



HAL
open science

Optimisation de l'immunothérapie IL-2 faible dose par combinaison avec l'antigène : effets biologiques sur les Treg spécifiques et potentiel thérapeutique dans un modèle d'allergie alimentaire

Helena Moguel-Houssin

► **To cite this version:**

Helena Moguel-Houssin. Optimisation de l'immunothérapie IL-2 faible dose par combinaison avec l'antigène : effets biologiques sur les Treg spécifiques et potentiel thérapeutique dans un modèle d'allergie alimentaire. Immunologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS338 . tel-03699578

HAL Id: tel-03699578

<https://theses.hal.science/tel-03699578>

Submitted on 20 Jun 2022

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 i³ -Immunologie, Immunopathologie, Immunothérapie

Sorbonne Université / INSERM UMRS 959

Optimisation de l'immunothérapie IL-2 faible dose par combinaison avec l'antigène : effets biologiques sur les Treg spécifiques et potentiel thérapeutique dans un modèle d'allergie alimentaire

Par Helena MOGUEL-HOUSSIN

Thèse de doctorat de Biologie

Spécialité Immunologie

Dirigée par le Professeur Bertrand Bellier

Présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 2021

Devant un jury composé de :

Président : Dr Guillaume Dorotheé

Rapportrices : Pr Natacha Bessis

Dr Nabila Seddiki

Examineurs : Dr Pierre-Louis Hervé

Dr Laurent Mascarell

Directeur de Thèse : Pr Bertrand Bellier

A mes parents

“Pour ce qui est de l'avenir, il ne s'agit pas de le prévoir, mais de le rendre possible.”

Antoine de Saint-Exupéry

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
TABLE DES FIGURES	4
TABLE DES TABLEAUX	5
LISTE D'ABBREVIATIONS.....	6
RESUME.....	8
ABSTRACT	9
PREAMBULE.....	10
PARTIE I : LES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS : DÉCOUVERTE ET CARACTÉRISATION.....	13
A. Découverte et caractérisation des lymphocytes T régulateurs.....	13
1. Thymectomies, greffes et irradiations ouvrent la voie de la découverte des lymphocytes T régulateurs	13
2. Identification de CD25 comme marqueur des Treg et rôle de l'IL-2	14
3. Identification de FOXP3 comme marqueur spécifique des Treg.....	17
4. Autres marqueurs importants pour l'identification, l'homéostasie et la fonction des Treg	18
B. Complexité du compartiment T régulateur : Sous populations suppressives, origines et plasticité cellulaire	22
1. Lymphocytes T régulateurs FOXP3 ⁺ : tTreg et pTreg.....	22
2. Tr1 et Th3, cellules régulatrices FOXP3 ⁻	26
3. Plasticité des Treg FOXP3 ⁺	27
C. Mécanismes de suppression.....	30
PARTIE 2 : IMPLICATION DES TREG DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES IMMUNOPATHOLOGIES ET LEUR TRAITEMENT.....	37
A. Défauts génétiques chez les Treg et développement de désordres immunitaires	37
B. Treg et les maladies auto-immunes multifactorielles	38
C. Treg et maladies allergiques	39

1.	Allergies IgE-dépendantes ou hypersensibilités de type 1	39
2.	Implication des Treg dans les maladies allergiques.....	41
D.	Outils ou cibles thérapeutiques, les Treg dans le traitement des désordres immunitaires	45
1.	Ciblage pharmacologique des Treg	45
2.	Les thérapies cellulaires : transfert de Treg	52
PARTIE 3 : RÔLE DE LA SPÉCIFICITÉ ANTIGÉNIQUE DES TREG DANS LE CONTRÔLE DES RÉPONSES IMMUNITAIRES.....		55
A.	Impact du signal TCR sur le phénotype et la fonction des Treg	55
B.	La spécificité des Treg dans les immunopathologies et immunothérapies	57
C.	Treg antigène-spécifiques vs Treg polyclonaux.....	61
OBJECTIFS.....		69
RESULTATS		73
A.	Preuve de concept de l'utilisation de la combothérapie IL-2 faible dose et antigène pour optimiser le recrutement des Treg spécifiques et potentiel thérapeutique dans l'allergie alimentaire.....	73
B.	Modifications des modalités d'administration de la combothérapie (voie orale et ajout de rapamycine) : Effet sur l'expansion des Treg spécifiques de l'antigène et potentiel thérapeutique.....	99
DISCUSSION.....		107
A.	Association de l'IL-2 faible dose et de l'antigène comme une stratégie innovante pour favoriser les Treg spécifiques	107
1.	Influence de la cinétique d'administration.....	108
2.	Effet de l'association et avantages thérapeutiques.....	109
3.	Limites des modèles utilisés	110
B.	Mécanismes immunologiques associés à l'effet thérapeutique de la combothérapie IL-2+antigène dans l'allergie alimentaire.....	111
1.	Impact de la combothérapie sur le rapport de forces entre Treg et Tconv spécifiques.....	112
2.	Impact de la combothérapie sur la biologie des Tconv.....	113

3.	Impact de la combothérapie sur la biologie des Treg	115
C.	Association de l'IL-2 faible dose et de l'antigène comme stratégie thérapeutique.....	117
1.	Risques liés à la réintroduction de l'antigène	117
2.	Optimisations possibles	118
D.	Perspectives de développement clinique	125
	CONCLUSION	126
	COMMUNICATION/MÉDIATION SCIENTIFIQUE	127
A.	Vis Ma Vie De Chercheur (VMVDC).....	127
B.	Ma Thèse en 180 secondes (MT180)	128
C.	Autres communications	129
	BIBLIOGRAPHIE	130

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Les Treg et les T effecteurs ont des sensibilités différentes à l'IL-2.....	16
Figure 2. L'intensité du signal TCR détermine l'élimination des thymocytes ou bien leur différenciation en Tconv ou Treg (inspirée de Klein <i>et al.</i> , 2019).	24
Figure 3. Plasticité et instabilité du compartiment Treg.	29
Figure 4. Différents mécanismes de suppression des Treg (adapté de Meng <i>et al.</i> , 2016).....	31
Figure 5. Différents modes d'action de l'IL-10.....	33
Figure 6. Suppression des cellules effectrices par les Treg dans le cadre de maladies allergiques.	34
Figure 7. Phase de sensibilisation.	40
Figure 8. Phase effectrice.	42
Figure 9. Etude du rôle de l'affinité du TCR des Treg dans la protection contre le DT1.....	56
Figure 10. Différentes stratégies d'administration testées.	74
Figure 11. Schéma expérimental du protocole d'induction de l'allergie alimentaire.	75
Figure 12. Effet de la voie et la dose d'administration de la combothérapie (stratégie J-3) sur les Treg et Tconv spécifiques.....	100
Figure 13. Optimisation de la combothérapie par ajout d'adjuvant, répétition d'administration de l'antigène et changement de voie d'administration : Effets sur les Treg et Tconv spécifiques.	101
Figure 14. La combinaison IL-2+OVA avec administration quotidienne de l'antigène administrée par voie orale peut conduire à l'aggravation de l'allergie alimentaire, mais l'ajout de rapamycine permet de contrôler cette aggravation.....	103
Figure 15. Différentes cinétiques d'administration possibles.	108

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Marqueurs associés à l'activation et la fonction exprimés par les Treg murins et humains (adapté de X. Chen & Oppenheim, 2011 et Roth-Walter <i>et al.</i> , 2021 ; Tang <i>et al.</i> , 2003)	19
Tableau 2 : Essais cliniques terminés ou en cours testant l'administration de l'IL-2 faible dose dans des maladies auto-immunes et allergiques (date de recherche: 04/10/2021 répertoriés sur clinicaltrials.gov).....	49
Tableau 3. Études précliniques montrant la plus grande efficacité suppressive des Treg antigène-spécifiques dans le contrôle de différentes maladies auto-immunes et inflammatoires (modifié à partir de Selck & Dominguez-Villar, 2021)	64

LISTE D'ABBREVIATIONS

ADP : Adénosine diphosphate	GITRL : Ligand de GITR
AIRE : Facteur de transcription gouvernant la régulation de l'expression d'ARN des cellules thymiques (Auto-immune regulator gene)	GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor)
Alun : Gel d'hydroxide d'aluminium	GVH : Maladie du greffon contre l'hôte
AMP : Adénosine monophosphate	GWAS : Genome-wide association studies
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	GzmB : Granzyme B
ARTE : Antigen-Reactive T cell Enrichment	HLA : Antigènes des leucocytes humains (Human leukocyte antigens)
ATP : Adénosine triphosphate	ICOS : Inducible T cell costimulator
ATRA : Acide tout-trans rétinolique (all-trans retinoic acid)	ICOSL : Ligand de ICOS
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase
CAR T : Cellules T exprimant un récepteur chimérique de l'antigène (Chimeric antigen receptor T)	IFN-γ : Interféron γ
CCR7 : Récepteur de chimiokine à motif C-C de type 7 (C-C Chemokines receptor type 7)	IgE : Immunoglobuline E
CDK : Kinases cycline-dépendantes	IgG : Immunoglobuline G
CIA : Modèle d'arthrite induite par le collagène (Collagen induced arthritis)	IL- : Interleukine
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	IL-2fd : Interleukine 2 faible dose
CNS : Séquence conservée non codante (Conserved noncoding sequence)	ILC2 : Cellules lymphoïdes innées
COVID-19 : Maladie à coronavirus 2019	IP : Intrapéritonéale
CREB : C-AMP Response Element-binding protein	IPEX : Syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4	IRF4 : Facteur 4 régulateur de l'interféron (Interferon regulatory factor 4)
DC : Cellule dendritique	iTreg : Treg induit
DT1 : Diabète de type 1	ITS : Immunothérapie spécifique
EAE : Encéphalomyélite expérimentale auto-immune	IV : Intraveineuse
EPIT : Immunothérapie épicutanée	LACK : <i>Leishmania</i> homolog of receptors for activated c kinase
Fab : Région variable des Immunoglobulines	LAG3 : Lymphocyte-activation gene 3
FasL : Ligand de Fas	LAP : Latency-associated peptide
Fc : Fragment constant des immunoglobulines	LES : Lupus érythémateux systémique
FOXP3 : Forkhead box P3	LFA-1 : Leukocyte function-associated antigen-1 Lin
GARP : Glycoprotein A repetitions predominant	LP : Lamina propria
GFP : Green fluorescent protein	LPS : Lipopolysaccharides
GITR : Glucocorticoid-induced TNFR-related protein	LRBA : Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein

NK : Natural Killer
NOD : Souris Non Obese Diabetic
Nrp-1 : Neurophiline 1
OIT : Immunothérapie spécifique par voie orale
OVA : Ovalbumine
OX40L : Ligand de OX4
PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique
PD-1 : Programmed cell death 1
PLGA : Poly-acide lactique-co-glycolique (Poly lactic-co-glycolic acid)
pSTAT-5: STAT-5 phosphorylé
pTreg : Treg périphérique
polyTreg : Treg polyclonaux
RALDH : Retinaldehyde dehydrogenase
ROR γ t : RAR-related orphan receptor g
SCIT : Immunothérapie spécifique par voie sous cutanée
SEP: Sclérose en plaque
SLIT : Immunothérapie spécifique par voie sublinguale
SNP : Polymorphisme nucléotidique (Single nucleotide polymorphism)

STAT-5: Signal transducer and activator of transcription 5
sTreg: Treg spécifiques
T-bet : T-box expressed in T cells
Tconv : Lymphocytes T conventionnels
TCR : Récepteur des lymphocytes T (T cell receptor)
Teff : Lymphocytes T effecteurs
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
Th : T helper
TLR-4 : Toll-like receptor 4
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFR : Récepteur au TNF
Tr1 : Cellules T régulatrices de type 1
TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
TSDR : Treg-specific demethylation region
TSLP : lymphopoïétine stromale thymique (Thymic stromal-derived lymphopoietin)
tTreg : Treg thymique
VLP : Pseudo particule Virale (Viral like particle)

RESUME

Les maladies allergiques concernent environ 20% de la population des pays industrialisés. L'augmentation de leur incidence au cours des dernières décennies et l'absence de traitement curatif fiable ont motivé le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Mon équipe a récemment montré le potentiel thérapeutique de l'IL-2 faible dose dans des modèles murins d'allergie alimentaire. Cette immunothérapie permet l'amplification du nombre et de la fonction des Treg, cellules essentielles pour le maintien de l'homéostasie immunitaire. Afin de renforcer l'induction d'une tolérance immunitaire spécifique pour une protection améliorée, nous avons décidé de renforcer l'amplification et le recrutement des Treg spécifiques de l'antigène en associant l'IL-2 avec ce dernier. Les objectifs de ce travail de thèse furent de trouver les modalités d'administration (dose, cinétique, voie d'administration) de la combinaison de l'IL-2+antigène qui favorisent le compartiment Treg spécifique sans stimuler les Tconv spécifiques. L'utilisation d'un modèle de transfert adoptif a permis l'identification d'un protocole d'administration qui répondait à ces critères. Le potentiel thérapeutique ainsi que l'effet sur les Treg et Tconv spécifiques de l'antigène dans un environnement inflammatoire ont été évalués dans un modèle d'allergie alimentaire induite à l'ovalbumine chez la souris. De plus, des analyses phénotypiques *in vitro* ont permis de mieux caractériser l'impact de l'association IL-2 et antigène sur la biologie des Treg spécifiques. Les résultats obtenus démontrent que la combothérapie IL-2 faible dose combinée à l'antigène permet l'amplification et le recrutement de Treg spécifiques de l'antigène *in vivo*. De plus, la combothérapie permet d'induire une protection immédiate contre les manifestations sévères de l'allergie alimentaire. Cela représente une réelle optimisation par rapport à l'IL-2 faible dose seule, où la protection contre l'allergie alimentaire se met pas en place plus tardivement. Des modifications supplémentaires du protocole d'administration de la combothérapie permettraient d'augmenter la protection observée en améliorant le recrutement des Treg spécifiques au niveau des sites inflammatoires. Outre les maladies allergiques, cette combothérapie pourrait se révéler intéressante dans le traitement d'autres désordres immunitaires tels que les maladies auto-immunes.

Mots-clés : Treg spécifiques, IL-2 faible dose, antigène, immunothérapie, allergie alimentaire

ABSTRACT

Allergic diseases affect about 20% of the population in Westernized countries. The increase in their incidence over the last decades and the lack of reliable curative treatment have prompted the development of new therapeutic approaches. My team has recently demonstrated the therapeutic potential of low-dose IL-2 (ld-IL2) in a food allergy mouse model. This immunotherapy increases the number and function of Tregs, which are essential for the maintenance of immune homeostasis. In order to enhance the induction of a specific immune tolerance for improved protection, we decided to boost the expansion and recruitment of antigen-specific Tregs by combining ld-IL2 and antigen. The goal of this thesis work was to find the administration modalities (dose, kinetics, route of administration) of the IL-2 + antigen combotherapy that promote the antigen-specific Tregs without stimulating the antigen-specific Tconv. The use of an adoptive transfer model allowed the identification of an administration protocol that met these criteria. The therapeutic potential as well as the effect on antigen-specific Treg and Tconv in an inflammatory environment was evaluated in a mouse model of ovalbumin-induced food allergy. In addition, *in vitro* phenotypic analyses allowed to characterize the impact of the IL-2+antigen association on the biology of specific Treg. The results obtained demonstrate that low-dose IL-2 combined with antigen boost the numbers and recruitment of antigen-specific Treg *in vivo*. Moreover, the combotherapy induces an immediate protection against the severe manifestations of food allergy. This represents a real optimization compared to low-dose IL-2 alone, as protection against food allergy develop after several cycles of antigen challenges. Further modifications of the administration protocol of the combotherapy could enhance early protection by improving the recruitment of antigen-specific Tregs to inflammatory sites. In addition to allergic diseases, this combotherapy could prove interesting in the treatment of other immune disorders such as autoimmune diseases.

Keywords: antigen-specific Tregs, low-dose IL-2, antigen, immunotherapy, food allergy

PREAMBULE

Pour assurer la protection de l'hôte et le maintien de l'homéostasie, le système immunitaire doit être en mesure de réagir face à différents antigènes pathogènes. Il doit également être capable de contrôler et mettre fin aux réponses inflammatoires, et d'empêcher les réponses aberrantes envers les antigènes du soi et du non soi non dangereux en modulant les cellules effectrices. Plusieurs mécanismes de régulation permettent de maintenir l'intégrité de l'hôte : la tolérance centrale, qui permet l'élimination de clones auto-réactifs potentiellement pathogènes, et la tolérance périphérique, qui permet le contrôle des clones auto-réactifs ayant échappés à la délétion clonale ainsi que la régulation des réponses envers les antigènes du non soi. Des défauts dans ces mécanismes de régulation sont associés au développement d'immunopathologies comme les maladies allergiques et auto-immunes, caractérisées par des réponses aberrantes envers des antigènes du non soi et du soi, respectivement.

Les Treg font partie des mécanismes de régulation du système immunitaire. Ils contrôlent les réponses immunitaires et assurent le maintien de la tolérance immunitaire en agissant sur les divers acteurs impliqués. Ainsi, ils sont devenus la cible de plusieurs stratégies thérapeutiques visant à traiter les désordres immunitaires.

Introduction

PARTIE I : LES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS : DÉCOUVERTE ET CARACTÉRISATION

Cette première partie est consacrée à la présentation des lymphocytes T régulateurs (Treg), cibles de la thérapie à l'interleukine 2 (IL-2) faible dose (fd). À travers une approche historique, nous nous intéresserons à comment la caractérisation des Treg a permis une meilleure compréhension de leur biologie et de la complexité de ce compartiment cellulaire. Finalement, nous nous intéresserons également aux mécanismes de suppression utilisés par les Treg afin de réguler les réponses immunitaires, et particulièrement les réponses allergiques. Ceci permettra d'introduire le rôle clé que jouent les Treg dans la physiopathologie des immunopathologies telles que les maladies allergiques et auto-immunes, qui sera abordé dans la deuxième partie de cette thèse.

A. Découverte et caractérisation des lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une sous-population de lymphocytes T (LT) CD4⁺ possédant une activité immunosuppressive. Ils représentent entre 5 et 10% des LT CD4⁺ présents dans le sang périphérique humain et jouent un rôle majeur dans la régulation de réponses auto-immunes, allergiques et inflammatoires. Si aujourd'hui le rôle clé des lymphocytes T régulateurs dans le maintien de la tolérance et l'homéostasie au sein du système immunitaire est clairement démontré, il y a 60 ans, leur existence commençait à peine à être soupçonnée.

1. Thymectomies, greffes et irradiations ouvrent la voie de la découverte des lymphocytes T régulateurs

En 1962, Miller ouvre la voie de leur découverte en montrant l'importance du thymus dans la mise en place de la tolérance au soi. En effet, il remarque qu'une thymectomie, réalisée chez des souris nouveau-nées, provoque leur mort après une dégradation rapide de leur état (Miller, 1962). Curieusement, il observe que les souris, thymectomisées entre 1 et 3 semaines après leur naissance, développaient rarement ce syndrome. Nous savons aujourd'hui que l'ablation précoce du thymus, principal lieu de développement des Treg, conduit à leur élimination avant qu'ils aient pu atteindre la périphérie et entraîne le développement des manifestations auto-immunes graves. Néanmoins, ce n'est que dans les années 70 que Gershon

propose le concept de « cellules T suppressives » à la suite de ses travaux sur le rôle des lymphocytes thymiques dans l'induction de tolérance. Il met en évidence que les cellules T sont capables non seulement d'amplifier les réponses immunitaires, mais aussi de les diminuer (Gershon, 1975; Gershon & Kondo, 1970).

Le rôle central du thymus dans la tolérance au soi montré par Miller est confirmé par plusieurs équipes qui montrent qu'une thymectomie néonatale conduit effectivement au développement de différentes manifestations auto-immunes chez la souris, souvent caractérisées par une inflammation tissulaire et la production d'auto-anticorps (Kojima & Prehn, 1981; Taguchi & Nishizuka, 1981). Entre 1973 et 1993, Penhale montre que la thymectomie et l'irradiation totale chez le rat adulte mènent aussi à des manifestations auto-immunes telles qu'une thyroïdite auto-immune (Penhale *et al.*, 1973) ou le diabète de type 1 (Fowell & Mason, 1993; Penhale *et al.*, 1990). À la lumière des connaissances actuelles, nous savons que chez les animaux adultes, la plupart des Treg issus du thymus se trouve déjà en périphérie. Cependant, ils sont plus radiosensibles que les autres lymphocytes T. La combinaison de ces deux méthodes permet leur élimination et conduit au déclenchement des manifestations auto-immunes.

Des expériences de transferts adoptifs renforcent l'hypothèse selon laquelle des cellules T aux capacités suppressives se développent dans le thymus. Ces expériences montrent qu'il est possible d'inhiber le développement des manifestations auto-immunes chez le rat et la souris en injectant des splénocytes ou des thymocytes issues d'animaux syngéniques normaux (Fowell & Mason, 1993; Penhale *et al.*, 1976; Sakaguchi *et al.*, 1982). Ainsi, l'ensemble de résultats permet d'affirmer l'existence de cellules régulatrices qui se développent dans le thymus et conservent leur fonction suppressive en périphérie. Cette population possède la capacité de prévenir et contrôler les manifestations auto-immunes. Cependant, aucun marqueur ne permettait de la distinguer spécifiquement des autres lymphocytes T CD4⁺.

2. Identification de CD25 comme marqueur des Treg et rôle de l'IL-2

Pour mieux étudier cette population CD4⁺ aux propriétés régulatrices, les recherches se sont concentrées sur l'identification de nouveaux marqueurs de surface spécifiques. Sakaguchi et son équipe ont grandement contribué à leur découverte. En 1995, ils proposent la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) comme marqueur spécifique. Cette population T CD4⁺CD25⁺ représente 10% des LT CD4⁺ périphériques et < 1% des LT CD8⁺ chez une souris BALB/c normale (Sakaguchi *et al.*, 1995). Le transfert de LT CD4⁺CD25⁻ à des souris BALB/c nude athymiques induit des maladies auto-immunes. En revanche, la reconstitution avec T

CD4⁺CD25⁺ 10 jours après le transfert de LT CD4⁺CD25⁻ empêche le développement des manifestations auto-immunes de manière dose-dépendante (Sakaguchi *et al.*, 1995). L'année suivante, l'équipe de Sakaguchi montre que ces LT CD4⁺CD25⁺ sont retrouvés en périphérie qu'à partir du troisième jour après la naissance, ce qui explique l'induction de manifestations auto-immunes après une thymectomie néonatale à J+3 après la naissance. Ces manifestations auto-immunes sont par ailleurs évitées si un transfert de Treg CD4⁺CD25⁺ issus de souris normales est réalisé juste après la thymectomie néonatale (Asano *et al.*, 1996).

L'identification de CD25 a permis de découvrir que le récepteur de forte affinité à l'IL-2 (composé de CD25, CD122 et CD132) est essentiel pour leur survie et la fonction des Treg. Les souris adultes CD25^{-/-}, développent une splénomégalie et une adénomégalie accompagnées des désordres auto-immuns (Willerford *et al.*, 1995). Dans des chimères reconstituées avec la moelle osseuse issue de souris CD25^{-/-} ou IL-2^{-/-}, le transfert de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ empêche l'hypertrophie des organes lymphoïdes et les manifestations auto-immunes (Almeida *et al.*, 2002). L'ensemble de ces résultats montre le rôle crucial de la signalisation IL-2 dans la biologie des Treg.

L'IL-2 est une cytokine de 15 000 kDa, à faible demi-vie (3-5 heures) produite principalement par les LT CD4⁺ activés, et dans une moindre mesure par les LT CD8⁺, les DC activées, les NK, les NKT et les mastocytes (Liao *et al.*, 2013). Le récepteur à l'IL-2 est un récepteur membranaire d'affinité intermédiaire ($K_d = 10^{-9}$ M) composé d'une sous-unité β (CD122) et une γ (CD132). Le récepteur de haute affinité ($K_d = 10^{-11}$ M) est composé des sous-unités $\beta\gamma$ et de la sous-unité α (CD25) (X. Wang *et al.*, 2005). Les Treg expriment constitutivement le récepteur trimérique de haute affinité. L'expression de la sous-unité α , est induite après activation chez les T effecteurs, les cellules B activées et les monocytes. Néanmoins, les Treg sont plus sensibles à l'IL-2 que les T effecteurs (Figure 1) : *in vitro*, une faible dose d'IL-2 (1 IU/mL) est capable d'induire un fort taux de phosphorylation de STAT5 chez les Treg mais pas chez les T effecteurs (Figure 1b) (Klatzmann & Abbas, 2015; Liao *et al.*, 2013).

La fixation de l'IL-2 sur son récepteur induit la phosphorylation de STAT-5 ainsi que l'activation de la voie des MAP kinases et de la voie Akt (Figure 1). Cela permet l'activation de nombreux gènes importants pour la survie, la différenciation et l'expansion des lymphocytes T activés tels que *Lta*, *Il24*, *Socs2*, *Cdk6* et *Bcl2* (Churlaud *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2013). Chez les Treg, l'IL-2 induit l'expression de Bcl-2 et Mcl-1 qui favorise leur survie (Toomer *et al.*, 2019).

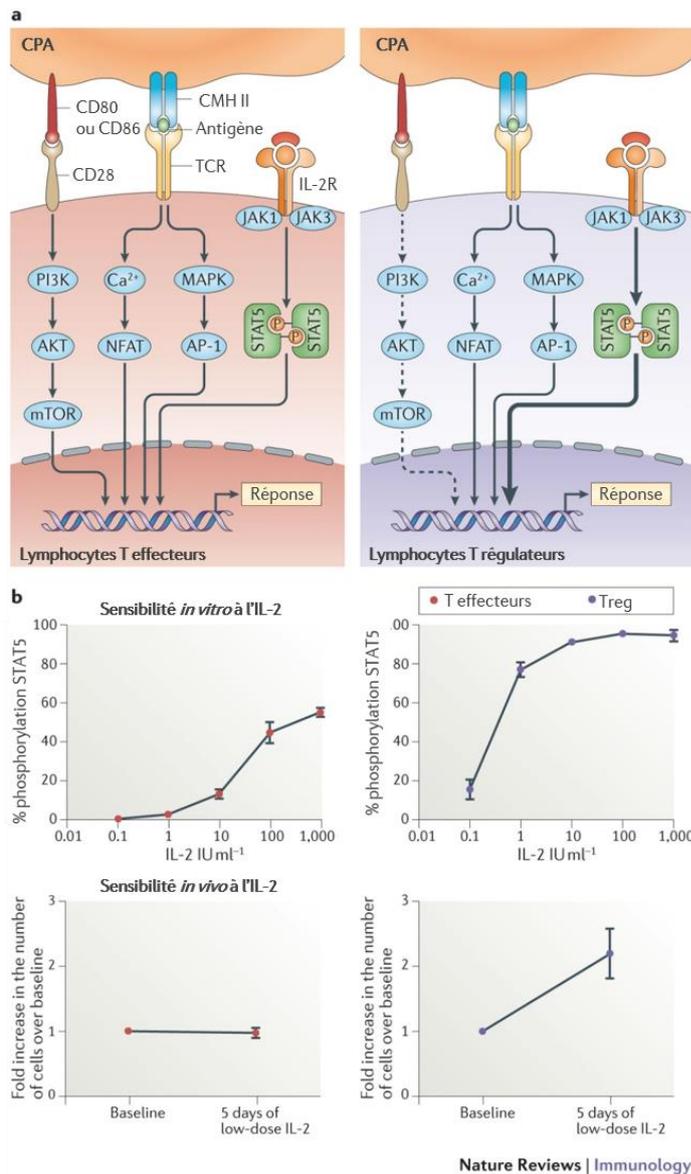


Figure 1. Les Treg et les T effecteurs ont des sensibilités différentes à l'IL-2.
 a) L'activation des cellules T effectrices et des Treg nécessite la combinaison des voies de signalisation du TCR et les molécules de costimulation telles que CD28, ainsi que la signalisation du récepteur à l'interleukine-2 (IL-2R). À différence des T effecteurs, les Treg sont plus sensibles à l'IL-2, répondant ainsi à de faibles doses d'IL-2. L'activation des Treg repose donc principalement sur la signalisation induite par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur (IL-2R) et de la phosphorylation de STAT-5 plutôt que de la signalisation induite par le TCR et les molécules de costimulation. b) Cette différence de sensibilité est confirmée par un taux important de phosphorylation de STAT5 chez les Treg à la suite d'une stimulation avec de faibles doses d'IL-2 *in vitro*, et une augmentation de leur nombre *in vivo*, ce qui n'est pas le cas pour les T effecteurs. D'après Klatzmann et Abbas (Klatzmann & Abbas, 2015)

L'IL-2 est également importante pour la fonction des Treg : les Treg des souris IL-2 β ^{-/-} expriment plus faiblement CD25, CTLA-4, GITR et CD103 comparés aux Treg de souris sauvages (Chinen *et al.*, 2016). De même, CD25 joue un rôle important dans la capacité suppressive des Treg en leur permettant de capturer l'IL-2 et d'appauvrir le milieu au détriment des Teff (Chinen *et al.*, 2016). Ce rôle sera discuté dans la partie dédiée aux mécanismes suppresseurs.

Ainsi, CD25 est un élément essentiel dans le développement et la fonction des Treg en plus d'être un marqueur permettant d'identifier les Treg. Néanmoins, il n'est pas exclusif aux Treg puisque les lymphocytes T conventionnels (Tconv) l'expriment aussi après activation. Malgré tout, il restera pendant près de 10 ans le seul marqueur disponible pour discriminer ces

populations, exploitant les différences de niveau et de persistance de l'expression de CD25 entre les Tconv et les Treg (Kuniyasu *et al.*, 2000). Ainsi, les fractions cellulaires identifiées comme étant des Treg pour leur statut CD25⁺ étaient probablement contaminées par des Tconv activés. Cela a conduit par le passé (et même encore aujourd'hui), à l'obtention de résultats contradictoires particulièrement lors de l'étude des capacités suppressives de ces cellules dans un contexte inflammatoire, plus susceptible de contenir des Tconv activés CD25⁺.

3. Identification de FOXP3 comme marqueur spécifique des Treg

Au début des années 2000, Brunkow *et al.* identifient le gène défectueux, responsable des atteintes auto-immunes multi-organes et de la mort précoce des souris Scurfy : *Foxp3*, un facteur de transcription intranucléaire (Brunkow *et al.*, 2001). Les similitudes entre les souris Scurfy et les patients atteints du syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X (IPEX) poussent des chercheurs à investiguer si des mutations du gène humain *Foxp3* sont responsables du syndrome IPEX. Leur hypothèse est vérifiée lors de la découverte de plusieurs mutations de *Foxp3* chez des patients IPEX (Bennett *et al.*, 2001).

Les ressemblances entre les manifestations auto-immunes des souris Scurfy et celles induites par la déplétion de LT CD4⁺CD25⁺ amènent les équipes de Sakaguchi et Rudensky à faire le lien entre *Foxp3* et les Treg CD25⁺. Ils montrent que FOXP3 est exprimé spécifiquement par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ et qu'il est essentiel à leur développement (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003). L'introduction d'un vecteur rétroviral *Foxp3* chez des LT CD4⁺ naïfs de souris induit, dans leurs expériences, un phénotype T régulateur similaire à celui retrouvé chez les Treg naturels (Hori *et al.*, 2003). Mais ces résultats n'ont pas toujours pu être reproduits et notamment à partir de cellules humaines (Ziegler, 2006).

Foxp3 est considéré le « gène maître » qui contrôle la transcription des gènes impliqués dans le développement, l'homéostasie et la fonction des Treg. Les modifications épigénétiques des séquences régulatrices du locus *Foxp3* jouent un rôle clé dans l'engagement des cellules vers le phénotype Treg et la stabilité du phénotype. Outre le promoteur de *Foxp3*, des régions conservées non codantes ou CNS (« Conserved Non-coding Sequences », en anglais) sont la cible de ces modifications (Zheng *et al.*, 2010). Le CNS2 est fortement enrichi en motifs CpG et la déméthylation de ces motifs est associée à une meilleure stabilité du phénotype Treg. Par ailleurs, la liaison de facteurs de transcription CREB et pSTAT5 au CNS2 est indispensable pour l'induction de FOXP3. Ces facteurs sont activés à la suite de la stimulation du TCR ou du

récepteur à l'IL-2, respectivement, soulignant l'importance de l'antigène et de l'IL-2 pour le phénotype Treg (Zheng *et al.*, 2010). La phosphorylation de STAT-5 est particulièrement importante pour la stabilité des Treg, elle contribue à la déméthylation du CNS2 et ainsi à la stabilité de son expression même lors de conditions inflammatoires (Feng *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, FOXP3 est considéré comme le meilleur marqueur pour identifier les Treg chez la souris. Chez l'humain, les limites de l'utilisation de FOXP3 comme seul marqueur pour discriminer les Treg des Tconv ont été soulevées. Des études ont montré que les Tconv humains pouvaient exprimer FOXP3 (sous forme protéique ou ARNm) après stimulation sans pour autant acquérir des capacités suppressives (Morgan *et al.*, 2005; J. Wang *et al.*, 2007). Cela ne semble pas être le cas chez la souris. En outre, trois sous-populations ont été caractérisées parmi les cellules FOXP3⁺ humaines : des Treg activés (CD45RA⁻FOXP3^{hi}) et au repos (CD45RA⁺FOXP3^{lo}), mais aussi une population T CD4⁺CD45RA⁻ non suppressive exprimant faiblement FOXP3 (FOXP3^{lo}) (Miyara *et al.*, 2011). De plus, il existe des populations de LT FOXP3⁻ possédant des capacités suppressives aussi bien chez l'humain que chez la souris (*cf.* Partie I. C. Complexité du compartiment T régulateur).

Néanmoins, FOXP3 reste le marqueur le plus adapté et utilisé pour définir les Treg chez les humains. Aujourd'hui, l'utilisation de marqueurs complémentaires permet une meilleure discrimination entre les Treg et les Tconv humains, dont CD127, la chaîne α du récepteur à l'IL-7. Cette molécule est faiblement exprimée par les Treg humains et murins. Son expression est d'ailleurs inversement corrélée à l'expression de FOXP3 et aux capacités suppressives des Treg. CD127 permet de distinguer, chez l'humain, les Treg (CD127⁻) des T activés qui expriment CD25 et FOXP3 transitoirement, mais sont CD127⁺ (Liu *et al.*, 2006; Seddiki *et al.*, 2006). Étant exprimé à la surface, CD127 est également utile pour identifier les Treg (CD25⁺CD127⁻) sans avoir recours à la perméabilisation des cellules, autrement nécessaire pour analyser l'expression de FOXP3 qui est en intranucléaire. Cependant, la combinaison des 3 marqueurs CD25, CD127 et FOXP3 restent la meilleure stratégie actuelle pour identifier les Treg humains.

4. Autres marqueurs importants pour l'identification, l'homéostasie et la fonction des Treg

Aujourd'hui, les Treg sont définis comme étant des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (CD127⁻ pour les humains). D'autres marqueurs, dont des marqueurs d'activation, se sont ajoutés pour mieux caractériser les Treg et définir des sous-populations au sein de ce compartiment (Tableau 1). L'ensemble de ces marqueurs participe au

développement, la survie, la stabilité et la fonction suppressive des Treg. La co-expression de certains d'entre eux permet de distinguer des sous-populations de Treg fortement suppressives. Cependant, bien qu'une fraction des Treg puisse les exprimer à l'état basal, à l'instar de CD25, ils sont également exprimés par les Tconv activés. Ils ne peuvent pas tous être utilisés seuls pour discriminer les Treg des Tconv.

Tableau 1: Marqueurs associés à l'activation et la fonction exprimés par les Treg murins et humains (adapté de X. Chen & Oppenheim, 2011 et Roth-Walter *et al.*, 2021 ; Tang *et al.*, 2003)

Marqueurs	Treg murins	Treg humains	Fonction/Commentaire
	Surface		
CD25	+ Expression ↑ suite à l'activation	Fort	Homéostasie, activation, fonction suppressive
CD39	+ Exprimé par la majorité des Treg Expression ↑ modérément suite à une stimulation TCR <i>in vitro</i>	+ Exprimé par 60% des Treg	Activité suppressive : Hydrolyse ATP en ADP et AMP
CD73	+ Exprimé par les Treg supresseurs	+ Exprimé par les Treg supresseurs	Activité suppressive : Dégrade l'AMP en adénosine
CD103	+ Exprimé par les Treg effecteurs/mémoire ayant le potentiel de produire de l'IL-10 (marqueur des Treg de la peau et des muqueuses)	Faible Expression peut ↑ pendant des réponses inflammatoires ou en présence de TGF-β	Migration (chaîne α de l'intégrine αβ7)
CD127	-/faible Expression peut ↑ suite à une stimulation TCR	-/faible	Permet la distinction avec les Tconv (CD127 ⁺)
CTLA-4 (CD152)	+ (constitutivement exprimé) Expression ↑ suite à une stimulation TCR	+ Exprimé constitutivement	Activité suppressive : Interagit avec CD80/CD86 et bloque l'activation des DC
GARP	+/fort Exprimé fortement par les Treg activés	+ Exprimé par les Treg activés très supresseurs	Lié au complexe TGF-β latent
GITR (CD357)	+ Exprimé par différentes sous-populations de Treg et Tr1	+ Exprimé par les Treg activés/mémoire	Favorise la différenciation et l'expansion des Treg
ICOS	+ Exprimé fortement par les Treg activés hautement suppressifs	+ Exprimé par les Treg mémoire. Les Treg ICOS ⁺ produisent de l'IL-10 et expriment du TGFβ membranaire	Impliqué dans la stabilité et la survie des Treg

LAG3 (CD223)	+	+	+	Également exprimé par les Tr1
	Exprimé sur les Treg activés par un signal TCR	Exprimé constitutivement par ~3% des Treg circulants, son expression est augmentée après activation chez les patients atteints de tumeurs (Treg hautement suppresseurs)		
LAP	+	+	+	Également exprimé par les Th3
	Exprimé à la surface d'une sous-population Treg activés	Exprimé à la surface d'une sous-population Treg activés		
Neuropiline 1 (Nrp-1)			-	Utilisé en association avec Helios pour différencier les tTreg (Helios ⁺ Nrp1 ⁺) des pTreg (Helios ⁻ Nrp1 ⁻)
	Exprimé préférentiellement par les tTreg			
OX40	+	+	+	Expression augmentée par stimulation avec TNF, favorise le développement, la prolifération et la survie des Treg
	Expression constitutive	Expression induite après activation		
TNFR2 (CD120b)	+	+	+	Expression augmentée sur les Treg activés et favorise la survie des Treg dans un environnement inflammatoire
	Exprimé par 30-40% des pTreg hautement suppresseurs et ~80% des tTreg	Exprimé constitutivement par ~70% des Treg FOXP3 ⁺ du sang périphérique et par 100% des tTreg (fortement exprimé par les Treg mémoire/ effecteurs)		
TIGIT	+	+	+	
	Exprimé chez une sous-population de Treg activés fortement suppresseurs	Exprimé chez une sous-population de Treg activés fortement suppresseurs		
4-1BB	+	+	+	Expression augmentée par stimulation avec TNF, favorise le développement, la prolifération et la survie des Treg
		Expression induite par activation		
Intracellulaire				
FOXP3	+	+	+	
Helios	+	+	+	Utilisé en association avec Neuropiline 1 pour différencier les tTreg (Helios ⁺ Nrp1 ⁺) des pTreg (Helios ⁻ Nrp1 ⁻)
	Exprimé préférentiellement par les tTreg	Exprimé préférentiellement par les tTreg		

Parmi les marqueurs d'activation exprimés par les Treg il y a ICOS (Inducible T Cell COStimulator), une molécule de costimulation de la famille de CD28. Il a été montré que les Treg les plus suppresseurs expriment fortement ICOS (CD278) à leur surface et sont capables de sécréter de l'IL-10, IL-17 et IFN- γ (Vocanson *et al.*, 2010). Les T naïfs expriment faiblement

ICOS, mais le signal TCR/CMH II induit une forte expression d'ICOS (Burmeister *et al.*, 2008; McAdam *et al.*, 2000). Le signal de costimulation induit par la voie ICOS/ICOSL est indépendant de la voie CD28/CD80-86, et semble être important pour le développement, la fonction et la stabilité des Treg (Landuyt *et al.*, 2019; Redpath *et al.*, 2013). De façon intéressante, l'ablation de la voie ICOS/ICOSL chez des souris inhibe l'induction de tolérance respiratoire chez la souris (Busse *et al.*, 2012). ICOS joue également un rôle important dans la survie des Treg. Une étude *in vivo* montre que la survie des Treg activés CD44^{hi}CD62L^{lo}CCR7^{lo} ne dépend pas de l'IL-2, mais de la signalisation ICOS/ICOSL puisque le blocage de cette voie avec un anticorps neutralisant anti-ICOSL conduit à la mort de cette sous-population Treg (Smigiel *et al.*, 2014).

Un autre marqueur important pour la stabilité des Treg FOXP3⁺ est CD83. La perte d'expression de CD83 spécifiquement chez les Treg conduit à une diminution de la population Treg FOXP3⁺. L'induction d'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), modèle de sclérose en plaque, chez des souris FOXP3^{YFP-Cre}CD83^{fl/fl} conduit à une pathologie exacerbée de longue durée par rapport aux contrôles. Ces Treg CD83^{-/-} adoptent alors un phénotype pro-inflammatoire, sécrétant de l'IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-17A (Doebbeler *et al.*, 2018). De même, la perte de CD83 impacte la conversion *in vitro* des Tconv en Treg : un plus faible nombre de cellules FOXP3⁺ est obtenu à partir de Tconv CD83^{-/-} cultivés en présence d'IL-2 et de TGF- β par rapport au nombre obtenu avec des Tconv CD83^{+/+} (Doebbeler *et al.*, 2018).

D'autres marqueurs d'activation, appartenant à la famille du récepteur du TNF (Tumor Necrosis Factor) participent à la caractérisation des Treg : GITR, OX40 et TNFR2. Ces récepteurs sont très importants pour le développement des Treg (Chen *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'expression du TNFR2 est essentielle pour la stabilité phénotypique et fonctionnelle des Treg dans un environnement inflammatoire. Le TNF, en se fixant sur le TNFR2 présent à la surface des Treg, permet de maintenir l'expression de FOXP3 après une stimulation par le TCR (Chen *et al.*, 2013). Contrairement au TNFR1, TNFR2 permet d'identifier les Treg, humains et murins, stables et fortement suppresseurs (Chen *et al.*, 2008, 2010; Ronin *et al.*, 2021; Santinon *et al.*, 2020).

Certains marqueurs, comme les endonucléotidases CD39 et CD73 et les ligand FasL ainsi que les molécules comme CTLA-4 et LAG3, sont directement associés à la fonction suppressive des Treg. Leurs rôles respectifs seront traités dans la Partie I. C. Mécanismes de suppression.

La combinaison des différents marqueurs exprimés par les Treg permet de les différencier des Tconv. Elle permet aussi de mettre en lumière la complexité de ce compartiment cellulaire distinguant différentes sous-populations Treg.

B. Complexité du compartiment T régulateur : Sous populations suppressives, origines et plasticité cellulaire

La population des lymphocytes T régulateurs est loin d'être une masse homogène. En plus des Treg FOXP3⁺ d'origine thymique qui ont été les premiers à être identifiés, il existe également des lymphocytes régulateurs FOXP3⁺ qui se développent en périphérie (pTreg) et d'autres cellules suppressives qui n'expriment pas FOXP3, comme les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) et les lymphocytes helper de type 3 (Th3). De plus, la capacité des Treg FOXP3⁺ à exprimer des facteurs de transcription lignée-déterminants classiquement associés aux effecteurs T helper apporte de la complexité et de l'hétérogénéité à ce compartiment cellulaire. Dans cette partie, nous aborderons brièvement les caractéristiques de ces populations T régulatrices, leur origine ainsi que la plasticité dont font preuve les Treg FOXP3⁺.

1. Lymphocytes T régulateurs FOXP3⁺ : tTreg et pTreg

La majorité des Treg FOXP3⁺ se développent dans le thymus et ils sont identifiés comme étant des Treg thymiques ou tTreg. L'autre partie des Treg se développe en périphérie, à la suite à la conversion de Tconv en Treg. Ces derniers sont les Treg périphériques ou pTreg. Il est également possible d'induire la conversion des Tconv en Treg *in vitro* en présence de TGF- β et de l'IL-2. Les Treg obtenus sont alors dénommés iTreg.

Les tTreg et les pTreg sont CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ et ils expriment également CTLA-4, directement lié à leur capacité suppressive. Il est donc difficile de distinguer ces deux populations en périphérie. Afin de les différencier et les étudier, les marqueurs Hélios et Neuropiline-1 (Nrp-1) ont été proposés chez la souris puisqu'ils sont fortement exprimés par les tTreg et pas par les pTreg (Thornton *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2012). Cependant, leur utilisation reste controversée. Tous les tTreg n'expriment pas Nrp-1 (Singh *et al.*, 2015) alors que dans des conditions inflammatoires, les pTreg peuvent l'exprimer (Weiss *et al.*, 2012). De plus, Hélios peut également être exprimé par les pTreg suite à des stimulations antigéniques fréquentes (Gottschalk *et al.*, 2012). Néanmoins, l'expression concomitante de Hélios et Nrp-1

reste encore aujourd'hui la stratégie la plus courante pour distinguer les tTreg des pTreg (Singh *et al.*, 2015).

a) Le développement thymique des tTreg

Site des sélections positive et négative, le thymus permet l'élimination des clones exprimant des TCR autoréactifs avec une affinité trop importante pour le complexe CMH/peptide. Le développement thymique des tTreg dépend aussi bien de l'affinité et de l'avidité de ses TCR que de la rencontre avec les antigènes du soi présentés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) thymiques. Le paradigme majoritaire sur le développement Treg se base sur un modèle à deux étapes pendant lesquelles les Treg acquièrent successivement l'expression de CD25 puis de FOXP3 (Burchill *et al.*, 2008; Lio & Hsieh, 2008; Santamaria *et al.*, 2021).

Lors de la première étape, le complexe CMH II/peptide d'une cellule épithéliale thymique (TEC) rencontre le TCR d'un thymocyte SP (simple positif) CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻. Si l'engagement produit un signal de forte intensité, cela induit l'expression de CD25 et l'apparition de précurseurs Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻ (Lio & Hsieh, 2008). Cependant, l'intensité du signal TCR (Figure 2) qui permet l'apparition de précurseur Treg reste environ 100 fois inférieure au seuil conduisant à la délétion clonale (Lee *et al.*, 2012). Les TEC et notamment les cellules médullaires (mTEC) sont cruciales pour le développement des Treg. Elles ont la particularité d'exprimer AIRE (Auto-Immune Regulator Gene), un facteur de transcription qui permet l'expression d'antigènes spécifiques de tissus périphériques (Anderson *et al.*, 2002). AIRE est essentiel puisqu'en l'absence d'antigène du soi, les Treg ne peuvent pas se différencier dans le thymus. Par ailleurs, des mutations du gène codant pour AIRE provoque la poly-endocrinopathie auto-immune de type 1 aussi appelé syndrome APECED (pour auto-immune polyendocrinopathy, candidiasis, ectodermal dystrophy) qui se manifeste sous forme d'atteintes auto-immunes systémiques. Ce syndrome souligne l'importance de AIRE pour l'établissement de la tolérance immunitaire et notamment dans le développement des tTreg.

