de par son mode d'action, son profil d'utilisation et son efficacité dans d'autres modèles de maladies auto-immunes. En plus de réguler la polarisation Th2 et la production d'IgE, cette molécule peut agir directement sur l'inflammation. Malgré des résultats décevants en monothérapie dans l'asthme modéré chez l'homme [70], l'utilisation de l'abatacept dans l'allergie alimentaire en association avec d'autres thérapies reste intéressante.

2.2.6. *Microbiote et bactéries recombinantes*

L'étude extensive du microbiote ces dernières années et la découverte de ses propriétés immunorégulatrices ouvrent là encore de nouvelles pistes thérapeutiques pour l'allergie alimentaire. Alors que son rôle dans certaines pathologies auto-immunes est avéré, le microbiote reste aujourd'hui un candidat potentiel qui permet d'expliquer différentes situations de corrélation ou d'incidence exceptionnelle d'allergie telle le mode d'accouchement, l'âge de la diversification de la nourriture ou encore l'utilisation précoce et récurrente d'antibiotiques [71]. L'étude de Cahenzli et al. a permis de démontrer le lien entre le microbiote et le niveau d'IgE chez l'homme [72]. Plusieurs hypothèses quant au mode d'action ont été proposées, notamment celle jouée par le microbiote comme barrière contre les allergènes, associée à une modulation de la plasticité et l'inflammation de l'épithélium intestinal [73]. L'autre hypothèse émise est la capacité du microbiote à réguler la sécrétion d'IgE et à favoriser à l'inverse la sécrétion d'IgA, permettant un plus faible passage de l'allergène à travers la barrière muqueuse [74]. Au-delà de la sphère intestinale, le microbiote présent en d'autres sites, comme la peau, pourrait également intervenir dans les phases de sensibilisation, y compris pour l'allergie alimentaire [71].

Plusieurs travaux ont exploité l'ensemble de ces propriétés régulatrices microbiennes afin d'induire une tolérance dans l'allergie. Différentes approches sont possibles combinant ou non l'administration mucosale et persistante d'un allergène, d'une molécule tolérogène ou l'utilisation des propriétés pro-tolérogènes de certaines souches bactériennes. Une des approches testées a permis d'évaluer l'impact d'une administration orale de *Lactococcus lactis* recombinante sécrétant Der p2, un des peptides impliqués dans l'asthme allergique chez la souris. Les résultats ont permis de démontrer une efficacité dans la baisse des IgE spécifiques, ainsi que de l'inflammation locale pulmonaire [75]. Une autre approche a consisté en l'utilisation de *Lactococcus lactis* capables de sécréter l'IL-10 au niveau local [76]. Dans un modèle d'allergie alimentaire au lait chez la souris, l'administration orale de ces bactéries recombinantes a permis de faire diminuer les taux d'IgE et d'IgG1 sériques spécifiques de l'antigène (b-lactoglobulin). À l'inverse, des niveaux plus élevés d'IgA ont été retrouvés avec également une augmentation du taux d'IL-10 au niveau des plaques de Peyer. Ces résultats suggèrent la possibilité d'utiliser des agents pro-biotiques afin de prévenir voir de traiter les allergies alimentaires et d'envisager l'utilisation d'autres molécules tolérogènes. L'utilisation de bactéries recombinantes semble être une alternative de choix dans les allergies alimentaires tant par la possibilité de sécrétion de nombreuses molécules tolérogènes, d'allergènes que par l'étude de souches dotées de propriétés tolérogènes intrinsèques.

2.2.7. *Thérapie cellulaire ex vivo par Treg*

Le rôle central des Treg dans la régulation des réponses allergiques ayant été établi, de nouvelles thérapies spécifiques de ces cellules peuvent être envisagées. Jusqu'à récemment, ces approches de thérapie cellulaire par Treg reposaient sur l'expansion et la stimulation in vitro de Treg avant leur réadministration au patient. La preuve de concept a pu être apportée dans différents modèles précliniques chez l'animal [25,77,78] mais ces stratégies restent confrontées aux problèmes de faisabilité en clinique humaine. L'obtention de population de Treg conservant leur fonction régulatrice après sélection et expansion ex vivo reste un point extrêmement critique. Alternativement aux stratégies de thérapie cellulaire ex vivo, une autre approche ciblant les Treg in vivo semble être bien plus prometteuse.

2.2.8. *IL-2 faible dose : une thérapie cellulaire in vivo spécifique des Treg*

Il a pu être démontré que l'administration de faibles doses d'IL-2 a pour conséquence de recruter et d'activer spécifiquement la population suppressive de lymphocytes Treg in vivo.

2.2.8.1. Rationnel et preuve de concept. L'IL-2 est une cytokine de 15 000 kDa produite par les cellules immunitaires (LT CD4, LT CD8, DC activées, NK et les NK exprimant le CD3 [NKT]) qui a été initialement décrite comme facteur de croissance des lymphocytes T. Elle agit en se fixant sur son récepteur composé de trois chaînes polypeptidiques (IL-2Rα [CD25], IL-2Rβ [CD122] et IL-2Rγ [CD132]) qui forment le récepteur de haute affinité à l'IL-2 [79]. La fixation de l'IL-2 sur son récepteur induit alors une cascade de signalisation permettant la survie, la différenciation et l'expansion des lymphocytes T activés [79]. Le dimère CD122 et CD132 peut également transduire le signal en l'absence de CD25, au prix d'une diminution d'affinité pour l'IL-2 [79]. L'IL-2 a donc des effets variables selon la dose, s'expliquant par l'expression différentielle et spécifique du récepteur de haute affinité à la surface de certaines populations cellulaires. Le récepteur trimérique de haute affinité est constitutivement exprimé sur les Treg, tandis que les autres populations cellulaires sensibles à l'IL-2 acquièrent le CD25 qu'après activation [79]. Les Treg sont donc plus sensibles à l'IL-2 que les autres populations cellulaires (Fig. 2).

L'IL-2 à forte dose a d'abord été utilisée pour traiter les patients atteints de différents cancers (adénocarcinome rénal, mélanome métastatique sévère) afin de renforcer la réponse T cytotoxique (Teff). Globalement, l'efficacité thérapeutique de l'IL-2 s'est avérée médiocre, notamment au vue des toxicités importantes qu'elle engendrait [80]. De façon intéressante, des doses plus faibles d'IL-2 ont pu être proposées mais s'accompagnant d'une efficacité anti-tumorale limitée (réponse clinique faible, voire nulle) [81], qui peut aujourd'hui s'expliquer par une inversion de la balance Treg/Teff en faveur d'une augmentation des Treg aux faibles doses.

