

# Table des matières

Remerciements .....	3
Table des matières .....	4
Tables des Figures .....	6
Tables des Tableaux .....	6
Liste des Abréviations .....	7
Résumé .....	9
Abstract .....	10
Avant-Propos .....	11
<b>Première Partie - De la découverte des lymphocytes T régulateurs... à leur utilisation en thérapie: Un bref historique.</b> .....	14
1. Identification d'une population thymique ayant des propriétés régulatrices : l'origine des lymphocytes T régulateurs. ....	14
i. Les Treg avant 1995 : une population suppressive nécessitant une meilleure caractérisation phénotypique. ....	15
ii. 1995 et l'identification du CD25 : un tournant dans l'analyse des Treg. ....	16
iii. FOXP3 : le marqueur idéal ? .....	17
iv. Développement thymique des Treg. ....	18
2. Vers une complexité du compartiment T régulateur : identification de sous populations de lymphocytes T régulateurs CD4+. ....	22
i. Les « peripheral » Treg. ....	22
a. Les lymphocytes T régulateurs de type 1. ....	23
b. Les lymphocytes T helper de type 3. ....	23
ii. Les « <i>in vitro</i> -induced » Treg. ....	24
iii. Caractéristiques phénotypiques des Treg. ....	25
3. Mécanismes d'action des Treg. ....	27
<b>Deuxième partie - Les Treg au service de la thérapie : Quels potentiels thérapeutiques et quelles applications ?</b> .....	34
1. Les lymphocytes T régulateurs à l'origine des maladies à composantes immunologiques ? .....	34
i. Treg et rejet de greffe. ....	34
ii. Treg et maladies auto-immunes. ....	35
iii. Treg et allergies. ....	39
2. Les Treg comme outil thérapeutique : preuve de principe et réalité thérapeutique. ....	44
i. Les différents exemples de thérapies cellulaires utilisant les Treg comme outil thérapeutique. ....	44
a. Utilisation de Treg polyclonaux. ....	44
b. Utilisation de Treg spécifiques d'antigène. ....	47
ii. Les limites de l'utilisation des Treg comme outils thérapeutiques. ....	49
3. IL-2 faible dose : une thérapie cellulaire <i>in vivo</i> spécifique des Treg. ....	51
<b>Troisième partie – Allergie alimentaire : physiopathologie et mécanismes immunologiques associés au niveau de la muqueuse intestinale.</b> .....	58
1. Physiopathologie de l'allergie alimentaire. ....	58
i. Le système immunitaire associé à la muqueuse digestive. ....	58
ii. Orientation de la réponse immunitaire vers la réponse Th2. ....	61
iii. Spécificité des réponses allergiques intestinales. ....	63
a. Les ILC2, Innate Lymphoid Cells 2. ....	63

b. L'IL9, les lymphocytes Th9 et les MMC9. ....	65
2. Complexité du compartiment Treg intestinal. ....	66
i. La notion de Treg tissulaires. ....	67
ii. De l'activation des tTreg jusqu'à leur homing au niveau de l'intestin. ....	68
iii. Importance des pTreg intestinaux : exemple de la mise en place de la tolérance orale. ....	69
iv. Les sous populations de Treg de l'intestin. ....	72
3. Les différentes cibles thérapeutiques de l'allergie alimentaire et le rôle des lymphocytes T régulateurs dans allergie. ....	75
<b>Objectifs et principes expérimentaux</b> .....	78
1. Preuve de concept de l'utilisation de l'IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie alimentaire. ....	78
2. Mécanismes immunologiques de l'immunothérapie par IL-2. ....	79
<b>Résultats</b> .....	81
Première partie : Preuve de concept de l'utilisation de l'IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie alimentaire. ....	82
Article 1: Low-dose interleukin-2 induces regulatory T-cell mediated control of experimental food allergy... 82	
Deuxième partie : Etude des mécanismes associés à la protection induite par l'IL-2 faible dose dans l'allergie alimentaire. ....	101
1. Le traitement IL-2 faible dose agit directement sur l'activité suppressive des Treg. ....	103
2. Le traitement IL-2 faible dose n'induit pas de pTreg en périphérie. ....	107
3. La protection clinique induite par l'IL-2 n'est pas liée à l'émergence de sous populations régulatrices efficaces pour contrôler les réponses allergiques. ....	108
4. Le transfert adoptif de Treg issus de souris protégées par IL-2 confère une meilleure protection contre l'allergie. ....	110
5. Les Treg issus de souris protégées par l'IL-2 entraînent une suppression dose dépendante de la prolifération de Tconv spécifiques de l'OVA, mais leur spécificité à l'OVA n'a pas pu être mise en évidence. ....	113
<b>Discussion</b> .....	117
1. Pourquoi développer une nouvelle immunothérapie par IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie alimentaire ? .....	118
i. Considérations épidémiologiques et économiques de l'enjeu de santé publique. ....	118
ii. Place de l'IL-2 par rapport aux autres traitements et immunothérapies de l'allergie. ....	120
a. Les immunothérapies spécifiques de l'allergie alimentaire. ....	121
b. Biothérapies alternatives en cours de développement. ....	125
c. Recul quant à l'utilisation de l'IL-2 : un avantage certain. ....	130
2. Mécanismes immunologiques associés à l'effet thérapeutique de l'IL-2 : désensibilisation, tolérance ou immunosuppression Treg-dépendante ? .....	132
i. L'action protectrice immédiate de l'IL-2 est Treg dépendant et permet de contrôler le recrutement et la dégranulation des cellules mastocytaires. ....	132
ii. Les mécanismes de protection à long-terme impliquent-ils le recrutement local de sous populations de cellules régulatrices ou de Treg spécifiques de l'antigène ? .....	136
a. Les Treg sont indispensables à l'effet à long terme de l'IL-2. ....	136
b. L'IL-2 sélectionnerait des populations de cellules régulatrices FOXP3- impliquées dans la régulation de l'allergie ....	137
c. L'effet protecteur de l'IL-2 serait en lien avec la génération de Treg anti-OVA. ....	139
d. L'activation et le maintien de la stabilité des Treg par l'IL-2 pourraient expliquer les effets à long terme. ....	141
<b>Annexes</b> .....	144
Article 2 : Cibles et immunothérapies innovantes dans le traitement de l'allergie alimentaire (Revue).....	144
Travaux originaux .....	155
<b>Bibliographie</b> .....	157

## Tables des Figures

<b>Figure 1</b> : Différentiation thymique des tTreg.....	21
<b>Figure 2</b> : Mécanismes de suppression des Treg par sécrétion de cytokine. ....	29
<b>Figure 3</b> : Mécanismes de suppression de la fonction et de la maturation des cellules dendritiques par les Treg	30
<b>Figure 4</b> : Mécanismes de suppression des Treg par cytolysse .....	31
<b>Figure 5</b> : Mécanismes de suppression des Treg par perturbation métabolique .....	32
<b>Figure 6</b> : Effets pléiotropiques de l'IL-2 en fonction de la dose utilisée .....	51
<b>Figure 7</b> : Sensibilité différentielle des cellules T effectrices et Treg à l'interleukine-2.....	52
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique du système immunitaire de l'intestin grêle. ....	60
<b>Figure 9</b> : Mécanismes de mise en place des réponses Th2 après administration orale de l'allergène. ....	62
<b>Figure 10</b> : Phénotypes des différentes populations d'ILC. ....	64
<b>Figure 11</b> : Mécanisme d'induction de la tolérance orale.....	70
<b>Figure 12</b> : Les sous populations de Treg au niveau de l'intestin .....	72
<b>Figure 13</b> : le traitement par IL-2 confère une meilleure activité suppressive aux Treg. ....	103
<b>Figure 14</b> : Le traitement par de faible dose d'IL-2 ne permet pas d'induire de Treg en périphérie.....	107
<b>Figure 15</b> : Le traitement par de faible dose d'IL-2 ne permet pas la sélection de sous populations de cellules régulatrices.....	109
<b>Figure 16</b> : Le transfert adoptif d'un faible nombre de Treg issus de souris protégées par l'IL-2 confère une protection contre les allergies. ....	112
<b>Figure 17</b> : Les Treg issus de souris protégées par l'IL-2 entraînent une suppression dose dépendante de la prolifération de Tconv spécifiques de l'OVA, mais leur spécificité à l'OVA n'a pas pu être mise en évidence. ....	116

## Tables des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Données expérimentales et cliniques démontrant l'importance des Treg dans différentes maladies auto-immunes.....	36
<b>Tableau 2</b> : Données expérimentales et cliniques démontrant l'importance des Treg dans différentes maladies allergiques. ....	43
<b>Tableau 3</b> : Essais cliniques de thérapie cellulaire utilisant les Treg. Adapté de Bluestone <i>et al</i> .....	46
<b>Tableau 4</b> : Essais cliniques terminés ou en cours testant l'administration d'IL-2 faible dose dans différentes pathologies. ....	55
<b>Tableau 5</b> : Tableau résumant les biothérapies alternatives de l'allergie. ....	129

## Liste des Abréviations

**ITS** : ImmunoThérapie Spécifique  
**Th2** : lymphocytes T helper de type 2  
**IgE** : Immunoglobuline de type E  
**IL-2** : Interleukine -2  
**Treg** : Lymphocyte T régulateur  
**TCR** : Récepteur des lymphocytes T (*T cell receptor*)  
**LT** : Lymphocytes T  
**DT1** : Diabète de type 1  
**FOXP3** : Forkhead Box Protein 3  
**IPEX** : Syndrome auto-immun lié à l’X associant polyendocrinopathies, entéropathies et allergies (*Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*)  
**tTreg** : lymphocytes T régulateurs d’origine thymique (*Thymus-derived Treg*)  
**CMH-II** : complexes majeur d’histocompatibilité de type II  
**APC** : cellules présentatrices de l’antigène (*Antigen-presenting cells*)  
**HA** : Hemagglutinine  
**OVA** : Ovalbumine  
**mTEC** : cellules épithéliales thymiques médullaires (*medullary thymic epithelial cells*)  
**AIRE** : Facteur de transcription gouvernant la régulation de l’expression d’ARN des cellules thymique (*auto-immune regulator gene*)  
**DC** : cellules dendritiques (*Dendritic cells*)  
**cDC** : cellules dendritiques conventionnelles (*Conventionnal dendritic cells*)  
**pDC** : cellules dendritiques plasmacytoides (*plasmacytoid dendritic cells*)  
**CCR7** : Récepteur de chimiokine à motif C-C de type 7 (*C-C Chemokines receptor type 7*)  
**TSLP** : thymic stromal-derived lymphopoietin  
**GITR** : glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor  
**STAT-5** : Signal transducer and activator of transcription

**pTreg** : Treg induits en périphérie (*peripheral Treg*)  
**iTreg** : Treg induits *in vitro* (*induced Treg*)  
**TGF-β** : Transforming Growth Factor-β  
**Tconv** : Lymphocytes T conventionnels  
**ATRA** : Acide tout-trans rétinolique (*all-trans retinoic acid*)  
**Tr1** : Treg de type 1  
**Th3** : lymphocytes T helper de type 3  
**LAG-3** : lymphocyte activation gene 3  
**CXCR-3** : Récepteur de Chimiokine à motif C-X-C de type 3 (*C-X-C Chemokine Receptor 3*)  
**IFN-γ** : Interferon-γ  
**LAP** : Latency-Associated Peptide  
**ICOS** : Inducible T cell costimulator  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**CTLA-4** : Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4  
**NRP1** : Neuropilin-1  
**NK** : Natural Killer  
**EAE** : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale  
**LFA-1** : Leukocyte function-associated antigen-1  
**IDO** : Indoleamine 2,3-dioxygenase  
**TRAIL** : Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand  
**DR5** : Death receptor 5  
**PD-1** : Programmed Death-1  
**ATP** : Adénosine Tri-Phosphate  
**CSH** : Cellules souches hématopoïétiques  
**GVH** : Maladie du greffon contre l’hôte (*Graft versus Host*)  
**DLI** : Transfusion de lymphocytes du donneur (*Donnor Lymphocyte Infusion*)  
**GVL** : Réaction du greffon contre les cellules leucémiques (*Graft versus leukemia*)  
**NOD** : Souris *Non Obese Diabetic*  
**LES** : Lupus érythémateux systémique  
**SEP** : Sclérose en plaque  
**CIA** : Modèle d’arthrite induite par le collagène (*Collagen induced arthritis*)  
**PBMC** : Cellules mononuclées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*)



**HLA** : Antigènes des leucocytes humains (*Human Leukocyte Antigens*)  
**CAR-T** : cellules T exprimant un récepteur chimériques de l'antigène (*Chimeric antigen receptor T*)  
**GM-CSF** : Facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)  
**FDA** : food and drug administration  
**CNS2** : (Séquence conservée non codante (*conserved noncoding sequence 2*)  
**pSTAT-5** : STAT-5 phosphorylé  
**CIC-BTi** : Centre d'investigation clinique – Biothérapie et immunologie  
**GALT** : tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive (*Gut associated lymphoid tissue*)  
**LP** : Lamina propria  
**PP** : Plaques de Peyer (*Peyer's Patches*)  
**MLN** : Ganglions mésentériques (*Mesenteric lymph node*)  
**IEL** : lymphocytes intraépithéliaux (*Intra-epithelial lymphocyte*)  
**PRR** : Pathogen Recognition Receptors  
**PAMP** : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
**TLR** : Toll like Receptor  
**LPS** : Lipopolysaccharides  
**ILC2** : cellules lymphoïdes innées de type 2 (*Innate lymphoid cells 2*)  
**GATA-3** : GATA-binding protein 3

**FC** : Fragment constant des Immunoglobulines  
**Fab** : Région variable des Immunoglobulines  
**MIP-1 $\alpha$**  : Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$   
**ROR $\gamma$ t** : retinoic acid-related orphan receptor- $\gamma$ t  
**IRF4** : Interferon-regulatory factor 4  
**MMC9** : mastocytes muqueux produisant de l'IL-9 (*multifunctional IL-9-producing mucosal mast cell*)  
**Lin** : Lineage  
**OLS** : Organe lymphoïde secondaire  
**RALDH** : Rétinaldéhyde dehydrogénase  
**Alun** : Gel d'hydroxide d'aluminium  
**Teff** : Lymphocytes T effecteurs  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**SCIT** : Immunothérapie spécifique par voie sous cutanée (*subcutaneous immunotherapy*)  
**OIT** : Immunothérapie spécifique par voie orale (*Oral immunotherapy*)  
**SLIT** : Immunothérapie spécifique par voie sublinguale (*Sublingual immunotherapy*)  
**EPIT** : Immunothérapie spécifique par voie épicutannée (*Epicutaneous immunotherapy*)  
**NP** : Nanoparticule  
**VLP** : Pseudo particule Virale (*Viral like particle*)

## Résumé

Les maladies allergiques sont devenues un enjeu de santé publique majeur en raison d'une prévalence en constante augmentation ces dernières années, d'un risque accru de choc anaphylactique et de l'absence de traitement curatif existant. Les allergies alimentaires sont caractérisées par une évolution fréquente vers le choc anaphylactique. Les lymphocytes T régulateurs (Treg), cellules permettant le maintien de l'homéostasie immunitaire et le contrôle des réponses, sont au centre du processus de régulation des réponses allergiques. Il a été démontré qu'il existait un déficit quantitatif et qualitatif de ces cellules chez les patients allergiques et que les manifestations allergiques étaient exacerbées en l'absence de Treg. L'induction, *in vivo*, de ces cellules semble donc être une alternative thérapeutique prometteuse afin de prévenir et traiter les maladies allergiques en particulier, l'allergie alimentaire.

L'interleukine-2 (IL-2), cytokine du système immunitaire permettant la survie, l'expansion et la différenciation des lymphocytes, notamment les Tregs lorsqu'elle est utilisée à faible dose, constitue une avancée thérapeutique majeure. L'objectif de cette thèse a été d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'IL-2 faible dose dans l'allergie alimentaire. L'IL-2 faible dose induit l'expansion et l'activation de Treg permettant la mise en place d'une protection contre les manifestations cliniques d'allergie alimentaire dans deux modèles de souris avec l'ovalbumine et l'arachide. L'abolition de cet effet clinique chez les souris dont les Treg ont été éliminés démontre la contribution majeure des Treg dans l'efficacité de la thérapie IL-2. Les mécanismes associés à la protection peuvent être corrélés à une modification locale de la balance Th1 / Th2 et une inhibition du recrutement et de l'activation des mastocytes.

Nous avons démontré que l'IL-2 induit une protection clinique durable, supérieure à 7 mois, aussi bien lorsqu'elle est administrée de façon préventive (avant la phase de sensibilisation), que curative (après la sensibilisation ou le déclenchement de l'allergie). Cette protection à long terme est également dépendante des Treg dans la mesure où leur déplétion entraîne la perte de protection de souris. Ces résultats, combinés à l'absence visible d'augmentation des Treg en fin de protocole, nous ont conduits à caractériser les mécanismes immunorégulateurs inhérents à ce contrôle effectif à distance et sur le long terme après traitement, en analysant notamment les sous populations de cellules régulatrices particulièrement efficace pour contrôler les réponses allergiques. Les résultats préliminaires obtenus, qu'il conviendra de reproduire, ne nous permettent pas de conclure clairement quant à la sélection des Treg spécifiques de l'allergène, ou de sous population de Treg, réputées protectrices dans l'allergie.

Toutefois, nos résultats constituent la preuve de concept de l'utilisation de l'IL-2 faible dose dans l'allergie alimentaire. De même l'IL-2 a également montré son efficacité dans un modèle murin d'allergie respiratoire (ovalbumine). Nous avons aussi démontré que des voies d'administration alternatives étaient possibles, notamment la voie orale. De ce fait, un essai clinique de phase II testant l'administration d'IL-2 faible dose dans la rhinoconjonctivite va prochainement être mise en place par notre centre d'investigation clinique. Ainsi, nous espérons développer une nouvelle biothérapie, sûre, efficace et peu coûteuse, dans la prise en charge thérapeutique des allergies.

**MOTS CLES :** Allergie, interleukine 2, biothérapie, traitement curatif, Treg spécifiques de l'antigène, pTreg.

## Abstract

Regulatory T cells (Treg) are pivotal for maintenance of immune self-tolerance, and also regulate immune responses to exogenous antigens, including allergens. Both decreased Treg number and function have been reported in allergic patients, offering new therapeutic perspectives. The *in vivo* induction of these cells therefore, appears to be a promising therapeutic option in order to prevent and treat allergic diseases in particular, food allergy.

Interleukin-2 (IL-2), allowing the survival, expansion and differentiation of lymphocytes, especially Treg when used at low doses, is a major therapeutic advance. Here, we evaluated the ability of low dose IL-2 (intraperitoneal route to control) allergy in an experimental model of food allergy.

Low dose IL-2 (ld-IL-2) induced Treg expansion and activation that elicited protection against clinical manifestations of food allergy in two mouse models with ovalbumin and peanut. This clinical effect was lost in Treg-depleted mice demonstrating the major contribution of Treg in ld-IL-2 efficacy. Also, protection from allergy could be explained by a Treg-dependent local modification of the Th1/Th2 balance and an inhibition of mast cell recruitment and activation.

Then, preventive and therapeutic effects of ld-IL-2 were observed over a 7-month period, highlighting its long-term efficacy. This long-term protection is also dependent on Treg insofar as their depletion results in the loss of protection of mice. These results, with the loss of increase of Treg at the end of the protocol, led us to better characterize the immunoregulatory mechanisms involved in the ld-IL2 long term efficacy, in particular by analyzing subpopulations of Treg particularly effective in controlling allergic responses. The preliminary results obtained, which should be reproduced, do not allow us to conclude clearly to the selection of allergen-specific Treg, or Treg subpopulation involved in the regulation of allergic responses.

However, our results demonstrate the proof of concept of the use of low-dose IL-2 in food allergy. Similarly IL-2 has also shown its efficacy in a mouse model of asthma (ovalbumin). Alternative routes of administration were also demonstrated, including oral route. As a result, a clinical trial testing low-dose IL-2 in rhinoconjunctivitis will soon be initiated by our center. The present data show for the first time the therapeutic potential of ld-IL-2 for the treatment of food allergy, and should prompt hope, in the therapeutic management of allergies. Patients will be offered the first curative treatment developed in food allergies to improve their quality of life.

**Keywords:** Allergy, Interleukin 2, biotherapy, therapeutic option, allergen-specific Treg, peripheral Treg.

## Avant-Propos

L'allergie, aussi appelée hypersensibilité, est une manifestation clinique observée lors d'une réaction immunitaire exacerbée contre un antigène non pathogène, l'allergène. Tout comme les autres formes d'allergies, l'allergie alimentaire, manifestation clinique contre un allergène alimentaire (trophallergène) constitue un enjeu de santé publique majeur.

L'allergie alimentaire concerne principalement des enfants vivant dans les pays industrialisés. Dans une moindre mesure, la population adulte est également concernée par l'allergie alimentaire. Globalement, le nombre de personnes souffrant d'allergie alimentaire dans le monde est estimé entre 200 et 250 millions de personnes (Mills et al. 2007). Par ailleurs, l'allergie alimentaire constitue la cause principale d'anaphylaxie chez les enfants de 0 à 14 ans. Le nombre de réactions sévères a connu un accroissement de 28% en 5 ans en France (Moneret-Vautrin 2008). Ces chiffres laissent présager la crainte d'une forte augmentation sur les prochaines années de cas graves avec risque de décès suite à un choc anaphylactique. De ce fait, une augmentation des dépenses de santé est attendue alors que l'allergie constitue déjà une part non négligeable dans le budget des systèmes de santé. Les chiffres disponibles sont basés sur des estimations en raison d'un manque d'étude fiable disponible à ce jour. Ainsi, l'allergie alimentaire représenterait une dépense se situant entre 23 et 100 milliards d'euros, selon les régions du monde étudiées (W. Yu, Freeland, et Nadeau 2016).

Un autre problème majeur réside dans le fait que l'arsenal thérapeutique de l'allergie alimentaire est très limité. Outre les traitements symptomatiques, il existe dans le cadre des allergies alimentaires deux grands types de traitements prescrits aujourd'hui : le traitement reposant sur le régime d'éviction et le traitement du choc anaphylactique par stylo auto-injecteur d'adrénaline. Toutefois, leur prescription s'heurte à certaines limites de ces traitements notamment en raison d'un risque de dénutrition secondaire dans le premier cas (Groetch et Nowak-Wegrzyn 2013) et d'un mésusage du stylo auto-injecteur chez plus de la moitié des patients souffrant d'allergie sévère dans le deuxième cas (O'Keefe et al. 2014).

De même, l'immunothérapie spécifique (ITS), seule méthode actuelle pour traiter durablement les allergies, s'heurte à un problème de tolérance et d'efficacité dans le cadre de l'allergie alimentaire. Bien que des efforts considérables aient été faits ces dernières années avec notamment l'essor de nouvelles voies d'administration de l'antigène, l'ITS possède

l'inconvénient majeur de la ré-administration de l'allergène en cause, pouvant provoquer des réactions potentiellement graves chez le patient. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles thérapies basées sur une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'allergie.

L'allergie alimentaire est caractérisée par une déviation des réponses immunitaires vers une réponse de type T helper de type 2 (Th2), responsable de la synthèse d'Immunoglobuline (Ig) de type E (IgE) expliquant les symptômes cliniques. Des données récentes obtenues chez l'Homme ou l'animal montrent que les manifestations cliniques de l'allergie sont exacerbées en cas d'absence congénitale (Torgerson et al. 2007) ou de déplétion expérimentale des Treg (Kanjrawi et al. 2011) alors même qu'ils sont indispensables pour réguler les réactions allergiques. Ces caractéristiques leur confèrent un fort potentiel thérapeutique comme cela a déjà été montré dans des modèles de transfert adoptif dans l'allergie alimentaire (Yamashita et al. 2012).

Notre laboratoire possède une expertise dans l'utilisation de l'interleukine (IL) 2 (IL-2) à faible dose comme immunothérapie immuno-régulatrice. Après avoir démontré que l'IL-2 faible dose permettait une expansion préférentielle des Treg (Klatzmann et Abbas 2015; Grinberg-Bleyer et al. 2010), l'utilisation de cette immunothérapie a connu un essor considérable dans le cadre d'essais cliniques afin de traiter des maladies auto-immunes (Saadoun et al. 2011; Hartemann et al. 2013; von Spee-Mayer et al. 2015; Hordinsky M et Kaplan DH 2014) ou de rejets allogéniques (Koreth et al. 2011). Ainsi, l'utilisation des Treg comme outil thérapeutique devient aisée, l'IL-2 faible dose permet de s'affranchir des difficultés techniques de sélection et d'expansion des Treg *in vitro* rencontrées dans le cadre de protocoles de thérapie cellulaire classique. Un tel traitement n'avait jamais été testé dans le cadre d'une maladie allergique.

Ainsi, l'objectif de cette thèse a été d'établir la preuve de concept de l'utilisation d'IL-2 faible dose comme outil thérapeutique de l'allergie dans une étude préclinique utilisant un modèle murin d'allergie alimentaire à l'ovalbumine. Les résultats obtenus, ayant permis la publication d'un article scientifique, seront exposés et discutés plus loin dans cette thèse. De même, une revue sur le sujet a été publiée en 2017. Surtout, ces résultats sont à l'origine d'un essai clinique (Rhinil-2, PHRC 2016), testant l'administration d'IL-2 faible dose chez des patients souffrant de rhinite allergique au pollen de Bouleau (Bet v 1) avec un syndrome oral associé à la consommation de pomme (Mal d 1). Ainsi, si les résultats obtenus chez l'animal

sont confirmés chez l'Homme, l'IL-2 constituera une avancée thérapeutique majeure laissant présager de son efficacité dans tout type d'allergie.

# **Première Partie - De la découverte des lymphocytes T régulateurs... à leur utilisation en thérapie: Un bref historique.**

La première partie de cette thèse sera consacrée à la présentation des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui se situent au cœur de l'immuno-régulation induite par l'IL-2 faible dose. Nous reviendrons sur les grandes étapes de leur découverte et de leur caractérisation, soulignant également leur complexité compte tenu des différentes sous-populations de Treg aujourd'hui décrites. De même, nous aborderons les principaux mécanismes employés par les Treg afin de réguler les réponses immunitaires et de maintenir une tolérance périphérique. Ceci permettra d'introduire le potentiel thérapeutique des Treg, point qui sera abordé dans la deuxième partie de cette thèse.

## **1. Identification d'une population thymique ayant des propriétés régulatrices : l'origine des lymphocytes T régulateurs.**

Le système immunitaire adaptatif est capable de réagir contre une multitude d'antigènes pathogènes d'origine tumorale, infectieuse ou environnementale. La très grande diversité du répertoire des récepteurs des cellules T (TCR, T cell receptor) obtenue par recombinaison génétique dans le thymus permet la reconnaissance de ces antigènes. Cependant, la capacité du système immunitaire adaptatif à générer au hasard cette diversité du répertoire conduit à l'émergence de clones capables de réagir contre des antigènes du soi ou des antigènes de l'environnement non pathogènes. Malgré la mise en place, dans le thymus, de mécanismes immunologiques de sélection négative, ces clones T auto-réactifs peuvent échapper à cette sélection et atteindre les compartiments périphériques. Ainsi, afin de préserver la tolérance à ces antigènes non pathogènes, les lymphocytes T régulateurs représentent une population cellulaire essentielle dans le maintien de cette tolérance. Ces Treg constituent une sous population de lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> à activité immunosuppressive. Ils représentent entre 5 et 10% des LT CD4<sup>+</sup> présents dans le sang périphérique chez l'Homme et jouent un rôle majeur dans la régulation de réponses auto-immunes, allergiques et dans le contrôle de l'homéostasie immunitaire.

### **i. Les Treg avant 1995 : une population suppressive nécessitant une meilleure caractérisation phénotypique.**

Les premières preuves de l'existence de cellules suppressives ont été établies au début des années 60 par les observations de Miller. La thymectomie néonatale en combinaison avec une greffe allogénique de thymus permet la mise en place d'une tolérance et le non rejet d'un greffon cutané allogénique de même fond génétique que la souris donneuse (J. F. A. P. Miller 1962). Ceci apporte, pour la première fois, la preuve que le thymus constitue le siège de la mise en place de la tolérance au soi. D'autres expériences ont ensuite consolidé ces données. Différents groupes ont observé que la thymectomie réalisée 3 jours après la naissance conduit au développement spontané de manifestations inflammatoires tissulaires et à la production d'auto-anticorps spécifiques de protéines du soi, caractéristiques de manifestations auto-immunes (Taguchi et Nishizuka 1981). De même, différentes équipes, ont rapporté dès 1973, que la thymectomie suivie d'une irradiation totale réalisée chez le rat à l'âge adulte conduit également à l'émergence de manifestations auto-immunes, notamment une thyroïdite associée à la présence d'auto-anticorps anti-thyroglobuline (Penhale et al. 1973), ou encore un diabète de type 1 (DT1) (Penhale et al. 1990; Fowell et Mason 1993). Dans ces conditions, le transfert adoptif de  $CD4^+$  issus de nouveaux nés, à des souris thymectomisées, conduit alors à l'établissement de manifestations auto-immunes chez ces souris (S. Sakaguchi, Takahashi, et Nishizuka 1982). A l'inverse, les lymphocytes T  $CD4^+$  ou les thymocytes simples positifs  $CD4^+CD8^-$  provenant de souris normales sont capables d'inhiber les réactions auto-immunes induites par la thyméctomie néonatale (S. Sakaguchi, Takahashi, et Nishizuka 1982; Asano et al. 1996). Ainsi, ces résultats démontrent dans un premier temps, l'existence de cellules régulatrices dérivant directement des thymocytes capables de prévenir les manifestations auto-immunes.

Par la suite, les travaux ont cherché à mieux caractériser la population lymphocytaire ayant des propriétés régulatrices au sein des LT  $CD4^+$ , notamment en identifiant des marqueurs de surface spécifiques. L'équipe de Sakaguchi a largement contribué à la découverte de ces nouveaux marqueurs. Elle a pu observer que chez les souris ayant subi une thymectomie néonatale et souffrant de pathologies auto-immunes, les LT  $CD4^+ CD5^+$  étaient diminués (S. Sakaguchi et al. 1985). Le CD5 fut proposé comme le premier marqueur membranaire des lymphocytes Treg. Ceci a été conforté par les expériences de transfert adoptif de LT  $CD4^+$  exprimant fortement le CD5, ayant permis de contrôler les manifestations auto-immunes chez la souris (S. Sakaguchi et al. 1985). Néanmoins, les expériences réalisées



par la suite ont remis en cause le CD5 comme marqueur des Treg. En effet, le transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD5<sup>low</sup> à des souris athymiques et déficientes en LT (Souris Nude) ou à des souris normales dont les lymphocytes T ont été éliminés (sérum anti-thymocytes + irradiation) conduit à l'émergence de manifestations auto-immunes sévères (S. Sakaguchi et al. 1985; Sugihara et al. 1988). Ces résultats suggèrent que le CD5 est exprimé différenciellement sur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ayant des fonctions opposées. Des expériences similaires ont été réalisées par Powrie *et al.* dans le début des années 90 et ont permis de mettre en avant une expression différentielle du CD45RC (chez le rat) ou CD45RB (chez la souris) sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels (CD45RC<sup>hi</sup> / CD45RB<sup>hi</sup>) et ceux ayant des propriétés régulatrices (CD45RC<sup>low</sup> / CD45RB<sup>low</sup>) (Powrie et Mason 1990; Powrie et al. 1993). Toutefois, ces marqueurs restent non-satisfaisants dans la mesure où ils peuvent être exprimés par d'autres cellules. Ainsi, la quête de nouveaux marqueurs des Treg, plus spécifiques que le CD5 ou le CD45RC/CD45RB s'est intensifiée.

## **ii. 1995 et l'identification du CD25 : un tournant dans l'analyse des Treg.**

L'identification du CD25 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-2) comme marqueur des lymphocytes Treg par l'équipe de Sakagushi, découle des observations obtenues par les expériences exposées dans la partie précédente. En effet, Sakagushi et son équipe ont observé que le CD25 était également présent sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant fortement le CD5 ou faiblement le CD45RB, deux sous populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> aux propriétés régulatrices (S. Sakaguchi et al. 1995). Ainsi, le transfert de splénocytes dont les LT CD25<sup>+</sup> ont été éliminés, à des souris athymiques, conduit à l'induction de manifestations auto-immunes de sévérité supérieure comparativement à un transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD5<sup>low</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup>. A l'inverse, l'injection de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> induit clairement une inhibition du développement de manifestations auto-immunes (S. Sakaguchi et al. 1995). De plus, il a été observé que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> apparaissaient autour du 3ème jour après la naissance, au niveau périphérique, chez une souris normale. Ceci permet d'expliquer les résultats obtenus et notamment l'observation de manifestations auto-immunes chez les souris ayant subi une thymectomie néonatale, empêchant le développement thymique de ces cellules régulatrices. Enfin, l'administration de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> provenant de souris normales à des souris venant de subir une thyméctomie prévient l'apparition des manifestations auto-immunes (Asano et al. 1996). Ces résultats suggèrent le caractère

indispensable du développement thymique de ces cellules dans le contrôle des réactions immunitaires auto-immunes.

Le CD25 est donc utilisé depuis pour l'identification des Treg dans les différentes publications, aussi bien chez la souris ( $CD4^+CD25^{hi}$ ), que chez l'Homme ( $CD4^+CD25^+$ ). De même, la seule expression de CD25 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-2) à la surface de la cellule est souvent utilisée comme critère de tri ex-vivo des Treg et reste satisfaisante chez la souris. Cependant les lymphocytes T conventionnels (Tconv) peuvent également exprimer le CD25. Cette expression de CD25 sur les Tconv est inductible par différents signaux d'activation (Roncador et al. 2005). Néanmoins, le niveau d'expression du CD25 sur les Tconv activés est inférieur au niveau d'expression du CD25 sur les Treg (Kuniyasu et al. 2000). En raison de cette expression différentielle du CD25 à la surface des Tconv et des Treg il reste indispensable de caractériser les Treg par un marqueur encore plus spécifique.

### **iii. FOXP3 : le marqueur idéal ?**

Le facteur de transcription FOXP3 (Forkhead Box Protein 3) a été identifié en 2001 suite à la caractérisation, chez la souris et chez l'Homme, de deux syndromes « auto-immuns » relativement similaires, associés à un défaut de FOXP3. Ainsi les souris SCURFY qui développent spontanément des manifestations auto-immunes et inflammatoires sévères et le syndrome IPEX (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome), qui induit chez l'Homme des manifestations auto-immunes impactant plusieurs organes et des allergies sévères, sont tous deux liés à une mutation du gène codant le FOXP3 (Brunkow et al. 2001; Bennett et al. 2001). De façon intéressante, les manifestations auto-immunes caractérisant le syndrome SCURFY sont de même nature que celles produites lors de la déplétion des lymphocytes  $CD4^+CD25^+$ . Ceci a conduit à identifier un rôle possible de FOXP3 dans la fonction des Treg. Notamment, en 2003 il a été rapporté que l'expression de FOXP3 était essentielle pour la différenciation et la fonction des Treg (Hori, Nomura, et Sakaguchi 2003; Fontenot, Gavin, et Rudensky 2003). Aujourd'hui, FOXP3 est considéré comme le meilleur marqueur pour identifier les Treg bien que certaines limites persistent. Alors que FOXP3 est constitutivement exprimé par les Treg, il a été rapporté chez l'Homme que sous certaines conditions, les Tconv activés peuvent également exprimer transitoirement FOXP3 sans acquérir de propriétés immuno-régulatrices (Banham, Powrie, et Suri-Payer 2006; Tran, Ramsey, et Shevach 2007). A l'inverse, une sous population de Treg chez l'Homme ( $CD45RA^+FOXP3^{low}$ ) ne possède pas d'activité suppressive, mais à l'inverse, est capable de produire des cytokines pro-inflammatoires (Miyara et al. 2009). Enfin, il existe de

véritables sous populations de Treg à activité immunosuppressive, n'exprimant pas forcément le FOXP3. Ces sous populations vont être décrites dans le chapitre 2. Ainsi, l'expression de FOXP3 seul chez l'Homme n'est pas une condition nécessaire, ni suffisante afin de conférer des propriétés régulatrices aux cellules. Enfin, FOXP3 étant une protéine nucléaire, elle ne peut pas être utilisée pour trier des Treg maintenus vivants. Chez l'Homme, il a pu être montré que l'expression de la protéine de surface CD127 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-7) est inversement corrélée à celle de FOXP3, ce qui permet ainsi d'identifier plus spécifiquement les Treg sur la base de marqueurs de surface (W. Liu et al. 2006, 127; Seddiki et al. 2006).

#### **iv. Développement thymique des Treg.**

Les expériences de thymectomie réalisées dans les années 60 démontrent que le thymus constitue le site de différenciation des Treg. De même, il a été montré que des anomalies de développement thymique conduit à une diminution du nombre de Treg (J. M. Kim et Rudensky 2006). Ces tTreg, appelés « Thymus-derived » Treg en raison de l'origine de leur différenciation, représentent la majorité des Treg de l'organisme. Ils expriment à haut niveau le CD25 et le FOXP3.

Le développement thymique des Treg est encore sujet à de nombreuses recherches. Il est maintenant admis que l'expression de FOXP3 apparait majoritairement au stade de thymocyte simple positif  $CD4^+$  au niveau de la zone médullaire thymique, même si un faible pourcentage de thymocytes doubles négatifs  $CD4^-CD8^-$  de la zone corticale expriment également le FOXP3 (Barra et al. 2015).

D'une manière plus générale, le développement thymique des tTreg dépend fortement de l'affinité et de l'avidité de son TCR - restreint aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) - ainsi que de la rencontre avec les différentes cellules présentatrices d'antigène (APC) thymiques présentant les antigènes du soi.

L'engagement et la spécificité du TCR jouent un rôle très important dans la sélection thymique des Treg (Hsieh, Lee, et Lio 2012). En effet, Sakagushi et al ont observé, chez des souris où les LT n'expriment qu'un seul TCR spécifique d'un antigène étranger (souris transgéniques pour un TCR spécifique de l'Ovalbumine croisées en fond RAG-/-), l'absence quasi complète de Treg (Itoh et al. 1999). Ainsi, en absence d'antigène du soi, les Treg ne peuvent pas se différencier dans le thymus. Cette expérience fut la première à mettre en avant le rôle essentiel d'un signal TCR dans la différenciation thymique des Treg. De même,

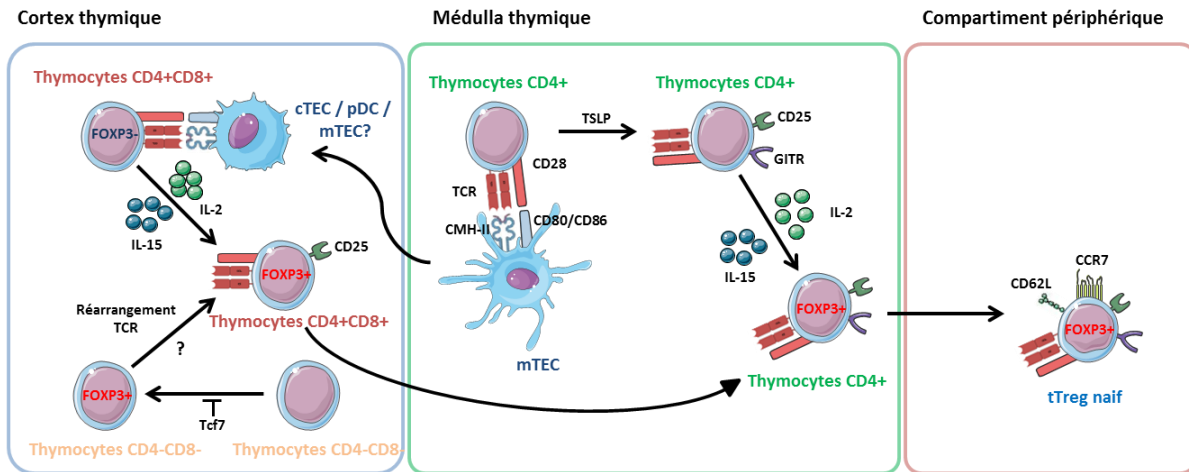
l'affinité ou l'avidité du TCR des thymocytes pour les antigènes du soi sont également déterminantes dans la différenciation en Treg. Cela a été démontré à l'aide de modèles transgéniques dont les LT expriment un TCR spécifique de l'hémagglutinine (HA) ou de l'ovalbumine (OVA). Lorsque ces souris sont croisées avec des souris exprimant HA ou OVA dans le thymus, la différenciation en Treg est favorisée (Apostolou et al. 2002; Jordan et al. 2001). De plus, un précurseur reconnaissant un antigène pour lequel il est faiblement spécifique ne se différencie pas en Treg. Ainsi, la différenciation des Treg dans le thymus est basé sur la force de l'interaction TCR-CMH II. On estime que l'interaction TCR-CMH/peptide de force intermédiaire permet l'induction du développement des Treg, alors qu'une interaction de force très élevée induit la sélection négative des clones auto-réactifs. A l'inverse un signal faible TCR-CMH/peptide, permet aux cellules d'engendrer leur processus de maturation afin de devenir des Tconv naïfs (Hsieh, Lee, et Lio 2012).

La disponibilité des APC thymiques joue également un rôle important dans le développement des Treg. Notamment, les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) semblent critiques dans le développement des tTreg et impliqueraient un mécanisme dépendant de AIRE (Auto-Immune Regulator Gene). AIRE est un facteur de transcription exprimé par les mTEC permettant ainsi l'expression des antigènes périphériques tissulaires et autorisant la sélection négative des thymocytes auto-réactifs (Derbinski et al. 2005). Ainsi, les régions du thymus où les mTEC n'expriment pas le CMH-II, sont moins pourvues en Treg que les régions du thymus où les mTEC expriment le CMH-II (Aschenbrenner et al. 2007). De même, il a été démontré *in vivo* que les cellules dendritiques (DC) conventionnelles (cDC) SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> originaires de la moelle osseuse sont de puissants inducteurs de la différenciation des tTreg (Proietto et al. 2008). En effet, ces cDC SIRP $\alpha$ <sup>+</sup> représentant approximativement 30% des DC thymiques, sont capables de migrer de la périphérie jusqu'au thymus, induisant ainsi le développement antigènes spécifiques des tTreg. Enfin, il a été montré que les DC plasmacytoides (pDC, issues de la moelle osseuse) impliquées normalement dans la sélection négative, peuvent servir de cellules accessoires pour le développement de tTreg (Hanabuchi et al. 2010).

Cependant, un développement cortical des tTreg a également été mis en évidence dans des expériences où la migration des thymocytes du cortex vers la médulla a été bloquée. Notamment, le CCR7 (C-C Chemokines receptor type 7) est essentiel pour la migration des thymocyte du cortex vers la medulla (Kurobe et al. 2006). Ainsi, chez des souris CCR7 KO, a été relevée une accumulation de thymocytes CD4<sup>+</sup> simple positifs exprimant le FOXP3,

démontrant que le cortex thymique est suffisant pour initier l'expression de FOXP3 (Kurobe et al. 2006).

Quelque soit la région du thymus impliquée, la sélection et la survie des tTreg restent sous l'influence de nombreux signaux de co-stimulation. Comme évoqué plus haut, un signal TCR-CMH peptide du soi de force intermédiaire (Apostolou et al. 2002; Jordan et al. 2001) permet la sélection de thymocytes simple positifs  $CD4^+CD25^{hi}GITR^{hi}FOXP3^-$  constituant les précurseurs des tTreg (Lio et Hsieh 2008). De même, l'interaction du CD28 avec le CD80/CD86 est également nécessaire pour la différenciation des tTreg, dans la mesure où les souris n'exprimant pas le CD28 ou le CD80/CD86 ont un nombre de Treg fortement diminué (Tang et al. 2003; Salomon et al. 2000). La sécrétion de TSLP (thymic stromal-derived lymphopoietin) par les DC médullaires et l'expression du récepteur TSLP par les thymocytes constituent également un point critique dans le développement des tTreg (Jiang et al. 2006), tout comme l'expression du GITR (glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor) qui permet au tTreg de résister aux signaux d'apoptose (McHugh et al. 2002). Enfin l'induction de l'expression de FOXP3 chez les tTreg matures est sous l'influence de la production d'IL-2. En effet, l'IL-2 présente un rôle crucial dans le développement des tTreg dans la mesure où l'inactivation du gène codant pour l'IL-2 conduit à une diminution de moitié du nombre de Treg développé dans le thymus chez la souris (Fontenot et al. 2005). Ce blocage partiel du développement des tTreg montre que la signalisation induite par l'IL-2, impliquant le facteur de transcription STAT-5 (Signal transducer and activator of transcription 5), n'est pas exclusive pour le développement des tTreg (Burchill et al. 2007). En effet, il a été démontré que l'IL-15, sécrétée par les macrophages, les lymphocytes B ou les mTEC, constitue également un signal de co-stimulation nécessaire à l'induction de l'expression de FOXP3 par les thymocytes simples positifs  $CD4^+CD25^{hi}GITR^{hi}FOXP3^-$  (I. Caramalho et al. 2015)



**Figure 1 : Différentiation thymique des tReg.**

Les thymocytes simples positifs CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> peuvent recevoir, au niveau de la médulla, des signaux d'activation (TCR/CMH-II-peptide) et de costimulation (CD28/CD80-CD86 ; TSLP) apportés par les mTEC et qui présentent des peptides du soi. Ceci conduit à la différenciation des thymocytes simples positifs CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> en précurseurs tReg, cellules CD4<sup>+</sup> (FOXP3<sup>-</sup>) exprimant le CD25 et le GITR. Ces précurseurs vont ensuite se différencier en véritables tReg exprimant le FOXP3<sup>+</sup> lors de l'exposition à l'IL-2, sécrétée par des thymocytes CD4 simples positifs matures ou lors de l'exposition à l'IL-15 sécrétés par les macrophages, les lymphocytes B ou les mTEC. De plus, lors de l'interaction avec les pDC activés ou les mTEC circulantes, les cellules doubles positives CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> présentes au niveau du cortex thymique peuvent également se différencier en tReg, de façon dépendante des signaux de co-stimulation. Enfin, l'expression de FOXP3 a récemment été décrite au niveau des thymocytes double négatifs du cortex thymique. Adapté de Caramalho *et al*, 2015 (Í. Caramalho et al. 2015)

Pour résumer, la plupart des auteurs s'accordent à dire que la différenciation des tReg est basée sur un modèle en deux étapes. Dans un premier temps, les thymocytes reconnaissent un peptide auto-réactif présenté par les DC thymique via le signal TCR/CMH-II. Ceci induit l'augmentation de l'expression du CD25 qui dans un deuxième temps, permet l'expression de FOXP3 au niveau de la médulla via la signalisation induite par l'IL-2/STAT-5 (Fig. 1). Le développement de tReg dans le cortex serait rendu possible par l'existence de DC thymiques médullaires circulantes, permettant la présentation d'antigènes médullaires sous la dépendance d'AIRE au niveau du cortex thymique (Gray et al. 2007).