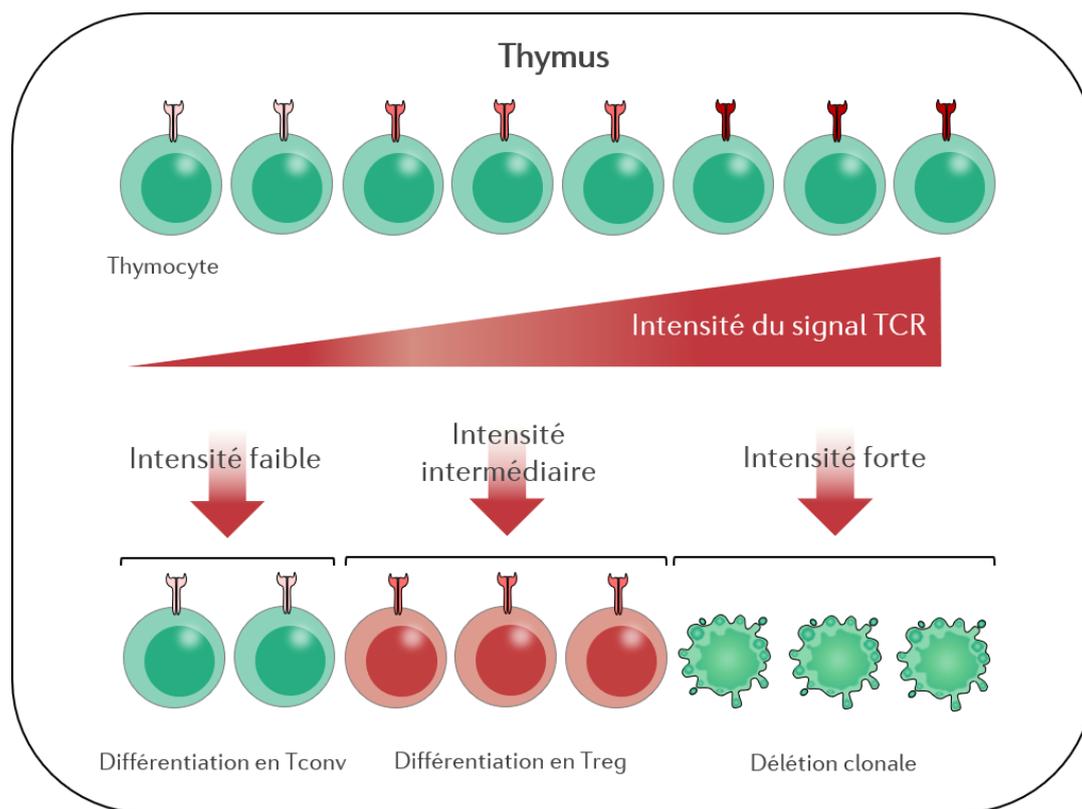


Figure 2. L'intensité du signal TCR détermine l'élimination des thymocytes ou bien leur différenciation en Tconv ou Treg (inspirée de Klein *et al.*, 2019).

Lors de la sélection négative dans le thymus, l'intensité de l'interaction entre le TCR du thymocyte et le complexe CMH II-peptide du soi présente sur les CPA (mTEC) détermine la survie du thymocyte et sa différenciation en Treg ou en Tconv.

Les molécules de costimulation jouent également un rôle essentiel pendant cette première étape. En effet, la perturbation de la voie CD28/CD80, soit en induisant une perte d'expression de CD28 ou CD80/CD86, soit en forçant l'expression de CTLA4-Ig chez des souris NOD, conduit à une diminution importante des Treg CD25⁺ (Lenschow *et al.*, 1996; Salomon *et al.*, 2000). La signalisation CD28/CD80 permet l'augmentation de l'expression de GITR, OX40 et TNFR2 chez ces progéniteurs Treg et cette augmentation est corrélée positivement à l'intensité du signal TCR. En effet, les T CD4⁺CD8⁻ qui reçoivent les signaux TCR de la plus haute affinité montrent la plus forte augmentation de l'expression de GITR, OX40 et TNFR2. (Mahmud *et al.*, 2014). En présence d'IL-2 faible dose (1 U/mL), la liaison avec leur ligand (GITRL, OX40L et TNF, respectivement) permet d'augmenter la conversion des précurseurs en Treg CD25⁺FOXP3⁺. En l'absence de costimulation avec GITRL ou OX40L, une dose d'IL-2 dix fois plus élevée est nécessaire pour obtenir le même effet (Mahmud *et al.*, 2014). Ainsi, les précurseurs ayant un TCR de forte affinité se retrouvent favorisés, ce qui a un impact sur la composition du répertoire TCR des lymphocytes T régulateurs (Kumar *et al.*,

2019; Mahmud *et al.*, 2014). De même, l'expression de FOXP3 semble dépendre de l'intensité du signal TCR (Hsieh *et al.*, 2012).

La deuxième étape du modèle de développement, pendant laquelle les précurseurs CD25⁺ deviennent des Treg CD25⁺FOXP3⁺, est TCR-indépendante. L'IL-2, ainsi que l'IL-15, sont des acteurs clé de cette étape. L'IL-2 est produite par les cellules T (Owen *et al.*, 2018) alors que l'IL-15 est produit par les cellules épithéliales thymiques (TEC) et principalement par les cellules médullaires (mTEC) qui expriment fortement le CMH II (Cui *et al.*, 2014). Ces cytokines permettent la phosphorylation du facteur de transcription STAT5 qui favorise la survie des cellules en induisant l'expression de Bcl-2 et l'expression de FOXP3 en se fixant à au CNS2. *In vitro*, l'IL-2 est suffisante pour induire FOXP3⁺, alors que d'autres signaux et notamment le signal TCR sont nécessaire pour induire son expression *in vivo* (Lio & Hsieh, 2008).

b) Conversion en périphérie : quand les Tconv rejoignent les forces régulatrices

Les Treg périphériques se développent en périphérie, à partir de Tconv matures. La conversion de Tconv FOXP3⁻ en pTreg FOXP3⁺ se produit dans des conditions particulières, souvent au niveau des muqueuses, des sites à l'interface entre l'hôte et l'environnement, majoritairement l'intestin et les poumons. En effet, dans les muqueuses, des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) particulières comme les DC CD11c⁺CD103⁺ intestinales ou les macrophages alvéolaires et interstitiels peuvent induire la conversion des Tconv CD4⁺ en pTreg (Benson *et al.*, 2007; Coombes *et al.*, 2007; Soroosh *et al.*, 2013). Cette conversion est favorisée en présence d'IL-2 ainsi que du TGF-β et de l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) produits par ces CPA. D'ailleurs, l'acide trans-rétinoïque permet l'induction de pTreg même lors d'un fort signal de costimulation (Benson *et al.*, 2007).

D'autres conditions qui favorisent la conversion des Tconv FOXP3⁻ sont : (i) l'activation en absence de signaux inflammatoires, (ii) l'activation par une DC immature exprimant peu de signaux de costimulation (Bilate & Lafaille, 2012; Kretschmer *et al.*, 2005) ainsi que (iii) des conditions d'activation en présence de faibles doses d'antigène (Apostolou & Von Boehmer, 2004). Dans le cas de signaux TCR et de costimulation forts, l'induction de pTreg nécessitera davantage de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-2 et TGF-β (Povoleri *et al.*, 2013).

Comme chez les tTreg, la région CNS2 (séquence non codante conservée) de *Foxp3* des pTreg, aussi appelée TSDR pour « Treg-specific de-methylated region », est hypométhylée, témoignant de la stabilité de l'expression de FOXP3 et du phénotype Treg (Polansky *et al.*,

2008). Ce n'est pas le cas des iTreg induits *in vitro* en présence de TGF- β , caractérisés par la déméthylation incomplète de leur région TSDR et donc un phénotype Treg instable (Feng *et al.*, 2014; Polansky *et al.*, 2008). Cependant, malgré la stabilité du phénotype Treg, dans certaines conditions inflammatoires, les Treg peuvent perdre l'expression de FOXP3 et sécréter des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ et l'IL-17, et devenir des exTreg (Zhou *et al.*, 2009).

Les pTreg sont impliqués dans le contrôle de l'inflammation et particulièrement au niveau des muqueuses. Leur répertoire TCR est différent de celui de tTreg. Issus de Tconv ayant subi la sélection thymique négative, le répertoire TCR des pTreg n'est donc pas restreint aux antigènes du soi comme celui des tTreg (Shevach & Thornton, 2014). Si ces derniers sont importants pour le maintien de la tolérance aux antigènes du soi, les pTreg sont impliqués dans le maintien de la tolérance aux antigènes microbiens et alimentaires. De ce fait, ils sont particulièrement importants pour la tolérance orale et le contrôle de allergies ainsi que le contrôle de l'inflammation intestinale comme la colite (Curotto de Lafaille *et al.*, 2008; Josefowicz *et al.*, 2012; Mucida *et al.*, 2005; Nutsch *et al.*, 2016).

Les pTreg sont également impliqués dans la tolérance materno-fœtale exerçant un contrôle de la réactivité contre les allo-antigènes paternels (Samstein *et al.*, 2012). En effet, l'ablation de CNS1, une des régions activatrices de FOXP3 essentielle à la conversion des pTreg (mais non essentielle pour les tTreg) conduit à la résorption des fœtus issus du croisement de pères BALB/c et de mères C57Bl/6 (Samstein *et al.*, 2012). Par ailleurs, les souris déficientes en CNS1 développent spontanément des pathologies allergiques (Josefowicz *et al.*, 2012).

Pour conclure, par leurs spécificités antigéniques orientées vers des antigènes d'origines différentes, les tTreg et les pTreg ont des rôles complémentaires qui permettent le maintien de la tolérance immunitaire et l'homéostasie. Classiquement, il est accepté que les tTreg contrôlent les réponses dirigées contre les auto-antigènes alors que les pTreg permettent la mise en place de la tolérance et le contrôle des réponses dirigées envers des antigènes étrangers.

2. Tr1 et Th3, cellules régulatrices FOXP3⁻

Il existe également des sous-populations T aux propriétés suppressives n'exprimant pas FOXP3. Ce sont les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) et les lymphocytes helper de type 3 (Th3). Ils sont induits en périphérie de façon TCR- et antigène-dépendante dans des contextes similaires à ceux entraînant l'induction de pTreg : activation par une DC immature,

en présence d'IL-10, à la suite d'une stimulation antigénique chronique par voie orale (Groux *et al.*, 1997; Povoleri *et al.*, 2013; Weiner *et al.*, 2011).

Ils jouent également un rôle important dans la mise en place et le maintien de la tolérance, notamment aux allergènes. En effet, une fréquence plus élevée de Tr1 CD4⁺CD45RA⁻Lag3⁺CD49b⁺ (0,57%) est retrouvée chez des enfants sains par rapport à des enfants souffrants d'une allergie alimentaire (0,39%) (Bergerson *et al.*, 2017).

Les Tr1 se caractérisent par les marqueurs de surface LAG3 (markers lymphocyte activation gene 3) et CD49b (Gagliani *et al.*, 2013). Ils prolifèrent peu, ne produisent ni d'IL-2 ni d'IL-4, mais sont en revanche capables de supprimer les réponses immunitaires *via* la sécrétion d'IL-10 (Groux *et al.*, 1997). De leur côté, les Th3 expriment TGF- β et LAP, le latency-associated peptide qui se lie à la forme membranaire de TGF- β (Tordesillas *et al.*, 2017; Weiner *et al.*, 2011).

3. Plasticité des Treg FOXP3⁺

La plasticité cellulaire est la capacité d'une cellule à s'adapter à une multitude de signaux provenant de son environnement, conduisant à des changements phénotypiques, voire fonctionnels. La grande majorité des cellules immunitaires possèdent cette capacité et les Treg FOXP3⁺ n'en font pas l'exception. Ils sont capables de coexprimer FOXP3 avec différents facteurs de transcription « spécifiques de lignée » (« lineage-specifying » en anglais), tels que T-bet, GATA-3/IRF4 et ROR γ t, généralement associés aux profils effecteurs de type Th1, Th2 et Th17, respectivement. Ils acquièrent ainsi des caractéristiques fonctionnelles spécifiques ainsi que des programmes de suppression et de réparation tissulaire qui permettent un contrôle efficace des réponses immunitaires. Par exemple, l'expression de récepteurs de chimiokines (Koch *et al.*, 2009) et de molécules d'adhésion particuliers leur permet de migrer vers des sites inflammatoires et d'y supprimer localement les réponses immunitaires (Raffin *et al.*, 2020). Cette plasticité est régulée par des signaux extracellulaires, particulièrement les cytokines (Dupage & Bluestone, 2016).

Pour le contrôle des réponses Th2, impliquées dans la pathogénèse des maladies allergiques, l'expression du facteur de transcription IRF4 par les Treg semble essentielle (Zheng *et al.*, 2009). En effet, la perte d'IRF4 dans les cellules FOXP3⁺ induit une hyperpolarisation Th2 des réponses immunitaires caractérisée, entre autres, par la production d'IgG1 et d'IgE (isotypes IL-4 dépendants) et des lésions tissulaires caractérisées par un fort infiltrat de plasmocytes (Zheng *et al.*, 2009).

Cependant, au niveau intestinal, le contrôle des réponses Th2, mises en cause dans l'allergie alimentaire, impliquerait des Treg exprimant ROR γ t, un facteur de transcription associé aux Th17 (Abdel-Gadir *et al.*, 2019). Les Treg ROR γ t⁺, induits par le microbiote, seraient impliqués dans le contrôle de ces réponses par un mécanisme CTLA-4-dépendant (Ohnmacht *et al.*, 2015). Ces Treg FOXP3⁺ROR γ t⁺ possèdent également une capacité suppressive supérieure à celle des Treg FOXP3⁺ dans un contexte d'inflammation intestinale induite par des effecteurs T (Yang *et al.*, 2016). Ces résultats montrent qu'il n'est pas toujours nécessaire que les Treg expriment le ou les facteurs de transcription associés à la réponse immunitaire qu'ils contrôlent. L'important, c'est que l'expression de ces facteurs permette aux Treg de se trouver au niveau des sites inflammatoires où ils pourront contrôler les effecteurs et d'éventuellement mettre en place des mécanismes effecteurs complémentaires.

Bien que cette plasticité semble être avantageuse pour l'hôte, car elle facilite le contrôle des différents types de réponses immunitaires par les Treg, une plasticité aberrante de ces derniers est également observée dans plusieurs maladies auto-immunes et allergiques. Dans ce contexte, les Treg deviennent des Treg « Th-like », capables de produire des cytokines pro-inflammatoires. Dans la plupart des cas, la capacité suppressive des Treg Th-like est diminuée, même si l'expression de FOXP3 est conservée (Dominguez-Villar *et al.*, 2011). Dans un contexte fortement inflammatoire, les Treg peuvent même perdre l'expression de FOXP3 en devenant des exTreg (Zhou *et al.*, 2009).

À la « Dr Jekyll et Mr Hyde », les facteurs de transcription, qui permettent aux Treg de s'adapter et de contrôler efficacement certains types de réponses immunitaires, peuvent leur conférer ce phénotype de Treg « Th-like » capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, l'expression d'IRF4 par les Treg est aussi retrouvée dans des contextes pathologiques. Une augmentation de la fréquence des Treg Th2-like de la peau est retrouvée chez des patients atteints de sclérose systémique. Ces Treg Th2-like sont capables de sécréter de l'IL-4 et de l'IL-13. L'IL-33, fortement produite au niveau de la peau chez ces patients, est mise en cause dans la polarisation des Treg cutanés vers ce phénotype Th2-like, d'autant plus que ces Treg expriment fortement l'une des chaînes du récepteur à l'IL-33, ST2 (Macdonald *et al.*, 2015).

Des Treg Th2-like ont également été observés chez des souris mutantes (Il4raF709) ayant une sensibilité accrue à l'allergie due à l'augmentation de la signalisation du récepteur à l'IL-4. Des Treg allergène-spécifiques ayant subi une reprogrammation Th2-like ont également été retrouvés dans le sang périphérique d'enfants souffrant d'allergies alimentaires. Ces Treg

Th2-like sécrètent de l'IL-4 et/ou de l'IL-13, expriment fortement les facteurs de transcription IRF4 et GATA-3 et leur capacité à supprimer l'activation et l'expansion des mastocytes est altérée due à cette signalisation IL-4R/STAT6 (Noval Rivas *et al.*, 2015).

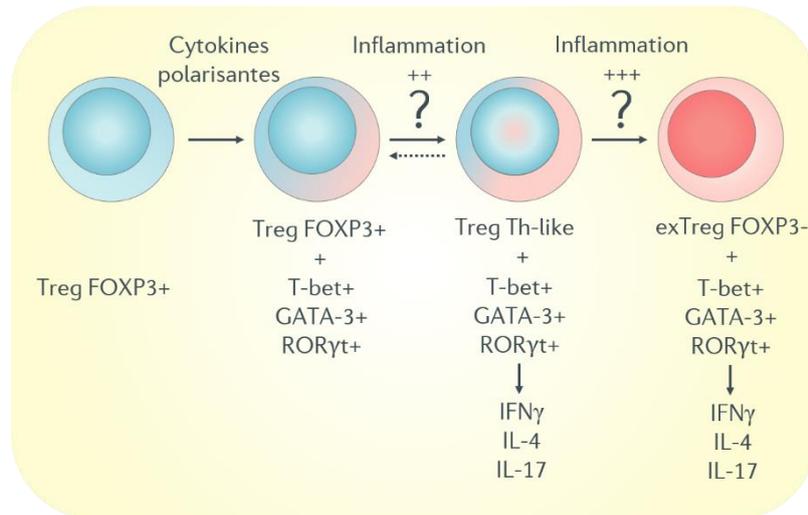


Figure 3. Plasticité et instabilité du compartiment Treg.

Les Treg sont doués d'une certaine plasticité. En plus de FOXP3, ils sont capables de coexprimer des facteurs de transcription classiquement associés aux profils Th1 (Tbet), Th2 (GATA-3) ou Th17 (ROR γ t) lorsqu'ils sont activés en présence de cytokines polarisantes (IL-4, IFN- γ , IL-12). Néanmoins, ils peuvent également adopter des phénotypes pro-inflammatoires « Th-like » et produire les cytokines associées à l'expression de ces facteurs de transcription voire perdre l'expression de FOXP3 et devenir des exTreg. Il n'est pas encore clair si les Treg Th-like représentent un état intermédiaire entre les Treg exprimant T-bet/GATA-3/ROR γ t et exTreg et si c'est état est réversible.

Ainsi, les Treg possèdent une plasticité qui leur permet de modifier leur phénotype en fonction de leur environnement. Ils expriment des facteurs de transcription lignée-déterminants, également exprimés par les effecteurs Tconv, ainsi que les récepteurs aux chimiokines et les molécules d'adhésion leur permettant d'être mieux « équipés » pour contrôler les cellules effectrices. Dans certains cas, l'expression de ces facteurs de transcription peut conduire les Treg à sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Toutefois, l'implication de ces Treg « Th-like » dans la pathogenèse de maladies auto-immunes et allergiques reste à déterminer. Font-ils partie des causes, ou cette polarisation aberrante est une conséquence d'une inflammation excessive voire d'une adaptation pour la contrôler ? La plasticité dont les Treg font preuve nous mène à nous interroger sur la possibilité de l'exploiter dans des nouvelles stratégies thérapeutiques pour soigner les maladies auto-immunes et allergiques.

Le choix de la polarisation en fonction des pathologies à traiter reste cependant à déterminer. Faut-il miser sur des stratégies thérapeutiques permettant de générer des Treg GATA-3⁺ pour soigner l'allergie alimentaire afin « d'équiper » les Treg avec les récepteurs aux

chimiokines qui leur permettront de migrer vers les sites inflammatoires ? Ou, au contraire, faut-il profiter des avantages que semble apporter les polarisations « antagonistes » pour contrôler certains types de réponses, c'est-à-dire, miser sur des approches permettant de générer des Treg ROR γ t⁺ ou T-bet⁺ pour soigner l'allergie ? Les deux approches sont intéressantes, mais ont des inconvénients. Dans la première, la stabilité des Treg est une grande interrogation : les Treg GATA-3⁺ resteront-ils stables dans l'environnement inflammatoire de type Th2 qu'induit l'allergie ou risquent-ils de sécréter des cytokines pro-inflammatoires voire devenir des exTreg et participer ainsi à la boucle d'amplification de l'allergie ? Quant à la deuxième approche, on peut se questionner sur la mobilisation de Treg au site où ils sont requis.

D'autres questions subsistent encore par rapport à la plasticité des Treg (Figure 3) : tous les Treg sont-ils doués de plasticité à tout moment ? Est-ce un phénomène réversible ? Si oui, les Treg « Th-like » redeviennent-ils des Treg « normaux » ou alors peut-être des exTreg comme dans le cas de l'arthrite inflammatoire ? Quels signaux sont à l'origine du maintien du phénotype polarisé ou bien de sa résolution ?

C. Mécanismes de suppression

Les Treg ont recours à différents mécanismes pour contrôler les réactions immunitaires et maintenir la tolérance et l'homéostasie. Certains de ces mécanismes permettent le contrôle direct des cellules effectrices soit par des mécanismes contact-indépendants tels que la sécrétion de cytokines inhibitrices ou l'induction de perturbations métaboliques, soit par des mécanismes contact-dépendants comme l'induction d'apoptose par la voie des récepteurs de mort et la modulation directe des cellules dendritiques. Mais les Treg peuvent également agir indirectement sur les effecteurs par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigène dont ils peuvent moduler la maturation/fonction (Figure 4).

Les mécanismes de suppression mobilisés par les Treg dépendent du type de réponse immunitaire à contrôler, des acteurs impliqués et de leur localisation. Dans le cadre de l'allergie, l'un des principaux mécanismes de suppression mis en œuvre par les Treg pour contrôler les cellules effectrices impliquées dans les réactions allergiques est la sécrétion de cytokines immunosuppressives et particulièrement d'IL-10.

Figure 4. Différents mécanismes de suppression des Treg (adapté de Meng *et al.*, 2016)

Les Treg sont capables de contrôler les réponses immunitaires grâce à des mécanismes qui ne nécessitent pas de contact comme la sécrétion de cytokines inhibitrices (IL-10, TGF- β) ou de molécules comme qui induisent la mort cellulaire (granzymes A et B), et l'induction de perturbations métaboliques en consommant l'IL-2 et hydrolysant l'ATP et l'ADP. Les Treg utilisent également des mécanismes de suppression qui dépendent de l'interaction physique avec les cellules cibles comme LAG3 ET CTLA-4.

L'IL-10 a différents modes d'action (Figure 5). Elle peut agir directement sur les cellules immunitaires effectrices comme (i) les mastocytes, en inhibant leur activation (Royer *et al.*, 2001) et la production de cytokines (Arock *et al.*, 1996) ; (ii) les éosinophiles, en inhibant la production de cytokines et leur survie LPS-induite (Takanaski *et al.*, 1994) ; (iii) les lymphocytes T CD4⁺, en inhibant leur prolifération, la production d'IL-2 (Taga & Tosato, 1992; Ye *et al.*, 2007), l'activation de Th2 (C. A. Akdis *et al.*, 1998; Hawrylowicz & O'Garra, 2005) ainsi que les réponses pathogènes de type Th17 (Chaudhry *et al.*, 2011) ; (iv) les lymphocytes

T CD8⁺, en restreignant leur activation et leur fonction cytotoxique (Smith *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2007) ; (v) et les lymphocytes B, en favorisant un switch isotypique d'IgE vers des IgG4 protectrices dans un contexte de maladie allergique (C. A. Akdis *et al.*, 1998; Jeannin *et al.*, 1998; Nouri-Aria *et al.*, 2004).

L'IL-10 aurait aussi un rôle potentiel dans l'induction de Treg chez l'humain. Récemment, une étude a montré que l'ajout d'IL-10, lors de l'induction *in vitro* de Treg humains en présence de TGF- β , conduit à une augmentation de l'expansion des iTreg FOXP3⁺. Ces iTreg expriment fortement CTLA-4 et leur capacité suppressive est comparable aux Treg naturels (Hsu *et al.*, 2015). L'IL-10 peut aussi agir sur les cellules présentatrices d'antigène, en diminuant l'expression du CMH II et des molécules de costimulation, et leur capacité à activer les effecteurs LT (C. A. Akdis *et al.*, 2000; de Waal Malefyt *et al.*, 1991; Ding & Shevach, 1992; Fiorentino *et al.*, 1991).

Le TGF- β est une autre cytokine immunorégulatrice exprimée, entre autres, par les Treg et impliquée dans le contrôle des réponses allergiques. La perte d'expression biallélique dans les Treg induit également des manifestations auto-immunes létales caractérisées par une production d'auto-anticorps accrue par la dérégulation des réponses des lymphocytes B et des lymphocytes T folliculaires helper (Turner *et al.*, 2020). La perte d'expression monoallélique Treg-spécifique entraîne une susceptibilité accrue à l'allergie alimentaire associée à une diminution des Treg ROR γ t⁺ intestinaux (Turner *et al.*, 2020), une sous-population connue pour le contrôle des réponses Th2 (Ohnmacht *et al.*, 2015). Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui montre que les Treg sont capables de réguler les manifestations allergiques au niveau pulmonaire par un mécanisme TGF β -dépendant (Joetham *et al.*, 2007).

Il a été montré que les Treg sécrètent des niveaux importants de TGF- β , mais l'expriment également à leur surface. Cette forme membranaire leur permet de supprimer l'activation d'effecteur de manière contact-dépendant (Nakamura *et al.*, 2001). Le TGF- β inhibe la prolifération des effecteurs en agissant directement sur la production d'IL-2 (Kehrl *et al.*, 1986) ainsi que sur l'expression de régulateurs du cycle cellulaire (Wan & Flavell, 2007). Cette molécule agit également sur les mastocytes en diminuant leur l'activation et leur expansion (Turner *et al.*, 2020). Le TGF- β contrôle également les réponses immunitaires de type Th1 en inhibant l'augmentation de l'expression de CD122, qui améliore la survie et l'expansion clonale des Th1 (Sad & Mosmann, 1994).

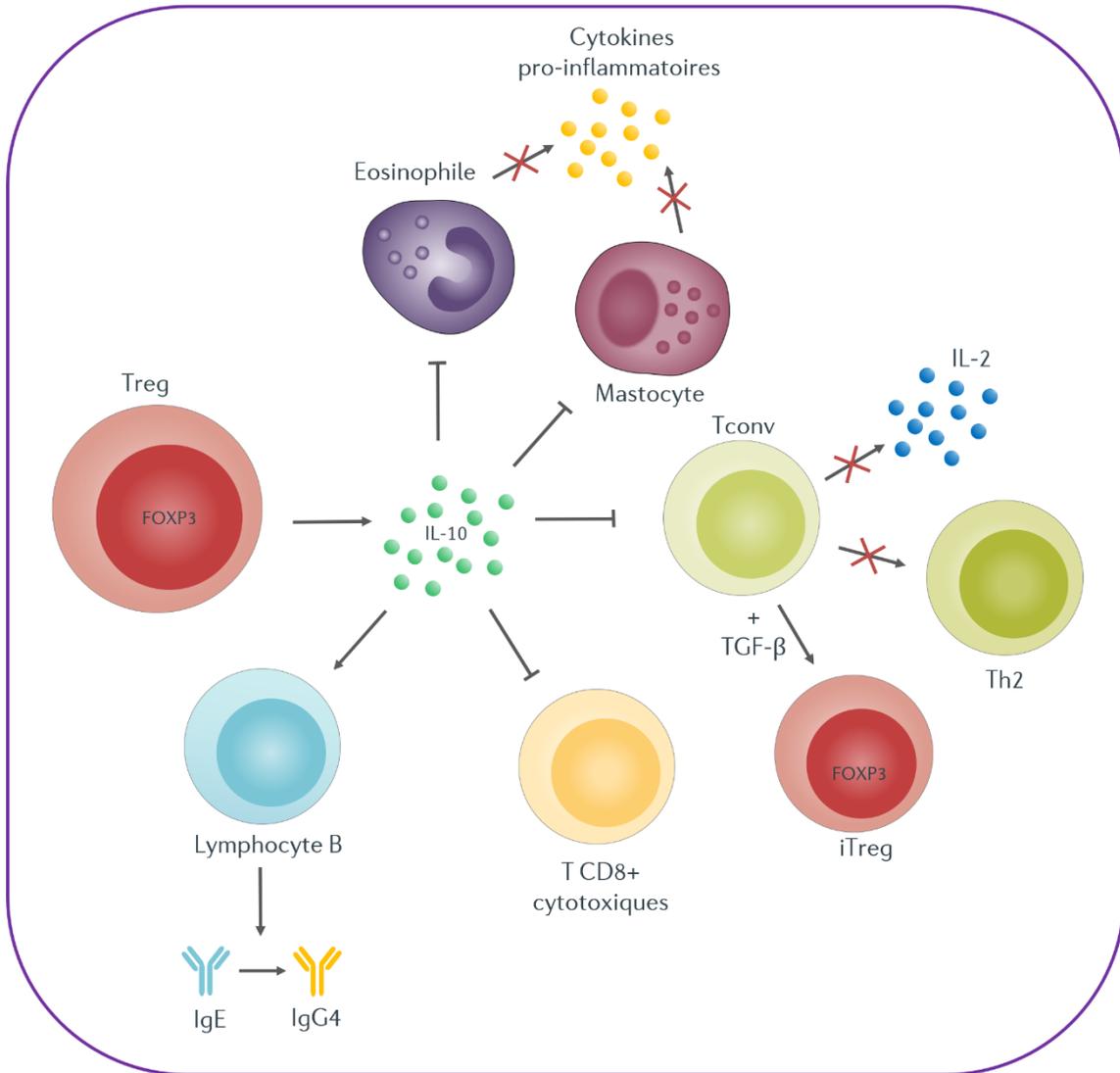


Figure 5. Différents modes d'action de l'IL-10.

L'IL-10 peut agir sur les éosinophiles et les mastocytes, en inhibant leur activation et la production de cytokine. Elle peut aussi bloquer la prolifération et la production d'IL-2 par les Tconv, ainsi que leur polarisation en Th2 et Th17. L'IL-10 agit sur les lymphocytes T CD8+, en restreignant leur activation et leur fonction cytotoxique, ainsi que chez les lymphocytes B, en favorisant un switch isotypique d'IgE pathogènes vers des IgG4 protectrices dans un contexte de maladie allergique.

Par ailleurs, des mécanismes contact-dépendants sont utilisés par les Treg pour contrôler les cellules effectrices pathogènes dans l'allergie. Les Treg sont capables d'inhiber la production de cytokines Th2 par les ILC2 (Cellules lymphoïdes innées de type 2) *via* des mécanismes contact dépendants impliquant une interaction ICOS/ICOSL. De même, ils inhibent, *via* des mécanismes impliquant une interaction OX40/OX40L, la dégranulation des mastocytes (Figure 6) (Gri *et al.*, 2008; Rigas *et al.*, 2017). Les Treg expriment également CTLA-4, une molécule immunosuppressive qui se lie aux molécules de costimulation CD80/CD86 à la surface des DC et transmet un signal inhibiteur. CTLA-4 bloque l'expression

de ces mêmes molécules de costimulation, indispensables pour l'activation des lymphocytes T naïfs, et maintien des DC dans un phénotype immature (Onishi *et al.*, 2008). *In vitro*, le CTLA-4 est capable de réguler le catabolisme du tryptophane chez les DC. En effet, CTLA-4 induit l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui catabolise le tryptophane en kynurénines (Fallarino *et al.*, 2002; Grohmann *et al.*, 2002). Ces métabolites induisent l'apoptose de thymocytes et des effecteurs Th1 (Fallarino *et al.*, 2002) contribuant ainsi à l'établissement et le maintien de la tolérance périphérique (Grohmann *et al.*, 2002). Comme mentionné précédemment, CTLA-4 est également impliqué dans la régulation des réponses intestinales de type Th2 par les Treg ROR γ ⁺.

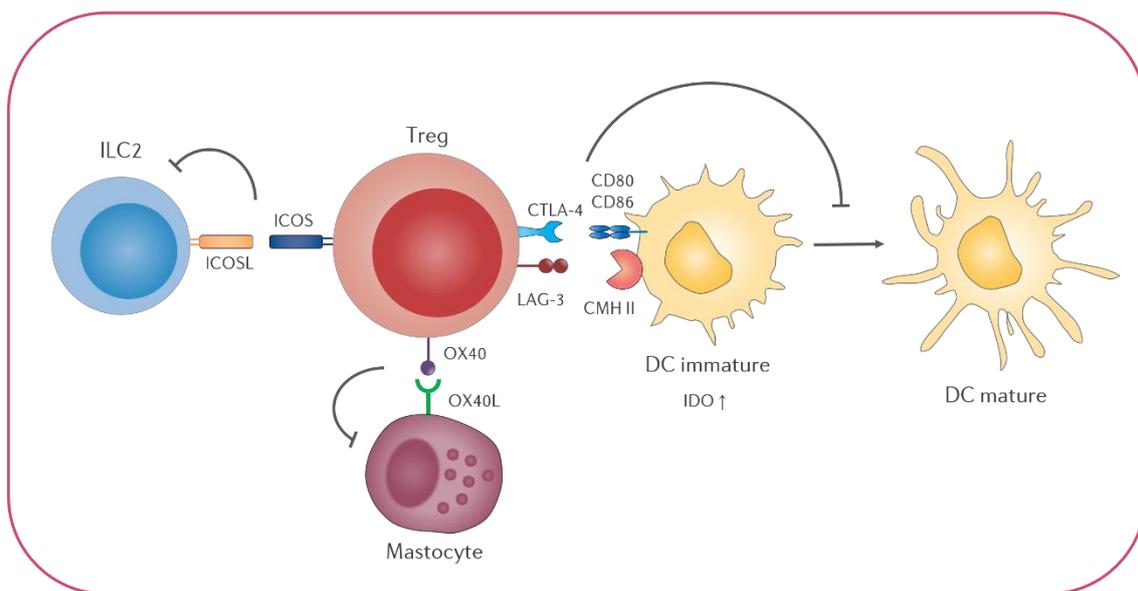


Figure 6. Suppression des cellules effectrices par les Treg dans le cadre de maladies allergiques. Les Treg peuvent inhiber les ILC2 *via* des mécanismes impliquant ICOS/ICOSL, et l'activation des mastocytes par un mécanisme impliquant OX40/OX40L. Les Treg sont également capables d'inhiber la maturation des cellules dendritiques par l'intermédiaire des molécules CTLA-4 et LAG3.

Les Treg peuvent moduler les cellules dendritiques par d'autres moyens. Ils sont capables de « séquestrer » les cellules dendritiques afin d'éviter qu'elles activent les Tconv. L'expression de Neuropiline-1 et LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1) par les Treg leur permettent d'avoir des interactions plus longues avec les DC immatures. L'inhibition de cette interaction avec des anticorps bloquants anti-Nrp-1 ou anti-LFA-1 conduit à l'augmentation de l'activation des Tconv (Onishi *et al.*, 2008; Sarris *et al.*, 2008). Après activation, les Treg expriment LAG3, une molécule qui se fixe au CMH II et leur permet également d'allonger la durée des interactions avec les DC. L'utilisation d'anticorps bloquants

anti-LAG3 ou l'induction de la perte d'expression de LAG3 conduit à une diminution de la capacité suppressive des Treg (Huang *et al.*, 2004).

De plus, les Treg sont aussi capables d'induire l'apoptose des DC *via* la voie perforine/granzyme (Boissonnas *et al.*, 2010). Par ailleurs, les Treg exprimant granzyme B jouent un rôle important dans le contrôle de l'inflammation pulmonaire suite à une infection par RSV (Loebbermann *et al.*, 2012)

La voie des récepteurs de mort Fas/FasL fait également partie de l'arsenal suppressif des Treg. Il a été montré qu'elle est mobilisée par les Treg dans la régulation de l'hypersensibilité de type II (hypersensibilité de contact) induite par les LT CD8⁺. En effet, les Treg limitent l'activation des LT CD8⁺ en induisant l'apoptose des DC activées (Gorbachev & Fairchild, 2010).

Les fonctions immunosuppressives des Treg sont aussi assurées par leur capacité à induire des modifications du micro-environnement. L'expression constitutive du récepteur de haute affinité à l'IL-2, essentielle à leur survie, leur permet également de contrôler les réponses immunitaires. En effet, les Treg sont les premiers à consommer l'IL-2 produite pendant les réponses immunitaires (O'Gorman *et al.*, 2009). La forte expression de CD25, la chaîne α du récepteur à haute affinité à l'IL-2, confère un avantage aux Treg, car les T effecteurs expriment CD25 transitoirement après activation. De ce fait, les Treg capturent en priorité l'IL-2, ce qui conduit à l'apoptose des T CD4⁺ et T CD8⁺ activés, privés de cette cytokine essentielle (Chinen *et al.*, 2016; Pandiyan *et al.*, 2007; Thornton & Shevach, 1998).

Les Treg expriment également CD39, une ectonucléotidase membranaire qui dégrade l'ATP en ADP ou en AMP. Cela empêche l'accumulation de l'ATP extracellulaire, qui est un signal de destruction tissulaire capable d'induire des réponses pro-inflammatoires. Par exemple, chez les monocytes, la stimulation par l'ATP conduit à la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (Borsellino *et al.*, 2007).

L'association de CD73, une autre ectonucléotidase exprimée par les Treg, et de CD39 leur permet de produire de l'adénosine à partir d'ADP (Deaglio *et al.*, 2007). L'adénosine est capable de se fixer à son récepteur, A_{2A}R. La signalisation A_{2A}R inhibe, entre autres, l'activation de la voie Ras-MAP-kinases. La fixation de l'adénosine à son récepteur déclenche des mécanismes immunosuppresseurs chez les Tconv: elle inhibe la prolifération des T effecteurs et la production d'IL-2, favorise la conversion de Tconv en pTreg en favorisant la

sécrétion de TGF- β tout en inhibant la signalisation IL-6 (Deaglio *et al.*, 2007; Zarek *et al.*, 2008).

Les Treg sont également capables de perturber la signalisation intracellulaire Ca²⁺ des cellules effectrices, notamment des Teff. Cela a un effet direct sur l'activation des effecteurs en inactivant les facteurs de transcription NFAT et NF- κ B qui sont Ca²⁺-dépendants, perturbant la prolifération des T activés (Othy *et al.*, 2020; Schmidt *et al.*, 2011, 2012).

En conclusion, les Treg sont essentiels pour le maintien de l'homéostasie et la tolérance immunitaire. Ils possèdent un certain degré de plasticité et plusieurs mécanismes de suppression qui leur permettent de contrôler des réactions immunitaires, notamment les réactions auto-immunes et allergiques. Au vu de ces caractéristiques, ils représentent une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des maladies auto-immunes et allergiques.

PARTIE 2 : IMPLICATION DES TREG DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES IMMUNOPATHOLOGIES ET LEUR TRAITEMENT

Les Treg jouent un rôle clé dans la physiopathologie de plusieurs immunopathologies tels que les maladies auto-immunes et allergiques. Dans cette deuxième partie, nous nous intéressons au lien entre les anomalies fonctionnelles et/ou quantitatives en Treg, qu'elles soient innées ou induites par l'environnement, et les conséquences sur le développement des maladies auto-immunes et allergiques. Finalement, nous aborderons quelques-unes des stratégies thérapeutiques proposées pour le traitement des désordres immunitaires qui ciblent les Treg.

A. Défauts génétiques chez les Treg et développement de désordres immunitaires

Plus de 350 maladies monogéniques immunitaires ont été répertoriées jusqu'à maintenant (Cepika *et al.*, 2018). Parmi elles, on distingue des maladies causées par des mutations génétiques délétères qui touchent des gènes importants pour l'ontogénie, l'homéostasie ou la biologie des Treg, comme FOXP3, CD25 ou CTLA-4. Ces maladies ont pour point commun le développement de manifestations auto-immunes systémiques sévères.

Le syndrome d'immunodérégulation, de polyendocrinopathie et d'entéropathie lié au chromosome X (IPEX) est l'une des plus connues. Il est causé par une mutation perte de fonction sur le gène *Foxp3*. Des 70 mutations identifiées jusqu'à aujourd'hui, 40% se trouvent dans un des domaines de liaison à l'ADN. Cela conduit à l'expression d'une protéine FOXP3 non fonctionnelle, perturbant les Treg qui sont incapables de supprimer les Tconv activés. Ces défauts entraînent le développement de manifestations auto-immunes systémiques sévères (Bacchetta *et al.*, 2006, 2018; Bennett *et al.*, 2001). Ces manifestations, typiques du syndrome IPEX, incluent trois maladies : une entéropathie auto-immune, un diabète de type 1 et de l'eczéma précoce (Powell *et al.*, 1982). D'autres manifestations auto-immunes telles que la thyroïdite auto-immune, la néphrite, l'arthrite, l'anémie hémolytique et l'alopécie y sont parfois associées. Certains des patients atteints du syndrome IPEX développent également des MICI et des maladies allergiques. Les mutations chez ces patients provoquent une faible expression de FOXP3. Cela conduit à une forte diminution du nombre et des capacités suppressives des cellules Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Torgerson *et al.*, 2007). Ces observations ont d'ailleurs conduit à comprendre le rôle clé de FOXP3 et des Treg FOXP3⁺ dans le contrôle de ces pathologies.

Des mutations sur les gènes codant CD25, CTLA-4 ou LRBA (Lipopolysaccharide-Responsive and Beige-like Anchor), une protéine impliquée dans le trafic intracellulaire de CTLA-4, provoquent des syndromes semblables au syndrome IPEX, témoignant du manque de régulation des réponses immunitaires (Caudy *et al.*, 2007; Goudy *et al.*, 2013; Lo *et al.*, 2015; Schubert *et al.*, 2014; Sharfe *et al.*, 1997).

Ainsi, les mutations des gènes essentiels à la fonction de Treg causent des manifestations auto-immunes, allergiques et inflammatoires, soulignant l'importance de ces gènes et des Treg dans le contrôle des réponses immunitaires. Cependant, les maladies auto-immunes monogéniques sont rares, la majorité des maladies auto-immunes et allergiques sont polygéniques et multifactorielles. Nous nous intéresserons dans les prochaines parties à l'implication des Treg dans la physiopathologie de ces maladies.

B. Treg et les maladies auto-immunes multifactorielles

Des altérations des Treg ont également été mises en évidence dans plusieurs maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique (Crispin *et al.*, 2003; Grant *et al.*, 2015; Mellor-Pita *et al.*, 2006; Miyara *et al.*, 2011), le diabète de type 1 (Bacchetta *et al.*, 2006; Lindley *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2008) ou encore la sclérose en plaques (Fletcher *et al.*, 2009; Montero *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Mais le caractère polygénique et multifactoriel de ces maladies ne permet pas de déterminer si les défauts de Treg font partie des causes ou des conséquences de la pathologie.

Des défauts en Treg ont également été documentés dans d'autres pathologies auto-immunes et inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, les MICI, entre autres (Grant *et al.*, 2015). Des études récentes de « Genome-Wide Association Study » (GWAS) révèlent qu'environ 60% des polymorphismes nucléotidiques (SNP) associés à des maladies auto-immunes se trouvent dans les régions régulatrices activatrices non codantes (« enhancer ») de gènes de cellules immunitaires (Farh *et al.*, 2015; Okada *et al.*, 2014). Parmi ces gènes, certains sont essentiels aux Treg, comme le locus *Il2ra* ou les gènes codants pour CTLA-4 (Ohkura *et al.*, 2020). Une étude récente révèle un enrichissement considérable de ces SNP sur des régions CpG déméthylées spécifiques des Treg naïfs, mais pas sur les régions communes avec les Tconv. Certains de ces SNP sont notamment retrouvés dans des régions activatrices associées à des gènes qui définissent l'identité Treg tels que les gènes codant pour FOXP3, Hélios, CD25, OX40, TNFR2, et CD83 (Kitagawa *et al.*, 2017). L'ensemble de ces résultats suggère que les SNP auto-immuns trouvés dans les gènes liés aux fonctions des cellules T CD4⁺

sont principalement associés à une perte de fonction des Treg, plutôt qu'à un gain de fonction des Tconv. Cette perte de fonction favoriserait le développement des maladies auto-immunes (Ohkura *et al.*, 2020).

C. Treg et maladies allergiques

L'augmentation de la prévalence des maladies allergiques au cours des dernières décennies a conduit l'étude des mécanismes impliqués dans la rupture de la tolérance afin de trouver comment la restaurer. Cela a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des Treg dans ces désordres, rôle qui sera discuté dans cette partie.

1. Allergies IgE-dépendantes ou hypersensibilités de type 1

Les allergies ou maladies allergiques sont causées par une hypersensibilité envers des agents environnementaux non-pathogènes, notamment les aéroallergènes, les allergènes alimentaires ou les médicaments. Ici, nous nous intéresserons aux allergies IgE-dépendantes, aussi appelées hypersensibilités de type I selon la classification de Gell et Coombs. Les mécanismes à l'origine des réponses allergiques sont caractérisés par une hyperpolarisation de type Th2 qui implique des cellules de l'immunité innée et adaptative, telles que les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles, ainsi que les cellules T de type Th2 et les cellules B productrices d'IgE.

On distingue deux phases dans la physiopathologie des allergies à IgE : une phase de sensibilisation et une phase effectrice. C'est pendant la phase de sensibilisation (Figure 7) qu'a lieu le premier contact entre les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et l'allergène. Celui-ci se produit dans un contexte inflammatoire particulier : en présence d'IL-33, IL-25 et/ou de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) ainsi que d'autres signaux inflammatoires indiquant des dommages tissulaires et/ou de détresse cellulaire. Ces signaux induisent la production d'IL-4 par la CPA et la polarisation des T naïfs en Th2 activés qui produiront eux aussi de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL-13. Ces cytokines, dont certaines sont également sécrétées par les ILC2 (IL-5 et IL-13), favorisent la polarisation d'autres T naïfs en Th2. Elles favorisent également le recrutement des éosinophiles et mastocytes au niveau des tissus et l'augmentation des basophiles dans le sang périphérique. La sécrétion d'IL-4 et l'expression de CD40L par les basophiles et mastocytes permettent le maintien de la réponse allergique : en favorisant la polarisation de type Th2 et la commutation de classe des cellules B en plasmocytes

sécréteurs d'IgE (Murphy *et al.*, 2016). Cette commutation de classe est induite à la suite de (i) l'interaction entre les cellules B ayant reconnu l'allergène et les T folliculaire helper (Tfh) polarisés en Th2 *via* CD40/CD40L et (ii) la stimulation des cellules B par le l'IL-4 et l'IL-13 secrétées par les Tfh. Les IgE secrétées par les plasmocytes se fixent aux récepteurs FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles.

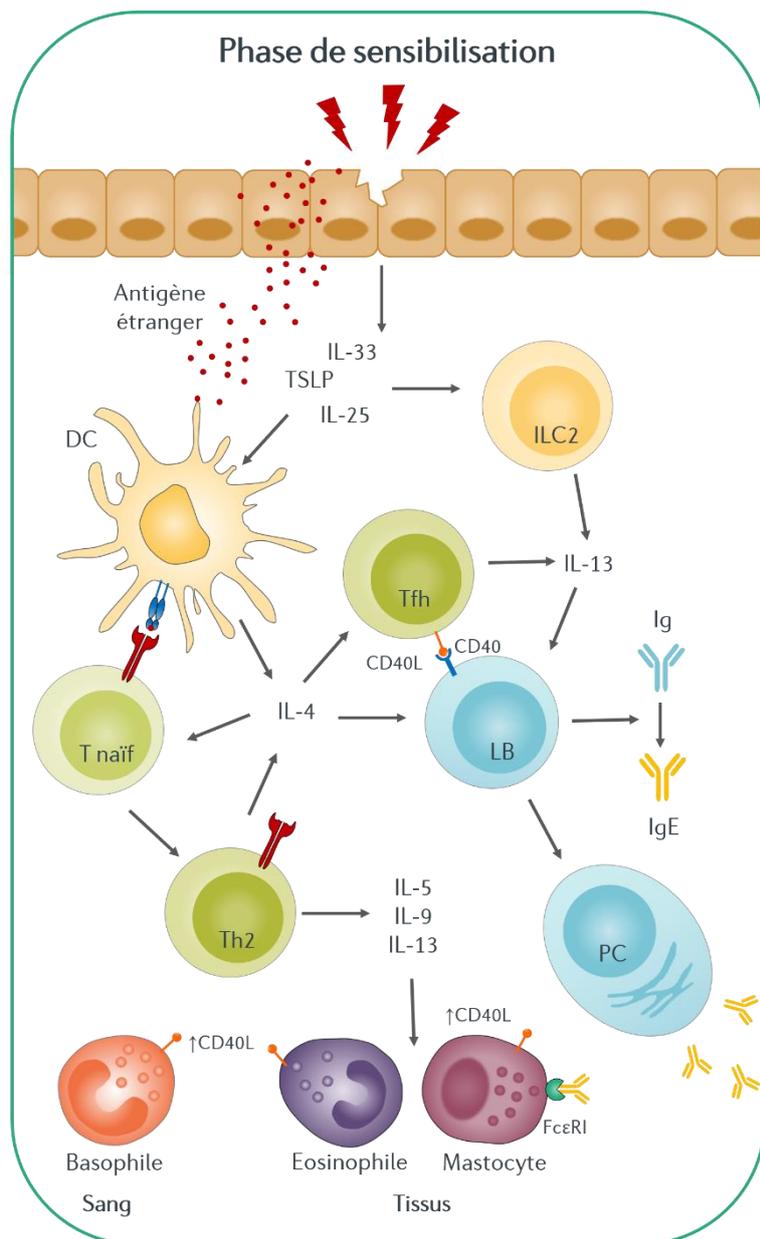


Figure 7. Phase de sensibilisation.

Les dommages ou les lésions épithéliales favorisent l'entrée de l'antigène et induisent la sécrétion des cytokines (IL-25, IL-33 et TSLP) par les cellules épithéliales. Ceci oriente le système immunitaire vers une réponse cellulaire de type Th2. Cela induit l'accumulation d'éosinophiles et de mastocytes tissulaires, ainsi que de basophiles circulants. La réponse immunitaire Th2 induit également la commutation de classe des lymphocytes B sécrétant des IgE. Ces derniers se fixent aux récepteurs FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles.