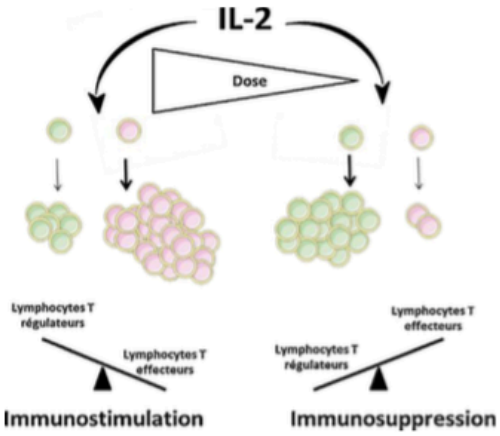


Fig. 2. Les effets pléiotropiques de l'IL-2 en fonction de la dose utilisée. L'IL-2 utilisée à faible dose induit l'expansion préférentielle des Treg qui possèdent le récepteur de haute affinité pour l'IL-2. À l'inverse, l'IL-2 utilisée à forte dose entraîne également le recrutement et l'expansion des lymphocytes T effecteurs.

Ainsi, une faible dose d'IL-2 peut favoriser l'expansion des Treg tout en préservant les Teff. Les premiers travaux démontrant le potentiel immunosuppresseur de l'IL-2 faible dose ont été menés dans le cadre de l'auto-immunité. Grinberg-Bleyer et al. ont montré que l'administration de faible dose d'IL-2 permettait de guérir les souris *non-obese diabetic* (NOD) du diabète de type 1 s'expliquant par une augmentation des Treg et de leur capacité suppressive [82]. L'IL-2 faible dose ou le complexe IL-2/anti-IL2, favorisant l'expansion de Treg, ont ensuite été testés dans d'autres modèles expérimentaux de maladies auto-immunes [83–86] ou dans d'autres maladies inflammatoires [87–89]. Dans tous les cas, ce traitement s'est révélé très efficace et son efficacité a été associée à une activation in vivo spécifique des Treg et la sécrétion d'IL-10 [90]. Le rôle anti-inflammatoire de l'IL-2 faible dose a également été montré dans le contrôle de maladies inflammatoires comme les lésions d'athérosclérose [85,91], certaines dystrophies musculaires [88] ou encore certaines lésions pulmonaires aiguës [92].

Chez l'homme, Saadoun et al. a montré que l'administration d'IL-2 à faible dose permettait d'augmenter spécifiquement les Treg chez des patients atteints de vascularite, s'accompagnant d'une amélioration clinique, constituant la première démonstration clinique de l'effet immunosuppresseur de l'IL-2. Suite à ces travaux, un essai clinique de phase I testant l'IL-2 faible dose dans le diabète de type 1 chez l'adulte a été mis en place. Les résultats préliminaires montrent un bon profil de tolérance et une augmentation des Treg de façon dose dépendante [93]. Deux essais cliniques concernant le diabète chez l'enfant (NCT02411253 et NCT01862120, disponibles sur clinicaltrials.gov) et des patients atteints de maladies auto-immunes (étude de phase II concernant 11 pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires ; NCT01988506) sont en cours.

En parallèle, d'autres groupes ont démontré l'efficacité clinique de l'administration de faibles doses d'IL-2 dans le traitement de la GVHD [94], du lupus [95] et des alopécies auto-immunes [96]. Ces résultats prometteurs apportent la preuve que l'IL-2 faible dose constitue une bonne alternative à la thérapie cellulaire ex vivo.

2.2.8.2. Utilisation de faible dose d'IL-2 dans l'allergie. L'IL-2 possède des effets biologiques particulièrement intéressants, au regard des maladies allergiques intervenant sur plusieurs aspects de la physiopathologie sans l'inconvénient de la ré-administration de l'allergène.

En effet, notre équipe a démontré que l'administration d'IL-2 faible dose permet l'expansion systémique (sang, rate) et locale (ganglion mésentérique, plaque de Peyer et intestin) des Treg chez la souris. De façon intéressante, cette expansion est sélective puisque les autres populations cellulaires exprimant le CD25 et potentiellement délétères dans l'allergie ne sont pas significativement impactées (mastocytes, *innate lymphoid cells 2*, éosinophile. . .) [26]. D'autres études ont démontré que l'IL-2 bloque le développement de cellules pro-inflammatoire Th17 à partir des CD4 naïfs [97]. De même, l'IL-2 bloque le développement des *T Follicular helper* (Tfh) [97], cellules impliquées dans la génération de la réponse anticorps/antigène spécifique. Enfin, il a été démontré que l'IL-2 active également les NK [79], cellules potentiellement impliquées dans la régulation des réponses B et la production d'anticorps via l'inhibition des Tfh [98].

Les propriétés biologiques précédemment décrites, nous ont conduit à appliquer cette immunothérapie par IL-2 faible dose dans deux modèles murins d'allergie alimentaire (ovalbumine et cacahuète). L'efficacité préventive de l'IL-2 (administrée avant la phase de sensibilisation) a été attestée par une diminution de l'incidence et la sévérité des diarrhées et par une diminution de la chute de la température corporelle. Par ailleurs, l'effet thérapeutique de l'IL-2 faible dose est Treg-dépendant dans la mesure où l'efficacité clinique de l'IL-2 chez les souris chez qui les Treg ont été éliminés est abrogée. IL-2 prévient le recrutement des effecteurs de l'allergie (éosinophiles, basophiles et mastocytes) et entraîne une diminution de la dégranulation des basophiles et des mastocytes mesurée respectivement par la diminution de l'expression membranaire du CD63 et la diminution du taux sérique de MCPT-1. Enfin, l'analyse des réponses immunitaires spécifiques de l'allergène montre que l'IL-2 permet le rééquilibre des réponses locales Th1/Th2 sans pour autant contrôler la sécrétion d'IgE spécifiques de l'ovalbumine [26]. L'efficacité curative de L'Il-2 faible dose (administrée après le déclenchement des signes cliniques) a été également démontrée dans ce modèle d'allergie à l'ovalbumine [26]. De façon remarquable, l'efficacité observée est complète et maintenue sur plusieurs mois après seulement deux cures d'IL-2 et ce aussi bien en préventif qu'en curatif.

L'administration de faible dose d'IL-2 a également été testée dans des modèles d'asthme allergique, démontrant l'efficacité préventive d'une cure de 5 jours d'IL-2 faible dose (50 000 UI) dans la prévention de l'hyperactivité bronchique chez des souris sensibilisée puis challengée par l'allergène (données non publiées).