## **2. Vers une complexité du compartiment T régulateur : identification de sous populations de lymphocytes T régulateurs CD4+.**

Plus récemment, ont été décrit deux autres catégories de Treg, en plus de tTreg générés dans le thymus. Désormais, on distingue les Treg induits dans les compartiments périphériques à partir de lymphocytes T conventionnels. Les différents experts se sont récemment accordés pour dénommer ces Treg induits en périphérie comme des pTreg (peripheral Treg). Dans un deuxième temps, les iTreg, (*in vitro*-induced Treg) ont également récemment été définis et sont quant à eux, induits *in vitro* à partir de lymphocytes T conventionnels en présence de « Transforming Growth Factor- $\beta$  » (TGF- $\beta$ ).

### **i. Les « peripheral » Treg.**

Les pTreg sont générés à partir des lymphocytes T conventionnels FOXP3- (Tconv) au niveau des sites périphériques sous certaines conditions. En effet l'activation des cellules T en absence d'inflammation ou en présence de cytokines immunosuppressives, telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , permet l'induction de l'expression de FOXP3 (Bilate et Lafaille 2012). De même la présentation de l'antigène par les DC immunosuppressives ou en absence de signal de costimulation fort, la présentation de l'antigène dans un microenvironnement tolérogénique, notamment au niveau des muqueuses riches en TGF- $\beta$  et en IL-2, sont autant de conditions favorisant le développement de pTreg à partir de Tconv (Bilate et Lafaille 2012). Contrairement au tTreg, le répertoire du TCR des pTreg, n'est pas restreint aux antigènes du soi. En effet, les pTreg bénéficient d'un répertoire partagé avec les Tconv dont ils dérivent et il n'existe que très peu de similarités entre le répertoire des tTreg et des pTreg (Shevach et Thornton 2014). L'induction de pTreg est conditionnée par la force du signal de stimulation et l'environnement cytokinique. Plus la force de l'interaction TCR/CMH-peptide est importante plus le TGF- $\beta$  et l'IL-2 sont indispensables pour induire des pTreg (Povolieri et al. 2013). Cependant, l'acide tout-trans rétinoïque (« all-trans retinoic acid », ATRA), en synergie avec le TGF- $\beta$ , permet le développement de pTreg indépendamment du niveau de co-stimulation (Benson et al. 2007).

Par analogie dans leur processus d'induction, d'autres sous populations de cellules aux propriétés immunorégulatrices ont été décrites et assimilées à des pTreg, bien que des

différences phénotypiques majeures existent. Ainsi, ont été décrits très récemment les Treg de type 1 (Tr1) et les lymphocytes T helper de type 3 (Th3).

#### **a. Les lymphocytes T régulateurs de type 1.**

Les Tr1 sont caractérisés par la co-expression de CD49b et de LAG-3 (lymphocyte activation gene 3), une forte sécrétion d'IL-10, l'absence de sécrétion d'IL-4 (Brockmann et al. 2017; Zeng et al. 2015). Ils sont également caractérisés par l'absence de l'expression de FOXP3 (Brockmann et al. 2017; Zeng et al. 2015), constituant une différence majeure avec les pTreg. Ainsi, ils sont identifiés pour le moment sur la base de leur sécrétion d'IL-10. Ils expriment également le CXCR3 (C-X-C Chemokine Receptor) et possèdent beaucoup de marqueurs d'activation (CD40L, CD69, CD28, et IL15R $\alpha$ ) (Kleinewietfeld et Hafler 2014). Il a longtemps été admis qu'une stimulation chronique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en présence d'IL-10 était suffisante pour induire des Tr1 (H. Groux et al. 1996). Cependant, ceci a été revu en 2003 par la même équipe. Notamment, Groux *et al.* démontrent que la stimulation par le TCR est indispensable à l'acquisition des fonctions régulatrices (Hervé Groux 2003). Ceci rejoint les travaux d'Hori *et al.*, qui montrent que les Tr1 peuvent également être induits en périphérie par les cellules dendritiques immatures et en présence d'IL-10 (Hori et al. 2003). Enfin, le TGF- $\beta$  permet également l'induction de Tr1 sécréteurs d'IL-10 après activation de DC sécrétant l'IL-27 (Awasthi et al. 2007). Les Tr1 sont donc activés de manière dépendante de l'antigène (H. L. Weiner 2001). Une fois activés, les Tr1 sont capables de proliférer sous la dépendance de l'IL-15 et non de l'IL-2, plaçant l'IL-15 comme cytokine très intéressante au regard de la mise en place d'une tolérance aux antigènes alimentaires, dans la mesure où les Tr1 se situent au centre du processus d'induction de la tolérance orale (Battaglia et al. 2004).

#### **b. Les lymphocytes T helper de type 3.**

La caractérisation phénotypique des lymphocytes T helper 3 est encore très discutée. Certains auteurs considèrent qu'ils expriment le FOXP3 (Th3 : CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (Carrier et al. 2007), alors que d'autres auteurs les définissent comme des cellules FOXP3<sup>-</sup> (Howard L. Weiner et al. 2011; Y. Chen et al. 1994).

Les Th3 possèdent une fonction suppressive par sécrétion de TGF- $\beta$ . Ils sont capables également de sécréter de l'interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et expriment à leur surface le LAP (Latency-Associated Peptide) (peptide formant un complexe avec le TGF- $\beta$ ) (Howard L. Weiner et al. 2011). Les lymphocytes Th3, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>, acquièrent leurs propriétés



régulatrices après activation de leur TCR au niveau de l'intestin par un antigène administré par voie orale ou le microbiote intestinale, expliquant pourquoi ils sont principalement retrouvés au niveau de l'intestin. Ainsi, les Th3, contrairement aux tTreg, sont spécifiques d'antigènes non présentés au niveau du thymus. Ils sont impliqués dans la tolérance orale aux antigènes alimentaires et dans la tolérance au microbiote (Françoise Cottrez et Groux 2004). Le TGF- $\beta$  sécrété par ces lymphocytes Th3 permet de maintenir l'activation et l'expansion des tTreg permettant la suppression des réponses Th1 et Th2. Le TGF- $\beta$  permet également la conversion des Tconv  $CD4^+FOXP3^-$  en pTreg  $CD4^+CD25^+FOXP3^+LAP^+$  (Awasthi et al. 2007).

## ii. Les « *in vitro*-induced » Treg.

Enfin, l'acquisition de FOXP3 à partir de lymphocytes T effecteurs après l'interaction *in vitro* TCR/CMH-peptide en présence de TGF- $\beta$  permet de définir les iTreg (Shevach et Thornton 2014). Ils ne seront que peu détaillés car ils ne contribuent pas à la régulation en condition physiopathologique des manifestations auto-immunes ou allergiques. Néanmoins, dans des modèles d'études *in vitro*, les iTreg ont démontré des capacités suppressives aussi importantes que les tTreg. Les iTreg sont également capables de supprimer les manifestations auto-immunes lorsqu'ils sont transférés à des souris SCURFY (Huter, Punkosdy, et al. 2008). Cependant leur effet thérapeutique *in vivo* est bien moindre que les tTreg (Huter, Punkosdy, et al. 2008). Cela serait lié au fait que les iTreg perdent l'expression de CD62L lorsqu'ils sont cultivés *in vitro*, ne pouvant plus migrer au niveau des ganglions (Shevach et Thornton 2014). Néanmoins, le potentiel thérapeutique des iTreg a tout de même été testé dans différents modèles de pathologie. Ainsi, des équipes ont différencié des iTreg spécifiques d'antigène, en utilisant des Tconv de souris transgéniques exprimant un TCR spécifique de la pompe à protons de l'estomac, cultivés en présence de TGF- $\beta$ . Ces iTreg spécifiques de l'antigène, co-transférés avec des  $CD4^+FOXP3^-$  transgéniques à des souris nude, ont permis d'inhiber le développement des manifestations de la gastrite auto-immune (DiPaolo et al. 2007). Dans des modèles de pathologies médiées par les lymphocytes Th17, ni les tTregs ni les iTregs polyclonaux n'ont pu prévenir la maladie alors que les iTreg spécifiques de l'antigène ont complètement empêché la destruction des tissus et supprimé l'expansion des cellules T effectrices dans les ganglions (Huter, Stummvoll, et al. 2008). L'utilisation des iTreg spécifiques de l'antigène ouvre donc de nouvelles perspectives de traitement.

### iii. Caractéristiques phénotypiques des Treg.

L'association des marqueurs  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  semble être le phénotype le plus spécifique des Treg à l'heure actuelle, même si elle ne semble pas parfaite pour les différentes raisons évoquées plus haut. Ainsi, d'autres marqueurs sont essentiels à la distinction des Treg par rapport aux autres sous populations  $CD4^+$  (Tconv notamment). Notamment, il existe différents marqueurs d'activation et différents marqueurs de sous populations de Treg, non restreints aux Treg, dont la co-expression permettrait de mieux caractériser les Treg.

Parmi les marqueurs d'activation, l'expression d'ICOS (Inducible T Cell COStimulator), molécule de co-stimulation de la famille de CD28, permet ainsi de caractériser les Treg les plus immunosuppresseurs et sécréteurs d'IFN- $\gamma$  (Vocanson et al. 2010). ICOS (CD278), est un signal de costimulation indépendant de la voie CD28/CD80-86. ICOS est faiblement exprimé sur les lymphocytes T naïfs. Son expression est up régulée après activation par le TCR. ICOS est donc fortement exprimé sur les lymphocytes T activés et sur les Treg (Busse et al. 2012). La fonction d'ICOS a été étudiée dans différents modèles d'infections, de maladies auto-immunes ou d'allergies chez la souris. Les études fonctionnelles ont montré que le blocage d'ICOS *in vivo*, inhibe l'induction de tolérance dans un modèle d'inflammation pulmonaire. Ce blocage induit une hypersécrétion de mucus, une éosinophilie pulmonaire et la production de cytokine proTh2 en réponse à une sensibilisation à l'OVA (Busse et al. 2012). Dans les maladies allergiques, ICOS influence la réponse antigène spécifique en contrôlant le nombre d'effecteurs de type Th2 (Busse et al. 2012). Les Treg ICOS $^+$  sont également capables d'inhiber spécifiquement la réponse de type Th2 lors d'infection par des parasites du groupes des helminthes (Redpath et al. 2013).

D'autres marqueurs d'activation participent également à la caractérisation des Treg. Ainsi, on distingue à la surface des Treg, des membres de la famille du récepteur du « Tumor Necrosis Factor » (TNF) tels que le GITR (Shimizu et al. 2002) et OX40. De même, l'expression du TNFR2 est essentielle pour la stabilité phénotypique et fonctionnelle des Tregs 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 (X. Chen et al. 2013). Aussi, le TNFR2, contrairement au TNFR1, permet d'identifier les Treg aux propriétés les plus suppressives (Heinrich et al. 2015). D'autre part, un membre de la famille des intégrines, le CD103 permet la caractérisation des Treg. L'expression de CD103 (chaîne  $\alpha$  de l'intégrine  $\alpha\epsilon\beta7$ ), sur les Treg activés, leur permettrait d'avoir une meilleure capacité migratoire vers les tissus (Suffia et al. 2005).

D'autres marqueurs comme LAG-3 ou le CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) (Takahashi et al. 2000), autres molécules de co-stimulation de la famille du CD28, sont également exprimés par les Treg. Leurs rôles respectifs seront abordés dans la partie 3 sur les mécanismes d'action des Treg.

L'ensemble de ces marqueurs participe à l'homéostasie et à la fonction suppressive des Treg. Malgré leur expression constitutive sur une fraction des Treg à l'état basal, ils peuvent aussi être présents sur les Tconv activés. Par conséquent, à eux seuls, ils ne permettent pas de définir les Treg en général, ni de distinguer les différentes sous populations de Treg.

Différents auteurs ont toutefois essayé de définir des marqueurs membranaires permettant de faire la distinction entre les différentes sous populations de Treg. Ainsi, en 2010, Thornton *et al.* ont démontré qu'Helios, facteur de transcription de la famille IKAROS, est exprimé par les tTreg et peut être utilisé comme marqueur intracellulaire permettant de distinguer les tTreg des pTreg, et notamment les tTreg les plus activés (Thornton et al. 2010). Ceci est aujourd'hui controversée car Helios peut être exprimé sur les pTreg sous certaines conditions immunologiques (Yadav et al. 2012; Gottschalk, Corse, et Allison 2012). L'équipe de Yadav *et al.* a démontré que les tTreg expriment à haut niveau, le marqueur de surface Neuropilin-1 (Nrp-1) et que ce marqueur est absent à la surface des pTreg. Ce marqueur membranaire est ainsi proposé pour différencier les tTreg des pTreg (Yadav et al. 2012). Toutefois, il a récemment été démontré que tous les Treg originaires du thymus n'exprimaient pas forcément Nrp1 alors qu'ils expriment tous Helios et en proportion plus importante que Nrp1 (Singh et al. 2015). Ainsi, la distinction des tTreg et des pTreg par l'expression des marqueurs Nrp1 et Hélios est toujours controversée. Néanmoins, l'équipe de Sanders préconise l'analyse de l'expression concomitante d'Helios et de Nrp1 afin d'obtenir la meilleure distinction possible entre tTreg et pTreg (Singh et al. 2015).

### 3. Mécanismes d'action des Treg.

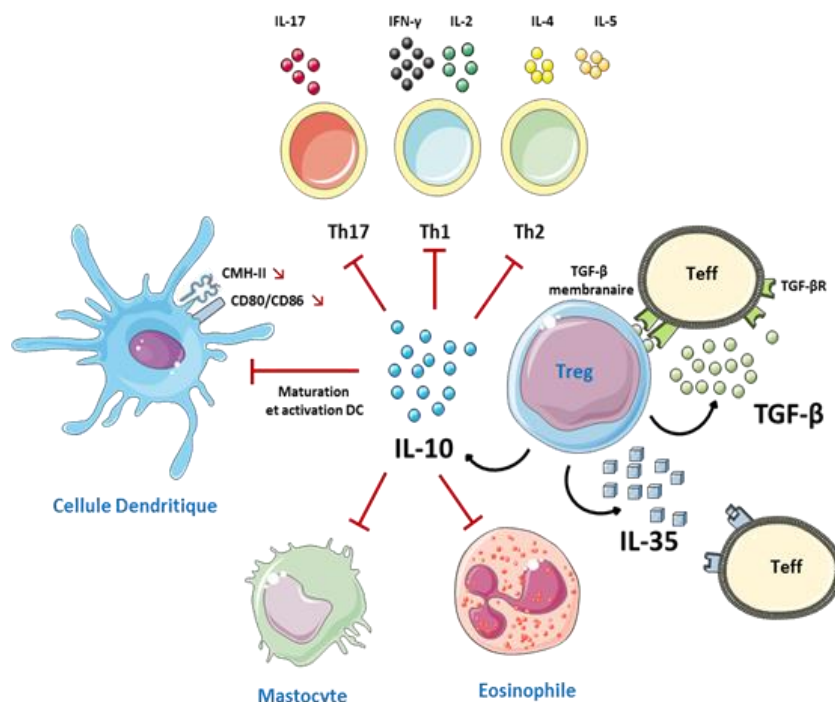
Les Treg utilisent d'une part, différents mécanismes de suppression dont la plupart sont communs entre les différentes populations de Treg décrites précédemment. Néanmoins, certaines sous populations de Treg utilisent des mécanismes de régulation qui leur sont propres. D'autre part, les Treg, après avoir reconnu leur antigène, vont s'activer et être capables de supprimer une grande variété de cellules effectrices, co-localisées aux alentours, de spécificité antigénique différente. Cette effet bystander, mis en évidence la première fois par l'équipe de Sakagushi (Takahashi et al. 1998), permet d'inhiber l'activation de différents clones de Tconv en utilisant des mécanismes de suppression variés.

Les fonctions suppressives des Treg sont multiples selon la population cellulaire considérée et l'environnement dans lequel ils se trouvent. Les Treg agissent sur différentes cibles cellulaires impliquant aussi bien des cellules de l'immunité innée (natural Killer (NK), mastocyte, macrophage, cellules dendritiques, polynucléaires) que des cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T, lymphocytes B...). Ils agissent soit directement en agissant sur leur cycle cellulaire, leur survie et/ou leur fonction effectrice, soit indirectement en régulant l'action des cellules présentatrices de l'antigène.

Les Treg sont capables d'exercer leurs activités immunosuppressives via des mécanismes de suppression directs, contact-indépendants. Ainsi, la production de cytokines inhibitrices est l'un des mécanismes principaux de régulation (Fig. 2). L'IL-10 est connue depuis longtemps comme ayant des propriétés suppressives. En effet, il a été démontré dans un modèle murin d'EAE (Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale) que l'IL-10 contribue à l'amélioration des symptômes (Mann et al. 2007) alors que l'invalidation conditionnelle de l'IL-10 spécifiquement dans les Treg est suffisante pour induire une colite chez la souris. De même, ces animaux sont plus susceptibles à l'induction de l'allergie respiratoire (Rubtsov et al. 2008). D'autres auteurs ont démontré le rôle des Treg sécréteurs d'IL-10 dans le contrôle de l'asthme allergique (Lloyd et Hawrylowicz 2009). Les Tr1 suppriment majoritairement la prolifération cellulaire T à travers la production d'IL-10 (H. Groux et al. 1996), faisant de ces cellules régulatrices, des cellules immunosuppressives dont les mécanismes de suppression sont principalement contact indépendant. L'IL-10 agit à différents niveaux : tout d'abord, elle bloque la différenciation des cellules dendritiques à partir des monocytes circulants (Allavena et al. 1997), réduit le niveau d'expression des molécules CMH-II et de co-stimulation (C. A. Akdis et al. 2000), inhibe la production de cytokines par les mastocytes (Arock et al. 1996) ainsi que la survie et la fonction des

éosinophiles (Takanaski et al. 1994). Chez l'homme, l'IL-10 bloque par ailleurs, la production d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1 mais aussi d'IL-4 et d'IL-5 à partir de lymphocytes de type Th2 en interférant avec les voies de signalisation CD28-CD80 (C. A. Akdis et al. 2000). L'IL-10 est en effet capable d'agir directement sur la transduction intracellulaire du signal généré par le CD28 (C. A. Akdis et al. 2000). Plus récemment, il a été démontré que l'IL-10 sécrétée par les Treg est essentielle afin de contrôler les réponses Th17 pathologiques (Chaudhry et al. 2011).

D'autres cytokines immunosuppressives sont également impliquées dans les mécanismes de régulation des Treg (Fig. 2). Parmi elles, le TGF- $\beta$  est notamment impliqué dans la régulation des réponses immunitaires intestinales. L'activité immunosuppressive des Treg producteurs de TGF- $\beta$  a été démontrée *in vivo* dans différentes pathologies auto-immunes. Ainsi les souris avec une invalidation du gène codant pour le TGF- $\beta$  spécifiquement dans les lymphocytes T développent des réactions auto-immunes létales (M. O. Li, Wan, et Flavell 2007). La sécrétion de TGF- $\beta$  est le mécanisme de suppression majoritaire employé par les Th3 (Howard L. Weiner et al. 2011). Aussi, les Tr1 peuvent exprimer le TGF- $\beta$  contribuant à leurs fonctions suppressives (Brockmann et al. 2017). De même, il a été démontré que le TGF- $\beta$  produit par les Treg permet de contrôler les manifestations d'allergies respiratoires (Joetham et al. 2007). Plus récemment, il a été montré que les Treg exercent également des fonctions suppressives via la production d'IL-35, hétérodimère associant la sous unité Ebi3 et la sous unité IL-12 $\alpha$  (Collison et al. 2007). En effet, l'équipe de Vignali a démontré par RT-qPCR sur cellules triées que l'expression d'Ebi3 et IL-12 $\alpha$  était restreinte aux Treg. Ainsi en utilisant des souris dont les Treg sont KO pour la sous unité Ebi3 ou IL-12 $\alpha$ , les auteurs ont démontré que les Treg Ebi3<sup>-/-</sup> ou IL-12 $\alpha$ <sup>-/-</sup> avaient des capacités suppressives *in vitro* diminuées comparativement aux Treg contrôles (Collison et al. 2007). Dans un modèle murin de MICI, les Treg Ebi3<sup>-/-</sup> ou IL-12 $\alpha$ <sup>-/-</sup> n'ont pas été en mesure de contrôler les manifestations de la colite, contrairement aux Treg sauvages. Enfin, en faisant exprimer par des Tconv transgéniques l'Ebi3, l'IL-12 $\alpha$  ou l'IL35 (Ebi3+IL12 $\alpha$ ), seules les cellules sécrétant l'hétérodimère IL-35 ont démontré des capacités suppressives *in vitro* sur des Tconv naifs restimulés par le peptide HA (Collison et al. 2007).

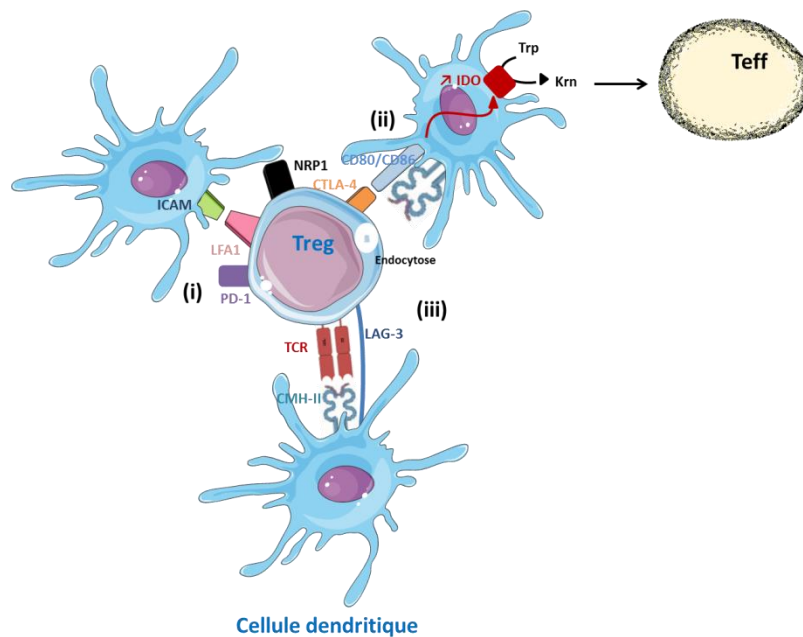


**Figure 2 : Mécanismes de suppression des Treg par sécrétion de cytokine.**

Les Treg sont caractérisés par les sécrétions de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- $\beta$  permettant la suppression des réactions immunitaires après fixation sur leurs récepteurs présents à la surface des différentes cellules effectrices. L'IL-10 induit en plus, un blocage de la maturation et de l'activation des DC caractérisé par la diminution de l'expression du CMH-II et des molécules de co-stimulation CD80/86. Par ailleurs l'IL-10 est capable de supprimer les réponses Th1, Th2 et Th17 en bloquant la sécrétion de cytokines par ces cellules. Les TGF- $\beta$  inhibe la prolifération des Teff, inhibe la différenciation des lymphocytes cellules cytotoxiques, induit la différenciation des Tconv en Treg. L'IL-35 induit la prolifération des Treg, supprime la prolifération des Tconv et inhibe la différenciation des LT en Th17. Teff : lymphocytes T effecteurs ; DC : cellules dendritiques ; TGF- $\beta$ R : Récepteur du TGF- $\beta$ .

En dehors de ces mécanismes de régulation directs, les Treg sont capables de supprimer la maturation et la fonction des DC inhibant leur interaction avec les lymphocytes T conventionnels régulant ainsi indirectement leur niveau d'activation (Tadokoro et al. 2006) (Fig. 3). Ceci impliquerait les molécules de surface NRP-1 et LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1) présentes sur les Treg capables de prolonger l'interaction entre les DC immatures et les Treg. En effet, différentes observations obtenues au microscope biphotonique suggèrent que l'utilisation d'anticorps bloquants NRP-1 ou LFA-1 inhibent l'interaction entre les DC et les Treg (Onishi et al. 2008; Sarris et al. 2008) résultant en une meilleure activation des lymphocytes T effecteurs. En formant des agrégats, les Treg empêchent l'up régulation de CD80 et CD86 sur les DC immatures (Onishi et al. 2008). Les Treg sont également capables de moduler la maturation des DC, les rendant inactives, incapables d'induire l'activation des lymphocytes T. En effet, les Treg possèdent à leur surface membranaire le CTLA-4 qui régule négativement l'expression de CD80 et CD86, principales molécules de costimulation présentes sur les cellules présentatrices d'antigène et indispensables à l'activation lymphocytaire T (Fig. 3). C'est ainsi que les Tr1, dans certaines

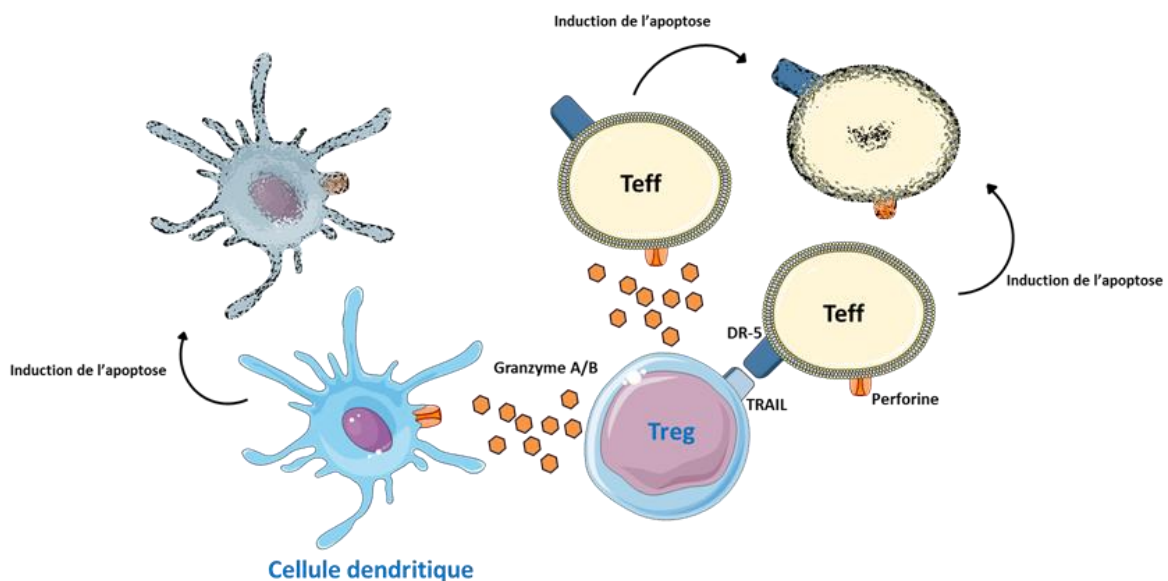
conditions pathologiques, expriment le CTLA-4 et inhibent les réponses effectrices. Les mécanismes de régulation associés au CTLA-4 dépendent du catabolisme du tryptophane, acide aminé essentiel pour la survie des lymphocytes. L'enzyme Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) permet la dégradation du tryptophane par la voie des Kynurenines. En effet, le CTLA-4, en se fixant sur le CD80/CD86, induit l'activité d'IDO ce qui a pour conséquence l'arrêt de la prolifération des lymphocytes T et la mort cellulaire suite à un appauvrissement en tryptophane (Grohmann et al. 2002) (Fig. 3). IDO est exprimée par les DC CD103+ de l'intestin, impliquées dans l'induction de pTreg permettant la mise en place de la tolérance orale, comme détaillé plus haut. Enfin, LAG-3 exprimé à la surface des Treg est également impliqué dans la suppression de la maturation des DC via une interaction de haute affinité avec le CMH-II présent sur le DC (Huang et al. 2004) (Fig. 3).



**Figure 3 :** Mécanismes de suppression de la fonction et de la maturation des cellules dendritiques par les Treg

(i) La fixation de NRP-1 et de LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1) présents à la surface des Treg sur les DC permet d'une part, la formation d'aggrégats rendant moins disponibles les DC pour l'activation des lymphocytes T conventionnels et d'autre part, induit une diminution de la maturation des DC et de l'expression de CD80/86 sur la DC. (ii) L'expression de CTLA-4 présents à la surface des Treg activés entraîne une inhibition de la fonction des cellules dendritiques (DC) en se fixant sur les molécules de co-stimulation CD80/CD86, les rendant non disponibles pour induire le deuxième signal d'activation des lymphocytes T effecteur (CD28-CD80/86). Outre ce mécanisme de compétition, la liaison du CTLA-4 aux CD80 / CD86 induit une signalisation permettant aux Treg d'endocyter les molécules de co-stimulation. Enfin, la fixation de CTLA-4 sur CD80/86 induit l'activation de l'enzyme Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) permettant la dégradation du tryptophane par la DC. L'appauvrissement en tryptophane dans le microenvironnement induit l'apoptose des Teff. (iii) Les Treg inhibent la maturation des cellules dendritiques via l'expression de LAG-3 interagissant avec les molécules de CMH-II.

Un autre mécanisme de régulation proposé implique l'activité cytotoxique des Treg (Fig. 4). Cette cytotoxicité est médiée par la sécrétion de perforine et de granzyme A chez l'Homme ou granzyme B chez la souris. Granzyme A et granzyme B permet l'apoptose des cellules T effectrices, des monocytes et des cellules dendritiques via l'activation de la voie des caspases (Grossman et al. 2004; Gondek et al. 2005; D.-M. Zhao et al. 2006). Ce mécanisme de régulation est impliqué dans la lutte contre le rejet de greffe allogénique (Gondek et al. 2008) et l'immunité anti-tumorale (Cao et al. 2007). Notamment, les Tr1 expriment granzyme B contribuant à leur fonction suppressive (Brockmann et al. 2017). De même, l'engagement de TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) présent à la surface membranaire des Treg activés induit l'apoptose des cellules cibles via l'activation de la voie des caspases après fixation sur son récepteur DR-5 (Death receptor 5). Ceci a été démontré dans un modèle de greffe cutanée où le blocage de DR-5 par un anticorps bloquant diminue la survie du greffon (X. Ren et al. 2007). Enfin, dans certaines situations pathologiques, la suppression médiée par les Tr1 nécessite un signal contact-dépendant via les molécules PD-1 (Programmed Death-1), GITR, ou le TGF- $\beta$  membranaire. C'est ainsi que les Tr1 peuvent réguler les réponses allergiques chez la souris (K. Wu et al. 2007).

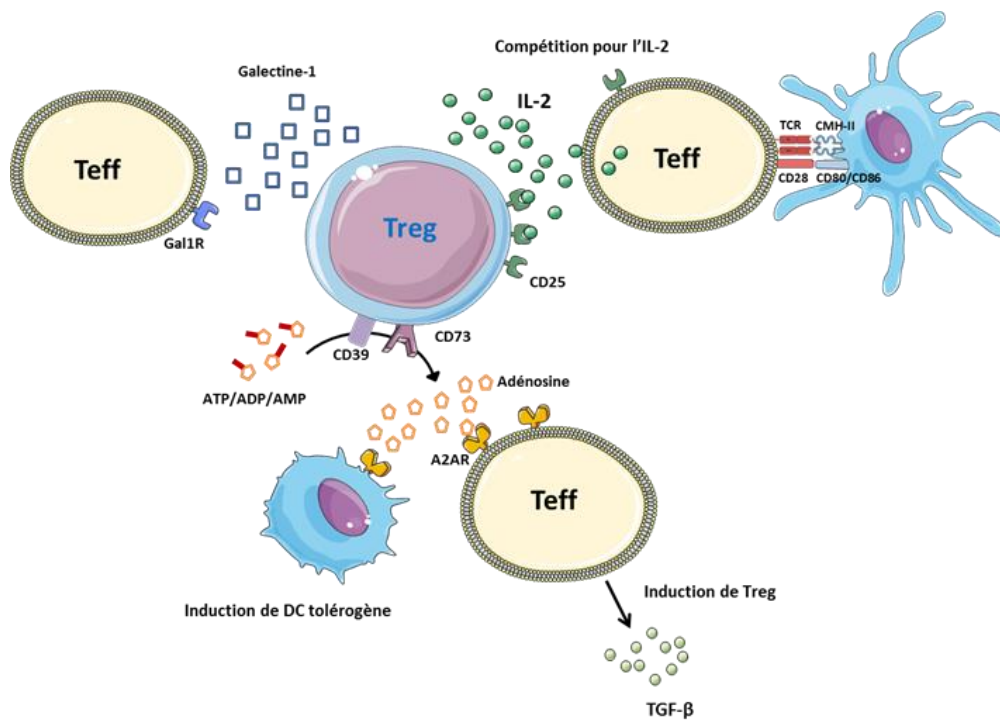


**Figure 4 : Mécanismes de suppression des Treg par cytolyse**

Le couple Perforine/Granzyme sécrété par les Treg permet l'induction de l'apoptose des lymphocytes T effecteurs et des DC après formation de pores membranaires via la perforine, et l'activation de la voie des caspases par Granzyme A/B. Les Treg peuvent également exprimer à leur surface TRAIL, permettant l'induction de l'apoptose des Teff après fixation sur son récepteur DR-5.



D'autres mécanismes de régulation existent encore (Fig. 5). Les Treg, qui expriment à haut niveau la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25), entrent en compétition avec les Tconv pour l'IL-2, induisant alors l'apoptose des Tconv suite à la déprivation en IL-2. Les Treg activés expriment à leurs membranes la galactine-1 qui peut interagir avec des récepteurs présents sur les Tconv induisant un arrêt du cycle cellulaire. Enfin, les Treg expriment très fortement le CD39 et CD73, permettant de convertir l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) en adénosine. En se fixant sur son récepteur A<sub>2A</sub>R, l'adénosine permet de supprimer l'activité des Tconv (Deaglio et al. 2007). Elle favorise également l'induction de Treg en inhibant la signalisation induite par l'IL-6 (ne permettant plus l'orientation vers la réponse Th17) et en favorisant la production de TGF- $\beta$  par les lymphocytes T activés (Zarek et al. 2008). Enfin, l'adénosine permet de moduler la maturation de DC leur permettant d'acquérir un phénotype tolérogénique (Vignali, Collison, et Workman 2008).



**Figure 5 : Mécanismes de suppression des Treg par perturbation métabolique**

Les Treg inhibent la survie et la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Teff) au travers l'appauvrissement du microenvironnement en IL-2, grâce à l'expression du récepteur de haute affinité pour l'IL-2. Les Treg sont capables de cataboliser l'Adénosine Tri Phosphate (ATP) en Adénosine permettant l'induction en périphérie de pTreg et de DC tolérogènes. Enfin, les Treg expriment à leur membrane la Galactine-1 qui, en interagissant avec un de ses récepteurs (Gal1R), supprime la prolifération des Teff après un arrêt du cycle cellulaire.

Pour conclure, les lymphocytes T régulateurs constituent une population cellulaire essentielle dans le maintien de la tolérance immunitaire aux antigènes du soi et le contrôle des maladies auto-immunes. De même, ils contribuent aux phénomènes de tolérance orale, permettant à l'individu de ne pas réagir contre un antigène alimentaire. Ces caractéristiques leur confèrent donc un vrai potentiel thérapeutique pouvant être exploité aussi bien dans le traitement des maladies auto-immunes que dans les maladies allergiques.

## **Deuxième partie - Les Treg au service de la thérapie : Quels potentiels thérapeutiques et quelles applications ?**

De nouveaux mécanismes immunologiques ont récemment été mis en évidence expliquant la physiopathologie de nombreuses maladies « dysimmunitaires » et qui placent les Treg au centre des mécanismes de régulation et de prévention de ces pathologies. Ainsi les Treg constituent un outil thérapeutique prometteur. Cependant, leur utilisation en thérapie reste un challenge dans la mesure où les difficultés techniques constituent un obstacle à l'obtention d'un nombre suffisant de Treg de grade clinique. Ainsi, dans cette deuxième partie, nous développerons les principales applications et limites de leur utilisation en thérapie. Nous étudierons enfin, les alternatives possibles, envisageables permettant l'induction et/ou l'activation de Treg *in vivo*, s'affranchissant ainsi des difficultés techniques de la thérapie cellulaire.

### **1. Les lymphocytes T régulateurs à l'origine des maladies à composantes immunologiques ?**

Les Treg, principales cellules à activité immunosuppressive de l'organisme, sont au centre des processus de régulation des maladies auto-immunes, allergiques ou encore des rejets de greffes allogéniques. Ces différentes pathologies sont la conséquence d'une absence ou d'une perte de tolérance vis à vis des antigènes du soi ou d'antigènes non pathogènes, pour laquelle les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle primordial.

#### **i. Treg et rejet de greffe.**

Dans les années 90, une équipe a démontré que le transfert adoptif de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> chez des rats ayant subi une greffe cardiaque permet d'éviter le rejet du greffon et la mise en place d'une tolérance au long terme. Cependant l'effet propre des Treg peut être discuté dans cette étude puisque les rats étaient également traités par la cyclosporine, un puissant immunosuppresseur (B. M. Hall et al. 1990). Le réel engouement de l'utilisation des Treg dans la prévention du rejet de greffe d'organe, a débuté lorsque l'équipe de Sakagushi a démontré que le transfert de Treg issus de souris naïves a permis de prévenir le rejet d'une greffe cutanée effectuée sur des souris Nude reconstituées en Tconv (S. Sakaguchi et al. 1995). Depuis une série d'études précliniques a démontré l'importance des Treg dans l'induction de tolérance de greffe d'organe solide ou de greffe de cellules souches

hématopoïétiques (CSH). Ainsi dans un modèle de greffe de CSH *in vitro*, les Treg sont indispensables à l'induction de tolérance aux peptides allogéniques (P. A. Taylor, Noelle, et Blazar 2001) alors que dans les études *in vivo*, la déplétion de Treg du donneur accélère la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte aigue (« Graft Versus Host disease », GVH) (Anderson et al. 2004; Cohen et al. 2002; Hoffmann et al. 2002). De même, la déplétion de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> du donneur lors de DLI (Donnor Lymphocyte Infusion) favorise une réponse effectrice contre les cellules tumorales (« Graft versus leukemia », GVL) (Maury et al. 2010), alors qu'à l'inverse, l'administration de Treg issus du donneur lors de DLI post transplantation de CSH, prévient la survenue d'une GVH (Patricia A. Taylor, Lees, et Blazar 2002; D. Zhao et al. 2008) voire même, permet la disparition de signes cliniques de GVH chronique (Anderson et al. 2004; D. Zhao et al. 2008). Aussi, dans un modèle de greffe d'organe solide, le transfert adoptif de Treg a permis de supprimer le rejet de greffe d'ilots pancréatiques chez la souris (Sánchez-Fueyo et al. 2002; Davies et al. 1999; Hara et al. 2001). Ces résultats démontrent le rôle central des Treg dans la mise en place d'une tolérance.

Compte tenu des résultats probants obtenus dans les modèles de greffe de CSH, la facilité d'obtention de Treg des donneurs, combiné à un degré élevé de morbidité et de mortalité associée à la greffe de CSH chez les patients, il n'est pas étonnant que la prévention de GVH soit apparue comme la première application clinique de la thérapie cellulaire par Tregs chez l'homme.

## **ii. Treg et maladies auto-immunes.**

Les maladies auto-immunes peuvent être définies comme les manifestations immunologiques observées suite à la rupture des mécanismes de la tolérance et l'induction d'une réponse immunitaire contre les composants du soi. Alors que des prédispositions génétiques à l'autoimmunité ont été établies, des défauts de régulation peuvent être également à l'origine des ces réponses indésirables. L'exemple le plus parlant est le syndrome IPEX, caractérisé par l'absence de lymphocytes T régulateurs, suite à une mutation du gène FOXP3, et qui conduit à la survenue de multiples manifestations auto-immunes dont le DT1 et la thyroïdite sont les plus fréquentes (Barzaghi, Passerini, et Bacchetta 2012). Bien qu'il existe une résistance des Tconv à la suppression médiée par les Treg dans les maladies auto-immunes (L. S. K. Walker 2009), la question de l'existence d'un défaut quantitatif et/ou qualitatif de Treg à l'origine des maladies auto-immunes a depuis longtemps été abordée (Tableau 1).

**Tableau 1 : Données expérimentales et cliniques démontrant l'importance des Treg dans différentes maladies auto-immunes.**

Données Expérimentales				Données Cliniques	
Maladie	Observations	Déplétion de Treg	Induction de Treg	Observations	Thérapies inductrices de Treg
Diabète de type I	Corrélation entre diabète et $\downarrow$ expression de FOXP3 (Gregori et al. 2003)	<u>DTR</u> : $\nearrow$ infiltration lymphocytaire du pancréas (Feuerer et al. 2009)	<u>LD-IL-2</u> : $\nearrow$ Treg et guérison du diabète (Tang et al. 2008; Grinberg-Bleyer et al. 2010)	$\downarrow$ CD4+CD25+FOXP3+ chez enfants diabétiques (Ryba-Stanisławowska et al. 2014)	<u>Treg polyclonaux autologues</u> : $\downarrow$ consommation d'insuline (Marek-Trzankowska et al. 2012) ; Maintien du taux de peptide C (Bluestone et al. 2015)
	<u>Souris NOD</u> : $\downarrow$ Treg (A. J. Wu et al. 2002)		<u>IL-2/Anti-IL-2</u> : $\nearrow$ Treg (Onur Boyman et al. 2006)	$\downarrow$ GITR sur les Treg périphériques (Xufre et al. 2013)	
	<u>Souris scurfy</u> : $\nearrow$ Diabète (Z. Chen et al. 2005)		<u>IL-2/anti-IL-2 + rapamycine + antigène</u> : $\nearrow$ Treg et protection contre le diabète (Manirarora et Wei 2015)	$\nearrow$ Treg producteurs de cytokines pro-inflammatoires et $\nearrow$ IL-12 et IL-18 chez enfants diabétiques (Ryba-Stanisławowska et al. 2014)	<u>LD-IL-2</u> : $\nearrow$ dose dépendante des Treg chez patients diabétiques (Hartemann et al. 2013)
	CD4+ BDC2.5 TCR Tg * Rag-/- : induction mortelle d'un diabète (Feuerer et al. 2009)		<u>Transfert adoptif de Treg polyclonaux</u> : $\downarrow$ apparition du diabète chez NOD (A. J. Wu et al. 2002; Petzold et al. 2013)		
	$\downarrow$ CD25 et du $\downarrow$ Bcl2 (facteur de survie) sur Treg de souris diabétiques (Tang et al. 2008)		<u>Transfert adoptif de Treg spécifiques</u> (BDC2.5 TCR tg) : $\downarrow$ DT1 chez NOD malades (Petzold et al. 2013; Tarbell et al. 2007)		
PR	$\downarrow$ de la suppression des Treg exprimant le TNFR-II dans un modèle murin d'arthrite Transgénique pour TNF- $\alpha$ (Biton et al. 2011)	$\alpha$ -CD25 : $\downarrow$ délai d'apparition de la maladie (Hilde Kelchtermans et al. 2005; Frey et al. 2005)	<u>Transduction de CSM par le TGF-<math>\beta</math></u> : $\nearrow$ Treg et $\downarrow$ arthrite (Park et al. 2011)	$\downarrow$ Treg chez les patients atteints de PR (Lawson et al. 2006; Xiao et al. 2011)	<u>CSM</u> : $\nearrow$ FOXP3 et $\downarrow$ prolifération CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène (collagène) in vitro (Gonzalez-Rey et al. 2010)
			<u>Induction de DC tolérogéniques</u> : $\nearrow$ Treg et $\downarrow$ arthrite (Carranza et al. 2012)	$\downarrow$ de la suppression par les Treg de la production de cytokines pro-inflammatoires (Ehrenstein et al. 2004; Alvarado-Sánchez et al. 2006)	<u>LD-IL-2</u> : $\nearrow$ différenciation de Treg à partir de PBMC issus de patients atteints de PR (Kosmaczewska et al. 2015)
			<u>Transduction des CD4 par FOXP3 et BCL-x</u> : $\nearrow$ survie Treg et $\downarrow$ arthrite (Haque et al. 2010)		
			<u>Transduction des CD4 par FOXP3 et TCR antigène spécifique</u> : $\nearrow$ Treg Antigène-spécifiques et $\downarrow$ arthrite (Wright et al. 2009)		
LES	<u>Scurfy Mice</u> : $\nearrow$ AAN, $\nearrow$ dsDNA, (Hadaschik et al. 2015)	$\alpha$ -CD25 : $\downarrow$ délai d'apparition de la maladie (Humrich et al. 2010)	<u>Transfert adoptif de Treg</u> : $\downarrow$ l'activité lupique chez souris Nude reconstituées par CD4+ (S. Sakaguchi et al. 1995)	$\downarrow$ Treg (Crispin, Martínez, et Alcocer-Varela 2003; Bonelli et al. 2008; Lyssuk et al. 2007)	<u>CSH autologues</u> : $\nearrow$ Treg et $\downarrow$ activité de la maladie (L. Zhang et al. 2009; Burt et al. 2006)
	<u>Souris NZB*NZW et souris MRL/lpr</u> : $\downarrow$ Treg et développement spontané de lupus (H. Y. Wu et Staines 2004; C.-H. Yang et al. 2008)		<u>Transfert adoptif de Treg</u> : $\downarrow$ activité lupique chez souris NZB*NZW (Humrich et al. 2010; Scalapino et al. 2006)	$\downarrow$ suppression de la prolifération de CD4 et CD8 (Lyssuk et al. 2007; Alvarado-Sánchez et al. 2006; Valencia et al. 2007)	<u>LD-IL-2</u> : $\nearrow$ Treg et $\downarrow$ activité de la maladie (Humrich et al. 2015) (von Spee-Mayer et al. 2015) (He et al. 2016)
	$\downarrow$ progressive des Treg avec l'âge et l'activité de la maladie (Humrich et al. 2010)			Corrélation de la $\downarrow$ capacité suppressive des Treg avec l'activité clinique de la maladie (Bonelli et al. 2008)	
	$\downarrow$ IL-2 sérique chez les souris MRL/lpr (C.-H. Yang et al. 2008)			$\downarrow$ suppression de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Valencia et al. 2007)	
	$\downarrow$ de la suppression induite par Treg de la prolifération des Teff et de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ chez MRL/lpr (Parietti et al. 2008)			$\downarrow$ TGF- $\beta$ dans le sérum des patients (Manolova, Gerenova, et Ivanova 2013)	
				$\downarrow$ production d'IL-2 chez patients lupiques (Solomou et al. 2001)	
				$\downarrow$ expression CD25 chez patients lupiques (Bonelli et al. 2008)	
SEP	$\downarrow$ expression de FOXP3 (Noori-Zadeh, Mesbah-Namin, et Saboor-Yaraghi 2017)	$\alpha$ -CD25 : inhibition de la phase de rémission après induction EAE ; $\nearrow$ sévérité maladie (McGeachy, Stephens, et Anderton 2005; X. Zhang et al. 2004, 10)	<u>Transfert adoptif de Treg</u> : $\downarrow$ l'activité de l'EAE (Van de Keere et Tonegawa 1998; Olivares-Villagómez, Wang, et Lafaille 1998).	$\downarrow$ expression de FOXP3 (Astier et Hafler 2007)	<u>Acétate de Glatiramère</u> : $\nearrow$ expression Foxp3 ; $\nearrow$ Treg naifs.
	Hyperméthylation du promoteur de FOXP3 (Noori-Zadeh, Mesbah-Namin, et Saboor-Yaraghi 2017)		<u>Administration IDO</u> : $\nearrow$ Treg et $\downarrow$ signe clinique (Yan et al. 2010)	$\downarrow$ capacité suppressives des Treg (Noori-Zadeh et al. 2016; Viglietta et al. 2004; Mastorodemos, Ioannou, et Verginis 2015)	$\nearrow$ capacité suppressive des Treg (Hong et al. 2005; Juergen Haas et al. 2009)
			<u>Administration IL-10</u> : $\downarrow$ signe clinique par $\nearrow$ Tr1 (Kwilas et al. 2015)	$\downarrow$ production IL-10 et $\downarrow$ Tr1 (Astier et Hafler 2007)	<u>IFN-<math>\beta</math></u> : restauration de la capacité suppressive des Treg (de Andrés et al. 2007)
Gougerot Sjögren			CSM : $\nearrow$ Treg et $\downarrow$ signe clinique (Xu et al. 2012)	$\downarrow$ Treg (M.-F. Liu et al. 2008; X. Li et al. 2007)	CSM allogéniques : $\downarrow$ activité de la maladie et $\downarrow$ anti-SSA (Xu et al. 2012)
				Corrélation inverse entre le nombre de Treg et l'inflammation glandulaire et les marqueurs d'inflammation systémique (Christodoulou et al. 2008; Furuzawa-Carballeda et al. 2013)	
Autres pathologies auto-immunes			<b>Maladie de Behcet</b>	<b>Vascularite à ANCA</b>	<b>Vascularite</b>
			<u>Transfert adoptif de Treg</u> : $\downarrow$ l'activité de la maladie de Behcet et $\downarrow$ IL-6 et IL-17 sériques (Shim et al. 2011)	$\downarrow$ Treg (Marinaki et al. 2005; Chavele et al. 2010; Boyer et al. 2004)	<u>LDIL-2</u> : $\nearrow$ Treg et $\downarrow$ activité de la maladie (Saadoun et al. 2011)
			<b>Myosite</b>	$\downarrow$ capacité suppressive des Treg chez patients ANCA+ (Free et al. 2013)	
			<u>Transfert adoptif de Treg polyclonaux</u> : $\downarrow$ score histologique (Allenbach et al. 2009)	<b>Maladie de Behcet</b>	<b>Maladie de Behcet</b>
				$\downarrow$ Treg périphériques (Nanke et al. 2008)	<u>Infliximab</u> : $\nearrow$ Treg et $\downarrow$ activité de la maladie (Sugita et al. 2011)
				<b>Myosite</b>	
				$\downarrow$ Treg périphériques (Allenbach et al. 2014)	

NOD : Non obese diabetic mice ; TCR : Récepteur de cellule T ; Tg : Transgénique ; AAN : Anticorps anti-nucléaires ; NZB : New Zeland Black mice ; NZW : New Zeland White mice ; Teff : Lymphocytes T effecteurs activés ; EAE : encéphalomyélite expérimentale autoimmune ; IFI : Immunofluorescence indirecte ; LD-IL-2 : IL-2 administrée à faible dose ; CSM : Cellules souches mésenchymateuses ; PR : Polyarthrite rhumatoïde ; LES : lupus érythémateux systémique ; SEP : Sclérose en plaque ; ANCA : Auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles ; CSH : cellules souches hématopoïétiques.