La phase effectrice débute lors d'une deuxième rencontre avec l'allergène (Figure 8). Ce dernier se fixe aux IgE à la surface des mastocytes et des basophiles, ce qui conduit au pontage des récepteurs FcεRI et à l'activation de ces cellules effectrices. Les mastocytes et les

basophiles activés libèrent l'histamine contenue de leurs granules et synthétisent des médiateurs lipidiques tels que des prostaglandines, des leucotriènes et du PAF (Platelet-Activating Factor). Ces molécules pro-inflammatoires peuvent agir à différents niveaux : (i) dans le tractus gastro-intestinal, elles provoquent des diarrhées et des vomissements en augmentant la sécrétion de fluides et des mouvements péristaltiques ; (ii) elles peuvent bloquer les voies respiratoires en diminuant leur diamètre et en augmentant la sécrétion de mucus ; (iii) elles peuvent également agir sur les vaisseaux sanguins en augmentant le débit et la perméabilité, ce qui conduit à la formation d'œdèmes, à un afflux de cellules dans les tissus et à une hypotension pouvant mener à un choc anaphylactique et à la mort (Murphy *et al.*, 2016).

Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux peuvent favoriser le développement des allergies. La composition du microbiote, elle-même influencée par la voie d'accouchement, l'allaitement et le régime alimentaire, la présence de polluants irritants, des mutations génétiques et même les infections sont certains des facteurs qui peuvent influencer le développement d'allergies. Ces facteurs agissent notamment sur l'homéostasie et/ou la fonction des Treg (Murphy *et al.*, 2016; Reynolds & Finlay, 2017).

2. Implication des Treg dans les maladies allergiques

Les allergies sont les désordres immunitaires les plus courants en Europe et aux États-Unis, et concernent plus de 20% de leur population (Abbas *et al.*, 2016). L'un des exemples historiques montrant l'importance des Treg dans le contrôle des maladies allergiques est le syndrome IPEX, dont nous avons parlé précédemment. Effectivement, outre les manifestations auto-immunes systémiques sévères qui caractérisent ce syndrome, certains patients IPEX développent également des manifestations allergiques sévères : allergie alimentaire, dermatite atopique, éosinophilie et syndrome hyper-IgE (Torgerson *et al.*, 2007). Lin *et al.* rapportent que des souris porteuses d'une mutation perte de fonction sur le gène *Foxp3* développent spontanément de manifestations allergiques semblables (Lin *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'élimination des Treg, soit chez des souris DEREG exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de FOXP3, soit par l'utilisation d'anti-CD25 (PC61), abolit ou empêche l'établissement de la tolérance orale et empire les manifestations allergiques (Bonnet *et al.*, 2016; Hadis *et al.*, 2011; Van Wijk *et al.*, 2007).

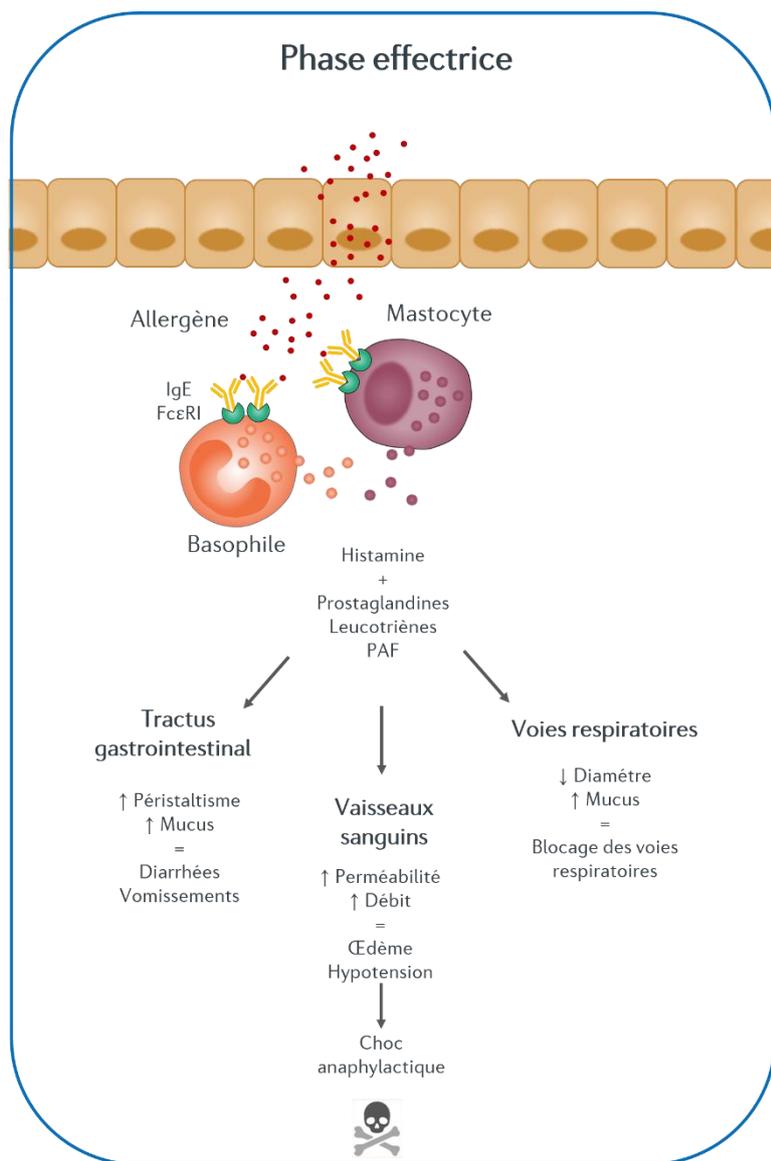


Figure 8. Phase effectrice.

Lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène/allergène, celui-ci se fixe aux IgE à la surface des mastocytes et des basophiles. Le pontage des récepteurs induit la dégranulation et la libération de médiateurs lipidiques, ce qui entraîne des diarrhées, vomissements, blocage des voies respiratoires, œdèmes. Dans les cas les plus sévères, l'allergène peut déclencher un choc anaphylactique voire la mort.

Outre l'absence ou le faible nombre de Treg, des défauts de leurs capacités suppressives ont aussi été impliqués dans la physiopathologie des désordres allergiques. En effet, l'induction de la perte d'expression de l'IL-10 par les Treg (souris *Foxp3*^{YFP-Cre} x *Il10*^{flox/flox}) conduit à une hyper-réactivité pulmonaire et cutanée (Rubtsov *et al.*, 2008). Plus récemment, il a été montré que le déficit de TGF-β1 dans les Treg favorise le développement de manifestations allergiques chez la souris (Turner *et al.*, 2020). Les infections peuvent également avoir un impact sur les Treg. Des souris rendues tolérantes à l'ovalbumine (OVA, protéine de l'œuf) *via* le lait maternel puis infectées à répétition avec le virus respiratoire syncytial (RSV) développent des réactions inflammatoires au niveau des voies respiratoires suite à un test d'épreuve avec l'OVA. Les Treg des souris infectées à répétition ont une activité suppressive diminuée et acquièrent un phénotype Th2-like : ils expriment le facteur de transcription GATA-3 et sécrètent de l'IL-

13 (Krishnamoorthy *et al.*, 2012). Ainsi, l'inflammation de type Th2 causée par le virus entraîne une polarisation délétère chez les Treg, qui favorise le développement de maladies allergiques.

Chez l'humain, l'étude des personnes atopiques, ayant une prédisposition à développer des maladies allergiques (asthme, allergie alimentaire, allergie au pollen, etc.), a également permis de mieux comprendre le rôle des Treg dans le contrôle de ces maladies (Thomsen, 2015). Une étude comparant des donneurs sains avec des donneurs atopiques a mis en évidence la diminution d'environ 25% de la capacité suppressive des Treg (définis ici comme LT CD4⁺CD25⁺) de personnes atopiques par rapport aux donneurs sains. En comparant ces données à celles de personnes souffrant du rhume des foins pendant la saison de pollen, les auteurs montrent une diminution de la capacité suppressive de 50% pour les Treg des patients allergiques au pollen (Ling *et al.*, 2004). Ainsi, ces résultats suggèrent que des déficiences dans la capacité suppressive des Treg sont associées au développement des maladies allergiques. Néanmoins, les auteurs n'utilisent ni FOXP3 ni CD127 pour définir les Treg et donc les « Treg » des patients atopiques et allergiques pourraient être contaminés par des Tconv activés, ce qui pourrait également expliquer la diminution de la capacité suppressive observée. Toutefois, ils montrent que chez les donneurs sains (i) les cellules T CD4⁺CD25⁺ sont suppressives et (ii) l'expression relative de l'ARNm de FOXP3 est 15 fois plus élevée chez les LT CD4⁺CD25⁺ que chez les LT CD4⁺CD25⁻ (Ling *et al.*, 2004).

En outre, l'augmentation de la fréquence des Treg est associée à la résolution spontanée des allergies. En effet, comparés à des enfants allergiques au lait de vache, des enfants "ex-allergiques" devenus spontanément tolérants ont une fréquence plus élevée de cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺ dans le sang périphérique (Karlsson *et al.*, 2004). Les apiculteurs/apicultrices représentent un autre bon modèle chez l'humain pour comprendre les mécanismes de la tolérance aux allergènes chez les individus sains. En raison de leur métier, les apiculteurs sont exposés à des piqûres et donc à de fortes doses de venin d'abeille, ce qui peut induire l'allergie (Ewan, 1998). Une étude menée chez des apiculteurs non-allergiques montre qu'après plusieurs piqûres, il y a une diminution de la production d'IL-4 par les Th2 spécifiques de l'allergène et une augmentation de la production d'IL-10 par les T CD4⁺CD25⁺. Ceci est associé à une diminution de l'inflammation cutanée. De façon intéressante, les LT reviennent à l'état basal de préexposition après une période de 2 à 3 mois sans piqûres. Ainsi, la tolérance transitoire qui s'installe chez les apiculteurs pendant la saison de récolte de miel est induite par cette augmentation de T CD4⁺CD25⁺IL-10⁺. Cette augmentation dépend de

l'exposition à l'allergène, soulignant l'importance de celui-ci pour le recrutement des Treg et le maintien de la tolérance (Meiler *et al.*, 2008).

Le rôle protecteur des Treg dans les maladies allergiques est également mis en évidence dans les protocoles d'immunothérapie spécifique, proposés pour traiter certaines allergies. Ces thérapies impliquent l'administration répétée de très faibles doses d'allergène natif ou modifié. Les doses sont augmentées au fur et à mesure du traitement afin d'augmenter le seuil de tolérance de l'allergène chez le patient. Différentes voies d'administration sont possibles : orale (OIT), sublinguale (SLIT), épicutanée (EPIT), sous-cutanée (SCIT). L'efficacité de ces protocoles a pu être corrélée à l'induction et à l'activation des Treg.

Jutel *et al.* observent que après 70 jours d'immunothérapie spécifique (ITS) contre Derp-1 (l'allergène majeur des acariens), la prolifération des PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique) est supprimée *in vitro* par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ des patients suite à une stimulation spécifique (Jutel *et al.*, 2003). De même, chez des patients allergiques au pollen de bouleau, l'immunothérapie spécifique par voie sublinguale (SLIT) pour Bet v 1 (l'allergène majeur du pollen de bouleau) améliore les scores des tests d'épreuve. Chez ces patients, la SLIT induit l'augmentation de la suppression de la prolifération des PBMC de patients stimulés avec Bet v 1 et avec Mal d 1 (l'allergène de la pomme, ayant une forte réactivité croisée avec Bet v 1) 4 semaines après le début du traitement. Cette suppression est spécifique puisqu'aucune suppression de la prolifération n'est observée lorsque les PBMC sont stimulés avec la toxine tétanique. La suppression est également Treg-dépendante et IL-10-dépendante, car la déplétion avec un anticorps anti-CD25 ou anti-IL-10 annule la suppression observée à 4 semaines (Bohle *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces données montre que des défauts quantitatifs et qualitatifs du compartiment Treg sont impliqués dans la physiopathologie des maladies auto-immunes et allergiques. De plus, l'augmentation de la fréquence des Treg, dans un contexte de maladie allergique par exemple, est de bon pronostic vis-à-vis de la résolution de l'allergie. De surcroît, la présence de l'antigène semble nécessaire pour observer une protection. Les Treg apparaissent comme des cibles thérapeutiques intéressantes pour les traitements visant à améliorer l'état des patients souffrant des maladies auto-immunes et allergiques, voire les guérir.

D. Outils ou cibles thérapeutiques, les Treg dans le traitement des désordres immunitaires

En raison de la capacité des Treg à induire et maintenir la tolérance immunitaire, plusieurs thérapies visant à générer des Treg FOXP3⁺ ou bien à renforcer leur nombre et leur fonction suppressive se sont développées afin de traiter les maladies auto-immunes, allergiques ou encore de prévenir le rejet des transplantations d'organes.

1. Ciblage pharmacologique des Treg

Plusieurs approches pharmacologiques, comme l'administration de molécules telles que l'IL-2 faible dose ou les agonistes du récepteur TNFR2, peuvent être utilisées pour cibler directement le compartiment Treg afin d'augmenter directement leur nombre et leur capacité suppressive *in vivo*.

a) IL-2 faible dose

L'IL-2 est une cytokine qui joue un rôle crucial dans la mise en place et le contrôle des réponses immunitaires. Son action se fait *via* les récepteurs d'affinité intermédiaire et de haute affinité. Le récepteur d'affinité intermédiaire est exprimé constitutivement par les cellules T conventionnelles, T mémoire ainsi que les cellules NK. Le récepteur de haute affinité est lui exprimé constitutivement par les Treg et les ILC2 et, transitoirement, par les T effecteurs, les cellules B activées et les monocytes.

L'IL-2 a d'abord été utilisée pour le traitement des mélanomes et les carcinomes des cellules rénales pour son activité immunostimulatrice à des doses qui atteignaient les 150 millions d'unités internationales (MIU) par jour (Klatzmann & Abbas, 2015). Ces fortes doses étaient à l'origine d'effets secondaires importants. Néanmoins, les tentatives pour réduire la dose furent infructueuses : baisser la dose diminuait également l'efficacité de cette immunothérapie antitumorale. Par la suite, l'IL-2 fut utilisée comme adjuvant vaccinal, elle était alors administrée à une dose maximale de 18 MIU par jour pendant 5 jours. De façon surprenante, une augmentation transitoire de la fréquence de Treg fut observée chez certains patients de cet essai clinique (Lemoine *et al.*, 2009). Ces résultats ont conduit à l'utilisation de l'IL-2 comme stratégie innovante pour augmenter les Treg *in vivo*. Pour exploiter les différences de sensibilité à l'IL-2 entre les Treg et les Tconv, l'IL-2 fut utilisée à faible dose (entre 1,5 et 3 MIU/jour) chez des patients atteints de vascularite induite par le virus de

l'hépatite C (VHC) chez qui un défaut de Treg était documenté. Pour la majorité des patients, l'immunothérapie IL-2fd permet d'augmenter la fréquence des Treg CD25⁺FOPX3⁺CD127⁻ fortement suppressifs. Bien toléré par la majorité des patients, ce traitement n'induit ni l'activation des T effecteurs ni une immunodépression (aucune augmentation de la virémie). De façon intéressante, une amélioration de la vascularite a été observée chez ces patients (Saadoun *et al.*, 2011).

En parallèle, une autre étude clinique montre des effets bénéfiques de l'IL-2fd dans un contexte de greffe hématopoïétique allogénique. Dans cette étude, les patients souffrant de GVH chronique et réfractaires aux glucocorticoïdes sont traités avec de l'IL-2fd (0.3×10⁶, 1×10⁶, or 3×10⁶ IU par m² de surface corporelle). Aucune aggravation de la GVH n'est observée chez les patients traités, et l'immunothérapie induit une expansion préférentielle des Treg et, dans certains cas, elle permet même d'inverser les manifestations avancées de la maladie.

Ces deux premières études cliniques montrent que l'IL-2fd permet d'expansion des Treg *in vivo* et apportent la preuve de principe de son utilisation comme immunothérapie pour traiter des maladies associées à un défaut de Treg comme les maladies auto-immunes et allo-immunes inflammatoires (Koreth *et al.*, 2011; Saadoun *et al.*, 2011). Depuis, l'IL-2fd est testée en clinique, dans différentes pathologies auto-immunes (Tableau 2) et inflammatoires telles que le diabète de type 1, le lupus érythémateux systémique, l'alopecie areata, l'hépatite auto-immune, le syndrome de Sjögren et l'arthrite rhumatoïde (Graßhoff *et al.*, 2021). Des essais cliniques pour évaluer l'effet thérapeutique de l'IL-2fd sont également en cours de recrutement pour les fausses couches à répétition (NCT03970954) et la dépression bipolaire (NCT04133233). L'ensemble de ces études montre que l'IL-2fd est une immunothérapie qui permet d'élargir sélectivement les Treg sans effets néfastes majeurs. Cependant, l'expansion des Treg n'est pas une garantie de l'amélioration de l'état des patients. Cette hétérogénéité intra- et inter-études peut être expliquée par des défauts différents du compartiment Treg aussi bien qualitatifs que quantitatifs. De même, d'une maladie à l'autre, l'implication des Treg dans la physiopathologie n'est pas la même, ce qui pourrait aussi expliquer cette hétérogénéité dans la réponse clinique. À cela s'ajoute l'effet exercé par l'IL-2 sur les autres cellules (non-Treg) qui peuvent participer à la physiopathologie de ces maladies.

L'IL-2 a également montré son efficacité en préclinique dans un modèle de diabète de type 1 où l'immunothérapie IL-2fd a permis la régression du diabète chez des souris NOD et l'augmentation des Treg pancréatiques (Grinberg-Bleyer *et al.*, 2010). Chez l'humain, plusieurs études cliniques ont évalué la sécurité et les effets de l'IL-2fd dans le diabète de type 1 (Tableau 4). L'une d'entre elles a montré que les patients diabétiques, fortement répondeurs à l'IL-2fd,

conservent une meilleure capacité à sécréter de l'insuline que les patients faiblement répondeurs (Rosenzwajg *et al.*, 2020).

Plus récemment, mon équipe a montré que l'immunothérapie IL-2fd permet d'induire chez la souris une protection à long terme, Treg-dépendante, contre les manifestations cliniques de l'allergie alimentaire montrant ainsi le potentiel thérapeutique de cette immunothérapie dans les maladies allergiques (Bonnet *et al.*, 2016). La protection clinique induite par l'IL-2fd est de longue durée et dépendante des Treg. Le potentiel thérapeutique anti-allergique est actuellement testé en clinique dans l'essai d'efficacité Rhinil-2 (Tableau 2). Il permettra d'évaluer la sécurité et l'efficacité de l'injection d'IL-2 chez des sujets allergiques. En effet, il est important de noter que des cas d'éosinophilies ont été rapportés chez des patients traités avec l'IL-2 (Van Gool *et al.*, 2014). Cet effet est dû à la production d'IL-5 par les ILC2 stimulés par l'IL-2 qui induit l'expansion des éosinophiles (Van Gool *et al.*, 2014). Mais des alternatives pour contrer cet effet existent comme la combinaison de l'immunothérapie IL-2 avec un anticorps anti-IL5 (Abo *et al.*, 2019).

D'autres stratégies, visant à augmenter la demi-vie et/ou la spécificité de l'IL-2 pour les Treg ont été développées. L'une de ces stratégies est l'utilisation de complexes IL-2/anti-IL-2. Ces complexes augmentent la demi-vie de l'IL-2 *in vivo* et permettent de moduler la spécificité de l'IL-2 vis-à-vis des Treg et des Tconv. Les complexes IL-2/S4B6 et IL-2/NARA-1 permettent de stimuler préférentiellement les T effecteurs et notamment les effecteurs CD8⁺ car la fixation de l'anticorps sur l'IL-2 engendre un encombrement stérique qui gêne la liaison de l'IL-2 avec CD25. En revanche, le complexe IL-2/JES6-1 permet de stimuler préférentiellement les Treg, car l'encombrement stérique créé par la liaison entre l'anticorps et l'IL-2 gêne l'interaction entre l'IL-2 et les sous-unités β et γ du récepteur à l'IL-2 (Boyman *et al.*, 2006; Spangler *et al.*, 2015). Ainsi, le complexe IL-2/JES6-1 permet l'expansion du compartiment Treg et l'efficacité thérapeutique de cette stratégie a été montrée dans des modèles précliniques de colite inflammatoire, d'EAE et de diabète de type 1 (Spolski *et al.*, 2018). Le complexe IL-2/F5111.2 (IL-2 fixé à un anticorps anti-IL-2 humaine) stimule les Treg sans pour autant avoir un effet sur les T effecteurs. Le potentiel thérapeutique de l'IL-2/F5111.2 a été testé dans divers modèles murins avec des résultats promoteurs. En effet, il permet de diminuer la sévérité de la maladie dans un modèle d'EAE, d'induire une rémission du diabète de type 1 chez des souris NOD et de protéger des souris contre le développement d'une GVH (Trotta *et al.*, 2018).

D'autres variations de l'immunothérapie IL-2 utilisant des mutéines d'IL-2, des IL-2 conjuguées ou encore des IL-2 fusionnées ont également été développées. En effet,

l'introduction de mutations, la conjugaison ou encore la fusion de l'IL-2 avec d'autres molécules permettent ainsi d'augmenter la demi-vie *in vivo* et la sélectivité de l'IL-2 pour CD25 en jouant sur les liaisons avec CD25 et CD122. Ces variantes de l'IL-2 permettent d'induire l'expansion du compartiment Treg et ont montré leur potentiel thérapeutique en préclinique, dans des modèles de diabète de type 1 et de lupus (Dixit *et al.*, 2021; Khoryati *et al.*, 2020; Ward *et al.*, 2018), et des essais cliniques sont en cours pour certaines de ces molécules.

b) Agonistes du récepteur TNFR2

Le TNFR2 est un des récepteurs de TNF- α , et à la différence du TNFR1 qui a un effet pro-inflammatoire et proapoptotique, il a des effets anti-inflammatoires et induit la survie et la prolifération des cellules. Parmi les LT CD4⁺, le TNFR2 est majoritairement exprimé par les Treg activés. De plus, la co-signalisation TNFR2 chez les Treg favorise l'expansion de cette population lymphocytaire et peut augmenter l'activité suppressive (Salomon, 2021). L'expression différentielle de TNFR2 sur les Treg et les Tconv et les effets de l'activation de cette voie ont conduit à développer des stratégies thérapeutiques ciblant ce récepteur pour stimuler spécifiquement les Treg. Dans un modèle de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), le traitement avec un agoniste murin de TNFR2 (STAR) permet l'expansion des Treg murins *in vivo* et protège les souris contre le développement de la maladie (Chopra *et al.*, 2016). Les auteurs montrent également que l'équivalent humain de cet agoniste, TNC-scTNF, permet l'expansion de Treg humain *in vitro* (Chopra *et al.*, 2016). Dans des modèles murins d'arthrite et de GVH, le traitement avec l'agoniste TNCscTNF80 permet l'augmentation de l'expansion et l'activation des Treg et cela est associé à l'amélioration du score clinique (Chopra *et al.*, 2016; Lamontain *et al.*, 2019).

Tableau 2 : Essais cliniques terminés ou en cours testant l'administration de l'IL-2 faible dose dans des maladies auto-immunes et allergiques (date de recherche: 04/10/2021 répertoriés sur clinicaltrials.gov).

Numéro NTC	Date de début	Maladie	Acronyme	Produit et voie d'administration	Posologie et schéma thérapeutique	Phase	Effet
Maladies auto-immunes							
NCT00525889	2007	DT1	-	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	4,5 MUI/j. 3 x semaine pendant 28 jours début à J0	I	Résultats non publiés
NCT01353833	2011	DT1	DF-IL2	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	0,33 ; 1 ou 3 MUI/j pendant 5 jours	I, II	↑ Treg dose dépendante
NCT01827735	2013	DT1	DILT1D	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	1 seule administration de 1,5 MUI/m2	I, II	Résultats non publiés
NCT01862120	2013	DT1	DFIL2-Child	rhIL-2, SC	0,3 ; 1 ou 3 MUI/m ² /j pendant 8 semaines	II	↑ Treg dose dépendante, meilleur maintien de la production du peptide C chez les répondeurs forts vs les faibles
NCT02084238	2013	LES	-	rhIL-2 (125Ala) SL Pharm, SC	3 cycles (1 cycle = 1 MUI tous les 2 jours pendant 14 jours puis 14 jours de repos)	-	↑ fréquence et fonction des Treg Amélioration clinique chez tous les patients (↓ score SLEDAI)
NCT01988506	2014	11 maladies auto-immunes	TRANSREG	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	1 MUI/j pendant 5 jours puis 1 injection d'1 MUI tous les 15 jours (sauf pour patients LES, tous les 7 jours) pendant 6 mois	II	Expansion et activation des Treg chez tous les patients
NCT02265809	2014	DT1	DILfrequency	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	L'IL-2 est administrée à différentes doses (0,09; 0,20; 0,32; 0,47 MUI/m ²) tous les 2, 3, 4, 5, 10 ou 14 jours	I, II	↑ dose dépendante de la fréquence de Treg et leur expression de CD25
NCT02411253	2015	DT1	DIABIL-2	rhIL-2 ; SC	0,5 MUI/m ² /j pendant 5 jours puis 1 injection tous les 15 jours entre J15 et J351 (Bras A) ; ou 1 injection par semaine en J15 et J351 (Bras B)	II	En cours

NCT02465580	2015	LES	-	rhIL-2 ; SC	3 cycles (1 cycle = 1 MUI tous les 2 jours pendant 14 jours puis 14 jours de repos)	II	Rétablissement de l'équilibre des cellules Tfr/Tfh
NCT02464319	2015	Syndrome de Sjögren primaire	-	rhIL-2 ; SC	3 cycles (1 cycle = 1 MUI tous les 2 jours pendant 14 jours puis 14 jours de repos)	II	-
NCT02467504	2015	Arthrite rhumatoïde	-	rhIL-2 ; SC	3 cycles (1 cycle = 1 MUI tous les 2 jours pendant 14 jours puis 14 jours de repos)	II	Amélioration clinique chez les patients traités avec l'IL-2 (CDAI)
NCT02932137	2016	LES	-	rhIL-2 (125Ala) SL Pharm, SC	3 cycles (1 cycle = 1 MUI tous les 2 jours pendant 14 jours puis 14 jours de repos)	-	Amélioration clinique chez les patients traités avec l'IL-2 Rémission: groupe IL-2 53,85% vs 16,67% dans groupe placebo
NCT02424396	2016	SEP-RR	MS-IL2	ILT101 (ILtoo Pharma) ; SC	IL-2 faible dose pendant 5 jours puis 1 injection d'IL-2 tous les 15 jours pendant 6 mois	II	Résultats non publiés
NCT02955615	2017	LES	LUPIL-2	ILT101 (ILtoo Pharma) ; SC	1.5 MUI/j pendant 5 jours puis 1 injection toutes les semaines pendant 3 ou 6 mois selon réponse	II	Résultats non publiés
NCT02389231	2017	Anémie hémolytique auto-immune	ANEMIL	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	1.5 MUI/jour pendant 5 jours suivi d'une période de "washout" de 9 jours, les traitements de 3 MUI/j seront initiés après une "washout" de pause de 16 jours.	I, II	Résultats non publiés
NCT03243058	2017	DT1	PROREG	ILT101 ; SC	Doses de 0.5 MUI/j (si surface corporelle <2 m ²) ou 1 MUI/j (si >2 m ²) pendant 5 jours, puis 1 injection tous les 15 jours pendant 1 an		Suspendu (COVID)
NCT03312335	2018	LES	Charact-IL-2	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	1.5 MUI/j pendant 5 jours toutes les 3 semaines pour un total de 4 cycles.	II	Résultats non publiés
NCT03782636	2019	DT1	ITAD	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	0.2 MUI/m ² 2 fois par semaine, tous les 3 jours pendant 6 mois	II	Recrutement en cours
NCT04062006	2019	Polymyalgia Rheumatica	-	rhIL-2, SC	1 MUI/m ² 5 jours par semaines pendant 4 semaines puis 1 fois par semaine pendant 8 semaines	II	Résultats non publiés

<i>NCT04077684</i>	2019	LES	-	rhIL-2, SC	0,2; 0,5; 1 MUI/j tous les 2 jours pendant 12 semaines puis 1 fois par semaine pendant 12 semaines	II	Recrutement en cours
<i>NCT04023149</i>	2020	Pemphigus Vulgaris	-	rhIL-2, SC	Gargarisme oral avec 2 MUI dans 5 mL de solution saline normale pour chaque dose (gargarisé pendant 3 minutes) 2 fois par jour pendant 3 semaines.	II	Recrutement en cours
<i>NCT04397107</i>	2020	LES, arthrite juvénile idiopathique et syndrome de Sjögren primaire	-	rhIL-2	0,5 MUI/m2 pendant 5 jours puis tous les 15 jours pendant 6 mois	-	Recrutement en cours
<i>NCT02586831</i>	2021	DT1	DIPIT	Proleukin (Adesleukin), Novartis ; SC	1 MUI/j pendant 5 jours puis tous les 15 jours pendant 1 an	I, II	Pas encore de recrutement
Allergies							
<i>NCT03776643</i>	2019	Rhinite allergique aux pollens de bouleau	Rhinil-2	ILT101 (ILtoo Pharma) ; SC	1 MUI/j pendant 5 jours, puis tous les 15 jours pendant 5 mois	II	En cours

Sous-cutanée (SC) ; Diabète de type 1 (DT1) ; Lupus érythémateux systémique (LES) ; Sclérose en plaques (SEP) ; -RR (récurrente-rémittente) ; Millions d'unités internationales (MUI) ; IL-2 humaine recombinante (rhIL-2)

2. Les thérapies cellulaires : transfert de Treg

D'autres stratégies permettent d'augmenter le nombre de Treg pour jouer sur l'équilibre Treg/Tconv, indispensable au maintien de la tolérance immunitaire : les thérapies cellulaires de transfert adoptif de Treg. Cette approche consiste à isoler et purifier les Treg du patient, les amplifier *in vitro* avant de les transférer à nouveau au patient. Les Treg sont isolés à partir du sang périphérique ou du sang de cordon (particulièrement enrichi en Treg naïfs). Ils peuvent également être isolés à partir du thymus et un essai clinique (NCT04924491) est en cours (Romano *et al.*, 2019). La faible fréquence des Treg ainsi que la purification et les coûts sont des limites importantes de ce type d'approches thérapeutiques. En effet, après des protocoles d'isolation des Treg par enrichissement magnétique, des cellules contaminantes CD25⁺FOXP3⁻ peuvent être retrouvées dans des proportions non négligeables (environ 20%) (Di Ianni *et al.*, 2012; Mathew *et al.*, 2018). Ces cellules CD25⁺FOXP3⁻ sont des T effecteurs activés qui représentent un risque d'aggravation des maladies auto-immunes. FOXP3 étant un facteur de transcription intranucléaire, il n'est pas possible d'analyser son expression pour discriminer les Treg des Tconv sans perméabiliser et tuer les cellules. Cependant, une amélioration de la pureté (>99%) est possible en triant par cytométrie en flux les cellules CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} (Bluestone *et al.*, 2015). Néanmoins, une étape d'enrichissement magnétique des LT CD4⁺ est souvent nécessaire avant le tri, ce qui augmente le coût final de cette stratégie thérapeutique. Après isolation, l'étape d'expansion *in vitro* permet, en un peu plus d'un mois, de multiplier par 500 - 2000 fois le nombre de Treg obtenus. Elle est réalisée par stimulation polyclonale du TCR avec des billes anti-CD3/anti-CD28 en présence d'IL-2 (Sakaguchi *et al.*, 2020). L'amplification antigène-spécifique des Treg est également en développement. Nous discuterons plus en détail de ces différentes stratégies (polyclonale et antigène-spécifique) dans la partie III. Par ailleurs, malgré la phase d'expansion, le nombre final de cellules obtenues est fortement limité par la faible fréquence de Treg circulants.

Le maintien de l'identité des Treg est un des enjeux majeurs dans le développement de ces thérapies cellulaires. Les recherches pour caractériser les mécanismes impliqués dans la stabilité des Treg ont permis de dévoiler des pistes de développement intéressantes pour l'améliorer. En effet, l'utilisation de vitamine C et des conditions de culture pauvres en oxygène ont montré leur efficacité pour augmenter l'expression d'enzymes TET (Ten-Eleven Translocation) et favoriser la déméthylation du CNS2 et donc la stabilité des Treg (Someya *et al.*, 2017). Ces découvertes constituent des pistes d'amélioration des protocoles de thérapie cellulaire et de développement de protocoles de génération d'iTreg stables.

L'innocuité et le potentiel thérapeutique des transferts adoptifs de Treg sont testés en clinique depuis une dizaine d'années. La première étude clinique (NCT00602693) utilisant le transfert adoptif de Treg comme traitement se fit chez des patients ayant reçu une allogreffe de moelle osseuse afin de prévenir la maladie du greffon contre l'hôte ou GVH (Brunstein *et al.*, 2011). Les patients sont infusés avec des doses allant de 0,1 à 30×10^5 /kg de Treg allogéniques issus de sang de cordon après 19 jours d'expansion polyclonale. Chez les patients transférés, les auteurs observent une réduction de l'incidence de GVH aigüe de grade II-IV par rapport aux contrôles sans Treg (43 % contre 61 %, $p= 0,05$) sans pour autant voir une augmentation des risques d'infection, de rechute ou de mortalité précoce (Brunstein *et al.*, 2011). Les résultats encourageants de ce premier essai démontrant l'innocuité et le potentiel thérapeutique des Treg transférés ont poussé les chercheurs à reconduire la stratégie dans d'autres pathologies. C'est ainsi que des Treg polyclonaux autologues amplifiés *in vitro* ont été perfusés à des patients atteints de diabète de type 1 (DT1) dans deux études différentes (ISRCTN06128462 et NCT02691247). Ces études ont démontré une nouvelle fois l'innocuité et la faisabilité de cette thérapie cellulaire (Bluestone *et al.*, 2015; Marek-Trzonkowska *et al.*, 2014). Le transfert adoptif de Treg a également été testé en transplantation d'organe (Dai *et al.*, 2018) ainsi que dans des maladies auto-immunes et inflammatoires (d'après la recherche effectuée sur clinicaltrials.gov le 21/09/2021). Actuellement, des études cliniques de phase I et II ont débuté dans le cadre de la maladie d'Alzheimer ou tout récemment pour les formes graves de la COVID-19 associées à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (*cf.* clinicaltrials.gov en date du 21/09/2021).

La thérapie cellulaire par transfert adoptif de Treg est une approche innovante pleine de potentiel. Plusieurs travaux en ont confirmé sa faisabilité, sa sécurité et ces effets thérapeutiques. Néanmoins, cette stratégie thérapeutique reste très coûteuse et de nombreuses questions subsistent à propos de la cinétique et la fréquence d'administration en fonction de la phase de la maladie où se trouve les patients, la dose de cellules à administrer pour une efficacité maximale sans immunodépression, et le maintien de l'action de ces cellules dans le temps. Des consolidations sont encore nécessaires pour développer des traitements sur-mesure qui permettront d'améliorer l'état des patients, et même de guérir les désordres immunitaires.

En conclusion, plusieurs approches visant à utiliser les Treg comme outil thérapeutique existent. Il reste à définir, en fonctions des pathologies, la stratégie qui donnera les meilleurs résultats avec un minimum d'effets secondaires. La spécificité des Treg ciblés/ utilisés par ces stratégies thérapeutiques est une également une question importante. Faut-il augmenter le

nombre global des Treg ou favoriser uniquement l'expansion d'une sous-population avec un profil et/ou une spécificité particulière ? Nous aborderons la question de la spécificité antigénique des Treg et son rôle dans la fonction des Treg dans le chapitre suivant.

PARTIE 3 : RÔLE DE LA SPÉCIFICITÉ ANTIGÉNIQUE DES TREG DANS LE CONTRÔLE DES RÉPONSES IMMUNITAIRES

Note de l'auteur : Au cours de cette partie, vous lirez souvent les termes « Treg spécifiques de l'antigène » et « Treg spécifiques ». Par ces termes, je fais référence aux Treg spécifiques d'un antigène particulier, souvent impliqué dans une maladie immunitaire donnée. Lorsque je fais allusion aux « Treg polyclonaux » ou « non spécifiques », je veux dire qu'ils sont spécifiques d'un antigène non impliqué ou différent de l'antigène d'intérêt et non pas qu'ils ne sont pas spécifiques d'un antigène.

Le but commun des stratégies utilisant les Treg comme outils thérapeutiques est l'expansion de cellules stables et fonctionnelles, capables de contrôler les réponses immunitaires aberrantes, tout en conservant l'immunocompétence des patients traités. Récemment, la découverte du rôle clé du TCR dans l'homéostasie et la fonction des Treg a mis en évidence la nécessité de considérer leur spécificité comme un paramètre essentiel pour le succès de ces immunothérapies.

A. Impact du signal TCR sur le phénotype et la fonction des Treg

Depuis quelques années, il est admis que la signalisation TCR est essentielle pour le développement intrathymique des tTreg et la conversion des pTreg (*cf.* Partie 1.B). Plus récemment, les chercheurs se sont penchés sur le rôle du TCR dans la fonction des Treg matures en périphérie.

Levine *et al.* montrent grâce à des modèles murins inductibles de perte d'expression du TCR α dans les Treg ($Trac^{FL/WT}$ ou $Trac^{FL/FL} \times Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}$) que le TCR n'est pas nécessaire pour le maintien de l'expression de FOXP3 et la stabilité du phénotype Treg (Levine *et al.*, 2014). En revanche, la délétion du TCR induit la perte de la fonction suppressive des Treg malgré le maintien de la signalisation IL-2 et l'expression de molécules telles que CD25, CD39 et CD73, impliquées dans certains mécanismes de suppression. L'expression d'un ensemble de gènes exprimés exclusivement par les Treg activés, tel que CTLA-4, nécessite aussi une signalisation TCR continue (Levine *et al.*, 2014). En effet, la perte d'expression du TCR entraîne une diminution d'une sous-population Treg activée exprimant fortement CD44 (CD44^{hi}) et faiblement CD62L (CD62L^{lo}). Cette diminution est associée à une plus faible prolifération de cette sous-population Treg. De façon intéressante, la perte des Treg CD44^{hi} CD62L^{lo} entraîne un état moribond chez les souris $Trac^{FL/FL} \times Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}$ âgées de 3

semaines. Cet état est causé par une inflammation sévère liée à une augmentation significative du nombre de LT CD4⁺ et LT CD8⁺ ainsi que de la fréquence des lymphocytes T effecteurs produisant des cytokines inflammatoires telles que l'IL-4, IFN- γ et IL-17 (Levine *et al.*, 2014). Ces résultats démontrent l'importance du TCR pour l'activation des Treg et la régulation des lymphocytes T effecteurs. Ils soulignent également l'importance cruciale de l'expression continue du TCR pour le maintien de la fonction suppressive de ces cellules.

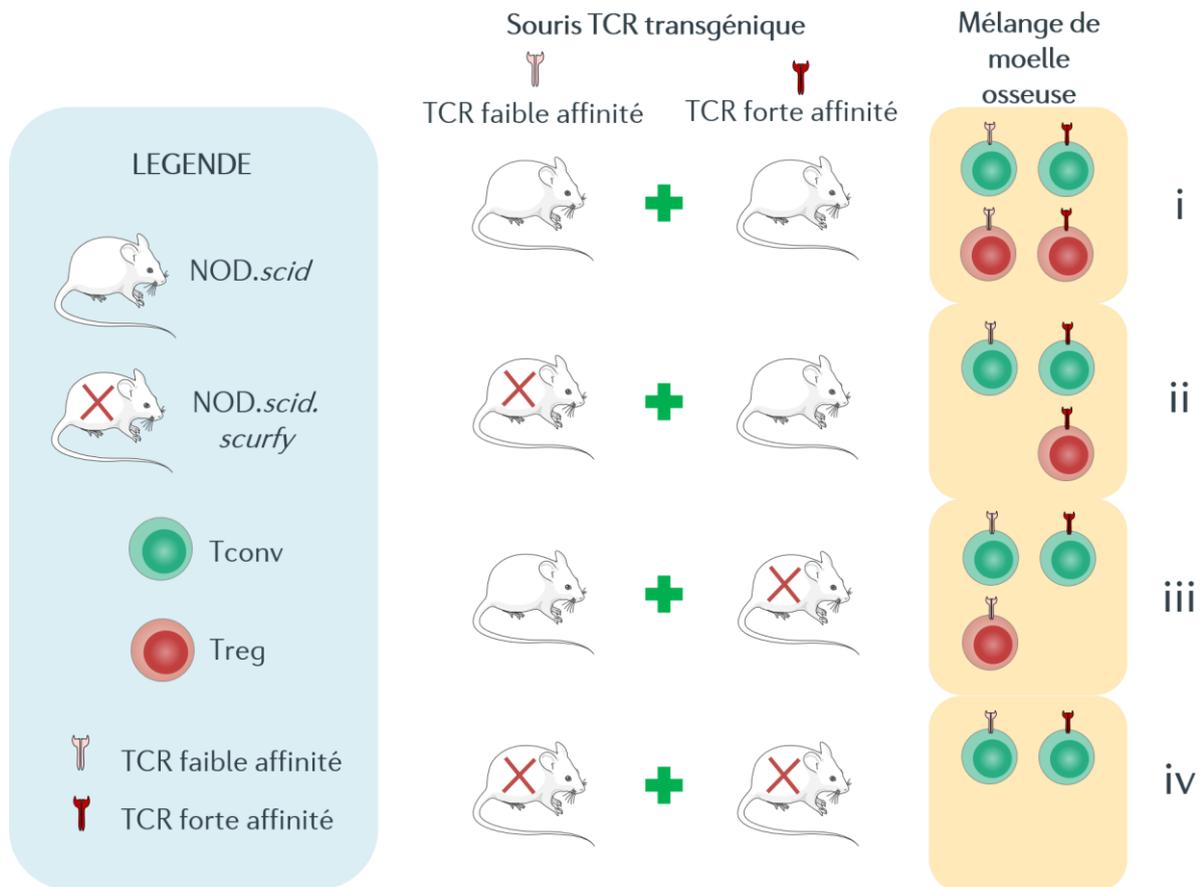


Figure 9. Etude du rôle de l'affinité du TCR des Treg dans la protection contre le DT1.

Le mélange de moelle de souris TCR transgéniques NOD.scid sauvages (Treg présents) et NOD.scid.scurfy (sans Treg), a permis l'obtention de 4 chimères avec des Teff de forte et de faible affinité et : (i) des Treg de forte et de faible affinité, (ii) uniquement des Treg de forte affinité, (iii) uniquement des Treg de faible affinité (iv) pas de Treg.

Une étude récente montre que l'affinité du TCR aurait un impact sur le phénotype et la fonction des Treg dans un contexte de diabète auto-immun (Sprouse *et al.*, 2018). Les chercheurs ont créé des chimères en mélangeant les moelles osseuses de souris TCR transgéniques avec un TCR de forte affinité et de faible affinité (Figure 9).

Ils rapportent qu'en l'absence de Treg, le diabète se développe dans 100% des cas. La présence des Treg de forte affinité et de faible affinité protège partiellement les souris puisque 50% développent un diabète. Cependant, en l'absence de l'un ou l'autre type de Treg (Figure 9, ii et iii), les souris sont moins protégées puisque 75% développent un diabète. Dans les chimères dotées des deux types d'affinité, les Treg de forte affinité expriment préférentiellement des gènes associés à la suppression des réponses de type Th1 tels que *Il10*, *Gzmb*, *Lag3*, et *Tigit* tandis que les Treg de faible affinité expriment plutôt *Areg* et *Ebi3*, associés à la réparation tissulaire, la survie des Treg et la suppression des réponses auto-immunes (Sprouse *et al.*, 2018). Les Treg de forte et de faible affinité auraient donc des rôles complémentaires permettant de contrôler les réponses auto-immunes spécifiques d'un tissu. Il serait intéressant d'étudier, dans l'allergie, si des Treg ayant des affinités différentes pour l'allergène sont nécessaires pour observer une protection contre les manifestations cliniques.

La spécificité du TCR semble également influencer le phénotype des Treg. Dans le colon des souris, des Treg qui expriment le même TCR ont tendance à avoir des transcriptomes similaires (Zemmour *et al.*, 2018). Cependant, il reste à déterminer la part jouée par le TCR et celle jouée par les signaux extracellulaires dans l'acquisition du phénotype Treg. Est-ce que des Treg ayant des clonotypes identiques, mais résidants dans des tissus différents ont des transcriptomes similaires ?

Le signal TCR, que ce soit par la spécificité antigénique ou son affinité pour le complexe CMH II/peptide, est primordial tout le long de la vie des Treg : depuis leur développement dans le thymus ou leur conversion en périphérie, jusqu'à leur activation et l'expression d'un phénotype particulier qui détermine leur fonction.

B. La spécificité des Treg dans les immunopathologies et immunothérapies

La diversité de phénotypes Treg et des fonctions associées semble importante pour la régulation des réponses effectrices, mais qu'en est-il de la diversité du répertoire Treg ? Que se passe-t-il lorsque les Treg d'une certaine spécificité antigénique font défaut ou sont faiblement amplifiés ? Ce défaut pourrait-il contribuer au développement de pathologies auto-immunes ou allergiques ? L'identification et l'étude des Treg antigène-spécifiques et de leur implication dans le développement des maladies auto-immunes et allergiques sont contraintes par les limites techniques encore nombreuses.

Les premières études sur le sujet se sont principalement intéressées aux Treg « organe-spécifiques » et leur capacité à contrôler le développement des réactions auto-immunes au sein des organes en question. Ces études montrent que le transfert adoptif de Treg provenant d'animaux donneurs dépourvus d'un organe en particulier ne protège pas les animaux receveurs des manifestations auto-immunes au niveau de cet organe. Sedon et Mason montrent que le transfert adoptif de T CD4⁺ périphériques provenant de rats Piebald Virol Glaxo (PVG) ayant subi une ablation de la thyroïde ne permet pas de prévenir le développement d'une thyroïdite auto-immune chez des rats thymectomisés et irradiés. En revanche, les T CD4⁺ issus de rats contrôles sont protecteurs vis-à-vis du développement de cette maladie auto-immune (Seddon & Mason, 1999). En revanche, le transfert adoptif de T CD4⁺ périphériques issus de rats dépourvus de thyroïde protège contre le diabète auto-immun, démontrant leur capacité suppressive dans un autre contexte pathologique indépendant de la thyroïde. De même, le transfert de thymocytes CD4⁺CD8⁻ issus rats dépourvus de thyroïde est capable de protéger contre le développement d'une thyroïdite auto-immune (Seddon & Mason, 1999). Ces résultats sont très intéressants : ils montrent que les thymocytes CD4⁺CD8⁻ des rats dépourvus de thyroïde peuvent générer des T thyroïde-spécifiques capables de contrôler des manifestations auto-immunes au niveau de cet organe mais l'absence des antigènes associés à la thyroïde empêche la sélection clonale, l'expansion et/ou la survie de ces cellules en périphérie, ce qui favorise le développement de manifestations auto-immunes organe-spécifiques. Des conclusions comparables ont été obtenues dans un modèle de maladie ovarienne auto-immune induite après thymectomie néonatale de souris B6AF1 femelles. En effet, après une ovariectomie néonatale suivie d'une greffe ovarienne à 3 semaines, seul le transfert de Treg CD25⁺ issus de souris femelles, mais pas de souris mâles, bloque complètement le développement de la maladie ovarienne auto-immune (Samy *et al.*, 2005). En revanche, le transfert de Treg CD25⁺ protège contre le développement de manifestations auto-immunes au niveau des glandes lacrymales (dacryocystite), quel que soit le sexe des souris donneuses (Samy *et al.*, 2005). Ainsi, comme chez les rats dépourvus de thyroïde, le déficit de protection est spécifique de l'organe « manquant » chez les souris donneuses.

Malgré les limites techniques de l'époque, ces travaux suggèrent l'importance de la présence des Treg « organe-spécifiques » pour contrôler les manifestations auto-immunes dans ces organes. Le manque ou la faible fréquence de ces Treg, liés à l'absence de leur antigène, favorisent le développement de ces maladies. Chez l'humain, la fréquence des Treg spécifiques de l'insuline est diminuée dans le sang périphérique d'enfants à risque de développer un diabète de type 1 pendant la période de mise en place de la réponse auto-immune contre les îlots

pancréatiques (Serr *et al.*, 2016). Ces résultats concourent au fait qu'un défaut en Treg spécifiques favorise le développement des maladies auto-immunes.