2.2.8.3. IL-2 : adjuvant des ITS ?. Dans la mesure où l'administration de faibles doses d'IL-2 induit l'expansion globale et transitoire des Tregs, et indépendamment de leur

spécificité antigénique, se pose la question de la spécificité de la thérapie. Alors que dans le cadre des maladies auto-immunes, l'efficacité thérapeutique requiert la présence de Treg spécifiques des auto-antigènes [99], la présence et le rôle de Treg spécifiques des allergènes doivent être démontrés dans le cadre des allergies. Ainsi, l'administration simultanée d'IL-2 faible dose et de l'allergène pourrait être une stratégie optimale pour induire un plus grand nombre de Treg spécifiques et donc de gagner en efficacité thérapeutique. De façon intéressante, nous travaillons aujourd'hui sur la formulation de l'antigène afin de limiter les éventuelles réactions sévères suite à la ré-administration de l'allergène et au contraire favoriser la tolérance.

3. Conclusion

Les évolutions épidémiologiques observées dans l'allergie alimentaire motivent aujourd'hui la recherche de nouveaux outils tant diagnostics que thérapeutiques rapidement disponibles pour les patients. En dehors de l'éviction stricte des allergènes pour les patients chez qui la cause a été identifiée, l'ITS reste à l'heure actuelle l'alternative thérapeutique la plus proposée. L'utilisation de nouvelles voies d'administration permet par ailleurs de moduler la balance efficacité–effets secondaires et de réduire les problématiques d'observance. Dans le domaine de la thérapeutique, les biothérapies représentent un domaine prometteur à la fois dans la prévention et dans la régulation des réponses allergiques observées. L'IL-2 à faible dose, par son recul d'utilisation et sa capacité à induire des réponses régulatrices, semble être un candidat intéressant. Les résultats préliminaires obtenus chez l'animal ainsi que la sécurité d'emploi de l'IL-2 faible dose à long terme [100] encouragent la définition de nouveaux schémas thérapeutiques et la conduite d'essais cliniques dans d'autres modèles d'animaux ainsi que chez l'homme.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

[1] Gupta RS, Springston EE, Warrier MR, Smith B, Kumar R, Pongracic J, et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. Pediatrics 2011;128(1):e9–17.

[2] Soller L, Ben-Shoshan M, Harrington DW, Fragapane J, Joseph L, St. Pierre Y, et al. Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. J Allergy Clin Immunol 2012;130(4):986–8.

[3] Umetsu DT, Rachid R, Schneider LC. Oral immunotherapy and anti-IgE antibody treatment for food allergy. World Allergy Organ J 2015;8(1):20.

[4] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. J Allergy Clin Immunol 2014;133(2):291–307 [e5].

[5] Liew WK, Williamson E, Tang MLK. Anaphylaxis fatalities and admissions in Australia. J Allergy Clin Immunol 2009;123(2):434–42.

[6] Moneret-Vautrin D-A. Épidémiologie de l'allergie alimentaire. Rev Fr Allergol Immunol Clin 2008;48(3):171–8.

[7] Patel DA, Holdford DA, Edwards E, Carroll NV. Estimating the economic burden of food-induced allergic reactions and anaphylaxis in the United States. J Allergy Clin Immunol 2011;128(1):110–5 [e5].

[8] O'Keefe AW, De Schryver S, Mill J, Mill C, Dery A, Ben-Shoshan M. Diagnosis and management of food allergies: new and emerging options: a systematic review. J Asthma Allergy 2014;7:141–64.

[9] Ercan H, Ozen A, Karatepe H, Berber M, Cengizlier R. Primary school teachers' knowledge about and attitudes toward anaphylaxis. Pediatr Allergy Immunol 2012;23(5):428–32.

[10] Groetch M, Nowak-Wegrzyn A. Practical approach to nutrition and dietary intervention in pediatric food allergy. Pediatr Allergy Immunol 2013;24(3):212–21.

[11] Flammarion S, Santos C, Guimber D, Jouannic L, Thumerelle C, Gottrand F, et al. Diet and nutritional status of children with food allergies. Pediatr Allergy Immunol 2011;22(2):161–5.

[12] Diamanti A, Pedicelli S, D'Argenio P, Panetta F, Alterio A, Torre G. Iatrogenic Kwashiorkor in three infants on a diet of rice beverages. Pediatr Allergy Immunol 2011;22(8):878–9.

[13] Palomares O. The role of regulatory T cells in IgE-mediated food allergy. J Investig Allergol Clin Immunol 2013;23(6):371–82 [quiz 2 p preceding 382].

[14] Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. AJP Gastrointest Liver Physiol 2007;294(1): G208–16.

[15] Allen KJ, Koplin JJ, Ponsonby A-L, Gurrin LC, Wake M, Vuillermin P, et al. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants. J Allergy Clin Immunol 2013;131(4):1109–16 [e6].

[16] Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111(36):13145–50.

[17] Metsälä J, Lundqvist A, Virta LJ, Kaila M, Gissler M, Virtanen SM. Mother's and offspring's use of antibiotics and infant allergy to cow's milk. Epidemiology 2013;24(2):303–9.

[18] Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F, et al. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. Gastroenterology 2007;132(5):1705–17.

[19] Schaub B, Liu J, Höppler S, Haug S, Sattler C, Lluis A, et al. Impairment of T regulatory cells in cord blood of atopic mothers. J Allergy Clin Immunol 2008;121(6):1491–9 [1499. e1–13].

[20] Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. J Exp Med 2004;199(12):1679–88.

[21] Sletten GBG, Halvorsen R, Egaas E, Halstensen TS. Memory T cell proliferation in cow's milk allergy after CD25+ regulatory T cell removal suggests a role for casein-specific cellular immunity in IgE-mediated but not in non-IgE-mediated cow's milk allergy. Int Arch Allergy Immunol 2007;142(3):190–8.

[22] Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Clin Transl Allergy 2012;2(1):2.

[23] Smarr CB, Bryce PJ, Miller SD. Antigen-specific tolerance in immunotherapy of Th2-associated allergic diseases. Crit Rev Immunol 2013;33(5):389–414.

[24] Syed A, Garcia MA, Lyu S-C, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, et al. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). J Allergy Clin Immunol 2014;133(2):500–10.

[25] Yamashita H, Takahashi K, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. Allergy 2012;67(2):201–9.

[26] Bonnet B, Vigneron J, Levacher B, Vazquez T, Pitoiset F, Brimaud F, et al. Low-dose IL-2 induces regulatory T cell-mediated control of experimental food allergy. J Immunol 2016;197(1):188–98.

[27] Kanjarawi R, Dercamp C, Etchart N, Adel-Patient K, Nicolas J-F, Dubois B, et al. Regulatory T cells control type I food allergy to Beta-lactoglobulin in mice. Int Arch Allergy Immunol 2011;156(4):387–96.

[28] Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of allergen-driven T cell activation to atopic status and expression of allergic disease. Lancet 2004;363(9409):608–15.