Ainsi, le rôle de Treg dans l'établissement et la progression du diabète de type I, maladie liée à la destruction des îlots- $\beta$  du pancréas par perte de contrôle de Tconv spécifiques auto-réactifs, a été étudié en détail notamment grâce aux expériences réalisées sur les souris Non Obese Diabetic (NOD) développant spontanément un DT1. En effet, la première preuve de l'implication des Treg dans la genèse de la physiopathologie de DT1 provient du fait que la susceptibilité au diabète chez ces souris corrèle avec la perte de l'expression de FOXP3 sur les Treg (Gregori et al. 2003), même si cela a été remis en cause dans une autre publication (Mellanby et al. 2007). De même, dans un modèle de souris manipulées génétiquement de sorte à éliminer les Treg, la destruction des îlots  $\beta$  du pancréas est accélérée par rapport aux souris contrôles (Z. Chen et al. 2005). Depuis, différentes équipes ont démontré qu'un transfert adoptif de Treg polyclonaux ou spécifiques de l'antigène isolés à partir de souris NOD, permet de prévenir le développement du DT1, démontrant que les Treg jouent un rôle central dans la physiopathologie du diabète (Tang et al. 2004; Tarbell et al. 2007; Szanya et al. 2002). L'importance des Treg dans la physiopathologie du diabète a également été étudiée chez l'Homme. De façon intéressante, 80% des patients atteints par le Syndrome IPEX développent un DT1 (Shimon Sakaguchi et al. 2006). De plus, une étude rapporte un défaut quantitatif en Treg chez les patients diabétiques (Kukreja et al. 2002) alors que d'autres études, montrent quant à elles, non pas un défaut dans l'effectif mais dans la fonction suppressive de ces cellules, avec notamment un défaut de la voie de signalisation de l'IL-2 chez les patients diabétiques (Lindley et al. 2005; Brusko et al. 2005; Long et al. 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que les Treg pourraient constituer un outil thérapeutique intéressant afin de traiter les patients avec des lésions pré-diabétiques.

L'importance des lymphocytes T régulateurs a également été mise en évidence dans d'autres maladies auto-immunes (Tableau 1), notamment le lupus érythémateux systémique (LES). En effet, en 1995, l'équipe de Sakagushi a montré que la reconstitution cellulaire de souris Nude par une suspension de lymphocytes T déplétée en Treg entraîne l'apparition d'une multitude de maladies auto-immunes, dont l'apparition d'anticorps anti-ADNn, un des marqueurs du LES (S. Sakaguchi et al. 1995). De façon intéressante, le transfert adoptif de

Treg peu de temps après la reconstitution prévient le développement de ces manifestations auto-immunes (S. Sakaguchi et al. 1995). Dans une autre étude, ces Treg deviennent inefficaces sur des lésions de glomérulonéphrite induite par le lupus, démontrant que l'administration curative de Treg n'est pas efficace lorsque les lésions sont déjà établies (Bagavant et Tung 2005). Bien que cela soit toujours débattu, différentes équipes ont montré qu'il existait une diminution des Treg circulants chez ces patients (Miyara et al. 2005; M.-F. Liu et al. 2004) corrélant avec l'activité clinique de la maladie. De même, un défaut d'activité de ces Treg a été documenté par plusieurs équipes (Alvarado-Sánchez et al. 2006; Bonelli et al. 2008; Lyssuk et al. 2007; Valencia et al. 2007). Aussi, la culture, l'expansion et l'activation *in vitro* des Treg issus de patients atteints de LES a permis de corriger leur défaut fonctionnel et de recouvrer des capacités suppressives de la prolifération des Tconv proche de celles de Treg issus de patients sains (Valencia et al. 2007), suggérant les bénéfices potentiels de cette stratégie dans le traitement des patients atteints de lupus réfractaires aux thérapeutiques conventionnelles.

Les résultats des études démontrant le rôle des Treg dans le contrôle des manifestations cliniques de sclérose en plaque (SEP) sont plus discutés. En effet, le transfert adoptif de Treg est efficace pour prévenir les manifestations cliniques de l'EAE, modèle d'étude de la SEP, uniquement s'ils sont administrés avant l'induction de la maladie. Si les Treg sont administrés plus tardivement, notamment après le déclenchement de la maladie, l'effet thérapeutique est nul, qu'il s'agisse de Treg polyclonaux ou spécifiques de l'antigène (Van de Keere et Tonegawa 1998; Olivares-Villagómez, Wang, et Lafaille 1998). Néanmoins, le compartiment Treg a été étudié chez l'Homme. Il a été montré récemment que les Treg avaient des capacités proliférative diminuées chez les patients atteints de SEP (Mastorodemos, Ioannou, et Verginis 2015). De même, plusieurs auteurs ont démontré que les Treg isolés de patients atteints de SEP avaient des capacités suppressives altérées (Huan et al. 2005; Jürgen Haas et al. 2005) alors qu'ils sont capables d'induire la régénération de la gaine de myéline, en promouvant la différenciation des oligodendrocytes (Dombrowski et al. 2017).

Dans un modèle d'arthrite inflammatoire auto-immune (Collagen-Induced Arthritis, CIA) mimant la polyarthrite rhumatoïde après administration de collagène formulé en adjuvant complet de Freund chez les animaux, les études ont révélé clairement l'implication des Treg dans le contrôle de la maladie. L'administration d'un anticorps éliminant spécifiquement les Treg (anticorps dirigé contre le CD25) juste après l'immunisation des

souris a significativement raccourci le délai d'apparition de la maladie et provoqué des signes cliniques plus sévères (Hilde Kelchtermans et al. 2005; Frey et al. 2005). L'implication des Treg dans la régulation des manifestations inflammatoires de la CIA a été confirmée peu de temps après par des études étudiant le potentiel thérapeutique des Treg dans ce modèle. Le transfert adoptif de Treg issus de souris naïves administrées par voie intraveineuse à des souris chez qui l'arthrite a été induite permet de ralentir la progression de la maladie de façon significative (Morgan et al. 2005; H. Kelchtermans et al. 2009; Frey et al. 2005). Ceci a été associé à un recrutement local de ces Treg au niveau des articulations (Morgan et al. 2005), à une diminution de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) et à une inhibition de l'activité ostéoclastique (H. Kelchtermans et al. 2009). Les résultats obtenus chez l'Homme sont plus controversés notamment en ce qui concerne la fréquence de Treg périphériques. En effet certaines études ont démontré une augmentation de la fréquence des Treg périphériques chez les patients malades (van Amelsfort et al. 2004), alors que d'autres études ont démontré l'existence d'un défaut de Treg comparé à des individus sains (Lawson et al. 2006; Xiao et al. 2011). Néanmoins, plusieurs études ont démontré l'existence d'anomalies qualitatives des Treg, résultant en une perte de leur activité suppressive (Ehrenstein et al. 2004).

Depuis la mise en évidence de l'existence d'un défaut de régulation à l'origine d'une multitude de maladies auto-immunes différentes (Noack et Miossec 2014; M.-F. Liu et al. 2008) (Tableau 1) dont le DT1, le LES et la SEP ont été les plus étudiées, des équipes de recherche se sont intéressées quant à elles, à étudier le compartiment Treg, non plus dans les maladies auto-immunes mais dans les maladies allergiques.

### **iii. Treg et allergies.**

Les allergies, constituent un ensemble de pathologies caractérisées par une réponse immunitaire exessive contre un antigène non pathogène. La physiopathologie de l'allergie sera abordée plus en détail dans la troisième partie de cette thèse. Néanmoins, elle se caractérise par une hyperpolarisation de la réponse cellulaire T vers une réponse de type Th2, associée à une dysrégulation des réponses immunitaires. Aujourd'hui, ce défaut de régulation peut s'expliquer en partie par l'absence de réponses immunitaires Th1, objectivée par la diminution d'expression de l'IFN- $\gamma$  (Teixeira et al. 2005), expliquant l'établissement de ces maladies. Cependant, de plus en plus de preuves s'accumulent aujourd'hui démontrant l'existence d'un défaut de régulation médiée par les Treg expliquant l'hyperpolarisation Th2



observée dans l'allergie (Palomares 2013). Le tableau 2 résume l'ensemble des données de la littérature plaçant les Treg au centre de la physiopathologie de l'allergie.

Les premières preuves de l'implication des Treg dans la régulation des manifestations allergiques ont été d'abord établies chez l'Homme. Notamment, l'allergie est l'une des manifestations cliniques retrouvée chez les patients atteints du syndrome IPEX, caractérisé par l'absence de Treg (Torgerson et al. 2007). Ensuite, des défauts qualitatifs et quantitatifs de Treg ont également été rapportés chez les patients allergiques ou atopiques. En comparant les cellules mononuclées du sang de cordon issues de mères atopiques (asthme, rhinite allergique, eczéma) à celles issues du sang de cordon de mères non atopiques, Schaub *et al*, ont démontré l'existence d'une diminution significative du nombre relatif de Treg  $CD4^+CD25^{hi}$ , associée à une diminution de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10 mesurée par ELISA après restimulation non spécifique, ainsi qu'une diminution de l'expression de GITR, de LAG-3 et de CTLA-4 sur ces cellules. De plus, la capacité suppressive des Treg sur la prolifération de Tconv après restimulation par un mitogène est significativement diminuée dans le sang de cordon de mères atopiques (Schaub et al. 2008). Ainsi, il existe une altération du compartiment Treg chez les enfants à haut risque d'allergie (basé sur les prédispositions familiales notamment l'atopie maternelle) comparativement aux enfants à faible risque (Schaub et al. 2008).

De même, l'importance des Treg s'illustre par ailleurs dans leur rôle pour la mise en place de la tolérance aux allergènes alimentaires et dans la résolution spontanée des allergies au lait de l'enfant (Karlsson, Rugtveit, et Brandtzaeg 2004; Sletten et al. 2007). En effet, les enfants dont l'allergie au lait de vache s'est estompée après une période d'éviction de 2 mois ont une fréquence de Treg circulants plus élevée comparée aux enfants dont l'allergie a persisté. De même la réponse proliférative *in vitro* des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) après stimulation par le  $\beta$ -lactoglobuline est diminuée chez ces enfants (Karlsson, Rugtveit, et Brandtzaeg 2004). La déplétion des  $CD4^+CD25^+$  des PBMC issus de ces enfants tolérants a conduit à une augmentation drastique de la prolifération induite par la  $\beta$ -lactoglobuline démontrant l'implication des Treg dans le contrôle des réponses à l'antigène (Karlsson, Rugtveit, et Brandtzaeg 2004). Les observations de Qamar *et al*, ont confirmé ces données en étudiant le compartiment Treg chez des enfants initialement allergiques à l'œuf ou à la cacahuète (Qamar et al. 2015). De plus cette étude apporte des précisions quant à la population des Treg impliquée dans la résolution des symptômes. Notamment les auteurs ont démontré chez les enfants tolérants, une augmentation de la fréquence de Treg exprimant l'IL-10 après stimulation par l'allergène uniquement et non par une protéine irrelevante. Ceci

ne s'est pas accompagné d'une augmentation du compartiment de cellule effectrice (Qamar et al. 2015). Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse de l'implication des Tr1 dans ces phénomènes de tolérance. Cette même équipe a étudié le homing des Treg permettant de fournir une preuve supplémentaire de l'implication des Treg dans la dérégulation des réponses immunitaires observée lors de l'allergie. Notamment, le CCR6, récepteur de chimiokine CCL20 impliquée dans le « homing » intestinal des Treg, est exprimé dans une moindre mesure sur les Treg de patients allergiques comparé aux patients non allergiques (Prince et al. 2017) pouvant expliquer le défaut de tolérance observé chez ces patients.

Ensuite, l'analyse des Treg lors de protocole de désensibilisation permet d'établir également des arguments forts démontrant l'implication des Treg dans le contrôle des allergies. Dans le cadre des protocoles d'immunothérapie spécifique, une induction et une activation des Treg en lien avec l'efficacité thérapeutique a été observée, confirmant leur rôle dans le contrôle de l'allergie (Fujita et al. 2012; Smarr, Bryce, et Miller 2013; Syed et al. 2014).

En plus de confirmer l'implication des Treg dans la régulation des allergies, les modèles animaux ont permis de démontrer leur potentiel thérapeutique dans l'allergie. En effet, dans un modèle d'asthme allergique, l'élimination des Treg exacerbe les réponses cliniques de l'asthme, tandis que la résolution spontanée des symptômes est conditionnée par un afflux de Treg au niveau des poumons et des ganglions drainants (Leech et al. 2007). De même, le transfert adoptif de Treg avant la sensibilisation permet de supprimer l'inflammation pulmonaire et l'hyperactivité bronchique, via un mécanisme dépendant de l'IL-10, impliquant probablement les Tr1 (Kearley et al. 2005). Aussi, l'administration curative des Treg administrés une fois la maladie établie, s'est révélée également efficace dans le contrôle de l'asthme allergique (Kearley, Robinson, et Lloyd 2008), démontrant l'efficacité préventive et curative de l'administration de Treg. Concernant l'allergie alimentaire, l'élimination des Treg entraîne une exacerbation des signes cliniques de l'allergie, démontrant leur rôle indispensable dans la régulation de ces manifestations (Yamashita et al. 2012; Kanjarawi et al. 2011). De même, l'administration de Treg à des souris allergiques à l'ovalbumine s'est montrée très efficace quant à la prévention des signes cliniques de l'allergie alimentaire constituant la première démonstration de l'utilisation des Treg comme outil thérapeutique dans l'allergie alimentaire (Yamashita et al. 2012).

Pour conclure, ces études ont conduit à trois observations majeures plaçant les Treg au centre des mécanismes de contrôle des réactions auto-immunes, allergiques ou de rejets allogéniques: une altération génétique de la fonction Treg entraîne l'émergence d'une multitude de manifestation cliniques auto-immunes ou allergiques ; de même une déplétion conditionnelle de Treg exacerbe les réponses auto-immunes, allogéniques et allergiques; enfin, un déficit qualitatif et quantitatif de Treg a été observé dans l'ensemble de ces 3 entités, y compris chez l'Homme au cours d'études cliniques. De plus, quasi aucunes données n'existent quant à l'utilisation thérapeutique des Treg chez l'Homme dans le cadre de l'allergie (Tableau 2). Ainsi l'amplification de cette population cellulaire dans le but de prévenir et de traiter ces maladies, notamment les allergies, objet de cette thèse, constitue un réel engouement et devient un axe de recherche prioritaire.

**Tableau 2 : Données expérimentales et cliniques démontrant l'importance des Treg dans différentes maladies allergiques.**

	Allergies alimentaires	Allergies Respiratoires	Autres Allergies
Données expérimentales	<p><b>Observations</b></p> <p>Souris DEREK : Toxine Diphtérique induit ↓Treg et rupture de la tolérance orale (Hadis et al. 2011)</p> <p>Souris <i>IL4-raF709</i> : Gain de fonction de l'IL-4 ; ↓ Treg spécifiques de l'allergène et ↑ sensibilisation orale (Noval Rivas et al. 2015)</p> <p>Souris <i>Tgfb1</i> -/- : Exacerbation allergie alimentaire (Noval Rivas et Chatila 2016)</p>	<p>Souris Scurfy : inflammation allergique des voies aériennes, ↑ IgE sérique (Lin et al. 2005)</p> <p>Exposition répétée à des aérosols d'OVA : induction de tolérance et ↓ réponse IgE (Holt, Batty, et Turner 1981)</p> <p>Exposition répétée à l'allergène : ↑ Treg et sécrétion d'IL-10 (Ostroukhova et al. 2004; Akbari et al. 2002)</p> <p>Souris MMP-7 -/- : ↑ activité de RALDH, ↑ pTreg et ↓ réponse allergique (Goswami et al. 2009)</p> <p>CCR4 -/- : ↓ Treg dans le poumon et exacerbation asthme (Sather et al. 2007)</p> <p>Souris TGF-b +/- : Exacerbation de l'allergie respiratoire (Scherf, Burdach, et Hansen 2005)</p>	Souris Scurfy : Dermatite atopique (Lin et al. 2005)
	<p><b>Déplétion de Treg</b></p> <p>α-CD25 : ↓ Treg et exacerbation allergie à la cacahuète (van Wijk et al. 2007)</p> <p>α-CD25 : ↓ Treg et exacerbation de l'allergie à la bêta-lactoglobuline (Kanjrawi et al. 2011)</p> <p>Souris CNS1 -/- : ↓ différenciation pTreg et induction allergie (Josefowicz et al. 2012)</p> <p>Délétion conditionnelle de l'IL-10 sur les Treg : induction d'une colite (Rubtsov et al. 2008)</p>	<p>Souris CNS1 -/- : ↓ différenciation pTreg, ↑ Th2 et induction asthme (Josefowicz et al. 2012)</p> <p>α-CD25 : ↓ Treg et exacerbation de l'asthme (Lewkowich et al. 2005) (Leech et al. 2007)</p> <p>α-CD25 : ↑ DC inflammatoires pulmonaires avec ↑ des marqueurs d'activation (HLA-DR, CD80/86) ; ↑ réponse Th2 (Lewkowich et al. 2005)</p> <p>Délétion conditionnelle de l'IL-10 sur les Treg : Exacerbation de l'asthme après exposition à l'allergène (Rubtsov et al. 2008)</p>	
	<p><b>Induction de Treg</b></p> <p>Transfert adoptif de Treg issus de souris tolérées à l'OVA : ↓ signes cliniques (Yamashita et al. 2012)</p> <p>L.Lactis IL-10+ : ↓ IgE et ↓ signes cliniques (Frossard, Steidler, et Eigenmann 2007)</p>	<p>Transfert adoptif de Treg : Prévention de l'inflammation allergique des voies aériennes et ↑ IL-10 (Kearley et al. 2005) (Leech et al. 2007)</p> <p>Transfert adoptif de Treg : contrôle les symptômes d'un asthme établi (Kearley, Robinson, et Lloyd 2008) (Akbari et al. 2002)</p> <p>Administration de TGF-b : suppression de l'allergie respiratoire (Joetham et al. 2007), ↑ Treg (W. Chen et al. 2003)</p> <p>i.n. L.Lactis IL10+ : ↓ allergie (Marinho et al. 2010)</p> <p>ITS : ↑ Treg, ↑ TR1 et amélioration de l'hypersensibilité et de l'inflammation pulmonaire (Bohm et al. 2015)</p>	
Données cliniques	<p><b>Observations</b></p> <p>Syndrome IPEX : allergie alimentaire sévère (Torgerson et al. 2007)</p> <p>↑ % Treg et résolution spontanée des allergies au lait (Karlsson, Rugtveit, et Brandtzaeg 2004; Sletten et al. 2007)</p> <p>↓ expression CCR6 sur Treg de patients allergiques (Prince et al. 2017)</p>	<p>Syndrome IPEX : Asthme sévère (T. A. Chatila et al. 2000)</p> <p>Déficit en IL-2Rα : ↓ production IL-10 et exacerbation asthme (Caudy et al. 2007)</p> <p>↓ Treg périphériques et ↓ sécrétion IL-10 chez asthmatiques (Mamessier et al. 2008)</p> <p>↓ Treg dans les LBA chez asthmatiques (Hartl et al. 2007)</p> <p>↓ expression de FOXP3 sur les CD4+CD25+ (Provoost et al. 2009)</p> <p>↓ production d'IL-10 et ↑ production d'IL-4 par LT CD4+ chez patients allergiques (M. Akdis et al. 2004)</p>	<p>Syndrome IPEX : Dermatite atopique, éosinophilie (Verbsky et Chatila 2013)</p> <p>↓ % Treg CD4+CD25+ dans le sang de cordon de mère atopique (Schaub et al. 2008)</p> <p>Treg issus de patients atopiques : ↓ capacité suppressive (Ling et al. 2004)</p>
	<p><b>Thérapie inductrice de Treg</b></p> <p>↑ Tr1 chez enfants devenus spontanément tolérants à l'œuf ou à la cacahuète (Qamar et al. 2015)</p> <p>ITS cacahuète : ↑ pTreg et induction d'une tolérance à l'allergène (Syed et al. 2014)</p>	<p>ITS : ↑Treg sanguins apres SLIT chez enfants souffrants d'allergies respiratoires avec manifestations digestives et cutanées (Stelmaszczyk-Emmel et al. 2015)</p>	<p>↑Treg après un protocole d'ITS ultra rush dans le cadre d'allergie aux venins d'hyménoptères (Mamessier et al. 2006)</p>

## **2. Les Treg comme outil thérapeutique : preuve de principe et réalité thérapeutique.**

Fort des connaissances du rôle central des Treg dans la physiopathologie des maladies auto-immunes, allergiques, et du rejet allogénique, de nouvelles thérapies ciblant cette population ont vu le jour. La thérapie cellulaire par Treg constitue le fer de lance des nouvelles biothérapies immuno-régulatrices. Comme abordé précédemment, la preuve de concept a pu être apportée dans différents modèles expérimentaux chez l'animal (Kearley, Robinson, et Lloyd 2008; Kearley et al. 2005; Yamashita et al. 2012) mais ces stratégies restent confrontées aux problèmes de faisabilité en clinique humaine. Dans cette partie, nous étudierons les différents exemples de thérapie cellulaire utilisant les Treg chez l'Homme, avant d'aborder les potentielles limites d'une telle stratégie.

### **i. Les différents exemples de thérapies cellulaires utilisant les Treg comme outil thérapeutique.**

Jusqu'à récemment, les différentes approches de thérapie cellulaire par Treg reposaient sur l'expansion et la stimulation *in vitro* de Treg polyclonaux avant leur ré-administration au patient. Dans un souci d'améliorer les résultats obtenus avec les Treg polyclonaux et de limiter le risque d'immunosuppression non spécifique, des équipes travaillent actuellement sur le développement de nouvelles stratégies, utilisant des Treg spécifiques de l'antigène.

#### **a. Utilisation de Treg polyclonaux.**

Plusieurs équipes ont tenté l'expérience avec succès dans différentes indications. Le tableau 3 résume les différents essais cliniques en cours ou terminés utilisant des Treg polyclonaux. Ainsi en 2009, Trzonkowski *et al.* ont été les premiers à tester cette stratégie dans le traitement de la GVH aigüe ou chronique. Ainsi un premier patient atteint d'un syndrome myélodysplasique a pu bénéficier de l'administration de Treg allogéniques 35 mois après une greffe de CSH en raison d'une GVH pulmonaire chronique. Ceci s'est traduit par une amélioration de la fonction pulmonaire avec une diminution de la consommation de corticoïdes constituant la première preuve de la réussite d'une thérapie cellulaire par Treg chez l'Homme (Trzonkowski et al. 2009). Malheureusement, cette stratégie s'est révélée inefficace chez une autre patiente atteinte d'une GVH hépatique aigüe (Trzonkowski et al.

2009). Cependant, la faisabilité et l'efficacité d'une telle approche ont été confirmées par deux autres équipes, non plus dans le traitement de la GHV mais dans sa prévention après greffe de CSH allogénique. En effet, l'équipe de Martelli a réalisé chez 28 patients atteints d'hémopathies malignes une administration de Treg autologues juste avant la greffe de CSH. Ainsi le transfert adoptif de Treg a diminué l'incidence d'une GVH chez 26 patients sans induire d'immunosuppression post-transplantation, a favorisé la reconstitution immunitaire et n'a pas altéré l'effet de GVL (Di Ianni et al. 2011). L'équipe de Wagner *et al.* a, quant à elle, étudié l'effet de l'administration de Treg juste après la greffe de CSH provenant de sang de cordon chez 23 patients atteints d'hémopathies. Ceci s'est traduit par une diminution de l'incidence de GVH de grade II à IV de 20% comparée aux 108 patients contrôles (Brunstein et al. 2011). Ainsi, ces résultats confirment les données de l'équipe de Trzonkowski. Fort de son expérience dans le domaine de la thérapie cellulaire, Trzonkowski a par la suite conduit une étude dans le cadre du DT1 incluant 10 enfants diabétiques sous insulinothérapie. Il a démontré que les Treg autologues cultivés et amplifiés *in vitro* ont permis de diminuer les besoins en insuline chez 80% des patients (Marek-Trzonkowska et al. 2012). L'équipe de Bluestone a également tenté l'expérience dans un essai clinique de phase I, en testant différentes doses de Treg polyclonaux pour traiter 14 adultes atteints de DT1. Bien qu'il ne s'agissait pas d'étudier l'efficacité d'une telle stratégie, cet essai clinique a été le premier à démontrer que l'administration de Treg n'a pas engendré d'effets secondaires majeurs. Aussi cette étude a permis de démontrer que l'expansion *ex-vivo* de Treg polyclonaux permet d'obtenir des Treg capables de survivre plus de 12 mois une fois administrés *in vivo*, protégeant ainsi de la perte de fonction des îlots  $\beta$  pancréatiques (Bluestone et al. 2015) (Tang et Bluestone 2013).

**Tableau 3** : Essais cliniques de thérapie cellulaire utilisant les Treg. Adapté de Bluestone *et al* (Bluestone, Trotta, et Xu 2015).

Pathologie	Schéma thérapeutique	Produit de thérapie cellulaire	Effectif	Dose	Effet	Institution	Références
<b>GVHD</b>	Curatif	Expansion <i>ex vivo</i> de Treg polyclonaux allogéniques	2 (adultes)	0.1-3 x 10 <sup>6</sup> /Kg	Efficacité sur la GVH pulmonaire / Pas d'effet sur la GVH hépatique	Medical University of Gdansk	(Trzonkowski et al. 2009)
<b>GVHD</b>	Préventif	Expansion <i>ex vivo</i> de Treg polyclonaux allogéniques	23 (adultes)	0.1-6 x 10 <sup>6</sup> /Kg	Diminution de 20 % de l'incidence de la GVH (grade II à IV)	Masonic Cancer Center, University of Minnesota, USA	(Brunstein et al. 2011)
<b>GVHD</b>	Préventif	Treg polyclonaux allogéniques	28 (adultes)	2-4 x 10 <sup>6</sup> /Kg	Efficacité chez 92% des patients sans altérer la GVL ni d'induire d'immunosuppression	University of Perugia, Italy	(Di Ianni et al. 2011)
<b>GVHD</b>	Préventif	Treg polyclonaux	9 (adultes)	5 x 10 <sup>6</sup> / Kg (>50% FOXP3+)	Aucun patient n'a développé de GVHD, pas de rechute de la maladie	Hôpital universitaire de Regensburg	Edinger <i>et al.</i> Données non publiées
<b>Diabète de type I</b>	Curatif	Expansion <i>ex vivo</i> de Treg polyclonaux autologues	12 (enfants)	10-30 x 10 <sup>6</sup> /Kg (1 ou 2 administrations)	Diminution de la consommation d'insuline chez 80% des patients	Medical University of Gdansk	(Marek-Trzonkowska et al. 2012)
<b>Diabète de type I</b>	Curatif	Expansion <i>ex vivo</i> de Treg polyclonaux autologues	14 (adultes)	5 x 10 <sup>6</sup> - 2.6 x 10 <sup>9</sup>	Survie de 12 mois des Treg administrés, Maintien du taux de peptide C sur une période de 2 ans après administration	University of California, San Francisco, USA	(Bluestone et al. 2015)
<b>Maladie de Crohn</b>	Curatif	Treg autologues cultivés in vitro en présence de l'antigène OVA	20 (adultes)	1 x 10 <sup>6</sup> , 1 x 10 <sup>7</sup> , 1 x 10 <sup>8</sup> , et 1 x 10 <sup>9</sup>	Diminution de l'index d'activité de la maladie CDAI chez 40% des patients à la semaine 5 et 8. Diminution de la CRP, et de la Calprotectine.	CHU de Lille, France	(Desreumaux et al. 2012)
<b>Uvéite</b>	Curatif	Expansion et activation in vitro de Treg polyclonaux	18 (adultes)	0.4, 1.2 et 3.6 x 10 <sup>6</sup>	En cours	APHP, Paris, France	NCT02494492
<b>Transplantation hépatique</b>	Curatif	Treg allogéniques du donneur	24 (adultes)	50 x 10 <sup>6</sup> , 200 x 10 <sup>6</sup> , 800 x 10 <sup>6</sup>	En cours	Mayo Clinic, Minnesota, USA University of California, San Francisco, USA	NCT02188719

## **b. Utilisation de Treg spécifiques d'antigène.**

Il a été démontré que les Treg spécifiques d'un antigène exprimé au niveau du tissu cible sont plus efficaces que les Treg polyclonaux. En effet, dans des modèles de transfert adoptif de Treg dans certaines maladies auto-immunes ou allergiques, les Treg spécifiques de l'antigène, à l'inverse des Treg polyclonaux, permettent de reverser les signes cliniques déjà établis, alors qu'ils sont administrés à une dose 2 fois inférieure par rapport aux Treg polyclonaux. Cela démontre que les Treg spécifiques de l'antigène sont plus efficaces dans le contrôle de ces maladies (Tang et al. 2004). D'autres études ont montré que l'utilisation de Treg spécifiques de l'antigène augmentait l'efficacité de la thérapie cellulaire d'un facteur 20 à 100 (Tang et al. 2004; Masteller et al. 2005), diminuant considérablement le nombre de Treg nécessaires à injecter dans le cadre de protocole de thérapie cellulaire. En effet, les Treg spécifiques sont capables de supprimer les réponses effectrices même lorsqu'ils sont présents en très faible proportion, contrairement aux Treg polyclonaux (M. Nomura et al. 2006; Bruce M. Hall et al. 2008). Ainsi, plusieurs approches utilisant des Treg spécifiques de l'antigène ont été développées.

Ainsi, différents groupes ont tenté l'expérience avec succès. Dans les études animales, les Treg spécifiques de l'OVA sont capables de migrer au niveau des sites inflammatoires (Foussat et al. 2003), où une fois activés par les DC après administration d'OVA, ils sont capables d'exercer leur propriétés régulatrices (H. Groux et al. 1997) et notamment de contrôler les manifestations inflammatoires de la colite (Foussat et al. 2003). Dans ce contexte, Desreumaux *et al.* ont choisi d'administrer des Treg spécifiques de l'OVA dans le but de traiter des patients atteints de la maladie de Crohn réfractaire aux traitements conventionnels. La stratégie adoptée consistait à induire et amplifier *in vitro* des Treg spécifiques de l'OVA puis d'apporter un régime riche en OVA aux patients après administration des Tregs afin de maintenir un état d'activation des Treg et d'assurer leur migration au niveau intestinale. Cette stratégie a été bien tolérée et a permis de diminuer l'index d'activité de la maladie de Crohn chez 40% des patients, par effet bystander (Desreumaux et al. 2012), .

De la même façon, Tang *et al.* ont développé une procédure permettant d'amplifier *in vitro* les Treg du donneur dans le cadre d'une greffe d'organe, en présence des molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) du donneur afin de réguler spécifiquement les réponses T allogéniques dirigées contre le greffon. Cette stratégie est actuellement en cours d'étude dans



un essai clinique concernant le greffe hépatique et prévoit d'inclure 24 patients (NCT02188719).

Cependant, l'obtention de Treg de grade clinique spécifiques d'un antigène d'une part, mais également en nombre suffisant d'autre part, reste des challenges techniques difficiles à surmonter. Des approches alternatives ont donc été développées afin de générer, par génie génétique, des Treg spécifiques d'une cible antigénique. En effet, certains auteurs, ont su tirer profit des avantages des techniques d'immunostimulation utilisant des cellules T exprimant un récepteur chimérique de l'antigène (CAR-T pour Chimeric Antigen Receptor T cells) afin de développer des Treg exprimant un TCR chimérique spécifique d'une cible antigénique donnée. Ainsi, la co-expression de FOXP3 et d'un CAR ciblant un peptide particulier permet de produire un nombre important de cellules suppressives de spécificité contrôlée. Cette stratégie permet d'entraîner une recirculation puis une accumulation préférentielle des Treg vers les sites exprimant la cible antigénique. Deux études précliniques ont été publiées avec des résultats très prometteurs, l'une concernant l'EAE (Fransson et al. 2012) et l'autre utilisant un modèle de colite inflammatoire (Blat et al. 2014). Une autre alternative à l'utilisation des Treg spécifiques d'un antigène est l'utilisation de Treg pré-activés *in vitro*. En effet, les auto-antigènes impliqués dans les maladies auto-immunes restent encore mal connus et sont souvent multiples, limitant l'utilisation de Treg spécifiques de l'antigène. L'équipe de Salomon a ainsi, mis au point une nouvelle stratégie alternative consistant à administrer, directement au site inflammatoire, des Treg pré-activés *in vitro* par culture cellulaire avec des DC spléniques en présence d'un milieu de culture supplémenté en anti-CD3, anti-CD28, GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et IL-2. L'utilisation de ces Treg polyclonaux préalablement activés *in vitro* a été évaluée dans un modèle d'uvéite autoimmune chez la souris et a permis de supprimer les manifestations cliniques par effet bystander (Grégoire et al. 2016). Dans la lignée de ces bons résultats obtenus, l'équipe de Salomon a testé cette stratégie chez des patients atteints d'uvéite. L'essai clinique, actuellement en cours, enregistré sous le n° NCT02494492, a prévu d'inclure 12 patients.

Ainsi la thérapie cellulaire par Treg, utilisant des Treg polyclonaux ou spécifiques de l'antigène, constitue une réelle avancée dans le traitement de maladies réfractaires aux thérapeutiques de référence. Bien que pour le moment, nous ne possédions que peu de recul concernant l'utilisation des Treg en thérapie, aucune étude à l'heure actuelle n'a rapporté de risque augmenté de cancer ou d'infection après administration de Treg. De même, des études récentes ont démontré que l'administration de Treg dans le cadre de protocole de thérapie

cellulaire n'altérerait pas la réponse immunitaire contre différents pathogènes (Di Ianni et al. 2011), ni n'entraînerait d'augmentation du risque d'infection (Brunstein et al. 2011). Cette stratégie constitue donc une alternative sûre et efficace. Néanmoins, elle reste peu développée et réservée aux équipes entraînées à la production de Treg dans la mesure où certaines contraintes techniques limitent son utilisation à plus grande échelle, expliquant pourquoi elle n'a jamais été testée dans le cadre du traitement de l'allergie.

## **ii. Les limites de l'utilisation des Treg comme outils thérapeutiques.**

L'obtention de population de Treg conservant leur fonction régulatrice après sélection et expansion *ex vivo* reste un point extrêmement critique constituant un frein au développement de la thérapie cellulaire par Treg en plus de la complexité de la procédure de production de Treg. En effet, une certaine proportion de Treg amplifiés *ex-vivo* perdent l'expression du FOXP3, comme cela a pu être démontré dans des modèles murins de colite (Murai et al. 2010). Ces ex-Treg, acquérant un phénotype de cellules T conventionnelles (X. Zhou et al. 2009) ne possèdent plus de fonction immunosuppressives. A l'inverse, ces cellules deviennent plutôt pro-inflammatoires caractérisées par la sécrétion d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  (Komatsu et al. 2009; Ayyoub et al. 2009) et s'opposant aux effets thérapeutiques souhaités. L'équipe de Bluestone s'est heurtée à ce problème de stabilité des Treg amplifiés *in vitro*, dans son étude clinique incluant des patients diabétiques et présentée plus haut (Bluestone et al. 2015). Cette étude a montré que les Treg ne survivaient pas plus de 12 mois après leur administration chez les patients, malgré l'obtention de Treg ayant une capacité de suppression après amplification *ex vivo*. Le marquage des Treg par le deutérium pendant la phase initiale d'amplification *in vitro* a permis de suivre les Treg injectés *in vivo*. Une fois isolés des patients, les auteurs ont démontré que ces ex-Treg avaient perdu leur phénotype d'activation (Bluestone et al. 2015).

Ainsi la plasticité des Treg constitue le point le plus critique de leur utilisation *in vivo*. Une autre limite de la thérapie cellulaire par Treg est plus réglementaire et dérive directement des recommandations de la « Food and Drug Administration » (FDA). La FDA oblige les unités de production de Treg à documenter la stérilité, la pureté et l'efficacité suppressive des préparations. La stérilité reste facile à démontrer, la pureté et l'efficacité suppressive sont plus problématiques. Le niveau de contamination par des cellules non-Treg est aujourd'hui déterminé par cytométrie en flux quantifiant la proportion de cellules FOXP3<sup>+</sup> dans la préparation. Or, la seule expression de FOXP3 ne peut, en elle-même, constituer un critère de pureté de Treg, dans la mesure où son expression est instable chez les Treg amplifiés *ex-vivo*,

et ne témoigne pas forcément de leur fonctionnalité (suppression). L'étude des modifications épigénétiques du gène codant le FOXP3 pourrait permettre de développer des thérapies s'affranchissant du problème de stabilité de ces Treg. En effet, en plus de l'expression du FOXP3, l'induction de modifications épigénétiques des gènes impliqués dans le développement des Treg est requise afin de conférer une stabilité de l'expression du FOXP3 et une forte activité suppressive aux Treg (Ohkura et al. 2012). Notamment, la déméthylation de la région CNS2 (conserved noncoding sequence 2) du gène codant FOXP3 est aujourd'hui associée à une expression stable de FOXP3 par les Treg (Miyao et al. 2012). Ainsi, l'étude du statut de méthylation de la région CNS2 du gène codant pour FOXP3 permettrait d'offrir une meilleure appréhension de la pureté et de la stabilité des Treg en vue d'une utilisation clinique. L'étude de l'efficacité suppressive des Treg avant administration reste également un challenge. Comme vu plus haut, les Treg possèdent plusieurs mécanismes d'action différents selon les pathologies impliquées. Il est aujourd'hui très difficile de connaître les mécanismes de régulation impliqués dans le contrôle de pathologies différentes (Tang et Bluestone 2008). De même, dans la mesure où plusieurs mécanismes de régulation peuvent être mis en jeu, il est difficile d'appréhender l'activité suppressive des Treg amplifiés *ex-vivo* sur la base d'un test unique. Ceci s'est d'ailleurs révélé problématique dans une étude préclinique. Après avoir cultivé *in vitro* des Treg en présence ou non de rapamycine et démontré leur activité suppressive dans un test *in vitro*, Golovina *et al.*, n'ont pas été en mesure de contrôler la GVH chez des souris greffées via l'utilisation de Treg cultivés en l'absence de rapamycine, contrairement aux Treg cultivés avec la rapamycine (Golovina et al. 2008). La rapamycine a permis de maintenir le phénotype d'activation des Treg et leur fonction suppressive lorsqu'ils ont été cultivés *in vitro*. Ces résultats impliquent la nécessité de développer des tests de suppression spécifiques d'une pathologie unique afin d'être en mesure de déterminer objectivement l'activité suppressive *in vitro* des Treg dans cette pathologie.

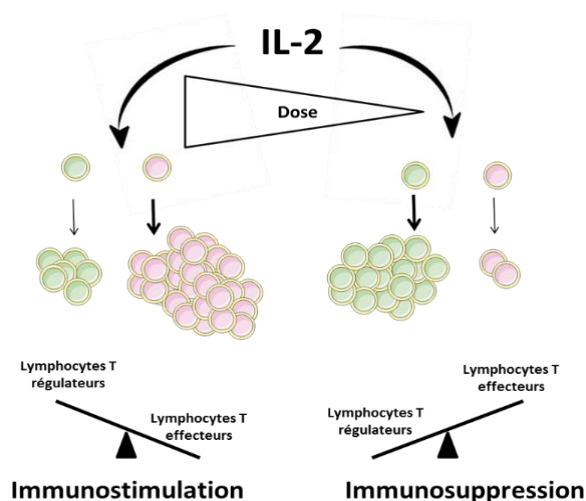
Toutes ces caractéristiques constituent autant de freins au développement de la thérapie cellulaire par Treg. Néanmoins les différentes études menées dans ce domaine ont permis le développement d'alternatives thérapeutiques, moins coûteuses et basées sur l'utilisation des Treg. Ainsi, le développement d'inhibiteur de la DNA méthyltransférase pourrait permettre le maintien de la stabilité du FOXP3 et d'améliorer l'efficacité des protocoles de thérapie cellulaire par Treg lorsqu'ils sont co-administrés ensemble (Moon et al. 2009). Enfin, l'IL-2 est une cytokine indispensable à la survie des Treg d'une part, et est impliquée dans le maintien de la stabilité du FOXP3 après transfert adoptif de Treg d'autre part (Koreth et al.

2011). Ces caractéristiques font de l'IL-2 une très bonne alternative à la thérapie cellulaire afin d'induire spécifiquement des Treg *in vivo*.

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

Alternativement aux stratégies de thérapie cellulaire *ex vivo*, une autre approche ciblant les Treg *in vivo* a été proposée. Il a pu être démontré récemment que l'administration de faibles doses d'IL-2 a pour conséquences de recruter et d'activer spécifiquement la population suppressive de lymphocytes Treg.