Récemment, le développement d'une nouvelle technologie appelée ARTE (« Antigen-Reactive T cell Enrichment ») a permis de mieux comprendre le rôle de la spécificité antigénique des Treg humains dans la régulation de la tolérance dans les allergies. ARTE est une technologie qui exploite l'expression différentielle de CD137 (4-1BB) par les Treg et celle de CD154 (CD40L) par les Tconv après 7 heures d'activation antigénique à partir de culture de PBMC humains. Cette technologie permet de les différencier et d'obtenir après tri magnétique deux fractions cellulaires activées par l'antigène, une enrichie en Tconv et une en Treg. Bacher *et al.* ont utilisé la technologie ARTE pour étudier les Treg et les Tconv antigène-spécifiques présents parmi les PBMC de donneurs sains et de patients allergiques (à des aéro-antigènes). De façon très intéressante, les chercheurs montrent que chez les patients allergiques, une réponse de type Th2 dirigée contre une protéine particulière est observée uniquement lorsque les Treg spécifiques de cette protéine sont absents ou leur fréquence est très faible (Bacher *et al.*, 2016). Bien que l'absence de Treg allergène-spécifiques n'entraîne pas automatiquement le développement d'une allergie comme observé chez les donneurs sains, elle pourrait toutefois contribuer à la création d'un terrain atopique, c'est-à-dire propice à l'allergie. Ces résultats suggèrent que les Treg antigène-spécifiques jouent un rôle important dans le contrôle des immunopathologies et notamment des allergies.

Les défauts quantitatifs de Treg spécifiques d'un antigène ne sont pas les seuls facteurs associés au développement des maladies allergiques. La reprogrammation de Treg allergène-spécifiques vers un profil Th2-like est un défaut qualitatif associé aux maladies allergiques, et plus précisément, à l'allergie alimentaire. Noval Rivas *et al.* montrent une augmentation de la fréquence de Treg allergène-spécifiques IL-4⁺ et IL-13⁺ parmi les PBMC de patients allergiques au lait restimulés *in vitro* avec l'allergène β -lactoglobuline (Noval Rivas *et al.*, 2015). Chez la souris, cette reprogrammation des Treg en Treg Th2-like peut être induite par l'augmentation de la signalisation du récepteur à l'IL-4 (IL-4R). Ce changement favorise l'allergie alimentaire, car la capacité suppressive des Treg Th2-like spécifiques de ces allergènes est perturbée (Noval Rivas *et al.*, 2015). Ces résultats soulignent l'importance de la stabilité des Treg allergène-spécifiques pour le contrôle des maladies allergiques. Ainsi, les défauts des Treg qui semblent favoriser les maladies allergiques (*cf.* Partie II) pourraient concerner plus particulièrement les Treg antigène-spécifiques.

Toutefois, l'augmentation des Treg est associée à une moindre sévérité des atteintes allergiques et celle-ci concernerait principalement les Treg allergène-spécifiques. En effet, une étude montre que chez des enfants allergiques au lait, une fréquence plus élevée de Treg spécifiques des protéines de lait est corrélée avec une forme moins sévère d'allergie (Shreffler *et al.*, 2009). Une autre étude, comparant des sujets sains avec des sujets allergiques au pollen de bouleau ou aux acariens, montre que l'équilibre entre les LT CD4⁺IL-10⁺ allergène-spécifiques et les cellules Th2 allergène-spécifiques différencie les sujets sains de sujets allergiques. Les premiers ont une fréquence environ 5 fois plus élevée de LT CD4⁺IL-10⁺ allergène-spécifiques par rapport aux seconds qui eux ont une fréquence environ 3 fois plus élevée de Th2 IL-4⁺ allergène-spécifiques (M. Akdis *et al.*, 2004). La caractérisation des LT CD4⁺IL-10⁺ des sujets sains révèle que ces cellules expriment fortement CTLA-4, CD25, PD-1, le récepteur à l'IL-10 ainsi que les récepteurs I et II au TGF- β et sont capables de suppression. Cela suggère que ces cellules sont des Treg malgré l'absence de marqueurs classiques utilisés aujourd'hui comme FOXP3 et CD127 (M. Akdis *et al.*, 2004). Plus récemment, une étude a analysé chez des enfants de 12 mois le rôle des Treg dans l'induction de la tolérance à l'œuf après son introduction précoce (vers 4-5 mois d'âge) dans leur régime alimentaire. Les auteurs ont remarqué chez ces enfants que la fréquence des Treg circulants spécifiques de l'OVA est quasiment doublée entre l'âge de 5 mois et 12 mois. Cette augmentation n'est pas observée chez les enfants nourris à l'œuf après 10 mois (Lai *et al.*, 2021). Les auteurs ont également comparé la fréquence de Treg spécifiques de l'OVA chez les enfants en fonction de leur sensibilité immunitaire à l'œuf à 12 mois : non allergiques, sensibilisés, mais tolérants (test cutané ≥ 3 mm) et allergiques (test cutané ≥ 3 mm + symptômes typiques de l'allergie alimentaire). Ils observent, chez les enfants non allergiques ayant reçu de l'OVA précocement, une augmentation significative des Treg spécifiques entre 5 et 12 mois, et cette augmentation est moins importante chez les enfants allergiques. De façon intéressante, l'augmentation des Treg spécifiques de l'OVA est significative uniquement chez les enfants ayant reçu de l'OVA précocement (Lai *et al.*, 2021). En conclusion, l'introduction précoce de l'œuf et la tolérance clinique à l'œuf sont associées à l'expansion des cellules T régulatrices spécifiques de l'ovalbumine, soulignant l'importance de ces cellules pour l'acquisition de la tolérance aux allergènes alimentaires.

De même, le succès des immunothérapies antigène-spécifiques (AIT) est corrélé à une augmentation des Treg et, des études récentes montrent que cette augmentation concerne particulièrement les Treg allergène-spécifiques. Des patients allergiques à l'arachide et traités efficacement par OIT deviennent immuno-tolérants et présentent une augmentation du nombre

de Treg allergène-spécifiques circulants comparativement à ceux chez qui l'immunothérapie a échoué. Ces Treg possèdent des capacités de suppression accrues et la forte déméthylation de leur locus *Foxp3* est le signe d'une forte stabilité (Syed *et al.*, 2014a). En outre, l'AIT avec Derp-1 (un allergène d'acarien) chez des patients souffrant de rhinite allergique augmente là-aussi les Treg FOXP3⁺ spécifiques de Derp-1. L'immunothérapie induit alors la diminution d'une sous-population Treg aux capacités suppressives diminuées (Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ILT3⁺) et l'augmentation de la fréquence de cellules CD4⁺FOXP3⁻ productrices d'IL-10 et d'IL-22. Ces modifications induites par l'AIT sont associées à une amélioration des scores cliniques (Boonpiyathad *et al.*, 2019).

Ainsi, à l'instar des Treg globaux, une corrélation existe entre le défaut en Treg antigène-spécifiques et le développement de réactions immunitaires antigène-spécifiques observées dans les maladies allergiques et auto-immunes. De plus, l'association entre l'augmentation des Treg antigène-spécifiques et l'amélioration des signes cliniques dans ces maladies est prometteuse. Ainsi, des recherches considérables entreprennent de générer des Treg spécifiques d'antigène pour restaurer la tolérance immunitaire en contrôlant les réactions immunitaires aberrantes spécifiques de l'antigène. Ces recherches ont conduit au développement des immunothérapies Treg antigène-spécifiques qui ont montré des résultats prometteurs en préclinique et clinique.

C. Treg antigène-spécifiques vs Treg polyclonaux

Pour contrôler les réactions immunitaires, certaines de ces stratégies thérapeutiques ont d'abord misé sur des approches polyclonales (comme celles décrites en Partie II), néanmoins des études montrent que les Treg antigène-spécifiques auraient des capacités suppressives supérieures à celles des Treg polyclonaux lorsqu'il s'agit de contrôler des réponses immunitaires spécifiques de cet antigène (Tableau 3).

Dans un contexte de diabète auto-immun, Tarbell *et al.* montrent que des transferts d'un faible nombre de Treg îlots-spécifiques, préalablement activés par des DC chargées avec l'auto-antigène, sont capables de ralentir le développement du diabète (avec 5 000 Treg CD25⁺) voire de stopper son développement (avec 50 000 Treg CD25⁺) chez des souris NOD. En revanche, le transfert de 100 000 Treg polyclonaux issus de souris NOD et activés en présence de DC et d'anti-CD3 n'a pas cet effet protecteur. Plusieurs études montrent qu'un nombre plus important de Treg polyclonaux que de Treg îlots-spécifiques est nécessaire pour ralentir le développement

du diabète (Tarbell *et al.*, 2004). Une autre étude par Tang *et al.* montre des résultats similaires. Ici, les chercheurs montrent que malgré une capacité de suppression qui semble comparable *in vitro* entre les Treg îlots-spécifiques et polyclonaux, ce n'est pas le cas *in vivo*. En effet, un transfert avec 2×10^6 Treg îlots-spécifiques issus de souris BDC2.5, amplifiés *in vitro* protège contre le développement de la maladie induite par le transfert de 25×10^6 cellules diabétogéniques issues de souris NOD. Alors que le transfert de 2×10^6 ou 5×10^6 Treg polyclonaux issus de souris NOD, amplifiés *in vitro* avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, ne confèrent pas cet effet protecteur (Tang *et al.*, 2004). De même, seul le transfert de 10^7 Treg spécifiques (issus de souris BDC2.5) permet la réversion du diabète chez 60% des souris NOD diabétiques receveuses (Tang *et al.*, 2004). Dans une autre étude, le transfert de Treg îlots-spécifiques suite à un traitement des souris NOD receveuses avec un anticorps anti-CD3 (induisant la déplétion partielle) permet 100% de rémission chez ces souris récemment devenues diabétiques. La protection serait due à l'accumulation et au maintien des Treg spécifiques au niveau des îlots pancréatiques des souris NOD receveuses, surtout après le traitement avec l'anti-CD3, qui permet de libérer la niche pour les Treg transférés (Cabello-Kindelan *et al.*, 2020). Toutefois, aucune protection n'est observée après transfert du même nombre de Treg polyclonaux après le traitement anti-CD3 (Cabello-Kindelan *et al.*, 2020). Cela suggère que libérer la niche n'est pas suffisant pour que les Treg transférés aient un effet protecteur : la spécificité des Treg est cruciale pour leur recrutement et leur maintien au niveau des sites inflammatoires.

La supériorité suppressive des Treg spécifiques par rapport aux Treg polyclonaux est également observée dans l'allergie. En effet, le transfert de cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ provenant de souris DO11.10 qui expriment un TCR transgénique spécifique d'un peptide OVA conduit à la réduction de l'inflammation des voies respiratoires chez des souris sensibilisées à l'OVA. Ce transfert permet également de diminuer le recrutement d'éosinophiles et l'expression de cytokines de type Th2 chez ces souris (Kearley *et al.*, 2005), ainsi qu'une diminution des niveaux sériques d'IgE après un test d'épreuve avec l'allergène (Saito *et al.*, 2008). Cependant, ces effets protecteurs ne sont pas observés lors du transfert d'un nombre équivalent de cellules régulatrices $CD4^+CD25^+$ polyclonales issues de BALB/c (Saito *et al.*, 2008), soulignant là encore l'importance de la spécificité antigénique des Treg (et du nombre) dans le contrôle des réactions inflammatoires de type allergiques.

L'efficacité des Treg spécifiques a également été rapportée dans d'autres modèles précliniques de maladies auto-immunes et inflammatoires (Tableau 3) dont un modèle de neuropathie auto-immune, chez le rat, induit par immunisation avec de la PNM (Myéline du

nerf périphérique). Il a été rapporté que le transfert de T CD4⁺CD25⁺ (majoritairement FOXP3⁺) amplifiés *ex vivo* en présence de PNM et d'IL-2, juste avant le début clinique de la maladie, permet de réduire la sévérité des manifestations cliniques et d'accélérer le rétablissement des animaux (Tran *et al.*, 2020). La stimulation avec l'antigène permettrait d'amplifier les Treg spécifiques, responsable de la protection. Les auteurs démontrent que la protection observée est bien antigène-spécifique puisque le transfert du même nombre de cellules, mais stimulées avec de l'IL-2 et un auto-antigène tiers (ici l'antigène tubulaire rénal ou RTA) ne modifie pas la gravité de l'EAE clinique chez les rats (Tran *et al.*, 2020). Des résultats similaires ont été obtenus dans plusieurs modèles murins de sclérose en plaques (EAE). Dans l'une de ces études, le transfert de 10⁵ Treg spécifiques de la protéine basique de la myéline (MBP) à des souris B10.PL, un jour avant l'immunisation avec MBP, confère une protection complète contre l'EAE (Stephens *et al.*, 2009). En revanche, le transfert de 2 x 10⁵ Treg polyclonaux issus de souris B10.PL ne confère aucune protection contre le développement de la maladie. De façon intéressante, les Treg MBP-spécifiques sont aussi capables d'améliorer l'EAE induite par un autre auto-antigène de la myéline, la protéine protéolipide (PLP). Dans ce cas, le transfert de Treg MBP-spécifiques a peu d'impact sur la phase aiguë de l'inflammation, mais améliore toutefois la phase chronique de l'EAE induite par PLP. Cette protection tardive serait associée au fait que les Treg MBP-spécifiques rencontrent leur auto-antigène après la phase inflammatoire provoquée par des T_H1 autoréactifs spécifiques de PLP (Stephens *et al.*, 2009). En effet, il est probable que l'inflammation et la destruction des gaines de myéline par les effecteurs PLP-spécifiques favorise la présentation de MBP aux Treg MBP-spécifiques par des CPA au niveau des ganglions drainants. Les Treg MBP-spécifiques seraient ensuite recrutés au niveau des sites inflammatoires où ils participeraient au contrôle de la phase chronique de la maladie.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que, dans les maladies induites par une réponse initiale contre un antigène donné, les Treg spécifiques semblent plus efficaces que les Treg polyclonaux pour contrôler la réponse permettant parfois d'éviter le développement de la maladie voire de favoriser la rémission. La capacité suppressive supérieure apparente des Treg spécifiques est liée à plusieurs facteurs. En effet, si les Treg spécifiques sont plus efficaces dans la suppression des réponses, c'est en partie parce qu'ils ont la capacité d'être recrutés précisément au lieu et au moment de la réaction : leur spécificité permet leur recrutement, simultanément aux T_H1 activés, au niveau des sites inflammatoires où se trouvent l'antigène et les effecteurs antigène-spécifiques. De plus, selon le micro-environnement dans lequel ils

sont activés, les Treg spécifiques peuvent adopter un profil qui leur permettra de mieux contrôler ces cellules effectrices.

Tableau 3. Études précliniques montrant la plus grande efficacité suppressive des Treg antigène-spécifiques dans le contrôle de différentes maladies auto-immunes et inflammatoires (modifié à partir de Selck & Dominguez-Villar, 2021)

Maladie	Modèle	Population de Treg antigène-spécifique	Treg spécifiques vs Treg polyclonaux	Référence
DT1	BDC2.5 + NOD	Expansion <i>in vitro</i> de LT CD4 ⁺ CD25 ⁺ de souris TCR-Tg BDC2.5 avec peptide BDC et DC de souris NOD	sTreg: Inhibition efficace du diabète induit par les cellules diabétogènes chez les souris NOD polyTreg : Aucune suppression	(Tarbell <i>et al.</i> , 2004)
DT1	BDC2.5 + NOD	Expansion <i>in vitro</i> de LT CD4 ⁺ CD25 ⁺ de souris TCR-Tg BDC2.5 avec billes anti-CD3/anti-CD28	Treg spé : ↑ suppression + régression du diabète induit par les cellules T diabétogènes chez les souris NOD. RAG ^{-/-} ou NOD CD28 ^{-/-} polyTreg : Léger retard de l'initiation de la maladie avec un nombre 4 fois plus élevé de cellules	(Tang <i>et al.</i> , 2004)
DT1	BDC2.5 + NOD	Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ (issus de souris NOD ou BDC2.5) fraîchement isolés	sTreg : Rémission durable chez des souris NOD diabétiques quand associés à un traitement anti-CD3 polyTreg : Pas de rémission	(Cabello-Kindelan <i>et al.</i> , 2020)
Arthrite rhumatoïde	DBA1	T CD4 ⁺ transduits avec FOXP3 et un TCR d'un clone associé à la CIA	sTreg induits: Inhibition efficace + régression de la CIA polyTreg induits: Aucun effet	(Fujio <i>et al.</i> , 2006)
SEP	Tg4 + B10.PL	LT CD4 ⁺ CD25 ⁺ de souris Tg4 TCR-Tg expandus <i>in vitro</i> avec des billes anti-CD3/anti-CD28	Treg TCR-Tg : Forte inhibition + amélioration de l'EAE induite par le MBP ou le PLP polyTreg : Aucun effet	(Stephens <i>et al.</i> , 2009)
SEP	2D2+C57Bl/6	Treg issus de souris 2D2 TCR-Tg surexprimant FOXP3 (après édition de HDR)	Treg TCR-Tg : ↑ suppression de la prolifération des Teff <i>in vivo</i> dans l'EAE induite par le MOG par rapport aux cellules Treg surexprimant FOXP3 polyclonales C57Bl/6	(Honaker <i>et al.</i> , 2020)

SEP	C57Bl/6	CAR T CD4 ⁺ spécifiques de MOG avec expression transgénique de FOXP3	CAR Treg : ↑ migration vers le cerveau + meilleur contrôle de l'EAE induite par le MOG que les cellules CAR T FOXP3 ⁺ contrôles	(Fransson <i>et al.</i> , 2012)
Neuropathie auto-immune	Rats Lewis	T CD4 ⁺ CD25 ⁺ amplifiés <i>in vitro</i> avec PNM et IL-2	Treg amplifiés avec PNM : Amélioration de l'EAN induite par le PNM Treg amplifiés avec auto-antigène non impliqué dans la maladie : Aucun effet	(Tran <i>et al.</i> , 2020)
Colite	TNP-Tg BALB/c	CAR Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ spécifique de TNP	CAR Treg TNP : Protection contre la colite induite par le TNBS CAR T contrôle : Aucun effet	(Elinav <i>et al.</i> , 2008)
Colite	CEABAC	CAR Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ spécifique de CEA (carcinoembryonic antigen)	CAR Treg CEA: ↑ migration vers le côlon et amélioration +++ de la colite (qu'elle soit induite par les Teff ou l'AOM-DSS) par rapport aux CAR Treg contrôles	(Blat <i>et al.</i> , 2014)
Gastrite auto-immune	TxA23 + BALB/c	iTreg induits par TGF-β à partir de T CD4 ⁺ de souris TxA23	TxA23 iTreg : Prévention de la gastrite auto-immune polyTreg induits : Pas de suppression	(Huter <i>et al.</i> , 2008)

Treg spécifiques (sTreg); Treg polyclonaux (polyTreg); Diabète de type 1 (DT1) ; TCR transgénique (TCR-Tg) ; Collagen induced arthritis (CIA) ; Myelin basic protein (MBP); Myelin Proteolipid Protein (PLP) ; Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG); CAR (Récepteur antigénique chimérique); Neurite auto-immune expérimentale (EAN) ; Peripheral Nerve Myelin (PNM); 2,4,6-trinitrophenol (TNP); acide 2,4,6-trinitrobenzene sulfonique (TNBS); Carcinoembryonic antigen (CEA); azoxymethane-dextran sodium sulfate (AOM-DSS)

Dans le cas des transferts de Treg spécifiques ou polyclonaux, la fréquence des Treg spécifiques et donc le ratio final entre Treg et Tconv spécifiques est important. Dans les fractions cellulaires de Treg polyclonaux, des Treg spécifiques d'un antigène donné sont présents à de très faibles fréquences. Malgré la migration de ces Treg antigènes-spécifiques au niveau des sites inflammatoires, leur faible nombre limite leur capacité à contrôler les réponses effectrices. Il n'est d'ailleurs pas impossible que l'effet thérapeutique observé après un transfert de Treg polyclonaux dépende de l'expansion des Treg antigène-spécifiques présents dans la fraction. Cela expliquerait en partie pourquoi un nombre très important de Treg polyclonaux est nécessaire pour avoir des effets protecteurs similaires à ceux observés suite au transfert de Treg spécifiques. Transférer directement des Treg spécifiques permet qu'un nombre plus important de cellules régulatrices migrent au niveau des sites inflammatoires pour y contrôler les cellules effectrices. La réactivité croisée du TCR des Treg pourrait également expliquer

l'effet protecteur des transferts de Treg polyclonaux. Ainsi, les Treg pourraient s'activer après stimulation de leur TCR par un antigène différent que celui pour lequel ils ont été sélectionnés dans le thymus.

Par ailleurs, les Treg peuvent contrôler les réponses immunitaires de façon antigène spécifique en arrachant les complexes CMH II/peptide à la surface des DC (Akkaya *et al.*, 2019). Ainsi, les Treg spécifiques possèdent un mécanisme de suppression supplémentaire par rapport aux Treg polyclonaux pour contrôler les réactions immunitaires. Néanmoins, les Treg sont capables de contrôler des réponses dirigées contre des antigènes dont ils ne sont pas spécifiques, on appelle cela une suppression « bystander ». Ainsi, les Treg polyclonaux activés par « leurs » antigènes sont potentiellement capables de contrôler, de façon bystander, en sécrétant des cytokines suppressives par exemple, les effecteurs spécifiques avoisinants. Cela se produit sous la condition qu'ils migrent au niveau des sites inflammatoires. En revanche, du fait de leur recrutement majoritaire au niveau des sites inflammatoires où se trouve leur antigène, les Treg spécifiques pourront non seulement contrôler les cellules effectrices de même spécificité, mais également contrôler ou du moins favoriser le contrôle des effecteurs d'une spécificité différente, mais impliquée dans la maladie.

En raison de leurs caractéristiques, les Treg spécifiques représentent un outil et une cible thérapeutique très intéressants dans les pathologies immunitaires où l'antigène ciblé (ou antigènes ciblés) par les réponses immunitaires aberrantes est connu, comme les allergies. De plus, ils semblent diminués et/ou perturbés dans ces maladies et l'augmentation de leur nombre et fonction est liée à une amélioration des manifestations cliniques dans l'allergie.

Afin d'augmenter leur fréquence, plusieurs stratégies sont possibles. Comme discuté précédemment, le transfert de Treg spécifiques en est une. Pour pallier la limite imposée par la très faible fréquence des Treg spécifiques, une des stratégies adoptées est la génération de Treg spécifiques en insérant des constructions de récepteurs spécifiques CAR ou TCR. Les CAR (Chimeric Antigen Receptor) sont composés de la région Fab d'un anticorps d'une spécificité choisie (allergène, auto-antigène, allo-antigène) fusionnée à un domaine de costimulation transmembranaire (souvent issu de CD28) et un domaine d'activation intracellulaire (chaîne CD3 ζ). Contrairement aux TCR, les CAR ne sont pas restreints par le CMH. Néanmoins, l'utilisation de CAR-Treg ou de TCR-Treg implique une étape supplémentaire de transduction des cellules avec le récepteur CAR (ou TCR) avant l'expansion et le transfert aux patients. Bien que ces stratégies aient permis l'obtention de résultats encourageants (Tableau 3) elles

comportent des limites : le faible nombre de Treg présents dans le sang périphérique des patients et leur taux d'expansion relativement long. Pour contourner cette limite, il serait possible de générer des CAR Treg (ou des TCR-Treg) à partir de Tconv chez qui l'expression de FOXP3 est induite conjointement au récepteur spécifique choisi. L'augmentation de l'expression de FOXP3 est possible grâce à l'insertion d'un promoteur ou d'un « enhancer » robustes dans le locus de *Foxp3*, afin de contourner la répression épigénétique de *Foxp3* dans ces cellules (Fransson *et al.*, 2012; Honaker *et al.*, 2020). Néanmoins, le transfert de Treg spécifiques reste une stratégie lourde et coûteuse, et partage les limites discutées dans la partie traitant sur le transfert adoptif de Treg polyclonaux (*cf.* Partie 2).

L'augmentation de la fréquence des Treg spécifiques peut également se faire *in vivo*, afin de s'affranchir des étapes d'isolation, d'expansion et de transduction, caractéristiques des transferts adoptifs de Treg spécifiques. L'une des stratégies utilisées est l'administration de l'antigène dans des conditions non inflammatoires comme c'est le cas pour les immunothérapies spécifiques utilisées pour traiter les patients allergiques (*cf.* Partie 3.B. La spécificité des Treg dans les immunopathologies et immunothérapies).

Ce principe est aujourd'hui rationalisé et optimisé dans des approches de vaccination tolérogène, visant à induire une tolérance immunitaire spécifique de l'antigène ciblé. Des stratégies utilisant soit un peptide mimétopé de l'insuline, soit de l'ADN codant pour un peptide de cette dernière ont montré une protection contre le développement de DT1 chez des souris NOD (Daniel *et al.*, 2011; Urbanek-Ruiz *et al.*, 2001). Cette protection est notamment associée à l'augmentation des Treg au niveau du pancréas et des ganglions pancréatiques (Daniel *et al.*, 2011). De nouvelles formulations pour favoriser l'émergence des Treg spécifiques ont récemment été développées. Dans l'équipe, des vecteurs tolérogènes basés sur des particules pseudo-virales ou VLP (« Virus-like particles », en anglais) pour encapsuler l'antigène et présentant des molécules immunomodulatrices à leur surface (CTLA-4) sont développés pour administrer l'antigène dans des conditions non inflammatoires favorisant l'induction de Treg (Vinot *et al.* données non publiées). De plus, la vaccination des souris sensibilisées à l'OVA par ces VLP tolérogènes (tVLP) a permis la réduction significative des signes cliniques de l'allergie lors des challenges oraux avec et jusqu'à 160 jours après les premières sensibilisations.

Une autre approche pour générer des Treg spécifiques est l'administration de l'antigène après induction de l'apoptose des cellules immunitaires par irradiation à des doses sub-létales ou par déplétion avec des anticorps anti-CD3 ou anti-CD4 (Kasagi *et al.*, 2014, 2019). En effet,

les cellules apoptotiques induisent la production de TGF- β par les phagocytes, favorisant la conversion des T CD4⁺ naïfs activés par l'antigène en pTreg FOXP3⁺. Ces pTreg sont d'ailleurs capables d'améliorer les manifestations auto-immunes dans des modèles d'EAE et de diabète de type 1 (Kasagi *et al.*, 2014).

Pendant ma thèse, nous avons choisi de combiner l'immunothérapie IL-2fd (qui favorise spécifiquement la survie, le maintien, la fonction et l'expansion des Treg) avec l'antigène, administré dans des conditions non inflammatoires afin de promouvoir le recrutement des Treg-spécifiques de l'antigène. Nous avons également évalué le potentiel thérapeutique de ces Treg dans un modèle murin d'allergie alimentaire à l'OVA.

OBJECTIFS

Mon projet de thèse a pour objectif général, d'étudier l'impact de l'association de l'IL-2fd et de l'antigène sur la biologie des Treg spécifiques et d'identifier les conditions optimales d'administration de cette combothérapie pour renforcer l'efficacité thérapeutique en agissant sur le recrutement de Treg spécifiques.

Nous pensons en effet que le recrutement de Treg spécifiques de l'allergène permettrait de contrôler/bloquer efficacement et sur le long terme les réponses allergiques effectrices et ainsi de générer une tolérance spécifique. Plusieurs études ont montré que les Treg spécifiques jouaient un rôle important dans l'induction de tolérance envers un allergène. Les Treg spécifiques d'antigène sont également mis en jeu dans les immunothérapies spécifiques de désensibilisation (ITA). Toutefois, ces immunothérapies sont longues, avec des effets secondaires, ce qui compromet fortement l'adhérence au traitement. Alors que notre proposition, si le pari est réussi, permettrait un traitement court pour un effet similaire.

Les objectifs de ma thèse sont donc :

1. L'optimisation de l'immunothérapie IL-2fd par combinaison avec l'antigène pour augmenter le recrutement des Treg spécifiques.
2. L'étude des conséquences fonctionnelles sur les lymphocytes T régulateurs et des effets thérapeutiques associés de la stimulation antigénique combinée à l'IL-2

Résultats

RESULTATS

A. Preuve de concept de l'utilisation de la combothérapie IL-2 faible dose et antigène pour optimiser le recrutement des Treg spécifiques et potentiel thérapeutique dans l'allergie alimentaire

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, les Treg, essentiels pour le maintien de l'homéostasie immunitaire, sont impliqués dans les maladies allergiques. Différentes études montrent des déficits dans le nombre et/ou la fonction de ces cellules chez les patients allergiques (Ling et al., 2004; Shreffler et al., 2009; Torgerson et al., 2007) alors que l'augmentation des Treg est, elle, associée à la résolution spontanée de l'allergie alimentaire ainsi qu'à l'induction de la tolérance après un traitement d'immunothérapie spécifique (M. Akdis et al., 2004 ; Karlsson et al., 2004). Mon équipe a récemment montré le potentiel thérapeutique de l'IL-2fd, une immunothérapie induisant l'amplification du nombre et de l'activité suppressive des Treg, dans des modèles murins d'allergie alimentaire.

Afin de renforcer l'induction d'une tolérance immunitaire spécifique pour une protection améliorée (et notamment précoce), nous avons décidé de renforcer l'amplification et le recrutement des Treg spécifiques de l'antigène. En effet, il a été montré que les Treg spécifiques d'un antigène sont plus efficaces que les Treg polyclonaux pour contrôler les réponses immunitaires dirigées contre cet antigène en particulier (Tableau 3). Nous avons émis l'hypothèse que l'association l'IL-2+antigène favoriserait l'activation et la prolifération des Treg spécifiques de cet antigène. Cependant, l'administration combinée d'IL-2fd et d'antigène n'est pas une approche anodine. Ce dernier pourrait notamment entraîner ou renforcer l'activation des Tconv pathogènes. Pour cela, il est nécessaire d'identifier les modalités d'administration de la combothérapie IL-2fd et antigène qui permettraient de renforcer les Treg spécifiques de l'antigène sans stimuler les Tconv spécifiques. Dans ce but, différentes cinétiques d'administration de l'antigène par rapport à l'immunothérapie IL-2fd (avant, après, pendant), ainsi que différentes doses et voies d'administration de l'antigène ont été testées. Afin d'évaluer l'effet de ces différentes modalités d'administration sur les Treg et les Tconv spécifiques de l'antigène, nous avons utilisé un modèle de transfert adoptif. Brièvement, des cellules enrichies en LT CD4⁺ (incluant Treg et Tconv) spécifiques de l'OVA issues de souris TCR-transgéniques DO11.10 ont été transférées chez des souris receveuses. Ces souris reçoivent ensuite l'OVA sous différentes doses et voies d'administration et sont traitées par

l'IL-2fd. Le traitement IL-2fd est constitué de 5 injections quotidiennes de 0,05 million IU en intrapéritonéale. Ce traitement, qui permet l'amplification des Treg, est couramment utilisé dans notre laboratoire (Churlaud et al., 2018; Grinberg-Bleyer et al., 2010). Plusieurs cinétiques d'administration de l'OVA par rapport à l'immunothérapie IL-2fd ont été testés. Pour la stratégie dite « J1 », l'immunothérapie IL-2fd débute le même jour que le transfert adoptif et l'administration d'OVA (Figure 10A) ; pour la stratégie J-3 celle-ci est initiée 3 jours après (Figure 10B). Les souris sont sacrifiées après la dernière injection d'IL-2fd et la prolifération ainsi que le phénotype des Treg et des Tconv spécifiques transférés sont étudiés.

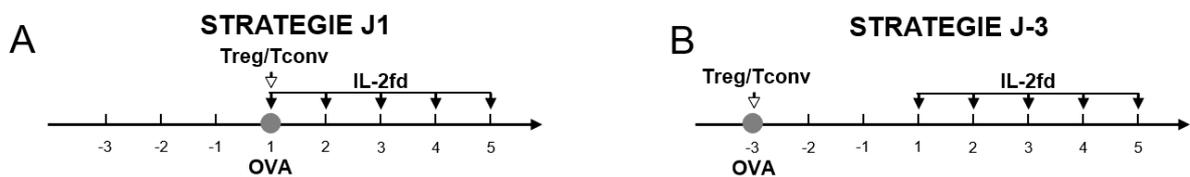


Figure 10. Différentes stratégies d'administration testées.

Les souris receveuses sont transférées avec des Treg et des Tconv spécifiques de l'OVA (flèche blanche) et reçoivent l'OVA (rond gris) soit (A) le premier jour de l'immunothérapie IL-2fd pour la stratégie J1 soit (B) 3 jours avant l'immunothérapie IL-2fd dans la stratégie J-3.

Nous avons mis en évidence, quel que soit la cinétique d'administration, que la combothérapie (IL-2fd+antigène) induit une augmentation significative du nombre absolu et de la prolifération de LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène par rapport aux contrôles IL-2fd et OVA seuls. Cependant, seule la stratégie J-3 favorise principalement l'expansion des Treg spécifiques (Article, Figure 1), contrairement à la stratégie J1 qui stimule également les Tconv spécifiques. Par la suite, nous avons montré qu'il était possible de moduler l'impact de la combothérapie en variant la dose d'antigène administrée (Article, Figure 2).

Afin d'évaluer l'effet de la combothérapie sur les Treg et Tconv spécifiques dans un contexte pathologique, nous avons utilisé un modèle murin d'allergie alimentaire à l'OVA. Pour cela, nous avons préalablement sensibilisé des souris avec un mélange d'OVA et d'alun puis nous avons déclenché l'allergie alimentaire par administrations orales répétées d'OVA. Les souris allergiques ont été traitées avec la combothérapie selon la stratégie J-3 (Figure 11) et les compartiments cellulaires endogènes ont été analysés. Nous avons montré dans ce modèle que la combothérapie permet également une augmentation du ratio Treg/Tconv spécifiques au niveau de la rate (Article, Figure 3).

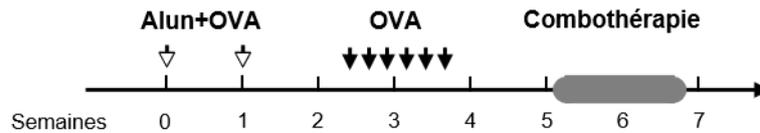


Figure 11. Schéma expérimental du protocole d'induction de l'allergie alimentaire.

Des souris BALB/c AnN ou BALB/c FOXP3-GFP sont sensibilisées avec un mélange d'OVA et d'alun, injecté à 7 jours d'intervalle par voie i.p. (flèches blanches). L'allergie alimentaire est déclenchée par des administrations orales d'OVA débutant au jour 17 du protocole (flèches noires). La combothérapie, administrée selon la stratégie J-3 débute 10 jours après la dernière administration orale d'OVA.

L'évaluation de l'effet thérapeutique précoce, également effectué dans le modèle d'allergie alimentaire, a permis de montrer que la combothérapie a un effet protecteur contre les manifestations cliniques sévères de l'allergie alimentaire. Cette protection précoce est associée à une augmentation des Treg spécifiques au niveau intestinal et à une diminution des cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) produites par les cellules des ganglions mésentériques. Cela représente une réelle optimisation par rapport à l'IL-2fd seule, où la protection contre l'allergie alimentaire se met en place plus tardivement (Bonnet et al., 2016).

De plus, des analyses phénotypiques *in vitro* ont permis de mieux caractériser l'impact de l'association IL-2 et antigène sur la biologie des Treg spécifiques. L'association de l'IL-2 et de l'antigène induit une forte expression de marqueurs associés à la survie, la stabilité, l'activation et la fonction suppressive des Treg.

Au total, ces résultats sont encourageants mais des modifications supplémentaires du protocole d'administration de la combothérapie permettraient d'augmenter la protection observée en améliorant le recrutement des Treg spécifiques au niveau des sites inflammatoires.

Article à soumettre: Sequential administration of antigen and low-dose IL-2 promotes antigen-specific Treg recruitment and improves the therapeutic efficacy of IL-2 immunotherapy in a mouse food allergy model

Helena Moguel¹, James Vigneron¹, Yanis Feraoun¹, Bruno Gouritin¹, Gwladys Fourcade¹, Hélène Vantomme^{1, 2}, David Klatzmann^{1, 2}, Bertrand Bellier^{1,2,*}

¹Sorbonne Université, INSERM, UMR_S 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3), 75005, Paris, France.

²Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B), Hôpital Piti  -Salp  tr  ri  re, AP-HP, 75651, Paris, France

* corresponding author

Abstract

Background: The increasing allergy occurrence emphasizes a dire need for new therapeutic approaches to treat these atopic disorders. New therapies have arisen from the understanding of the physiopathological mechanisms of allergic reactions. Based on the central role of Tregs in the establishment and the maintenance of immune tolerance, we chose to develop a Treg-based immunotherapy to treat food allergy. Our team have proved the therapeutic potential of low-dose IL-2 (ld-IL2) in a food allergy model showing that ld-IL2 can increase Treg numbers and immunosuppressive functions. However, immediate protection was not achieved in therapeutic setting and the role of antigen-specific Tregs for protection is currently highlighted. Thus, we aimed to combine ld-IL2/antigen to selectively increase the antigen-specific Tregs. However, questions remain regarding the administration modalities of both IL-2 and antigen.

Method: In order to identify the best administration settings of ld-IL2 and antigen, we transferred OVA-specific TCR-transgenic CD4+ T lymphocytes, including both Tregs and non-Treg (Tconv) cells into non-TCR transgenic mice. By following the fate of these transferred cells, we explored how the route, dose and timing of administration of OVA affect these two populations when combined with ld-IL2. We also assessed the early therapeutic efficacy of the ld-IL2+OVA combotherapy in a food allergy mouse model to ovalbumin.

Results: We first found that the kinetics of IL-2 and OVA administration influences directly the Treg and Tconv compartments. We show in the adoptive model that administration of OVA three days prior the beginning of ld-IL2 treatment favours the OVA-specific Treg expansion over the OVA-specific Tconv which is not the case when OVA and ld-IL2 are given

simultaneously. We confirmed that this regimen similarly increases the OVA-specific Treg in allergic mice. Importantly, this combotherapy improves the immune protection against allergic reactions after per os OVA challenges in sensitized mice that is associated with an increase of antigen-specific Treg in the lamina propria of protected mice.

Conclusion: While successful immunotherapy and treatment of allergic individuals often correlate with an increase in Tregs, the combination of allergen and IL-2 at low doses could be a significant improvement of allergen-specific immunotherapy efficacy. However, specific administration modalities must be clearly evaluated to avoid severe side effects caused by the stimulation of pathogenic Tconv. Our study should be helpful to define such combo-therapy.

Introduction

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells (Tregs) are critical to control innate and adaptive immune responses and maintaining immune tolerance. Deficiencies in Treg cells have been associated with severe autoimmune diseases and chronic inflammation, but also linked to the development of allergic diseases. Indeed, severe allergic reactions such as food allergy, atopic dermatitis, eosinophilia and hyper-Ig syndrome are some of the clinical manifestations of IPEX syndrome patients (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) (Torgerson *et al.*, 2007), characterised by a Treg deficit due to a loss-of-function mutation in *Foxp3*.

Besides, allergy severity is associated with lower frequency of Tregs (Shreffler *et al.*, 2009) and the suppressive capacity of Tregs from atopic individuals (without defects in Treg numbers) is reduced in comparison to healthy individuals (Ling *et al.*, 2004). In the other hand, Treg increase is associated to spontaneous resolution of food allergy as well as tolerance induction following specific immunotherapy treatment (M. Akdis *et al.*, 2004; Karlsson *et al.*, 2004).

As research on Tregs has highlighted their key role in immune homeostasis and immunopathologies such as allergies, therapeutic strategies aiming to harness their suppressive capacities have emerged. The low-dose IL-2 (ld-IL2) is one of them, based on the vital role of IL-2 for Treg development, survival, expansion and function. When used at low-dose, IL-2 selectively activates Tregs without significant effect on Tconv and induces polyclonal Tregs expansion.

Our previous work showed that ld-IL2 induced a long-term, Treg-dependent protection against severe clinical manifestation of food allergy in mice. However, it is still unknown

whether Treg-mediated tolerance is antigen specific and how Treg specificity can improve their therapeutic effect.

Several studies have shown that antigen-specific Tregs have enhanced suppressive capacities in comparison to polyclonal Tregs (Fujio et al., 2006; Tarbell et al., 2004; Tran et al., 2020) as antigen-specific Tregs can be recruited locally where the antigen is and thus can directly control pathogenic effector cells (Blat et al., 2014; Cabello-Kindelan et al., 2020; Fransson et al., 2012). Interestingly, a recent study has shown that Th2 cells and Tregs target disparate proteins in allergic patients, highlighting the importance of Treg antigen-specificity for tolerance induction in humans (Bacher et al., 2016).

As a result, we investigated the possibility to optimize Id-IL2 therapy by combining it to antigen administration in order to increase antigen-specific Treg recruitment to treat food allergy. In this study, we showed that depending of the administration modalities of the Id-IL2 and antigen combotherapy Treg and Tconv compartments are variably affected. We demonstrated that when antigen is administrated before Id-IL2 immunotherapy, antigen-specific Tregs are increased with poor to none stimulation of the Tconv compartment. The local increase of antigen-specific Tregs was correlated with early protection from severe allergic reactions in therapeutic settings.

Materials and methods

Mice

Female BALB/C (AnNR/J) mice from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France), female BALB/c FOXP3-GFP (H-2^d), female OVA-specific OTII x FOXP3-GFP transgenic mice (H-2^b) and female and male OVA-specific DO11.10 x FOXP3-GFP transgenic mice (H-2^d), bred in our own animal facility (UMS28), were used at aged from 7 to 20 weeks. Mice were maintained in our animal facility 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 ethics committee and French authorities (#32149-2021082617476358).

Combotherapy

For IL-2 treatment, mice received a daily injection of human IL-2 (Proleukin; Novartis) by i.p. route during 5 consecutive days at the dose of 50,000 IU/injection in 100 μ L. For OVA treatment, mice received 1 μ g, 10 μ g, 100 μ g, and 200 μ g of ovalbumin (OVA) (A5503; Sigma-

Aldrich) in 100 μ L of PBS injected by i.v., i.p. or s.c. route at different time points. Control mice received PBS. In the adoptive transfer model, mice were sacrificed 2 hours after the last IL-2 injection.

Induction of OVA-specific food allergy in mice.

BALB/c or BALB/c FOXP3-GFP mice were sensitized twice at 1-wk interval by i.p. injection of 10 mg OVA (A5503; Sigma-Aldrich) mixed with 500 mg aluminum hydroxide (Alum) gel (AIH303; Sigma). Allergy was then induced 10 days later by OVA p.o. administrations (20 mg/mouse), five times within a 10-day period in average. Severity of allergic response was assessed 30–40 min after the last induction by measuring changes in body temperature using a rectal thermometer (Bioseb, Vitrolles, France) and by evaluating clinical score (which includes the severity of diarrhea graded from 0 to 3 points and appearance of hirsute pelage marked out 0 to 2 points) as previously described (Bonnet *et al.*, 2016). The global clinical score includes both the body temperature drop (ex. -2 $^{\circ}$ C is equivalent to 2 points) and the clinical score.

Isolation of immune cells

Spleens were isolated and dissociated in PBS 1X 3% Fetal Calf Serum (FCS, Sigma). Red blood cells (RBCs) were lysed with 1 mL ammonium-chloride-potassium buffer and then washed with 9 mL PBS 1X 5% FCS. Lymph nodes were isolated and dissociated in PBS 1X 5% FCS. Lamina propria lymphocytes from small intestine (SI) were isolated as previously described with minor modifications (Bonnet *et al.*, 2016). In brief, SI was harvested and Peyer's patches (PP) were removed. The tissue was then cut in small pieces and incubated 30 min on ice in PBS 1X 5mM EDTA. After 3 PBS 1X washes, the tissue was incubated with 1 mg/mL collagenase IV (Sigma) and 0.1 mg/mL DNase (Roche Applied Science) for 30-45 min at 37 $^{\circ}$ C in a shaker (150 rpm). The tissues were smashed, passed through a 40 mm cell strainer, and washed in complete RPMI 1640 (Sigma) 3% FCS. Lymphocytes were isolated by discontinuous density centrifugation in Percoll 40/80. Isolated cells were centrifuged twice at 1300 rpm for 7 min at 4 $^{\circ}$ C, passed through a 40 mm cell strainer, and resuspended in complete RPMI 10% FCS medium.

Magnetic enrichment of CD4+ T cells

Cells isolated from the spleen and lymph nodes of FOXP3-GFP DO11.10 transgenic mice were counted and then labelled with anti-B220 (BD Biosciences), anti-Ter119 (BD Biosciences), anti-CD11c (BD Biosciences), anti-CD8 (eBioscience), and anti-NKp46 (eBioscience) antibodies all coupled to biotin, for 20 minutes at 4°C. The cells were then incubated in the presence of anti-biotin magnetic beads (Miltenyi Biotec) and separated using an autoMACS Pro sorter (Miltenyi Biotec) by negative selection according to the manufacturer recommendations. The enriched cell suspension including both Tregs and Tconvs was either used for flow cytometry cell sorting or used for adoptive transfer in mice.

Cell sorting

Freshly enriched CD4+ T cells were sorted by flow cytometry (BD FACS ARIA II, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) after cell labelling with anti-CD3 PE eFluor610 (eBioscience) and anti-CD4 V500 (BD Biosciences). Highly purified Treg (>95%) were obtained by sorting GFP+ cells.

Treg cell culture

Cells were cultured at 37°C, 5% CO₂, in RPMI supplemented with 10% FCS, Pen Strep Glutamine 1X (Life Technologies), 5 mL HEPES 1M, 0.5 mL beta-2-mercaptoethanol and 20 ng/mL of Mouse GM-CSF (Miltenyi). Enriched CD4+ T cells or GFP+ purified Tregs were cultured at 2 x 10⁵/well and stimulated with 1 μM (or 0.0001; 0.001; 0.01; 0.1 μM) OVA³²³⁻³³⁹ peptide (GenScript) and/or with 100 IU/mL IL-2 (Proleukin, Novartis) in the presence of irradiated B220+, Ter119+, CD8+, CD11c+, NKp46+ splenocytes (5 x 10⁴/well). The expression of different Treg-associated markers for activation, survival, polarization and function was assessed by flow cytometry 3 days later (unless otherwise indicated). 6 x 10⁵ anti-CD3/anti-CD28 activator beads per well were used as a non-specific stimulation control.

CytoBox Th1 mouse and CytoBox Th2 mouse (Miltenyi) were used to create polarizing conditions accordingly to manufacturer conditions: 10 ng/mL of IL-12 and 10 μg/mL for anti-IL-4 antibody were added for Th1 polarizing conditions, and 10 ng/mL of IL-4 and 10 μg/mL for anti-IFN-γ antibody were added for Th2 polarizing conditions.

Adoptive transfer of CD4+ T cells

Enriched CD4+ T cells from mice DO11.10 x FOXP3-GFP (BALB/c background) were labelled with CellTrace Violet (ThermoFisher Scientific) and $5-9 \times 10^6$ cells were i.v. injected (retro-orbital route) into naive recipient sex-matched BALB/c AnNRj or BALB/c FOXP3-GFP mice.

Flow cytometry

Isolated cells were stained with the following Abs at predetermined optimal dilutions for 30-60 min at 4°C: Annexin V-APC, Bcl2-eFluor 450, CD25-APC A700, CD44-Biotin, CD44-PC7, CD44-PE, CD45-PECF594 and CD4-V500 from BD Biosciences; CD62L-eFluor 450, CD73-PE, CTLA-4-Biotin, CTLA-4-PE, FOXP3-FITC, GARP-PE, GATA-3-APC, GATA-3-PC7, GITR-PE, GranzymeB-PE, ICOS-APC, KJ1.26-PC7, Lag3-eFluor 450, Fixable Viability Dye eFluor 780, Perforin-APC, ROR γ t-PE, Vb5-APC, Nrp-1-APC, IFN- γ -eFluor450, ICOS-BV421 from eBioscience; CD39-ECD, CD83-APC, OX40-BV421, TNFR2-APC, Zombie Red, Zombie Violet from Biolegend; Streptavidine-APC-e780, TIGIT-PC5.5 from Invitrogen and Tbet-PE-Vio615 from Milteniy.

Intracellular detection of Bcl2-eFluor 450 (BD Biosciences), FOXP3-FITC (eBioscience), GranzymeB-PE (eBioscience), IFN- γ -eFluor 450 (eBioscience), Perforin-APC (eBioscience), ROR γ t-PE (eBioscience), and Tbet-PE-Vio615 (Miltenyi) were performed on fixed and permeabilized cells using the FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). Cells were acquired on an CytoFLEX (Beckman Coulter) and analyzed with CytExpert (Beckman Coulter) or FlowJo software (Tree Star). Dead cells were excluded by forward/side scatter gating, Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience), Zombie Red (Biolegend) or Zombie Violet (Biolegend) staining. Tregs were defined as CD4+FOXP3+(CD25+) cells, Tconv as CD4+FOXP3- cells, and activated effector T cells (Teff) as CD4+CD25+FOXP3- cells.