[29] Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. J Immunol 2000;165(9):4848–53.
[30] Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. J Immunol 2005;174(8):4718–26.
[31] Van Wijk F, Nierkens S, de Jong W, Wehrens EJM, Boon L, van Kooten P, et al. The CD28/CTLA-4-B7 signaling pathway is involved in both allergic sensitization and tolerance induction to orally administered peanut proteins. J Immunol 2007;178(11):6894–900.
[32] Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. Allergy 2008;63(11):1455–63.
[33] Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. Immunity 2008;29(5):771–81.
[34] Kashyap M, Thornton AM, Norton SK, Barnstein B, Macey M, Brenzovich J, et al. Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. J Immunol 2008;180(4):2039–43.
[35] Rolland JM, Gardner LM, O'Hehir RE. Allergen-related approaches to immunotherapy. Pharmacol Ther 2009;121(3):273–84.
[36] Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Poulsen LK, Neubauer A, Asturias J, Blom L, et al. FAST: towards safe and effective subcutaneous immunotherapy of persistent life-threatening food allergies. Clin Transl Allergy 2012;2(1):5.
[37] Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, Lindblad RW, et al. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. N Engl J Med 2012;367(3):233–43.
[38] Caminiti L, Pajno GB, Crisafulli G, Chiera F, Collura M, Panasci G, et al. Oral immunotherapy for egg allergy: a double-blind placebo-controlled study, with postdesensitization follow-up. J Allergy Clin Immunol Pract 2015;3(4):532–9.
[39] Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, Perry TT, Kemper A, Steele P, et al. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. J Allergy Clin Immunol 2011;127(3):654–60.
[40] Keet CA, Frischmeyer-Guerrerio PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, Boden S, et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. J Allergy Clin Immunol 2012;129(2):448–55 [455. e1–5].
[41] Chiang D, Berin MC. An examination of clinical and immunologic outcomes in food allergen immunotherapy by route of administration. Curr Allergy Asthma Rep [Internet] 2015;15(6) [cited 2015 Jul 7. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11882-015-0536-y].
[42] Vazquez-Ortiz M, Alvaro M, Piquer M, Dominguez O, Machinena A, Martín-Mateos MA, et al. Baseline specific IgE levels are useful to predict safety of oral immunotherapy in egg-allergic children. Clin Exp Allergy 2014;44(1):130–41.
[43] Vázquez-Ortiz M, Alvaro-Lozano M, Alsina L, Garcia-Paba MB, Piquer-Gibert M, Giner-Muñoz MT, et al. Safety and predictors of adverse events during oral immunotherapy for milk allergy: severity of reaction at oral challenge, specific IgE and prick test. Clin Exp Allergy 2013;43(1):92–102.
[44] Lucendo AJ, Arias A, Tenias JM. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. Ann Allergy Asthma Immunol 2014;113(6):624–9.
[45] Senna GE, Calderon M, Milani M. Allergy immunotherapy tablet: Grazax® for the treatment of grass pollen allergy. Expert Rev Clin Immunol 2011;7(1):21–7.
[46] Kostadinova AI, Willemsen LEM, Knippels LMJ, Garssen J. Immunotherapy – risk/benefit in food allergy. Pediatr Allergy Immunol 2013;24(7):633–44.
[47] Marogna M, Spadolini I, Massolo A, Canonica GW, Passalacqua G. Long-lasting effects of sublingual immunotherapy according to its duration: a 15-year prospective study. J Allergy Clin Immunol 2010;126(5):969–75.
[48] Fleischer DM, Burks AW, Vickery BP, Scurlock AM, Wood RA, Jones SM, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. J Allergy Clin Immunol 2013;131(1):119–27 [e1–7].
[49] Narisety SD, Frischmeyer-Guerrerio PA, Keet CA, Gorelik M, Schroeder J, Hamilton RG, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. J Allergy Clin Immunol 2015;135(5):1275–82 [e1–6].
[50] Holt PG, Sly PD, Sampson HA, Robinson P, Loh R, Lowenstein H, et al. Prophylactic use of sublingual allergen immunotherapy in high-risk children: a pilot study. J Allergy Clin Immunol 2013;132(4):991–3 [e1].
[51] Tordesillas L, Goswami R, Benedé S, Grishina G, Dunkin D, Järvinen KM, et al. Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. J Clin Invest 2014;124(11):4965–75.
[52] Brough HA, Simpson A, Makinson K, Hankinson J, Brown S, Douiri A, et al. Peanut allergy: effect of environmental peanut exposure in children with filaggrin loss-of-function mutations. J Allergy Clin Immunol 2014;134(4):867–75 [e1].
[53] Fox AT, Sasieni P, du Toit G, Syed H, Lack G. Household peanut consumption as a risk factor for the development of peanut allergy. J Allergy Clin Immunol 2009;123(2):417–23.
[54] Dioszeghy V, Mondoulet L, Dhelft V, Ligouis M, Puteaux E, Benhamou P-H, et al. Epicutaneous immunotherapy results in rapid allergen uptake by dendritic cells through intact skin and downregulates the allergen-specific response in sensitized mice. J Immunol 2011;186(10):5629–37.
[55] Dioszeghy V, Mondoulet L, Dhelft V, Ligouis M, Puteaux E, Dupont C, et al. The regulatory T cells induction by epicutaneous immunotherapy is sustained and mediates long-term protection from eosinophilic disorders in peanut-sensitized mice. Clin Exp Allergy 2014;44(6):867–81.
[56] Dupont C, Kalach N, Soulaines P, Legoué-Morillon S, Piloquet H, Benhamou P-H. Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. J Allergy Clin Immunol 2010;125(5):1165–7.
[57] Sampson HA, Agbotounou W, Thébault C, Charles R, Martin L, Yang WH, et al. Epicutaneous immunotherapy (EPIT) is effective and safe to treat peanut allergy: a multi-national double-blind placebo-controlled randomized phase IIb trial. J Allergy Clin Immunol 2015;135(2, Supplement):AB390.
[58] Sampson HA, Leung DYM, Burks AW, Lack G, Bahna SL, Jones SM, et al. A phase II, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled oral food challenge trial of Xolair (omalizumab) in peanut allergy. J Allergy Clin Immunol 2011;127(5):1309–10 [e1].
[59] Yee CSK, Rachid R. The heterogeneity of oral immunotherapy clinical trials: implications and future directions. Curr Allergy Asthma Rep 2016;16(4):1–19.
[60] Wood RA, Kim JS, Lindblad R, Nadeau K, Henning AK, Dawson P, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of omalizumab combined with oral immunotherapy for the treatment of cow's milk allergy. J Allergy Clin Immunol 2016;137(4):1103–10.
[61] Pagovich OE, Wang B, Chiuchiolo MJ, Kaminsky SM, Sondhi D, Jose CL, et al. Anti-hIgE gene therapy of peanut-induced anaphylaxis in a humanized murine model of peanut allergy. J Allergy Clin Immunol 2016;138(6):1652–62.
[62] Wheeler AW, Marshall JS, Ulrich JT. A Th1-inducing adjuvant, MPL, enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. Int Arch Allergy Immunol 2001;126(2):135–9.
[63] Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, Sperr WR, Krauth MT, Majlesi Y, et al. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. Clin Exp Allergy 2003;33(9):1198–208.
[64] Crivellaro M, Senna GE, Pappacoda A, Vanzelli R, Spacal B, Marchi G, et al. Safety of ultrashort-term sit with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A: a prospective Italian survey. Eur Ann Allergy Clin Immunol 2011;43(2):58–60.
[65] Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed–toll-like

receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. N Engl J Med 2006;355(14):1445–55.
[66] Fonseca DM, Wowk PF, Paula MO, Gembre AF, Baruffi MD, Fermino ML, et al. Requirement of MyD88 and Fas pathways for the efficacy of allergen-free immunotherapy. Allergy 2015;70(3):275–84.
[67] Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med 2009;360(10):973–84.
[68] Nair P, Pizzichini MMM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. N Engl J Med 2009;360(10):985–93.
[69] Straumann A, Conus S, Grzonka P, Kita H, Kephart G, Bussmann C, et al. Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic oesophagitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. Gut 2010;59(1):21–30.
[70] Parulekar AD, Boomer JS, Patterson BM, Yin-Declue H, Deppong CM, Wilson BS, et al. A randomized controlled trial to evaluate inhibition of T cell co-stimulation in allergen-induced airway inflammation. Am J Respir Crit Care Med 2013;187(5):494–501.
[71] Wesemann DR, Nagler CR. The microbiome, timing, and barrier function in the context of allergic disease. Immunity 2016;44(4):728–38.
[72] Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, Geuking MB, McCoy KD. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. Cell Host Microbe 2013;14(5):559–70.
[73] Hill DA, Siracusa MC, Abt MC, Kim BS, Kobuley D, Kubo M, et al. Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. Nat Med 2012;18(4):538–46.
[74] Prioult G, Nagler-Anderson C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? Immunol Rev 2005;206:204–18.
[75] Ai C, Zhang Q, Ding J, Wang G, Liu X, Tian F, et al. Mucosal delivery of allergen peptides expressed by Lactococcus lactis inhibit allergic responses in a BALB/c mouse model. Appl Microbiol Biotechnol 2016;100(4):1915–24.
[76] Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA. Oral administration of an IL-10-secreting Lactococcus lactis strain prevents food-induced IgE sensitization. J Allergy Clin Immunol 2007;119(4):952–9.
[77] Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. J Allergy Clin Immunol 2008;122(3):617–24 [e6].
[78] Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. J Exp Med 2005;202(11):1539–47.
[79] Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol 2015;15(5):283–94.
[80] Royal RE, Steinberg SM, Krouse RS, Heywood G, White DE, Hwu P, et al. Correlates of response to IL-2 therapy in patients treated for metastatic renal cancer and melanoma. Cancer J Sci Am 1996;2(2):91–8.
[81] Nizar S, Copier J, Meyer B, Bodman-Smith M, Galustian C, Kumar D, et al. T regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? Br J Cancer 2009;100(11):1697–703.
[82] Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. J Exp Med 2010;207(9):1871–8.
[83] Boyman O, Surh CD, Sprent J. Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. Expert Opin Biol Ther 2006;6(12):1323–31.
[84] Lee S-Y, Cho M-L, Oh H-J, Ryu J-G, Park M-J, Jhun J-Y, et al. Interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody immune complex suppresses collagen-induced arthritis in mice by fortifying interleukin-2/STAT5 signalling pathways. Immunology 2012;137(4):305–16.
[85] Dinh TN, Kyaw TS, Kanellakis P, To K, Tipping P, Toh B-H, et al. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. Circulation 2012;126(10):1256–66.
[86] Liu R, Zhou Q, La Cava A, Campagnolo DI, Van Kaer L, Shi F-D. Expansion of regulatory T cells via IL-2/anti-IL-2 mAb complexes suppresses experimental myasthenia. Eur J Immunol 2010;40(6):1577–89.
[87] Hao J, Campagnolo D, Liu R, Piao W, Shi S, Hu B, et al. Interleukin-2/interleukin-2 antibody therapy induces target organ natural killer cells that inhibit central nervous system inflammation. Ann Neurol 2011;69(4):721–34.
[88] Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball JG, et al. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. Sci Transl Med 2014;6(258):258ra142.
[89] Kasahara K, Sasaki N, Yamashita T, Kita T, Yodoi K, Sasaki Y, et al. CD3 antibody and IL-2 complex combination therapy inhibits atherosclerosis by augmenting a regulatory immune response. J Am Heart Assoc 2014;3(2):e000719.
[90] Brandenburg S, Takahashi T, de la Rosa M, Janke M, Karsten G, Muzzulini T, et al. IL-2 induces in vivo suppression by CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. Eur J Immunol 2008;38(6):1643–53.
[91] Dietrich T, Hucko T, Schneemann C, Neumann M, Menrad A, Willuda J, et al. Local delivery of IL-2 reduces atherosclerosis via expansion of regulatory T cells. Atherosclerosis 2012;220(2):329–36.
[92] D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, et al. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. J Clin Invest 2009;119(10):2898–913.
[93] Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, Jacqueminet S, Bourron O, Nicolas N, et al. Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol 2013;1(4):295–305.
[94] Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. N Engl J Med 2011;365(22):2055–66.
[95] Von Spee-Mayer C, Siegert E, Abdirama D, Rose A, Klaus A, Alexander T, et al. Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2016;75(7):1407–15.
[96] Hordinsky M, Kaplan DH. Low-dose interleukin 2 to reverse alopecia areata. JAMA Dermatol 2014;150(7):696–7.
[97] Kosmaczewska A. Low-dose interleukin-2 therapy: a driver of an imbalance between immune tolerance and autoimmunity. Int J Mol Sci 2014;15(10):18574–92.
[98] Cook KD, Kline HC, Whitmire JK. NK cells inhibit humoral immunity by reducing the abundance of CD4+ T follicular helper cells during a chronic virus infection. J Leukoc Biol 2015;98(2):153–62.
[99] Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. J Exp Med 2004;199(11):1455–65.
[100] Churlaud G, Jimenez V, Ruberte J, Amadoudji Zin M, Fourcade G, Gottrand G, et al. Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. Clin Immunol 2014;151(2):114–26.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

2018 - FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) San Francisco

Communication Poster

“Retrovirus-derived Virus-like particles as tolerogenic vaccines for food allergy treatment”

2018 - EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) Munich

Communication Orale

“Retrovirus-derived Virus-like particles as tolerogenic vaccines for food allergy treatment”