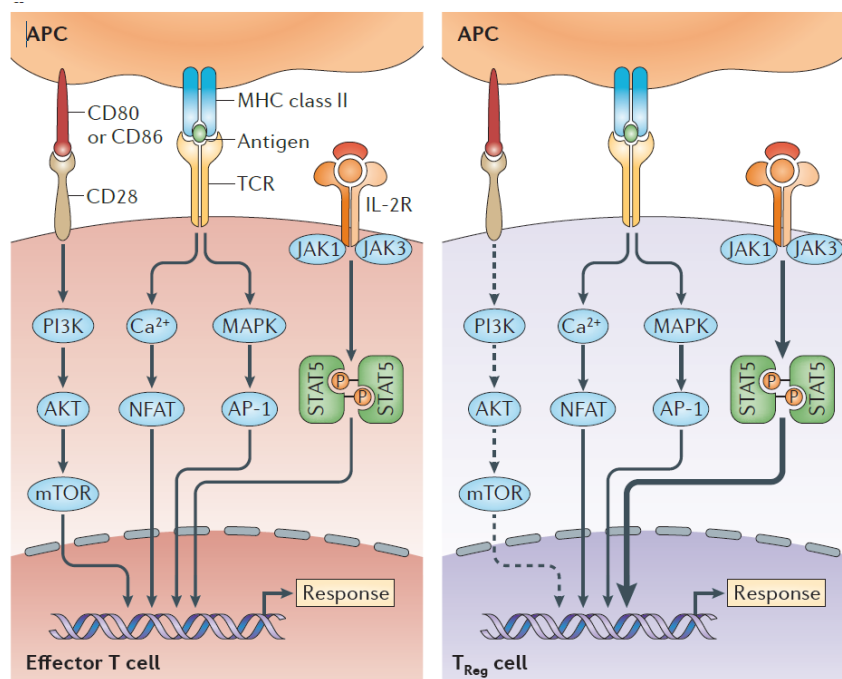
L'IL-2 est une cytokine de 15000 kDa, de faible demi-vie d'élimination (3 à 5 heures) produite par les cellules immunitaires (LT CD4, LT CD8, DC activées, NK et les NK exprimant le CD3 (NKT)) qui a été initialement décrite comme facteur de croissance des lymphocytes T. Elle agit en se fixant sur son récepteur composé de trois chaînes polypeptidiques (IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) et IL-2R $\gamma$  (CD132)) qui forment le récepteur de haute affinité à l'IL-2 (Liao, Lin, et Leonard 2013). La fixation de l'IL-2 sur son récepteur induit alors une cascade de signalisation permettant la survie, la différenciation et l'expansion des lymphocytes T activés (Robb 1984). Le dimère CD122 et CD132 peut également transduire le signal en l'absence de CD25, au prix d'une diminution d'affinité pour l'IL-2 (Liao, Lin, et Leonard 2013). L'IL-2 a donc des effets variables selon la dose, s'expliquant par l'expression différentielle et spécifique du récepteur de haute affinité à la surface de certaines populations cellulaires. Le récepteur trimérique de haute affinité est constitutivement exprimé sur les Treg, tandis que les autres populations cellulaires sensibles à l'IL-2 acquièrent le CD25 qu'après activation (Liao, Lin, et Leonard 2013). Les Treg sont donc plus sensibles à l'IL-2 que les autres populations cellulaires (Fig. 6).



**Figure 6 :** Effets pléiotropiques de l'IL-2 en fonction de la dose utilisée

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

La fixation de l'IL-2 sur son récepteur induit la phosphorylation de STAT-5. Les Treg ont un seuil d'activation environ 20 fois inférieur pour IL-2 que les cellules T effectrices lorsqu'il est mesuré en fonction du taux de STAT5 phosphorylé (pSTAT5). En outre, en aval de pSTAT5, l'activation de nombreux gènes importants pour la fonction cellulaire nécessite des doses d'IL-2 100 fois plus faibles pour les Treg que pour les lymphocytes T effecteurs (A. Yu et al. 2015) (Fig. 7). Aussi, pSTAT-5 se fixe notamment sur la région CNS2 du gène codant FOXP3 contribuant ainsi à sa déméthylation (Y. Feng et al. 2014) et ainsi à la stabilité de son expression même après plusieurs cycles de division cellulaire (Y. Feng et al. 2014).



**Figure 7 : Sensibilité différentielle des cellules T effectrices et Treg à l'interleukine-2**

L'activation des cellules T effectrices et des Treg est conditionnée par une signalisation combinée *via* le TCR et les molécules de co-stimulation telles que CD28, et le récepteur de l'interleukine-2 (IL-2R). Comparativement aux cellules T effectrices, 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 co-stimulation. D'après Klatzmann et Abbas (Klatzmann et Abbas 2015)

Historiquement, l'IL-2 a été utilisée à forte dose pour traiter les patients atteints de cancer (adénocarcinome rénal, mélanome métastatique sévère) afin de renforcer la réponse T cytotoxique (Tconv). Globalement, l'efficacité thérapeutique de l'IL-2 s'est avérée médiocre, notamment au vue des toxicités importantes qu'elle engendrait (Royal et al. 1996). De façon intéressante, des doses plus faibles d'IL-2 ont pu être proposées mais s'accompagnant d'une

efficacité anti-tumorale limitée (réponse clinique faible, voire nulle) (Nizar et al. 2009) , qui pourrait aujourd'hui s'expliquer par une inversion de la balance Treg/Tconv en faveur d'une augmentation des Treg aux faibles doses.

Ainsi, une faible dose d'IL-2 peut favoriser l'expansion des Treg tout en préservant les Tconv. Grinberg-Bleyer *et al.* ont montré que l'administration de faible dose d'IL-2 permettait de guérir les souris NOD du DT1 s'expliquant par une augmentation des Treg et de leur capacité suppressive (Grinberg-Bleyer et al. 2010). L'IL-2 faible dose favorisant l'expansion de Treg a également été testée dans différents modèles expérimentaux de maladies auto-immunes (Onur Boyman, Surh, et Sprent 2006; Lee et al. 2012; Dinh et al. 2012; R. Liu et al. 2010) ou dans d'autres maladies inflammatoires (Hao et al. 2011; Villalta et al. 2014; Kasahara et al. 2014). Dans tous les cas, ce traitement s'est révélé très efficace via notamment une activation *in vivo* spécifique des Treg et l'induction de la sécrétion d'IL-10 (Brandenburg et al. 2008). Etant donné que les Treg ont également un rôle anti-inflammatoire, l'IL-2 faible dose a également montré son efficacité dans le contrôle de maladies inflammatoires comme les lésions d'athérosclérose (Dietrich et al. 2012; Dinh et al. 2012), certaines dystrophies musculaires (Villalta et al. 2014), certaines lésions pulmonaires aiguës (D'Alessio et al. 2009), ou encore certaines pathologies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer (Alves et al. 2016).

Néanmoins, la faible demi-vie de l'IL-2 oblige la réalisation de cure comportant plusieurs administrations d'IL-2. Tout en favorisant son efficacité thérapeutique, des équipes ont développé une stratégie permettant d'augmenter la demi-vie de l'IL-2, notamment en la complexant avec des anticorps anti-IL-2. Différentes formes d'IL-2 complexée ont été proposées pour agir préférentiellement sur les Treg ou les Tconv. Dans le but de favoriser l'activation des Treg, l'IL-2 a été complexée avec un anticorps reconnaissant la partie de l'IL-2 se fixant sur le CD122, laissant ainsi la partie reconnaissant le CD25 libre. L'IL-2-JES6-1, nom donné à ce complexe, permet de favoriser l'induction de signal IL-2 sur les Treg sans pour autant stimuler les Tconv. Ce complexe IL-2 / anti-IL-2 induit une augmentation rapide des Treg permettant de considérablement atténuer la progression des lésions dans différentes maladies dont l'accident vasculaire cérébral, la myasthénie, l'athérosclérose ou le diabète (O. Boyman et al. 2012; Dinh et al. 2012; R. Liu et al. 2010; Horwitz et al. 2008; Liesz et al. 2009). L'autre forme d'IL-2 complexée, l'IL-2-S4B6, utilise un anticorps reconnaissant la partie de fixation au CD25. IL-2-S4B6 va pouvoir se fixer sur le CD122 et le CD132 des récepteurs de la famille  $\gamma$ C mais pas ou peu sur le CD25, activant préférentiellement les

Tconv (Létourneau et al. 2010). Egalement, de l'IL-2 mutée (mutéine) ou des protéines de fusion associant un domaine Fc des Ig à l'IL-2 sont en cours de développement, afin d'augmenter la demi-vie d'élimination et son efficacité quant à l'induction de Treg (Brevet détenu par Amgen US20140286898 A1).

Chez l'Homme, seule l'IL-2 non complexée a été testée. Les différents essais cliniques utilisant l'IL-2 faible dose sont résumés dans le tableau 4. Au sein de notre unité, Saadoun *et al.* a montré que l'administration d'IL-2 à faible dose permettait d'augmenter spécifiquement les Treg chez des patients atteints de vascularite dans le cadre d'une infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC), et s'accompagnant d'une amélioration clinique, ce qui constitue la première démonstration clinique de l'effet immunosuppresseur de l'IL-2. Suite à ces travaux, un essai clinique de phase I testant l'IL-2 faible dose dans le diabète de type 1 chez l'adulte a été mis en place. Les résultats préliminaires montrent un bon profil de tolérance et une augmentation des Treg de façon dose dépendante (Hartemann et al. 2013). Notre laboratoire est depuis l'investigateur de plusieurs essais cliniques. Ainsi, deux essais cliniques concernant le diabète chez l'enfant (NCT02411253 et NCT01862120, disponibles sur [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)), un essai clinique concernant la sclérose en plaque (NCT02424396), un essai clinique concernant le lupus (NCT02955615), et enfin un essai clinique testant l'effet immunologique de l'administration de l'IL-2 à faible dose chez des patients atteints de maladies auto-immunes (étude de phase II concernant 11 pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires ; NCT01988506) ont été récemment mise en place dans le Centre d'Investigation Clinique Biothérapies et Immunologie (CIC-BTi) de la Pitié-Salpêtrière (Tableau 4).

En parallèle, d'autres groupes ont démontré l'efficacité clinique de l'administration de faibles doses d'IL-2 dans le traitement de la GVHD (Koreth et al. 2011), du lupus (von Spee-Mayer et al. 2015) (Humrich et al. 2017) (He et al. 2016) (Humrich et al. 2015) et des alopecies auto-immunes (Hordinsky M et Kaplan DH 2014) (Castela et al. 2014). Ces résultats prometteurs confortent que l'IL-2 faible dose constitue une bonne alternative à la thérapie cellulaire *ex vivo*. De même, une telle stratégie n'a jamais été utilisée dans le traitement de l'allergie, alors qu'il s'agit d'une maladie caractérisée par un défaut de Treg.

**Tableau 4 :** Essais cliniques terminés ou en cours testant l'administration d'IL-2 faible dose dans différentes pathologies.

Nom	Pathologie	Année	Drogue et voie d'administration	Posologie et schéma thérapeutique	Patients (n=)	Type Essai	Effet	Investigateur	Référence
<b>Pathologies Auto-Immunes</b>									
VASCU-IL-2	HCV-vascularite induite	Mars 2008	Proleukin (Adesleukin) ; SC	1,5 MUI/j pendant 5 jours, suivis de trois cures de 5 jours à 3 MUI/j aux semaines 3, 6 et 9	10	Ouvert	↗ Tregs ↘ symptomatologie clinique chez 8 patients sur 10	CIC BTi, France	(Saadoun et al. 2011)
DF-IL-2	Diabète de type 1	Mai 2011	Proleukin (Adesleukin) ; SC	Une cure de 5 jours à 0,33 ; 1 ou 3 MUI/j	25	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	↗ Tregs dose dépendante	CIC BTi, France	(Hartemann et al. 2013)
DFIL-2-Child		Juin 2013	?, SC	0,3 ; 1 ou 3 MUI/m <sup>2</sup> /j pendant 8 semaines	24	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	En cours	CIC BTi, France	NCT01862120
DIABIL-2		Juin 2015	Proleukin (Adesleukin) ; SC	0.5 MIU/m <sup>2</sup> /j pendant 5 jours puis 1 injection toutes les deux semaines entre J15 et J351 (Bras A) ; ou une injection par semaine en J15 et J351 (Bras B)	138	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	En cours	CIC BTi, France	NCT02411253
Etude Alopecia Areata	Alopecia Areata	Novembre 2010	Proleukin (Adesleukin) ; SC	1,5 MUI/j pendant 5 jours, puis trois cures de 5 jours à 3 MUI/j aux semaines 3, 6 et 9	5	Ouvert	Amélioration clinique au niveau local chez 4 patients sur 5 ↗ Tregs	CHU Nice, France	(Castela et al. 2014)
TRANSREG	11 maladies auto-immunes	Janvier 2014	Proleukin (Adesleukin) ; SC	1MUI/j pendant 5 jours puis une injection d'1MUI tous les 15 jours (sauf LES, tous les 7 jours) pendant 6 mois	132	Ouvert	En cours	CIC BTi, France	NCT01988506
MS-IL-2	Sclérose en plaque	Juin 2016	ILT101 (ILtoo Pharma) ; SC	?	30	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	Non commencé	CIC BTi, France	NCT02424396



Etude SLE	Lupus érythémateux systémique	Aout 2013	rhIL-2 (125Ala) SL Pharm, SC	3 cures de 1 injection à 1MUI tous les deux jours pendant 2 semaines.	40	Ouvert	↗ nombre relatif et de la fonction des Tregs  Amélioration clinique chez tous les patients (SLEDAI)  ↘ index d'activité de la maladie (SRI-4) chez 34 patients	Peking University People's Hospital, Chine	(He et al. 2016)
PRO-IMMUN		Janvier 2014	Proleukin (Adesleukin) ; SC	1.5 MUI / j pendant 5 jours	5	Ouvert	↗ Treg chez atients lupiques	Charité - Universitätsmedizi n Berlin	(von Spee-Mayer et al. 2015)
				0,75, 1,5 ou 3 MUI/j pendant 5 jours, suivi de 3 cures de 5 jours à la même dose aux semaines 3, 6 et 9	12		↘ score clinique chez 10 patients (SLEDAI)		EudraCT-Number: 2013-001599-40 (1)
Etude SLE		2015	rhIL-2 (125Ala), SC	1,5 MUI/j pendant 5 jours, suivis de 3 cures à 3, 1.5 et 1.5 MUI/j pendant 5 jours aux semaines 3, 6 et 9	1	Compassionnel	↘ score clinique (SELENA-SLEDAI)	/	(Humrich et al. 2015)
Etude SLE		Juin 2015	rhIL-2 (125Ala) SL Pharm, SC	3 cures de 1 injection à 1 MUI tous les deux jours pendant 2 semaines.	60	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	En cours	Peking University People's Hospital, Chine	NCT02465580
Etude SLE		Mai 2016	rhIL-2 (125Ala) SL Pharm, SC	?	30	Etude comparative ouverte versus traitement de référence (Glucocorticoïde)	En cours	Peking University People's Hospital, Chine	NCT02932137
LUPIL-2		Novembre 2016	ILT101 (ILtoo Pharma) ; SC	Une cure de 5 jours à 1.5 MUI puis une injection toutes les semaines pendant 3 ou 6 mois selon réponse	100	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	En cours	Iltoo Pharma, France ; CIC-Bti, France	NCT02955615
Polyarthrite rhumatoïde	Polyarthrite rhumatoïde	Juillet 2015	rhIL-2 (125Ala) SL Pharm, SC	3 cycles de 14 jours à 1MUI d'IL-2 sc en association avec le methotrexate et le loxoprofen	60	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	En cours	Peking University People's Hospital, Chine	NCT02467504

Greffes de cellules souches hématopoïétiques et greffes d'organes									
Etude GVHD	GVHD Chronique	Août 2007	Proleukin (Adesleukin) ; SC	0.3MIU/m <sup>2</sup> /j, 1.0 MUI/m <sup>2</sup> /j ou 3MIU/m <sup>2</sup> /j	29	ouvert	↗ Treg chez tous les patients sans rechute de l'hémapathie Efficacité sur la GVH cutanée. Amélioration clinique majeure (multisite) chez 12 patients	Dana-Farber Cancer Institute, USA	(Koreth et al. 2011)
Etude GVHD	Prévention GVHD	Juin 2007	Proleukin (Adesleukin) ; SC	0.1MUI/m <sup>2</sup> 3 fois par semaine pendant 6 semaines	25(16)	Ouvert	↗ Treg chez tous les patients ↘ incidence de la GVHD dans le groupe traité	Texas Children's Hospital, Baylor College of Medicine, USA	(Kennedy-Nasser et al. 2014)
Etude GVHD	GVHD Chronique	Juillet 2011	Proleukin (Adesleukin) ; SC	1MIU/m <sup>2</sup> /j pendant 12 semaines	35	ouvert	En cours d'analyse	Dana-Farber Cancer Institute, USA	NCT01366092 (résultats)
Etude GVHD	Prévention GVHD	Aout 2014	?; SC	0.1MIU/m <sup>2</sup> pendant 12 semaines	40	Ouvert	En cours	National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), USA	NCT02226861
Etude GVHD	Chronique GVHD	Fevrier 2015	Proleukin (Adesleukin) ; SC	Escalade de dose évaluant la tolérance de 3 doses différentes d'IL-2 administrées par cycle de 5 jours aux semaines 1, 2 et 4. Puis administration de la dose maximale tolérée sur 4 semaines	20	ouvert	En cours	Dana-Farber Cancer Institute, USA	NCT02318082
Etude GVHD	Prévention GVHD	Mars 2016	rhIL-2 (125Ala) SL Pharm, SC	0.4 MUI/m <sup>2</sup> /j, 3 fois par semaine jusqu'à 3 mois après la greffe	70	Ouvert	En cours	Peking University People's Hospital, Chine	NCT02659657
SubQ	Grefe hépatique	Novembre 2016	Proleukin (Adesleukin) ; SC	une administration tous les jours à 1.0MIU/m <sup>2</sup> pendant 4 semaines	12	Ouvert	En cours	Beth Israel Deaconess Medical Center, Israel	NCT02739412
Allergies									
Rhinil-2	Rhinite allergique aux pollens de bouleau	Prévu pour Novembre 2017	ILT101 (ILtoo Pharma) ; SC	une administration tous les jours à 1.0MIU/j pendant 5 jours, puis une administration tous les 15 jours pendant 5 mois	50	Double aveugle, randomisé et contrôlé contre placebo	Non commencé	CIC BTi, France	?

GVHD : Graft versus host disease, SC : Sous cutanée, j : jours, CIC-BTi ; Centre d'Investigation Clinique Biothérapies et Immunologie, SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, SELENA-SLEDAI : SLEDAI modifié par le groupe SELENA. SRI : index de réponse lupique

## **Troisième partie – Allergie alimentaire : physiopathologie et mécanismes immunologiques associés au niveau de la muqueuse intestinale.**

L'allergie alimentaire est une réaction clinique observée lors d'une réponse immunitaire excessive, contre un antigène non pathogène d'origine alimentaire appelé trophallergène. Les mécanismes immunopathologiques de l'allergie sont complexes et font intervenir différentes populations cellulaires effectrices. De même, les mécanismes immunorégulateurs permettant de contrôler ces réponses immunitaires sont altérés. Lors de cette 3ème partie, nous définirons les cibles thérapeutiques potentielles de l'allergie alimentaire au travers l'étude de sa physiopathologie. La complexité du compartiment T régulateur intestinal sera également abordé, avant d'exposer le rôle central des Treg dans la régulation des manifestations allergiques et notamment au niveau local.

### **1. Physiopathologie de l'allergie alimentaire.**

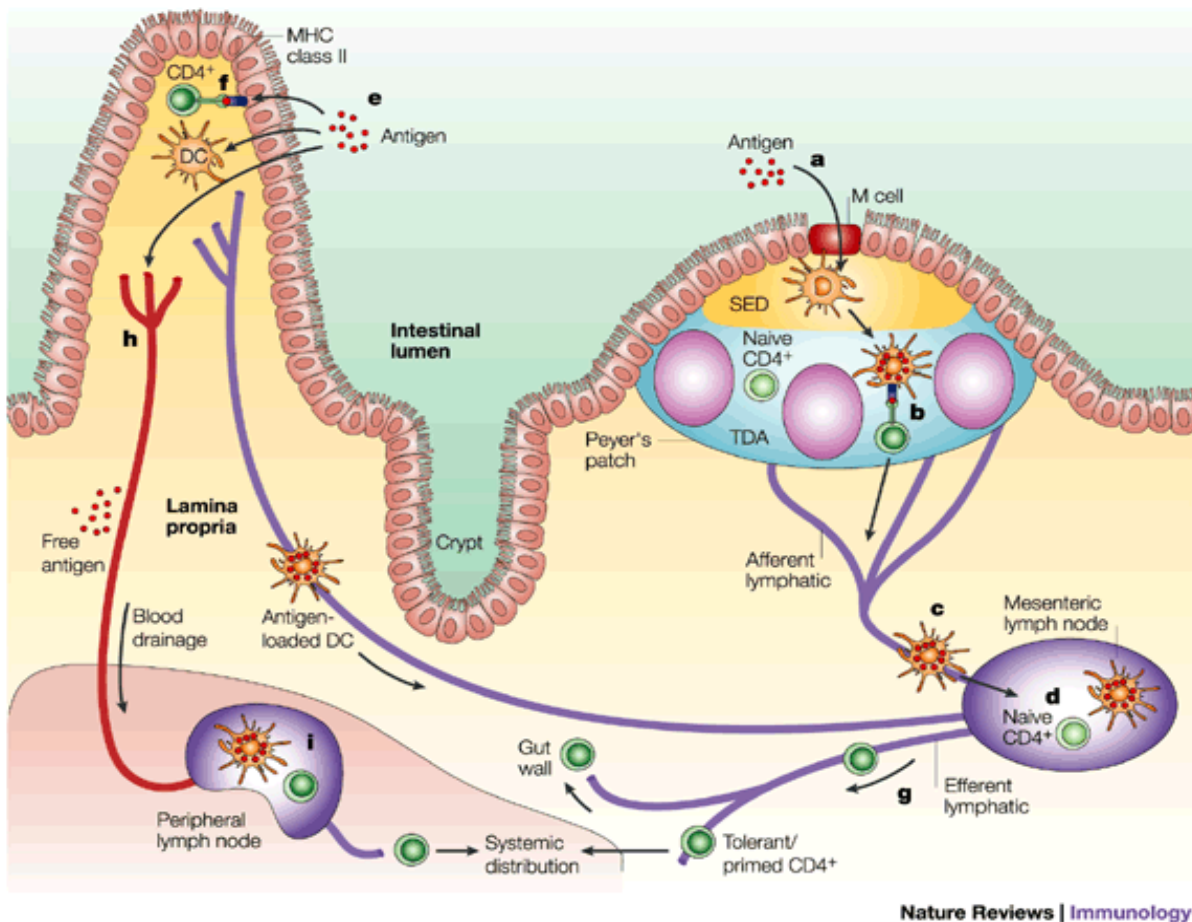
L'intestin constitue le siège de la réponse immunitaire mise en place lors de l'allergie alimentaire. Il constitue à la fois le site inducteur et le site effecteur des réponses immunitaires avec notamment l'implication des différentes structures lymphoïdes associées à la muqueuse digestive, le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue).

#### **i. Le système immunitaire associé à la muqueuse digestive.**

La muqueuse intestinale est recouverte d'un épithélium composé d'entérocytes séparant le contenu de la lumière intestinale et de la *lamina propria* (LP), tissu conjonctif lâche sous-jacent. Plus profondément, on retrouve la couche sous-muqueuse contenant les différents vaisseaux sanguins et lymphatiques, puis la musculature. Le GALT est une structure bien décrite qui peut être diffuse avec une organisation peu structurée comme les amas de cellules lymphoïdes dans la *lamina propria* ou la couche externe de la muqueuse épithéliale, ou bien, présenter une organisation très structurée comme les plaques de Peyer (PP) et les ganglions mésentériques (MLN) (Fig. 8).

Le GALT se décompose en un site inducteur des réponses immunitaires (PP et MLN) et en un site effecteur (IEL et *lamina propria*) dont la composition cellulaire varie d'un site à un autre. Ainsi les lymphocytes intraépithéliaux (IEL, IntraEpithelial Lymphocytes) de l'intestin grêle sont majoritairement représentés par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dont le développement est indépendant du thymus (Little et al. 2005). Ils expriment surtout un TCR  $\gamma\delta$  restreint à un faible nombre d'antigène. A noter qu'il existe au sein de ces IEL des lymphocytes T doubles négatifs CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> exprimant un TCR  $\gamma\delta$  ainsi que des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui sont deux fois moins représentés que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Guy-Grand et al. 2013).

Au niveau de la *lamina propria*, la diversité en cellules immunitaires est plus importante. Elle est, en effet, infiltrée par un nombre important de lymphocytes T, de lymphocytes B, de macrophages, de DC, de neutrophiles et de mastocytes. Les macrophages constituent une des populations les plus abondantes de la LP et jouent un rôle de sentinelles capables de phagocyter différentes bactéries pathogènes. De façon intéressante, ils sont nécessaires à la mise en place d'une tolérance aux antigènes non pathogènes (incluant les antigènes alimentaires et les bactéries de la flore commensale), notamment via la sécrétion d'IL-10 qui contribue à l'induction de Treg (Denning et al. 2007). Concernant les populations lymphocytaires, la *lamina propria* est colonisée majoritairement par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (60% des LT), capables de sécréter de l'IL-10 et de l'IL-17 en réponse à une stimulation non spécifique. Une partie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprime le facteur de transcription FOXP3, sans up-régulation du CD25 caractérisant les Treg tissulaires de l'intestin (Asigbetse, Eigenmann, et Frossard 2010). Ces Treg tissulaires sont composés de plusieurs sous populations de Treg, dérivant soit de tTreg, après migration du thymus jusqu'à la LP, soit de pTreg, induits directement à partir de Tconv présents au niveau de la LP. Ils seront décrits dans le chapitre 2.iii.



**Figure 8 : Représentation schématique du système immunitaire de l'intestin grêle.**

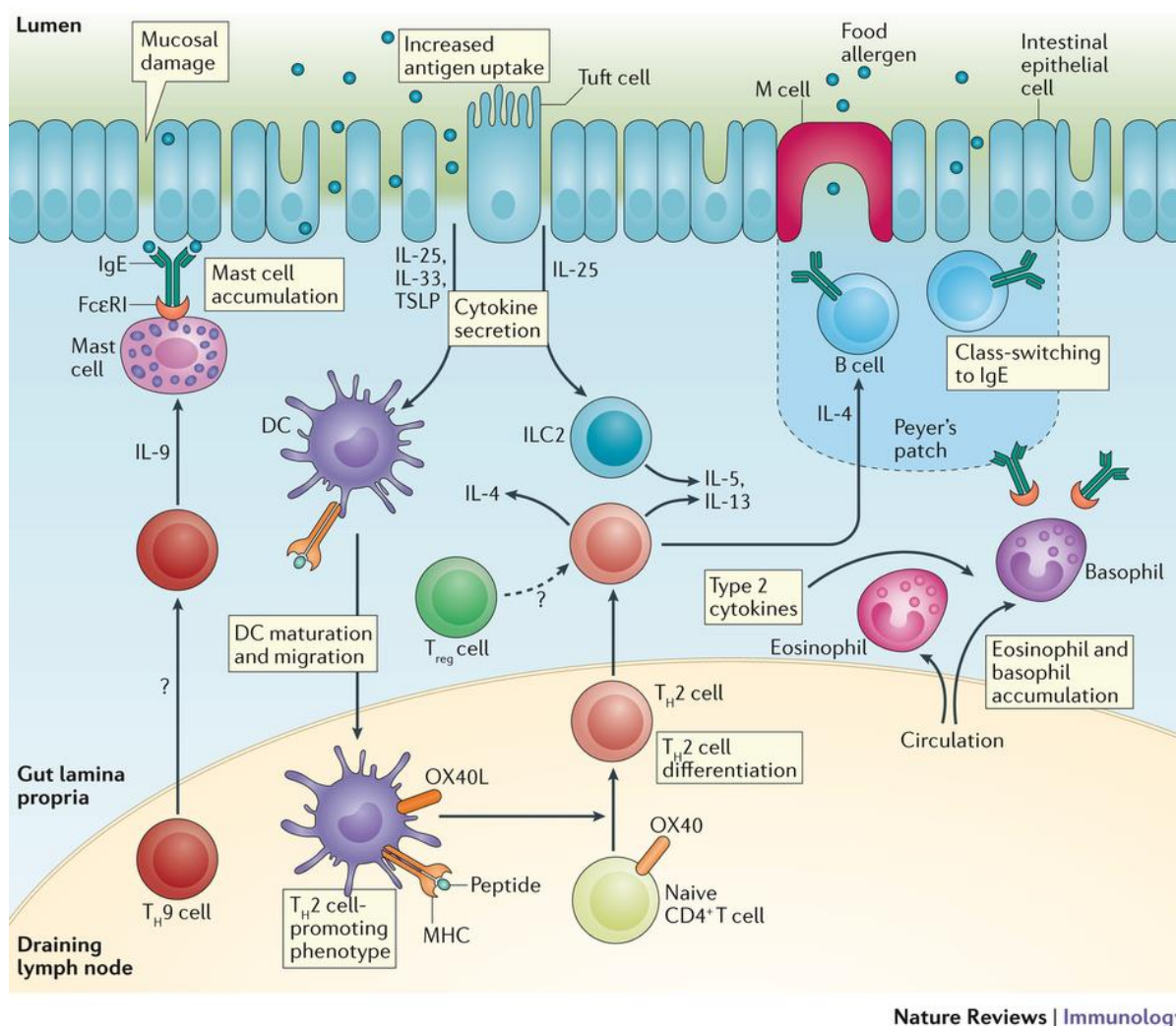
Les antigènes peuvent traverser l'épithélium via des cellules M et ensuite être pris en charge par des DC pour être présentés aux LT au niveau des PP. Les antigènes présents dans la lumière intestinale peuvent également être captés directement dans la lumière par des DC de la lamina propria via l'émission de dendrites à travers l'épithélium pour être présentés aux LT dans les MLN. Dans de rares cas, les cellules épithéliales peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes et présenter directement l'antigène aux lymphocytes. D'après Mowat *AM et al.* (Mowat 2003)

L'ensemble des structures du GALT sont impliquées dans la physiopathologie de l'allergie alimentaire, réaction immunitaire d'hypersensibilité IgE-médiée. Elle se décompose en deux phases, une phase de sensibilisation correspondant à la génération de plasmocytes sécrétant des IgE spécifiques de l'allergène sous l'influence des cellules Th2 et une phase effectrice correspondant aux manifestations cliniques lors de la réintroduction de ce même allergène dans l'organisme.

## ii. Orientation de la réponse immunitaire vers la réponse Th2.

Chez les sujets atopiques, les antigènes présents dans la lumière intestinale pénètrent dans l'intestin au niveau des cellules M situées au niveau des PP, et vont être pris en charge par les DC. Ces DC expriment de nombreux récepteurs de l'immunité innée tels les PRRs (Pathogen Recognition Receptors), qui sont capables de reconnaître un large panel de motifs microbiens (PAMPs ; Pathogen-Associated Molecular Patterns) mais aussi certains allergènes notamment grâce au TLR-4 (Toll Like Receptor-4) ou à DC-SIGN (Trompette et al. 2009; Shreffler et al. 2006). Les TLR peuvent également contribuer de façon indirecte à la prise en charge des allergènes en fixant les contaminants tel le lipopolysaccharides (LPS) associés aux allergènes (Trompette et al. 2009). Les fragments peptidiques de l'antigène vont alors être couplés avec les molécules du complexes majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et présentés à la surface des DC afin d'être présentés et induire l'activation des LT CD4<sup>+</sup> au niveau des MLN. Dans le cas de l'allergie alimentaire, le système immunitaire s'oriente vers une réponse de type Th2 car la DC se trouve dans un environnement pro-Th2.

En effet, il a été démontré que les allergènes ou encore un stress mécanique peuvent activer l'épithélium et induire ainsi la sécrétion d'IL-25, d'IL-31, de TSLP et d'IL-33 contribuant au phénomène inflammatoire de l'allergie (Kang et al. 2005; Kakkar et Lee 2008) (Fig. 9). Le TSLP et l'IL-33 agissent sur les DC permettant la polarisation des cellules Th2, notamment via l'up-régulation d'OX40L sur les DC permettant la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th2 à partir de lymphocytes naïfs (Ito et al. 2005). L'IL-25 et l'IL-33 activent les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) et permettent leur expansion (Klose et Artis 2016). Ces cellules sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL-13 qui potentialisent la réponse Th2 en favorisant notamment, la différenciation, la survie et l'expansion des Th2 (Mirchandani et al. 2014; Talal A. Chatila et al. 2008). L'IL-2 et l'IL-4 amplifient les réponses Th2 en induisant la sécrétion d'IL-4 supplémentaire. La signalisation résultant de la liaison de l'IL-4 avec son récepteur passe par GATA-3 (GATA-binding protein 3), qui entraîne l'expression des gènes associés aux cytokines propres à l'inflammation de type Th2 (Zhu, Yamane, et Paul 2010). Les lymphocytes T Th2 activés et exprimant les intégrines  $\alpha 4\beta 7$  vont quitter les MLN pour rejoindre la *lamina propria* et l'épithélium, constituant les sites effecteurs de l'intestin.



Nature Reviews | Immunology

**Figure 9 :** Mécanismes de mise en place des réponses Th2 après administration orale de l'allergène.

Les dommages ou les lésions épithéliales dans l'intestin permettent une augmentation de l'entrée d'antigène et favorisent la sécrétion des cytokines d'interleukine-25 (IL-25), d'IL-33 et la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) par les cellules épithéliales. Ceci oriente le système immunitaire vers une réponse cellulaire de type T helper 2 (Th2). En particulier, le TSLP permet la maturation de cellules dendritiques (DC) qui par la suite favoriseront la différenciation des cellules Th2. L'augmentation d'expression d'OX40L par les DC favorise la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en cellules Th2. La sécrétion d'IL-25 par les cellules épithéliales permet également l'expansion des d'innate lymphoid cells 2 (ILC2) qui, conjointement avec les cellules Th2, sécrètent des cytokines favorisant la réponse immunitaire Th2. Cela induit l'accumulation d'éosinophiles tissulaires et la commutation de classe des lymphocytes B sécrétant des IgE. Les cellules Th9 contribuent également à la réponse immunitaire allergique en recrutant localement les mastocytes tissulaires, et en favorisant la conversion des cellules T régulatrices en cellules Th2 via un signal IL-4 dépendant. D'après Yu *et al.*, 2016 (W. Yu, Freeland, et Nadeau 2016).

La production de cytokines de type Th2 oriente alors la commutation de classe du lymphocyte B vers la production d'IgE (Stone, Prussin, et Metcalfe 2010). Ce profil particulier de cytokines est également responsable du recrutement et/ou de l'activation de cellules effectrices dans les tissus comme les mastocytes (IL-4, IL-9 et IL-13) et les éosinophiles (IL-3, IL5 et GM-CSF), ou bien de leur augmentation dans le sang à l'image des basophiles (IL-3). Les IgE présentes dans le sang circulant et dans les tissus, libres ou fixées à

la surface des mastocytes et des polynucléaires basophiles via leur fragment constant (Fc) qui se fixe à la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de forte affinité pour les IgE, Fc $\epsilon$ RI. Cette phase de sensibilisation qui reste asymptomatique peut durer de quelques semaines à quelques années.

La fixation et le pontage des IgE spécifiques liées au Fc $\epsilon$ RI des mastocytes et polynucléaires basophiles, lors d'un deuxième contact avec l'allergène, induit l'activation de ces effecteurs et la libération de médiateurs contenus dans leur granulation intracytoplasmiques. Cette dégranulation, rapide et brutale, est responsables des signes cliniques de l'allergie et implique différents types de médiateurs qui ne seront pas détaillés. Les mécanismes physiopathologiques de l'allergie impliquent d'autres types de réponses, qui sont plus spécifiquement retrouvées au niveau de l'intestin.

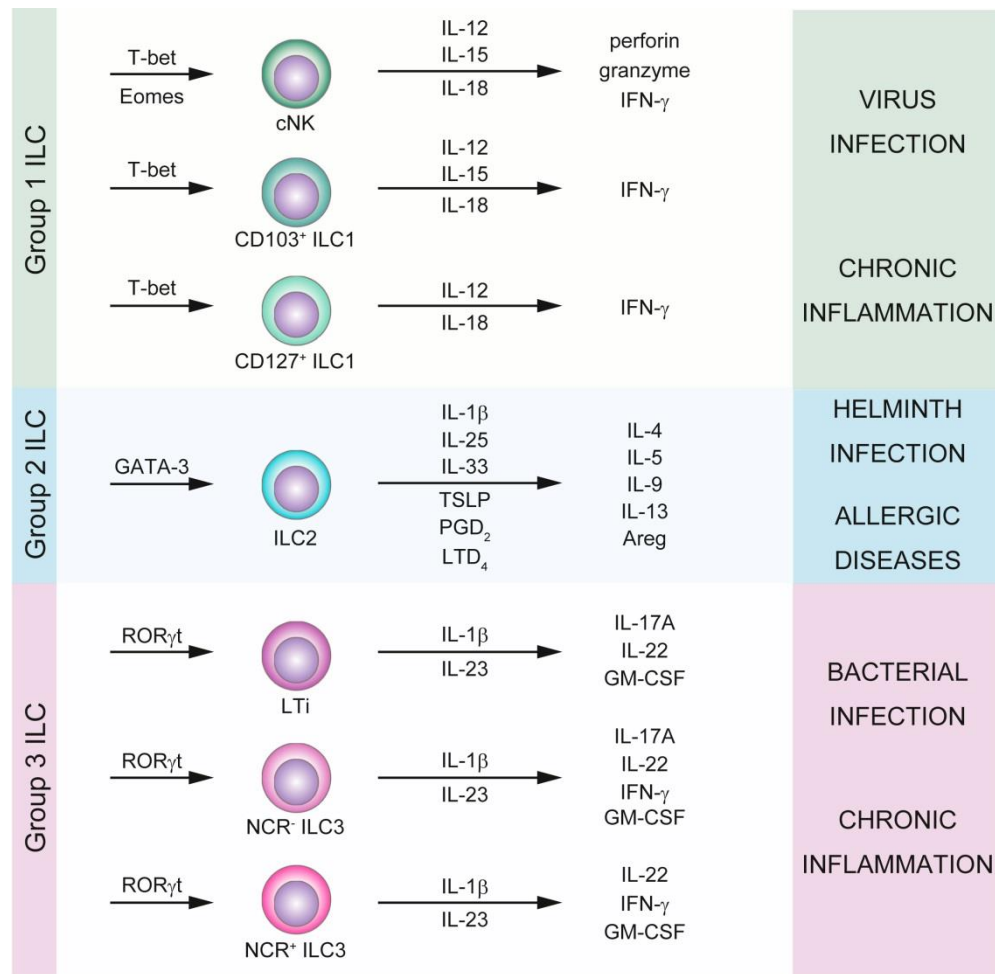
### **iii. Spécificité des réponses allergiques intestinales.**

Différentes populations de cellules effectrices, décrites au niveau de l'intestin, participent activement à la physiopathologie de l'allergie alimentaire. Nous décrirons dans cette partie, l'implication des ILC2 et des lymphocytes Th9.

#### **a. Les ILC2, Innate Lymphoid Cells 2.**

Les ILC constituent des populations de cellules lymphoïdes innées qui ont été décrites et classées selon la même dichotomie que les cellules T « helper » du système immunitaire adaptatif en fonction de leur profil de sécrétion cytokinique (Fig. n°10). Les ILC n'expriment pas de marqueur de surface spécifique à d'autres lignées cellulaires (« Lineage négative » ; Lin-) et n'expriment pas de récepteurs spécifiques de l'antigène. En revanche, ces cellules répondent rapidement à de multiples facteurs solubles, tels que les cytokines et les eicosanoïdes, qui sont produits par d'autres cellules en réponse à différents signaux induits par les PRRs. Les ILC2, seules associées à l'allergie, peuvent être identifiées par l'expression de CD25, ICOS, SCA-1, IL7R $\alpha$  (CD127), IL33R (T1ST2) et la forte expression du facteur de transcription de la réponse Th2, GATA-3 chez la souris. Les ILC2 ont été identifiées dans les ganglions mésentériques, le foie, la rate et l'intestin (J. A. Walker et McKenzie 2013; J. A. Walker, Barlow, et McKenzie 2013) et au niveau des plaques de Peyer.





**Figure 10 : Phénotypes des différentes populations d'ILC.**

Les ILC sont divisées en 3 sous populations en fonction de leur profil de sécrétion de cytokine et de l'expression de différents facteurs de transcription. Les ILC1 produisent de l'IFN- $\gamma$  après stimulation par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 et expriment le facteur de transcription t-bet. Elles sont impliquées dans les réponses immunitaires contre les pathogènes intracellulaires. Les ILC2 sécrètent des cytokines pro Th2 comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 en réponse à l'IL-33, l'IL-25 et le TSLP produites par les cellules épithéliales. Elles expriment le facteur de transcription GATA3 et sont impliquées dans les réponses immunitaires allergiques. Les ILC3 produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 en réponse à l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23. Elles expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et sont impliquées dans les défenses contre les pathogènes extracellulaires. D'après Morita *et al*, 2016. (Morita, Moro, et Koyasu 2016)

Les ILC2 participent très fortement à la phase de sensibilisation de l'allergie, quelque soit l'organe atteint. Leur rôle a été particulièrement décrit dans l'asthme où ils semblent indispensables à la phase de sensibilisation (Halim *et al.* 2014). En plus de leur activité antihelminthe au niveau intestinale, l'implication des ILC2 dans la physiopathologie de l'allergie alimentaire a également été démontrée. Comme dans le poumon, les ILC2 intestinales, en réponse à la sécrétion par les cellules épithéliales de l'intestin d'IL-25, d'IL-33 et du TSLP, vont s'activer et sécréter à leur tour, l'IL-13, l'IL-5 et l'IL-4, amplifiant la réponse Th2, favorisant la sécrétion d'IgE par les plasmocytes et activant les éosinophiles (Noval Rivas *et al.* 2016). Aussi Noval-Rivas *et al.* ont démontré que la sécrétion d'IL-4 par les ILC-2 était indispensable pour induire une sensibilisation à l'allergène, dans la mesure où le

transfert adoptif d'ILC2 déficient en IL-4 a des souris *Il4raF709 Il1rl1*<sup>-/-</sup> (souris ayant un polymorphisme de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-4 se traduisant par une augmentation de l'affinité du récepteur pour l'IL-4, et une délétion du récepteur à l'IL-33) ne permet pas de réinduire l'allergie (Noval Rivas et al. 2016). De même, la co-culture d'ILC2 issues de souris sauvages ou de souris *Il4raF709* diminuent l'induction de CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> à partir de CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>. Ceci est dépendant de l'IL-4 puisque l'ajout d'un anticorps neutralisant l'IL-4 permet de recouvrer l'induction de Treg (Noval Rivas et al. 2016). Ainsi, la sécrétion d'IL-4 par les ILC2 activées par l'IL-33 favorise l'allergie alimentaire en diminuant l'induction de Treg spécifiques de l'allergène et en altérant leur capacité suppressives (Noval Rivas et al. 2016).

### **b. L'IL9, les lymphocytes Th9 et les MMC9.**

L'IL-9 est produite par une sous-population de lymphocytes T auxiliaires, qui se différencient en lymphocytes Th9 en réponse à une stimulation par l'IL-4 et le TGF- $\beta$  (Veldhoen et al. 2008). Les lymphocytes Th9 expriment avant tout, les facteurs de transcription PU.1 (Chang et al. 2010) et l'Interferon-Regulatory Factor 4 (IRF4) (Staudt et al. 2010) ainsi qu'à un plus faible niveau, le facteur de transcription GATA-3. Les Th9 se rapprochent donc des lymphocytes Th2 et sont capables de produire également des cytokines Th2.

L'IL-9 a longtemps été considérée comme une cytokine appartenant à la réponse Th2 en raison de ses effets biologiques, identiques à ceux observés avec les cytokines Th2. Les études ont d'abord été menées chez le sujet asthmatique où l'IL-9 est associée à l'augmentation de la sécrétion de mucus au niveau de l'appareil respiratoire supérieur (Louahed et al. 2000). De plus, la surexpression constitutive d'IL-9 dans un modèle murin favorise l'infiltration du poumon par des éosinophiles entraînant l'augmentation de l'hyperactivité bronchique (Temann et al. 1998) alors qu'à l'inverse, la neutralisation de l'IL-9 par un anticorps anti-IL-9 réduit le recrutement d'éosinophiles dans le poumon, diminue la production d'IgE spécifiques et l'hyperactivité bronchique (Kung et al. 2001).

Des travaux remarquables ont permis de comprendre l'implication de l'IL-9 dans les différentes phases de la physiopathologie de l'allergie alimentaire, notamment dans les réactions anaphylactiques. En plus de l'IL-4 et du TGF- $\beta$ , le TSLP et l'IL-25 sont deux cytokines capables d'induire l'activation et la différenciation des Th9 (Wisniewski et Borish

2011). De plus, l'IL-9 est la cytokine principale permettant le recrutement de mastocytes au niveau de l'intestin (Forbes et al. 2008), entretenant la phase effectrice de l'allergie. Parmi les mastocytes recrutés, les mastocytes muqueux (les MMC9, de *multifunctional IL-9-producing mucosal mast cell*) figurent parmi les principaux producteurs d'IL-9 au niveau de l'intestin (C.-Y. Chen et al. 2015) en réponse à l'IL-4 et au pontage par l'antigène des IgE fixées sur leur FcεRI (Lorentz et al. 2000). Ainsi, il existe une boucle d'amplification autocrine des MMC9 via le signal IL-9/IL-9R (C.-Y. Chen et al. 2015). Enfin, la sécrétion épithéliale d'IL-33 produite lors de la phase de sensibilisation est capable d'activer les MMC9 amplifiant leur sécrétion d'IL-9 (C.-Y. Chen et al. 2015). Ceci conduit à leur recrutement intestinal accru pouvant expliquer les réactions anaphylactiques. Ainsi l'activation des lymphocytes Th9 entraîne la production d'IL-9 permettant l'amplification de l'induction des MMC9 qui sont responsables, par effet autocrine, de l'augmentation de la réponse anaphylactique en réponse à l'allergène.

Les mécanismes physiopathologiques de l'allergie sont finement régulés par les Treg. L'intestin est un organe complexe où plusieurs populations de Treg tissulaires ont été décrites.