Stimulation index

The stimulation index was calculated by dividing the absolute number of cells in the IL-2, OVA or IL-2+OVA groups by the absolute number of cells in the control group (PBS).

ELISPOT assays

OVA-specific production of IFN- γ , IL-4, and IL-10 were determined by murine ELISPOT assay (Mabtech, Nacka Strand, Sweden). In brief, 5×10^5 cells/well (or 2×10^5 for IFN- γ) were

restimulated for 48 h in duplicates at 37°C in 5% CO₂ with 100 µg OVA protein (0.5 mg/mL final). Medium alone and Con A (Sigma) at 2 µg/mL final were used as negative and positive controls, respectively. Spots were counted with an AID ELISPOT reader (ELR03; AID Autoimmun Diagnostika, Strassberg, Germany). Results, expressed as spot-forming units (SFU) per 10⁶ cells, represent the mean of duplicates.

ELISA assays

IFN-γ, IL-10, IL-4, and IL-5 secretion levels were measured by murine ELISA assays (eBioscience) in supernatants of cells (5 x 10⁵ cells/well) cultured during 72 h in 96-well plates (Nunc, Denmark) in complete RPMI 1640 with 100 mg OVA (0.5 mg/mL final).

The OD was read at 450 nm using an automatic ELISA plate reader (DTX 880, Multimode detector; Beckman Coulter).

Statistical analyses

Statistical significances were evaluated between the treated groups and control subjects using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) using the Mann–Whitney U test (comparison of rank, unpaired test, nonparametric test, two-tailed p value) with * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001.

Results

Sequential administration of low-dose IL-2 and antigen improves the expansion of antigen-specific Treg in an adoptive transfer model

In order to evaluate the impact of the administration settings of the Id-IL2 and antigen combotherapy on the expansion of antigen-specific Tregs and Tconvs, with the specific aim to identify the ones favouring the most the antigen-specific Treg expansion, we chose an adoptive transfer model as the natural frequency of antigen-specific cells is very low. We transferred CTV+ OVA-specific TCR-transgenic CD4+ T lymphocytes from DO11.10 x FOXP3-GFP mice into BALB/c recipients and analysed specifically the expansion and the activation of antigen-specific Tregs and Tconvs (Figure 1A). At first, we assessed the impact of two different administration strategies on these antigen-specific cell populations. In the first one, called “D1” strategy, the OVA antigen was administrated the first day of the Id-IL2 therapy (Figure 1B). In the second one, called “D-3”, OVA was administrated 3 days prior the beginning of the

ld-IL2 therapy (Figure 1C). We observed that the absolute number of antigen-specific Tregs, identified by KJ1.26 staining (an anti-DO11.10 clonotypic TCR) was significantly higher in both strategies when ld-IL2 and OVA are combined as compared to IL-2 or antigen alone (Figure 1B-C, upper graphs). This increase of Treg absolute numbers is correlated with a significant improvement of their cell proliferation assessed by the CTV dilution (Figure 1B-C, middle graphs) that is mainly antigen-driven as shown by the high proliferation with OVA alone. Since Tconv were also stimulated by these combotherapies (unpublished data), we calculated the ratio between antigen-specific Treg/Tconv to identify which of the two strategies favour the Treg compartment. Notably, with the D1 strategy, there is no significant difference of the Treg/Tconv ratio when ld-IL2 and OVA are combined in comparison to controls (Figure 1B, lower panel). In contrast, with the D-3 strategy, we noted a high and significant increase of the Treg/Tconv ratio compared to OVA or IL-2 alone. Surprisingly, ld-IL2 alone had no effect on the transferred cells (both Tregs and Tconvs) while endogenous Tregs were positively affected (data not shown). Importantly, when stimulation indexes were calculated, we confirmed that the D-3 combotherapy significantly favoured Treg expansion over Tconv expansion, making this the most suitable strategy to attain our goal (Figure 1B-C, lowest graphs). These results highlight the importance of the combination of ld-IL2+antigen and its specific kinetics of administration to enhance the antigen-specific Treg compartment.

In vitro and in vivo effects of antigen dose in the D-3 combotherapy on Treg expansion

The administration parameters being important, we evaluated the impact of the antigen dose on the antigen-specific Treg and Tconv compartments.

First, enriched CD4⁺ T cells of DO11.10 x FOXP3-GFP mice were cultured with different doses of OVA³²³⁻³³⁹ peptide in association or not with IL-2. We observed a dose-dependent increase in the numbers of OVA-specific Tregs, which seems to be systematically stronger in the presence of IL-2 (Figure 2A, left). When the division of the cells was analysed, we confirmed the dose-dependent effect with maximum proliferation observed at a dose of 0.01 μ M of OVA³²³⁻³³⁹ peptide, whether IL-2 was present or not (Figure 2B, left). A dose-dependent effect was also seen for the frequency of proliferative Tconvs, but with no impact of IL-2 association and maximal Tconv expansion at intermediate doses of antigen (Figure 2A, right). Interestingly, for the lowest OVA³²³⁻³³⁹ peptide doses (0.0001 - 0.01 μ M), we observed that the proliferation of the OVA-specific Tregs was systematically higher to those of Tconvs (Figure

2B). Altogether, these results reveal that expansion of OVA-specific Tregs can be achieved with none or minimal OVA-specific Tconv expansion depending of the antigen dose.

We next sought to evaluate *in vivo* the impact of the antigen dose within the D-3 combotherapy. Different doses (1 µg, 10 µg, 100 µg, and 200 µg) of OVA protein were administrated just before the adoptive transfer of DO11.10 CD4⁺ T cells and 3 days prior the Id-IL2 immunotherapy. A dose-dependent increase of the OVA-specific Treg number, the Treg proliferation and the Treg/Tconv ratio were observed (Figure 2C, 2D, 2F). Notably, the stimulation index clearly showed that the two highest doses (100 µg and 200 µg) favour the OVA-specific Treg compartment while the 200 µg dose seemed to slightly stimulate Tconv cells (Figure 2E). We can conclude that there is a distinct impact of the antigen dose on each one of the antigen-specific compartments and this difference of Ag-specific sensitivity could allow a specific targeting of Treg.

The D-3 combotherapy improves the recruitment of antigen-specific Treg in allergic mice

We next tested if the D-3 strategy could favour the recruitment of endogenous OVA-specific Treg cells in a food allergy mice model. For this, mice were sensitized with OVA and alum, and then orally challenged with 20 mg of OVA until the onset of food allergy. Ten days after the last oral challenge with OVA, mice were injected subcutaneously with 100 µg of OVA and 3 days later they received 50,000 IU/day IL-2 (i.p.) for 5 days. As controls, mice were injected with PBS, IL-2 alone or OVA alone. As expected, allergic mice treated with Id-IL2 have higher frequency of total Tregs in the spleen and mesenteric lymph nodes than PBS-treated mice (Figure 3A), and the difference is significant in the spleen. More importantly, the global Treg frequency is even higher in the IL-2+OVA treated than in the Id-IL2 treated mice.

When we analysed the OVA-specific compartments, we noted an increase of the Treg/Tconv ratio in the spleen of IL-2+OVA treated mice compared to IL-2 alone treated mice. This ratio is also higher and significantly different in IL-2+OVA treated mice in comparison with mice treated with OVA alone (Figure 3B). However, modifications of the antigen-specific Treg/Tconv ratio were not observed in the mesenteric lymph nodes (Figure 3B) nor the lamina propria (data not shown). Altogether, our results show that the D-3 combotherapy seems to favour at systemic level the endogenous OVA-specific Treg compartment in allergic mice.

The D-3 combotherapy improves clinical signs of food allergy in a mice model

The early therapeutic efficacy of the Id-IL2+OVA D-3 combotherapy was next investigated. Mice were treated as previously and 3 days after the combotherapy, they were orally challenged 3-times at 2 day-interval with OVA before monitoring the allergic reactions (see the *Materials and methods* section). We observed that in contrast to IL-2 treated mice, IL-2+OVA mice were protected from extremely severe anaphylaxis and had lower global score than controls in this 1st cycle of challenges after treatment (Figure 4A). This protection was associated with an increase in number (Figure 4B) and frequency (Figure 4C) of antigen-specific CD4⁺ T cells in the lamina propria, including antigen-specific Tregs. Interestingly, we noted that the antigen-specific Tconv compartment was increased in IL-2+OVA treated mice despite the fact that no aggravation of the disease was noted (Figure 4B, 4C), revealing an effective control of their activity. In this line, we observed a decrease of IL-4-secreting cell numbers measured by ELISPOT and IL-13 production measured by ELISA in the MLN of IL-2+OVA treated mice compared to other experimental groups (Figure 4D). However, no signs of a shift from pathogenic Th2 polarization to protecting Th1 and Th17 polarisation were seen as no significant changes in IL-17 production (Figure 4D) or IFN- γ -secreting cell numbers (data not shown) of IL-2+OVA treated mice were observed in the MLN.

Taken together, these results show that the IL-2+OVA combotherapy can induce early protective effect against severe allergic reaction that may be related to the Th2 cytokine-unresponsiveness (IL-4 and IL-13) due to OVA-specific Treg increase.

Effect of the IL-2 and antigen association on the Treg biology

To better understand the impact of the combination of IL-2 and antigen on Treg biology, we cultured FACS-sorted OVA-specific TCR transgenic Tregs in presence of the OVA peptide in association or not with IL-2. First of all, we confirmed that the combination of IL-2 and antigen, induced the highest number of antigen-specific Tregs *in vitro* compared to OVA or IL-2 independent stimulation (Figure 5A). We next wanted to characterize more specifically the impact of IL-2 and antigen on Treg cell biology. We confirmed that IL-2 has a major effect on the Treg survival, as shown by the significant increase of the Bcl-2 protein expression in Treg culture with IL-2 (IL-2 and IL-2+OVA) (Figure 5B). This anti-apoptotic effect of IL-2 was confirmed after analysing the survival of Tregs after treatment with pro-apoptotic molecules (data not shown).

We next looked at CD83 and TNFR2 expression as they have been associated to Treg stability: both are increased in presence of OVA, highlighting the importance of the antigen to maintain the stability of Treg phenotype. We also analysed several activation-related Treg markers especially those associated to highly suppressive Treg populations (Figure 5 E-K). We found that the level of expression or the frequency of expression of these markers were systematically the highest among antigen-specific Tregs in the IL-2+OVA condition, indicating the major effect of IL-2 and antigen on the Treg function. This was confirmed with the highest expression of the CTLA-4 and CD39 suppression-associated molecules observed when antigen is added in the cultures.

Overall, the expression profile of Treg markers reveals, with few exceptions, that both IL-2 and antigen are needed to induce enhanced survival, stability, activation and function abilities of Tregs. Furthermore, as co-expression of FOXP3 with other master regulatory transcription factors such as T-bet and GATA-3 is associated with optimal control of immunopathogenic responses, we sought to evaluate the impact of the combotherapy on the Treg polarization. In absence of Th1/Th2 polarizing cytokines, we observed that IL-2 and OVA alone slightly increase the frequency of T-bet-expressing Tregs, but is the IL-2+OVA condition that showed the highest proportion of antigen-specific Treg expressing T-bet (Figure 6A, left). The optimal induction of T-bet+ Tregs by the combotherapy was confirmed in presence Th1-polarizing cytokines (Figure 6B, left). Notably, IL-2 and antigen separately are not prone to induce T-bet+ Tregs. IL-2 appears to be more favourable to the induction of Th2-like Tregs, as shown by the increase of GATA-3+ Tregs in non-polarizing and Th2- polarizing conditions. Nevertheless, the proportion of GATA-3+ Tregs was at least 3 times higher in Th2 polarizing conditions (Figure 6B, right).

Surprisingly, a small percentage of Treg expressed either GATA-3 in Th1 polarizing conditions or T-bet in Th2 polarizing conditions.

Taken together, these results confirm that the combotherapy does not interfere with the Treg capacity to co-express master regulatory transcription factors accordingly to the polarizing conditions. Even more, IL-2 and antigen are both necessary for Treg to achieve maximal expression of both FOXP3 (data not shown) and T-bet or GATA-3.

Discussion

The antigen specificity of Tregs and its role in the control of immune reactions leading to the peripheral tolerance has been an interesting yet elusive question for researchers. Nevertheless, despite the technical limitations, previous studies have highlighted how the antigen specificity of Tregs is important to preserve tissue integrity (Samy *et al.*, 2005; Seddon & Mason, 1999; Serr *et al.*, 2016). Recently, it has been showed in the context of allergy that specific Th2 responses against a particular allergen are only observed in the complete or partial absence of allergen-specific Tregs (Bacher *et al.*, 2016), highlighting the key role of allergen-specific Treg in the control of allergic reactions. Besides, higher frequency of allergen-specific Tregs was associated with a milder form of cow's milk allergy in children (Shreffler *et al.*, 2009). Similarly, as the success of antigen-specific immunotherapy (AIT) correlates with an increase in Tregs, recent studies have shown that this increase particularly concerns allergen-specific Tregs (Boonpiyathad *et al.*, 2019; Syed *et al.*, 2014b). Aside of these results pointing to the beneficial role of antigen-specific Tregs in allergic disease, several studies have established that antigen-specific Tregs are more effective than polyclonal Tregs to control allergen-induced responses. Indeed, adoptive transfer experiments showed antigen-specific Treg were able to control allergic responses while polyclonal Treg transfers didn't have any protective effect when transferred at equivalent numbers (Kearley *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2008). Similar results were found in several auto-immune disease models (Blat *et al.*, 2014; Cabello-Kindelan *et al.*, 2020; Stephens *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2004; Tarbell *et al.*, 2004). As a result, targeting or improving antigen-specific Tregs appears a promising strategy to treat auto-immune and allergic diseases. However, the question of how to specifically target and activate antigen-specific Tregs remains.

In order to enhance antigen-specific Treg recruitment, we proposed to combine antigen administration with Id-IL2 immunotherapy. We showed in an adoptive transfer model that antigen administration 3 days prior to the Id-IL2 immunotherapy efficiently increases antigen-specific Tregs with limited stimulation of the antigen-specific Tconvs. More importantly, we also demonstrated the early protective effect of this combotherapy in a food allergy model, which was associated to an increase in antigen-specific Tregs and a decrease in Th-2 cytokine production. Recently, other teams have used similar approaches to increase antigen-specific Treg numbers. Izquierdo *et al.* showed administration of peptide/MHC tetramers (carrying a mimotope) 3 days prior to IL-2:anti-IL-2 complex treatment increases the frequency of

antigen-specific Tregs with poor expansion of specific Tconvs and protects mice from type 1 diabetes development (Izquierdo *et al.*, 2018). Phan *et al.* combined Fc-fused IL-2 mutein and anti-DEC-OVA fusion protein administration and showed the expansion of adoptively-transferred OVA-specific OTII Tregs without expansion of OTII Tconvs when antigen and IL-2 are injected 3 days apart (Pham *et al.*, 2021).

In our model, we showed that the strategy in which antigen was added 3 days before Id-IL2 immunotherapy (D-3 strategy) was the optimal strategy to favour antigen-specific Tregs. This may appear surprising to start with antigen administration since it could trigger allergic reactions. However, the low dose and the non-inflammatory administration conditions are prone to induce the expansion of antigen-specific Tregs that are later boosted by Id-IL2 immunotherapy. To further improve the recruitment of antigen-specific Treg and avoid Tconv activation, optimizations can be made in the antigen formulation. We and others have proposed to encapsulate the antigen in nanoparticles (Basomba *et al.*, 2002; Gamazo *et al.*, 2014; Srivastava *et al.*, 2015) or VLPs (Virus-like particles) (Patent #FR3072973A1) aiming the “hiding” of the antigen and to prevent inflammatory responses. In addition, immunomodulatory molecules can be associated as we made by displaying CTLA-4 onto the VLPs to promote immune tolerance and Treg activation and expansion (unpublished results). Other administration kinetics could result in the same effect. We hypothesized that administrating the antigen after the Id-IL2 therapy would selectively boost the expansion of the antigen-specific Tregs among the IL-2-activated Tregs. We also hypothesized that the combined administration of Id-IL2 and antigen could also promote antigen-specific Treg expansion. Nevertheless, in our experimental settings (D1 strategy), we showed that the co-administration of antigen at the Id-IL2 initiation achieves a similar expansion of antigen-specific Tregs and Tconvs. Preliminary results also showed that adding the antigen after the Id-IL2 therapy highly stimulate the antigen-specific Tconv compartment (data not shown).

Interestingly, when we tested the therapeutic efficacy of the D-3 strategy we found out that, contrary to what we had seen in the adoptive transfer model, antigen-specific Tconvs were highly stimulated in allergic mice. This discordance might be due to the allergy-related inflammation. However, despite of the Tconv expansion, mice were protected against severe allergic manifestations and a lower production of Th2 cytokines was observed in these mice. This indicates that local antigen-specific Treg expansion may be sufficient to control the antigen-specific Tconvs. In this line, the local expansion of antigen-specific Tregs in the

intestine could be sought and enhanced by oral administration of the antigen. Indeed, when analysing the expansion of antigen-specific Tregs before oral challenge, the cells are mostly found in the spleen rather than in the MLN or the lamina propria (data not shown), while antigen-specific Tregs are mostly found in the lamina propria after oral challenges. This leads us to think that an improvement of the D-3 strategy would be to propose oral administration of the antigen using a gastrointestinal proteases resistant form of the antigen (Serradell *et al.*, 2019).

Importantly, the combotherapy appears to promote Treg survival and stability, which is of paramount importance for therapeutic strategies as instable Tregs could lead to loss of suppressive capacities and disease aggravation (Noval Rivas *et al.*, 2015). The combination of IL-2 and antigen seems to improve the suppressive activity of Treg as shown by the increase of function-related molecules such as CTLA-4, CD39 and GITR. Indeed, the level of CTLA-4 on Tregs is associated with a higher suppressive capacity (Levine *et al.*, 2014) and a better control of immune reactions in atopic and allergic situations (Ling *et al.*, 2004). Besides, we also showed that the combotherapy doesn't interfere with plasticity of the Treg population since, in polarizing conditions, Tregs conserved their ability to co-express T-bet or GATA-3 in addition to FOXP3. This specific Th-like phenotype of Tregs may be important to their efficient control of Th1 and Th2 responses (Koch *et al.*, 2009; Levine *et al.*, 2017; Raffin *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2009).

Altogether, the combotherapy that we proposed is an interesting strategy to stimulate the expansion of antigen-specific Tregs without having to resort to CAR Treg production, which is a long and costly alternative. We showed that D-3 strategy has a protective effect against severe allergic reactions and the combination of IL-2 and antigen promotes Treg survival, stability, activation and suppressive capacities. Further optimisation of antigen formulation and delivery can be proposed to favour site-specific targeting and recruitment of these cells at the site of inflammation (airways, skin, gastro-intestinal tract).

Acknowledgments

We thank the staff at Centre experimentation et Formation (UMS28) especially Kim, Polina, Doriane and Flora for taking care of the mice and Asmat Ullah and Faustine Brimaud for technical assistance.

References

Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., & Akdis, C. A. (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(11), 1567–1575.

Bacher, P., Heinrich, F., Stervbo, U., Nienen, M., Vahldieck, M., Iwert, C., Vogt, K., Kollet, J., Babel, N., Sawitzki, B., Schwarz, C., Bereswill, S., Heimesaat, M. M., Heine, G., Gadermaier, G., Asam, C., Assenmacher, M., Knemeyer, O., Brakhage, A. A., ... Scheffold, A. (2016). Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell*, 167(4), 1067-1078.e16.

Basomba, A., Tabar, A. I., De Rojas, D. H. F., García, B. E., Alamar, R., Olaguibel, J. M., Prado, J. M. Del, Martín, S., & Rico, P. (2002). Allergen vaccination with a liposome-encapsulated extract of *Dermatophagoides pteronyssinus*: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109(6), 943–948.

Blat, D., Zigmund, E., Alteber, Z., Waks, T., & Eshhar, Z. (2014). Suppression of murine colitis and its associated cancer by carcinoembryonic antigen-specific regulatory T cells. *Mol. Ther.*, 22(5), 1018–1028.

Bonnet, B., Vigneron, J., Levacher, B., Vazquez, T., Pitoiset, F., Brimaud, F., Churlaud, G., Klatzmann, D., & Bellier, B. (2016). Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell–Mediated Control of Experimental Food Allergy. *J. Immunol.*, 197(1), 188–198.

Boonpiyathad, T., Sokolowska, M., Morita, H., Rückert, B., Kast, J. I., Wawrzyniak, M., Sangasapaviliya, A., Pradubpongsa, P., Fuengthong, R., Thantiworasit, P., Sirivichayakul, S., Kwok, W. W., Ruxrungtham, K., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2019). Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy. *Allergy*, 74(5), 976–985.

Brotons-Canto, A., Gamazo, C., Martín-Arbella, N., Abdulkarim, M., Gumbleton, M., Quincoces, G., Peñuelas, I., & Irache, J. M. (2019). Mannosylated Nanoparticles for Oral Immunotherapy in a Murine Model of Peanut Allergy. *J. Pharm. Sci.*, 108(7), 2421–2429.

Cabello-Kindelan, C., MacKey, S., Sands, A., Rodriguez, J., Vazquez, C., Pugliese, A., & Bayer, A. L. (2020). Immunomodulation followed by antigen-specific treg infusion controls islet autoimmunity. *Diabetes*, 69(2), 215–227.

Fransson, M., Piras, E., Burman, J., Nilsson, B., Essand, M., Lu, B. F., Harris, R. A., Magnusson, P. U., Brittebo, E., & Loskog, A. S. I. (2012). CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *J. Neuroinflammation*, 9, 1–12.

Fujio, K., Okamoto, A., Araki, Y., Shoda, H., Tahara, H., Tsuno, N. H., Takahashi, K., Kitamura, T., & Yamamoto, K. (2006). Gene Therapy of Arthritis with TCR Isolated from the Inflamed Paw. *J. Immunol.*, 177(11), 8140–8147.

Gamazo, C., Gastaminza, G., Ferrer, M., Sanz, M. L., & Irache, J. M. (2014). Nanoparticle based-immunotherapy against allergy. *Immunotherapy*, 6(7), 885–897.

Izquierdo, C., Ortiz, A. Z., Presa, M., Malo, S., Montoya, A., Garabatos, N., Mora, C., Verdaguer, J., & Stratmann, T. (2018). Treatment of T1D *via* optimized expansion of antigen-specific Tregs induced by IL-2/anti-IL-2 monoclonal antibody complexes and peptide/MHC tetramers. *Sci. Rep.*, 8(1), 1–14.

Karlsson, M. R., Rugtveit, J., & Brandtzaeg, P. (2004). Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J. Exp. Med.*, 199(12), 1679–1688.

Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., & Lloyd, C. M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after *in vivo* transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.*, 202(11), 1539–1547.

Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.*, 10(6), 595–602.

Levine, A. G., Medoza, A., Hemmers, S., Moltedo, B., Niec, R. E., Schizas, M., Hoyos, B. E., Putintseva, E. V., Chaudhry, A., Dikiy, S., Fujisawa, S., Chudakov, D. M., Treuting, P. M., & Rudensky, A. Y. (2017). Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature*, 546(7658), 421–425.

Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., & 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(9409), 608–615.

Pham, M. N., Khoryati, L., Jamison, B. L., Hayes, E., Sullivan, J. M., Campbell, D. J., & Gavin, M. A. (2021). *In Vivo* Expansion of Antigen-Specific Regulatory T Cells through Staggered Fc.IL-2 Mutein Dosing and Antigen-Specific Immunotherapy. *ImmunoHorizons*, 5(9), 782–791.

Raffin, C., Vo, L. T., & Bluestone, J. A. (2020). Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat. Rev. Immunol.*, 20(3), 158–172.

Saito, K., Torii, M., Ma, N., Tsuchiya, T., Wang, L., Hori, T., Nagakubo, D., Nitta, N., Kanegasaki, S., Hieshima, K., Yoshie, O., Gabazza, E. C., Katayama, N., Shiku, H., Kuribayashi, K., & Kato, T. (2008). Differential Regulatory Function of Resting and Preactivated Allergen-Specific CD4 + CD25 + Regulatory T Cells in Th2-Type Airway Inflammation. *J. Immunol.*, 181(10), 6889–6897.

Samy, E. T., Parker, L. A., Sharp, C. P., & Tung, K. S. K. (2005). Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4+CD25+ regulatory T cells in the regional lymph node. *J. Exp. Med.*, 202(6), 771–781.

Seddon, B., & Mason, D. (1999). Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 189(5), 877–881.

Serr, I., Fürst, R. W., Achenbach, P., Scherm, M. G., Gökmen, F., Haupt, F., Sedlmeier, E.-M., Knopff, A., Shultz, L., Willis, R. A., Ziegler, A.-G., & Daniel, C. (2016). Type 1 diabetes

vaccine candidates promote human Foxp3+Treg induction in humanized mice. *Nat. Commun.*, 7(1), 10991.

Serradell, M. C., Rupil, L. L., Martino, R. A., Prucca, C. G., Carranza, P. G., Saura, A., Fernández, E. A., Gargantini, P. R., Tenaglia, A. H., Petiti, J. P., Tonelli, R. R., Reinoso-Vizcaino, N., Echenique, J., Berod, L., Piaggio, E., Bellier, B., Sparwasser, T., Klatzmann, D., & Luján, H. D. (2019). Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins. *Nat. Commun.*, 10(1).

Shreffler, W. G., Wanich, N., Moloney, M., Nowak-Wegrzyn, A., & Sampson, H. A. (2009). Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 123(1), 43-52.e7.

Srivastava, K. D., Siefert, A., Fahmy, T., Caplan, M. J., Li, X.-M., & Sampson, H. A. (2015). Investigation of Peanut Oral Immunotherapy Using CpG/Peanut-Nanoparticles in a Murine Model of Peanut Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 135(2), AB235.

Stephens, L. A., Malpass, K. H., & Anderton, S. M. (2009). Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3+ Treg. *Eur. J. Immunol.*, 39(4), 1108–1117.

Syed, A., Garcia, M. A., Lyu, S. C., Bucayu, R., Kohli, A., Ishida, S., Berglund, J. P., Tsai, M., Maecker, H., O’Riordan, G., Galli, S. J., & Nadeau, K. C. (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(2), 500-510.e11.

Tang, Q., Henriksen, K. J., Bi, M., Finger, E. B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E. L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., & Bluestone, J. A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.*, 199(11), 1455–1465.

Tarbell, K. V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., & Steinman, R. M. (2004). CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.*, 199(11), 1467–1477.

Torgerson, T. R., Linane, A., Moes, N., Anover, S., Mateo, V., Rieux-Laucat, F., Hermine, O., Vijay, S., Gambineri, E., Cerf-Bensussan, N., Fischer, A., Ochs, H. D., Goulet, O., & Ruemmele, F. M. (2007). Severe Food Allergy as a Variant of IPEX Syndrome Caused by a Deletion in a Noncoding Region of the FOXP3 Gene. *Gastroenterology*, 132(5), 1705–1717.

Tran, G. T., Hodgkinson, S. J., Carter, N., Verma, N. D., Robinson, C. M., Plain, K. M., Nomura, M., & Hall, B. M. (2020). Autoantigen specific IL-2 activated CD4+CD25+T regulatory cells inhibit induction of experimental autoimmune neuritis. *J. Neuroimmunol.*, 341(February), 577186.

Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., DeRoos, P., Kim, J. M., Chu, T. T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., & Rudensky, A. Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature*, 458(7236), 351–356

Figures

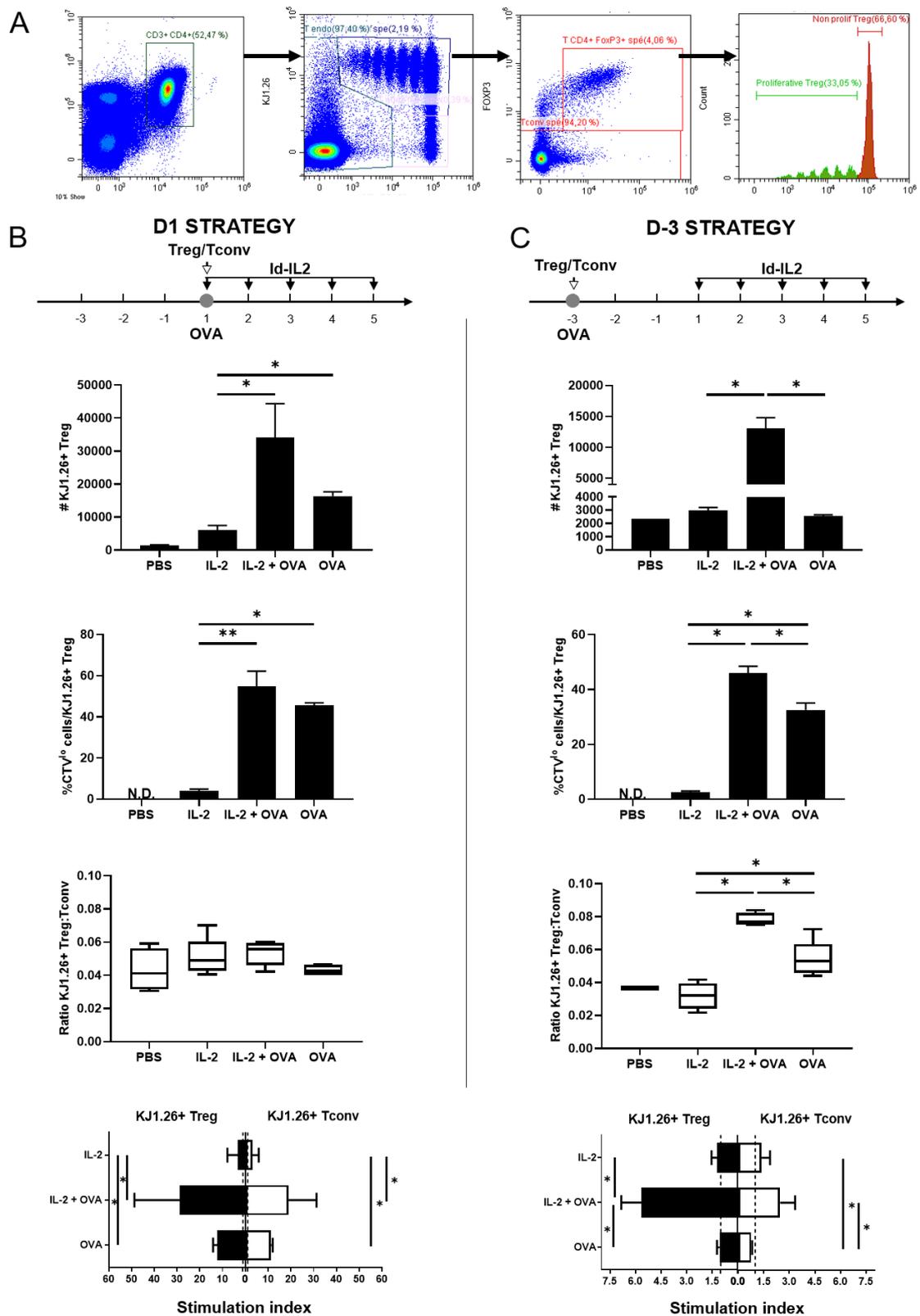


Figure 1. Administrating the antigen 3 days before the Id-IL2 therapy (D-3 strategy) favours antigen-specific Treg expansion with little stimulation of the antigen-specific Tconv compartment.

Recipient BALB/c mice were injected with KJ1.26+ CTV^{hi} CD4⁺ enriched T cells and with 100 μ g of OVA by i.v. route before being i.p. treated for 5 days with Id-IL2. As control, mice received Id-IL2 alone, OVA alone or

PBS. (A) Gating strategy to identify OVA-specific Tconv and Treg cells (KJ1.26+ CTV+) and analyse their proliferation. (B-C) Results obtained in D1 (B) and D-3 strategies (C). From the top to bottom are shown: Experimental design, absolute number of OVA-specific Tregs; frequency of proliferative cells (CTV^{lo}) among OVA-specific, ratio of KJ1.26+ Treg/Tconv cells, Index of stimulation of KJ1.26+ Treg and KJ1.26+ Tconv cells. The stimulation index is calculated by dividing the number of Treg or Tconv of a condition by the number of Treg or Tconv in control (PBS) and median and range are shown. Bars represent group means \pm SEM, n = 4-5 per group, except D-3 PBS=1 (*p \leq 0.05; **p \leq 0.01; Mann-Whitney U test).

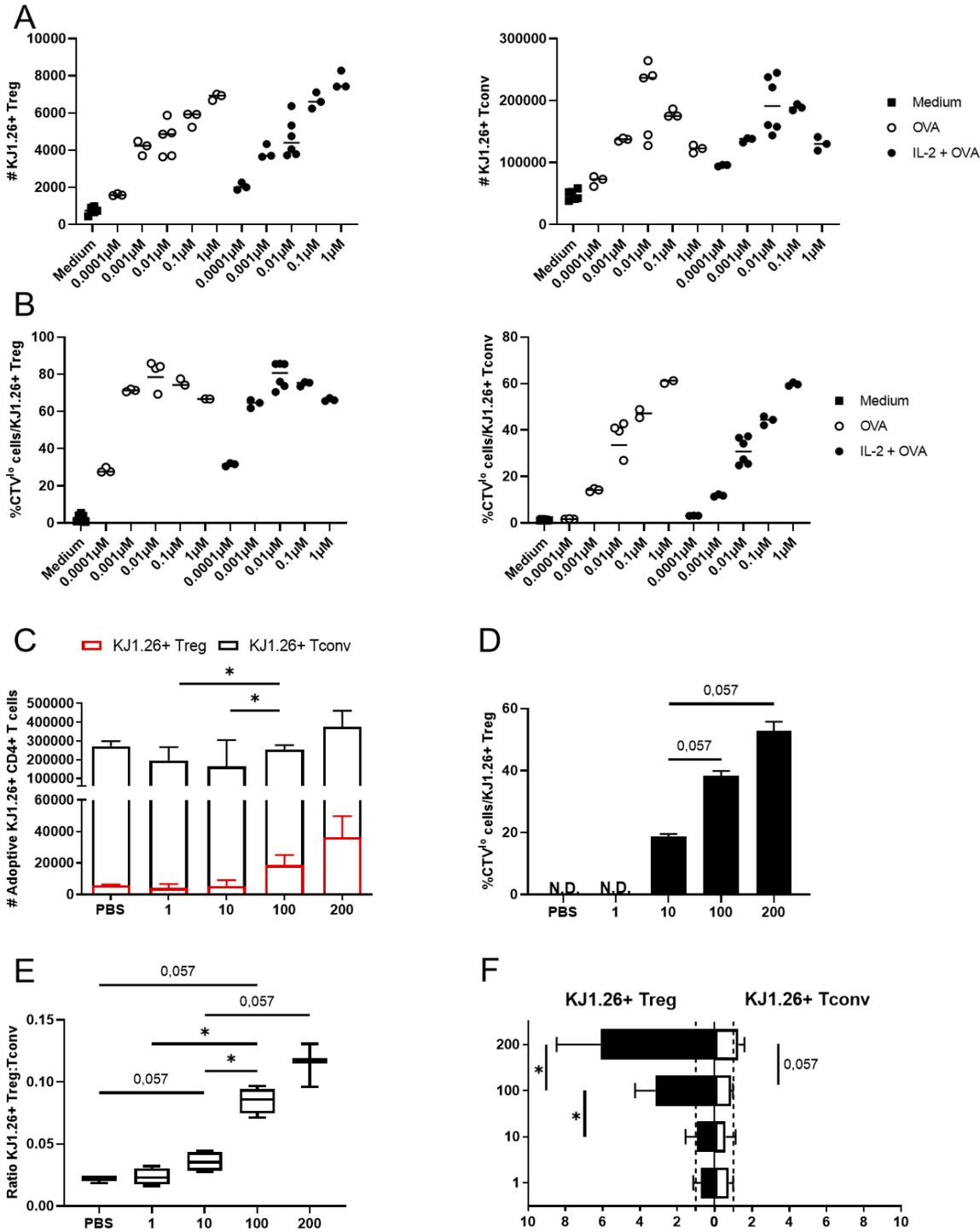


Figure 2. Antigen dose impacts the OVA-specific cell compartments in the D-3 combotherapy.

(A-B) *In vitro* study. 2×10^5 enriched DO11.10 CD4⁺ T cells were labelled with CTV, co-cultured with 5×10^4 irradiated splenocytes and stimulated with IL-2 (100 IU/mL) and different doses of OVA³²³⁻³³⁹ peptide (0.0001 μ M - 1 μ M) for 3 days. (A) Count of OVA-specific Tregs (left) and Tconv cells (right). (B) Frequency of proliferative cells among OVA-specific Tregs (left) and Tconv cells (right). Each dot represents individual value, and median is shown. (C-F) *In vivo* study. Recipient BALB/c mice were injected with OVA-specific KJ1.26+ CTV^{hi} CD4⁺ enriched T cells and with different doses of OVA (1, 10, 100 or 200 μ g) by i.v. route 3 days before being i.p. treated with ld-IL2 for 5 days. (C) Absolute number of OVA-specific Tregs and Tconv. (D) Frequency of proliferative cells (CTV^{lo}) among OVA-specific Treg. (E) KJ1.26+ Treg/Tconv ratio. (F) Stimulation index (median and range are shown). Bars represent group means \pm SEM, n = 3 mice (PBS, 200 μ g); n = 4 (1 μ g, 10 μ g and 100 μ g) (* p \leq 0.05, **p \leq 0.01; Mann-Whitney U test).

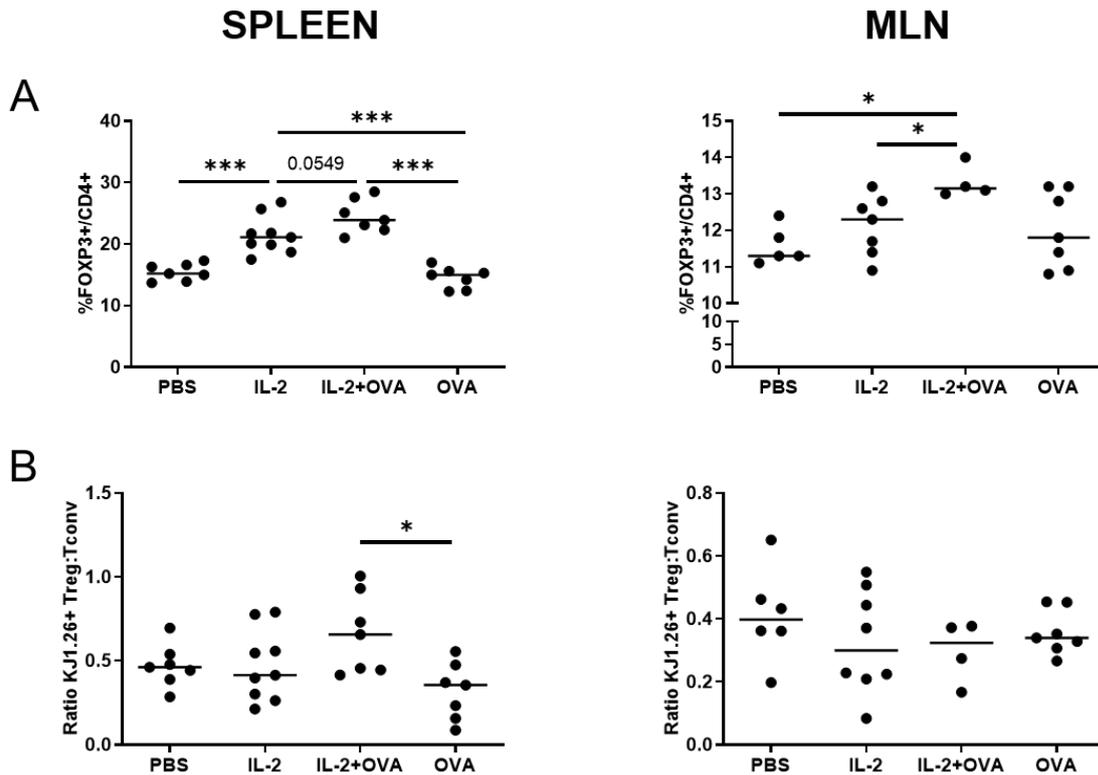


Figure 3. The D-3 combotherapy favours the increase of OVA-specific Treg in allergic mice.

OVA-allergic BALB/c FOXP3-GFP mice were treated by the D-3 combotherapy with 100 μ g of OVA (s.c.) 3 days before receiving ld-IL2 (i.p.) for 5 days. As control, mice received ld-IL2 alone, OVA alone or PBS. Cells from spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) were isolated and analysed 1 day after the last IL-2 injection. (A) Frequency of Tregs among CD4⁺ T cells in spleen (left) and MLN (right). (B) Ratio of OVA-specific KJ1.26+ Tregs/ Tconv in the spleen (left) and MLN (right). Each dot represents individual value and medians are shown (n = 7 – 9) (* p \leq 0.05, ** p \leq 0.01; Mann-Whitney U test).

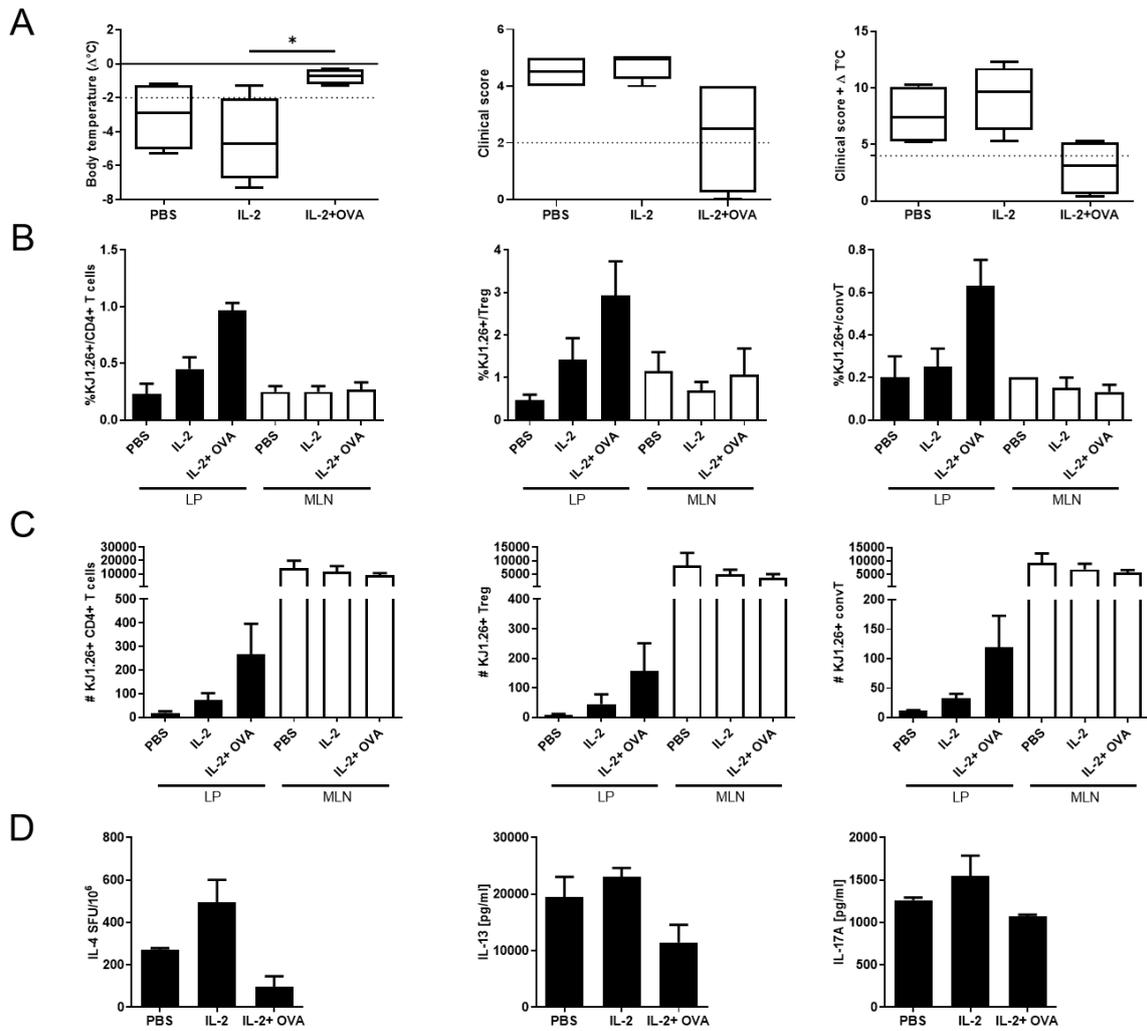


Figure 4 The D-3 combotherapy protects mice from severe allergic reactions and expanded OVA-specific Tregs control the effector response.

OVA-allergic BALB/c FOXP3-GFP mice were treated by the D-3 combotherapy with 100 μg of OVA (s.c.) 3 days before receiving 1d-IL2 (i.p.) for 5 days. As control, mice received 1d-IL2 alone, OVA alone or PBS. Mice were then challenged 3 times with OVA administered orally two days apart. (A) Body temperature (right), symptoms (middle), and global clinical score including symptoms and temperature drop (left) measured 30-40 min after the third p.o. challenge are shown. Severe reactions are defined as reactions with more than 2°C of body temperature drop, reactions with clinical score > 2 and global score > 4 . $N = 4$ mice per group. (B-C) Ten days later, OVA-specific Treg and Tconv compartments were analysed. Frequencies (B) and absolute numbers (C) of KJ1.26+ T cells (left), KJ1.26+ Tregs (middle) and KJ1.26+ Tconvs (right) in PBS-, IL-2- and combotherapy-treated mice were measured. Bars represent group means \pm SEM, $n = 3$ mice. (D) OVA-specific T cell immune responses were measured in the MLNs of treated mice (IL-2, IL-2+OVA) and control (PBS) by an IL-4 ELISPOT assay (left) as well as IL-13 (middle) and IL-17A ELISA assays (right). Bars represent group means \pm SEM, $n = 2-3$ per group. ELISPOT results are expressed in SFUs per 10^6 total cells.

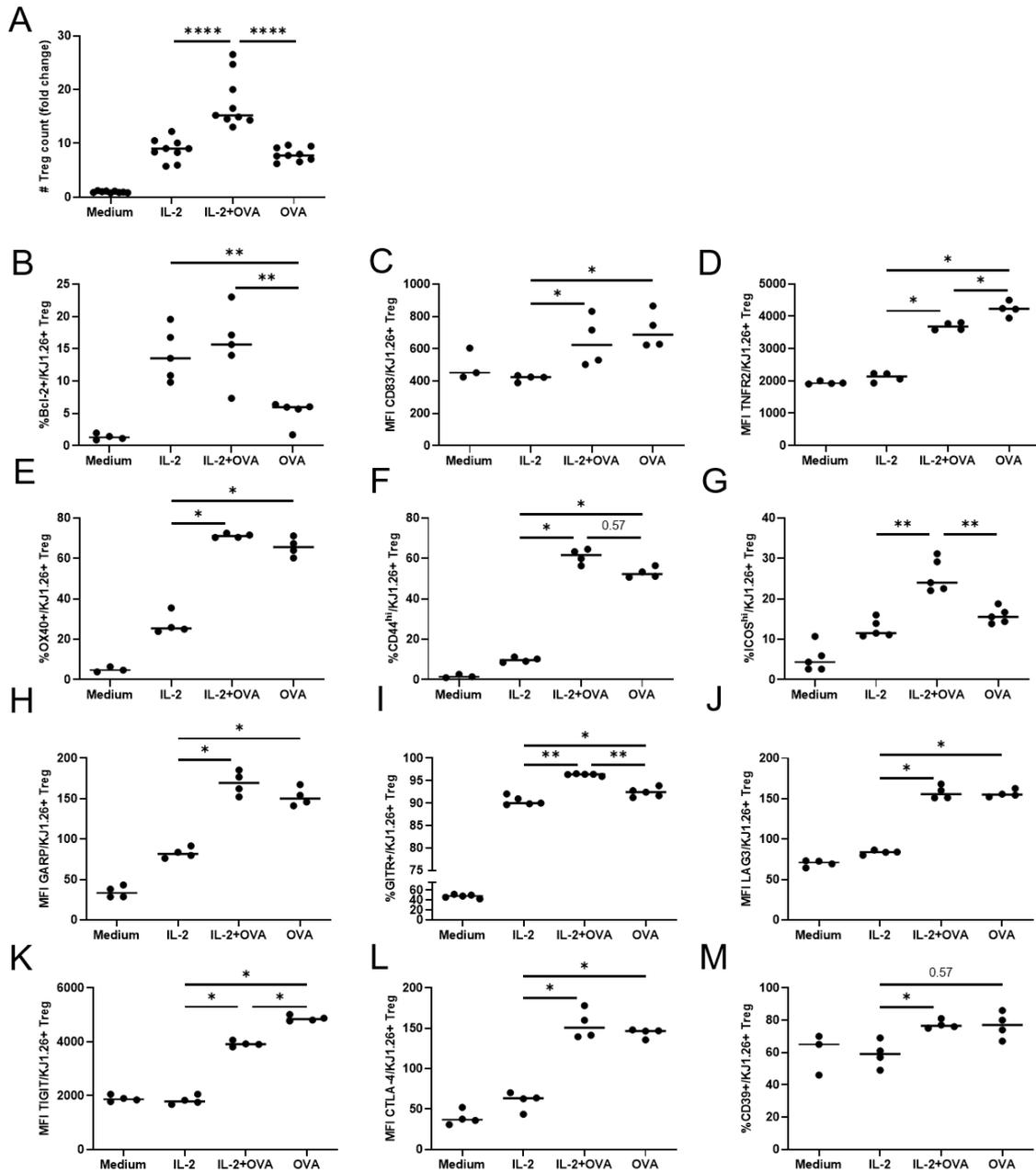


Figure 5 IL-2+OVA combination increases the frequency and level of expression of survival, stability, activation and function markers in Tregs.