2018 Junior Member Scholarship Award

2018 - CFA (Congrès Francophone d’allergie) Paris

Communication orale

« Pseudo-particules rétrovirales comme vaccins tolérogéniques dans l’allergie alimentaire »

2018 - ART (Allergy Research Today) Paris

Communication orale

“Retrovirus-derived Virus-like particles as tolerogenic vaccines for food allergy treatment”

INDEX DES FIGURES ET DES TABLES

FIGURES

FIGURE 1. MECANISMES DE TOLERANCE CENTRALE ET PERIPHERIQUE DES LYMPHOCYTES T. AU NIVEAU CENTRAL, LA TOLERANCE S'OPERE PAR LA SELECTION POSITIVE DES CLONES T REAGISSANT CONTRE DES ANTIGENES EXOGENES, L'ELIMINATION DE CLONES LYMPHOCYTAIRES T AUTOREACTIFS AINSI QUE PAR LA GENERATION DE CLONES T REGULATEURS (TREG). EN PERIPHERIE, L'IGNORANCE, L'ANERGIE, L'APOPTOSE ET L'INDUCTION DE TREG CONTRIBUENT AU CONTROLE DE L'AUTO-IMMUNITE. D'APRÈS WALKER L.S.K & ABBAS A.K. *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* (2002)..... 13

FIGURE 2. LES DC TOLEROGENES PRESENTENT UN PHENOTYPE DISTINCT DES DC MATURES OU IMMATURES. LES DC TOLEROGENES CARACTERISEES PAR UNE EXPRESSION INTERMEDIAIRE DES MOLECULES DE COSTIMULATION CD80, CD86, CD83 ET DES MOLECULES DE PRESENTATION ANTIGENIQUE DE CLASSE II ET DU MARQUEUR DE MATURATION CD40. LA SECRETION IMPORTANTE D'INTERLEUKINE-10 ASSOCIEE A UNE SECRETION FAIBLE D'IL-12 ET D'IL-23 COMPLETE LA DEFINITION DE CES CELLULES. D'APRES FLOREZ-GRAU G. *ET AL. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* (2018). 17

FIGURE 3. LES MECANISMES D'ACTION DES TREG. A) LES TREG AGISSENT DE MANIERE PARACRINE AVEC LA SECRETION DE TGF-β, D'IL-10 ET D'IL-35. B) LES TREG POSSEDENT UNE CAPACITE CYTOLITIQUE MEDIEE PAR LA SECRETION DE GRANZYMES DE TYPE A OU B. C) LA CAPTATION DE L'IL-2 DANS LE MILIEU PAR L'INTERMEDIAIRE DU RECEPTEUR DE HAUTE AFFINITE, ASSOCIEE A LA PRODUCTION D'ADENOSINE INDUISENT UNE ANERGIE DES TEFF. D) LES TREG EXERCENT UNE MODULATION DES DC PAR L'INTERMEDIAIRE DE LAG-3 ET DU CTLA-4. CETTE MODULATION INDUIT LA SECRETION DE L'ENZYME IDO ET *IN FINE* L'ANERGIE DES TEFF. D'APRES VIGNALY A. *ET AL. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* (2008)..... 25

FIGURE 4. DEVELOPPEMENTS THERAPEUTIQUES UTILISANT DES NANOPARTICULES D'ORIGINE SYNTHETIQUE. TROIS PRINCIPES D'UTILISATION DES NP EN VACCINATION TOLEROGENE SONT DEVELOPPES A L'HEURE ACTUELLE : CEUX EXPLOITANT LES PROCESSUS TOLEROGENES PREEXISTANTS, CEUX CIBLANT DES RECEPTEURS DE LA TOLERANCE ET ENFIN CEUX UTILISANT DES AGENTS PHARMACOLOGIQUES. AU SEIN DE CES TROIS CLASSES, ON RETROUVE DES NP VECTORISANT DES ANTIGENES SOUS FORME D'ADN, DE PROTEINES, DE PEPTIDES OU ASSOCIES AUX MOLECULES DU CMH. LA PRESENCE DE PROTEINES MEMBRANAIRES, TELLES QUE LA PHOSPHATIDYLSERINE, DES LIGANDS DE CD22 OU DES AC ANTI-FAS PERMET EGALEMENT DE DIVERSIFIER LES MECANISMES D'ACTION. D'APRES KISHIMOTO T.K. ET MALDONADO R.A. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY* (2018)..... 43

FIGURE 5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA LIAISON DU CTLA-4 AU CD80. LES HOMODIMERES DE CTLA-4 PRESENTS A LA SURFACE DES LYT SE LIENT AUX HOMODIMERES DE CD80 PRESENTS SUR LES DC. CETTE STRUCTURE PARTICULIERE PERMET LA STABILITE DU COMPLEXE FORME. D'APRES ALEGRE *ET AL. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* (2001)..... 50

FIGURE 6. CYCLE INTRACELLULAIRE DU CTLA-4. L'ADRESSAGE MEMBRANAIRE DES VESICULES CONTENANT DU CTLA-4 EST DEPENDANT DE SIGNAUX ACTIVATEURS TELS QUE CEUX MEDIES PAR LE TCR. APRES EXPRESSION MEMBRANAIRE, LE CTLA-4 EST SOUMIS A UNE ENDOCYTOSE MEDIEE PAR LA CLATHRINE ET PAR LA PROTEINE AP2. LE DEVENIR DE CES ENDOSOMES EST DOUBLE, AVEC UN RECYCLAGE MEMBRANAIRE OU AVEC UNE DEGRADATION AU SEIN DE LYSOSOMES. D'APRES WALKER *ET AL. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* (2011). 51

FIGURE 7. MECANISMES D'ACTION INTRACELLULAIRES DU CTLA-4. LE CTLA-4 POURRAIT INHIBER LE SIGNAL INDUIT PAR LE CD3 PAR L'INTERMEDIAIRE DE SHP-2 EN DESTABILISANT LES MICROCLUSTERS DE ZAP70. D'AUTRE PART, LES VOIES MEDIEES PAR PI3K ET PAR PP2A POURRAIENT INHIBER LA PRODUCTION CYTOKINIQUE ET LA PROLIFERATION CELLULAIRE EN MODULANT LES CASCADES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES. D'APRES ALEGRE *ET AL. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* (2001). 53