## **2. Complexité du compartiment Treg intestinal.**

L'intestin constitue un site anatomique particulier situé à l'interface environnements / organisme. Cette surface vulnérable aux infections est défendue par le GALT. Le GALT est confronté à un challenge difficile, celui de faire la discrimination non seulement entre les antigènes du soi et du non-soi, mais aussi entre les antigènes indésirables pathogènes et les antigènes inoffensifs (nutriments, bactéries du microbiote). Cet équilibre fragile entre les mécanismes de tolérance et les réponses effectrices est dirigé par une multitude de cellules différentes appartenant au système immunitaire inné et adaptatif de l'intestin. Notamment, l'intestin est une zone d'induction de tolérance privilégiée où les lymphocytes T régulateurs intestinaux jouent un rôle central. Ces Treg tissulaires dérivant à la fois des tTreg ou des pTreg, sont identifiés par l'expression de différents facteurs de transcription. Cette partie décrira les différents mécanismes d'enrichissement de la muqueuse intestinale par les Treg – de leur migration intestinale depuis le thymus jusqu'à leur induction en périphérie – et présentera les différentes populations de Treg tissulaires présentes au niveau de l'intestin.

## **i. La notion de Treg tissulaires.**

La recolonisation de souris RAG1  $-/-$  dépourvues en lymphocyte T, par des Treg après avoir reçues une greffe cutanée préalablement tolérée, constitue la première preuve de l'existence de Treg tissulaire (Graca, Cobbold, et Waldmann 2002). Ces cellules sont associées à des fonctions suppressives locales permettant de prévenir le rejet de greffe (Graca, Cobbold, et Waldmann 2002). L'existence d'une altération de la distribution des Treg *in vivo*, via la perte d'expression de molécule d'adressage, entraîne le développement d'une inflammation locale au niveau des tissus concernés (Sather et al. 2007), soulignant l'importance des capacités migratoires des Treg afin d'exercer une régulation localement. De même, les auteurs ont étudié la distribution tissulaire des Treg, et ont démontré l'existence de Treg au niveau de la quasi-totalité des tissus non lymphoïdes, notamment au niveau du poumon, du foie, de la peau, de l'intestin (épithélium intestinal et lamina propria) ainsi que de la cavité péritonéale. Les équipes de recherche se sont ensuite attelées à mieux caractériser ces lymphocytes T régulateurs résidents au niveau des tissus.

Plusieurs populations de Treg ont été décrites au niveau tissulaire. Notamment, après stimulation par l'IFN- $\gamma$  et sous l'influence du facteur de transcription T-bet, certains Treg peuvent exprimer le récepteur aux chimiokines CXCR3. Ainsi, ces Treg Foxp3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> s'accumulent aisément au niveau des tissus afin de réguler les réponses inflammatoires de type Th1 (Koch et al. 2009; Szabo et al. 2000). De la même façon, les Treg exprimant le facteur de transcription STAT-3, permettant la différenciation des lymphocytes Th17, sont impliqués dans la régulation des réponses Th17. La délétion conditionnelle de STAT-3 au niveau des Treg conduit à une inflammation intestinale mortelle en lien avec une réponse Th17 exacerbée (Chaudhry et al. 2009).

Ainsi les Treg tissulaires sont essentiels à l'homéostasie immunitaire du tissu dans lequel ils se trouvent, et cela via la dépendance de l'expression de molécules d'adressage spécifique du tissu et de facteurs de transcription communs aux cellules T effectrices. Les Treg représentent plus de 30% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du côlon et environ 20% au niveau de la *lamina propria* de l'intestin grêle (Atarashi et al. 2011; Stefka et al. 2014). Ils sont constitués à la fois de tTreg et de pTreg dont les mécanismes de migration ou d'induction vont être présentés dans les 2 prochaines parties.

## ii. De l'activation des tTreg jusqu'à leur homing au niveau de l'intestin.

Suite à leur différenciation dans le thymus, les tTreg rejoignent la circulation et recirculent entre les différents organes lymphoïdes secondaires (OLS). Des études immunohistologiques récentes ont montré que, dans des conditions d'homéostasie, les Tregs étaient uniformément répartis dans les zones T des OLS murins et humains (Lim, Hillsamer, et Kim 2004; Roncador et al. 2005).

Différentes données suggèrent que la capacité des Treg à migrer vers des sites lymphoïdes ou inflammatoires est un facteur déterminant de leur fonction. Les premières preuves de cette répartition de compétence entre les sous types de Treg proviennent d'études comparant le potentiel de suppression *in vivo* des Treg CD62L<sup>high</sup> and CD62L<sup>low</sup>. Beaucoup d'études ont montré que les Treg CD62L<sup>high</sup> et CD62L<sup>low</sup> ont des capacités suppressives similaires *in vitro* (Szanya et al. 2002). Cependant leur effet immuomodulateur *in vivo* est différent notamment, les Treg CD62L<sup>high</sup> sont plus efficaces que leurs homologues CD62L<sup>low</sup> dans la prévention des manifestation auto-immunes et le développement de GVH (Szanya et al. 2002; Ermann et al. 2005). Ceci suggère des différences dans leur propriété de migration plutôt que dans leur propriété suppressive. De plus, dans les expériences démontrant le rôle protecteur des Treg CD62L<sup>high</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (comparativement aux Treg CD62L<sup>Low</sup>), les transferts adoptifs ont été réalisés de façon préventive, avant le début des symptômes, indiquant que seuls les Treg CD62L<sup>high</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> peuvent entrer efficacement dans les ganglions drainants et contrôler le développement des cellules effectrices et, par conséquent, l'induction de l'auto-immunité (Fisson et al. 2003). Ainsi les ganglions drainants constituent un site privilégié d'induction de tolérance dans la mesure où le blocage de la migration des Treg dans les ganglions, par un anticorps anti-CD62L, résulte dans la perte de tolérance (Ochando et al. 2005). Plus tard, des précisions quant au phénotype des tTreg ont été apportées. Ainsi, les Treg CD62L<sup>high</sup> ont été définis comme les Tregs naïfs.

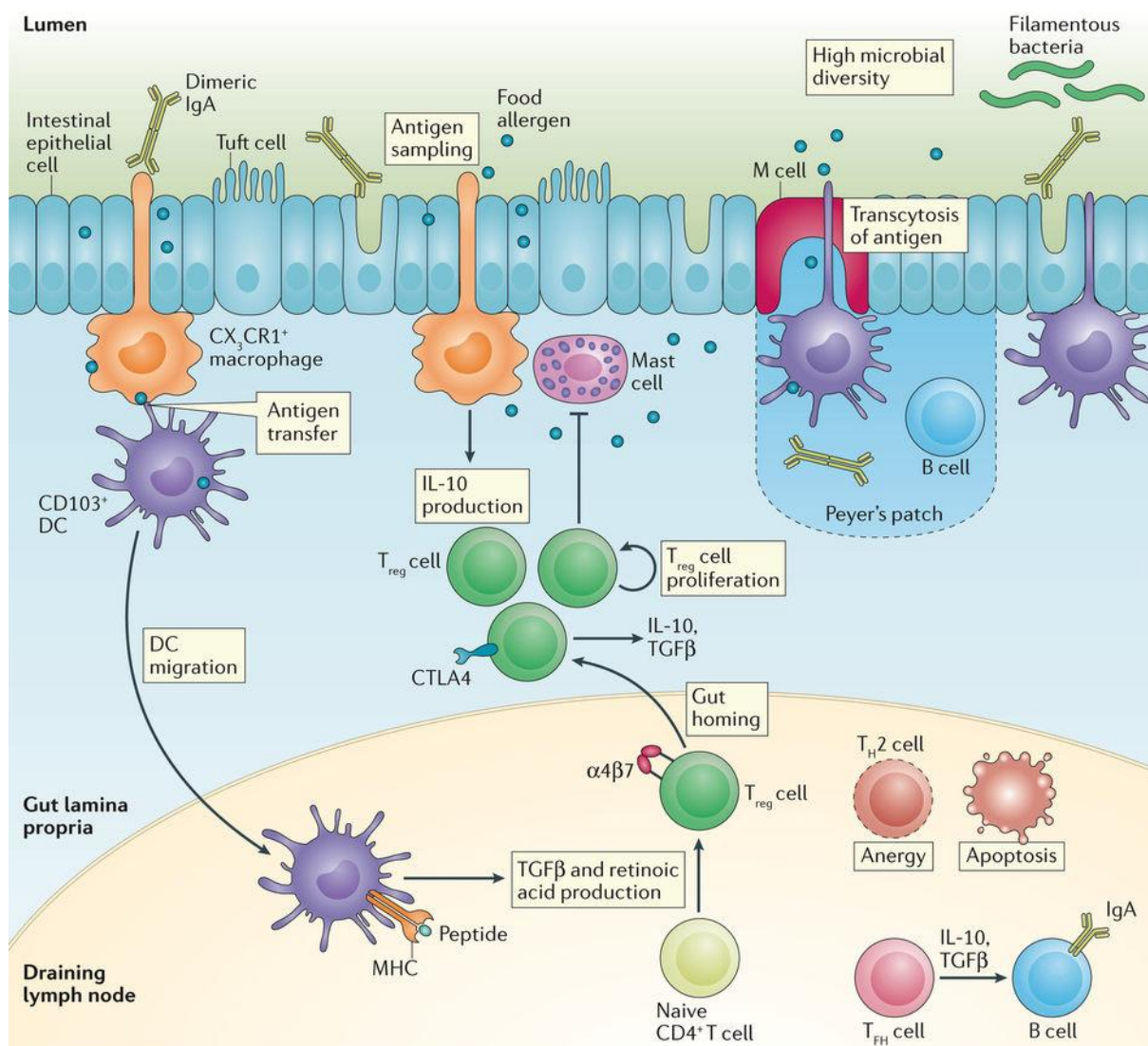
Ainsi, durant la phase initiale des réponses immunitaires, les Tregs naïfs, ayant migrés au niveau des organes lymphoïdes secondaires après l'acquisition de CCR7 (Sharma et al. 2015), vont, après avoir reconnu l'antigène pour lequel ils sont spécifiques, s'activer et se différencier en Treg effecteurs puis mémoires, afin de supprimer l'induction, l'expansion et la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices activés. Ceci induit l'augmentation d'expression de CD44 et la diminution d'expression de CD62L à la surface des Treg (Fisson

et al. 2003). L'effet suppresseur des Treg CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup> est strictement dépendant de l'engagement de leur récepteur à l'antigène, permettant leur activation (S. Sakaguchi et al. 2001). La migration des Treg vers l'intestin est dépendante de l'expression de molécules d'adressages. Parmi ces marqueurs, l'intégrine  $\alpha 4 \beta 7$ , en se fixant sur son ligand MAdCAM-1 exprimé à la surface des cellules endothéliales intestinales, semble indispensable au homing au niveau de l'intestin. En effet dans des expériences de « homing », la neutralisation de la chaîne  $\alpha 4$ , de la chaîne  $\beta 7$  ou encore de MAdCAM-1 par des anticorps neutralisants, réduit l'entrée des lymphocytes au niveau de l'intestin sans influencer leur entrée au niveau du tissu hépatique, pulmonaire ou cutanée (Hamann et al. 1994). De même, le récepteur de chemokine CCR9 permet également aux lymphocytes de se diriger vers la muqueuse intestinale en réponse à CCL25 sécrétée par les cellules épithéliales intestinales (Hadis et al. 2011; Agace 2006). En effet, le transfert adoptif de lymphocyte CD4<sup>+</sup> provenant de souris CCR9<sup>-/-</sup> ont une capacité de migration au niveau de l'intestin altérée (Stenstad et al. 2006). Enfin, une proportion importante de Treg exprime le récepteur des chimiokines CCR6 (Prince et al. 2017) et les Treg déficients en CCR6 migrent moins efficacement au niveau de l'intestin enflammé en réponse à CCL20 (Oyama et al. 2007).

L'expression de ces principaux marqueurs permet aux Treg de résider spécifiquement au niveau de l'intestin. Ces Treg tissulaires pourront donc exercer leur activité suppressive directement *in situ* (Mottet, Uhlig, et Powrie 2003).

### **iii. Importance des pTreg intestinaux : exemple de la mise en place de la tolérance orale.**

La tolérance orale est caractérisée par une absence de réponse clinique envers un allergène administré par voie orale. Il s'agit d'un mécanisme immunologique actif par lequel l'allergène n'induit pas de réponse cellulaire et humorale spécifiques (Chehade et Mayer 2005). Ceci est en lien avec l'induction en périphérie de différentes populations de cellules régulatrices. Le GALT occupe une place centrale dans les mécanismes immunologiques inhérents à la mise en place de la tolérance orale dans la mesure où il constitue le siège de la pénétration de l'allergène dans l'organisme (Fig. 11). Deux sous populations de DC de la LP sont impliquées dans la mise en place de tolérance orale : les cellules exprimant CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> et les cellules exprimant CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup> (Bogunovic et al. 2009).



Nature Reviews | Immunology

### Figure 11 : Mécanisme d'induction de la tolérance orale

Les DC de l'intestin sont uniques dans le fait qu'elles peuvent conduire à l'induction de Treg à partir de cellules FOXP3<sup>+</sup>. Ceci est conditionné par l'activation des DC par les bactéries commensales ou les antigènes alimentaires et la sécrétion de TGF- $\beta$  et d'IL-10. Les DC CD103<sup>+</sup> expriment la RALDH permettant la production d'acide rétinoïque, à partir de vitamine A fournie par l'alimentation. L'induction de Treg se produit dans les MLN et implique à la fois les récepteurs à chimiokines CCR7, CCR9 et l' $\alpha 4\beta 7$ . Les macrophages ou les DC CD103<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> sont activés par les antigènes alimentaires captés via l'émission de dendrites au travers de l'épithélium et produisent du TGF- $\beta$ , de l'IL-10 et de l'IL-27, favorisant l'induction de Tr1 et l'expansion de Treg. Ces mêmes DC peuvent également transférer l'antigène au DC CD103<sup>+</sup> afin d'induire des Treg dans les MLN. D'après Yu *et al*, 2016 (W. Yu, Freeland, et Nadeau 2016)

Les DC CD103<sup>+</sup> capturent l'antigène directement dans la lamina propria, après avoir été transporté par les cellules M ou certaines cellules épithéliales. Ces cellules expriment constitutivement le CCR7 leur permettant de migrer vers les MLN. De même, elles sont capables de produire une forte quantité de TGF- $\beta$  et expriment de façon importante les enzymes IDO et RALDH (rétinaldéhyde dehydrogénase). Cette dernière étant nécessaire à la production d'acide rétinoïque à partir de la vitamine A. Ainsi, après capture de l'antigène alimentaire dans la lamina propria, ces DC migrent dans les MLN où leur activité métabolique



leur permettent d'induire préférentiellement des Treg FOXP3<sup>+</sup> à partir de lymphocytes T naïfs (Matteoli et al. 2010). Les pTreg ainsi différenciés vont exprimer, sous l'effet de l'acide rétinoïque, l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et le CCR9, leur permettant de quitter les MLN et de rejoindre la *lamina Propria*. Ces DC CD103<sup>+</sup> sont également capables d'induire la différenciation de lymphocytes T naïfs en Tr1 FOXP3<sup>-</sup> sécrétant l'IL-10 (Bakdash et al. 2015) (Fig. 11).

Ainsi, l'induction de cellules régulatrices par les DC au niveau des MLN est une étape clé de la mise en place de la tolérance orale dans la mesure où le blocage de la migration des DC via l'utilisation de souris CCR7 KO ou l'utilisation de souris lymphadénectomisées rend impossible le développement de cette tolérance (Worbs et al. 2006). De même l'intestin constitue le site effecteur de la mise en place de la tolérance orale dans la mesure où le blocage du « homing » des Treg au niveau de l'intestin via l'utilisation de souris CCR9 KO ou d'anticorps bloquant le ligand d' $\alpha 4\beta 7$  rend impossible l'établissement de la tolérance orale (Howard L. Weiner et al. 2011). Le rôle indispensable de PP est moins clair (Spahn et al. 2002).

D'un autre côté, les DC CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup>, phénotypiquement très proches des macrophages, sont capables d'étendre des dendrites entre les cellules épithéliales, leur permettant de capturer directement l'allergène dans la lumière intestinales. Elles n'expriment pas le CCR7 et ne peuvent donc pas migrer au niveau des MLN (Schulz et al. 2009). Elles sont capables de transférer l'allergène aux DC CD103<sup>+</sup> et permettent l'induction de tolérance au travers la production d'IL-10 (Steinbach et Plevy 2014) et d'IL-27, augmentant la production d'IL-10 par les Treg (Shiokawa et al. 2009). Ainsi, après leur induction dans les MLN par les DC CD103<sup>+</sup> et leur retour au niveau de la *lamina Propria*, les Treg interagissent avec les DC CD103<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup> ce qui permet leur expansion.

Enfin, les entérocytes jouent également un rôle important dans l'induction de la tolérance orale aux allergènes. En plus d'être capables de produire de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  (Howard L. Weiner et al. 2011), les entérocytes peuvent exprimer les CMH-I et CMH-II. Ceci leur confère la faculté de prendre en charge les allergènes et de les présenter aux lymphocytes T. Cependant, ils sont dépourvus des signaux de co-stimulation, indispensables à l'activation complète des lymphocytes T (Mowat 2003). Ceci conduit à l'anergie des lymphocytes T.

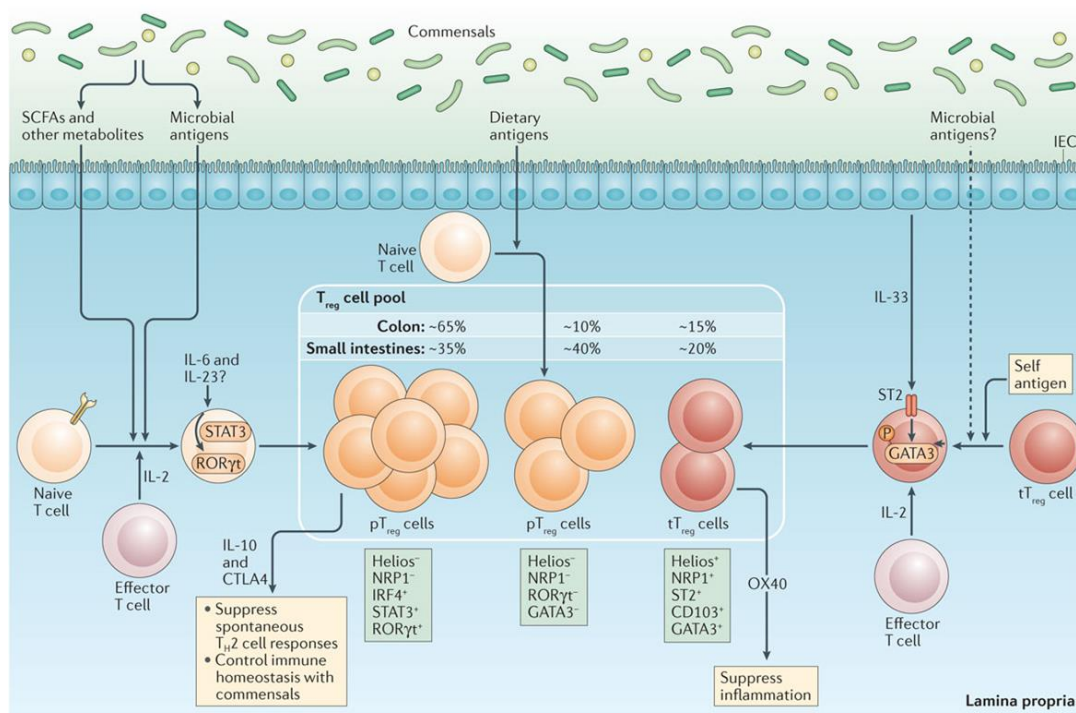
L'induction de la tolérance via l'administration mucosale de l'antigène aboutie entre autre à l'induction et l'activation ou au recrutement local de toutes les populations principales de Treg (i.e. pTreg, tTreg, Tr1, Th3). Ainsi, l'existence de Treg tissulaires permet de contrôler



les réactions inflammatoires directement *in situ*. Il existe différentes sous populations de Treg tissulaires présentes au niveau de l'intestin incluant des tTreg et des pTreg. Leurs rôles respectifs sont encore à caractériser.

#### iv. Les sous populations de Treg de l'intestin.

Les cellules régulatrices de l'intestin peuvent être divisées en plusieurs sous populations, basées sur l'expression des facteurs de transcription ROR $\gamma$ t et GATA3, avec des fonctions différentes (Fig. 12).



**Figure 12 :** Les sous populations de Treg au niveau de l'intestin

Les cellules régulatrices de l'intestin peuvent être divisées en 3 sous types différents, basés sur l'expression de RAR-related orphan receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) et de GATA-binding protein 3 (GATA3). Les Treg ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> sont majoritaires. Ils sont impliqués dans le contrôle des réponses Th2 via l'expression de CTLA-4 et la sécrétion d'IL-10. Ils sont considérés comme des Treg induits en périphérie en réponse au microbiote et à certains métabolites alimentaires type Acides Gras à chaîne courte. L'IL-6 et l'IL-23 induiraient l'expression de ROR $\gamma$ t. La deuxième sous population de Treg de l'intestin est représentée par les Treg ROR $\gamma$ t<sup>-</sup>NRP1<sup>-</sup>. Ils sont induits en périphérie par les antigènes alimentaires et ont un rôle crucial dans la suppression des réponses immunitaires contre ces antigènes. Les Treg GATA3<sup>+</sup> représentent la 3<sup>ème</sup> sous population de Treg de l'intestin. Il s'agit de tTreg ayant migré au niveau de l'intestin. Ils expriment le récepteur à l'IL-33 (ST2), les rendant capables de répondre rapidement à la libération d'IL-33 par les cellules épithéliales de l'intestin en cas d'inflammation. L'IL-33 et l'IL-2 contribuent ensemble à l'expression de GATA3 par ces Treg. GATA3 permet l'augmentation de l'expression et la stabilité d'expression de FOXP3 et contribue à la prolifération des Treg. Les Treg GATA3 suppriment les réponses inflammatoires excessives via l'expression d'OX40. D'après Tanoue et al. (Tanoue, Atarashi, et Honda 2016).

La première sous population est constituée de Treg exprimant le ROR $\gamma$ t, facteur de transcription impliqué dans la différenciation des lymphocytes Th17. Elle représente environ 65 % des Treg issus du colon et 35 % des Treg de l'intestin (B.-H. Yang et al. 2016). Les Treg ROR $\gamma$ t n'expriment pas les marqueurs de surface Helios et NRP1 et disparaissent en condition « germ-free », suggérant qu'ils sont dérivés de pTreg, induit à partir de Tconv en réponse à différents stimuli, notamment le microbiote intestinal (Sefik et al. 2015). Le développement des Treg ROR $\gamma$ t dépend largement de l'environnement cytokinique dans lequel se trouvent ces cellules. En effet, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs commencent à exprimer, *in vitro*, les facteurs de transcription ROR $\gamma$ t et FOXP3 lorsqu'ils sont stimulés sous certaines conditions associés au développement des réponses Th17 (Lochner et al. 2008). Ces précurseurs se différencient ensuite en Treg FOXP3<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ou en véritables cellules effectrices Th17 en fonction des réponses cytokiniques environnementales présentes, à savoir respectivement le TGF- $\beta$  ou les cytokines proinflammatoires comme par exemple l'IL-6, IL-21 et IL-23 (L. Zhou et al. 2008). Les Treg FOXP3<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, désignés récemment comme des Treg de type 3 (Cortes-Perez et al. 2017), expriment à haut niveau l'IL-10 et le CTLA-4, inhibant ainsi le signal de co-stimulation CD80/86 induit par les DC intestinales (Ohnmacht et al. 2015). Il a été démontré que ces Treg ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> étaient capables de supprimer les réponses T effectrices chez la souris (Tartar et al. 2010). Ils sont impliqués dans la régulation des réponses de type Th2 et allergiques (Ohnmacht et al. 2015). Lochner *et al* ont également démontré la capacité de ces Treg à supprimer les réponses inflammatoires intestinales (Lochner, Wang, et Sparwasser 2015). De façon intéressante, les Treg ROR $\gamma$ t, expriment le CCR6, favorisant le homing intestinal, et ont un rôle dans la suppression des réponses Th17 de l'intestin (Sefik et al. 2015; B.-H. Yang et al. 2016).

La deuxième sous-population de Treg intestinaux est représentée par les Treg GATA3<sup>+</sup> constituant approximativement 20 % des Treg de l'intestin. Ils expriment les marqueurs Helios et NRP1 démontrant qu'ils sont plutôt dérivés du thymus (tTreg) (Sefik et al. 2015). Les études *in vitro* montrent que l'expression de GATA3 est conditionnée par l'engagement du TCR des Treg et par un signal de co-stimulation induit par l'IL-2, permettant l'induction de l'expression de GATA3 et son maintien (Wohlfert et al. 2011). GATA-3 forme un complexe avec FOXP3 permettant une meilleure stabilité de l'expression de FOXP3. De plus, il existe une accumulation préférentielle de Treg GATA3<sup>+</sup> au niveau des tissus lors d'un processus inflammatoire (Wohlfert et al. 2011). Les Treg GATA3<sup>+</sup> du colon, représentant 15% des Treg du colon, expriment le récepteur à l'IL-33, cytokine produite par les cellules

épithéliales de l'intestin en réponse à un processus inflammatoire. Ainsi, en plus de l'engagement du TCR et de la stimulation par l'IL-2, l'activation de Treg par l'IL-33 permet la surexpression de FOXP3 et induit leur prolifération au niveau intestinal (Schiering et al. 2014). Les Treg GATA-3 expriment à haut niveau l'OX40, leur permettant de supprimer les réponses inflammatoires excessives. Le rôle important d'OX40 pour l'accumulation des Treg dans l'intestin a pu être montré par l'utilisation de souris dont la moelle osseuse a été rendue chimérique, composée de cellules sauvages CD45.1 et de cellules issues de souris KO OX40<sup>-/-</sup> CD45.2. Après la reconstitution médullaire, l'analyse des populations de Treg a montré un nombre comparable de Treg CD45.1 et de Treg CD45.2 dans les MLN, alors que dans l'intestin, seuls les Treg dérivant de souris sauvages sont présents, soulignant le rôle indispensable d'OX40 pour la migration intestinale (Griseri et al. 2010). De même, OX40 semble indispensable pour supprimer les réponses T effectrices dans un modèle de colite inflammatoire, dans la mesure où le transfert adoptif de Treg OX40<sup>-/-</sup> ne permet pas de contrôler la maladie, à l'inverse des Treg sauvages (Griseri et al. 2010).

Les Treg RORγt<sup>+</sup>NRP1<sup>-</sup>, constituant la troisième population de Treg intestinaux, représentent plus de 40% des Treg de l'intestin et environ 10% des Treg du côlon. Ils sont considérés comme des pTreg, induits par des antigènes alimentaires. Cette population de Treg n'est pas influencée par l'absence du microbiote intestinale. En revanche, cette population de Treg disparaît dans des souris « antigen free » développée par l'équipe de Surh où leur alimentation ne comporte pas d'antigène alimentaire (K. S. Kim et al. 2016). Ils ont un rôle crucial dans la suppression de la réponse immunitaire aux antigènes alimentaires et l'induction de tolérance dans la mesure où les souris « antigen-free » ont une sensibilité à l'allergie alimentaire exacerbée (K. S. Kim et al. 2016).

Ainsi, ces 3 populations ont des rôles bien distincts : les Treg GATA3<sup>+</sup> NRp1<sup>+</sup> permettent de maintenir l'homéostasie locale en régulant les réponses inflammatoires, les Treg RORγt<sup>+</sup>NRp1<sup>-</sup> auraient pour but de réguler les réponses contre le microbiote intestinal et les antigènes alimentaires et enfin, les Treg RORγt<sup>-</sup>NRp1<sup>-</sup> permettent de maintenir une tolérance orale aux allergènes alimentaires. Ces deux dernières populations de lymphocytes T régulateurs constituent ainsi des populations particulièrement intéressantes dans notre étude.

### **3. Les différentes cibles thérapeutiques de l'allergie alimentaire et le rôle des lymphocytes T régulateurs dans allergie.**

Comme vu précédemment, la réponse allergique est une réponse immunologique complexe, impliquant différentes populations cellulaires et différentes réponses cytokiniques. L'étude de la physiopathologie de l'allergie, vu plus haut, induisant une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques impliqués, permet de définir les différents points clés qu'il est potentiellement envisageable de contrôler afin de réguler les réponses allergiques.

En premier lieu, l'allergie est une réponse Th2 exacerbée. Ainsi toute stratégie permettant d'inhiber le développement d'une réponse Th2 serait potentiellement bénéfique afin de traiter les allergies. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement disponible, ni en cours de développement, en raison du caractère multifactoriel de mise en place de la réponse Th2 allergique. Aussi, le paradigme du déséquilibre Th2 devient rapidement insuffisant pour expliquer l'immuno-pathologie de l'allergie (Magnan et Humbert 2005). Durant les premières phases de l'allergie, il est avancé un défaut de l'activation des lymphocytes Treg pour expliquer l'activation importante des lymphocytes Th2 (Magnan et Humbert 2005). En effet, les Treg ont un rôle crucial dans la régulation des réponses Th2 (Venuprasad et al. 2010). Martin *et al.* ont démontré l'implication des tTreg dans le contrôle de l'allergie en utilisant des souris humanisées NOD/SCID. Après transfert de PBMC et activation des Treg, seules les souris ayant reçu les cellules des patients sains ont résisté au déclenchement de l'allergie alors que les souris ayant reçu les PBMC des patients allergiques ont été malades. Ces résultats suggèrent l'existence d'un défaut fonctionnel de tTreg chez les patients allergiques, ne permettant plus de contrôler la réponse Th2 (Martin et al. 2012). Aussi, des études récentes ont démontré le rôle particulièrement important des pTreg dans la régulation Th2 (Josefowicz et al. 2012). De même, les Tr1 suppriment de manière similaire la réponse allergique Th2 en diminuant la production d'IL-4 par les cellules T effectrices via la sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  et en exprimant le CTLA4 et PD-1. Selon les observation d'Akdis, leur nombre serait réduit dans le sang périphérique des sujets allergiques (M. Akdis et al. 2004). D'autres types de Treg sont impliqués dans le contrôle des réponses allergiques. Notamment, plusieurs auteurs ont démontré que les Treg ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> induisent une régulation des manifestations inflammatoires de l'intestin, en contrôlant la réponses Th2 (Ohnmacht et al. 2015) et Th17 (Sefik et al. 2015), leur conférant un rôle protecteur dans l'allergie. Aussi, l'invalidation

conditionnelle de l'IL-10 spécifiquement dans les Treg, entraîne une susceptibilité accrue des animaux à l'induction de l'allergie (Rubtsov et al. 2008) et est suffisante pour induire une colite chez ces souris (Rubtsov et al. 2008), suggérant le rôle primordiale des Tr1 dans la régulation de l'hypersensibilité.

De la même façon, l'IL-5 fut longtemps considérée comme une cible intéressante dans la régulation des réponses allergiques. Impliquée dans le recrutement des populations responsables de l'inflammation locale allergique, sa neutralisation représente donc une piste prometteuse. De la même façon, des traitements symptomatiques peu efficaces contribuent à bloquer la dégranulation des effecteurs, constituant une autre cible potentiellement intéressante à neutraliser afin de traiter l'allergie. Cependant plutôt que de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'utilisation des Treg pourraient servir d'alternative prometteuse dans la mesure où ils contribuent à contrôler l'allergie en inhibant directement le recrutement local et la dégranulation des mastocytes et des basophiles via une interaction OX40-OX40L (Gri et al. 2008) et en diminuant l'expression du FcεRI à la surface des cellules effectrices (Kashyap et al. 2008).

Les thérapies visant à bloquer les IgE, acteur central dans les phénomènes allergiques, présentent un intérêt certain dans l'allergie alimentaire. Aussi, les Treg contribuent au contrôle de l'allergie en inhibant la synthèse d'IgE spécifiques et en induisant la production d'IgG4 spécifiques (F. Meiler et al. 2008) et d'IgA, deux classes d'immunoglobulines réputées protectrices dans l'allergie. Ce changement d'isotype d'immunoglobuline, observé notamment lors des différents protocoles d'immunothérapies spécifiques, serait induit par les tTreg, mais également par les Tr1 (F. Meiler et al. 2008) sous la dépendance de l'IL-10 et du TGF-β. En effet, la sécrétion d'IL-10 par les Tr1 permet l'inhibition de la synthèse d'IgE (Punnonen et al. 1993) et le switch vers les IgG4, tandis que le TGF-β permet l'induction de la synthèse d'IgA (Cazac et Roes 2000).

Les molécules d'activation des lymphocytes T et plus particulièrement les molécules de co-stimulation ont un rôle important dans l'initiation et l'entretien des réponses allergiques. Différentes stratégies ciblant ces molécules sont déployées, notamment le CD28, molécule de surface des lymphocytes T qui se lie aux CD80 et CD86 présents sur les cellules présentatrices d'antigènes et qui peut être bloqué par la molécule régulatrice CTLA-4. Là encore, les Treg sont capables de neutraliser ces signaux de co-stimulation et d'inhiber ainsi les réponses allergiques notamment les Tr1 comme décrit plus haut (K. Wu et al. 2007).

En agissant sur l'ensemble des checkpoints de l'allergie, à savoir le contrôle de la synthèse d'IgE, la régulation de la balance Th1/Th2 ainsi que la diminution du recrutement et de la dégranulation des effecteurs, les Treg se situent au centre du processus de régulation de l'allergie. Ainsi, l'amplification thérapeutique des Treg constitue une alternative très intéressante dans le but de traiter les maladies allergiques. Cependant les différentes difficultés techniques inhérentes à la production de Treg de grade clinique, nous orientent préférentiellement vers l'utilisation de l'IL-2 faible dose. Ainsi, tester l'administration d'IL-2 faible dose dans un modèle préclinique d'allergie alimentaire n'a jamais encore été réalisée et constitue le principal objectif de cette thèse.

## Objectifs et principes expérimentaux

Ce travail de thèse avait un double objectif : (i) établir la preuve de concept de l'utilisation d'IL-2 faible dose comme outil thérapeutique de l'allergie dans une étude préclinique utilisant un modèle murin d'allergie alimentaire à l'ovalbumine ; (ii) étudier les mécanismes immunologiques associés à la protection induite sur le long terme suite à l'administration d'IL-2 faible dose.

### 1. Preuve de concept de l'utilisation de l'IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie alimentaire.

Au cours de cette étude, nous avons développé un modèle murin d'allergie alimentaire afin d'évaluer l'effet préventif et curatif de l'administration de l'IL-2 faible dose. Différentes voies d'administration de l'IL-2 ont été testées.

#### - Modèle murin d'allergie alimentaire

Pour étudier le potentiel thérapeutique de l'IL-2 faible dose dans un modèle murin d'allergie alimentaire, notre équipe s'est appuyée sur le modèle de l'allergie à l'OVA établi par Yamashita *et al.* (Yamashita et al. 2012), modifiant la fréquence et la dose d'OVA administrée. Brièvement, des souris BALB/c, modèle classique pour étudier les réponses Th2, sont sensibilisées par deux administrations intrapéritonéales (ip) d'OVA en présence d'adjuvant de type hydroxyde d'aluminium (Alun ; adjuvant pro-Th2) à une semaine d'intervalle. Dix jours plus tard, l'allergie alimentaire est déclenchée par des administrations orales d'OVA. L'allergie est alors quantifiée selon un score clinique prenant en considération la diarrhée et l'aspect du pelage, et confirmée par une chute de température rectale. L'immunothérapie par IL-2 a été mise en place par des cures intrapéritonéales de 5 jours d'IL-2 faible dose (50 000 UI / jour), administrées à différents instants du protocole (traitement préventif *versus* traitement curatif). Le potentiel effet Treg dépendant du traitement par l'IL-2 a été attesté dans un modèle murin d'allergie dans lequel les Treg ont été éliminés par l'administration d'un anticorps anti-CD25 déplétant (PC61). Nous avons également testé l'efficacité de l'IL-2 administrée par voie orale, sublinguale ou intra-rectale dans la mesure où ces muqueuses sont des sites privilégiés d'induction de tolérance.

- Faible dose d'IL-2 : Proleukin®

Le Proleukin®, Interleukine 2 recombinante humaine, a été utilisé dans toutes nos expériences. Des études préalables réalisées chez la souris ont montré que l'utilisation d'une cure de 25 000 UI / j pendant 5 jours consécutifs permet une activation et une expansion efficace des Treg sans induction de lymphocytes T effecteurs (Teff, Tconv activés) (données non publiées). Une étude dose/réponse réalisée au sein de notre laboratoire a montré qu'une dose de 50 000 UI / jour pendant 5 jours permettait une induction et une activation plus efficace des Treg (données non publiées), non-associée à une augmentation des Teff activés, contrairement aux doses supérieures (100 000 UI / jour). Nous avons donc décidé d'utiliser la dose de 50 000 UI / jour pendant 5 jours dans l'ensemble de cette étude.

## **2. Mécanismes immunologiques de l'immunothérapie par IL-2.**

Nous avons voulu, dans un premier temps, caractériser les mécanismes immunomodulateurs locaux inhérents à l'administration d'IL-2 faible dose sur les différentes populations immunitaires impliquées dans l'allergie. Par ailleurs, les réponses cellulaires et humorales spécifiques de l'antigène et l'effet de l'IL-2, quant au recrutement local, l'activation et la dégranulation des populations effectrices de l'allergie, ont été étudiés dans notre modèle murin d'allergie alimentaire.

- Caractérisation de l'effet immunomodulateur local de l'IL-2 faible dose

Des souris BALB/c naïves (non-sensibilisées) ont été traitées par une cure de 5 jours d'IL-2 faible dose avec l'objectif d'évaluer l'effet sur les différentes populations cellulaires impliquées dans l'allergie notamment au niveau des tissus et organes lymphoïdes associés au tube digestif. Ainsi, une analyse phénotypique des cellules lymphocytaires de l'intestin (IEL et LPL), des PP et des MLN a été réalisée par cytométrie en flux. Notamment, l'effet de faibles doses d'IL-2 sur les Treg, les Teff, les ILC2, les éosinophiles, les NK, et les lymphocytes B naïfs et mémoires a été analysé.

- Analyse des réponses immunologiques induites par l'administration d'IL-2

L'effet immunomodulateur de l'IL-2 sur les réponses spécifiques de l'antigène a été évalué chez les souris BALB/c sensibilisés et challengés avec l'OVA. Au cours de cette étude, nous avons analysé les réponses T spécifiques à l'OVA en fin de protocole chez les



souris protégées, en se concentrant sur la réponse locale et sur les organes lymphoïdes associés à la muqueuse digestive et impliqués dans les phénomènes de tolérance orale. Notamment, la réponse Th1 et la réponse Th2 ont été étudiées par ELISpot et ELISA après 24 à 48h de restimulation spécifique par l'antigène au niveau des MLN et des PP, mesurant la sécrétion d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-4 et d'IL-5, respectivement. La réponse intestinale a été étudiée par RT-qPCR en quantifiant les transcrits cytokiniques présents dans l'intestin et signant les réponses Th1, Th2 et Treg.

L'effet de l'IL-2 sur la réponse humorale a pu être apprécié en quantifiant à différents instants du protocole (après la sensibilisation mais également en fin de protocole, après les inductions par l'antigène) dans le sérum et les fèces les anticorps spécifiques produits. La quantification des réponses IgE, IgA, IgG2a et IgG1 dans ces différents compartiments a été réalisée par ELISA sandwich spécifique de l'OVA. La quantité obtenue a été rapportée à une gamme spécifique afin de déterminer leur concentration, ou bien un titre a été calculé en rapportant les valeurs obtenues chez les souris sensibilisées aux valeurs obtenues chez des souris naïves.

- Etude de l'effet de l'IL-2 sur les populations effectrices de l'allergie

Un test d'activation *in vitro* des basophiles, mesurant l'expression membranaire par cytométrie en flux du CD63 et CD200R après stimulation par l'antigène, a été réalisé pour évaluer la réactivité à l'allergène.

Par ailleurs, l'action sur les mastocytes a été étudiée de deux façons. Dans un premier temps, le mMCPT-1, protéase majoritaire sécrétée par les mastocyte lors d'une réaction allergique, a été mesuré dans le sérum des souris, 30 minutes après le déclenchement des signes cliniques. Dans un second temps, le recrutement de mastocytes au niveau de l'intestin a été évalué par histologie sur coupe de duodénum incluse en paraffine et colorées au bleu de toluidine.

## Résultats

Dans une première partie, nous avons pu établir la preuve de concept de l'utilisation d'IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie alimentaire en utilisant un modèle murin d'allergie à l'ovalbumine (OVA). Ont également été abordés, les régulations immunologiques des réponses spécifiques de l'antigène associées à la protection induite par l'IL-2. Cependant, les résultats obtenus nous ont posé un certain nombre de questions mécanistiques, dont les hypothèses seront abordées dans la deuxième partie des résultats.

## **Première partie : Preuve de concept de l'utilisation de l'IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie alimentaire.**

### **Article 1: Low-dose interleukin-2 induces regulatory T-cell mediated control of experimental food allergy**

Benjamin Bonnet, James Vigneron, Béatrice Levacher, Thomas Vazquez, Fabien Pitoiset, Faustine Brimaud, Guillaume Churlaud, David Klatzmann, Bertrand Bellier.

Article publié dans la revue *Journal of immunology* 197(1):188-98. July 2016 doi: 10.4049/jimmunol.1501271.

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, les lymphocytes T régulateurs (Treg), cellules permettant le maintien de l'homéostasie immunitaire, sont au centre du processus de régulation des réponses allergiques. Il a été démontré qu'il existait un déficit quantitatif et qualitatif de ces cellules chez les patients allergiques (Tableau 2) et que les manifestations allergiques étaient exacerbées en l'absence de Treg (Torgerson et al. 2007). Le développement d'immunothérapies utilisant les Treg constitue une alternative thérapeutique prometteuse afin de prévenir et traiter les maladies allergiques en particulier, l'allergie alimentaire. L'IL-2, cytokine du système immunitaire permettant la survie, l'expansion et la différenciation des lymphocytes, notamment les Treg lorsqu'elle est utilisée à faible dose, constitue une avancée thérapeutique majeure et permet de s'affranchir des difficultés techniques de la thérapie cellulaire.

Dans cette étude, nous avons souhaité mettre à profils les propriétés immunorégulatrices de l'IL-2 utilisée à faible dose, afin d'induire spécifiquement des Treg *in vivo*. Nous avons dans un premier temps caractérisé l'effet immunorégulateur local de l'IL-2 chez des souris BALB/c naïves, documentant l'effet local au niveau de la muqueuse intestinale. Après avoir développé un modèle murin d'allergie alimentaire à l'OVA, nous avons ensuite étudié l'efficacité protectrice de l'administration de l'IL-2 faible dose dans plusieurs schémas thérapeutiques, préventif puis curatif, contre les manifestations cliniques de l'allergie alimentaire. Enfin, les mécanismes immunologiques associés à la protection ont été étudiés.

## Immunotherapy Research Reagents

**Full** • 155 molecules  
• 12 species  
• 8,000 products

**Diverse** • Immune checkpoints  
• Cytokines  
• Tumor antigens

**Highlighted** • Superior quality  
• Lowest price  
• Quick shipping



Proteins | Antibodies | Genes | ELISA Kits  
Web: [www.sinobiological.com](http://www.sinobiological.com)  
Learn More>>



## Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell–Mediated Control of Experimental Food Allergy

This information is current as of June 11, 2017.

Benjamin Bonnet, James Vigneron, Béatrice Levacher, Thomas Vazquez, Fabien Pitoiset, Faustine Brimaud, Guillaume Churlaud, David Klatzmann and Bertrand Bellier

*J Immunol* 2016; 197:188-198; Prepublished online 3 June 2016;

doi: 10.4049/jimmunol.1501271

<http://www.jimmunol.org/content/197/1/188>

**Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2016/06/01/jimmunol.1501271.DCSupplemental>

**References** This article cites 48 articles, 11 of which you can access for free at:  
<http://www.jimmunol.org/content/197/1/188.full#ref-list-1>

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

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

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

*The Journal of Immunology* is published twice each month by  
The American Association of Immunologists, Inc.,  
1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852  
Copyright © 2016 by The American Association of  
Immunologists, Inc. All rights reserved.  
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



# Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell–Mediated Control of Experimental Food Allergy

Benjamin Bonnet,<sup>\*,†,‡</sup> James Vigneron,<sup>\*,†</sup> Béatrice Levacher,<sup>\*,†</sup> Thomas Vazquez,<sup>\*,†</sup> Fabien Pitoiset,<sup>\*,†</sup> Faustine Brimaud,<sup>\*,†</sup> Guillaume Churlaud,<sup>\*,†,‡</sup> David Klatzmann,<sup>\*,†,‡</sup> and Bertrand Bellier<sup>\*,†,‡</sup>

Regulatory T cells (Tregs) are pivotal for maintenance of immune self-tolerance and also regulate immune responses to exogenous Ags, including allergens. Both decreased Treg number and function have been reported in allergic patients, offering new therapeutic perspectives. We previously demonstrated that Tregs can be selectively expanded and activated by low doses of IL-2 (ld-IL-2) inducing immunoregulation without immunosuppression and established its protective effect in autoimmune diseases. In this study, we evaluated the ability of ld-IL-2 to control allergy in an experimental model of food allergy. Ld-IL-2 induced Treg expansion and activation that elicited protection against clinical manifestations of food allergy in two mouse models with OVA and peanut. This clinical effect was lost in Treg-depleted mice, demonstrating the major contribution of Tregs in ld-IL-2 efficacy. Mechanistic studies further indicated that protection from allergy could be explained by a Treg-dependent local modification of the Th1/Th2 balance and an inhibition of mast cell recruitment and activation. Preventive and therapeutic effects of ld-IL-2 were observed over a 7-mo-period, highlighting its long-term efficacy. This study demonstrated that ld-IL-2 is efficient to prevent and to treat allergic immune responses, and thus represents a promising therapeutic strategy for managing allergic diseases. *The Journal of Immunology*, 2016, 197: 188–198.