DO11.10 or OTII Tregs were cultured with IL-2 (100 IU/mL) and 1 μ M OVA³²³⁻³³⁹ peptide for 3 days or as control with IL-2 alone, OVA alone or medium. (A) Treg counts are expressed as fold change compared to medium and calculated from 2 independent experiments. The results are representatives of 4 independent experiments. (B-M) Frequency and level of expression (MFI) of different Treg-associated marker among KJ1.26+ Tregs. Each dot represents individual value for independent culture condition, and group medians for one experiment are shown (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$; Mann-Whitney U test). The results are representative of 2 independent experiments, either with OT II or DO11.10 cells except for Lag3 and GITR.

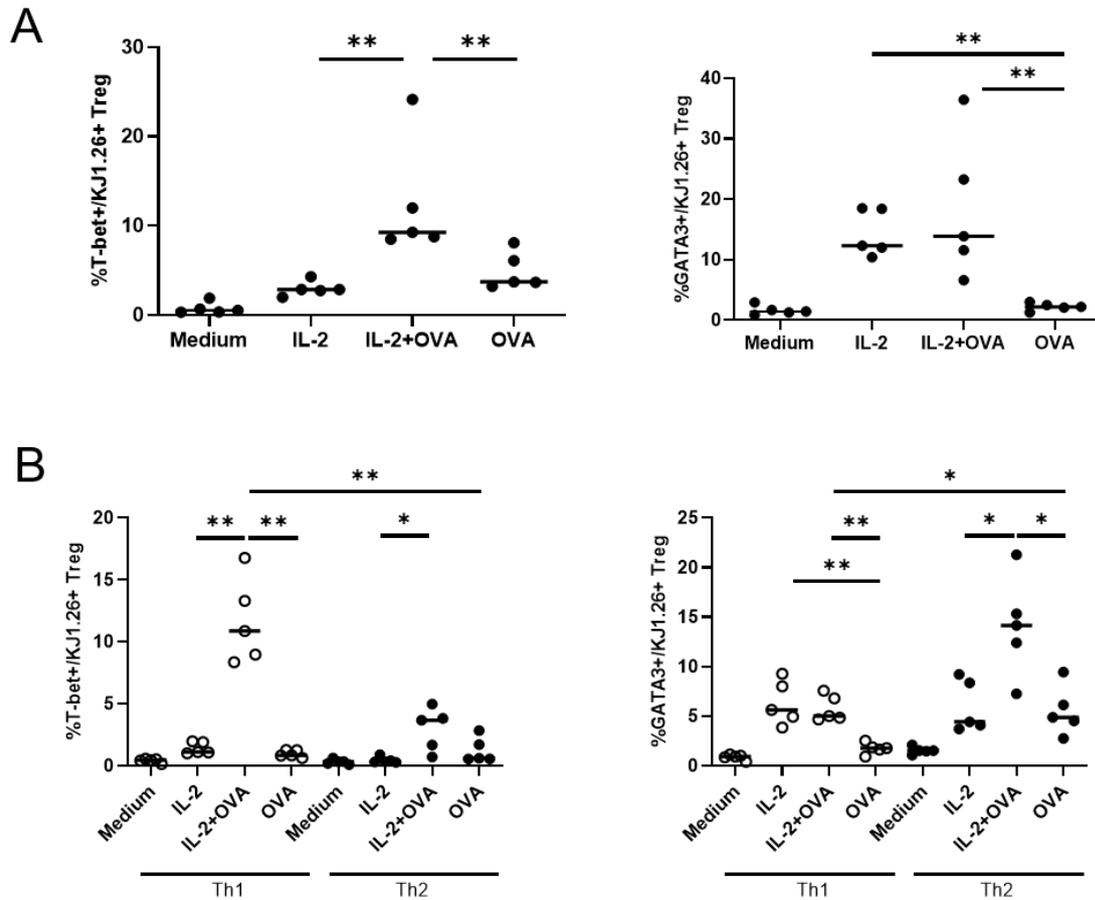


Figure 6 IL-2+OVA combination does not disrupt but potentiates the polarization of Treg.

OT II Tregs were cultured with IL-2 (100 IU/mL) and 1 μ M OVA³²³⁻³³⁹ peptide for 3 days or as control with IL-2 alone, OVA alone or medium. (A) Frequencies of Tbet⁺ and GATA3⁺ Tregs among OVA-specific Tregs were measured in absence of additional cytokines. (B) Tregs were cultured under Th1 or Th2 polarizing conditions. Frequencies of Tbet⁺ (left) and GATA3⁺ Tregs (right) among OVA-specific Tregs were analysed. Each dot represents individual value for each well (representative data from 2 independent experiments) and group medians are shown (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$; Mann-Whitney U test).

B. Modifications des modalités d'administration de la combothérapie (voie orale et ajout de rapamycine) : Effet sur l'expansion des Treg spécifiques de l'antigène et potentiel thérapeutique

Les résultats obtenus dans la partie A sont très prometteurs. Nous avons montré que la combothérapie J-3 favorise l'expansion des Treg spécifiques de l'antigène et induit une protection clinique précoce contre les manifestations sévères de l'allergie alimentaire dans un modèle murin. La protection contre l'inflammation intestinale semble être associée à un recrutement renforcé des Treg spécifiques au niveau de la muqueuse digestive (lamina propria). Ainsi, il pourrait être opportun d'optimiser le recrutement local des Treg spécifiques de l'antigène pour augmenter la protection induite. Nous avons alors évalué les effets du changement de voie d'administration de l'antigène sur ces paramètres.

En gardant la stratégie J-3 (D-3 dans l'article), nous avons administré, dans le modèle de transfert adoptif des Treg et Tconv anti-OVA, différentes doses d'OVA (0,2 ; 2 ; 20 ; 50 mg) par voie orale trois jours avant le début du traitement IL-2fd (Figure 12A). Nous avons évalué les effets de ces modifications de la combothérapie au niveau systémique (rate) ainsi qu'au niveau local (MLN). Nous avons observé que lorsque l'antigène est administré par voie orale, les principales modifications sont observées au niveau local. Ainsi, nous avons observé un effet dose de l'augmentation du nombre absolu de Treg spécifiques de l'antigène, identifiés par le marquage KJ1.26 au niveau des MLN (Figure 12B). Cette expansion est corrélée à une augmentation de la fréquence des cellules en prolifération (CTV^{lo}) parmi les Treg spécifiques (Figure 12C).

Le ratio Treg/Tconv et l'index de stimulation (Figure 12D-E) indiquent que la dose la plus favorable aux Treg est la dose de 50 mg d'OVA, aussi bien au niveau des MLN qu'au niveau de la rate des souris non allergiques. Cependant, cette dose correspond à 2,5 fois la dose d'OVA administrée aux souris lors de tests d'épreuve orale dans le modèle d'allergie alimentaire. Utiliser cette dose d'antigène au cours d'une combothérapie représente donc un risque élevé de choc anaphylactique. Pour la suite de l'étude, nous avons donc retenu la dose de 2 mg d'OVA, dose qui n'induit pas de réaction allergique chez les souris malades après administration orale, mais qui permet d'activer sensiblement le compartiment Treg spécifiques au niveau local comme systémique, même si de façon non-optimale.

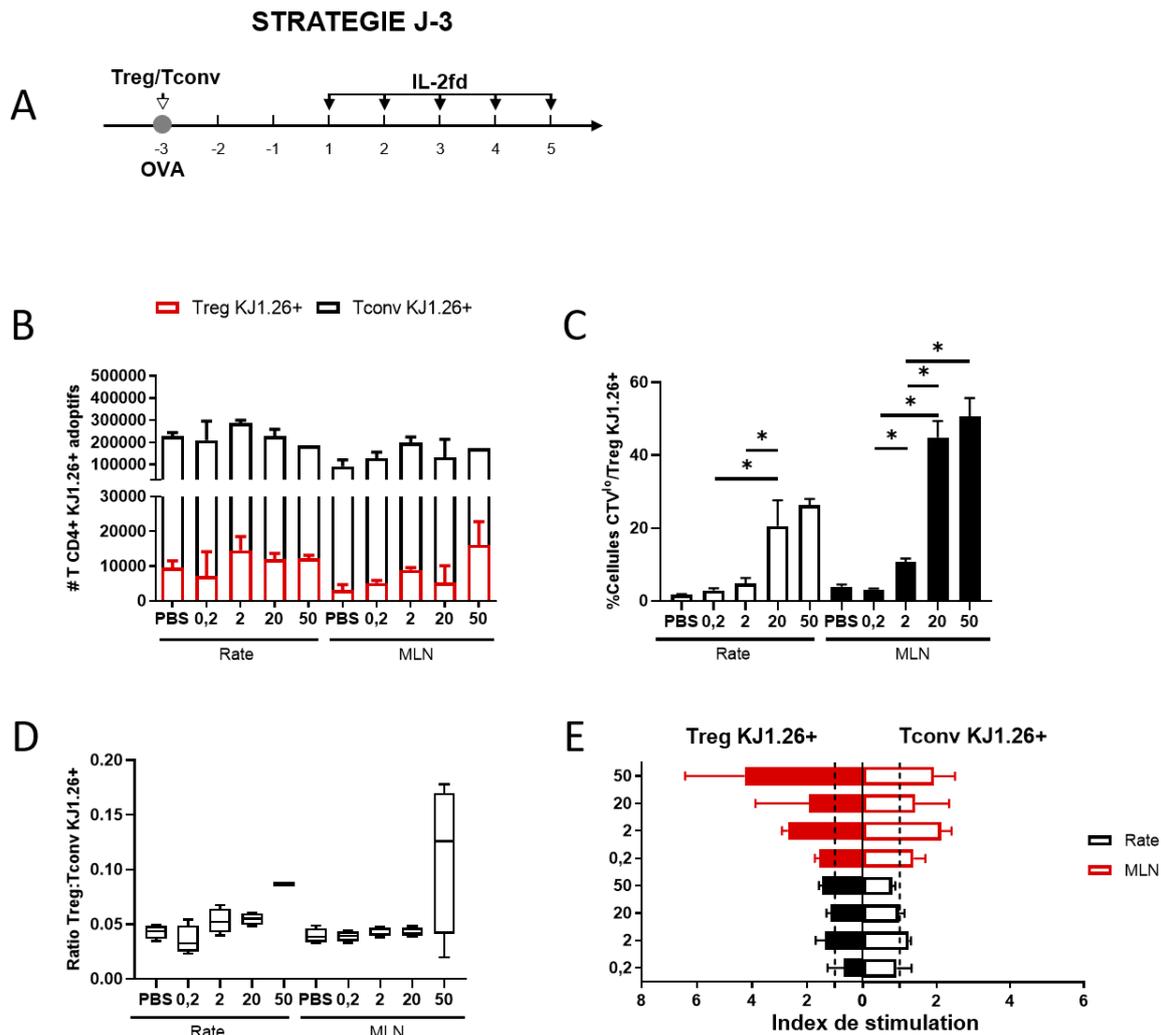


Figure 12. Effet de la voie et la dose d'administration de la combothérapie (stratégie J-3) sur les Treg et Tconv spécifiques.

Des souris receveuses BALB/c ont été injectées avec une fraction cellulaire enrichie en LT CD4⁺KJ1.26⁺CTV^{hi} puis gavées avec différentes doses (0,2, 2, 20, 50 mg) d'OVA par voie orale avant d'être traitées pendant 5 jours avec IL-2fd par voie i.p. En contrôle, des souris ont reçu du PBS. (A) Schéma expérimental. (B) Nombre absolu de Treg et Tconv spécifiques. (C) Fréquence de cellules divisées parmi les Treg KJ1.26⁺. (D) Ratio Treg:Tconv spécifiques. (E) Index de stimulation. Les traits en pointillés indiquent la valeur de 1. Les résultats sont exprimés sous forme de médiane et de « range ». Les barres représentent les moyennes des groupes ± SEM, n=4 pour toutes les conditions sauf pour les conditions 50mg (rate) où n=2 et PBS où n=6. * p≤ 0,05 ; test non paramétrique de Mann-Whitney.

Nous nous sommes inspirés des protocoles d'induction de tolérance orale pour établir notre nouvelle cinétique d'administration pour la dose 2 mg, de façon à favoriser l'expansion et le recrutement local des Treg spécifiques de l'antigène. L'OVA a été administrée par voie orale (2 mg) tous les jours pendant la durée de l'immunothérapie IL-2fd (Figure 13A). Par ailleurs, la voie d'administration de l'IL-2 a également été modifiée pour tester si l'administration orale de l'immunothérapie IL-2fd permettait de renforcer l'expansion locale

des Treg spécifiques de l'antigène. Finalement, afin de limiter l'expansion des Tconv spécifiques, la combothérapie IL-2+antigène a été associée à la rapamycine.

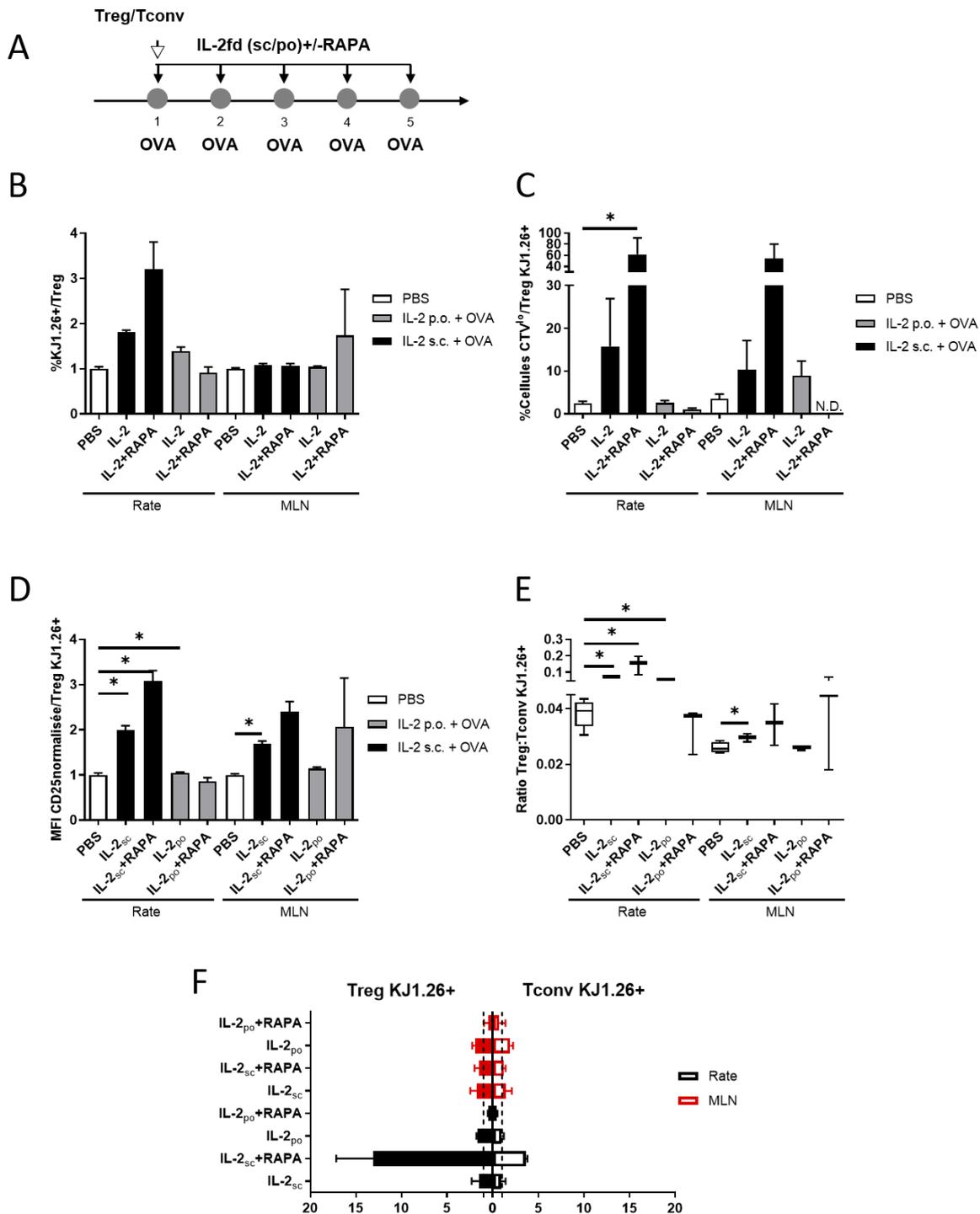


Figure 13. Optimisation de la combothérapie par ajout d'adjuvant, répétition d'administration de l'antigène et changement de voie d'administration : Effets sur les Treg et Tconv spécifiques.

Des souris receveuses BALB/c ont été injectées avec une fraction cellulaire enrichie en LT CD4⁺ KJ1.26⁺CTV^{hi} puis traitées avec 2mg d'OVA par voie orale (toutes les souris sauf PBS) et de l'IL-2fd et de la rapamycine par voie i.p. pendant 5 jours. Dans certains cas, l'IL-2fd a été administrée par voie orale pendant 5 jours. En contrôle, des souris ont reçu du PBS, de l'IL-2+OVA sans rapamycine. (A)

Schéma expérimental. (B) Fréquence de Treg KJ1.26⁺ parmi les Treg (C) Fréquence de cellules en prolifération parmi les Treg KJ1.26⁺. (D) Augmentation de MFI de CD25 des Treg KJ1.26⁺ par rapport au contrôle PBS. (E) Ratio Treg/Tconv spécifiques. (F) Index de stimulation. Les traits en pointillés indiquent la valeur de 1. (D) Expression de CD25 (MFI) normalisée par rapport au PBS. Les résultats sont exprimés sous forme de médiane \pm étendue (max-min). Les barres représentent les moyennes des groupes \pm SEM, n=3 pour toutes les conditions sauf pour la PBS où n=6. * p \leq 0,05 ; test non paramétrique de Mann-Whitney.

Les résultats obtenus montrent d'une part que la voie d'administration de l'IL-2 conditionne l'étendue de son effet. En effet, lorsque l'IL-2 est administrée par voie orale, elle induit majoritairement des effets locaux, visualisables au niveau des ganglions mésentériques. Au contraire, l'administration sous-cutanée de l'IL-2 a un effet à la fois systémique, mais aussi local qui est lui comparable, voire supérieur à celui observé pour l'IL-2 p.o. (Figure 13). D'autre part, l'ajout de rapamycine favorise l'augmentation de la fréquence des Treg spécifiques de l'antigène (Figure 13B) par rapport à la combothérapie classique IL-2+antigène (Figure 13C) tout en bloquant la stimulation des Tconv spécifiques. La rapamycine induit également une forte augmentation de la prolifération des Treg spécifiques et des niveaux d'expression de CD25 (Figure 13D), aussi bien au niveau local que systémique. L'analyse du ratio et de l'indice de stimulation désigne la combothérapie (IL-2 s.c. + OVA p.o.) + rapamycine comme la stratégie favorisant le plus les Treg spécifiques, au niveau systémique (Figure 13E-F). Par ailleurs, le ratio des Treg/Tconv spécifiques (Figure 13E) observé dans la rate des souris traitées avec la combothérapie IL-2/OVA/RAPA est supérieur aux ratios calculés pour les stratégies J1 et J-3 (Article Figure 1 et Figure 2E). Malgré la stimulation du compartiment des Tconv spécifiques chez ces souris, ce ratio en faveur des Treg pourrait être un indicateur du potentiel thérapeutique de la combothérapie IL-2/OVA/RAPA.

Par la suite, nous avons testé le potentiel thérapeutique de l'association IL-2/OVA/RAPA dans l'allergie. Les souris rendues allergiques ont été traitées par la combothérapie IL-2/OVA/RAPA avec l'IL-2fd (i.p.) et 2mg d'OVA (p.o.) tous les jours pendant 5 jours, ainsi que de la rapamycine (administrée tous les 2 jours pendant 5 jours). A l'issue du traitement, des tests d'épreuve orale ont été réalisés (3 jours après) afin d'évaluer la protection induite par la combothérapie IL-2/OVA/RAPA. Nous avons observé une aggravation de la réaction allergique chez les souris ayant reçu quotidiennement de l'OVA pendant 5 jours, seule ou associée à l'IL-2. Cette aggravation n'est toutefois pas observée chez les souris traitées avec l'antigène associé à la rapamycine. L'association IL-2/OVA/RAPA induit, elle, une protection contre les manifestations sévères de l'allergie chez 50% des souris traitées.

En conclusion, ces résultats montrent la complexité que représente l'identification des conditions d'administration de la combothérapie. Ils soulignent également l'importance de la voie d'administration pour favoriser le recrutement local des Treg spécifiques. De plus, les résultats témoignent de la grande utilité des adjuvants tels que la rapamycine pour diminuer la prolifération des Tconv spécifiques.

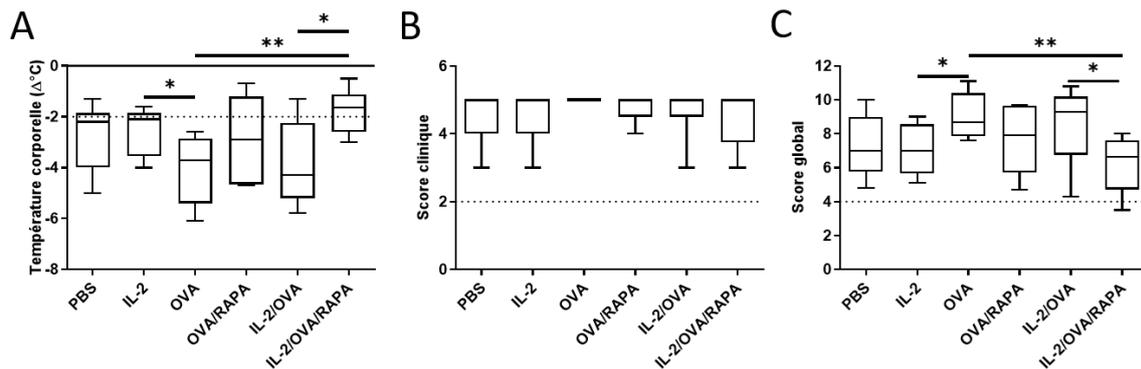


Figure 14. La combinaison IL-2+OVA avec administration quotidienne de l'antigène administrée par voie orale peut conduire à l'aggravation de l'allergie alimentaire, mais l'ajout de rapamycine permet de contrôler cette aggravation.

Des souris BALB/c FOXP3-GFP allergiques à l'OVA ont été traitées par la combothérapie IL-2+OVA avec 2mg d'OVA (p.o.) et de l'IL-2fd (i.p.) tous les jours pendant 5 jours, ainsi que de la rapamycine 10mg/kg (i.p.) un jour sur deux pendant 5 jours (3 injections). Comme contrôle, les souris ont reçu IL-2fd seule, OVA seule, OVA et rapamycine, IL-2fd+OVA ou PBS. Les souris ont ensuite été exposées à un premier cycle d'OVA administrée par voie orale (3 tests d'épreuve un jour sur deux). (A) La température corporelle, (B) le score clinique et (C) le score clinique global comprenant le score clinique et la chute de température mesurés 30-40 minutes à l'issue du cycle de tests d'épreuve sont présentés. Les réactions sévères sont définies comme des réactions avec une chute de plus de 2°C de la température corporelle, des réactions avec un score clinique > 2 et un score global > 4. n = 9 souris par groupe (sauf pour les groupes OVA et OVA/RAPA pour lesquels n=5). Les résultats englobent deux expériences indépendantes. * p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; test non paramétrique de Mann-Whitney.

Discussion

DISCUSSION

Depuis la découverte de leur rôle clé pour le maintien de l'homéostasie et la tolérance périphérique, les Treg sont devenus la cible de différentes stratégies visant à exploiter leur potentiel thérapeutique pour le traitement de maladies auto-immunes, inflammatoires et allergiques. Plus récemment, un intérêt croissant pour les Treg spécifiques de l'antigène a motivé le développement de nouvelles approches visant à mobiliser leurs capacités suppressives. Pendant ma thèse, j'ai justement développé une de ces stratégies : j'ai démontré qu'il est possible d'optimiser l'immunothérapie IL-2 faible dose en la combinant avec l'antigène afin d'augmenter l'expansion et le recrutement des Treg spécifiques de l'antigène. J'ai aussi montré que cette combothérapie induit une protection immédiate contre les manifestations sévères de l'allergie alimentaire chez des souris allergiques. Nous discuterons par la suite de l'intérêt d'une telle approche pour le traitement des maladies allergiques et en quoi elle représente une optimisation intéressante par rapport à l'immunothérapie IL-2fd standard. Nous discuterons également des limites des résultats et de l'approche expérimentale, des mécanismes immunologiques impliqués dans la protection clinique et des pistes à explorer pour continuer l'optimisation.

A. Association de l'IL-2 faible dose et de l'antigène comme une stratégie innovante pour favoriser les Treg spécifiques

Plusieurs études montrent que les Treg spécifiques d'un antigène sont plus efficaces que les Treg polyclonaux quand il s'agit de contrôler des réponses immunitaires spécifiques de cet antigène (Tableau 3). Dans l'allergie, l'augmentation du nombre de Treg, plus particulièrement de Treg spécifiques de l'allergène, est associée à la résolution spontanée et à l'efficacité thérapeutique des immunothérapies spécifiques (Bohle *et al.*, 2007; Jutel *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2021; Meiler *et al.*, 2008; Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2008; Syed *et al.*, 2014a). Afin de développer une stratégie thérapeutique permettant de favoriser leur recrutement, nous avons supposé que l'administration de l'antigène au cours de l'immunothérapie IL-2fd, connue pour induire l'expansion des Treg (Churlaud *et al.*, 2018), renforcerait l'expansion des Treg spécifiques. Différentes modalités d'administrations de l'antigène peuvent être envisagées, en variant les doses, la voie et la cinétique d'administration.

1. Influence de la cinétique d'administration

Pour déterminer les cinétiques d'administration de la combothérapie l'IL-2+antigène, nous avons formulé et testé plusieurs hypothèses (Figure 15) : (i) une administration initiale de l'antigène dans des conditions non inflammatoires pour favoriser l'expansion des cellules spécifiques (majoritairement des Treg) puis renforcer cette expansion avec l'IL-2fd ; (ii) une administration de l'IL-2fd pour induire l'expansion des Treg puis ajout de l'antigène pour renforcer l'expansion des cellules spécifiques (majoritairement des Treg); ou (iii) co-administration de l'IL-2fd et de l'antigène.

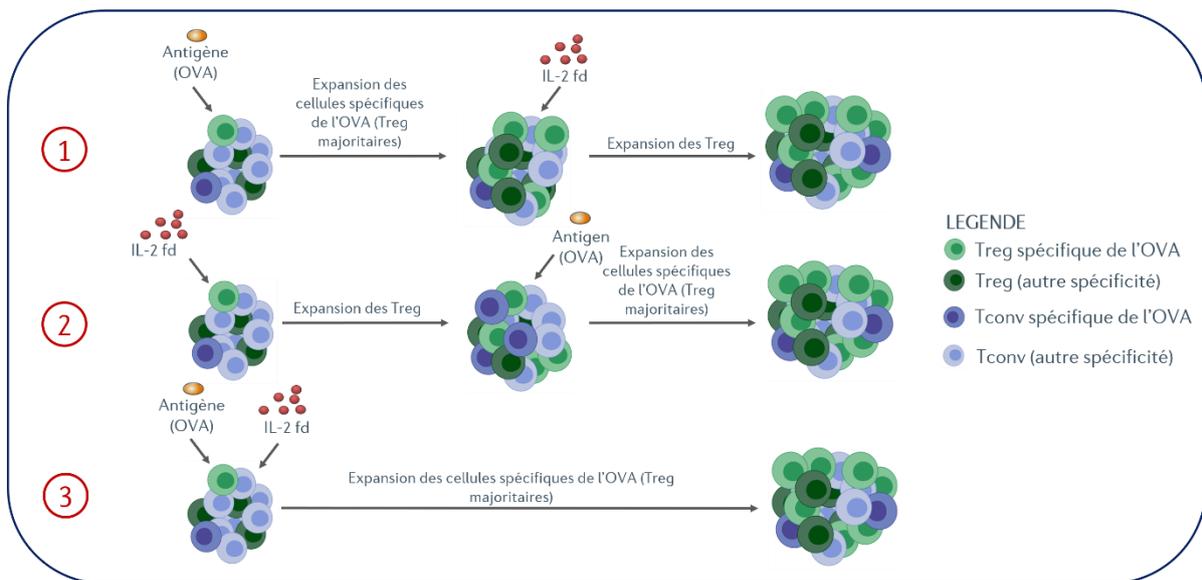


Figure 15. Différentes cinétiques d'administration possibles.

L'administration de l'antigène avant (1), après (2) ou pendant (3) l'immunothérapie IL-2fd pourrait favoriser l'amplification des Treg spécifiques de l'antigène.

Parmi les deux cinétiques testées dans l'article (J-3 et J1), celle où l'antigène est administré 3 jours avant (J-3) favorise le plus l'expansion des Treg avec peu ou pas de stimulation du compartiment Tconv spécifique (Article, Figure 1C et 2). Ces résultats démontrent l'influence de l'enchaînement des stimulations sur le devenir et la biologie des différents compartiments cellulaires. Cette observation a été confirmée par d'autres études récentes qui ont également cherché à combiner l'immunothérapie IL-2 à l'antigène.

La première combine l'administration de complexes IL-2/anti-IL-2 et l'antigène sous forme de complexe CMH II/peptide et montre que cette combinaison entraîne une expansion importante des Treg spécifiques associée à une protection contre le développement du diabète de type 1 chez les souris traitées (Izquierdo *et al.*, 2018). De façon intéressante, lorsque le complexe CMH II/peptide est administré environ 3 jours avant le début du traitement par le

complexe IL-2/anti-IL-2, l'amplification des Treg spécifiques est plus importante par rapport à quand le complexe CMH II/peptide est administré le jour précédant le début du traitement avec le complexe IL-2/anti-IL-2. De même, ils observent que l'activation des Tconv spécifiques est moins importante lorsque le complexe CMH II/peptide est administré 3 jours avant (Izquierdo *et al.*, 2018). Ces résultats sont très proches des nôtres et confirment les différences que nous avons pu observer entre la stratégie J1 et la stratégie J-3 (Article Figure 1).

Une seconde étude combine l'administration d'une IL-2 mutée, complexée à un fragment Fc, et l'antigène sous forme de protéine OVA fusionnée à un anticorps anti-DEC pour favoriser le ciblage des DC tolérogènes (Pham *et al.*, 2021). Dans cette étude, l'antigène est administré 2-3 jours après l'IL-2 mutée, pendant la phase d'expansion des Treg induite par cette dernière. Les auteurs montrent que l'association de ces deux composants favorise l'expansion des Treg spécifiques sans forte stimulation du compartiment Tconv spécifique dans un modèle de transfert adoptif (Pham *et al.*, 2021). Ils montrent également que l'expansion maximale des Treg spécifiques est obtenue lorsque l'antigène est administré 3 jours après l'administration de l'IL-2 mutée. Leurs résultats montrent que d'autres alternatives permettent également de favoriser le compartiment Treg spécifiques, validant ainsi notre hypothèse ii : l'administration de l'IL-2 permet l'expansion des Treg et l'ajout de l'antigène, dans un 2^e temps, permet de renforcer l'expansion des cellules spécifiques (majoritairement des Treg).

2. Effet de l'association et avantages thérapeutiques

Les résultats de ces études nous confortent dans la pertinence d'associer l'IL-2 et l'antigène pour favoriser l'expansion et le recrutement des Treg spécifiques. Dans notre modèle de transfert adoptif, nous avons observé une très faible prolifération (<7%) des Treg spécifiques de l'OVA chez les souris traitées avec de l'IL-2fd seule (Article, Figure 1). Nous avons également observé cette faible prolifération quand les Treg spécifiques sont cultivés avec de l'IL-2 seule *in vitro*. De même, Phan *et al.* observent le même phénomène dans leur modèle de transfert adoptif (Pham *et al.*, 2021). Au contraire, l'administration d'antigène seul (100 µg d'OVA en i.v.) permet d'obtenir une forte augmentation de la prolifération, environ 6 fois plus élevée qu'avec l'IL-2fd seule (Article, Figure 1). Il est important de souligner que le pourcentage de cellules en prolifération est proportionnel à la dose d'antigène lorsqu'il est administré par voie intraveineuse ou orale (Article, Figure 2D et Figure 12E). Par ailleurs, dans la stratégie J-3, nous observons un effet synergique de la combinaison de l'IL-2fd et l'antigène sur l'augmentation du nombre absolu de Treg spécifiques.

Ainsi, en combinant l'antigène et l'immunothérapie IL-2 faible dose, nous sommes capables d'induire des Treg spécifiques qui, selon les données de la littérature, sont plus efficaces pour supprimer les réponses spécifiques de leur antigène, en raison de leur capacité à migrer et rester au niveau des sites inflammatoires (Blat *et al.*, 2014; Cabello-Kindelan *et al.*, 2020; Fransson *et al.*, 2012). L'impact de l'antigène sur les fonctions des cellules sera discuté plus loin.

De plus, l'avantage thérapeutique de cette association a été démontré dans la prévention du diabète de type 1 (Izquierdo *et al.*, 2018). Pour notre part, nous avons pu montrer que la combothérapie J-3 permet non seulement l'amplification des Treg spécifiques, mais aussi l'induction de la protection précoce contre les manifestations sévères de l'allergie alimentaire chez la souris.

3. Limites des modèles utilisés

Bien que la combothérapie IL-2fd associée à l'antigène représente une stratégie intéressante pleine de potentiel pour le traitement des maladies allergiques, il est important de connaître les limites rencontrées (et à venir) pour le développement de cette approche thérapeutique.

Une des difficultés majeures que nous avons rencontrée dans l'établissement des modalités d'administration de la combothérapie est l'identification même des Treg et Tconv spécifiques de l'antigène. En effet, la fréquence naturelle des Treg spécifiques d'un antigène est très faible ce qui représente une limite pour leur identification par cytométrie en flux. Pour s'affranchir de cette limite, nous avons utilisé un modèle de transfert adoptif de LT CD4⁺ (incluant Treg et Tconv) issues de souris DO11.10 TCR transgéniques dont le TCR est spécifique du peptide OVA³²³⁻³³⁹. Dans ce modèle, les Treg et Tconv spécifiques de l'antigène (OVA) sont identifiés à l'aide de l'anticorps clonotypique (KJ1.26⁺) reconnaissant le TCR spécifique du peptide OVA³²³⁻³³⁹. Ce modèle nous a permis de suivre l'impact des différentes modalités d'administration de la combothérapie sur les compartiments Treg et Tconv spécifiques de l'OVA.

Cependant, en raison des mécanismes de régulation homéostatique existant chez les souris receveuses, nous n'avons pas pu retrouver les cellules transférées par cytométrie en flux. En conséquence, il n'a pas été possible d'étudier l'impact de la combothérapie sur les Treg spécifiques à distance du traitement dans ces modèles de transfert. Des modèles alternatifs, comme l'utilisation de chimères issues d'un mélange de moelle osseuse de souris BALB/c et de souris DO11.10, ou bien une déplétion partielle avec un anticorps anti-CD3 pour libérer de

la place dans les niches de lymphocytes T CD4⁺, pourraient faciliter l'analyse des cellules spécifiques à distance du traitement.

Plus important, notre modèle de transfert adoptif ne nous permet pas de tenir compte de l'impact qu'un environnement inflammatoire peut avoir sur les effets de la combothérapie. Nous observons en effet des différences dans l'expansion des Tconv spécifiques de l'antigène entre le modèle de transfert adoptif et le modèle d'allergie alimentaire. Pour tester le potentiel thérapeutique de la combothérapie, notre choix s'était porté sur la stratégie d'administration J-3 car elle permettait une expansion du compartiment Treg spécifique sans stimulation importante du compartiment Tconv spécifique (Article, Figures 1 et 2). Dans le modèle d'allergie alimentaire, nous observons pourtant une expansion importante des Tconv spécifiques en plus des Treg chez les souris allergiques traitées par la combothérapie par rapport aux contrôles PBS ou IL-2fd seule (Article, Figure 4B). Cette différence de dynamique du compartiment Tconv peut s'expliquer par le fait que les souris allergiques ont été stimulées plusieurs fois avec l'OVA ce qui entraîne la constitution d'un pool de cellules mémoires. Les Tconv mémoires étant plus sensibles à de faibles doses d'antigène et moins dépendants des signaux de costimulation que les Tconv naïfs, l'administration de l'antigène pourrait expliquer l'expansion observée (Berard & Tough, 2002).

Le modèle d'allergie alimentaire nous a permis d'évaluer le potentiel thérapeutique de la combothérapie dans cette maladie. Par ailleurs, l'utilisation de souris allergiques nous a confronté à la limite qu'on tentait de contourner précédemment : la faible fréquence des cellules spécifiques de l'antigène. L'utilisation de l'anticorps clonotypique KJ1.26 pour identifier les cellules spécifiques, restreint également l'étude à un seul clonotype et ne permet pas d'appréhender la diversité des cellules qui peuvent être mobilisées dans ces réactions. Dans un futur proche, nous projetons d'analyser le répertoire des souris allergiques avant et après traitement afin d'évaluer si la combothérapie permet l'expansion majoritaire d'un certain nombre de clones.

B. Mécanismes immunologiques associés à l'effet thérapeutique de la combothérapie IL-2+antigène dans l'allergie alimentaire

Nous avons démontré que la combothérapie, administrée selon des modalités précises, induit une protection rapide contre les manifestations sévères de l'allergie alimentaire chez des souris allergiques. Cela contraste avec la protection différée mise en place lorsque l'IL-2fd est

utilisée seule en thérapeutique (Bonnet *et al.*, 2016). Les mécanismes immunitaires impliqués dans cette protection restent toutefois à définir.

1. Impact de la combothérapie sur le rapport de forces entre Treg et Tconv spécifiques

L'objectif associé au développement de la combothérapie était de trouver les conditions favorisant l'augmentation des Treg spécifiques de l'antigène sans pour autant stimuler le compartiment Tconv spécifiques. La stratégie J-3 remplissait ces conditions dans le modèle de transfert adoptif (Article, Figure 1). Nous avons évoqué précédemment que, chez des souris allergiques, l'analyse du ratio Treg/Tconv spécifiques juste après traitement confirme un ratio Treg/Tconv spécifiques plus élevé dans la rate des souris traitées avec la combothérapie par rapport aux souris contrôles traitées avec l'OVA seule, l'IL-2 seule ou du PBS (Article, Figure 3). Ce ratio en faveur des Treg au niveau systémique chez les souris traitées par la combothérapie pourrait entraîner un meilleur contrôle des cellules effectrices circulantes et expliquer que les souris soient protégées contre le choc anaphylactique (réaction allergique systémique), mais pas contre la diarrhée allergique (réaction locale). Ces résultats nous poussent à nous interroger sur l'importance d'augmenter le ratio Treg/Tconv spécifiques localement au site inflammatoire. Cela permettrait de renforcer le contrôle des réactions allergiques au niveau local et donc protéger contre certains symptômes allergiques tels que la diarrhée. Il reste également possible d'assurer un contrôle systémique et de bloquer les réactions sévères comme le choc anaphylactique. En effet, il a été montré que l'inflammation locale chez les sujets allergiques augmente la perméabilité intestinale, ce qui favoriserait la dissémination de l'antigène dans la circulation sanguine (Samadi *et al.*, 2018). Afin de favoriser l'expansion des Treg spécifiques et leur recrutement au niveau local, l'utilisation de la voie orale semble une alternative intéressante. Nous avons testé différentes cinétiques d'administration de la combothérapie en utilisant la voie orale pour administrer l'antigène et en s'inspirant des protocoles d'induction de tolérance. L'équipe de Pabst utilise de l'eau de boisson supplémentée avec 1 mg/mL d'OVA pendant 7 jours ou administre 50 mg d'OVA p.o. par jour pendant 2 jours pour induire une tolérance orale à l'OVA chez des souris (Hadis *et al.*, 2011). Yamashita *et al.* utilisent un protocole qui consiste à administrer 1 mg/jour d'OVA p.o. pendant 5 jours (Yamashita *et al.*, 2012).

Cependant, aucune de nos stratégies testées par voie orale (OVA p.o. + l'IL-2fd +/- rapamycine) n'induit une protection comparable à celle obtenue par la stratégie J-3 (Figure 14). Des aggravations ont été observées chez les souris traitées avec de l'OVA en absence de

rapamycine. Pourtant, la dose d'OVA utilisée est de 2 mg, une dose intermédiaire entre celle de Yamashita *et al.* et celle ingérée dans l'eau de boisson par les souris (environ 4 mL/jour/souris) dans le protocole de Hadis *et al.*

Malgré tout, ces résultats restent en accord avec nos résultats précédant mettant en avant que l'administration simultanée de l'OVA et de l'IL-2 n'est pas en faveur de l'expansion des Treg.

Il serait donc intéressant de déployer la stratégie J-3 par voie orale. Toutefois, tout comme les immunothérapies classiques, la réadministration de l'allergène reste une étape critique, associée à un risque de réactions incontrôlées. Des optimisations sont donc nécessaires pour utiliser la voie orale sans déclencher ou exacerber l'allergie. En plus des formulations innovantes de l'antigène (*cf.* Discussion C.2), il pourrait être proposé une stratégie combinant la stratégie J-3 « classique », qui a montré des résultats prometteurs, en y ajoutant une 2^e administration de l'antigène par voie orale à la fin de la thérapie IL-2fd afin de favoriser le recrutement local des Treg spécifiques de l'antigène. L'administration orale de l'antigène pourrait être moins problématique compte tenu de l'effet suppresseur induit par le premier traitement.

2. Impact de la combothérapie sur la biologie des Tconv

Si le ratio entre Treg et Tconv spécifiques est une piste pour comprendre les mécanismes derrière la protection observée chez les souris traitées par la combothérapie IL-2+OVA, le phénotype et les capacités fonctionnelles de ces cellules sont d'autant plus intéressants. Nous avons observé que, au niveau des ganglions drainants l'intestin (MLN), aucune modification du nombre et de la fréquence des Treg et de Tconv spécifiques est observée à la suite de la combothérapie et donc, il n'y a aucune modification du ratio Treg/Tconv (Article, Figure 4). Cependant, la combothérapie semble impacter la production de cytokines Th2 par les cellules des MLN de souris allergiques. En effet, une diminution des réponses IL-4 et IL-13 est observée chez les souris traitées avec la combothérapie par rapport aux souris contrôles IL-2 seule et PBS (Article, Figure 4D). Cette diminution a également été observée suite aux protocoles d'ITS (C. A. Akdis & Akdis, 2011; Fujita *et al.*, 2012) et, du fait de l'association entre l'IL-4 et l'exacerbation de l'anaphylaxie (Mathias *et al.*, 2011; Strait *et al.*, 2003), le contrôle de la production de cette cytokine semble jouer un rôle clé dans la protection induite par la combothérapie. Néanmoins, au vu du faible nombre d'échantillons analysés, ces résultats restent à confirmer.

Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer la diminution de la production des cytokines Th2, l'IL-4 et l'IL-13. Mon équipe avait montré que le traitement par l'IL-2fd

induisait un rééquilibrage de la balance Th1/Th2 en diminuant la production locale de cytokines Th2 (IL-4 et IL-5) et en augmentant la production de cytokines Th1 (IFN- γ) (Bonnet *et al.*, 2016). Cependant, la combothérapie IL-2fd et antigène ne semble pas induire ce rééquilibrage, car aucune différence dans la production IFN- γ n'a été observée entre les souris traitées avec la combothérapie et les souris contrôles (résultats non montrés). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette diminution de cytokines et dans la protection contre les manifestations sévères de l'allergie, nous projetons de réaliser des analyses complémentaires pour mieux caractériser le phénotype de ces Tconv. En effet, l'acquisition d'un phénotype régulateur Tr1 ou Th3 par ces Tconv spécifiques pourrait expliquer l'absence d'effets délétères malgré la prolifération de lymphocytes T CD4⁺FOXP3⁻. Les Tr1 produisent principalement de l'IL-10, est sont impliqués dans le maintien de la tolérance périphérique et l'induction de la tolérance orale (Battaglia *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2015). Néanmoins, les résultats préliminaires ne montrent pas d'augmentation de la production d'IL-10 dans les ganglions mésentériques. Cependant, ces résultats restent à confirmer et il serait intéressant d'analyser la présence des Tr1 parmi les Tconv spécifiques dans l'intestin.

Les cellules régulatrices Th3 FOXP3⁻LAP⁺ sécrètent des cytokines suppressives telles que TGF- β et d'IL-10 (Scurr *et al.*, 2014) et sont impliquées dans la mise en place de la tolérance orale aussi bien chez l'humain que chez la souris. Une étude a montré dans un modèle murin d'allergie alimentaire à l'OVA que le traitement par immunothérapie épicutanée (EPIT) induit une protection contre le choc anaphylactique et que cette protection est associée à l'induction de cellules T suppressives FOXP3⁻LAP⁺ au niveau de l'intestin (Tordesillas *et al.*, 2017). Les auteurs montrent que la protection clinique observée est liée au contrôle de l'activation des mastocytes par ces cellules, et celui-ci se fait *via* un mécanisme TGF- β dépendant (Tordesillas *et al.*, 2017). Pour savoir si ces Th3 LAP⁺ spécifiques de l'antigène jouent également un rôle dans la protection induite par la combothérapie, il serait intéressant d'analyser la présence de cellules LAP⁺ parmi les Tconv spécifiques au niveau de l'intestin et des MLN.

Une autre explication à la diminution de la production de cytokines Th2 peut être l'acquisition d'un phénotype anergique par les Tconv lié aux mécanismes de suppression employés par les Treg spécifiques pour contrôler la réponse immunitaire.

Une étude transcriptomique des Teff spécifiques de ces souris pourrait permettre d'apporter certains éléments de réponses pour mieux comprendre la protection observée malgré l'expansion de ce compartiment.

3. Impact de la combothérapie sur la biologie des Treg

Tout comme pour les Tconv, l'analyse fonctionnelle, phénotypique et transcriptomique des Treg est essentielle pour une meilleure caractérisation des effets de la combothérapie sur cette population. Les analyses *in vitro* nous ont permis de commencer à caractériser les effets de la combothérapie sur la biologie des Treg. Ainsi, nous avons mis en évidence que les Treg cultivés avec de l'IL-2 et l'antigène (Article, Figure 5) expriment Bcl-2, une molécule anti-apoptotique, à une fréquence plus élevée et expriment également des niveaux plus élevés de marqueurs associés à la stabilité du phénotype Treg comme CD83 et TNFR2 (Chen *et al.*, 2013; Doebbeler *et al.*, 2018; Santinon *et al.*, 2020) comparativement aux contrôles et notamment l'IL-2 seule. Ces résultats sont très prometteurs par rapport à l'effet protecteur à long terme que pourrait avoir la combothérapie IL-2+antigène. En effet, si la combothérapie induisait l'amplification de Treg spécifiques peu stables cela pourrait conduire, malgré un effet protecteur précoce, à l'aggravation de l'allergie si ces Treg devenaient des exTreg potentiellement pathogènes. Cela ne semble pas être le cas. Malgré ces résultats prometteurs, il sera nécessaire de les confirmer *in vivo*, dans le modèle allergie, afin de mieux analyser l'impact de l'inflammation présente sur la stabilité des Treg. Dans ce contexte, l'analyse de l'expression de Bcl-6 et du profil de méthylation de FOXP3 pourrait être des indicateurs intéressants de la stabilité des Treg. Il a été rapporté dans la littérature que la perte de Bcl-6 dans les Treg, entraîne une augmentation de la perte d'expression de FOXP3 par les Treg lorsqu'ils se trouvent en conditions d'inflammation de type Th2 chez des souris (Sawant *et al.*, 2015).