FIGURE 8. MECANISMES D'ACTION EXTRINSEQUES DU CTLA-4. A) LE CTLA-4 EN SE LIANT AU COUPLE CD80/86 DIMINUE LA DISPONIBILITE POUR LE CD28 CE QUI EMPECHE L'INDUCTION DU SIGNAL DE COSTIMULATION. B) SUITE A LA LIAISON AVEC LE CD80/86, LE CTLA-4 INDUIT LA SECRETION DE CYTOKINES INHIBITRICES AVEC MAJORITAIREMENT LE TGF-β. C) LE CTLA-4 INDUIT AU NIVEAU DES APC LA PRODUCTION ET LA SECRETION D'IDO. CETTE ENZYME EN CATABOLISANT LE TRYPTOPHANE INDUIT L'ANERGIE DES LYT PRESENT DANS LE MICROENVIRONNEMENT. D) DES PHENOMENES DE TRANSENDOCYTOSE, OBSERVES PRINCIPALEMENT AU NIVEAU DES TREG, PARTICIPENT A LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DES MOLECULES DE COSTIMULATION A LA SURFACE DES APC. D'APRES WALKER *ET AL. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* (2011)..... 56

FIGURE 9. ROLE DE PD-1 DANS LA TOLERANCE IMMUNITAIRE. PD-1 PARTICIPE A L'ETABLISSEMENT DE LA TOLERANCE DES LA SELECTION CLONALE DANS LE THYMUS. EN PERIPHERIE, PD-1 EST IMPLIQUE DANS LE CONTROLE DES REPONSES AUTO-IMMUNES PAR LA DIMINUTION DE L'ACTIVATION DES LYT, LE

CONTROLE DE LEUR MIGRATION ET PARTICIPE A L'ACTION DES TFR. LE DERNIER NIVEAU D'ACTION EST TISSULAIRE ET COMPREND LE CONTROLE DE L'ACTIVATION DES LYT ET L'INDUCTION DE TREG. 61
FIGURE 10. CARACTERISATION DES VLP EXPRIMANT L'IL-2 A LEUR SURFACE (VLP-IL2). A) ANALYSE DES COMPOSANTS DES VLP-IL2 PAR WESTERN BLOT AVEC UNE REVELATION PAR ANTICORPS ANTI-IL-2 ET ANTI-GAGP30. B) ANALYSE DE L'IMPACT DE L'ANCRAGE MEMBRANAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX ET UTILISATION DE BILLES FIXANT LES VLP. C) DETECTION DE LA QUANTITE MOYENNE D'IL-2 PAR ELISA DANS LES ECHANTILLONS DE VLP-IL2. D) ANALYSE DE L'ACTIVITE DE L'IL-2 A LA SURFACE DES VLP PAR ETUDE DE LA PROLIFERATION ET DE LA SURVIE DE CELLULES CTLL-2 EN COMPTAGE AU BLEU TRYPAN. 143
FIGURE 11. DEVELOPPEMENT DES TVLP^{MOG}. A) CARACTERISATION DES VLP^{MOG} PAR WESTERN BLOT. LA PRESENCE DES PROTEINES GAG ET MOG EST REVELEE PAR L'UTILISATION D'ANTICORPS ANTI-GAG P30 ET ANTI-MOG. B) CARACTERISATION DES TVLP^{MOG} PAR CYTOMETRIE EN FLUX. LA PRESENCE DE LA PROTEINE MOG A L'INTERIEUR ET DU CTLA-4 A L'EXTERIEUR DES TVLP^{MOG} EST REVELEE PAR L'ANALYSE DES VLP CONJUGUEES A DES BILLES DE LATEX . C) D) E) DES LYT CD4+ SPECIFIQUES DU PEPTIDE MOG$_{35-55}$ MARQUES AU CELLTRACEVIOLET® ONT ETE CULTIVES EN PRESENCE DE DC CHARGEES AVEC LE PEPTIDE MOG$_{35-55}$ AVEC OU SANS TVLP. LA PROLIFERATION A ETE ENSUITE ANALYSEE PAR CYTOMETRIE EN FLUX SUR 7 JOURS. C) INHIBITION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES 2D2 PAR LES TVLP ET CALCUL DES INDEX DE SUPPRESSION CORRESPONDANTS D) POURCENTAGE DE CELLULES DIVISEES DURANT LES 7 JOURS DE CULTURE. E) L'ACTION INHIBITRICE DES TVLP EST DOSE DEPENDANTE. MESURE DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE DU CD25 EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE TVLP UTILISEES EN CULTURE. 146

TABLES

TABLEAU 1. MODALITES DE GENERATION DES DC TOLEROGENES. LA GENERATION DES DC TOLEROGENES PEUT NECESSITER L'USAGE D'AGENTS BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES, LA THERAPIE GENIQUE OU ENCORE L'UTILISATION DE PROBIOTIQUES ET DE PARASITES. LE POTENTIEL TOLEROGENE EST PAR LA SUITE EVALUE DANS DES MODELES DE DESORDRES IMMUNITAIRES EN PARALLELE DE L'IDENTIFICATION DES MECANISMES D'INDUCTION DE TOLERANCE. D'APRES VAN BRUSSEL *ET AL. AUTOIMMUNITY REVIEWS* (2014). 33
TABLEAU 2. POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRE ANNEXES. AU SEIN DE CETTE CATEGORIE, DES POINTS DE CONTROLE ACTIVATEURS (4-1BB, GITR, ICOS) ET INHIBITEURS (LAG-3, TIM-3, TIGIT) SONT DECRITS. LES ACTIVATEURS ACCROISSENT LES FONCTIONS DES LYT, QU'ELLES SOIENT SUPPRESSIVES OU EFFECTRICES TANDIS QUE LES INHIBITEURS MODULENT LES SIGNAUX D'ACTIVATION INDUITS PAR LA FIXATION ENTRE LE TCR ET LES MOLECULES DU CMH. 62
TABLEAU 3. DEVELOPPEMENT DU CTLA-4 SOUS FORME SOLUBLE (CTLA4-IG). LE CTLA4-IG A ETE TESTE DANS DE NOMBREUX DESORDRES IMMUNITAIRES CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS COMPRENANT LES MALADIES AUTO-IMMUNES, LA TRANSPLANTATION ET L'ALLERGIE. 67
TABLEAU 4. DEVELOPPEMENTS VACCINAUX UTILISANT DES VLP EN DEHORS DE LA PREVENTION OU DU TRAITEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES. D'APRES KUSCHNIR *ET AL. VACCINE* (2012). 124

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu l'ensemble des membres du jury, le Dr Roberto Mallone, le Pr. Marie-Christophe Boissier, le Pr. Christophe Dupont, le Pr. Véronique Godot, le Dr Vincent Dioszeghy et enfin le Dr. Benoit Salomon pour leurs remarques, leur vision critique et leur temps passé à améliorer ce manuscrit.

Merci au Professeur Klatzmann pour m'avoir permis de réaliser ce double cursus, pour son engagement au sein de l'hôpital et du laboratoire, et pour permettre le maintien de structures transversales qui sont à mes yeux des endroits extrêmement précieux pour la recherche.