**T**hymic-derived CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) account for ~5–10% of circulating CD4<sup>+</sup> T cells, suppress autoreactive lymphocytes, and control innate and adaptive immune responses in mice and humans (1, 2). Treg impairment is associated with loss of tolerance, autoimmunity, and also allergy (3). Indeed, allergy is one of the clinical manifestations of patients with the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome, a Treg deficit caused by mutations in *FOXP3* (4). Dysfunctional Tregs have been also identified in allergic individuals (5–7). Both decreased Treg numbers and function have been reported, particularly in children at high risk for allergic diseases based on maternal atopy compared with children at low risk (8). Studies investigating the pathophysiology of food allergy point to a functional role of Tregs in the development of

normal tolerance to food allergens and the spontaneous resolution of milk allergy (9, 10).

In support for a role of Tregs in allergy, the induction of Tregs has been also demonstrated in successful allergen-specific immunotherapy (AIT), where they suppressed almost all aspects of Th2-mediated hypersensitivity (11, 12). In addition, transfer of Tregs inhibited and reversed airway hyperresponsiveness, gut inflammation, and related Th2 responses in murine models (13–15). Collectively, these data highlight that allergic diseases result from an inappropriate balance between allergen-activated effector Th2 cells and Tregs, and that treatments to enhance Treg responses might be useful in prevention and treatment of allergic diseases.

IL-2 is critical for Treg development, expansion, activity, and survival (16). IL-2 was originally discovered as a growth factor for activated T cells in vitro and has been extensively used to boost immune responses in patients with tumors (17) or chronic infection such as HIV (18). More recently, it was shown that ld-IL-2 increase specifically Treg numbers and function, and may be of therapeutic benefit in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. Pioneer clinical trials revealed the potential benefit of ld-IL-2 administration in alleviating chronic graft versus host disease (19, 20) and chronic hepatitis C–mediated vasculitis (21). This was then confirmed in alopecia areata (22) and other autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus (23), confirming the potential of this approach. IL-2 is not only required for the survival of Foxp3<sup>+</sup> Tregs in the periphery, but also appears to be critical for maintenance of their suppressive functions (24). Thus, we sought to evaluate ld-IL-2 treatment in allergy control. Our results show that ld-IL-2 induces specific Treg expansion and activation, including in gut and lymphoid-associated tissues, which elicit protection against clinical manifestations of food allergy in mice. We demonstrated both preventive and therapeutic long-term effects of ld-IL-2. The mechanisms underlying this efficacy depend on the expansion and activation of Tregs that modify the Th1/Th2 balance and inhibit mast cell activation.

<sup>\*</sup>Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 6, UMR5 959, I<sup>3</sup>, F-75013 Paris, France; <sup>†</sup>INSERM, UMR5 959, I<sup>3</sup>, F-75013 Paris, France; and <sup>‡</sup>Service de Biothérapies et Centre d'Investigation Clinique en Biothérapie, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 75013 Paris, France

ORCID: 0000-0002-9315-0010 (B. Bonnet); 0000-0001-8014-5725 (J.V.); 0000-0002-6415-6712 (B.L.); 0000-0002-4140-498X (T.V.); 0000-0001-9950-4011 (F.P.); 0000-0002-7038-2978 (F.B.); 0000-0003-1343-752X (G.C.); 0000-0002-0054-3422 (D.K.); 0000-0001-8921-5478 (B. Bellier).

Received for publication June 4, 2015. Accepted for publication April 29, 2016.

This work was supported by Université Pierre et Marie Curie, INSERM, and the French state funds managed by the Agence Nationale de la Recherche within the Programme d'Investissements d'Avenir under reference ANR-11-IDEX-0004-02.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Bertrand Bellier, UMR5 959, Bâtiment Cervi, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. E-mail address: bertrand.bellier@upmc.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AIT, allergen-specific immunotherapy; Alum, aluminum hydroxide; ILC2, type 2 innate lymphoid cell; ld-IL-2, low dose of IL-2; MLN, mesenteric lymph node; mMCP-1, murine mast cell protease type 1; NS, nonsensitized mice; p.o., oral; PP, Peyer's patch; pre-C, between mice sensitization and challenge; pre-S, before mice sensitization; SFU, spot-forming unit; SI, small intestine; Teff, effector T cell; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2016 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/16/\$30.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1501271



## Materials and Methods

### Mice

Seven-week-old BALB/C (AnNR/J) female mice were purchased from Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). 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 local ethics animal committee. Mice were treated daily by i.p. or oral (p.o.) administration with the human rIL-2 (Proleukin; Novartis) during 5 consecutive days at the dose of 50,000 IU/injection in 200 or 100  $\mu$ l, respectively.

### Development of intestinal allergic inflammation in mice

**OVA model.** Based on published procedures (15) with specific modifications, BALB/c mice were sensitized twice at 1-wk interval by i.p. injection of 10  $\mu$ g OVA (Ova A5503; Sigma-Aldrich) mixed with 500  $\mu$ g aluminum hydroxide (Alum) gel (AlH<sub>3</sub>O<sub>3</sub>; Sigma) or PBS mixed with Alum as control (nonsensitized mice [NS]). Allergy was then induced 10 d later by OVA p.o. administrations (20 mg/mouse), five times within a 10-d period. Severity of allergic response was assessed 30–45 min after the last induction by measuring changes in body temperature using a rectal thermometer (Biosseb, Vitrolles, France) and by evaluating clinical score (component of the severity of diarrhea graded from 0 to 3 points and appearance of hirsute pelage marked out 0–2 points).

**Peanut model.** Crude peanut extract was prepared from defatted raw flour as previously described (25). Mice were sensitized i.p. three times at 1-wk interval with 500  $\mu$ g peanut extract in 500  $\mu$ g Alum. Control groups received PBS plus 500  $\mu$ g Alum. Mice were then orally challenged with peanut extract (15 mg) every 2 d for a total of seven challenges. Severity of allergic response was assessed 30–45 min after the last challenge by measuring body temperature drops and clinical symptoms including: 1) repetitive mouth/ear scratching, 2) piloerection, 3) puffiness around eyes or mouth/eye edema, 4) decreased activity/lethargy, 5) diarrhea, and 6) death. Each clinical sign was noted with a score of 1; the maximum score per mouse is 6.

### In vivo Treg depletion

Mice received two i.p. injections of 250  $\mu$ g PC61 Ab (anti-CD25; Bio X Cell) at 3-d interval before OVA sensitization or challenge. As control, mice were treated with PBS or isotype (Antibodies Online). Blood samples were collected at day 10 post-PC61 treatment to control Treg depletion by flow cytometry.

### Isolation of immune cells

Spleens were isolated and dissociated in PBS 5% FCS. RBCs were lysed with 1 ml ammonium-chloride-potassium buffer and then washed with 9 ml PBS 5% FCS. Mesenteric lymph nodes (MLNs) and Peyer's patches (PP) were isolated and then digested with 0.46 mg/ml Liberase TM and 0.1 mg/ml DNase (both from Roche Applied Science) in complete RPMI 1640 20% FCS medium for 10 min and filtered. Lamina propria lymphocytes from small intestine (SI) were isolated as previously described with minor modifications (26). In brief, SI was harvested and PP were removed. The tissue was then cut in small pieces and incubated with 10  $\mu$ g/ml Liberase TM, 0.1 mg/ml DNase, and 0.5 mg/ml hyaluronidase (all from Roche Applied Science) for 25 min at 37°C in a shaker (150 rpm). The tissues were smashed, passed through a 70- $\mu$ m cell strainer, and washed in complete RPMI 1640 3% FCS. Cells were centrifuged at 1300 rpm for 7 min at 4°C, washed again, passed through a 40- $\mu$ m cell strainer, and finally suspended in complete RPMI 1640 20% FCS medium.

### Flow cytometry

Isolated cells were stained with the following Abs at predetermined optimal dilutions for 20 min at 4°C: CD45-PETR, B220-FITC, IgM-allophycocyanin, IgD-PeCy7, SiglecF-PE, streptavidin-e780 (eBioscience), and IgE-biotin (Southern Biotech) to analyze B cells/eosinophils; Live Dead-e780, CD45-PETR, CD49b-FITC, FcR1-PeCy7, c-Kit-allophycocyanin, B220-e450, SiglecF-PE, CD3-HorizonV500, NkP46-AlexaFluor700 (eBioscience) to analyze mast cells and NK cells; and CD45-PETR, CD3-PE, CD8-Alexa700, CD4-HorizonV500, CD25-PeCy7, GITR-PE (eBioscience), and ICOS-allophycocyanin (Biolegend) to analyze T cells. Intracellular detection of Foxp3-e450 (eBioscience), CTLA4-biotin (eBioscience), and Ki67-FITC (eBioscience) were performed on fixed and permeabilized cells using a CytoFix/CytoPerm kit buffer (eBioscience). Cells were acquired on an LSR II (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo software (Tree Star). Dead cells were excluded by forward/side scatter gating. Tregs were defined as Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells, activated Tregs as ICOS<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells, and activated effector T cells (Teff) as CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells.

Memory and naive B cells were defined as IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> and IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> cells among B220<sup>+</sup> cells, respectively. Eosinophils and mast cells were characterized as SSC<sup>hi</sup>CD45<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup> and FcR1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>, respectively.

### In vitro basophil activation assay

Heparinized blood sample was collected 2 d after the last OVA p.o. administrations and erythrocytes were lysed. Cells were stimulated with RPMI 1640 (negative control), 500 ng/ml anti-IgE (positive control; Southern Biotech), or 1  $\mu$ g/ml OVA for 2 h at 37°C. Cells were then stained with CD45-PETR, CD49b-FITC, FcR1-PeCy7, and IgE-biotin to identify the basophil population and CD63-allophycocyanin (eBioscience) to measure degranulation.

### ELISPOT assays

OVA-specific production of IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-5 were determined by murine ELISPOT assay (Mabtech, Nacka Strand, Sweden). In brief,  $5 \times 10^5$  cells/well (or  $2 \times 10^5$  for IFN- $\gamma$ ) were restimulated for 48 h in duplicates at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> with 100  $\mu$ g OVA protein (0.5 mg/ml final). Medium alone and Con A (Sigma) at 2  $\mu$ g/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  $10^6$  cells, represent the mean of duplicates.

### ELISA assays

To measure murine mast cell protease type 1 (mMCP-1) levels, we harvested blood samples 30 min after the last OVA challenge and isolated sera by centrifugation. Samples were frozen and kept at -20°C until use. Level of mMCP-1 in serum was measured according to the manufacturer's recommendations using specific mouse ELISA kits (eBioscience).

IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-5 secretion levels were measured by murine ELISA assays (eBioscience) in supernatants of cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) cultured during 72 h in 96-well plates (Nunc, Denmark) in complete RPMI 1640 with 100  $\mu$ g OVA (0.5 mg/ml final).

OVA-specific IgE titers were quantified in serum of sensitized mice by ELISA. OVA (500 ng/well) was coated in flat-bottom, 96-well plates (Nunc, Denmark) at 4°C overnight. After washing and blocking nonspecific binding sites with PBS + 1% BSA for 1 h at room temperature, 100  $\mu$ l diluted serum samples were added to each well and incubated for 2 h at room temperature. OVA-specific IgE were detected with biotinylated anti-IgE (Southern Biotech) and revealed with peroxidase-conjugated streptavidin (Sigma-Aldrich) and TMB at room temperature for 5 min. The reaction was stopped by adding 100  $\mu$ l HCl (1M), and the OD was read at 450 nm using an automatic ELISA plate reader (DTX 880, Multimode detector; Beckman Coulter).

### Intestine quantitative RT-PCR

Segments of duodenum were flushed with PBS 5% FCS and immersed in 1 ml RNA-later (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -80°C. For RNA extraction, total tissues were transferred in 1 ml TRIzol Reagent (Life Technologies, France), and disruption and homogenization were done with TissueLyser II (Qiagen). Total RNA was isolated by using RNeasy Mini Kits (Qiagen). cDNA was generated using SuperScript III (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) with Fast Master mix (Life Technologies). The probe IDs are: m1, TNF- $\alpha$ : Mm00443258\_m1, IFN- $\gamma$ : Mm01168134\_m1, IL-4: Mm00445259\_m1, IL-5: Mm00439646\_m1, IL-6: Mm00446190\_m1, IL-10: Mm00439614\_m1, IL-12p40: Mm01288992\_m1, IL-13: Mm00434204\_m1, 18S: Mm03928990\_g1, and GAPDH: Mm99999915\_g1. PCRs were performed in triplicate, and the mRNA levels were normalized to that of GAPDH and 18S mRNA levels. Gene expressions in control and Id-IL-2-treated groups were expressed as relative transcript abundance, relative to the GAPDH reference gene.

### Histology

One centimeter length of duodenum was removed and immersed in 4% formaldehyde buffer. Tissues were further dehydrated in alcohol solutions using an automatic tissue processor (STP 120; Microm Microtech, Francheville, France) and included in paraffin. Transverse sections were cut at 4 mm by HM340E microtome (Thermo Scientific). Sections were stained with toluidine blue, and mast cells were visualized with a Leica DMRBE microscope. A total of four sections per group were randomly analyzed (original magnification  $\times 400$ ), and results were expressed as number of mast cells per millimeter.

### 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  $*p < 0.05$  taken as statistical significance ( $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). Statistical significances for long-term ld-IL-2 therapeutic effect were evaluated using one-way ANOVA test with  $*p < 0.05$  taken as statistical significance ( $***p < 0.001$ ).

## Results

### *Ld-IL-2 treatment induces expansion and activation of Tregs in spleen and GALTs*

We evaluated the effect of ld-IL-2 on immune cell populations at various locations, focusing mainly on the GALTs. BALB/c mice were injected daily for 5 d with 50,000 IU IL-2 per injection or PBS as a negative control. CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells, B cells, Tregs, and Teff were monitored in spleen, MLN, PP, and SI mucosa. We observed that ld-IL-2 had no significant impact on CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cell, and B cell populations in spleen, PP, and SI in terms of percentages and absolute numbers (Fig. 1A). Only a significant expansion of total cells in MLN was observed in ld-IL-2-treated mice, which did not affect the relative values of B, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 1A). As expected, ld-IL-2 induced expansion of total CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells (Fig. 1B, upper panels), Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>; data not shown), and CD8<sup>+</sup> Tregs (CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>; Supplemental Fig. 1) in the different organs. Interestingly, the highly suppressive ICOS<sup>+</sup> Tregs (27) were robustly expanded in percentage (Fig. 1B, 1C) and absolute number (data not shown) in local and peripheral lymphoid tissues. Ld-IL-2 induced both Treg proliferation and activation as shown by a significant increase of the proportion of Ki67<sup>+</sup>, ICOS<sup>hi</sup>, and CTLA-4<sup>+</sup> Tregs in spleen and MLN (Fig. 1E). In contrast, ld-IL-2 had no significant impact on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Teff, except a moderate but significant increase in spleen (Fig. 1C). Nevertheless, the Treg/Teff ratio was significantly increased in all organs of treated mice as compared with control subjects (Fig. 1D). Importantly, other cell populations such as mast cells, eosinophils, type 2 innate lymphoid cells (ILC2), naive B cells, or IgE<sup>+</sup> B cells are not significantly expanded under ld-IL-2 except for moderate eosinophilia in spleen and NK cells (Supplemental Fig. 1). A small increase of IgE<sup>+</sup> B cells in spleen and mast cells in SI were also observed in IL-2-treated mice but at lower levels than allergic mice. Taken together, these results show that ld-IL-2 induces expansion and activation of Tregs in naive mice, notably in gut-associated tissues.

### *Effective induction of food allergy in OVA-sensitized mice*

A murine food allergy model with high degree of anaphylaxis was established by repeated p.o. administration of OVA protein in OVA-sensitized mice (Fig. 2). Severe allergic reactions were observed in sensitized mice and scored based on diarrhea and fur characteristics (Fig. 2A). A significant decrease in body temperature was also induced in OVA-sensitized mice and was positively correlated with the severity of allergic symptoms (Fig. 2A, 2B). Elevated mMCPT-1 levels were also detected in serum of sensitized mice after OVA challenges and can be related with an increase of mast cells in the gut (Fig. 2C). The robustness of this food allergy model was also evidenced by the severe allergic reactions observed in sensitized mice when they were challenged 30 or 60 d after the last sensitization (data not shown). Moreover, a strong systemic and local Th2 bias was observed in OVA-sensitized mice as shown by high levels of IL-4- and IL-5-secreting cells in spleen, MLN, and PP as compared with the NS (Fig. 2D and data not shown). We also detected OVA-specific IgE Abs in serum and feces in sensitized mice that can be related to a significant increase of IgE<sup>+</sup> memory B cells in allergic mice compared with NS (Fig. 2E). Taken together, these results show that our protocol is effective to establish food allergy with a high degree of anaphylaxis and strong Th2-biased immune responses.

### *Ld-IL-2 treatment prevents food allergy in OVA and peanut allergy models*

We first investigated the preventive efficacy of ld-IL-2 in the OVA-specific allergy model. Mice were daily i.p. injected with IL-2 or PBS as control for 5 consecutive days and then sensitized and challenged with OVA according to our protocol. We observed that i.p. ld-IL-2 prevents food allergy because 90% of IL-2-treated mice were fully protected (score  $\leq 2$ ), whereas control mice had severe allergic reactions with a median score of 5 (Fig. 3A). The protective effect of ld-IL-2 was confirmed by the prevention of body temperature decline in IL-2-treated mice in contrast with PBS-treated controls (Fig. 3A) and a significant decrease of serum levels of mMCPT-1 (Fig. 3B) that were both positively correlated ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.746$ ). Notably, the protective effect was robust because IL-2-treated mice were still protected against severe hypothermia (temperature declines  $>2^{\circ}\text{C}$ ) after repeated OVA challenges (Fig. 3C).

Protective effect of ld-IL-2 was also demonstrated in a second experimental model of food allergy using peanut protein extract as allergen and using specific scoring system based on anaphylactic symptoms to measure the severity of allergic reactions (Fig. 3D and *Materials and Methods*). We observed that IL-2-treated mice were protected against peanut allergy because very few mice presented anaphylactic symptoms, whereas pruritus, piloerection, swollen eyes, lethargy, and diarrhea were observed in the PBS group after peanut extract challenge. Absence of temperature decline in IL-2-treated mice confirmed the preventive effect of IL-2 (Fig. 3D).

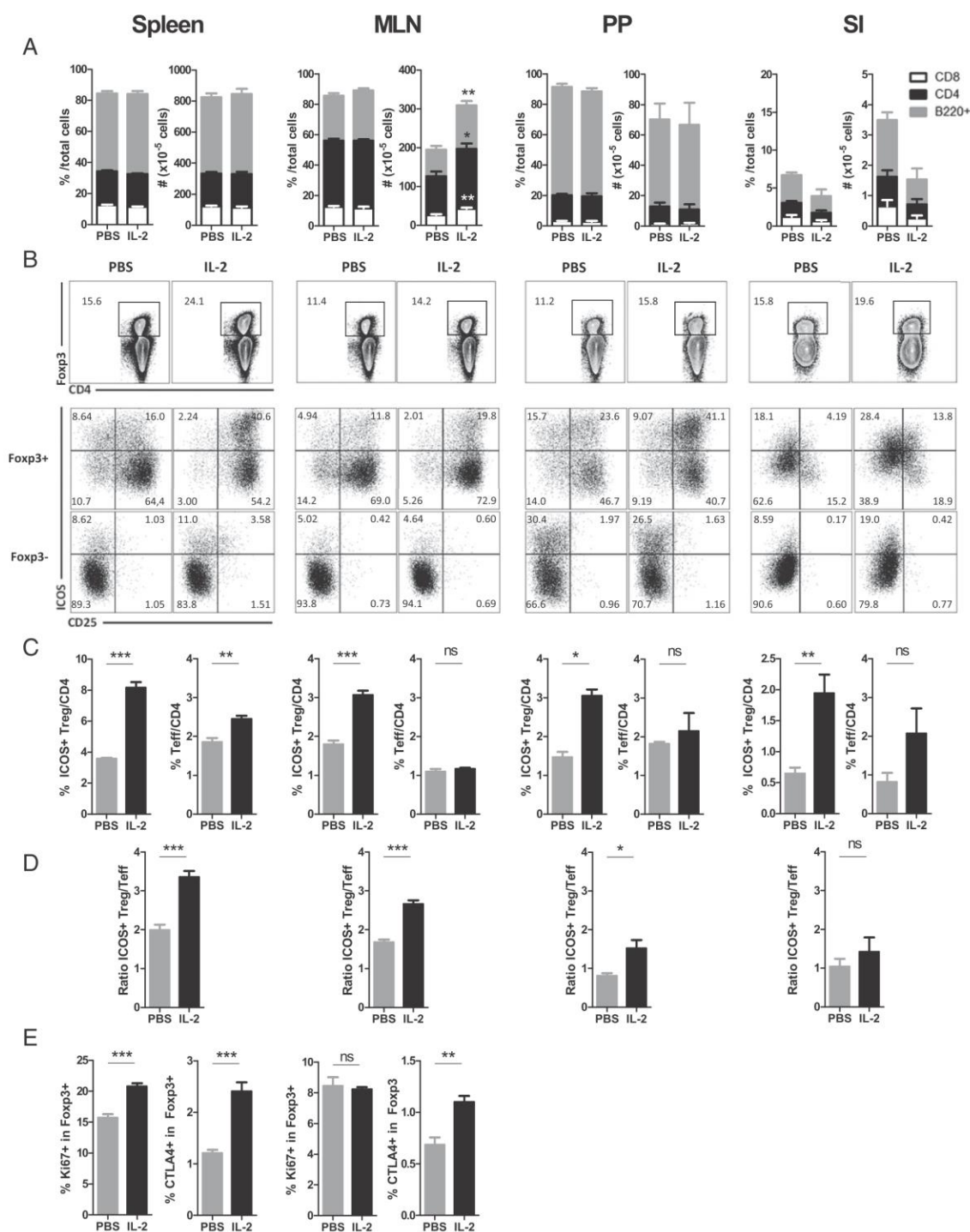
### *Ld-IL-2 control of food allergy is Treg mediated*

To evaluate the role of Tregs in ld-IL-2 treatment efficacy, we performed similar experiments in which Tregs were depleted. Mice were first treated by i.p. ld-IL-2 or PBS during 5 d and then injected or not with PC61 mAb (anti-CD25 IgG1) to eliminate Tregs. Mice were then sensitized and challenged with OVA to induce food allergy. PC61-mediated specific Treg depletion was documented by the major loss of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in blood of treated mice at day 10 and confirmed by the significant decrease of total Foxp3<sup>+</sup> cells in comparison with PBS or isotype controls (Supplemental Fig. 2). Notably, no variations in blood eosinophil and NK cell counts or ILC2 cells in PP were observed (Supplemental Fig. 2).

After OVA challenges, we observed that sensitized control mice in which Tregs have been depleted after PC61 treatment had more severe allergic symptoms than controls, highlighting that Tregs downmodulate allergic immune responses in PBS-treated control mice (Fig. 3E). More importantly, we demonstrated that Treg depletion abrogates the efficacy of ld-IL-2 as shown by severe allergic symptoms, an important decrease in body temperature (Fig. 3E) and significant increase of mMCPT1 levels (Fig. 3G) in Treg-depleted IL-2-treated mice. Interestingly, the Treg counts observed before mice sensitization (pre-S) can be correlated with the severity of the allergic reactions (Fig. 3F). However, no significant variation of OVA-specific Abs was observed in serum of treated mice at this early time point, including when OVA-specific IgE, IgG2a, IgG1, and IgA isotypes were measured (Fig. 3H and data not shown).

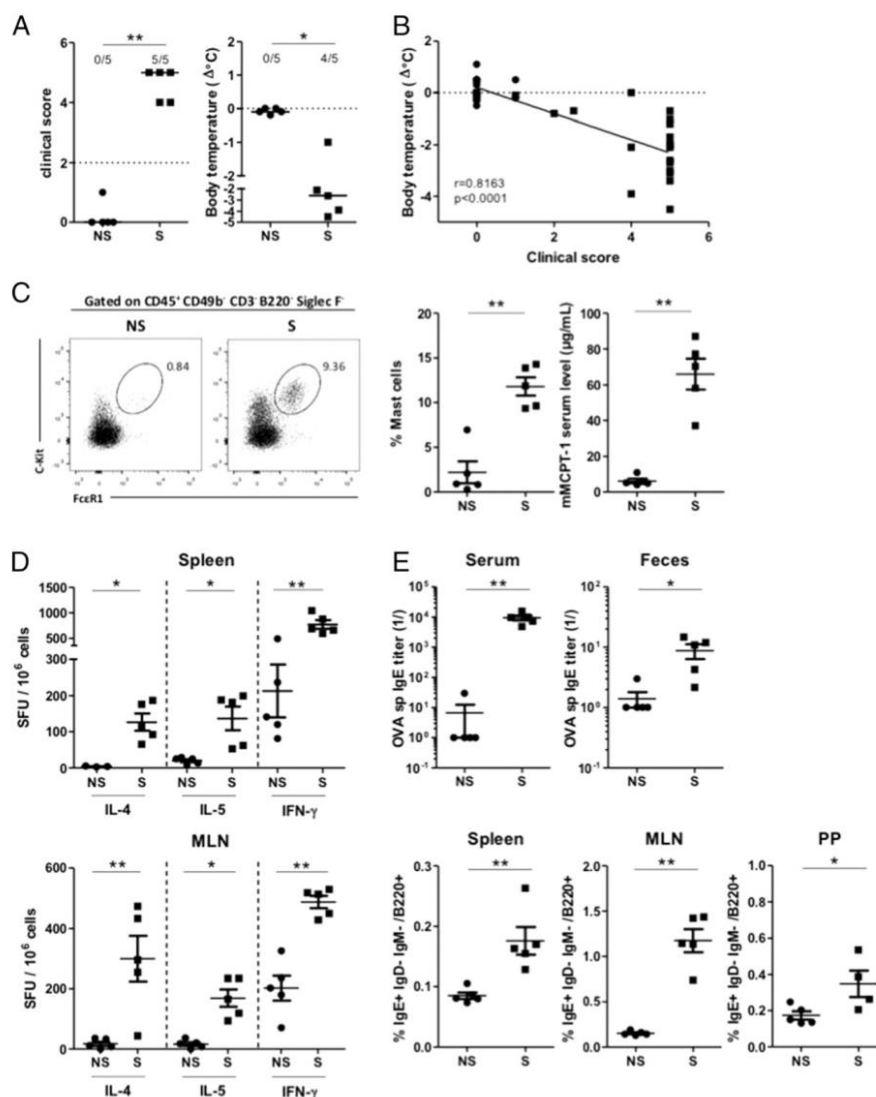
To formally demonstrate that the protective effect induced by ld-IL-2 is Treg mediated, we realized experiments in which Tregs were depleted in protected mice, 1 mo after ld-IL-2 treatment. After additional OVA challenges, we observed that late PC61 treatment abolished protection because treated mice presented severe allergic reactions with clinical scores comparable with PBS control groups (Fig. 3I).





**FIGURE 1.** Immune characterization of ld-IL-2 treatment in mice. Mice were daily i.p. injected with ld-IL-2 (IL-2) or PBS as control during 5 d, and cell populations were analyzed by flow cytometry in spleen, MLNs, PP, and SI 2 h after the last injection. **(A)** Cumulative percentages and absolute numbers of CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T cells and B cells in the different organs. **(B–E)** Effect of ld-IL-2 on Treg and Teff compartments. **(B)** Representative FACS contour plots of Foxp3<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells (upper panels) and ICOS/CD25 expression analysis among Foxp3<sup>+</sup> (middle panels) and Foxp3<sup>-</sup> (lower panels) CD4<sup>+</sup> T cells in IL-2- and PBS-treated mice. **(C)** Proportions (%) of activated Tregs (ICOS<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) and effector T cells (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>, Teff) among CD4<sup>+</sup> T cells in the different organs. **(D)** Ratio of ICOS<sup>+</sup> Tregs over Teff cells after treatment with ld-IL-2 or PBS as control. **(E)** Proportion (%) of Ki67<sup>+</sup> and CTLA4<sup>+</sup> cells among Tregs in spleen and MLN. Data represent one of three independent experiments. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 6–10 mice (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 versus control, Mann–Whitney  $U$  test). ns, nonsignificant.



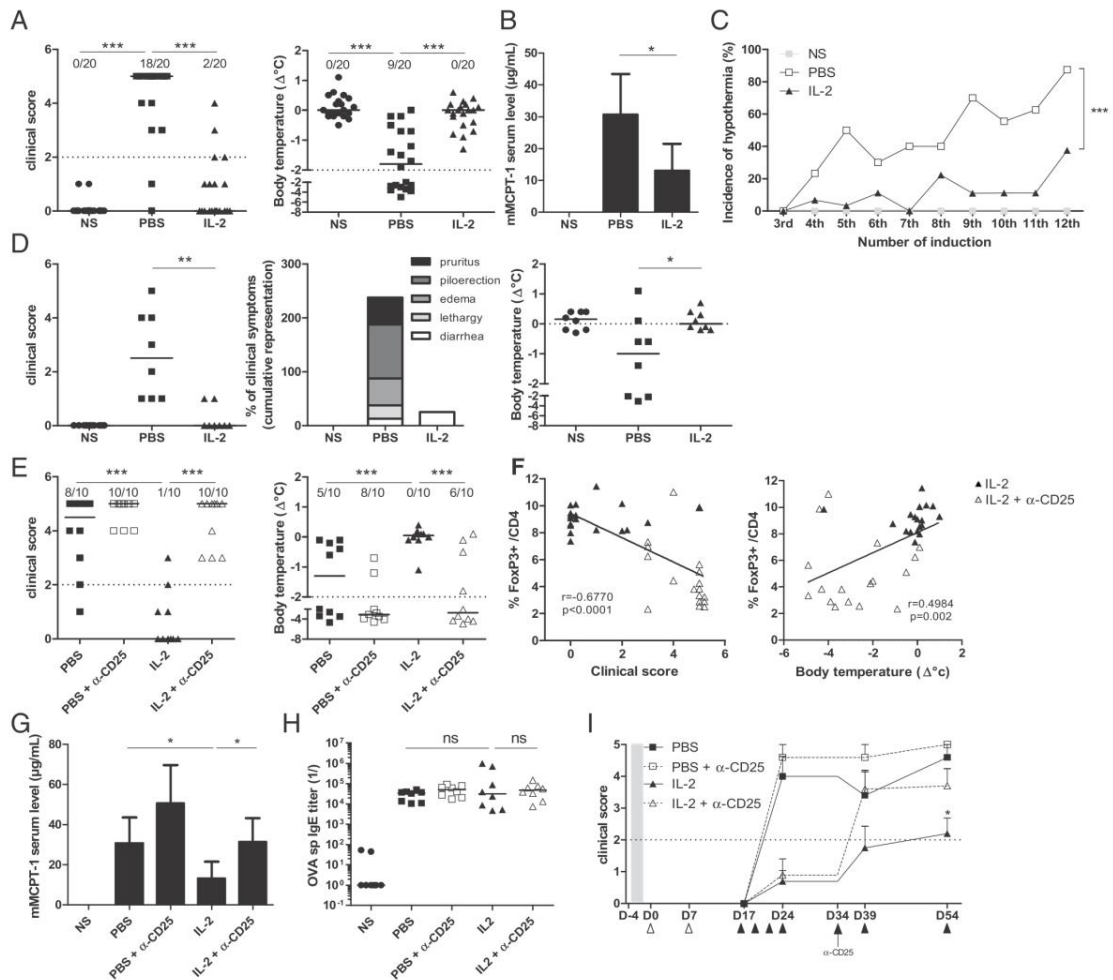


**FIGURE 2.** Ova-specific food allergy model. Mice ( $n = 5$  per group) were sensitized by two i.p. administrations of OVA/alum or PBS/alum as control (NS group) and challenged by five p.o. administrations of Ova every 2 d to induce food allergy. **(A)** Allergic reactions were monitored after the fifth p.o. challenge. Clinical scores (left panel) and body temperature variations (right panel) measured 30 min after the last challenge are shown for each individual mouse. Clinical protection threshold has been defined for clinical score  $\leq 2$  and hypothermia when the body temperature declines  $>2^{\circ}\text{C}$ . The numbers of unprotected and hypothermic mice are indicated for each group. **(B)** Correlation between clinical score and body temperature variations in sensitized mice (square) and NS (circle). Pearson correlation coefficient ( $r$ ) is done. Data represent a pool of four different experiments. **(C)** Representative FACS dot plots (left panels) and quantification of frequencies (middle panel) of C-kit<sup>+</sup>FcεR1<sup>+</sup> mast cells among CD45<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup> in SI of naive and sensitized mice. Serum mMCPT-1 levels (right panel) were quantified in naive and sensitized mice after OVA challenges. **(D)** OVA-specific T cell immune responses were measured in the spleen (upper panels) and MLNs (lower panels) of sensitized mice and NS by IL-4, IL-5, and IFN-γ ELISPOT assays. Individual results are expressed in SFUs per  $10^6$  total cells, and means ( $\pm$  SEM) of each group are represented. **(E)** OVA-specific IgE-mediated immune responses. Ova-specific IgE Ab titers (upper panels) were measured in serum (left panel) and feces (right panel) by ELISA assay, and IgE<sup>+</sup> memory B cells (lower panels) were quantified in spleen (left panel), MLN (middle panel), and PP (right panel) by flow cytometry. Each dot represents individual value, and mean  $\pm$  SEM of the five mice are shown (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Mann-Whitney  $U$  test; sensitized [S] versus NS groups). ns, nonsignificant.

#### Ld-IL-2 treatment modifies the local Th1/Th2 balance and lowers the mast cell and basophil degranulation

To better characterize the mechanisms associated to the clinical protection induced by Ld-IL-2, we analyzed the immune profile of treated and untreated mice 2 d after the last OVA challenge. While Ld-IL-2-treated mice were protected from allergic responses, the per-

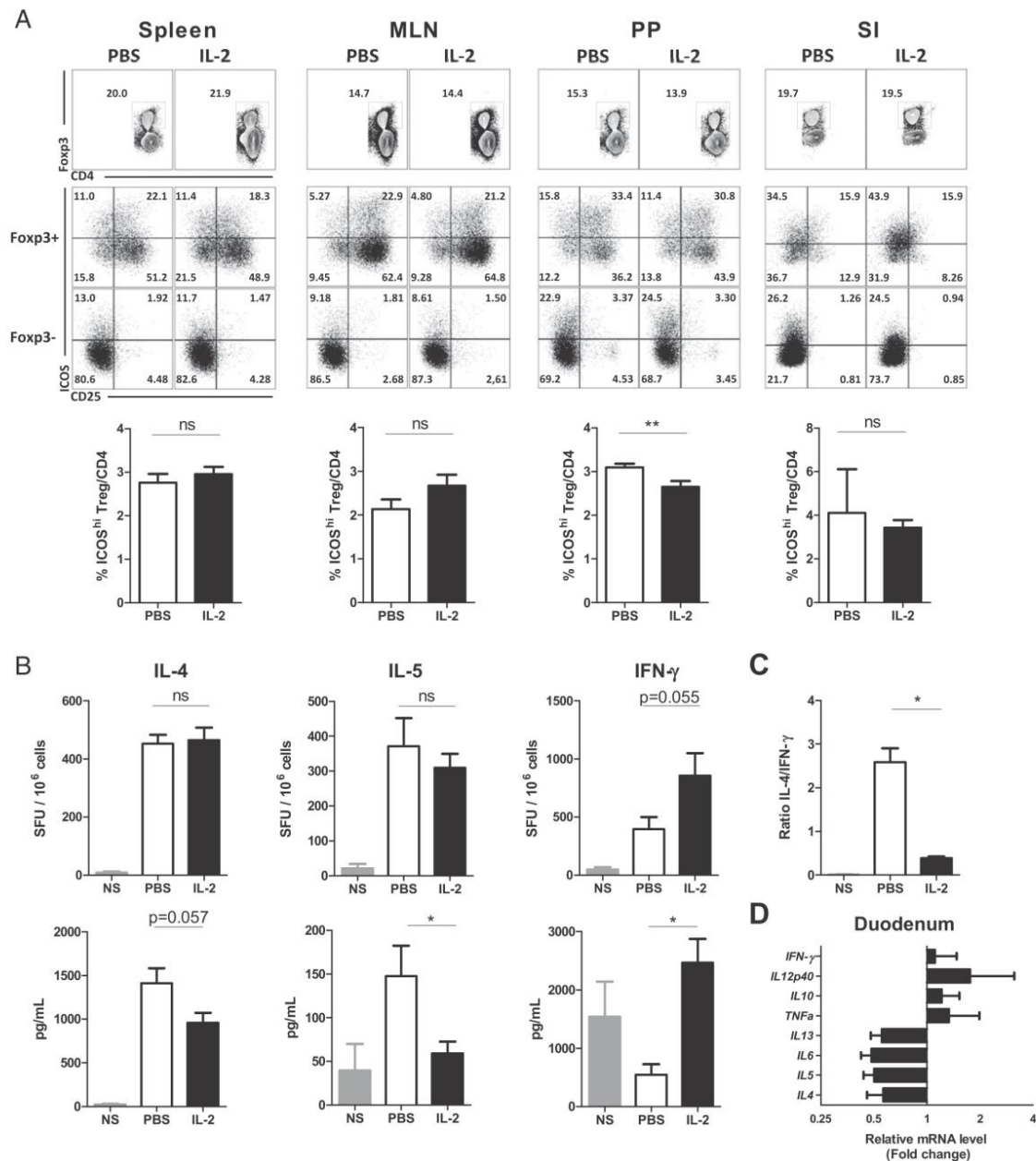
centages of total CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells or activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> Tregs (Fig. 4A) were not increased in the different organs as compared with control mice. We also did not observe variation of IL-4- and IL-5-secreting cell numbers measured by ELISPOT in spleen, PP (data not shown), and MLN (Fig. 4B, upper panels). However, when IL-4 and IL-5 productions were measured by



**FIGURE 3.** Ld-IL-2 provides Treg-mediated protection against clinical manifestations of food allergy. (A–C) OVA-specific allergy model. Mice were treated for 5 d with ld-IL-2 (IL-2) or PBS, i.p. sensitized or not (NS), and then challenged by repeated p.o. administration of OVA. (A) Clinical score (left panel) and body temperature (right panel) measured 30 min after the fifth p.o. challenge are shown for each individual mouse. Each dot represents individual value for each mouse, and group medians are shown. Clinical protection threshold has been defined for clinical score  $\leq 2$  and hypothermia when the body temperature declines  $>2^{\circ}\text{C}$ . The numbers of unprotected and hypothermic mice are indicated for each group. Data represent a pool of four independent experiments of  $n = 5$  mice per group. (B) Serum mMCPT-1 levels were measured after the last OVA challenge. Bars represent group means ( $\pm$  SEM,  $n = 10$  per group). (C) Incidence of hypothermia was measured after multiple OVA challenges, repeated every 2 d (\*\*\*)  $p < 0.001$ , ANOVA; IL-2 versus PBS,  $n = 10$  per group). (D) Peanut-specific allergy model. Mice were treated for 5 d with ld-IL-2 (IL-2) or PBS, sensitized with peanut protein extract, and then orally repeatedly challenged with peanut extract. As control, untreated NS are included and challenged with peanut extract. Clinical scores (left panel), cumulative incidence of symptoms (middle panel) and body temperature variation (right panel) measured 30 min after the seventh challenge, are shown. Each dot represents individual mouse data and group medians are shown ( $n = 8$  per group). (E–I) Role of Tregs in IL-2-induced prevention of OVA-specific allergy. (E) Tregs were depleted after ld-IL-2 or PBS treatment by i.p. administration of anti-CD25 PC61 mAb ( $\alpha$ -CD25). OVA sensitization and p.o. challenges were then performed to induce food allergy. Clinical scores and body temperature variations measured 30 min after the fifth challenge are shown for each individual mouse. The numbers of unprotected and hypothermic mice are indicated for each group. Data represent one of two independent experiments of  $n = 10$  mice per group. (F) Correlation between % Tregs in blood at day 5 and clinical scores (left panel) or body temperature variations (right panel) measured after OVA challenges in IL-2– (black symbols) and IL-2 +  $\alpha$ -CD25 (white symbols)–treated mice. Pearson correlation coefficient ( $r$ ) and  $p$  values are noted. Data represent a pool of two independent experiments of  $n = 8$ –10 mice per group. (G) Levels of mMCPT-1 and (H) Ova-specific IgE Abs were measured in serum. Bars represent group means ( $\pm$  SEM,  $n = 8$  per group). (I) Impact of Treg depletion during the OVA-challenge phase. The 5-d ld-IL-2 cure (gray bar) was initiated before OVA sensitization (white arrows), and mice were repeatedly challenged (black arrows) to induce allergic symptoms (measured at day 24). Ten days later, mice were injected or not with anti-CD25 PC61 mAb ( $\alpha$ -CD25) to deplete Tregs and then challenged with OVA at days 39 and 54. Clinical scores (mean  $\pm$  SEM) are shown for each group ( $n = 10$  per group). (A–H) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , Mann–Whitney  $U$  test, PBS- versus IL-2-treated group. (I) \* $p < 0.05$ , Mann–Whitney  $U$  test, IL-2 + anti-CD25 versus IL-2-treated group. ns, nonsignificant.

ELISA in supernatants after Ag-specific restimulation, we reported a decrease of Th2 cytokine secretions in MLN of IL-2–treated mice (Fig. 4B, lower panels). In contrast, we observed an increase of

OVA-specific IFN- $\gamma$ -secreting cell numbers and IFN- $\gamma$  production in MLN and PP of IL-2–treated mice compared with control mice (Fig. 4B and data not shown). As a result, ld-IL-2 treatment

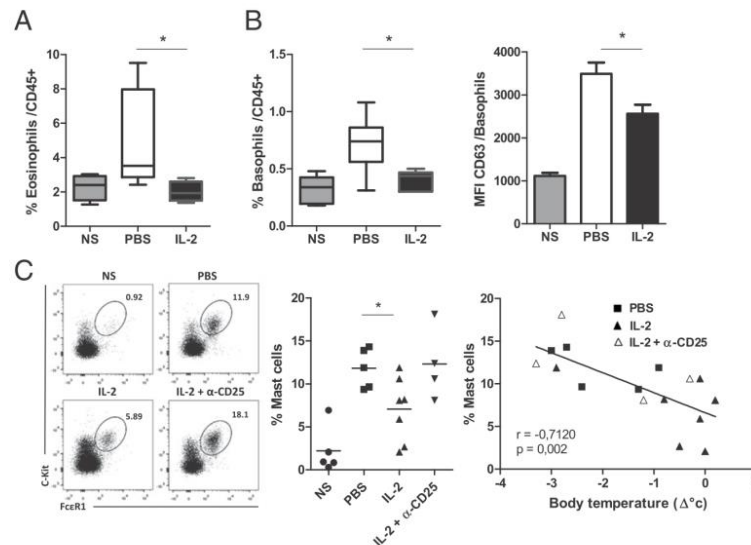


**FIGURE 4.** Ld-IL-2 treatment locally modulates the Th1/Th2 balance. Tregs enrichment and immune responses were analyzed in spleen, MLN, PP, and SI harvested from IL-2- or PBS-treated sensitized mice after the fifth OVA challenge. **(A)** Representative FACS contour plots of Foxp3<sup>+</sup> cells, among CD4<sup>+</sup> T cells (upper panels); dot plots of ICOS/CD25 expression among FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells or FOXP3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (middle panels) and quantification of frequencies of activated Tregs (ICOS<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) in PBS- and IL-2-treated mice are shown. Bars represent the mean  $\pm$  SEM of 10 mice. **(B)** OVA-specific T cell response was measured in MLN by IL-4, IL-5, and IFN- $\gamma$  ELISPOT (upper panels) and ELISA (lower panels) assays after OVA restimulation. As control, NS challenged mice were included. Results represent the average of duplicates of individual mouse as SFUs per 10<sup>6</sup> total cells, and group means ( $\pm$  SEM;  $n = 5$  per group) are indicated. **(C)** Ratio of IL-4/IFN- $\gamma$ -secreting cells in MLN. **(D)** Cytokine immune responses analyzed by qRT-PCR in duodenum of PBS and Ld-IL-2-treated mice. Graph showing the mean values of fold change for IFN- $\gamma$ , IL-12p40, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-6, IL-5, and IL-4 mRNA levels in Ld-IL-2-treated mice relative to PBS-treated mice (control). Gene expressions in control and Ld-IL-2-treated groups were expressed as relative transcript abundance, relative to the GAPDH reference gene. The fold changes of gene expression in Ld-IL-2 mice relative to PBS controls are shown. Data represent a pool of two independent experiments of  $n = 5$  mice per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Mann-Whitney  $U$  test ( $n = 5$ –10 per group). ns, nonsignificant; S, sensitized mice.

led to a modulation of Th2/Th1 balance in draining lymphoid organs highlighted with the decline of the IL-4/IFN- $\gamma$  ratio in PP (data not shown) and MLN (Fig. 4C). We also observed specific local

modifications of Th2 cytokine expression levels assessed in SI by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). IL-4, IL-5, IL-6, and IL-13 gene expression were decreased in the duodenum of the IL-2-treated





**FIGURE 5.** Ld-IL-2 prevents recruitment and activation of allergic effector cells. (**A** and **B**) Blood eosinophils and basophils were analyzed by flow cytometry 3 d after the last OVA challenge in Ld-IL-2- (IL-2) or PBS-treated mice. (**A**) Percentage of eosinophils among total CD45<sup>+</sup> cells. (**B**) Percentage of basophils among total CD45<sup>+</sup> cells and level of CD63 expression (MFI) were measured after 4 h of incubation with OVA. (**C**) Mast cells were analyzed 10 d after the last OVA challenge in SI of IL-2-treated mice and Treg-depleted (α-CD25) or not mice before allergy induction. Representative FACS dot plots (left panels) and percentages (middle panel) of c-Kit<sup>+</sup>FcεR1<sup>+</sup> cells among CD45<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup> cells in NS, sensitized PBS-treated (PBS), IL-2-treated (IL-2), and Treg-depleted IL-2-treated mice (left panels) are shown. Correlation between percentage of mast cells and body temperature variations in sensitized mice including IL-2 (black triangle), IL-2+anti-CD25 (white triangle), and PBS (black square)-treated mice (right panel) is done. Pearson correlation coefficient ( $r$ ) and  $p$  values are noted. Data represent one of two independent experiments ( $n = 5$  mice per group,  $*p < 0.05$ , Mann-Whitney  $U$  test).

group (Fig. 4D), whereas IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , and IL-10 gene expression levels were increased (Fig. 4D).