L'analyse *in vitro* a aussi révélé que la combinaison IL-2+antigène induit une expression plus forte et à une fréquence plus élevée des marqueurs associés à l'activation et la fonction des Treg (Article, Figure 5). Ces résultats révèlent que dans la majorité des cas, la présence des deux stimuli, IL-2 et antigène, est nécessaire pour obtenir des Treg ayant un phénotype associé à une forte capacité suppressive. L'augmentation de la fréquence de Treg ICOS⁺ et des Treg OX40⁺ dans la condition IL-2+antigène est particulièrement intéressant dans le cadre de l'allergie. Des études ont montré que les Treg ICOS⁺ représentaient une population fortement suppressive capable de produire de l'IL-10 (Vocanson *et al.*, 2010) et qu'ils sont aussi capables de bloquer la production cytokinique des ILC2, qui jouent un rôle délétère dans la pathologie allergique (Rigas *et al.*, 2017). Bien que cette dernière étude signale que seuls les Treg induits *in vitro* montrent cette capacité, ils sont également les seuls à avoir été activés avec de l'IL-2 et des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 avant la mise en culture avec les ILC2 (Rigas *et al.*, 2017). Ceci expliquerait pourquoi les Treg naturels de leur étude, n'ayant pas reçu de signaux TCR et de costimulation, sont incapables de contrôler les ILC2. Ces résultats soulignent

là encore l'importance de l'antigène pour renforcer la capacité suppressive des Treg. Quant à eux, les Treg OX40⁺ sont capables de bloquer la dégranulation des mastocytes et contrôler les réponses allergiques. Cette suppression est dépendante de l'interaction OX40/OX40L entre les Treg et les mastocytes (Gri *et al.*, 2008).

L'importance de l'ajout de l'antigène est également souligné par le niveau d'expression de CTLA-4 qui est également augmenté suite à la stimulation antigénique, en présence ou en absence d'IL-2. Le rôle central de CTLA-4 sur la fonction suppressive des Treg est bien connu (Fallarino *et al.*, 2002; Grohmann *et al.*, 2002). Par ailleurs, dans le cadre de l'allergie, il a également été montré que cette molécule est impliquée dans le contrôle des réponses Th2 au niveau intestinal par les Treg ROR γ t⁺ (Ohnmacht *et al.*, 2015). De plus, il a été montré que CTLA-4 joue un rôle clé dans la régulation de l'intensité des réponses immunitaires dans l'allergie alimentaire (van Wijk *et al.*, 2005).

GARP (Glycoprotein A repetitions predominant) est un autre marqueur associé à l'activation et à la fonction suppressive des Treg qui est fortement induit par la combinaison IL-2+antigène. Ce marqueur est particulièrement intéressant car il permet d'identifier une sous-population de Treg qui sécrète abondamment de l'IL-10 et TGF- β (Zhong *et al.*, 2016). Dans un contexte d'inflammation intestinale induite par un allergène chez des souris humanisées, la déplétion des Treg GARP⁺ conduit à la perte de la protection conférée par les Treg (Eschborn *et al.*, 2015).

Ainsi, l'analyse de l'expression de ces divers marqueurs montre que la combinaison de l'IL-2 et l'antigène est associée à une meilleure survie, stabilité et fonction des Treg. En effet, les Treg cultivés avec de l'IL-2 et l'antigène sont plus activés et l'expression des marqueurs directement liés à leur fonction suggère qu'ils ont une capacité suppressive plus importante que les Treg cultivés avec l'IL-2 seule. Comme mentionné précédemment, ces résultats sont très encourageants, mais demandent à être vérifiés dans un contexte de maladie allergique.

Pour le moment, une étude transcriptomique est en cours et pourra apporter des informations complémentaires concernant l'impact de la combinaison IL-2+antigène sur les Treg spécifiques. Pour cette étude, des Treg spécifiques de l'OVA, issus d'une souris DO11.10 (rate et ganglions périphériques) ont été triés et mis en culture pendant 3 jours avec de l'IL-2 (100 UI/mL), de l'OVA (1 μ M) et des cellules « feeders » irradiées. Les Treg ont ensuite été triés de nouveau avant extraction de leur ARNm. Comme contrôle, des Treg spécifiques issus de la même souris ont été cultivés avec de l'OVA seule, de l'IL-2 seule ou du milieu seul. L'expérience a été répétée pour 4 souris différentes. Elle nous permettra d'analyser comment

l'expression des gènes de ces Treg est modifiée par les différents signaux, et si l'association des deux stimuli induit un phénotype particulier.

Des études subséquentes devront également être réalisées afin de statuer sur la durée de la protection induite par la combothérapie, l'évolution des compartiments T CD4⁺ antigène-spécifiques dans le temps, la génération de Treg mémoire et la stabilité du phénotype des Treg spécifiques de l'antigène. Les résultats obtenus nous permettront de déterminer si des combothérapies « de rappel » sont nécessaires, comme le montrent Phan *et al.* avec leur stratégie IL-2 mutée et OVA fusionnée avec anti-DEC (Pham *et al.*, 2021). Si nécessaire, un schéma thérapeutique incluant une combothérapie initiale suivie d'une ou plusieurs combothérapies de maintien pourrait être proposé. Pour identifier la distance temporelle entre la combothérapie initiale et celles de maintien, l'identification de biomarqueurs corrélés à la protection serait très intéressante. Pour commencer, on pourrait imaginer des tests d'épreuve suivis par l'identification de la fréquence des Treg et Tconv spécifiques circulants, grâce à la technologie ARTE (*cf.* p59) et évaluer leur fonctionnalité *in vitro*.

C. Association de l'IL-2 faible dose et de l'antigène comme stratégie thérapeutique

1. Risques liés à la réintroduction de l'antigène

Si l'immunothérapie IL-2fd et les ITS, ont fait leurs preuves individuellement (en préclinique et/ou clinique) pour le traitement de l'allergie, l'association des deux est loin d'être anodine. En effet, la réintroduction de l'antigène comporte le risque de déclencher une réaction allergique si la dose dépasse le seuil de tolérance, seuil qui varie en fonction des allergènes (Ballmer-Weber *et al.*, 2015). Ce risque d'aggravation a d'ailleurs été confirmé pour certaines de nos conditions d'administration testées notamment pour la combothérapie administrée par voie orale (Figure 14). En effet, malgré l'absence de symptômes au cours du traitement, pendant lequel les souris ont reçu 2 mg d'OVA p.o. tous les jours pendant 5 jours, lors du test d'épreuve orale, les souris traitées avec l'IL-2 faible dose et l'OVA voient la sévérité de leurs symptômes s'aggraver par rapport aux contrôles non traités. Cette aggravation est liée à l'antigène administré pendant le traitement puisque des résultats similaires sont obtenus chez les contrôles traités avec de l'OVA seule. L'exacerbation de la maladie pourrait s'expliquer par la proximité temporelle entre les derniers gavages avec l'antigène avant le traitement et le début de celui-ci. En effet, l'inflammation et la perturbation de la perméabilité au niveau intestinal causées par ce dernier gavage pourraient contribuer à l'amplification des réponses effectrices Th2 en favorisant l'activation et la polarisation de nouveaux T effecteurs. Augmenter le délai entre le

dernier test d'épreuve orale et le début de la combothérapie serait un moyen simple de vérifier cette hypothèse.

En ce sens, il a été rapporté dans la littérature que les IgE pouvaient être à l'origine d'une amplification des réponses T et B spécifiques de l'antigène par un phénomène appelé « propagation d'épitopes » (« epitope spreading » en anglais) (Gould & Sutton, 2008). En se liant à leur antigène, les IgE fixées au récepteur de faible affinité CD23 exprimé à la surface des DC et les lymphocytes B favorisent la présentation de l'antigène et induisent une augmentation de la réponse T et de la production d'anticorps de spécificité multiple contre les différents épitopes de cet antigène (Carlsson *et al.*, 2007). Des modifications dans la formulation de l'antigène (abordées plus loin) sont des alternatives qui permettraient d'éviter la reconnaissance de l'antigène/allergène par les IgE, l'activation des Th2, et le risque d'exacerbation.

2. Optimisations possibles

Comme mentionné précédemment, l'une des limites de notre combothérapie est la réintroduction de l'allergène chez des individus allergiques, ce qui implique un risque de déclenchement ou d'aggravation des réactions allergiques. Parmi les optimisations possibles de notre combothérapie, les modifications de la formulation de l'antigène et l'ajout d'adjuvants tolérogènes permettraient de limiter ce risque.

a) Formulation de l'antigène

Lorsque l'antigène est administré « à nu » dans un contexte de maladie allergique, il risque de se lier aux IgE spécifiques produites lors de la phase de sensibilisation, induisant l'activation des effecteurs cellulaires pathogènes. L'encapsulation de l'antigène ou de la protéine entière est un moyen efficace de diminuer sa visibilité par les IgE tout en permettant sa capture par des cellules présentatrices et sa présentation aux cellules régulatrices. Plusieurs stratégies d'encapsulation ont montré des résultats prometteurs dans des modèles précliniques de maladies allergiques (Basomba *et al.*, 2002; Brotons-Canto *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2015). En effet, l'utilisation de nanoparticules composées de polymères de poly-acide lactique-co-glycolique (PLGA) recouvert de motif CpG ou de nanoparticules mannosylées ont montré un potentiel thérapeutique prometteur dans le cadre d'optimisation d'OIT dans des modèles d'allergie alimentaire à la cacahuète (Brotons-Canto *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2015). Il est important de souligner que l'administration de ces nanoparticules pendant le traitement n'a pas occasionné de choc anaphylactique. Néanmoins, la protection induite par ces nanoparticules

repose principalement sur une déviation immunitaire Th1 grâce à l'utilisation de motifs CpG plutôt que l'induction de Treg.

Une ancienne étude clinique a également montré l'innocuité et le potentiel thérapeutique des liposomes dans le traitement de l'asthme allergique. Dans cette étude, de l'extrait de *Dermatophagoides pteronyssinus* (une espèce d'acarien domestique) est encapsulé dans des liposomes et administré pendant 1 an à des patients asthmatiques (Basomba *et al.*, 2002). Les auteurs montrent que ce traitement a permis la réduction de la sévérité de la maladie associée à une augmentation d'IgG spécifiques.

Parmi ces stratégies, mon équipe a développé des pseudo-particules virales ou VLP (Virus-like particle) comme agent vaccinal tolérogène. Pour cela, les VLP ont été recouvertes d'une molécule immunorégulatrice, le CTLA-4 et font l'objet de deux brevets : un pour leur utilisation dans l'allergie (WO2019081872) et un autre pour son utilisation dans les maladies auto-immunes (WO2019081873). L'encapsulation de la protéine OVA dans des VLP présentant des molécules de CTLA-4 à leur surface (tVLP) a montré son potentiel thérapeutique dans un modèle d'allergie alimentaire à l'OVA. En effet, le traitement de souris sensibilisées à l'OVA avec ces tVLP permet le contrôle de l'allergie alimentaire de manière spécifique et à long terme (Vinot *et al.* données non publiées). De plus, des tVLP, recouverts de protéines de surfaces spécifiques du variant (VSP) issues du parasite intestinal *Giardia lamblia* sont en cours de développement. Il a été montré que ces VSP remplissent une double fonction : protéger les VLP administrées par voie orale de la dégradation et stimuler l'activation des CPA *via* le TLR4 (Serradell *et al.*, 2019). Ces propriétés sont d'autant plus intéressantes qu'il a récemment été montré que le TLR4 est essentiel à l'induction de la tolérance orale dans un modèle murin de dermatite allergique de contact (Hacini-Rachinel *et al.*, 2018). Les auteurs montrent que le TLR4 est essentiel pour la migration des DC tolérogènes CD103⁺CD11b⁺RALDH⁺ intestinales vers les ganglions mésentériques où elles induisent la conversion de Tconv en pTreg (Hacini-Rachinel *et al.*, 2018). L'administration orale de tVLP-VSP contenant de l'OVA apparaît comme une stratégie intéressante pour renforcer la tolérance orale envers un allergène, tout en diminuant les risques de choc anaphylactique en raison de l'encapsulation de l'allergène.

Toutes ces approches d'encapsulation et notamment les tVLP, déjà utilisées dans notre laboratoire, constituent des pistes intéressantes pour améliorer la combothérapie en réduisant les risques liés à la réintroduction de l'allergène et en maximisant l'effet protecteur.

b) Association de la combothérapie avec des adjuvants et autres stratégies thérapeutiques

(1) Adjuvants

Une autre optimisation possible pour améliorer la protection de la combothérapie est l'ajout d'adjuvants. Certains ont été retenus pour recouvrir les vecteurs utilisés pour encapsuler l'antigène (mentionnés ci-dessus) et ainsi favoriser l'induction de Treg ou la déviation immunitaire Th1/Th2 ; d'autres permettent de restreindre l'activation des effecteurs T.

La rapamycine est une molécule ayant des propriétés suppressives. Il a été montré, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, que la rapamycine présente un effet antiprolifératif sur les Tconv tout en favorisant l'expansion des Treg et en préservant leur fonction suppressive (Battaglia *et al.*, 2006). De plus, cette molécule augmente l'expression de FOXP3 chez les Treg (Thomson *et al.*, 2009). La rapamycine a notamment été utilisée dans des protocoles d'expansion de Treg dans les thérapies cellulaires de transfert adoptif. Dans ces protocoles d'expansion, l'association de l'IL-2, de la rapamycine et du TGF- β permet de renforcer la stabilité des Treg en augmentant le niveau de déméthylation du TSDR de FOXP3 (Mathew *et al.*, 2018).

Nous avons décidé d'exploiter les propriétés pro-Treg et anti-Tconv de la rapamycine afin de diminuer l'activation des Tconv spécifiques de l'antigène lors de l'administration de l'antigène. Dans le modèle de transfert adoptif, la combothérapie, en association avec la rapamycine (Figure 13), induit une très forte stimulation du compartiment Treg spécifique associée à une stimulation réduite des Tconv spécifiques de l'antigène. Ces données encourageantes nous ont conduit à tester le potentiel thérapeutique de cette combothérapie + rapamycine lors de la réintroduction de l'antigène par voie orale (Figure 14). Les résultats des tests d'épreuve post-traitement montrent que la rapamycine permet de bloquer de façon significative l'aggravation de la maladie causée par l'ajout de l'antigène. De plus, l'association IL-2/rapamycine dans la condition IL-2/OVA/RAPA semble avoir un effet protecteur légèrement supérieur à celui de l'IL-2 seule. Néanmoins, un contrôle IL-2/RAPA est nécessaire pour confirmer ces observations.

Ainsi la rapamycine constitue un adjuvant intéressant pour diminuer le risque d'activation des Tconv spécifiques lors de la réintroduction de l'antigène pendant le traitement par la combothérapie.

Un autre adjuvant intéressant, également utilisé dans les protocoles d'expansion de Treg lors des transferts adoptifs, est l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique des kinases CDK8

et CDK19. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de CDK8/19 permet d'induire *in vitro* comme *in vivo* l'expression de FOXP3 dans les cellules Tconv et ce aussi bien dans les cellules T naïves que dans les cellules T effectrices/mémoires. De plus, l'inhibition de CDK8/19 dans des cellules FOXP3⁺ est associée à une expression d'autres marqueurs fonctionnels comme CTLA-4, PD-1 et GITR (Guo *et al.*, 2019). L'inhibition de CDK8/19 bloque également la différenciation des cellules Tconv en lymphocytes T helper effecteurs (Akamatsu *et al.*, 2019). Dans un modèle murin d'EAE, le traitement avec un inhibiteur de CDK8/19, le CCT251921, augmente significativement la fréquence de Treg aussi bien dans les ganglions drainants que dans la rate et la moelle épinière. Cette augmentation est associée à une amélioration des signes cliniques de l'EAE (Guo *et al.*, 2019). Associé à la combothérapie, un inhibiteur de CDK8/19 pourrait non seulement bloquer l'activation de nouveaux effecteurs Th2, mais aussi convertir les T effecteurs spécifiques déjà activés en Treg spécifiques de l'antigène (pTreg).

La vitamine D3 a également des propriétés tolérogènes intéressantes : *in vitro*, la culture de DC avec sa forme active, la 1 α ,25-Dihydroxyvitamine D3 empêche l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86) et du complexe CMH II/peptide à la surface des DC (Penna & Adorini, 2000). Cet effet est associé à une réduction de la capacité des DC à activer des lymphocytes T alloréactifs. Utilisée en tant qu'adjuvant pendant une ITS, l'administration orale de l'1 α ,25-Dihydroxyvitamine D3 permet la diminution de la dose d'antigène nécessaire, l'augmentation de la production de cytokines comme l'IL-10 et l'IFN- γ et la diminution de la production de cytokines Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-13 (Petrarca *et al.*, 2016). Une étude récente montre que l'encapsulation de l'OVA avec la vitamine D3 dans des nanoparticules permet de mieux cibler les cellules dendritiques. Les auteurs montrent également que l'administration par voie orale des nanoparticules OVA+vitamine D3 permet d'induire une tolérance immunitaire spécifique à l'OVA (Jung *et al.*, 2019).

(2) Autres stratégies

Une autre stratégie thérapeutique qui a été testée en association avec les immunothérapies spécifiques et qui pourrait faire l'objet d'une combinaison intéressante avec notre combothérapie est l'anticorps anti-IgE (Omalizumab). Une étude clinique a montré que le traitement d'asthme allergique en combinant l'ITS avec l'administration d'anti-IgE permet de réduire la sévérité des symptômes par rapport à l'ITS seule (Kopp *et al.*, 2009). En effet, l'omalizumab réduit les taux d'IgE circulants, l'expression de Fc ϵ RI et la dégranulation des effecteurs cellulaires tels que les mastocytes et les basophiles (Kopp *et al.*, 2009).

Une autre alternative intéressante pour contourner le risque de déclenchement ou d'aggravation de l'allergie par la combothérapie est l'expansion de Treg spécifiques d'un antigène différent, mais susceptible de co-localiser avec l'allergène. Cette stratégie est basée sur la capacité des Treg à supprimer de façon bystander des effecteurs avoisinants. L'efficacité de cette « immunothérapie bystander » (par opposition à « spécifique ») a été montrée dans un modèle asthme allergique chez la souris (Navarro et al., 2015). Pour cela, les auteurs ont sensibilisé des souris avec l'antigène LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated c kinase) puis les ont rendues tolérantes à l'OVA à la suite des administrations répétées par voie intranasale. Par la suite, des tests d'épreuve avec des aérosols LACK et LACK+OVA ont montré que les souris tolérantes à l'OVA présentaient une réduction forte de l'inflammation des voies respiratoires lorsque LACK et OVA étaient co-administrés. Les auteurs montrent que cette protection est abolie par l'utilisation d'anticorps bloquant anti-CTLA-4 et anti-ICOS, des marqueurs associés à la fonction suppressive des Treg.

À première vue, il peut paraître contradictoire de proposer une combothérapie pour amplifier et recruter des Treg d'une spécificité autre que celle associée à l'immunopathologie, surtout après avoir vanté les avantages des Treg spécifiques. Néanmoins, cette approche bystander permet d'exploiter certaines des caractéristiques qui expliquent l'efficacité des Treg spécifiques pour supprimer les réponses immunitaires dirigées contre leur antigène. En effet, cette approche « bystander » permettrait d'activer et de recruter des Treg au niveau des sites inflammatoires où se trouve leur antigène (non impliqué dans la maladie). Les Treg pourront ainsi contrôler, de façon non spécifique, les effecteurs locaux par plusieurs mécanismes comme la sécrétion de cytokines suppressives, la modulation des cellules dendritiques ou par l'induction de perturbations métaboliques. Par ailleurs, ce contrôle bystander des réponses allergène-spécifiques pathogènes pourrait, par la suite, favoriser l'induction de la tolérance envers un autre antigène dont l'allergène associé à l'immunopathologie. Cette tolérance pourrait être renforcée par une deuxième combothérapie combinant allergène d'intérêt et antigène « bystander » afin d'induire les Treg spécifiques de l'allergène tout en réduisant les risques qu'implique l'administration de l'allergène. L'induction de Treg spécifiques de l'allergène permettrait de dépasser la contrainte de coadministrer l'antigène « bystander » avec l'allergène pour observer une protection. Ainsi, une première combothérapie IL-2+antigène alimentaire (pas impliqué dans l'allergie) ou antigène intestinal, suivie d'une deuxième immunothérapie IL-2+antigène alimentaire ou intestinal + allergène pourrait permettre l'induction d'une première « vague » de Treg non spécifiques de l'allergène capables de

contrôler l'activation potentielle des effecteurs pathogènes lors de l'administration de l'allergène au cours de la deuxième combothérapie.

Parmi toutes ces stratégies, il serait intéressant de tester l'efficacité d'une association tVLP-VSP contenant de l'OVA + IL-2fd. Cette approche permet de diminuer les risques associés à l'administration de l'antigène en diminuant sa visibilité par les effecteurs de l'allergie, tout en modulant l'activation des cellules dendritiques grâce aux molécules CTLA-4 présentes à la surface et qui permettent la mise en place d'un profil tolérogène propice à l'induction de Treg spécifiques qui seront alors stimulés par l'IL-2 (3 jours plus tard).

c) Voie d'administration

La voie d'administration est une variable importante qui peut modifier l'issue de la combothérapie. Chacune des voies d'administration comporte des avantages et des inconvénients. Lors de l'identification de modalités d'administration, nous avons testé des voies systémiques dites aussi parentérales telles que la voie intraveineuse et la voie sous-cutanée. Lorsque l'antigène est administré par l'une de ces voies, une forte expansion des Treg spécifiques au niveau systémique est favorisée. Néanmoins, la propagation de l'antigène dans la circulation comporte un risque très élevé d'induction de choc anaphylactique lors de son administration. Ce risque est particulièrement élevé pour la voie intraveineuse utilisée dans nos modèles de transfert adoptif mais que nous ne souhaitons pas étudier en thérapeutique en raison de ce risque. La voie sous-cutanée semble avoir un risque diminué de choc anaphylactique par rapport à la voie intraveineuse et est utilisée dans certaines ITS. Néanmoins, elle induit qu'une faible augmentation des Treg spécifiques au niveau intestinal. Pour augmenter le recrutement intestinal des Treg spécifiques, nous avons choisi la voie orale, souvent utilisée dans le cadre d'ITS pour traiter les allergies alimentaires. L'administration de l'antigène par cette voie a effectivement permis d'augmenter le nombre de Treg spécifiques au niveau intestinal. Cependant, dans les conditions d'administration testées, la voie orale ne semble pas avoir d'effet protecteur supérieur (Figure 14) à celui observé pour la stratégie J-3 en sous-cutanée. (Article, Figure 4). Toutefois, des changements de doses et de cinétiques d'administration, ainsi que l'ajout d'adjuvants pourraient améliorer le début de protection observée pour la condition IL-2/OVA/RAPA. L'utilisation de tVLP-VSP contenant de l'OVA, mentionnée ci-dessus, apparaît comme une stratégie intéressante pour l'immunothérapie orale et qui pourrait être facilement combinée à l'administration IL-2fd.

En plus de la voie orale, les voies sublinguale et épicutanée sont également des voies d'administration utilisées dans le traitement des allergies par ITS. De ce fait, elles constituent des alternatives intéressantes pour l'administration de l'antigène.

L'immunothérapie sublinguale est l'une des stratégies les plus courantes. La voie sublinguale est associée à un risque faible d'effets systémiques sévères. Une étude a montré que les cellules présentatrices de l'antigène peuvent stimuler des cellules T CD4⁺ régulatrices capables de sécréter de l'IL-10 et polariser les T naïfs en T effecteurs de type Th1 (Mascarell *et al.*, 2008).

De part ces propriétés tolérogènes, l'utilisation de cette voie pour administrer l'antigène permettrait d'amplifier les effets de la combothérapie sur l'expansion et le recrutement de Treg spécifiques. Une éventuelle collaboration avec Stallergenes Greer, un laboratoire britannique ayant mis au point les premières tablettes sublinguales, ORALAIR®, pour traiter les allergies respiratoires, permettrait d'évaluer si l'administration sublinguale de l'antigène associé à l'IL-2fd permet de renforcer la protection clinique voire de diminuer le temps de traitement nécessaire pour l'obtenir.

Des études ont également montré que l'immunothérapie épicutanée (EPIT) permet de réduire la réactivité de souris sensibilisées aux allergènes dans divers modèles d'allergie. Cet effet est associé à une augmentation des IgG2a, une diminution significative de taux d'IgE spécifiques et de la quantité de cytokines Th2 dans la circulation et dans les lavages bronchoalvéolaires (BAL) ainsi qu'une diminution de l'infiltrat cellulaire dans les BAL (Mondoulet *et al.*, 2011, 2012; Pelletier *et al.*, 2021). De même, l'EPIT permet d'augmenter le taux des Treg et induit également des modifications épigénétiques telles que la déméthylation du TSDR de FOXP3 ce qui est associé à un phénotype Treg stable (Mondoulet *et al.*, 2019). Ces résultats sont particulièrement intéressants, car l'utilisation de cette voie pour administrer l'antigène de notre combothérapie pourrait favoriser la stabilité des Treg spécifiques amplifiés. Ainsi, des associations EPIT et IL-2fd pourraient renforcer la protection contre les manifestations cliniques de l'allergie par rapport à l'utilisation d'EPIT ou l'IL-2fd seules. Une éventuelle collaboration avec DBV Technologies pourrait permettre de développer cette optimisation. En effet, DBV Technologies a développé la technologie Viaskin®, un patch qui permet administrer des allergènes par voie épicutanée sur une peau intacte, et qui a été utilisé dans les études mentionnées ci-dessus.

D. Perspectives de développement clinique

La combothérapie IL-2+antigène apparaît comme une stratégie intéressante pour l'induction et le recrutement des Treg spécifiques. Cette stratégie, ayant montré des résultats prometteurs dans le cadre de l'allergie alimentaire, nécessite des études complémentaires à propos de son impact sur les différents acteurs impliqués dans les maladies allergiques et pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la protection. Afin de développer cette stratégie en clinique, il est nécessaire d'évaluer la durée de la protection et la stabilité des Treg spécifiques recrutés pour s'assurer de la sûreté de l'approche pour le traitement des maladies allergiques.

Un frein potentiel au développement clinique de la combothérapie comme traitement pour les maladies allergiques est le risque lié à la réintroduction de l'antigène. Cependant, l'utilisation plus ou moins courante des diverses stratégies d'ITS ainsi que les différentes optimisations proposées précédemment sont des arguments qui pourraient jouer en faveur de la combothérapie. L'adjuvantation des ITS en les associant à une immunothérapie IL-2fd est une variante de la combothérapie intéressante à explorer. Cependant, suite aux résultats obtenus dans notre combothérapie orale (Figure 14), il semblerait que la co-administration des deux éléments, allergène et IL-2fd, soit à éviter. Des schémas thérapeutiques alternant le protocole d'ITS classique et la combothérapie pourraient permettre d'atteindre plus rapidement une protection contre les manifestations cliniques de l'allergie sans provoquer d'aggravation.

D'autre part, la combothérapie pourrait également se révéler intéressante dans le traitement des maladies auto-immunes. Même si l'antigène est présent dans ces pathologies (au moins jusqu'à la destruction complète de la source, comme le cas de l'insuline dans le diabète de type 1), la combothérapie permettrait de contrôler les conditions d'administration et donc le contexte dans lequel l'antigène sera présenté par les CPA, favorisant l'activation et le recrutement des Treg spécifiques au niveau des sites inflammatoires.

CONCLUSION

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que la combothérapie IL-2 et antigène, l'antigène étant administré selon des modalités d'administration bien précises (antigène 3 jours avant la thérapie IL-2fd), permet la stimulation et le recrutement des Treg spécifiques de l'antigène aussi bien dans un modèle de transfert adoptif que dans un modèle d'allergie alimentaire. Ces résultats sont très intéressants, car ils montrent que l'expansion *in vivo* des Treg spécifiques est possible. Cette stratégie se positionne comme une stratégie d'adjuvantation voire de remplacement des ITS classiques et une alternative aux thérapies cellulaires aux coûts techniques et financiers non négligeables dans le cadre du traitement de maladies auto-immunes. De façon intéressante, des études publiées très récemment obtiennent des résultats similaires aux nôtres démontrant la possibilité d'expandre *in vivo* des Treg spécifiques en associant l'antigène à des complexes IL-2/anti-IL-2 ou des mutéines d'IL-2. L'une de ces stratégies a d'ailleurs montré un effet protecteur contre le développement du diabète de type 1 chez des souris. De notre côté, les premiers résultats indiquent que notre stratégie a un potentiel thérapeutique très prometteur dans l'allergie alimentaire : en effet, nous avons montré que des souris allergiques traitées par notre combothérapie sont protégées contre les manifestations sévères de l'allergie alimentaire telles que le choc anaphylactique. Néanmoins, des exacerbations de la maladie allergique ont été observées pour certaines conditions d'administration et notamment lors de l'administration orale de l'antigène. Des modifications subséquentes des modalités d'administration permettraient de réduire les risques liés à la réintroduction de l'allergène et de renforcer la protection contre les manifestations cliniques de l'allergie en incluant non seulement les manifestations sévères systémiques, mais aussi les manifestations locales telles que les diarrhées. Des analyses complémentaires permettraient également de mieux caractériser les mécanismes immunitaires mis en place et de proposer des optimisations afin d'augmenter le niveau de protection.

COMMUNICATION/MÉDIATION SCIENTIFIQUE

Le défi de trouver les bons mots et les bonnes images mentales pour expliquer des concepts scientifiques à différents publics m'a toujours attiré. J'ai saisi les opportunités offertes par la thèse pour relever ce défi et m'essayer à la communication et la médiation scientifiques.

A. Vis Ma Vie De Chercheur (VMVDC)

J'ai été sélectionnée pour réaliser la mission doctorale de médiation scientifique « Vis Ma Vie De Chercheur » (VMVDC) de l'Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS) avec 7 autres doctorants lors de ma 2^e et 3^e année de thèse. Tous les 8, nous avons conçu et animé des TP ludiques sous forme d'enquête, en français ou en anglais, devant des classes de lycéens d'Île-de-France (allant de la seconde jusqu'à la terminale). Nous avons même développé la version numérique lorsque les restrictions sanitaires ne permettaient pas la réalisation en présentiel.

Pour une expérience réaliste de la recherche, les élèves ont accès à du matériel de laboratoire pour réaliser une PCR, une migration sur gel, l'observation d'un modèle animal (drosophile, poisson-zèbre) et un test au luminol. Nous discutons des résultats de leurs expériences et les élèves en tirent des conclusions qui leur permettent d'avancer dans le scénario et résoudre l'énigme scientifique au cœur du projet.

VMVDC a plusieurs objectifs :

- Consolider de façon interactive et originale les notions abordées en classe tout au long de l'année concernant l'ADN et la PCR
- Suivre une démarche scientifique rigoureuse tels de véritables chercheurs/chercheuses pour résoudre le scénario proposé (2019-2020 : enquête policière, 2020-2021 : enquête médicale)
- Discuter sur l'expérimentation animale : comment elle est encadrée, pourquoi elle est considérée nécessaire
- Faire découvrir l'université aux lycéens et montrer qu'elle leur est accessible
- Présenter les cursus de formation en biologie et les différents métiers auxquels ils mènent

Le programme VMVDC 2019-2021 est soutenu par la Région Île-de-France, le Rectorat, la Mairie de Paris, l'Institut de Biologie Paris-Seine, le CNRS et Sorbonne Université.

B. Ma Thèse en 180 secondes (MT180)

Intimidante au premier abord, ma participation au concours Ma Thèse en 180 secondes fut finalement une expérience stimulante et enrichissante. Grâce à la formation de préparation au concours, j'ai acquis des compétences en prise de parole en public et en conception de discours avec un vocabulaire adapté à divers publics. Ces compétences me serviront pour la suite de ma vie professionnelle, quelle qu'elle soit.

Ce fut aussi l'occasion de rencontrer des doctorants hors du laboratoire et de notre domaine de recherche, de confronter nos sujets, et de nous sensibiliser aux disciplines des uns et des autres.

Lors de la finale régionale de Sorbonne Université, j'ai été récompensée avec le prix du public.

Vidéo



Texte :

« Réussirai-je à vous faire tolérer l'intolérable ?

Comme environ 200 millions de personnes dans le monde, Théo, 16 ans, a une allergie alimentaire... Lui, il est allergique à l'œuf.

Cela veut dire que son système immunitaire a ajouté par erreur l'œuf sur la liste noire où il met les éléments réellement dangereux comme ce virus qui nous pourri la vie.

Résultat de cette erreur, quand Théo mange de l'œuf, son système immunitaire balance l'artillerie lourde en pensant détruire l'ennemi public numéro un. En réalité, cette réaction disproportionnée peut mettre en péril la vie de Théo.

Comment faire pour l'aider ?

Hé bien, une autre liste existe : la liste des approuvés, certifiée 100% gentils !

Cette liste est gérée par des cellules immunitaires appelées les lymphocytes T régulateurs, ou Treg pour les intimes. Chaque Treg est prédestiné à inscrire le nom d'un seul élément sur cette liste, il est spécifique de cet élément. Le protocole est strict, avant d'écrire le nom, le Treg doit rencontrer cet élément. Qui, une fois sur la liste, est libre d'aller et venir à sa guise sans se faire embêter par notre système immunitaire, car il est toléré. Comme l'est la nourriture chez les non allergiques.

Vous commencez peut-être à vous dire que ça serait super que les Treg spécifiques de l'œuf chez Théo se mobilisent et inscrivent l'œuf sur la bonne liste.

Mais... si Théo est allergique, c'est en partie parce que ses Treg sont un peu mal en point. Ils ont besoin d'un petit remontant pour se requinquer, mais pas seulement, ils ont besoin de voir l'œuf pour se rappeler de l'inscrire dans la bonne liste.

Côté petit remontant, j'ai ce qu'il me faut : l'interleukine-2, la star de mon laboratoire. Une molécule qui permet de renforcer les Treg : leur nombre, leur survie, mais surtout leur fonction.

Ma stratégie thérapeutique semble simple : associer l'interleukine-2 et a ce qui déclenche l'allergie pour mobiliser les Treg spécifiques et voilà, on peut guérir Théo !

Mais si c'était si facile, ma thèse serait finie depuis bien longtemps. Si je donne de l'œuf à Théo, je risque de déclencher son allergie, et dans certains contextes, l'ajout d'interleukine-2 peut empirer la chose.

Mais moi j'y crois vraiment à ce couple explosif ! Il faut juste que je trouve les bonnes conditions d'administration qui me permettront de recruter et de favoriser les Treg spécifiques de l'œuf. Quelle dose d'œuf utiliser, quand ajouter l'œuf par rapport à l'interlukine-2. À toutes ces questions, je réponds grâce à des souris allergiques à l'œuf, mes partenaires particulières. Et ensemble on les a trouvées ces fameuses conditions ! Si aujourd'hui j'arrive à faire tolérer l'intolérable à mes souris. Peut-être que demain on aura Théo, 16 ans, ex-allergique à l'œuf. »

C. Autres communications

Moguel-Houssin, H., Vigneron, J., Gouritin, B., Fourcade, G., Vantomme, H., Klitzmann, D., Bellier, B. Immunotherapy combining allergen with low-dose IL-2 to generate antigen-specific regulatory T cells and improve food allergy. 6th European Congress of Immunology 2021. Communication affichée.

Moguel-Houssin, H., Vigneron, J., Gouritin, B., Fourcade, G., Vantomme, H., Klitzmann, D., Bellier, B. IL-2 and antigen combination: Biological effect on Tregs and therapeutic potential for food allergy treatment. JED 2021. Communication orale.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2016). *Cellular and Molecular Immunology* (Elsevier (ed.); 9th Editio, p. 608).
- Abo, H., Flannigan, K. L., Geem, D., Ngo, V. L., Harusato, A., & Denning, T. L. (2019). Combined IL-2 Immunocomplex and Anti-IL-5 mAb Treatment Expands Foxp3⁺ Treg Cells in the Absence of Eosinophilia and Ameliorates Experimental Colitis. *Front. Immunol.*, *10*, 459.
- Akamatsu, M., Mikami, N., Ohkura, N., Kawakami, R., Kitagawa, Y., Sugimoto, A., Hirota, K., Nakamura, N., Ujihara, S., Kurosaki, T., Hamaguchi, H., Harada, H., Xia, G., Morita, Y., Aramori, I., Narumiya, S., & Sakaguchi, S. (2019). Conversion of antigen-specific effector/memory T cells into Foxp3-expressing Treg cells by inhibition of CDK8/19. *Sci. Immunol.*, *4*(40), 1–17.
- Akdis, C. A., & Akdis, M. (2011). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *127*(1), 18–27.
- Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wüthrich, B., & Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.*, *102*(1), 98–106.
- Akdis, C. A., Joss, A., Akdis, M., Faith, A., & Blaser, K. (2000). A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *FASEB J.*, *14*(12), 1666–1668.
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., & Akdis, C. A. (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*(11), 1567–1575.
- Akkaya, B., Oya, Y., Akkaya, M., Al Souz, J., Holstein, A. H., Kamenyeva, O., Kabat, J., Matsumura, R., Dorward, D. W., Glass, D. D., & Shevach, E. M. (2019). Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nat. Immunol.*, *20*(February).
- Almeida, A. R. M., Legrand, N., Papiernik, M., & Freitas, A. A. (2002). Homeostasis of Peripheral CD4⁺ T Cells: IL-2R α and IL-2 Shape a Population of Regulatory Cells That Controls CD4⁺ T Cell Numbers. *J. Immunol.*, *169*(9), 4850–4860.
- Anderson, M. S., Venzani, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., Von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., & Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* (80-), *298*(5597), 1395–1401.
- Apostolou, I., & Von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.*, *199*(10), 1401–1408.
- Arock, M., Zuany-Amorim, C., Singer, M., Benhamou, M., & Pretolani, M. (1996). Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur. J. Immunol.*, *26*(1), 166–170.
- Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., & Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.*, *184*(August), 387–396.
- Bacchetta, R., Barzaghi, F., & Roncarolo, M.-G. (2018). From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *1417*(1), 5–22.
- Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S. E., Perroni, L., Dagna-Bricarelli, F., Sartirana, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., Azzari, C., Ziegler, S. F., Levings, M. K., & Roncarolo, M. G. (2006). Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest.*, *116*(6), 1713–1722.
- Bacher, P., Heinrich, F., Stervbo, U., Nienen, M., Vahldieck, M., Iwert, C., Vogt, K., Kollet, J., Babel, N., Sawitzki, B., Schwarz, C., Bereswill, S., Heimesaat, M. M., Heine, G., Gadermaier, G., Asam, C., Assenmacher, M., Kniemeyer, O., Brakhage, A. A., ... Scheffold, A. (2016). Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell*, *167*(4), 1067–1078.e16.
- Ballmer-Weber, B. K., Fernandez-Rivas, M., Beyer, K., Defernez, M., Sperrin, M., Mackie, A. R., Salt, L. J., Hourihane, J. O. B., Asero, R., Belohlavkova, S., Kowalski, M., De Blay, F., Papadopoulos, N. G., Clausen, M., Knulst, A. C., Roberts, G., Popov, T., Sprickelman, A. B., Dubakiene, R., ... Mills, E. N. C. (2015). How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *135*(4), 964–971.
- Basomba, A., Tabar, A. I., De Rojas, D. H. F., García, B. E., Alamar, R., Olaguibel, J. M., Prado, J. M.

- Del, Martín, S., & Rico, P. (2002). Allergen vaccination with a liposome-encapsulated extract of *Dermatophagoides pteronyssinus*: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *109*(6), 943–948.
- Battaglia, M., Gianfrani, C., Gregori, S., & Roncarolo, M. G. (2004). IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *1029*, 142–153.
- Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., Horejs-Hoeck, J., Kaupper, T., & Roncarolo, M.-G. (2006). Rapamycin Promotes Expansion of Functional CD4 + CD25 + FOXP3 + Regulatory T Cells of Both Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients. *J. Immunol.*, *177*(12), 8338–8347.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., & Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.*, *27*(1), 20–21.
- Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., & Noelle, R. J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med.*, *204*(8), 1765–1774.
- Berard, M., & Tough, D. F. (2002). Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology*, *106*(2), 127–138.
- Bergerson, J. R., Erickson, K., & Singh, A. M. (2017). Tr1 Cell Identification and Phenotype in Children with and without Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *139*(2), AB70.
- Bilate, A. M., & Lafaille, J. J. (2012). Induced CD4 + Foxp3 + regulatory T cells in immune tolerance. *Annu. Rev. Immunol.*, *30*, 733–758.
- Blat, D., Zigmund, E., Alteber, Z., Waks, T., & Eshhar, Z. (2014). Suppression of murine colitis and its associated cancer by carcinoembryonic antigen-specific regulatory T cells. *Mol. Ther.*, *22*(5), 1018–1028.
- Bluestone, J. A., Buckner, J. H., Fitch, M., Gitelman, S. E., Gupta, S., Hellerstein, M. K., Herold, K. C., Lares, A., Lee, M. R., Li, K., Liu, W., Long, S. A., Masiello, L. M., Nguyen, V., Putnam, A. L., Rieck, M., Sayre, P. H., & Tang, Q. (2015). Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.*, *7*(315), 315ra189-315ra189.
- Bohle, B., Kinacian, T., Gerstmayr, M., Radakovics, A., Jahn-Schmid, B., & Ebner, C. (2007). Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *120*(3), 707–713.
- Boissonnas, A., Scholer-Dahirel, A., Simon-Blancal, V., Pace, L., Valet, F., Kissenpfennig, A., Sparwasser, T., Malissen, B., Fetler, L., & Amigorena, S. (2010). Foxp3+ T Cells Induce Perforin-Dependent Dendritic Cell Death in Tumor-Draining Lymph Nodes. *Immunity*, *32*(2), 266–278.
- Bonnet, B., Vigneron, J., Levacher, B., Vazquez, T., Pitoiset, F., Brimaud, F., Churlaud, G., Klatzmann, D., & Bellier, B. (2016). Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell-Mediated Control of Experimental Food Allergy. *J. Immunol.*, *197*(1), 188–198.
- Boonpiyathad, T., Sokolowska, M., Morita, H., Rückert, B., Kast, J. I., Wawrzyniak, M., Sangasapaviliya, A., Pradubongsa, P., Fuengthong, R., Thantiworasit, P., Sirivichayakul, S., Kwok, W. W., Ruxrungtham, K., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2019). Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy. *Allergy*, *74*(5), 976–985.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., Rossini, P. M., Battistini, L., Röttschke, O., & Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, *110*(4), 1225–1232.
- Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M. P., Surh, C. D., & Sprent, J. (2006). Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* (80-.), *311*(5769), 1924–1927.
- Brotons-Canto, A., Gamazo, C., Martín-Arbella, N., Abdulkarim, M., Gumbleton, M., Quincoces, G., Peñuelas, I., & Irache, J. M. (2019). Mannosylated Nanoparticles for Oral Immunotherapy in a Murine Model of Peanut Allergy. *J. Pharm. Sci.*, *108*(7), 2421–2429.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepfer, B., Clark, L. B., Yasayko, S., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., & Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.*, *27*(1), 68–73.
- Brunstein, C. G., Miller, J. S., Cao, Q., McKenna, D. H., Hippen, K. L., Curtsinger, J., DeFor, T., Levine, B. L., June, C. H., Rubinstein, P., McGlave, P. B., Blazar, B. R., & Wagner, J. E. (2011). Infusion

- of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: Safety profile and detection kinetics. *Blood*, 117(3), 1061–1070.
- Burchill, M. A., Yang, J., Vang, K. B., Moon, J. J., Chu, H. H., Lio, C. W. J., Vegoe, A. L., Hsieh, C. S., Jenkins, M. K., & Farrar, M. A. (2008). Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire. *Immunity*, 28(1), 112–121.
- Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A. C., Mages, H. W., Lam, K.-P., Coyle, A. J., Kroccek, R. A., & Hutloff, A. (2008). ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, 180(2), 774–782.
- Busse, M., Krech, M., Meyer-Bahlburg, A., Hennig, C., & Hansen, G. (2012). ICOS Mediates the Generation and Function of CD4 + CD25 + Foxp3 + Regulatory T Cells Conveying Respiratory Tolerance. *J. Immunol.*, 189(4), 1975–1982.
- Cabello-Kindelan, C., MacKey, S., Sands, A., Rodriguez, J., Vazquez, C., Pugliese, A., & Bayer, A. L. (2020). Immunomodulation followed by antigen-specific treg infusion controls islet autoimmunity. *Diabetes*, 69(2), 215–227.
- Carlsson, F., Hjelm, F., Conrad, D. H., & Heyman, B. (2007). IgE enhances specific antibody and T-cell responses in mice overexpressing CD23. *Scand. J. Immunol.*, 66(2–3), 261–270.
- Caudy, A. A., Reddy, S. T., Chatila, T., Atkinson, J. P., & Verbsky, J. W. (2007). CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119(2), 482–487.
- Cepika, A. M., Sato, Y., Liu, J. M. H., Uyeda, M. J., Bacchetta, R., & Roncarolo, M. G. (2018). Tregopathies: Monogenic diseases resulting in regulatory T-cell deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 142(6), 1679–1695.
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J. M., Jack, R. S., Wunderlich, F. T., Brünig, J. C., Müller, W., & Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, 34(4), 566–578.
- Chen, X., Subleski, J. J., Hamano, R., Howard, O. M. Z., Wiltrout, R. H., & Oppenheim, J. J. (2010). Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4 +FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur. J. Immunol.*, 40(4), 1099–1106.
- Chen, X., Subleski, J. J., Kopf, H., Howard, O. M. Z., Männel, D. N., & Oppenheim, J. J. (2008). Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4 + CD25 + FoxP3 + T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *J. Immunol.*, 180(10), 6467–6471.
- Chen, X., Wu, X., Zhou, Q., Howard, O. M. Z., Netea, M. G., & Oppenheim, J. J. (2013). TNFR2 Is Critical for the Stabilization of the CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cell Phenotype in the Inflammatory Environment. *J. Immunol.*, 190(3), 1076–1084.
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nat. Immunol.*, 17(11), 1322–1333.
- Chopra, M., Biehl, M., Steinfatt, T., Brandl, A., Kums, J., Amich, J., Vaeth, M., Kuen, J., Holtappels, R., Podlech, J., Mottok, A., Kraus, S., Jordán-Garrote, A. L., Bäuerlein, C. A., Brede, C., Ribechini, E., Fick, A., Seher, A., Polz, J., ... Beilhack, A. (2016). Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *J. Exp. Med.*, 213(9), 1881–1900.
- Churlaud, G., Abbara, C., Vinot, P. A., Fourcade, G., Ritvo, P. G., Lorenzon, R., Rosenzweig, M., Diquet, B., & Klatzmann, D. (2018). Pharmacodynamics of regulatory T cells in mice and humans treated with low-dose IL-2. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 142(4), 1344-1346.e3.
- Churlaud, G., Pitoiset, F., Jebbawi, F., Lorenzon, R., Bellier, B., Rosenzweig, M., & Klatzmann, D. (2015). Human and Mouse CD8+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front. Immunol.*, 6(MAR), 2–11.
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R. R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., & 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(8), 1757–1764.
- Crispin, J. C., Martínez, A., & Alcocer-Varela, J. (2003). Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.*, 21(3), 273–276.
- Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-ichi,

- S., & Ikuta, K. (2014). Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *111*(5), 1915–1920.
- Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., & Lafaille, J. J. (2008). Adaptive Foxp3⁺ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. *Immunity*, *29*(1), 114–126.
- Dai, Z., Saas, P., Pino-Lagos, K., Duggleby, R., Danby, R. D., Madrigal, J. A., & Saudemont, A. (2018). Clinical Grade Regulatory CD4⁺ T Cells (Tregs): Moving Toward Cellular-Based immunomodulatory Therapies. *Article*, *9*, 1.
- Daniel, C., Weigmann, B., Bronson, R., & von Boehmer, H. (2011). Prevention of type 1 diabetes in mice by tolerogenic vaccination with a strong agonist insulin mimotope. *J. Exp. Med.*, *208*(7), 1501–1510.
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., & de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.*, *174*(4), 915–924.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., & Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.*, *204*(6), 1257–1265.
- Di Ianni, M., Del Papa, B., Zei, T., Iacucci Ostini, R., Cecchini, D., Cantelmi, M. G., Baldoni, S., Sportoletti, P., Cavalli, L., Carotti, A., Pierini, A., Falini, B., Martelli, M. F., & Falzetti, F. (2012). T regulatory cell separation for clinical application. *Transfus. Apher. Sci.*, *47*(2), 213–216.
- Ding, L., & Shevach, E. M. (1992). IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.*, *148*(10).
- Dixit, N., Fanton, C., Langowski, J. L., Kirksey, Y., Kirk, P., Chang, T., Cetz, J., Dixit, V., Kim, G., Kuo, P., Maiti, M., Tang, Y., VanderVeen, L. A., Zhang, P., Lee, M., Ritz, J., Kamihara, Y., Ji, C., Rubas, W., ... Zalevsky, J. (2021). NKTR-358: A novel regulatory T-cell stimulator that selectively stimulates expansion and suppressive function of regulatory T cells for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *J. Transl. Autoimmun.*, *4*, 100103.
- Doebbler, M., Koenig, C., Krzyzak, L., Seitz, C., Wild, A., Ulas, T., Baßler, K., Kopelyanskiy, D., Butterhof, A., Kuhnt, C., Kreiser, S., Stich, L., Zinser, E., Knippertz, I., Wirtz, S., Riegel, C., Hoffmann, P., Edinger, M., Nitschke, L., ... Lechmann, M. (2018). CD83 expression is essential for Treg cell differentiation and stability. *JCI Insight*, *3*(11).
- Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C. M., & Hafler, D. A. (2011). Identification of T helper type 1-like, Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat. Med.*, *17*(6), 673–675.
- Dupage, M., & Bluestone, J. A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4⁺ T cells to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.*, *16*(3), 149–163.
- Elinav, E., Waks, T., & Eshhar, Z. (2008). Redirection of Regulatory T Cells With Predetermined Specificity for the Treatment of Experimental Colitis in Mice. *Gastroenterology*, *134*(7), 2014–2024.
- Eschborn, M., Weigmann, B., Reissig, S., Waisman, A., Saloga, J., & Bellinghausen, I. (2015). Activated glycoprotein A repetitions predominant (GARP)-expressing regulatory T cells inhibit allergen-induced intestinal inflammation in humanized mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *136*(1), 159–168.
- Ewan, P. W. (1998). ABC of allergies: Venom allergy. *BMJ*, *316*(7141), 1365–1368.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.*, *9*(10), 1069–1077.
- Farh, K. K.-H., Marson, A., Zhu, J., Kleinewietfeld, M., Housley, W. J., Beik, S., Shores, N., Whitton, H., Ryan, R. J. H., Shishkin, A. A., Hatan, M., Carrasco-Alfonso, M. J., Mayer, D., Luckey, C. J., Patsopoulos, N. A., De Jager, P. L., Kuchroo, V. K., Epstein, C. B., Daly, M. J., ... Bernstein, B. E. (2015). Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*, *518*(7539), 337–343.
- Feng, Y., Arvey, A., Chinen, T., Van Der Veeken, J., Gasteiger, G., & Rudensky, A. Y. (2014). Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the foxp3 locus. *Cell*, *158*(4), 749–763.

- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., & O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.*, *146*(10).
- Fletcher, J. M., Loneragan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O'Farrelly, C., Tubridy, N., & Mills, K. H. G. (2009). CD39 + Foxp3 + Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.*, *183*(11), 7602–7610.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, *4*(4), 330–336.
- Fowell, D., & Mason, D. (1993). Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J. Exp. Med.*, *177*(March), 627–636.
- Fransson, M., Piras, E., Burman, J., Nilsson, B., Essand, M., Lu, B. F., Harris, R. A., Magnusson, P. U., Brittebo, E., & Loskog, A. S. I. (2012). CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *J. Neuroinflammation*, *9*, 1–12.
- Fujio, K., Okamoto, A., Araki, Y., Shoda, H., Tahara, H., Tsuno, N. H., Takahashi, K., Kitamura, T., & Yamamoto, K. (2006). Gene Therapy of Arthritis with TCR Isolated from the Inflamed Paw. *J. Immunol.*, *177*(11), 8140–8147.
- Fujita, H., Soyka, M. B., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2012). *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. 1–8.
- Gagliani, N., Magnani, C. F., Huber, S., Gianolini, M. E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D. R., Bulfone, A., Trentini, F., Di Serio, C., Bacchetta, R., Andreani, M., Brockmann, L., Gregori, S., Flavell, R. A., & Roncarolo, M. G. (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.*, *19*(6), 739–746.
- Gamazo, C., Gastaminza, G., Ferrer, M., Sanz, M. L., & Irache, J. M. (2014). Nanoparticle based-immunotherapy against allergy. *Immunotherapy*, *6*(7), 885–897.
- Gershon, R. K. (1975). A Disquisition on Suppressor T Cells. *Immunol. Rev.*, *26*(1), 170–185.
- Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, *18*(5), 723–737.
- Gorbachev, A. V., & Fairchild, R. L. (2010). CD4+CD25+ regulatory T cells utilize FasL as a mechanism to restrict DC priming functions in cutaneous immune responses. *Eur. J. Immunol.*, *40*(7), 2006–2015.
- Gottschalk, R. A., Corse, E., & Allison, J. P. (2012). Expression of Helios in Peripherally Induced Foxp3 + Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, *188*(3), 976–980.
- Goudy, K., Aydin, D., Barzaghi, F., Gambineri, E., Vignoli, M., Mannurita, S. C., Doglioni, C., Ponzoni, M., Cicalese, M. P., Assanelli, A., Tommasini, A., Brigida, I., Dellepiane, R. M., Martino, S., Olek, S., Aiuti, A., Ciceri, F., Roncarolo, M. G., & Bacchetta, R. (2013). Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin. Immunol.*, *146*(3), 248–261.
- Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.*, *8*(3), 205–217.
- Grant, C. R., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., & Longhi, M. S. (2015). Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and-yet-unanswered questions. *Autoimmun. Rev.*, *14*(2), 105–116.
- Graßhoff, H., Comdühr, S., Monne, L. R., Müller, A., Lamprecht, P., Riemekasten, G., & Humrich, J. Y. (2021). Low-Dose IL-2 Therapy in Autoimmune and Rheumatic Diseases. *Front. Immunol.*, *12*(April).
- Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfroi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., Viola, A., Odom, S., Rivera, J., Colombo, M. P., & Pucillo, C. E. (2008). CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic Responses through OX40-OX40L Interaction. *Immunity*, *29*(5), 771–781.
- Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., Cagnard, N., Carpentier, W., Tang, Q., Bluestone, J., Chatenoud, L., Klatzmann, D., Salomon, B. L., & Piaggio, E. (2010). IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, *207*(9), 1871–1878.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates

- tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.*, 3(11), 1097–1101.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652), 737–742.
- Guo, Z., Wang, G., Lv, Y., Wan, Y. Y., & Zheng, J. (2019). Inhibition of Cdk8/Cdk19 Activity Promotes Treg Cell Differentiation and Suppresses Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.*, 10.
- Hacini-Rachinel, F., Gomez de Agüero, M., Kanjarawi, R., Moro-Sibilot, L., Le Luduec, J. B., Macari, C., Boschetti, G., Bardel, E., Langella, P., Dubois, B., & Kaiserlian, D. (2018). Intestinal dendritic cell licensing through Toll-like receptor 4 is required for oral tolerance in allergic contact dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 141(1), 163–170.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., & Pabst, O. (2011). Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3⁺Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity*, 34(2), 237–246.
- Hawrylowicz, C. M., & O'Garra, A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.*, 5(4), 271–283.
- Honaker, Y., Hubbard, N., Xiang, Y., Fisher, L., Hagin, D., Sommer, K., Song, Y., Yang, S. J., Lopez, C., Tappen, T., Dam, E. M., Khan, I., Hale, M., Buckner, J. H., Scharenberg, A. M., Torgerson, T. R., & Rawlings, D. J. (2020). Gene editing to induce FOXP3 expression in human CD4⁺ T cells leads to a stable regulatory phenotype and function. *Sci. Transl. Med.*, 12(546).
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science (80-.)*, 299(5609), 1057–1061.
- Hsieh, C. S., Lee, H. M., & Lio, C. W. J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.*, 12(3), 157–167.
- Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C. H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S. J., & Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *J. Immunol.*, 195(8), 3665–3674.
- 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., Powell, J. D., Pardoll, D. M., Drake, C. G., & Vignali, D. A. A. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21(4), 503–513.
- Huter, E. N., Stummvoll, G. H., DiPaolo, R. J., Glass, D. D., & Shevach, E. M. (2008). Cutting Edge: Antigen-Specific TGF β -Induced Regulatory T Cells Suppress Th17-Mediated Autoimmune Disease. *J. Immunol.*, 181(12), 8209–8213.
- Izquierdo, C., Ortiz, A. Z., Presa, M., Malo, S., Montoya, A., Garabatos, N., Mora, C., Verdaguer, J., & Stratmann, T. (2018). Treatment of T1D via optimized expansion of antigen-specific Tregs induced by IL-2/anti-IL-2 monoclonal antibody complexes and peptide/MHC tetramers. *Sci. Rep.*, 8(1), 1–14.
- Jeannin, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J. F., & Bonnefoy, J. Y. (1998). IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J. Immunol.*, 160(7), 3555–3561.
- Joetham, A., Takada, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.-H., Dakhama, A., & Gelfand, E. W. (2007). Naturally Occurring Lung CD4⁺ + CD25⁺ T Cell Regulation of Airway Allergic Responses Depends on IL-10 Induction of TGF- β . *J. Immunol.*, 178(3), 1433–1442.
- Josefowicz, S. Z., Niec, R. E., Kim, H. Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D. T., & Rudensky, A. Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*, 482(7385), 395–399.
- Jung, H. H., Kim, S. H., Moon, J. H., Jeong, S. U., Jang, S., Park, C. S., & Lee, C. K. (2019). Polymeric nanoparticles containing both antigen and vitamin d3 induce antigen-specific immune suppression. *Immune Netw.*, 19(3), 1–12.
- Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczyk, M., Blaser, K., & Akdis, C. A. (2003). *IL-10 and TGF-I cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy Soluble TGF-g RII-Fc chimeric protein TT: Tetanus toxin.*
- Karlsson, M. R., Rugtveit, J., & Brandtzaeg, P. (2004). Allergen-responsive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J. Exp. Med.*, 199(12), 1679–1688.
- Kasagi, S., Wang, D., Zhang, P., Zanvit, P., Chen, H., Zhang, D., Li, J., Che, L., Maruyama, T., Nakatsukasa, H., Wu, R., Jin, W., Sun, L., & Chen, W. J. (2019). Combination of apoptotic T cell induction and self-peptide administration for therapy of experimental autoimmune

- encephalomyelitis. *EBioMedicine*, 44, 50–59.
- Kasagi, S., Zhang, P., Che, L., Abbatiello, B., Maruyama, T., Nakatsukasa, H., Zanvit, P., Jin, W., Konkell, J. E., & Chen, W. J. (2014). In vivo-generated antigen-specific regulatory T cells treat autoimmunity without compromising antibacterial immune response. *Sci. Transl. Med.*, 6(241), 1–13.
- Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., & Lloyd, C. M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J. Exp. Med.*, 202(11), 1539–1547.
- Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B., & Fauci, A. S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.*, 163(5), 1037–1050.
- Khoryati, L., Pham, M. N., Sherve, M., Kumari, S., Cook, K., Pearson, J., Bogdani, M., Campbell, D. J., & Gavin, M. A. (2020). An IL-2 mutein engineered to promote expansion of regulatory T cells arrests ongoing autoimmunity in mice. *Sci. Immunol.*, 5(50), eaba5264.
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., Kidani, Y., Vandenberg, A., Hirota, K., Kawakami, R., Yasuda, K., Motooka, D., Nakamura, S., Kondo, M., Taniuchi, I., Kohwi-Shigematsu, T., & Sakaguchi, S. (2017). Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.*, 18(2), 173–183.
- Klatzmann, D., & Abbas, A. K. (2015). The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 15(5), 283–294.
- Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.*, 10(6), 595–602.
- Kojima, A., & Prehn, R. T. (1981). Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics*, 14(1–2), 15–27.
- Kopp, M. V., Hamelmann, E., Zielen, S., Kamin, W., Bergmann, K. C., Sieder, C., Stenglein, S., Seyfried, S., & Wahn, U. (2009). Combination of omalizumab and specific immunotherapy is superior to immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis and co-morbid seasonal allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 39(2), 271–279.
- Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H. T., McDonough, S. M., Bindra, B., Alyea, E. P., Armand, P., Cutler, C., Ho, V. T., Treister, N. S., Bienfang, D. C., Prasad, S., Tzachanis, D., Joyce, R. M., Avigan, D. E., Antin, J. H., Ritz, J., & Soiffer, R. J. (2011). Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease. *N. Engl. J. Med.*, 365(22), 2055–2066.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C., & von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.*, 6(12), 1219–1227.
- Krishnamoorthy, N., Khare, A., Oriss, T. B., Raundhal, M., Morse, C., Yarlagadda, M., Wenzel, S. E., Moore, M. L., Peebles, R. S., Ray, A., & Ray, P. (2012). Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma. *Nat. Med.*, 18(10), 1525–1530.
- Kumar, P., Marinelarena, A., Raghunathan, D., Ragothaman, V. K., Saini, S., Bhattacharya, P., Fan, J., Epstein, A. L., Maker, A. V., & Prabhakar, B. S. (2019). Critical role of OX40 signaling in the TCR-independent phase of human and murine thymic Treg generation. *Cell. Mol. Immunol.*, 16(2), 138–153.
- Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., & Sakaguchi, S. (2000). Naturally anergic and suppressive CD25+CD4+ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.*, 12(8), 1145–1155.
- Lai, C. L., Campbell, D. E., Palmer, D. J., Makrides, M., Santner-Nanan, B., Gold, M., Tan, J. W. L., Valerio, C., Nanan, R., Prescott, S. L., & Hsu, P. S. (2021). Longitudinal egg-specific regulatory T- and B-cell development: Insights from primary prevention clinical trials examining the timing of egg introduction. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, 76(5), 1385–1397.
- Lamontain, V., Schmid, T., Weber-Steffens, D., Zeller, D., Jenei-Lanzl, Z., Wajant, H., Straub, R. H., & Männel, D. N. (2019). Stimulation of TNF receptor type 2 expands regulatory T cells and ameliorates established collagen-induced arthritis in mice. *Cell. Mol. Immunol.*, 16(1), 65–74.
- Landuyt, A. E., Klocke, B. J., Colvin, T. B., Schoeb, T. R., & Maynard, C. L. (2019). Cutting Edge: ICOS-Deficient Regulatory T Cells Display Normal Induction of Il10 but Readily Downregulate

- Expression of Foxp3. *J. Immunol.*, 202(4), 1039–1044.
- Lee, H. M., Bautista, J. L., Scott-Browne, J., Mohan, J. F., & Hsieh, C. S. (2012). A Broad Range of Self-Reactivity Drives Thymic Regulatory T Cell Selection to Limit Responses to Self. *Immunity*, 37(3), 475–486.
- Lemoine, F. M., Cherai, M., Giverne, C., Dimitri, D., Rosenzweig, M., Trebeden-Negre, H., Chaput, N., Barro, B., Thioun, N., Gattegnio, B., Selles, F., Six, A., Azar, N., Lotz, J. P., Buzyn, A., Sibony, M., Delcourt, A., Boyer, O., Herson, S., ... Lacave, R. (2009). Massive expansion of regulatory T-cells following interleukin 2 treatment during a phase I-II dendritic cell-based immunotherapy of metastatic renal cancer. *Int. J. Oncol.*, 35(5), 547–557.
- Lenschow, D. J., Herold, K. C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Qin, H. Y., Fuchs, E., Singh, B., Thompson, C. B., & Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity*, 5(3), 285–293.
- Levine, A. G., Arvey, A., Jin, W., & Rudensky, A. Y. (2014). Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat. Immunol.*, 15(11), 1070–1078.
- Levine, A. G., Medoza, A., Hemmers, S., Moltedo, B., Niec, R. E., Schizas, M., Hoyos, B. E., Putintseva, E. V., Chaudhry, A., Dikiy, S., Fujisawa, S., Chudakov, D. M., Treuting, P. M., & Rudensky, A. Y. (2017). Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature*, 546(7658), 421–425.
- Liao, W., Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2013). Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*, 38(1), 13–25.
- Lin, W., Truong, N., Grossman, W. J., Haribhai, D., Williams, C. B., Wang, J., Martín, M. G., & Chatila, T. A. (2005). Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia e in Foxp3 mutant mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116(5), 1106–1115.
- Lindley, S., Dayan, C. M., Bishop, A., Roep, B. O., Peakman, M., & Tree, T. I. M. (2005). Defective Suppressor Function in CD4+CD25+ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 54(1), 92–99.
- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., & 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(9409), 608–615.
- Lio, C.-W. J., & Hsieh, C.-S. (2008). A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity*, 28(1), 100–111.
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Barbara, B. F., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., & Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.*, 203(7), 1701–1711.
- Lo, B., Zhang, K., Lu, W., Zheng, L., Zhang, Q., Kanellopoulou, C., Zhang, Y., Liu, Z., Fritz, J. M., Marsh, R., Husami, A., Kissell, D., Nortman, S., Chaturvedi, V., Haines, H., Young, L. R., Mo, J., Filipovich, A. H., Bleesing, J. J., ... Jordan, M. B. (2015). Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science (80-)*, 349(6246), 436–440.
- Loebbermann, J., Thornton, H., Durant, L., Sparwasser, T., Webster, K. E., Sprent, J., Culley, F. J., Johansson, C., & Openshaw, P. J. (2012). Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol.*, 5(2), 161–172.
- Mahmud, S. A., Manlove, L. S., Schmitz, H. M., Xing, Y., Wang, Y., Owen, D. L., Schenkel, J. M., Boomer, J. S., Green, J. M., Yagita, H., Chi, H., Hogquist, K. A., & Farrar, M. A. (2014). Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 15(5), 473–481.
- Marek-Trzonkowska, N., Myśliwiec, M., Dobyszyk, A., Grabowska, M., Derkowska, I., Juścińska, J., Owczuk, R., Szadkowska, A., Witkowski, P., Młynarski, W., Jarosz-Chobot, P., Bossowski, A., Siebert, J., & Trzonkowski, P. (2014). Therapy of type 1 diabetes with CD4+CD25highCD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - Results of one year follow-up. *Clin. Immunol.*, 153(1), 23–30.
- Mascarell, L., Lombardi, V., Louise, A., Saint-Lu, N., Chabre, H., Moussu, H., Betbeder, D., Balazuc, A. M., Van Overtvelt, L., & Moingeon, P. (2008). Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 122(3).

- Mathew, J. M., H.-Voss, J., LeFever, A., Konieczna, I., Stratton, C., He, J., Huang, X., Gallon, L., Skaro, A., Ansari, M. J., & Leventhal, J. R. (2018). A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Sci. Rep.*, 8(1), 7428.
- Mathias, C. B., Hobson, S. A., Garcia-Lloret, M., Lawson, G., Poddighe, D., Freyschmidt, E. J., Xing, W., Gurish, M. F., Chatila, T. A., & Oettgen, H. C. (2011). IgE-mediated systemic anaphylaxis and impaired tolerance to food antigens in mice with enhanced IL-4 receptor signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 127(3), 795-805.e6.
- McAdam, A. J., Chang, T. T., Lumelsky, A. E., Greenfield, E. A., Boussiotis, V. A., Duke-Cohan, J. S., Chernova, T., Malenkovich, N., Jabs, C., Kuchroo, V. K., Ling, V., Collins, M., Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. (2000). Mouse Inducible Costimulatory Molecule (ICOS) Expression Is Enhanced by CD28 Costimulation and Regulates Differentiation of CD4 + T Cells. *J. Immunol.*, 165(9), 5035–5040.
- Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Rückert, B., Akdis, C. A., & Akdis, M. (2008). In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J. Exp. Med.*, 205(12), 2887–2898.
- Mellor-Pita, S., Citores, M. J., Castejon, R., Tutor-Ureta, P., Yebra-Bango, M., Andreu, J. L., & Vargas, J. A. (2006). Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 65(4), 553–554.
- Miller, J. F. A. P. (1962). Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.*, 156(964), 415–428.
- Miyara, M., Gorochov, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., & Amoura, Z. (2011). Human FoxP3 + regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, 10(12), 744–755.
- Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Busato, F., Plaquet, C., Dhelft, V., Bethune, K., Leclere, L., Daviaud, C., Ligouis, M., Sampson, H., Dupont, C., & Tost, J. (2019). Gata3 hypermethylation and Foxp3 hypomethylation are associated with sustained protection and bystander effect following epicutaneous immunotherapy in peanut-sensitized mice. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, 74(1), 152–164.
- Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Ligouis, M., Dhelft, V., Puteaux, E., Dupont, C., & Benhamou, P.-H. (2012). Epicutaneous Immunotherapy Compared with Sublingual Immunotherapy in Mice Sensitized to Pollen (*Phleum pratense*). *ISRN Allergy*, 2012(1), 1–8.
- Mondoulet, L., Dioszeghy, V., Vanoirbeek, J. A. J., Nemery, B., Dupont, C., & Benhamou, P. H. (2011). Epicutaneous immunotherapy using a new epicutaneous delivery system in mice sensitized to peanuts. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 154(4), 299–309.
- Montero, E., Nussbaum, G., Kaye, J. F., Perez, R., Lage, A., Ben-Nun, A., & Cohen, I. R. (2004). Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: Analysis using depleting antibodies. *J. Autoimmun.*, 23(1), 1–7.
- Morgan, M. E., Van Bilsen, J. H. M., Bakker, A. M., Heemskerk, B., Schilham, M. W., Hartgers, F. C., Elferink, B. G., Van Der Zanden, L., De Vries, R. R. P., Huizinga, T. W. J., Ottenhoff, T. H. M., & Toes, R. E. M. (2005). Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4 +CD25 + T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.*, 66(1), 13–20.
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J. J., & Curotto De Lafaille, M. A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.*, 115(7), 1923–1933.
- Murphy, K., Weaver, C., & Janeway, C. (2016). *Janeway's Immunobiology, 9th Edition* (p. 928). Garland Science: New York.
- Nakamura, K., Kitani, A., & Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J. Exp. Med.*, 194(5), 629–644.
- Navarro, S., Lazzari, A., Kanda, A., Fleury, S., Dombrowicz, D., Glaichenhaus, N., & Julia, V. (2015). Bystander immunotherapy as a strategy to control allergen-driven airway inflammation. *Mucosal Immunol.*, 8(4), 841–851.
- Nouri-Aria, K. T., Wachholz, P. A., Francis, J. N., Jacobson, M. R., Walker, S. M., Wilcock, L. K., Staple, S. Q., Aalberse, R. C., Till, S. J., & Durham, S. R. (2004). Grass Pollen Immunotherapy Induces Mucosal and Peripheral IL-10 Responses and Blocking IgG Activity. *J. Immunol.*, 172(5), 3252–3259.
- Noval Rivas, M., Burton, O. T., Wise, P., Charbonnier, L. M., Georgiev, P., Oettgen, H. C., Rachid, R., & Chatila, T. A. (2015). Regulatory T cell reprogramming toward a Th2-Cell-like lineage impairs

- oral tolerance and promotes food allergy. *Immunity*, 42(3), 512–523.
- Nowak-Wegrzyn, A., Bloom, K. A., Sicherer, S. H., Shreffler, W. G., Noone, S., Wanich, N., & Sampson, H. A. (2008). Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 122(2).
- Nutsch, K., Chai, J. N., Ai, T. L., Russler-Germain, E., Feehley, T., Nagler, C. R., & Hsieh, C. S. (2016). Rapid and Efficient Generation of Regulatory T Cells to Commensal Antigens in the Periphery. *Cell Rep.*, 17(1), 206–220.
- O’Gorman, W. E., Dooms, H., Thorne, S. H., Kuswanto, W. F., Simonds, E. F., Krutzik, P. O., Nolan, G. P., & Abbas, A. K. (2009). The Initial Phase of an Immune Response Functions to Activate Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, 183(1), 332–339.
- Ohkura, N., Yasumizu, Y., Kitagawa, Y., Tanaka, A., Nakamura, Y., Motooka, D., Nakamura, S., Okada, Y., & Sakaguchi, S. (2020). Regulatory T Cell-Specific Epigenomic Region Variants Are a Key Determinant of Susceptibility to Common Autoimmune Diseases. *Immunity*, 52(6), 1119–1132.e4.
- Ohnmacht, C., Park, J.-H., Cording, S., Wing, J. B., Atarashi, K., Obata, Y., Gaboriau-Routhiau, V., Marques, R., Dulauroy, S., Fedoseeva, M., Busslinger, M., Cerf-Bensussan, N., Boneca, I. G., Voehringer, D., Hase, K., Honda, K., Sakaguchi, S., & Eberl, G. (2015). The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t + T cells. *Science* (80-.), 349(6251), 989–993.
- Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., Graham, R. R., Manoharan, A., Ortmann, W., Bhangale, T., Denny, J. C., Carroll, R. J., Eyster, A. E., Greenberg, J. D., Kremer, J. M., ... Plenge, R. M. (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*, 506(7488), 376–381.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., & 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(29), 10113–10118.
- Othy, S., Jairaman, A., Dynes, J. L., Dong, T. X., Tune, C., Yeromin, A. V., Zavala, A., Akunwafo, C., Chen, F., Parker, I., & Cahalan, M. D. (2020). Regulatory T cells suppress Th17 cell Ca2+ signaling in the spinal cord during murine autoimmune neuroinflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 117(33), 20088–20099.
- Owen, D. L., Mahmud, S. A., Vang, K. B., Kelly, R. M., Blazar, B. R., Smith, K. A., & Farrar, M. A. (2018). Identification of Cellular Sources of IL-2 Needed for Regulatory T Cell Development and Homeostasis. *J. Immunol.*, 200(12), 3926–3933.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., & Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.*, 8(12), 1353–1362.
- Pelletier, B., Perrin, A., Assoun, N., Plaquet, C., Oreal, N., Gaulme, L., Bouzereau, A., Labernardière, J.-L., Ligouis, M., Dioszeghy, V., Wavrin, S., Matthews, K., Porcheray, F., Sampson, H. A., & Hervé, P.-L. (2021). Epicutaneous immunotherapy protects cashew-sensitized mice from anaphylaxis. *Allergy*, 76(4), 1213–1222.
- Penhale, W. J., Farmer, A., McKenna, R. P., & Irvine, W. J. (1973). Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin. Exp. Immunol.*, 15(2), 225–236.
- Penhale, W. J., Irvine, W. J., Inglis, J. R., & Farmer, A. (1976). Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 25(1), 6–16.
- Penhale, W. J., Stumbles, P. A., Huxtable, C. R., Sutherland, R. J., & Pethick, D. W. (1990). Induction of diabetes in PVG/c strain rats by manipulation of the immune system. *Autoimmunity*, 7(2–3), 169–179.
- Penna, G., & Adorini, L. (2000). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D 3 Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. *J. Immunol.*, 164(5), 2405–2411.
- Petrarca, C., Clemente, E., Amato, V., Gatta, A., Cortese, S., Lamolinara, A., Rossi, C., Zanotta, S., Mistrello, G., Paganelli, R., & Gioacchino, M. (2016). Vitamin D3 improves the effects of low dose Der p 2 allergoid treatment in Der p 2 sensitized BALB/c mice. *Clin. Mol. Allergy*, 14(1), 1–10.
- Pham, M. N., Khoryati, L., Jamison, B. L., Hayes, E., Sullivan, J. M., Campbell, D. J., & Gavin, M. A. (2021). In Vivo Expansion of Antigen-Specific Regulatory T Cells through Staggered Fc.IL-2

- Mutein Dosing and Antigen-Specific Immunotherapy. *ImmunoHorizons*, 5(9), 782–791.
- Polansky, J. K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., & Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.*, 38(6), 1654–1663.
- Povoleri, G. A. M., Scottá, C., Nova-Lamperti, E. A., John, S., Lombardi, G., & Afzali, B. (2013). Thymic versus induced regulatory T cells—who regulates the regulators? *Front. Immunol.*, 4(JUN), 1–22.
- Powell, B. R., Buist, N. R. M., & Stenzel, P. (1982). An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J. Pediatr.*, 100(5), 731–737.
- Raffin, C., Vo, L. T., & Bluestone, J. A. (2020). Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat. Rev. Immunol.*, 20(3), 158–172.
- Redpath, S. A., van der Werf, N., Cervera, A. M., Macdonald, A. S., Gray, D., Maizels, R. M., & Taylor, M. D. (2013). ICOS controls Foxp3⁺ regulatory T-cell expansion, maintenance and IL-10 production during helminth infection. *Eur. J. Immunol.*, 43(3), 705–715.
- Reynolds, L. A., & Finlay, B. B. (2017). Early life factors that affect allergy development. *Nat. Rev. Immunol.*, 17(8), 518–528.
- Rigas, D., Lewis, G., Aron, J. L., Wang, B., Banie, H., Sankaranarayanan, I., Galle-Treger, L., Maazi, H., Lo, R., Freeman, G. J., Sharpe, A. H., Soroosh, P., & Akbari, O. (2017). ILC2 Suppression by Regulatory T Cells Attenuates Airway Hyperreactivity and Requires ICOS:ICOS-Ligand Interaction. *J. Clin. Investig. Allergy Clin. Immunol.*, 139(5), 1468–1477.
- Romano, M., Fanelli, G., Albany, C. J., Giganti, G., & Lombardi, G. (2019). Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Front. Immunol.*, 10(JAN).
- Ronin, E., Pouchy, C., Khosravi, M., Hilaire, M., Grégoire, S., Casrouge, A., Kassem, S., Sleurs, D., Martin, G. H., Chanson, N., Lombardi, Y., Lalle, G., Wajant, H., Auffray, C., Lucas, B., Marodon, G., Grinberg-Bleyer, Y., & Salomon, B. L. (2021). Tissue-restricted control of established central nervous system autoimmunity by TNF receptor 2–expressing Treg cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 118(13), e2014043118.
- Rosenzweig, M., Salet, R., Lorenzon, R., Tchitchek, N., Roux, A., Bernard, C., Carel, J. C., Storey, C., Polak, M., Beltrand, J., Amouyal, C., Hartemann, A., Corbeau, P., Vicaut, E., Bibal, C., Bougnères, P., Tran, T. A., & Klatzmann, D. (2020). Low-dose IL-2 in children with recently diagnosed type 1 diabetes: a Phase I/II randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding study. *Diabetologia*, 63(9), 1808–1821.
- Royer, B., Varadaradjalou, S., Saas, P., Guillosson, J. J., Kantelip, J. P., & Arock, M. (2001). Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin. Exp. Allergy*, 31(5), 694–704.
- Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Muller, W., & Rudensky, A. Y. (2008). Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity*, 28(4), 546–558.
- Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., & Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-Cell Responses to Low-Dose Interleukin-2 in HCV-Induced Vasculitis. *N. Engl. J. Med.*, 365(22), 2067–2077.
- Sad, S., & Mosmann, T. R. (1994). Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J. Immunol.*, 153(8).
- Saito, K., Torii, M., Ma, N., Tsuchiya, T., Wang, L., Hori, T., Nagakubo, D., Nitta, N., Kanegasaki, S., Hieshima, K., Yoshie, O., Gabazza, E. C., Katayama, N., Shiku, H., Kuribayashi, K., & Kato, T. (2008). Differential Regulatory Function of Resting and Preactivated Allergen-Specific CD4 + CD25 + Regulatory T Cells in Th2-Type Airway Inflammation. *J. Immunol.*, 181(10), 6889–6897.
- Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J. B., Tanaka, A., Ichiyama, K., & Ohkura, N. (2020). Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 38, 541–566.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 155(3), 1151–1164.
- Sakaguchi, S., Takahashi, T., & Nishizuka, Y. (1982). Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J. Exp. Med.*, 156(December), 1577–1586.
- Salomon, B. L. (2021). Insights into the biology and therapeutic implications of TNF and regulatory T

- cells. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 17(8), 487–504.
- Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., & Bluestone, J. A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12(4), 431–440.
- Samadi, N., Klems, M., & Untersmayr, E. (2018). The role of gastrointestinal permeability in food allergy. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, 121(2), 168–173.
- Samstein, R. M., Josefowicz, S. Z., Arvey, A., Treuting, P. M., & Rudensky, A. Y. (2012). Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell*, 150(1), 29–38.
- Samy, E. T., Parker, L. A., Sharp, C. P., & Tung, K. S. K. (2005). Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4+CD25+ regulatory T cells in the regional lymph node. *J. Exp. Med.*, 202(6), 771–781.
- Santamaria, J. C., Borelli, A., & Irla, M. (2021). Regulatory T Cell Heterogeneity in the Thymus: Impact on Their Functional Activities. *Front. Immunol.*, 12(February), 1–8.
- Santonin, F., Batignes, M., Mebrek, M. L., Biton, J., Clavel, G., Hervé, R., Lemeiter, D., Breckler, M., Busato, F., Tost, J., Zioli, M., Boissier, M. C., Decker, P., Semerano, L., & Bessis, N. (2020). Involvement of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in FoxP3 Stability and as a Marker of Treg Cells Specifically Expanded by Anti-Tumor Necrosis Factor Treatments in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 72(4), 576–587.
- Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L., & Betz, A. G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity*, 28(3), 402–413.
- Sawant, D. V., Wu, H., Yao, W., Sehra, S., Kaplan, M. H., & Dent, A. L. (2015). The transcriptional repressor Bcl6 controls the stability of regulatory T cells by intrinsic and extrinsic pathways. *Immunology*, 145(1), 11–23.
- Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer, P. H. (2012). Molecular mechanisms of Treg-mediated cell suppression. *Front. Immunol.*, 3(MAR), 1–20.
- Schmidt, A., Oberle, N., Weiß, E. M., Vobis, D., Frischbutter, S., Baumgrass, R., Falk, C. S., Haag, M., Brügger, B., Lin, H., Mayr, G. W., Reichardt, P., Gunzer, M., Suri-Payer, E., & Krammer, P. H. (2011). Human regulatory T cells rapidly suppress T cell receptor-induced Ca²⁺, NF-κB, and NFAT signaling in conventional T cells. *Sci. Signal.*, 4(204), 1–15.
- Schubert, D., Bode, C., Kenefack, R., Hou, T. Z., Wing, J. B., Kennedy, A., Bulashevskaya, A., Petersen, B.-S., Schäffer, A. A., Grüning, B. A., Unger, S., Frede, N., Baumann, U., Witte, T., Schmidt, R. E., Dueckers, G., Niehues, T., Seneviratne, S., Kanariou, M., ... Grimbacher, B. (2014). Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat. Med.*, 20(12), 1410–1416.
- Scurr, M., Ladell, K., Besneux, M., Christian, A., Hockey, T., Smart, K., Bridgeman, H., Hargest, R., Phillips, S., Davies, M., Price, D., Gallimore, A., & Godkin, A. (2014). Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP + Foxp3⁺ T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3⁺ regulatory T cells. *Mucosal Immunol.*, 7(2), 428–439.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., Kelleher, A., & Barbara, B. F. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.*, 203(7), 1693–1700.
- Seddon, B., & Mason, D. (1999). Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 189(5), 877–881.
- Selck, C., & Dominguez-Villar, M. (2021). Antigen-Specific Regulatory T Cell Therapy in Autoimmune Diseases and Transplantation. *Front. Immunol.*, 12.
- Serr, I., Fürst, R. W., Achenbach, P., Scherm, M. G., Gökmen, F., Haupt, F., Sedlmeier, E.-M., Knopff, A., Shultz, L., Willis, R. A., Ziegler, A.-G., & Daniel, C. (2016). Type 1 diabetes vaccine candidates promote human Foxp3⁺Treg induction in humanized mice. *Nat. Commun.*, 7(1), 10991.
- Serradell, M. C., Rupil, L. L., Martino, R. A., Prucca, C. G., Carranza, P. G., Saura, A., Fernández, E. A., Gargantini, P. R., Tenaglia, A. H., Petiti, J. P., Tonelli, R. R., Reinoso-Vizcaino, N., Echenique, J., Berod, L., Piaggio, E., Bellier, B., Sparwasser, T., Klatzmann, D., & Luján, H. D. (2019). Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins. *Nat. Commun.*, 10(1).

- Sharfe, N., Dadi, H. K., Shahar, M., & Roifman, C. M. (1997). Human immune disorder arising from mutation of the α chain of the interleukin-2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *94*(7), 3168–3171.
- Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and Differences. *Immunol Rev.*, *259*(1), 88–102.
- Shreffler, W. G., Wanich, N., Moloney, M., Nowak-Wegrzyn, A., & Sampson, H. A. (2009). Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *123*(1), 43-52.e7.
- Singh, K., Hjort, M., Thorvaldson, L., & Sandler, S. (2015). Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naïve mice. *Sci. Rep.*, *5*, 1–10.
- Smigielski, K. S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K. R., Dudda, J. C., Klonowski, K. D., & Campbell, D. J. (2014). CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.*, *211*(1), 121–136.
- Smith, L. K., Boukhaled, G. M., Condotta, S. A., Mazouz, S., Guthmiller, J. J., Vijay, R., Butler, N. S., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Krawczyk, C. M., & Richer, M. J. (2018). Interleukin-10 Directly Inhibits CD8+ T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity*, *48*(2), 299-312.e5.
- Someya, K., Nakatsukasa, H., Ito, M., Kondo, T., Tateda, K.-I., Akanuma, T., Koya, I., Sanosaka, T., Kohyama, J., Tsukada, Y.-I., Takamura-Enya, T., & Yoshimura, A. (2017). Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation. *Int. Immunol.*, *29*(8), 365–375.
- Soroosh, P., Doherty, T. A., Duan, W., Mehta, A. K., Choi, H., Adams, Y. F., Mikulski, Z., Khorram, N., Rosenthal, P., Broide, D. H., & Croft, M. (2013). Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J. Exp. Med.*, *210*(4), 775–788.
- Spangler, J. B., Tomala, J., Luca, V. C., Jude, K. M., Dong, S., Ring, A. M., Votavova, P., Pepper, M., Kovar, M., & Garcia, K. C. (2015). Antibodies to Interleukin-2 Elicit Selective T Cell Subset Potentiation through Distinct Conformational Mechanisms. *Immunity*, *42*(5), 815–825.
- Spolski, R., Li, P., & Leonard, W. J. (2018). Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat. Rev. Immunol.*, *18*(10), 648–659.
- Sprouse, M. L., Shevchenko, I., Scavuzzo, M. A., Joseph, F., Lee, T., Blum, S., Borowiak, M., Bettini, M. L., & Bettini, M. (2018). Cutting Edge: Low-Affinity TCRs Support Regulatory T Cell Function in Autoimmunity. *J. Immunol.*, *200*(3), 909–914.
- Srivastava, K. D., Siefert, A., Fahmy, T., Caplan, M. J., Li, X.-M., & Sampson, H. A. (2015). Investigation of Peanut Oral Immunotherapy Using CpG/Peanut-Nanoparticles in a Murine Model of Peanut Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *135*(2), AB235.
- Stephens, L. A., Malpass, K. H., & Anderton, S. M. (2009). Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3+ Treg. *Eur. J. Immunol.*, *39*(4), 1108–1117.
- Strait, R. T., Morris, S. C., Smiley, K., Urban, J. F., & Finkelman, F. D. (2003). IL-4 Exacerbates Anaphylaxis. *J. Immunol.*, *170*(7), 3835–3842.
- Syed, A., Garcia, M. A., Lyu, S. C., Bucayu, R., Kohli, A., Ishida, S., Berglund, J. P., Tsai, M., Maecker, H., O’Riordan, G., Galli, S. J., & Nadeau, K. C. (2014a). Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Syed, A., Garcia, M. A., Lyu, S. C., Bucayu, R., Kohli, A., Ishida, S., Berglund, J. P., Tsai, M., Maecker, H., O’Riordan, G., Galli, S. J., & Nadeau, K. C. (2014b). 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*(2), 500-510.e11.
- Taga, K., & Tosato, G. (1992). IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. K Taga and G Tosato This information is current as Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at: IL-10 INHIBITS HUMAN T CELL PROLIFERATION AND IL-2 PRODUCTION. *J. Immunol.*, *148*, 1143–1148.
- Taguchi, O., & Nishizuka, Y. (1981). Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, *46*(2), 425–434.
- Takanashi, S., Nonaka, R., Xing, Z., O’byrne, P., Dolovich, J., & Jordana, M. (1994). Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood

- eosinophils. *J. Exp. Med.*, 180(2), 711–715.
- Tang, Q., Adams, J. Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C. A., Salomon, B. L., & Bluestone, J. A. (2008). Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction. *Immunity*, 28(5), 687–697.
- Tang, Q., Henriksen, K. J., Bi, M., Finger, E. B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E. L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., & Bluestone, J. A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.*, 199(11), 1455–1465.
- Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B., & Bluestone, J. A. (2003). Cutting Edge: CD28 Controls Peripheral Homeostasis of CD4 + CD25 + Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, 171(7), 3348–3352.
- Tarbell, K. V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., & Steinman, R. M. (2004). CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.*, 199(11), 1467–1477.
- Thomsen, S. F. (2015). Epidemiology and natural history of atopic diseases. *Eur. Clin. Respir. J.*, 2(1), 24642.
- Thomson, A. W., Turnquist, H. R., & Raimondi, G. (2009). Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(5), 324–337.
- Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., & Shevach, E. M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3 + T Regulatory Cells. *J. Immunol.*, 184(7), 3433–3441.
- Thornton, A. M., & 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(2), 287–296.
- Toomer, K. H., Lui, J. B., Altman, N. H., Ban, Y., Chen, X., & Malek, T. R. (2019). Essential and non-overlapping IL-2R α -dependent processes for thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Nat. Commun.*, 10(1).
- Tordesillas, L., Mondoulet, L., Blazquez, A. B., Benhamou, P. H., Sampson, H. A., & Berin, M. C. (2017). Epicutaneous immunotherapy induces gastrointestinal LAP+ regulatory T cells and prevents food-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 139(1), 189-201.e4.
- Torgerson, T. R., Linane, A., Moes, N., Anover, S., Mateo, V., Rieux-Laucat, F., Hermine, O., Vijay, S., Gambineri, E., Cerf-Bensussan, N., Fischer, A., Ochs, H. D., Goulet, O., & Ruemmele, F. M. (2007). Severe Food Allergy as a Variant of IPEX Syndrome Caused by a Deletion in a Noncoding Region of the FOXP3 Gene. *Gastroenterology*, 132(5), 1705–1717.
- Tran, G. T., Hodgkinson, S. J., Carter, N., Verma, N. D., Robinson, C. M., Plain, K. M., Nomura, M., & Hall, B. M. (2020). Autoantigen specific IL-2 activated CD4+CD25+T regulatory cells inhibit induction of experimental autoimmune neuritis. *J. Neuroimmunol.*, 341(February), 577186.
- Trotta, E., Bessette, P. H., Silveria, S. L., Ely, L. K., Jude, K. M., Le, D. T., Holst, C. R., Coyle, A., Potempa, M., Lanier, L. L., Garcia, K. C., Crellin, N. K., Rondon, I. J., & Bluestone, J. A. (2018). A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism. *Nat. Med.*, 24(7), 1005–1014.
- Turner, J. A., Stephen-Victor, E., Wang, S., Rivas, M. N., Abdel-Gadir, A., Harb, H., Cui, Y., Fanny, M., Charbonnier, L. M., Fong, J. J. H., Benamar, M., Wang, L., Burton, O. T., Bansal, K., Bry, L., Zhu, C., Li, Q. Z., Clement, R. L., Oettgen, H. C., ... Chatila, T. A. (2020). Regulatory T Cell-Derived TGF- β 1 Controls Multiple Checkpoints Governing Allergy and Autoimmunity. *Immunity*, 53(6), 1202-1214.e6.
- Urbanek-Ruiz, I., Ruiz, P. J., Paragas, V., Garren, H., Steinman, L., & Fathman, C. G. (2001). Immunization with DNA encoding an immunodominant peptide of insulin prevents diabetes in NOD mice. *Clin. Immunol.*, 100(2), 164–171.
- Van Gool, F., Molofsky, A. B., Morar, M. M., Rosenzweig, M., Liang, H.-E., Klatzmann, D., Locksley, R. M., & Bluestone, J. A. (2014). Interleukin-5–producing group 2 innate lymphoid cells control eosinophilia induced by interleukin-2 therapy. *Blood*, 124(24), 3572–3576.
- van Wijk, F., Hoeks, S., Nierkens, S., Koppelman, S. J., van Kooten, P., Boon, L., Knippels, L. M. J., & Pieters, R. (2005). CTLA-4 Signaling Regulates the Intensity of Hypersensitivity Responses to Food Antigens, but is Not Decisive in the Induction of Sensitization. *J. Immunol.*, 174(1), 174–179.

- Van Wijk, F., Wehrens, E. J. M., Nierkens, S., Boon, L., Kasran, A., Pieters, R., & Knippels, L. M. J. (2007). CD4+CD25+ T cells regulate the intensity of hypersensitivity responses to peanut, but are not decisive in the induction of oral sensitization. *Clin. Exp. Allergy*, *37*(4), 572–581.
- Vocanson, M., Rozieres, A., Hennino, A., Poyet, G., Gaillard, V., Renaudineau, S., Achachi, A., Benetiere, J., Kaiserlian, D., Dubois, B., & Nicolas, J.-F. (2010). Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *126*(2), 280-289.e7.
- Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). “Yin-Yang” functions of transforming growth factor- β and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol. Rev.*, *220*(1), 199–213.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I. H., Huizinga, T. W. J., & Toes, R. E. M. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.*, *37*(1), 129–138.
- Wang, X., Rickert, M., & Garcia, K. C. (2005). Structural biology: Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α , β and γ c receptors. *Science (80-.)*, *310*(5751), 1159–1163.
- Ward, N. C., Yu, A., Moro, A., Ban, Y., Chen, X., Hsiung, S., Keegan, J., Arbanas, J. M., Loubeau, M., Thankappan, A., Yamniuk, A. P., Davis, J. H., Struthers, M., & Malek, T. R. (2018). IL-2/CD25: A Long-Acting Fusion Protein That Promotes Immune Tolerance by Selectively Targeting the IL-2 Receptor on Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, *201*(9), 2579–2592.
- Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F., & Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunol. Rev.*, *241*(1), 241–259.
- Weiss, J. M., Bilate, A. M., Gobert, M., Ding, Y., de Lafaille, M. A. C., Parkhurst, C. N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A. B., Ruocco, M. G., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M. O., Niec, R. E., Rudensky, A. Y., Dustin, M. L., Littman, D. R., & Lafaille, J. J. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosagenerated induced Foxp3+ T reg cells. *J. Exp. Med.*, *209*(10), 1723–1742.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., & Alt, F. W. (1995). Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, *3*(4), 521–530.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J. M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B. A., Sverdrup, F. M., Head, R., Kuster, D. J., Ruminski, P., Weiss, D., Von Schack, D., & Bluestone, J. A. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.*, *209*(10), 1713–1722.
- Yamashita, H., Takahashi, K., Tanaka, H., Nagai, H., & Inagaki, N. (2012). Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, *67*(2), 201–209.
- Ye, Z., Huang, H., Hao, S., Xu, S., Yu, H., Van Den Hurk, S., & Xiang, J. (2007). IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naive and active T cell subsets. *J. Interf. Cytokine Res.*, *27*(12), 1031–1038.
- Zarek, P. E., Huang, C. T., Lutz, E. R., Kowalski, J., Horton, M. R., Linden, J., Drake, C. G., & Powell, J. D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, *111*(1), 251–259.
- Zemmour, D., Zilionis, R., Kiner, E., Klein, A. M., Mathis, D., & Benoist, C. (2018). Single-cell gene expression reveals a landscape of regulatory T cell phenotypes shaped by the TCR article. *Nat. Immunol.*, *19*(3), 291–301.
- Zeng, H., Zhang, R., Jin, B., & Chen, L. (2015). Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell. Mol. Immunol.*, *12*(5), 566–571.
- Zhang, X., Koldzic, D. N., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R. F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V. K., Zhang, H. L. W., Koldzic, D. N., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R. F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V. K., & Weiner, H. L. (2004). IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.*, *16*(2), 249–256.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., DeRoos, P., Kim, J. M., Chu, T. T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., & Rudensky, A. Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature*, *458*(7236), 351–356.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X. P., Forbush, K., & Rudensky, A. Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*, *463*(7282), 808–812.

- Zhong, Y., Tang, H., Wang, X., Zeng, Q., Liu, Y., Zhao, X. i., Yu, K., Shi, H., Zhu, R., & Mao, X. (2016). Intranasal immunization with heat shock protein 60 induces CD4⁺CD25⁺GARP⁺ and type 1 regulatory T cells and inhibits early atherosclerosis. *Clin. Exp. Immunol.*, *183*(3), 452–468.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., & Bluestone, J. A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.*, *10*(9), 1000–1007.
- Ziegler, S. F. (2006). FOXP3: Of Mice and Men. *Annu. Rev. Immunol.*, *24*(1), 209–226.