Ces 4 années de recherches auraient été bien fades sans la présence de mes comparses actuels de bureau : Fabien, Toto, Jamès et Fab Momo, sans oublier Beujam qui nous a quitté pour bénéficier d'une maison de 200m2 à moins de 800 euros par mois. Vous allez vraiment me manquer. Fofo et Karimero, vous n'étiez pas dans le bureau mais votre présence chaque jour était au moins aussi importante que mon premier café de matin. Même s'ils ne sont plus au CERVI aujourd'hui, Paul GR et Charlotte méritent sans aucun doute leur place dans ces remerciements.

Un grand merci aux gens du 4ème étage s'impose, à la fois pour leur écoute quand j'avais envie de râler mais aussi pour leur partage de leurs connaissances en aquariophilie : F(R)ederica, Sophie, Vanessa, Pierre, Valentin, Gwladys, Laura et Océane. Je tiens à saluer les actuels et anciens thésards du CIMI : Raphou, Jordane, Simon et Camille. Vous étiez certes loin du labo mais c'était toujours un plaisir de vous croiser ☺.

Merci aux stagiaires qui m'ont apporté leur aide et à qui j'espère avoir pu donner le goût de la recherche : Anissa Nazimoudine, Wing Yan Yuen et Léa Deltourbe.

Bon courage aux nouveaux Héléna et Adrien, j'espère que le temps que vous passerez dans cette équipe sera aussi enrichissant que le mien.

Merci à toi, Babyfoot du 2ème, pour m'avoir permis de déstresser régulièrement pendant la période d'écriture. Merci à toi aussi, machine Nespresso®, tu as toujours fonctionné dans les moments où j'avais le plus besoin de toi.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel AP-HP, Michelle R, Michelle B, Nathalie, Cornélia et Émilie pour leur bonne humeur et pour les moments passés à vos côtés. Merci à Claude pour ces années d'internat et pour son suivi durant ces années de recherche. Du côté de la recherche, je remercie l'ensemble des chefs d'équipe et ingénieurs du laboratoire : Encarnita, Adrien, Mustapha, Bruno et enfin les nouveaux arrivants Guillaume et Stéphanie. Malgré très peu d'interactions professionnelles en définitive, ce fut un plaisir de travailler à vos côtés.

Merci à l'équipe d'ILTOO Pharma (Jérémie, Dominique et Phuong) pour cette collaboration très enrichissante et pour m'avoir permis de partir présenter mes travaux à l'international.

Petites Balb/C et C57BL/6 de l'animalerie, merci pour votre participation aux résultats de ce manuscrit. J'en profite également pour remercier le personnel de l'animalerie (Bocar, Olivier et Kim tout spécialement) pour leur aide et leur disponibilité.

Merci à mes collègues pharmaciens, qu'ils soient de vrais scientifiques (Dan, Nicolas, Louise, Clarisse et Thaïs) ou non (Tigrou, Antoine et Pierre et tous les autres).

Merci à mes parents et à mes sœurs pour leur soutien et leur patience durant ces 12 longues années d'étude.

A Marine, merci pour tout (ce serait trop long de tout énumérer).

A tous ceux que j'ai oublié, veuillez accepter mes plus plates excuses.

∞ A toi qui un jour m'a dit que je n'étais pas assez intelligent et que je ne pourrais jamais faire d'études supérieures ∞, merci d'avoir déclenché en moi cette volonté de te prouver ton erreur.

Je souhaite clôturer ces remerciements en soulignant l'importance du Professeur Bertrand Bellier dans l'existence de ce manuscrit. Merci pour ta confiance, ton suivi, ton implication et ta motivation dans ce projet. J'ai toujours pu trouver porte ouverte pour discuter professionnellement et personnellement. Et pour moi c'est une qualité essentielle pour gérer une équipe avec brio. C'est avec des regrets que je pars vers d'autres horizons mais surtout avec une expérience inestimable dans un domaine qui m'est cher. Je te souhaite de continuer avec la même excellence et la même implication que ces dernières années. Un grand merci.

Résumé

L'incidence croissante des désordres immunitaires a motivé le développement de nouvelles approches permettant l'induction d'une tolérance immunitaire spécifique et maintenue dans le temps. S'inscrivant dans ce cadre, la vaccination tolérogène exploite les propriétés innées du système immunitaire pour rétablir la tolérance en visant spécifiquement les acteurs majeurs que sont les cellules dendritiques et les lymphocytes T régulateurs. Ce concept se confronte néanmoins à certaines limitations dues au besoin d'apporter l'antigène sous une forme particulière ou de manière combinée avec un signal de tolérance. En exploitant les propriétés natives des pseudo-particules dérivées de rétrovirus, nous avons mis au point une plateforme permettant de répondre à ces problématiques propres à la vaccination tolérogène. Par ce travail de thèse, l'objectif fut de démontrer la faisabilité de cette approche, en produisant et caractérisant des VLP exprimant l'ovalbumine au sein de la capside et présentant des molécules de CTLA-4 à leur surface. Par une étude fonctionnelle sur les cellules dendritiques et sur des cellules présentant une spécificité réactionnelle pour l'ovalbumine, nous avons mis en exergue les propriétés tolérogènes de ces VLP. Ces propriétés ont par la suite été confirmées dans un modèle d'allergie alimentaire induite à l'ovalbumine chez la souris. Les résultats obtenus démontrent pour la première fois que ces VLP tolérogènes permettent le contrôle de l'allergie alimentaire de manière spécifique et à long terme et fournissent la preuve de concept de leur utilisation. Les travaux entrepris permettent d'autre part d'envisager l'utilisation de ces particules dans d'autres champs d'application et notamment les maladies auto-immunes.

Mots clés : Immunothérapie – Tolérance – Pseudo-particules rétrovirales - Allergie

Abstract

The increasing incidence of immune disorders has motivated the development of innovative approaches allowing the induction of a specific and long-lasting immune tolerance. Tolerogenic vaccination stands as one of those new therapies and exploits the innate properties of the immune system to restore tolerance by specifically targeting major players such as dendritic cells and regulatory T cells. Nevertheless, this concept faces certain limitations due to the need to provide the antigen in a particular form or in combination with a tolerance signal. By exploiting the native properties of pseudo-particles derived from retroviruses, we have developed a platform to answer those needs. With this thesis research, the objective was to highlight the feasibility of this approach by producing and characterizing VLPs expressing ovalbumin within the capsid and presenting CTLA-4 molecules on their surface. By functional studies on dendritic cells and on ovalbumin specific T cells, we highlight the tolerogenic properties of these VLPs. These properties were subsequently confirmed in a model of ovalbumin-induced food allergy in mice. The obtained results demonstrate for the first time that these tolerogenic VLPs allow the control of food allergy in a specific and long-lasting manner, thus supporting the proof of concept of their use. Additional work also makes it possible to consider the use of these particles in other fields of application and in particular autoimmune diseases.