We also investigated the effect of Ld-IL-2 treatment on the different effector cells of allergic disease. We observed that Ld-IL-2 prevented the eosinophil and basophil recruitment as shown by the lower cell counts in blood of treated mice compared with the PBS group (Fig. 5A, 5B). Interestingly, we showed in ex vivo assay that Ld-IL-2 reduced basophil degranulation as shown by the low expression of CD63 in IL-2-treated mice compared with control mice. More importantly, we also observed in SI of treated mice lower frequency of mast cells that can be correlated with limitation of temperature decline (Fig. 5C). The control of mast cell infiltrate induced by IL-2 is Treg mediated because the percentages of mast cells were high, reaching similar levels than allergic animals in PC61-treated mice (Fig. 5C). These results show that Ld-IL-2 prevents food allergy by a Th1 shift of the Th1/Th2 balance and reduced activation of effector cells.

#### Ld-IL-2 induces long-term protection against food allergy reaction in preventive and therapeutic settings

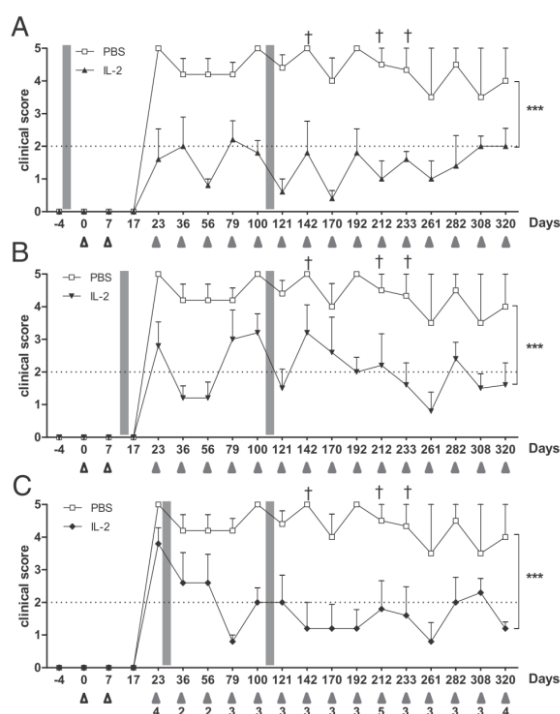
To further evaluate Ld-IL-2 efficacy, we investigated the long-term effect of IL-2 treatment for food allergy protection and evaluated its preventive and therapeutic effects. In addition to the 5-d Ld-IL-2 course performed pre-S, a 5-d Ld-IL-2 course between mice sensitization and challenge (pre-C) and a therapeutic 5-d Ld-IL-2 course after p.o. challenge were also tested (Fig. 6).

When long-term efficacy of the pre-S treatment was evaluated, we confirmed that IL-2-treated mice are immediately protected from allergic symptoms ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney compared with PBS group at day 23; Fig. 6A) and remains protected against four additional cycles of OVA challenges (between days 36 and 100; Fig. 6A). After another 5-d Ld-IL-2 course initiated 3 mo after the first one, long-term treatment

efficacy was observed because mice resisted to 10 additional OVA challenge cycles. Altogether, we observed that Ld-IL-2 treatment could control allergic reactions over a 10-mo period, with no progressive loss of efficacy over time (Fig. 6A) that was confirmed by absence of body temperature variation (Supplemental Fig. 3).

A between mice sensitization and challenge treatment showed that protection was not immediately effective (score  $>2$  at day 23; Fig. 6B) but was elicited as from the second cycle of OVA challenges (day 36). As previously and because of a partial loss of the protective effect at days 79 and 100, a new 5-d Ld-IL-2 course was performed, and the long-term efficacy of the treatment was then tested. We observed that IL-2 could control allergic reactions over a 7-mo period with high efficacy because  $>80\%$  of mice were fully protected (score  $\leq 2$ ; Fig. 6B) and no significant temperature decline was observed (Supplemental Fig. 3).

In the same experiment, we observed that allergic mice treated with IL-2 after p.o. challenge were also not immediately protected from allergic reactions induced by OVA challenges (day 36 and day 56; Fig. 6C). However, mice became resistant to next OVA challenges (day 79 and day 100). Additional cure of Ld-IL-2 was performed like other groups 3 mo after the sensitization, and long-term efficacy was investigated over an extra period of 7 mo. We observed that IL-2 could control allergic reactions with similar efficacy and long-term maintenance than the pre-S treatment (Fig. 6A, 6C). Importantly, therapeutic efficacy of IL-2 was confirmed by absence of body temperature variation and low level of MPCT1 in IL-2-treated mice compared with control mice (Supplemental Fig. 3). However, no significant variations of OVA-specific IgE titer were observed at early (day 73) or late (day 320) time points in IL-2-treated mice compared with control mice (Supplemental Fig. 3).



**FIGURE 6.** Ld-IL-2 induces a sustainable protection against food allergy reaction in preventive and therapeutic settings. Mice were sensitized at days 0 and 7 (white arrows) with OVA and then challenged with OVA by repeated p.o. administrations. Food allergy was scored (gray arrows) after two to five p.o. inductions to induce severe allergic reactions (score  $\geq 4$ ) in 75% of PBS-treated sensitized mice (group S). Number of challenges is indicated below the symbols. The 5-d Ld-IL-2 (gray bars) cure was initiated (A) pre-S, (B) pre-C, or (C) after allergy induction. One additional cure of Ld-IL-2 was performed in treated mice at day 110. Allergic status of IL-2- or PBS-treated mice was analyzed over a 10-mo period. Data represent one of two independent experiments. Dagger indicates a dead mouse. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of five mice (\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA).

#### *Ld-IL-2 administrated by p.o. route is effective to induce protection against food allergy reaction*

We wondered whether alternative and more convenient routes of administration could be used to perform Ld-IL-2 treatment. We demonstrated that Ld-IL-2 p.o. treatment induced protection against allergy as shown by the lower susceptibility of IL-2-treated mice to allergy induction compared with control mice (Fig. 7A). A robust protection was observed because mice were fully protected after three cycles of challenges over a 2-mo period (data not shown). We also demonstrated that the protective effect is Treg-mediated because protection was abolished when Tregs have been depleted after IL-2 p.o. treatment (Fig. 7A). Notably, IL-2 p.o. induced protection is associated with a decrease of mast cell frequency in the duodenum, whereas large infiltrates were shown in Treg-depleted mice after OVA challenges (Fig. 7B).

Altogether, these results show that both preventive and curative administration of IL-2 provide long-term clinical protection against food allergy, including when IL-2 is administrated by more convenient route.

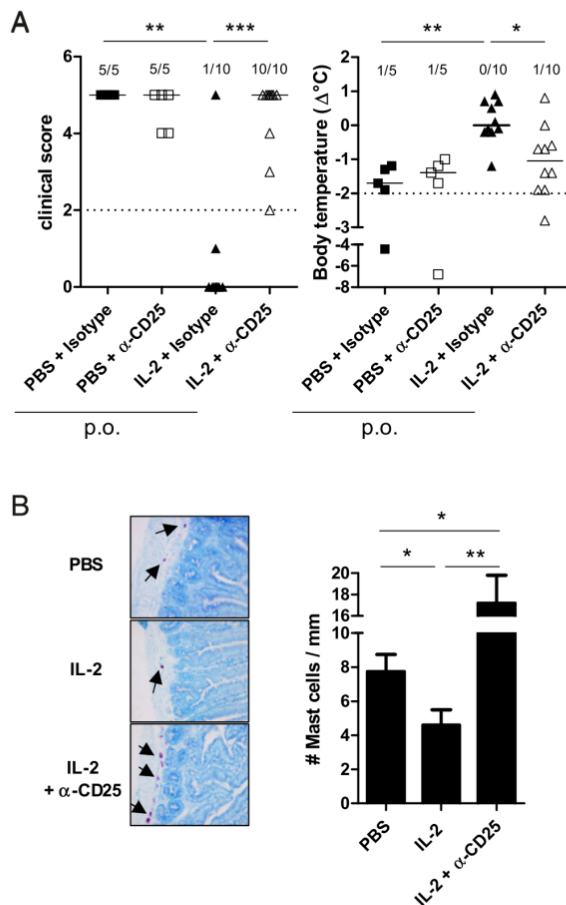
#### **Discussion**

Previous investigations have established that Tregs play a central role both in the development of natural p.o. tolerance (28, 29) and

in the mechanism of AIT efficacy (12, 30, 31). However, specific Treg-based immunotherapies have not been evaluated in the context of food allergy. For this purpose, we established an experimental model based on previous work (15), comprising sensitization with OVA/alum i.p. injections followed by administration of high amounts of OVA by repeated intragastric delivery. This induces gastrointestinal hypersensitivity characterized notably by temperature decline, acute diarrhea, local recruitment, and degranulation of effector cells, associated with a Th2 immune response profile as shown by high levels of IL-4- and IL-5-secreting cells in peripheral and gut-associated tissues. This Th2 profile was confirmed by high levels of OVA-specific IgE and IgG1 Abs after allergen challenges (Fig. 2 and data not shown). As discussed recently by Liu et al. (32), the genetic background, the nature of allergen, and the route of allergen exposure greatly influence the phenotype of mouse models. We have tested different inbred mouse strains and selected the BALB/c AnN mice in which we succeed to induce severe allergic reactions. Indeed, in contrast with a previous report (33), we observed that a significant proportion of sensitized BALB/c AnN mice were diarrheic and were hypothermic after a limited number of OVA challenges (Figs. 2, 3) whatever the animal provider (Janvier Labs or Charles River; data not shown).

Using this mouse model, we showed that Ld-IL-2 treatment efficiently prevents and controls food allergy reactions that can be explained by the capacity of Tregs to rebalance the Th2-dominant local immune responses. Indeed, we observed in protected mice a significant decrease of Th2-associated gene expression and cytokine production in gut and lymphoid-associated tissues, whereas the Ag-specific Th1 immune responses in MLN and PP were amplified (Fig. 4 and data not shown). Because IL-4 has been shown to exacerbate anaphylaxis (34), the reduction of IL-4 levels induced by Ld-IL-2 during the effector phase of immediate hypersensitivity may rapidly alleviate allergic symptoms. Interestingly, the Th1/Th2 immune deviation cannot be related with the potential immunogenicity of human IL-2 used in these experiments because control of Th2 allergic responses was also observed in mice treated with murine IL-2 (Supplemental Fig. 4 and data not shown). In contrast, we showed that mice treated with heat-denatured human IL-2 were not protected against Th2-mediated allergic reaction. A switch to Th1 immune responses was already reported in AIT (35), including in food allergy treatment (36). Even though Th1 redirection induced by AIT with allergen extracts or peptides continues to be reported in more recent publications (37, 38), other groups, however, did not observe this effect (39). More recently, the induction of allergen-specific Tregs producing IL-10 has been considered as a main event causing peripheral T cell tolerance (35). Importantly, the mechanisms of immunodeviation and immunoregulation should not be considered as alternative and mutually exclusive events. Indeed, it was reported that Th2 to Th1 recommitment of T cells correlates with the induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> and IL-10-producing Tregs in wasp venom immunotherapy (40). Accumulation of IL-10<sup>+</sup> Tregs and Th1 cells in allergen-challenged skin sites was also shown after tolerogenic vaccination with Fel d 1 peptides (41). In our results, we observed an increase of both IL-10 and IFN- $\gamma$  responses in PP and duodenum (data not shown). Regulatory IFN- $\gamma$ /IL-10 double-positive Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells that have been described in mice undergoing chronic Ag stimulation (42) might be induced after Ld-IL-2 treatment, thus explaining the unexpected absence of Foxp3<sup>+</sup> Tregs expansion after p.o. challenges in the protected mice (Fig. 4A). In this line, Wilson et al. (43) report that the preventive protective effect of IL-2:anti-IL-2-based therapy in the mouse asthma model was correlated with an increase of IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells. There are other lines of evidence suggesting that IL-10 and Tregs play interrelated roles in the regulation of effector phase of the allergic re-





**FIGURE 7.** Ld-IL-2 by p.o. route provides protection against clinical manifestations of food allergy and prevents mast cells recruitment in Treg-dependent manner. Mice were orally treated (p.o.) with Ld-IL-2 (IL-2) or PBS during 5 d, injected or not at day 5 with anti-CD25 PC61 mAb (anti-CD25) to depleted Tregs, and then sensitized and challenged with OVA. **(A)** Clinical score (left panel) and body temperature (right panel) measured 30 min after the sixth p.o. challenge are shown for each individual mouse. Each dot represents individual value for each mouse, and group medians are shown. Clinical protection threshold has been defined for clinical score  $\leq 2$  and hypothermia when the body temperature declines  $>2^{\circ}\text{C}$ . The numbers of unprotected and hypothermic mice are indicated for each group ( $n = 5$ –10 mice per group). **(B)** Mast cell infiltrates were analyzed by immunohistochemistry in the duodenum of IL-2-, IL-2+ $\alpha$ -CD25-, and PBS-treated mice. Representative photomicrographs (original magnification  $\times 400$ ) are shown. Arrows indicate mast cells. A total of four sections were randomly analyzed per group, total mast cells were counted, and results were expressed as mast cells per millimeter.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , Mann-Whitney  $U$  test.

sponses. IL-10 produced by increased numbers of induced Tregs during AIT downregulates eosinophil function and activity, and suppresses IL-5 production by Th2 cells (44, 45). As a result, local IL-10 production might have a major contribution in Ld-IL-2 treatment efficacy, as suggested by the established correlation between IL-10 secretion in PP and the control of degranulation revealed by low mMCPT-1 concentration in serum of Ld-IL-2-treated mice (data not shown).

Nevertheless, we can state that Ld-IL-2 acts primarily through Treg expansion and activation. The fundamental role of Tregs in protective phenotype was demonstrated by the abolition of protection after anti-CD25 PC61 mAb treatment, which induced Treg

depletion but preserved ILC2 and eosinophil populations that are known to promote allergic reactions. Interestingly, we observed that Ld-IL-2 induced initial Treg expansion in systemic (spleen) and local compartments (MLN, PP) including SI where Tregs express a lower level of CD25, whereas their proliferation occurred mainly at a systemic level as shown by the increased percentages of KI67<sup>+</sup>, ICOS<sup>hi</sup>, and CTLA4<sup>hi</sup> Tregs in the spleen (Fig. 1). In contrast, a few weeks after the end of Ld-IL-2 treatment, we did not observe any sustained CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> Treg expansion in the different organs of protected mice after OVA challenges (Fig. 4A). These observations suggest that: 1) alternative local immune-suppressive mechanisms might be induced by IL-2-activated Tregs, including suppressive Foxp3<sup>+</sup> T cells; or 2) Ag-specific Tregs might be selected and persisted at low frequencies. Interestingly, a relationship between the ICOS<sup>hi</sup> Tregs and the suppressive IL-10<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tr1 cells has been already described (46). However, the loss of protection observed when PC61 mAb was administered between two OVA challenges (Fig. 3I) highlights the role of Tregs in the long-term protected phenotype. Further investigations are necessary to address this specific issue. We especially plan to investigate whether association of Ld-IL-2 with allergen could improve therapeutic efficacy by generating allergen-specific Tregs. Alternatively, specific IL-2 treatment regimens to maintain a high level of Tregs over a long-term period could be proposed. Importantly, we previously demonstrated that sustained stimulation and expansion of Tregs does not induce general immunosuppression because we showed that long-term IL-2 treatments control immune disorders in mice without impairing immune responses to infection, vaccination, and cancer (47). Alternative and more convenient routes of Ld-IL-2 administration can be proposed. In this article, we have shown for the first time, to our knowledge, that p.o. administration of IL-2 can induce Treg activation and immune protection against food allergy that can be related to a local modification of Th1/Th2 balance (i.e., decrease of IL-4 and increase of IFN- $\gamma$  responses in PP of IL-2-treated mice; data not shown) and a control of mast cell infiltration in gut (Fig. 7). Accordingly with previous work (48), our results emphasize the suppressive function of Tregs on mast cell compartment because Treg depletion induces an intestinal mastocytosis that can be correlated with the severity of allergic reactions (Figs. 5C, 7B). Whatever the route of IL-2 administration, we have shown that Ld-IL-2 induced a Treg-mediated control of allergic diseases that may be explained by Th2 and mast cell suppression (34, 48).

Altogether, the present data show for the first time, to our knowledge, the therapeutic potential of Ld-IL-2 for the treatment of food allergy and should prompt further investigations of this potential to re-establish long-term immune tolerance to allergens.

## Acknowledgments

We thank the staff at Centre d'Expérimentation et Formation (Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière) for taking care of the mice and Raphael Jeger-Madiot, Pierre-Axel Vinot, and Simon Brunel for technical assistance.

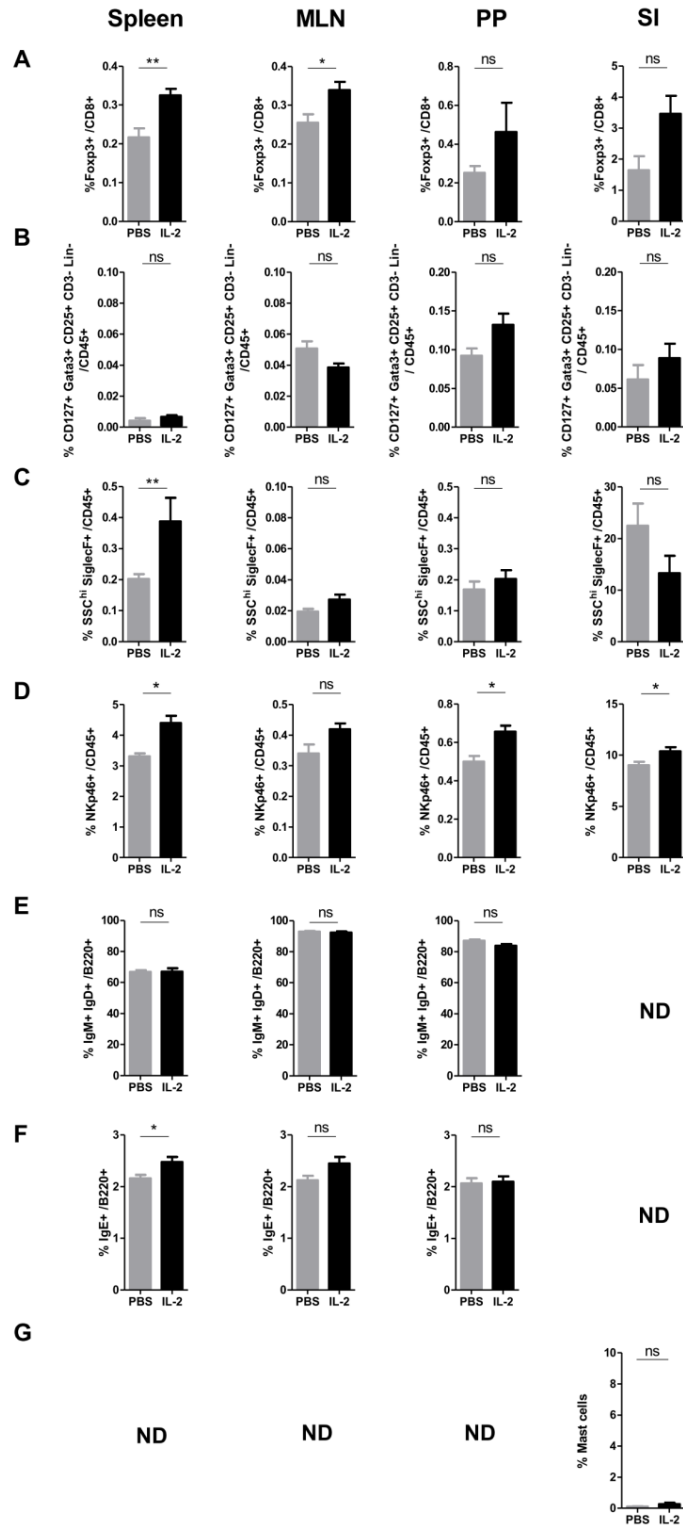
## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

1. Sakaguchi, S., D. A. A. Vignali, A. Y. Rudensky, R. E. Niec, and H. Waldmann. 2013. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 461–467.
2. Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi. 2013. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38: 414–423.

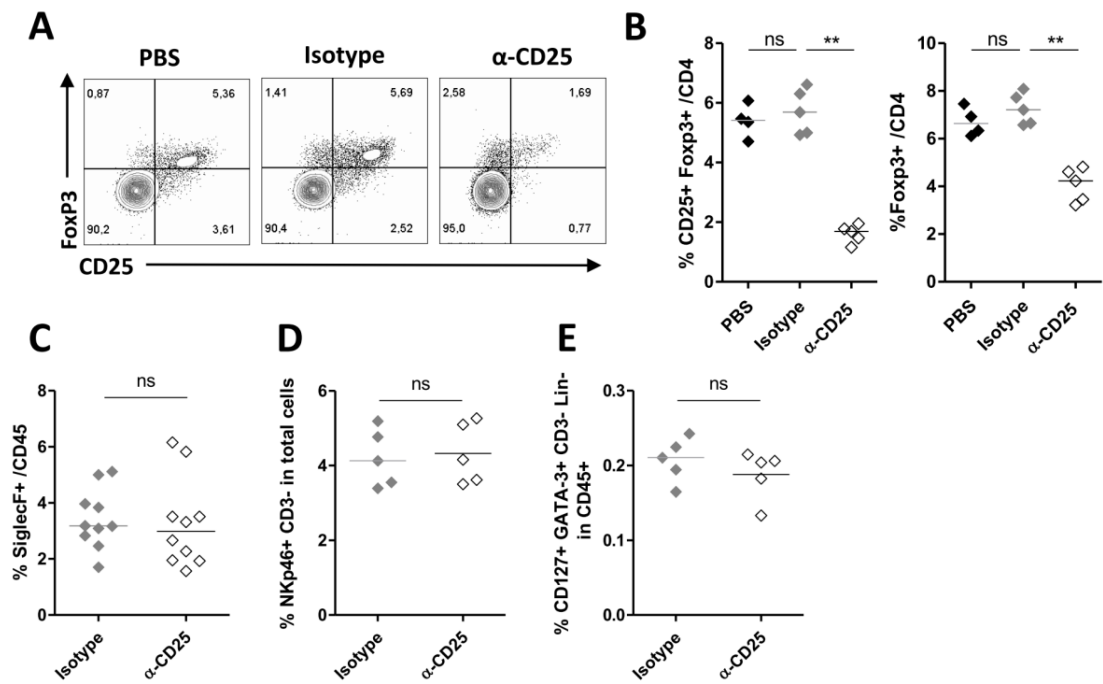
3. Palomares, O. 2013. The role of regulatory T cells in IgE-mediated food allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 23: 371–382, quiz 2, 382.
4. Torgerson, T. R., A. Linane, N. Moes, S. Anover, V. Mateo, F. Rieux-Laucat, O. Hermine, S. Vijay, E. Gambineri, N. Cerf-Bensussan, et al. 2007. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology* 132: 1705–1717.
5. Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr, and D. S. Robinson. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363: 608–615.
6. Taylor, A., J. Verhagen, C. A. Akdis, and M. Akdis. 2004. T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135: 73–82.
7. Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, et al. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 199: 1567–1575.
8. Schaub, B., J. Liu, S. Höppler, S. Haug, C. Sattler, A. Luis, S. Illi, and E. von Mutius. 2008. Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: 1491–1499, 1499.e1–1499.e13.
9. Karlsson, M. R., J. Rugtveit, and P. Brandtzaeg. 2004. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J. Exp. Med.* 199: 1679–1688.
10. Sletten, G. B. G., R. Halvorsen, E. Egaas, and T. S. Halstensen. 2007. Memory T cell proliferation in cow's milk allergy after CD25+ regulatory T cell removal suggests a role for casein-specific cellular immunity in IgE-mediated but not in non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 142: 190–198.
11. Fujita, H., M. B. Soyka, M. Akdis, and C. A. Akdis. 2012. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin. Transl. Allergy* 2: 2.
12. Smarr, C. B., P. J. Bryce, and S. D. Miller. 2013. Antigen-specific tolerance in immunotherapy of Th2-associated allergic diseases. *Crit. Rev. Immunol.* 33: 389–414.
13. Kearley, J., D. S. Robinson, and C. M. Lloyd. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122: 617–624.e6.
14. Kearley, J., J. E. Barker, D. S. Robinson, and C. M. Lloyd. 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: 1539–1547.
15. Yamashita, H., K. Takahashi, H. Tanaka, H. Nagai, and N. Inagaki. 2012. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy* 67: 201–209.
16. Shevach, E. M. 2012. Application of IL-2 therapy to target T regulatory cell function. *Trends Immunol.* 33: 626–632.
17. Rosenberg, S. A., and M. T. Lotze. 1986. Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 681–709.
18. Abrams, D., Y. Lévy, M. H. Lasso, A. Babiker, G. Collins, D. A. Cooper, J. Darbyshire, S. Emery, L. Fox, F. Gordin, et al. INSIGHT-ESPRIT Study Group; SILCAAT Scientific Committee. 2009. Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 361: 1548–1559.
19. Koreth, J., K. Matsuoaka, H. T. Kim, S. M. McDonough, B. Bindra, E. P. Alyea, III, P. Armand, C. Cutler, V. T. Ho, N. S. Treister, et al. 2011. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 365: 2055–2066.
20. Kim, N., Y.-W. Jeon, Y.-S. Nam, J.-Y. Lim, K.-I. Im, E.-S. Lee, and S.-G. Cho. 2016. Therapeutic potential of low-dose IL-2 in a chronic GVHD patient by in vivo expansion of regulatory T cells. *Cytokine* 78: 22–26.
21. Saadoun, D., M. Rosenzweig, F. Joly, A. Six, F. Carrat, V. Thibault, D. Sene, P. Cacoub, and D. Klatzmann. 2011. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 365: 2067–2077.
22. Castela, E., F. Le Duff, C. Butori, M. Ticcioni, P. Hofman, P. Bahadoran, J.-P. Lacour, and T. Passeron. 2014. Effects of low-dose recombinant interleukin 2 to promote T-regulatory cells in alopecia areata. *JAMA Dermatol.* 150: 748–751.
23. Humrich, J. Y., C. von Spee-Mayer, E. Siegert, T. Alexander, F. Hiepe, A. Radbruch, G.-R. Burmester, and G. Riemekasten. 2015. Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Ann. Rheum. Dis.* 74: 791–792.
24. Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172: 6519–6523.
25. Wang, M., M. Okamoto, J. Domenico, J. Han, S. Ashino, Y. S. Shin, and E. W. Gelfand. 2012. Inhibition of Pim1 kinase prevents peanut allergy by enhancing Runx3 expression and suppressing T(H)2 and T(H)17 T-cell differentiation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130: 932–944.e12.
26. von Moltke, J., M. Ji, H.-E. Liang, and R. M. Locksley. 2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 529: 221–225.
27. Vocanson, M., A. Rozieres, A. Hennino, G. Poyet, V. Gaillard, S. Renaudineau, A. Achachi, J. Benetiere, D. Kaiserlian, B. Dubois, and J.-F. Nicolas. 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: 280–289, 289.e1–289.e7.
28. Weiner, H. L., A. P. da Cunha, F. Quintana, and H. Wu. 2011. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 241: 241–259.
29. Berin, M. C., and L. Mayer. 2013. Can we produce true tolerance in patients with food allergy? *J. Allergy Clin. Immunol.* 131: 14–22.
30. Syed, A., M. A. Garcia, S.-C. Lyu, R. Bucayu, A. Kohli, S. Ishida, J. P. Berglund, M. Tsai, H. Maecker, G. O'Riordan, et al. 2014. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J. Allergy Clin. Immunol.* 133: 500–510.
31. Suárez-Fueyo, A., T. Ramos, A. Galán, L. Jimeno, P. A. Wurtzen, A. Marin, C. de Frutos, C. Blanco, A. C. Carrera, D. Barber, and R. Varona. 2014. Grass tablet sublingual immunotherapy downregulates the TH2 cytokine response followed by regulatory T-cell generation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133: 130–138.e1, 2.
32. Liu, T., S. Navarro, and A. L. Lopata. 2016. Current advances of murine models for food allergy. *Mol. Immunol.* 70: 104–117.
33. Ahrens, R., H. Osterfeld, D. Wu, C.-Y. Chen, M. Arumugam, K. Groschwitz, R. Strait, Y.-H. Wang, F. D. Finkelman, and S. P. Hogan. 2012. Intestinal mast cell levels control severity of oral antigen-induced anaphylaxis in mice. *Am. J. Pathol.* 180: 1535–1546.
34. Strait, R. T., S. C. Morris, K. Smiley, J. F. Urban, Jr., and F. D. Finkelman. 2003. IL-4 exacerbates anaphylaxis. *J. Immunol.* 170: 3835–3842.
35. Maggi, E., A. Vultaggio, and A. Muccilli. 2012. T-cell responses during allergen-specific immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 12: 1–6.
36. Nieuwenhuizen, N. E., and A. L. Lopata. 2005. Fighting food allergy: current approaches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056: 30–45.
37. Ciprandi, G., M. P. Sormani, G. Filaci, and D. Fenoglio. 2008. Carry-over effect on IFN-gamma production induced by allergen-specific immunotherapy. *Int. Immunopharmacol.* 8: 1622–1625.
38. Sel, S., M. Wegmann, S. Sel, S. Bauer, H. Garn, G. Alber, and H. Renz. 2007. Immunomodulatory effects of viral TLR ligands on experimental asthma depend on the additive effects of IL-12 and IL-10. *J. Immunol.* 178: 7805–7813.
39. Rolinck-Werninghaus, C., M. Kopp, C. Liebke, J. Lange, U. Wahn, and B. Niggemann. 2005. Lack of detectable alterations in immune responses during sublingual immunotherapy in children with seasonal allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136: 134–141.
40. Mamessier, E., J. Birnbaum, P. Dupuy, D. Vervloet, and A. Magnan. 2006. Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and regulatory patterns according to the severity of allergy. *Clin. Exp. Allergy* 36: 704–713.
41. Alexander, C., M. Tarzi, M. Larché, and A. B. Kay. 2005. The effect of Fel d 1-derived T-cell peptides on upper and lower airway outcome measurements in cat-allergic subjects. *Allergy* 60: 1269–1274.
42. Trinchieri, G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med.* 204: 239–243.
43. Wilson, M. S., J. T. Pesce, T. R. Ramalingam, R. W. Thompson, A. Cheever, and T. A. Wynn. 2008. Suppression of murine allergic airway disease by IL-2: anti-IL-2 monoclonal antibody-induced regulatory T cells. *J. Immunol.* 181: 6942–6954.
44. Schandené, L., C. Alonso-Vega, F. Willems, C. Gérard, A. Delvaux, T. Velu, R. Devos, M. de Boer, and M. Goldman. 1994. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J. Immunol.* 152: 4368–4374.
45. Wu, K., Y. Bi, K. Sun, and C. Wang. 2007. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell. Mol. Immunol.* 4: 269–275.
46. Strauss, L., C. Bergmann, M. J. Szczepanski, S. Lang, J. M. Kirkwood, and T. L. Whiteside. 2008. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J. Immunol.* 180: 2967–2980.
47. Churlaud, G., V. Jimenez, J. Ruberte, M. Amadouji Zin, G. Fourcade, G. Gottrand, E. Casana, B. Lambrecht, B. Bellier, E. Piaggio, et al. 2014. Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. *Clin. Immunol.* 151: 114–126.
48. Brandt, E. B., R. T. Strait, D. Hershko, Q. Wang, E. E. Muntel, T. A. Scribner, N. Zimmermann, F. D. Finkelman, and M. E. Rothenberg. 2003. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J. Clin. Invest.* 112: 1666–1677.



**Supplemental figure 1: Ld-IL2 effect on other cell compartments.**

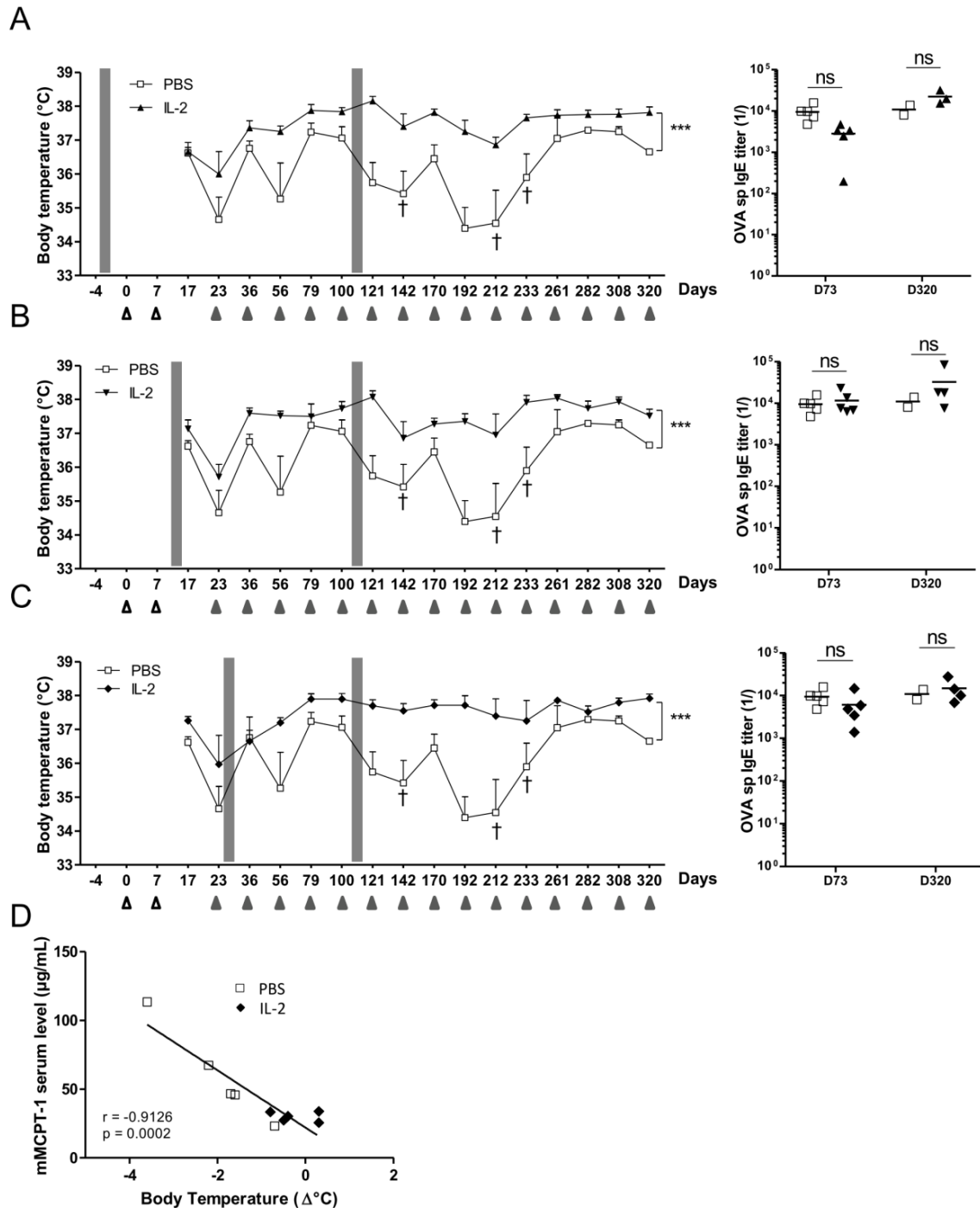
Mice were daily i.p injected with Ld-IL2 (IL-2) or PBS as control during 5 days, and cell populations were analyzed by flow cytometry in spleen, mesenteric lymph nodes (MLN), Peyer's patches (PP) and small intestine (SI) 2 hours after the last injection. (A) Percentage of CD8<sup>+</sup>Tregs (Fcp3<sup>+</sup> among CD8<sup>+</sup> T cells). (B) Percentage of ILC2 (Lin-CD3-CD127<sup>+</sup>GATA-3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) among total CD45<sup>+</sup> cells. (C) Percentage of eosinophils (SSC<sup>Hi</sup>SiglecF<sup>+</sup>) among total CD45<sup>+</sup> cells. (D) Percentage of NK cells (NKp46<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>) in CD45<sup>+</sup> cells. (E) Percentage of naïve B cells (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) in B220<sup>+</sup> cells. (F) Percentage of IgE<sup>+</sup> B cells in B220<sup>+</sup> cells. (G) Percentage of mast cells (FCeR1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>) among CD45<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>SiglecF<sup>-</sup> cells. Data represent one of three independent experiments. Each value represents the mean ± SEM of five to ten mice (\*P<0.05, \*\*P<0.01; IL-2 vs PBS, Mann Whitney test). ns: non-significant, ND: Not determined.





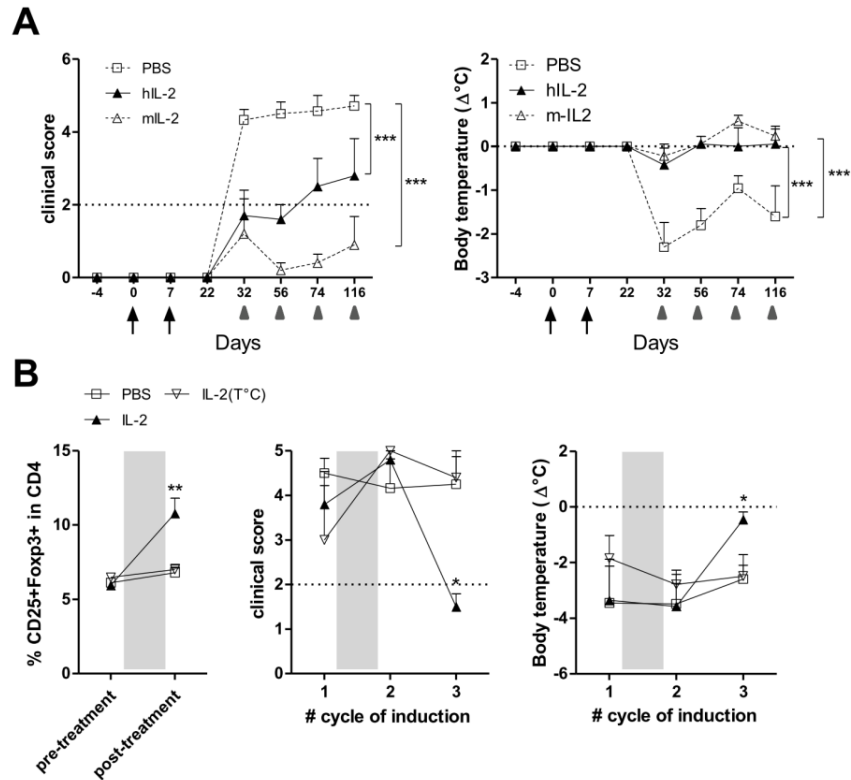
**Supplemental figure 2: Specific depletion of Foxp3<sup>+</sup> T cells after α-CD25 PC61 antibody treatment.**

Mice were treated with anti-CD25 mAb, isotype control or PBS as controls and impact on different cell populations was analyzed by flow cytometry 10 days after. (A-B) Impact on Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in blood. (A) Representative dot plot of CD25 and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup> T cells from treated mice. (B) Percentage of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (left panel) and total Foxp3<sup>+</sup> (right panel) among CD4<sup>+</sup> T cells were represented. (C) Percentage of eosinophils (SSC<sup>hi</sup>SiglecF<sup>+</sup>) and (D) NK cells (NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) in blood. (E) Percentage of ILC2 (Lin<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>GATA-3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) in Peyer's patches. Each dot represents individual value for each mouse and group means are shown (n = 5 to 10 mice per group; \*\*P<0.01, Mann Whitney test). ns: non-significant.



**Supplemental figure 3 : Ld-IL2 induces a sustainable protection against body temperature drop after OVA challenges in preventive and therapeutic settings.**

Mice were sensitized at days 0 and 7 with OVA and then challenged with OVA by repeated oral administrations. The 5-day Ld-IL2 cure (grey bars) was initiated (A) before sensitization, (B) between sensitization and allergy induction or (C) after allergy induction. One additional cure of Ld-IL2 was performed in IL-2 treated mice at day 110. The body temperature variations were recorded over a period of 10 months including 18 cycles of OVA challenges (Left panels). Represented data are temperature variations measured after the last OVA challenge of each cycle (grey arrows) that induced severe allergic reactions (score  $\geq 4$ ) at least in 75% of PBS-treated sensitized mice. OVA-specific IgE titers were measured by ELISA at the indicated days and individual values and mean are shown (Right panels). Data represent one of two independent experiments. (D) Correlation between mMCPT-1 serum levels and body temperature variations in sensitized mice treated with IL-2 (black diamonds) and PBS (white squares) is done at day 56. Pearson correlation coefficient ( $r$ ) and  $p$  values are noted (\*\*\* $P < 0.001$ , One way ANOVA). ns: non-significant (Mann-Whitney test). † indicates a dead mouse.



#### Supplemental figure 4: Allergy protection cannot be related to the potential immunogenicity of human IL-2 in mice.

(A) Mice were treated with 5-day Id-IL2 cure (hIL-2) or injected once intraperitoneally with  $10^{10}$  viral particles of recombinant AAV8 carrying murine IL2 gene (mIL-2). They were next sensitized at days 0 and 7 (black arrows) with i.p. OVA/Alum and then challenged with OVA by repeated oral administrations. Clinical scores (Left panel) and temperature variations (Right panel) measured after the last OVA challenge of each cycle (grey arrows) that induced severe allergic reactions (score  $\geq 4$ ) in at least 75% of PBS-treated sensitized mice (PBS) are shown. Values represent the mean  $\pm$  SEM of five mice. (\*\*\*P<0.001, One way ANOVA). (B) OVA-specific allergic mice were treated during 5 days (grey bars) with low doses of IL-2 or heat inactivated IL-2 (IL-2 T<sup>°</sup>C). Percentage of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells were analyzed by flow cytometry before and after the cure (Left panel). Clinical score (Middle panel) and body temperature variations (Right panel) were recorded after the last OVA challenge of each cycle. Data represent the mean  $\pm$  SEM of five mice (\*P<0.05, \*\*P<0.01, Mann-Whitney T).

## Conclusion de l'article 1

Les résultats présentés dans cet article confirment la capacité de l'IL-2 administrée à faible dose chez la souris par voie intrapéritonéale à induire l'expansion et l'activation des lymphocytes T régulateurs. De façon intéressante, nous avons pu montrer l'absence d'effet notable de l'IL-2 sur les autres populations cellulaires y compris les cellules effectrices de l'allergie (Fig. S1) et démontré ici une action de l'IL-2 au niveau des organes lymphoïdes et des tissus associés à la muqueuse digestive. Cette action de l'IL-2 faible dose sur les Treg nous a conduit à tester cette immunothérapie dans un modèle d'allergie.

Pour cela, nous avons adapté le protocole établi par Yamashita et al. (Yamashita et al. 2012) pour l'induction d'une allergie alimentaire à l'OVA chez la souris. Nous avons pu observer chez des souris BALB/c AnN sensibilisées que l'administration répétée de l'antigène par voie orale induit l'apparition de diarrhées profuses et d'une chute de température pouvant conduire à une hypothermie sévère ( $<-2^{\circ}\text{C}$ ) chez certaines souris (Fig. 2). Nous avons pu identifier que le choix de la souche de souris est important dans la mesure où l'induction de l'anaphylaxie a été plus efficace chez les Balb/c AnN, comparée aux souris Balb/c jRj ou Balb/c ByJRj (données non montrées), et que l'effet est indépendant du fournisseur d'animaux (i.e. Janvier Labs ou Charles Rivers). Nous avons ensuite confirmé que la phase de sensibilisation permet l'induction d'une réponse mémoire de type Th2, détectée dans la rate et les ganglions mésentériques (données non montrées) et que la phase d'induction orale permet la mise en place d'une réactivité lymphocytaire locale (PP, MLN) de type Th2 (IL-4, IL-5), associée à l'apparition des symptômes (Magnan et Humbert 2005). Néanmoins, nous avons pu également observer une réponse IFN- $\gamma$  spécifique à l'OVA dans les MLN et la rate (Fig. 2).

Utilisant ce modèle, nous avons montré que le traitement IL-2 est efficace afin de prévenir et traiter les signes cliniques de l'allergie alimentaire y compris les réactions sévères associées une forte chute de température corporelle. L'effet obtenu est robuste, comme le démontre la protection après de multiples challenges, et perdure sur une durée de plus de 10 mois. Afin de vérifier l'implication des Treg dans la protection induite par l'IL-2, nous avons réalisé des expériences similaires dans lesquelles les Treg ont été spécifiquement éliminés par l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre le CD25, à la fin de la cure d'IL-2. Les résultats obtenus ont démontré le rôle indispensable des Treg dans le contrôle de la réactivité allergique à l'OVA. L'étude des mécanismes immunologiques associés a démontré

que l'IL-2 induit un rééquilibrage de la balance Th1/Th2 avec notamment une diminution de la sécrétion d'IL-5 et une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  au niveau local (MLN). Ceci s'est accompagné d'une diminution du recrutement et de la dégranulation des basophiles et des mastocytes. Néanmoins, le taux d'IgE spécifiques de l'OVA n'est pas diminué chez les souris traitées par IL-2 (Fig. S3) aux dates testées. Ceci pose la question d'un mécanisme de régulation se situant en aval du pontage des IgE à la surface des cellules effectrices par l'OVA. Nous avons démontré que le traitement par de faibles doses d'IL-2 permet de supprimer le recrutement local et la dégranulation de mastocytes, de façon Treg-dépendante (Article 1). D'autre part, l'augmentation précoce de Treg est transitoire, disparaissant à J30 (Fig. 4). Néanmoins, ils restent actifs dans la mesure où leur déplétion tardive, entre deux challenge à l'OVA, entraîne la réapparition des symptômes de l'allergie (Fig. 3), ouvrant des perspectives de recherche intéressantes en se focalisant sur les mécanismes de régulations locaux ou l'exploration d'autres populations de cellules régulatrices.

Alors que la voie d'administration systémique (intrapéritonéale) a permis de faire la preuve de concept de l'utilisation de l'IL-2, aujourd'hui la question de voies alternatives plus réalistes en clinique se pose. Nous avons voulu cibler plus préférentiellement les muqueuses digestives en testant l'administration d'IL-2 pour voie sublinguale, rectale et orale. De façon intéressante, nous avons démontré que l'IL-2 administrée par voie orale permet de prévenir les manifestations cliniques de l'allergie alimentaire et le recrutement local de mastocyte (Fig. 7), suggérant que des voies alternatives sont envisageables.

De façon intéressante, nous avons démontré que l'IL-2 est efficace dans un autre modèle antigénique d'allergie. En effet nous avons démontré, en plus du modèle à l'OVA, que l'IL-2 prévient les signes cliniques de l'allergie alimentaire à la cacahuète (Fig.3). Ceci est une avancée thérapeutique considérable, ouvrant la perspective de pouvoir traiter les patients souffrant de poli-sensibilisation.

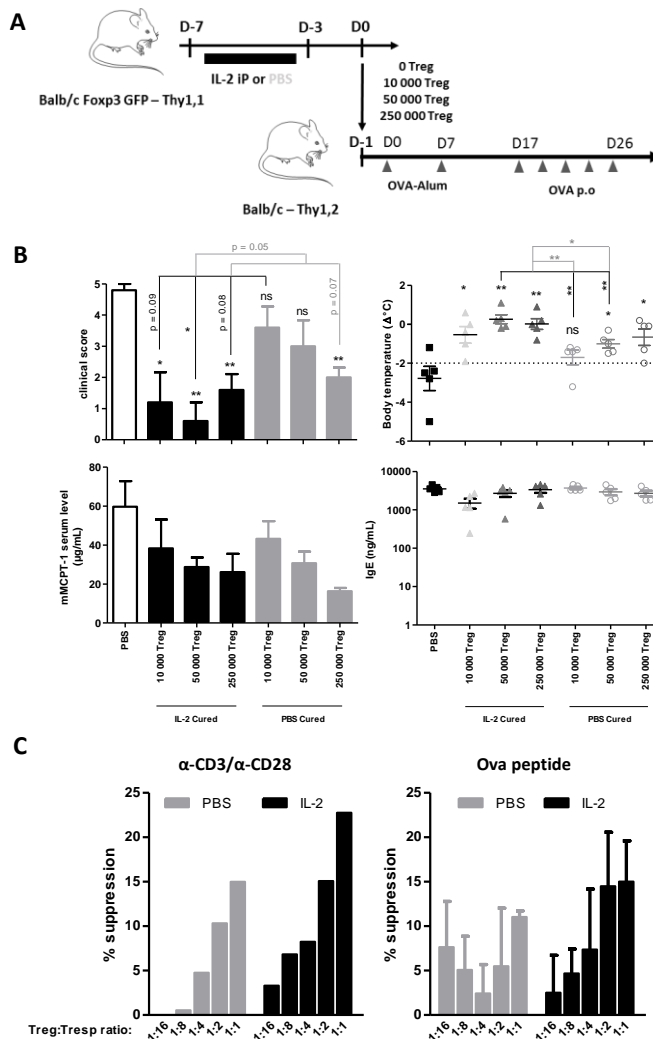
Au final, cet article a permis d'une part de confirmer les données de la littérature quant à l'effet spécifique de l'IL-2 sur l'expansion et l'activation spécifique des Treg, tout en apportant des nouveautés, en caractérisant notamment l'effet immunomodulateur de l'IL-2 faible dose au niveau de l'intestin. D'autre part, cette étude apporte la preuve de concept de l'utilisation de l'IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie alimentaire.

## **Deuxième partie : Etude des mécanismes associés à la protection induite par l'IL-2 faible dose dans l'allergie alimentaire.**

Les résultats obtenus dans la première partie sont très prometteurs, cependant certains points restent à éclaircir. Notamment, nos données démontrent que l'IL-2 agit initialement par une expansion et une activation des Treg, puisque leur élimination abolit l'effet clinique obtenu. De façon intéressante, nous avons observé que l'IL-2 faible dose induit l'expansion précoce des Treg au niveau systémique (rate) et local (MLN, PP), y compris au niveau de la muqueuse intestinale où ils expriment un faible niveau de CD25. A l'inverse, leur prolifération et leur activation ne sont induites uniquement en périphérie, attestées par une augmentation du pourcentage de cellules Ki67<sup>+</sup>, d'ICOS<sup>hi</sup> et de CTLA-4<sup>hi</sup> dans la rate après traitement par IL-2 (Fig. 1). Se pose dès lors, une première série de questions, et notamment du type de cellules régulatrices sensibles à l'IL-2. Les tTreg sont-ils les seuls lymphocytes T régulateurs capables de répondre à de faibles doses d'IL-2, ou alors, l'IL-2 peut-elle induire des pTreg à partir de Tconv, et entrainer leur expansion ? L'effet protecteur de l'IL-2 serait-il lié à une activation et une prolifération systémique des Treg puis à leur migration vers les tissus cibles de l'inflammation où ils exerceraient leur action localement ? La question de leur spécificité antigénique est également ouverte. Aussi, quelques semaines après la fin du traitement par IL-2, nous n'observons plus d'expansion des lymphocytes CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ni même des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> (Fig. 4) dans les différents organes des souris protégées, alors qu'ils restent actifs, puisque leur élimination tardive, après les premiers challenges oraux, entraine la perte de protection clinique obtenue par l'IL-2 (Fig. 3). L'ensemble de ces observations permet d'émettre plusieurs hypothèses mécanistiques différentes, qui ne sont certainement pas exclusives. L'absence visible d'augmentation de Treg chez les souris protégées pose la question de la sélection de Treg particulièrement efficaces pour contrôler les réponses allergiques et qui seraient présents en fréquence faible, correspondant éventuellement aux Treg « mémoires » spécifiques de l'antigène. En effet, l'administration répétée de l'OVA a pu sélectionner les Treg spécifiques de l'antigène, persistant alors à très faible fréquence mais capables lors d'une nouvelle stimulation antigénique d'agir rapidement et efficacement et ainsi de contrôler les réponses allergiques. De même, existent-ils des mécanismes immunorégulateurs locaux, alternatifs, impliquant les cellules régulatrices FOXP3<sup>+</sup> ? Enfin, l'activité protectrice de l'IL-2 passe-t-elle par une action exclusive sur les Treg, ou par la mise en place de mécanismes immunomodulateurs alternatifs

impliquant d'autres médiateurs que les Treg ? Dans cette deuxième partie, j'essaierai de répondre à ces différentes questions en présentant les premiers résultats obtenus, qui devront être reproduits afin de répondre clairement aux différentes hypothèses.

# 1. Le traitement IL-2 faible dose agit directement sur l'activité suppressive des Treg.



**Figure 13** : le traitement par IL-2 confère une meilleure activité suppressive aux Treg.

Les souris donneuses de Treg ont été traitées par de faibles doses d'IL-2 ou de PBS pendant 5 jours. 2 jours plus tard, les souris ont été sacrifiées. Les Treg ont été triés à partir des MLN dans le but de réaliser un transfert adoptif (B) et un test de suppression de la prolifération de Tconv transgéniques (C). (A), Représentation schématique du protocole expérimental. (B) Transfert adoptif de lymphocytes T régulateurs. 10 000, 50 000 ou 250 000 Treg issus de souris donneuses préalablement traitées ou non par IL-2 ont été administrés par voie intraveineuse à des souris receveuses congéniques. Les souris receveuses ont ensuite été sensibilisées à l'OVA et challengées par voie orale dans le but d'induire l'allergie. La protection induite par les Treg a été analysée. Des souris non transférées, sensibilisées et challengées ont été utilisées comme témoins (PBS). Scores cliniques et changements de température corporelle lors de la dernière induction à J26 chez les souris receveuses (B, panel du haut). Mesure du taux de mMCP-1 (B, Panel du bas à droite) et des IgE spécifiques (B, Panel en bas à gauche) dans le sérum des souris receveuses par ELISA. Le sérum a été prélevé dans les 30 minutes suivant l'apparition des signes cliniques d'allergie lors de la dernière induction. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SEM de chaque groupe de 5 souris. Chaque point représente une souris individuelle. La barre représente la moyenne  $\pm$  SEM de chaque groupe de 5 souris (C) Test de suppression de la prolifération de Tconv transgéniques.  $10^5$  Tconv transgéniques spécifiques de l'OVA (DO11.10) marqués au CTV ont été stimulés avec des billes activatrices anti-CD3/CD28 (A gauche) ou le peptide OVA à 0.025  $\mu$ g/mL (A droite) en présence de  $5 \cdot 10^5$  splénocytes et cultivés en présence ou non de Tregs (non-TCR-transgéniques) dans les ratios indiqués. Quatre jours après, la suppression de la prolifération des Tconv médiée par les Treg issus de souris traitées ou non par IL-2 a été analysée par cytométrie en flux et un pourcentage de suppression a été calculé. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SEM de simplicité ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28) ou de triplicats (Ova Peptide). \*p < 0.05 ; \*\* p < 0.01, Mann Whitney Test comparé aux souris contrôles PBS. ns, non significatif



Ayant démontré l'impact de l'IL-2 sur l'homéostasie du compartiment Treg (sytémique et local), nous avons ici voulu savoir si l'IL-2 faible dose agissait sur la qualité des fonctions suppressives des lymphocytes T régulateurs, notamment au niveau local.

Pour cela, nous avons réalisé une expérience de transfert adoptif d'un nombre fixe de Treg (3 doses testées) issus des MLN de souris donneuses ayant été traitées pendant 5 jours par de l'IL-2 faible dose ou du PBS. Les souris receveuses ont ensuite été sensibilisées puis challengées par l'OVA afin d'induire l'allergie (Fig. 13A). Des souris non transférées, sensibilisées et challengées (PBS) ont été utilisées comme témoin. La présence et la survie des cellules injectées à la fin du protocole ont été confirmées par l'expression de marqueurs congéniques analysée par cytométrie en flux, dans tous les groupes (données non montrées).

L'analyse des scores cliniques et de la chute de température des souris ayant reçu des Treg issus de souris traitées par PBS (Treg<sup>PBS</sup>), montre un effet protecteur dose dépendant, avec un effet nul à la dose de 10 000 Treg<sup>PBS</sup> et une protection significative à la dose de 250 000 Treg<sup>PBS</sup> (Fig. 13B) comparé aux souris contrôles, démontrant le rôle protecteur des Treg non préalablement activés. A l'inverse les Treg, activés par l'IL-2 (Treg<sup>IL-2</sup>), induisent une protection efficace quelque soit la dose à laquelle ils sont administrés, et significativement meilleure comparativement aux souris ayant reçu des Treg issus du groupe PBS (Fig. 13B). L'analyse de la dégranulation des mastocytes attestée par la mesure du taux de mMCPT-1 dans le sérum des souris prélevées 30 minutes après le déclenchement des symptômes, confirme l'effet dose-dépendant observé avec les Treg PBS, avec un effet maximal à la dose de 250 000 Treg (Fig. 16B) comparé aux souris non injectées. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes (Treg<sup>PBS</sup> et Treg<sup>IL-2</sup>) quant à la diminution du taux sérique de mMCPT-1 (Fig. 16B) et ce, quelque soit la dose de Treg administrée. Aussi, l'administration de Treg<sup>PBS</sup> ou Treg<sup>IL-2</sup> n'a pas d'effet quant à la concentration d'IgE spécifiques analysée dans le sérum des souris à J30, dans la mesure où des niveaux comparables ont été retrouvés dans les différents groupes analysés (Fig. 13B).

Enfin nous avons analysé l'activité suppressive *in vitro* des Treg issus des souris donneuses traitées ou non pendant 5 jours par de l'IL-2. Pour cela, nous avons mis au point un test de suppression spécifique utilisant des souris DO11.10 dont 80% lymphocytes T CD4<sup>+</sup> possèdent un TCR (KJ1.26) transgénique spécifique pour le peptide OVA323-339 (données non montrées). Les lymphocytes T conventionnels CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de ces souris ont été triés puis 10<sup>5</sup> de ces Tconv ont été marqués *in vitro* au CellTrace® Violet (CTV) pour suivre la

prolifération des cellules en cytométrie en flux par dilutions successives du marqueur. Les Tconv CTV<sup>+</sup> ont ensuite été mis en culture pendant 4 jours, en présence d'OVA (peptide OVA323-339) ou de billes activatrices anti-CD3/CD28, de splénocytes irradiés et de différents ratios de Treg issus de souris naïves non transgéniques traitées ou non par l'IL-2. Un pourcentage de suppression spécifique a été calculé en prenant en compte l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du CTV des Tconv KJ1.26<sup>+</sup> divisés (à partir du 2ème pic de prolifération) et des Tconv KJ1.26<sup>+</sup> non divisés. Les différentes conditions testées permettent d'induire une forte prolifération des Tconv puisque environ 77% des Tconv ont proliféré après restimulation spécifiques par le peptide OVA323-339 (données non montrées). De plus, la prolifération des Tconv est spécifique de l'OVA puisqu'une stimulation par une protéine non relevante (Bovin Serum Albumin) n'a pas induit de prolifération cellulaire (données non montrées).

En condition de restimulation spécifique par le peptide OVA, les Treg issus de souris traitées par IL-2 montrent une activité suppressive dépendante du ratio de Treg (Fig. 13C panel de droite). Ceci n'a pas été retrouvé avec les Treg issus de souris non traitées, en raison d'une grande variabilité des résultats, notamment aux faibles ratios (Fig. 13C panel de droite). Néanmoins, si l'on considère les 3 premières dilutions de Treg (ratio 1:1, 1:2, 1:4), les Treg issus de souris traitées par IL-2 sont plus suppresseurs que les Treg issus de souris non traitées, et ce à tous les ratios considérés (Fig. 13C panel de droite). Fait intéressant, les Tregs issus de souris traitées par l'IL-2, au ratio 1:4, ont montré un niveau de suppression comparable aux Treg issus de souris non traitées au ratio 1:2. De même, le niveau de suppression induit par les Treg issus de souris traitées à l'IL-2 au ratio 1:2 est supérieur au niveau de suppression induit par les Treg issus de souris non traitées au ratio 1:1 (Fig. 13C panel de droite). Ces résultats indiquent une forte augmentation de l'activité suppressive des Treg IL-2. Des résultats similaires ont été obtenus en condition de restimulation non spécifique par billes anti-CD3/CD28 (Fig. 13C panel de gauche). Ainsi, le traitement par IL-2 semble induire une activation des Treg, leur conférant une meilleure activité suppressive *in vitro* et *in vivo*.

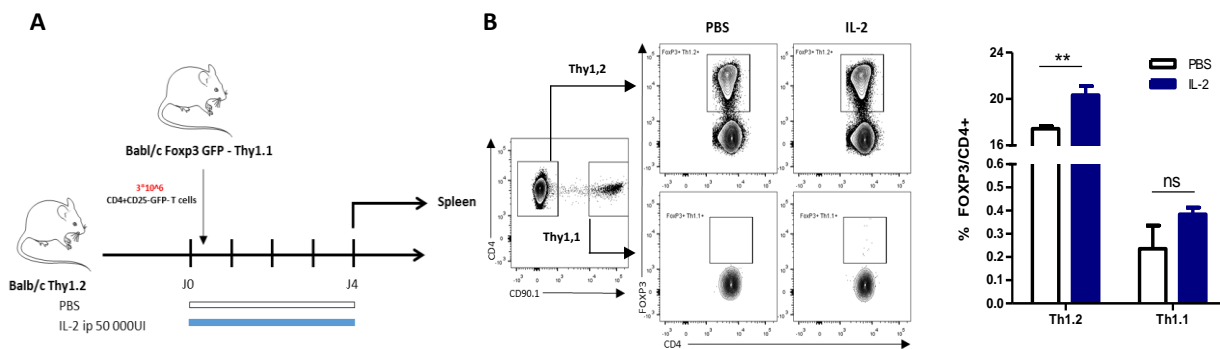
L'ensemble de ces résultats démontre que l'activation systémique des Treg par de faibles doses d'IL-2 est suffisante pour conférer une meilleure activité suppressive aux Treg, et induire une protection clinique des souris contre les manifestations de l'allergie. Néanmoins, le transfert adoptif de Treg issus de souris non traitées par IL-2 est également efficace, mais nécessite des doses plus importantes. Ainsi, l'effet thérapeutique de l'IL-2 passe par une

activation préalable des Treg, sans toutefois préjugé du type de Treg capables de répondre à l'IL-2.

## 2. Le traitement IL-2 faible dose n'induit pas de pTreg en périphérie.

Alors que les tTreg sont sensibles à l'IL-2 faible dose en raison de l'expression du CD25, nous avons voulu savoir s'ils étaient les seuls lymphocytes T régulateurs capables de répondre à l'IL-2, ou si l'IL-2 pouvait induire et amplifier des pTreg à partir de Tconv.

Nous avons réalisé des expériences de transfert adoptif avec  $3.10^6$  Tconv  $CD4^+GFP^-$  issus de souris Thy1.1 (CD90.1) Foxp3/GFP chez des souris receveuses Thy1.2 traitées par IL-2 (50 000 IU) ou PBS en contrôle. Suite à la cure de 5 jours, l'analyse de l'induction de Treg a été réalisée par cytométrie de flux en recherchant dans la rate les cellules T  $CD4^+$  Thy1.1 $^+$ FOXP3 $^+$ . (Fig. 14B). L'efficacité du traitement par IL-2 faible dose a pu être objectivée par l'augmentation significative des Treg endogènes ( $CD4^+$  Thy1.2 $^+$ ) par rapport au groupe contrôle (PBS) (Fig. 14B). Par contre, l'analyse du marquage FOXP3 dans la population  $CD4^+$  Thy1.1 $^+$  (attestant de l'induction des pTreg) ne montre pas d'augmentation significative du pourcentage de Treg chez les souris IL-2 comparativement au groupe PBS (Fig. 14B). Malgré une légère augmentation, nous pouvons conclure de ces données préliminaires que le traitement par IL-2 ne permettrait pas l'induction de Treg en périphérie.



**Figure 14 :** Le traitement par de faible dose d'IL-2 ne permet pas d'induire de Treg en périphérie

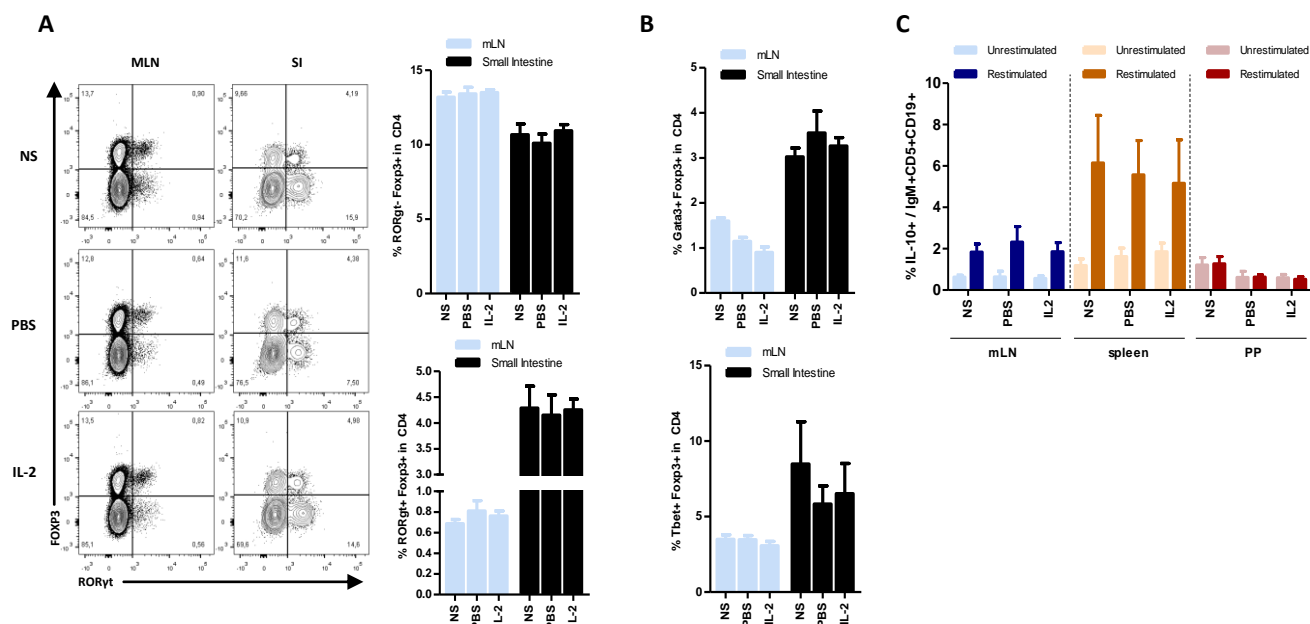
Des souris receveuses BALB/c Thy1.2+ (n=5 / groupe) ont été traitées par 50 000 UI d'IL-2 ou de PBS par voie intrapéritonéale à J0. Les Tconv  $CD4^+GFP^-$  issus de souris donneuses BALB/c Foxp3-GFP Thy1.1+ ont été triés par cytométrie en flux (BD FACS Aria II).  $3.10^6$  Tconv  $CD4^+GFP^-$  ont ensuite été injectés par voie intraveineuse à chaque souris receveuse à J0+8h. La cure d'IL-2 a ensuite été poursuivie pour un total de 5 jours. L'induction de Treg a été analysée à J4 au niveau de la rate. **(A)**, Protocole expérimental. **(B)**, Contour plot représentant l'analyse des Treg au sein des  $CD4^+$ Thy1.1 $^+$  et des  $CD4^+$ Thy1.2 $^+$  (panel de Gauche) ; Graphique en barre représentant la proportion de lymphocytes Foxp3 $^+$  observée au sein des  $CD4^+$ Thy1.1 $^+$  et des  $CD4^+$ Thy1.2 $^+$  pour chaque groupe (Panel de droite). Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SEM pour chaque groupe de 5 souris. \*\*  $p < 0.01$ , Mann Whitney Test. ns, non significatif

### **3. La protection clinique induite par l'IL-2 n'est pas liée à l'émergence de sous populations régulatrices efficaces pour contrôler les réponses allergiques.**

Alors que l'IL-2 n'a *a priori* pas d'effet sur la conversion de Tconv en Treg, nous avons voulu évaluer si le traitement modifiait le phénotype des Treg et sélectionnait des sous-populations de cellules immunosuppressives particulièrement efficaces pour contrôler les réponses allergiques localement. Pour cela, nous avons analysé les Treg ROR $\gamma$ <sup>+</sup>, les Treg GATA-3<sup>+</sup> et les Treg T-Bet<sup>+</sup>, populations de cellules régulatrices décrites pour induire une tolérance aux antigènes alimentaires et supprimer efficacement les réponses Th2 et Th1, respectivement (Koch et al. 2009; Wohlfert et al. 2011). L'analyse a été effectuée par cytométrie en flux au niveau de l'intestin et des MLN à la fin du protocole d'induction d'allergie chez les souris protégées en comparaison aux souris malades (Fig. 15A). Alors que les Treg ROR $\gamma$ <sup>+</sup> sont en proportions comparables entre les deux organes, les Treg ROR $\gamma$ <sup>+</sup> sont retrouvés majoritairement au niveau de l'intestin (Fig. 15A). Par contre, nous n'avons pas observé de différence de nombre de Treg ROR $\gamma$ <sup>+</sup> ou Treg ROR $\gamma$ <sup>+</sup> entre les souris traitées par IL-2 et PBS, dans les différents organes étudiés (Fig. 15A). De même, l'analyse des Treg GATA-3<sup>+</sup> et des Treg T-bet<sup>+</sup> montrent qu'ils sont préférentiellement localisés au niveau tissulaire (Fig. 15B). Toutefois, la protection induite par l'IL-2 ne peut être expliquée par l'induction de ces Treg, dans la mesure où nous n'observons pas d'augmentation des Treg GATA-3<sup>+</sup> ni des Treg T-bet<sup>+</sup> dans le groupe traité (protégé) comparé au groupe PBS (malade), et ce, dans les différents organes étudiés (Fig. 15B).

De même, nous avons analysé les lymphocytes B régulateurs (Breg), caractérisés par la sécrétion d'IL-10, constituant un des mécanismes de régulation alternatif. Ces cellules semblent de plus en plus décrites dans la régulation des phénomènes inflammatoires allergiques. Cependant, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de définition phénotypique claire de ces cellules. Néanmoins, nous avons analysé la sécrétion d'IL-10 au sein de la population de lymphocytes B dite « régulatrice » CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> dans la rate, les PP et les MLN. Il n'existe pas de différence significative de pourcentage de Breg IL-10<sup>+</sup> dans les différents organes étudiés entre les groupes protégés par IL-2 et le groupe malade (Fig. 15C), qu'ils soient analysés avec ou sans restimulation *in vitro* préalable.

Ces résultats montrent que l'efficacité du traitement par IL-2 ne peut s'expliquer par l'émergence d'une sous-population de Treg tissulaires particulièrement efficaces pour contrôler les réponses allergiques, ni par l'implication des Breg.



**Figure 15 :** Le traitement par de faible dose d'IL-2 ne permet pas la sélection de sous populations de cellules régulatrices

Les souris ont été traitées par voie intrapéritonéale par 50 000 UI d'IL-2 ou de PBS, puis sensibilisées et challengées par l'OVA. Des souris non sensibilisées (NS) ont été utilisées comme contrôle négatif. Après 6 challenges oraux, 73 % des souris traitées par PBS étaient malades et 73 % des souris traitées par IL-2 étaient protégées. A j30, les souris ont été sacrifiées et l'analyse des différentes populations lymphocytaires régulatrices a été réalisée au niveau des Rates, MLN, PP et de l'intestin (SI) par cytométrie en flux. **(A)**, Contour plot (panel de gauche) et représentation du pourcentage (Panel de droite) des Treg RORγt+ et des Treg RORγt- observé dans chaque groupe au sein des Lymphocytes T CD4+. **(B)**, représentation du pourcentage des différentes sous populations de Treg observées dans chaque groupe au sein des Lymphocytes T CD4+. **(C)**, Proportion de lymphocytes B régulateurs sécréteurs d'IL-10 observés au sein des cellules CD19+IgM+CD5+ dans la rate, les MLN et les PP. Les cellules totales de chaque organe ont été restimulées ou non pendant 4h par PMA, Ionomycine, LPS et monensine et analysées par cytométrie en flux. Chaque barre représente la moyenne +/- SEM pour chaque groupe de 5 souris. Mann Whitney Test. ns, non significatif.

#### **4. Le transfert adoptif de Treg issus de souris protégées par IL-2 confère une meilleure protection contre l'allergie.**

Il est important de souligner que dans notre protocole, l'OVA est administrée de façon répétée et rapprochée dans le temps par rapport au traitement IL-2. Ainsi, la sélection de Treg spécifiques de l'OVA pourrait être un mécanisme expliquant l'efficacité à long-terme de notre traitement. Même si les tTreg des souris BALB/c ne sont a priori pas spécifiques de l'OVA (non antigène du soi), nous pouvons imaginer que l'administration répétée de l'antigène permette l'émergence de clones Treg cross-réactifs.

Plusieurs modèles expérimentaux peuvent être mis en place pour étudier cette spécificité. L'utilisation d'un modèle murin de polysensibilisation à deux allergènes pourrait être intéressante afin d'évaluer la spécificité des Treg générés dans notre protocole et leur efficacité ou non à traiter les manifestations cliniques contre les 2 antigènes. Néanmoins, l'obtention d'un double modèle antigénique reste difficile en raison de la compatibilité des protocoles de sensibilisation et de challenge, dont les cinétiques varient en fonction de l'antigène considéré.

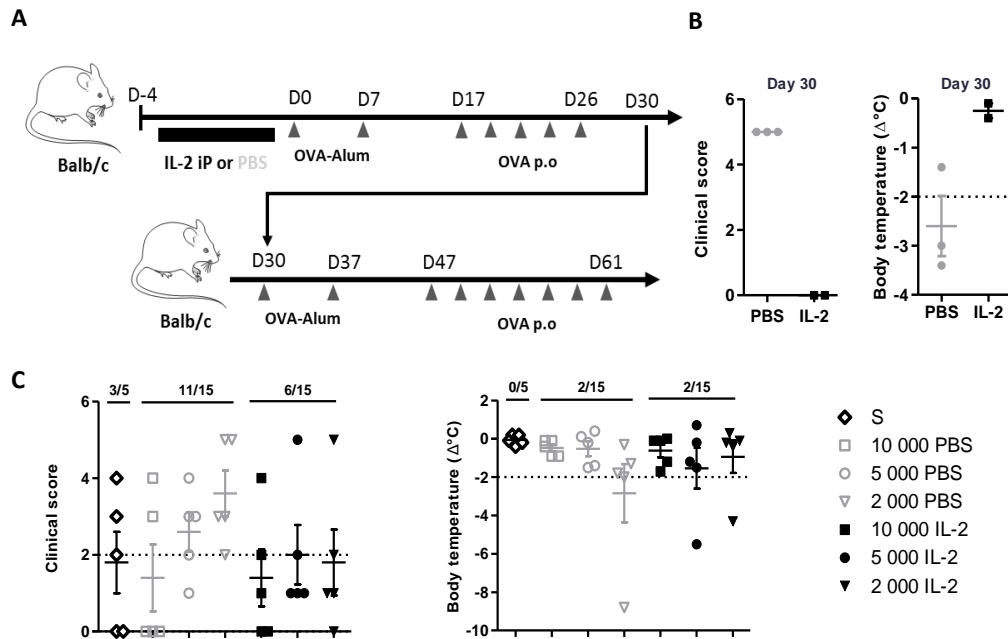
Alternativement, nous avons comparé par transfert adoptif, l'efficacité *in vivo* de la protection induite par les Treg isolés à partir de souris traitées et protégées par l'IL-2 et prélevés à J30 du protocole d'allergie, à l'efficacité de Treg issus de souris non protégées et prélevés au même timing du protocole (Fig. 16A-B). Les souris receveuses ont ensuite été sensibilisées à l'OVA et challengées, selon notre protocole standard d'induction d'allergie et les signes cliniques d'allergie ont été monitorés. Des souris non transférées, sensibilisées (S) et challengées, ont été utilisées comme témoins. Nous avons testé trois doses faibles de Treg (2 000, 5 000, 10 000 cellules) pour le transfert. Le choix du nombre de cellules transférées a été basé sur les résultats obtenus lors des expériences de la figure 13. Dans ces tests, le nombre minimal de Treg injectés était de 10 000 cellules par souris et toutes les souris ayant reçu des Treg issus de souris traitées à l'IL-2 étaient protégées contre les allergies (Fig. 13B). C'est pourquoi nous avons diminué le nombre de cellules injectées afin d'étudier un potentiel effet des Treg spécifiques de l'antigène.

A ces doses, nous avons observé que les Treg provenant de souris traitées par IL-2 contrôlaient efficacement les manifestations cliniques de l'allergie (Fig.16C). En revanche, plus de la moitié des souris transférées avec les Treg issus du groupe PBS (11 sur 15) avaient

une diarrhée sévère et une pilo-érection (Fig. 16C). Cependant, l'effet dose observé avec les Treg issus de souris malades (PBS), n'a pas été observé avec les Treg issus de souris traitées et protégées par IL-2, démontrant le meilleur contrôle des Treg IL-2. Ainsi, la protection obtenue peut être liée soit à un effet durable de l'IL-2, soit à un effet optimal grâce à l'émergence de Treg spécifiques. L'analyse de l'activité suppressive de Treg prélevés à distance de la cure d'IL-2 (environ 30 jours après la dernière injection d'IL-2), sur la prolifération de Tconv restimulés de façon spécifique ou non, ou sur les manifestations cliniques de l'allergie après transfert adoptif à des souris sensibilisées puis challengées à l'OVA, permettra clairement de répondre à cette question. Néanmoins, les Treg issus de souris traitées au PBS et prélevées en fin de protocole (Fig. 16) sont plus efficaces pour induire une protection clinique que les Treg issus de souris traitées au PBS et prélevées en début de protocole (Fig. 13), dans la mesure où la dose de 10 000 Treg permet l'obtention d'une protection clinique lorsqu'ils sont prélevés en fin de protocole contrairement à leur prélèvement en début de protocole. Ces résultats donnent une piste de réflexion quant à l'émergence de clones de Treg spécifiques de l'OVA induits lors de l'administration répétée d'OVA.

Toutefois, la qualité des résultats obtenus est discutable compte tenu des valeurs relativement faibles de chute de la température corporelle, y compris pour le groupe sensibilisé non-transféré et d'une certaine variabilité intra-groupe empêchant de dégager des différences statistiquement significatives.





**Figure 16 :** Le transfert adoptif d'un faible nombre de Treg issus de souris protégées par l'IL-2 confère une protection contre les allergies.

Les souris donneuses ont été traitées par de faibles doses d'IL-2 ou de PBS, sensibilisées à l'OVA et challengées. A J30, les souris donneuses ont été sacrifiées, les Treg issus des MLN ont été triés sur la base du CD4+CD25+ puis transférés à des souris receveuses naïves par voie intraveineuse. Les souris receveuses ont ensuite été sensibilisées à l'OVA et challengées par voie orale. La protection induite par les Treg a été analysée. (A) Représentation schématique du protocole de transfert adoptif. (B,C) Scores cliniques et changements de température corporelle lors de la dernière induction à J26 chez les souris donneuses (B) et à J61 chez les souris receveuses (C). Chaque point représente une souris individuelle. La barre représente la moyenne  $\pm$  SEM de chaque groupe de 5 souris.

## **5. Les Treg issus de souris protégées par l'IL-2 entraînent une suppression dose dépendante de la prolifération de Tconv spécifiques de l'OVA, mais leur spécificité à l'OVA n'a pas pu être mis en évidence.**

Nous avons poursuivi nos efforts pour évaluer la présence de Treg spécifiques à l'OVA lors de notre protocole. Il existe un nombre limité d'approches pour démontrer la pertinence fonctionnelle des Treg spécifiques. Le test de suppression de Treg est une méthode disponible permettant de démontrer la fonctionnalité suppressive des Treg spécifiques de l'antigène.

Afin de vérifier la mise en place d'une suppression OVA-spécifique, nous avons évalué l'activité suppressive *in vitro* de Treg issus de souris protégées par l'IL-2 ou non. Brièvement, les souris ont été traitées par IL-2 ou par PBS pendant 5 jours puis sensibilisées et challengées par l'OVA. Les manifestations cliniques de l'allergie ont été monitorées à J30 du protocole (Fig. 17A). L'activité suppressive des Treg, triés sur la base du CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>, issus de souris protégées à J30 a été évaluée et comparée à celle des Treg issus de souris malades traitées par PBS au moyen d'un test de suppression *in vitro*, comme décrit précédemment (Fig. 17B). En guise de contrôle positif, nous avons utilisé des Treg transgéniques ayant un TCR spécifique de l'OVA issus de souris D011.10 naïves, ce qui nous permet d'estimer le niveau maximal de suppression spécifique. En présence de Treg transgéniques spécifiques de l'OVA, la prolifération des Tconv est diminuée proportionnellement au ratio Treg:Tconv avec un effet suppressif notable jusqu'au ratio 1:4 (Fig. 17C). Nous avons pu observer une suppression dose-dépendante induite par les Treg issus de souris traitées par IL-2 (Fig. 17C). De façon intéressante, le niveau de suppression des Treg<sup>IL-2</sup> au ratio 1:1 est comparable à celui des Treg transgéniques au ratio 1:4, suggérant la présence d'un nombre significatif de Treg spécifiques chez les souris protégées (Fig. 17C). Toutefois, il n'est pour le moment pas possible de conclure quant à la supériorité des Treg issus de souris protégées par IL-2 par rapport à l'activité suppressive de Treg issus de souris malades en raison d'un problème technique survenu au cours de la préparation des Treg<sup>PBS</sup>. Cette expérience devra donc être reproduite.

Par ailleurs, les résultats obtenus soulignent la difficulté de détecter l'activité suppressive par des tests *in vitro*, à partir d'échantillons de souris non TCR-transgéniques. Nous avons donc testé la sensibilité du test, en utilisant un ratio Treg:Tconv de 1:1 et en faisant varier le pourcentage de Treg spécifiques de l'OVA, en mélangeant des Treg issus de souris DO11.10 à des Treg issus de souris naïves (Fig. 17D). Ainsi, des suspensions cellulaires de Treg,

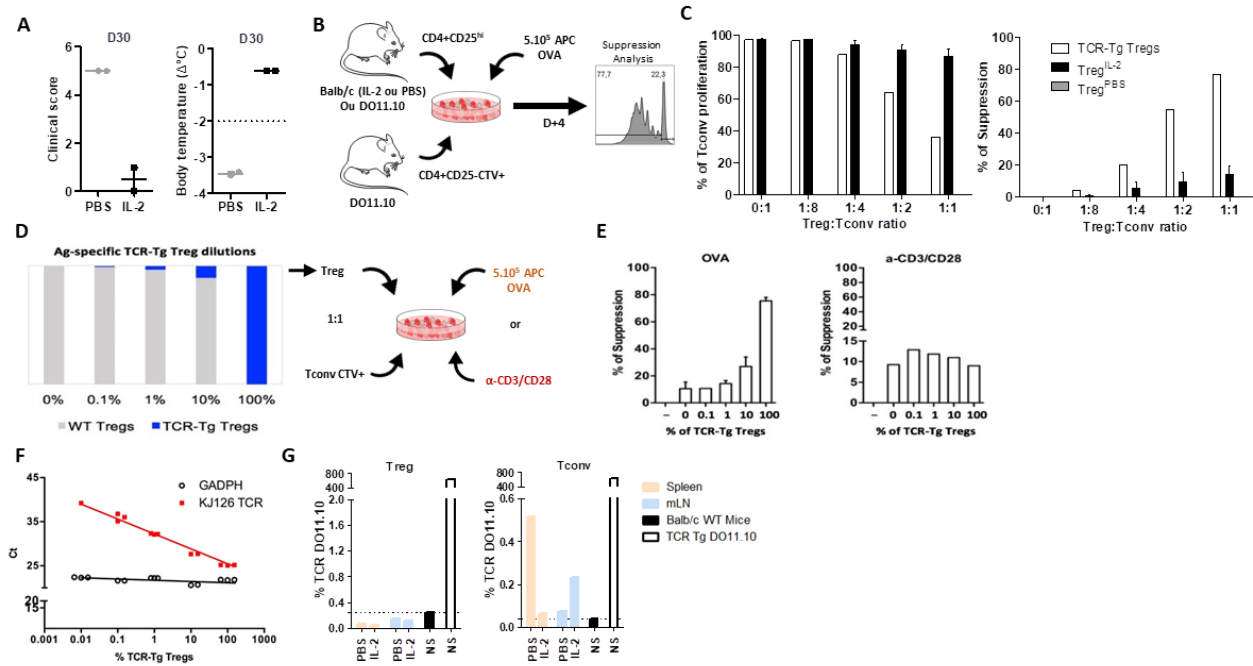
contenant des Treg spécifiques anti-OVA de l'ordre de 0,1%, 1% et 10% ont été préparées, de même que les conditions témoins à 0% et 100% de Treg transgéniques. Les cellules ont été stimulées par le peptide OVA en présence de splénocytes irradiés ou par des billes activatrices anti-CD3 / anti-CD28 pendant quatre jours et la prolifération des Tconv DO11.10 marqués au CTV a été analysée par cytométrie en flux. En condition de restimulation spécifique, la suppression observée croît avec le pourcentage de Treg transgéniques. En effet, la suppression est minimale lorsqu'il n'y a pas de Treg transgéniques dans le milieu (0%) alors qu'elle est maximale lorsqu'il y a 100% de Treg transgéniques correspondant à une suppression de 10% et de 75% respectivement (Fig. 17E). Ces résultats démontrent que l'efficacité de suppression des T anti-OVA est dépendante du pourcentage de Treg spécifiques de l'antigène et que la spécificité TCR joue un rôle important pour l'activité suppressive des Treg. De façon intéressante, lorsqu'une restimulation non antigène-spécifique (billes) est utilisée, les niveaux de suppression sont comparables entre les différents échantillons, quelque soit le pourcentage de Treg TCR-transgéniques présents (Fig. 17E) ; s'expliquant par l'activation de l'ensemble des Tregs quelque soit leur TCR. Lorsque l'on compare les niveaux de suppression des différentes dilutions de Treg transgéniques à ceux observés avec les Treg non transgéniques issus de souris traitées et protégées par IL-2 en condition d'activation spécifique (Fig. 17C), nous pouvons extrapoler, au sein de notre suspension de Treg IL-2, la présence de Treg spécifiques à une fréquence de l'ordre de 1% (permettant d'obtenir 15% de suppression au ratio 1:1).

Toutefois, nous voyons que dans ces conditions expérimentales il est difficile de détecter la présence de Treg spécifiques lorsqu'ils sont en faible fréquence puisqu'après restimulation spécifique aucune différence de suppression n'est observée entre les conditions 0 % et 0.1 % de Treg spécifiques (Fig. 17D) et qu'il faut atteindre 1 % de spécificité au sein de la population Treg pour observer la suppression. Ainsi il reste indispensable d'optimiser les conditions expérimentales du test de suppression et/ou de trouver des approches alternatives.

En parallèle, nous avons cherché à évaluer la fréquence de Treg spécifiques de l'antigène en utilisant une méthode quantitative, plus sensible, par RT-PCR (RT-qPCR), permettant de quantifier un enrichissement des clones porteurs du TCR immunodominant dans nos différents échantillons. Pour valider l'approche, différents échantillons correspondants aux dilutions de Treg contenant 0%, 0,1%, 1%, 10%, 100% de Treg transgéniques, spécifiques de l'OVA, ont été utilisés. L'ARN a été extrait puis une RT-qPCR par Taqman a été effectuée en utilisant des primers spécifiques de la séquence KJ1.26 DO11.10 ; alors que le gène de

ménage GAPDH a été utilisé comme contrôle interne. Les données brutes de la RT-qPCR montrent une corrélation entre le pourcentage de Treg spécifiques de l'échantillon et le nombre de cycles de PCR (Ct) nécessaires pour l'amplification du gène d'intérêt (TCR DO11.10) (Fig. 17F). Ainsi, l'augmentation du nombre de transcrit d'intérêt est dépendante et proportionnelle à la fréquence de Treg KJ1.26+ présent dans l'échantillon et validant l'approche. La courbe « étalon » ainsi mise au point nous permet d'estimer par extrapolation le pourcentage de cellules KJ1.26+ dans les échantillons Treg et Tconv prélevés dans la rate ou les MLN chez les souris protégées (IL-2) ou allergiques (PBS). L'analyse des données montre que l'enrichissement en Treg spécifiques reste très faible, y compris chez les souris IL-2. Néanmoins, le pourcentage de Treg KJ1.26+ est plus important dans les MLN que dans la rate (Fig. 17G). L'analyse des Tconv montre que le traitement par IL-2 permet de contrôler l'induction de Tconv KJ1.26+ au niveau de la rate, dans la mesure où le pourcentage de Tconv KJ1.26+ est supérieur dans le groupe PBS comparé au groupe protégé par l'IL-2 (Fig. 17G).

En conclusion, il est pour le moment difficile de mettre en évidence l'émergence de Treg spécifiques de l'OVA en raison des limites de nos tests mis en place. En effet, des optimisations de nos tests de suppression spécifiques sont nécessaires afin de pouvoir clairement observer des différences de suppressions induites par de faible proportion de Treg spécifiques de l'antigène. Notamment, nous envisageons de répéter le test en utilisant un ratio Treg/Tconv plus important par diminution du pourcentage de Tconv transgéniques, afin de limiter une prolifération trop importante des Tconv. Aussi la RT-qPCR DO11.10 n'a pas permis de détecter les Treg KJ1.26+ chez les souris testées et doit être reproduite. D'autres clonotypes spécifiques de l'OVA pourraient également être recherchés. Ainsi, nous envisageons le séquençage des TCR des Treg des souris protégées par IL-2 et des souris malades, non traitées. L'analyse comparative des séquences obtenues permettra d'étudier si un enrichissement de séquences de TCR spécifiques de l'OVA est présent chez les souris protégées, sans se restreindre à un seul clone immunodominant.



**Figure 17 :** Les Treg issus de souris protégées par l'IL-2 entraînent une suppression dose dépendante de la prolifération de Tconv spécifiques de l'OVA, mais leur spécificité à l'OVA n'a pas pu être mise en évidence.

Les souris ont été traitées ou non par l'IL-2 à faible dose puis sensibilisées et challengées par l'OVA, comme décrit précédemment. A J30 du protocole, les souris ont été sacrifiées et les Treg et Tconv issus des MLN et de la rate ont été triés. **(A)** Scores cliniques et changements de la température corporelle lors des inductions orales d'OVA chez les souris traitées par IL-2 (IL-2) et non traitées (PBS), utilisées pour le test de suppression. Chaque point représente une souris individuelle. **(B-C)** Analyse de l'activité suppressive de la prolifération de Tconv transgéniques (DO11.10) spécifiques de l'OVA par les Treg au travers la mise au point d'un test de suppression *in vitro* spécifiques de l'antigène. 5.10<sup>5</sup> splénocytes irradiés (25 Gy) ont été chargés avec le peptide OVA 323-339 pendant 1h aux concentrations indiquées. 1.10<sup>5</sup> lymphocytes Tconv CD4+CD25<sup>-</sup>, triés à partir des MLN de souris DO11.10 ont été marqués par le CellTrace® Violet puis mis en culture avec différents ratios de Treg triés sur la base du CD4+CD25<sup>hi</sup> issus de souris sauvages traitées (Treg<sup>IL-2</sup>) ou non (Treg<sup>PBS</sup>) par IL-2. En contrôle positif de la suppression, des Treg issus de souris transgéniques DO11.10 ont été utilisés. Après 4 jours de culture, la prolifération cellulaire des Tconv a été analysée par cytométrie en flux. **(B)** Schéma expérimental. **(C)** Pourcentages de Tconv ayant proliférés au moins une fois (panel de gauche) et pourcentage de suppression induit par les Treg (panel de droite). **(D-E)** La suppression de la prolifération spécifique est dépendante de la proportion de Treg transgéniques spécifiques de l'OVA. **(D)** Représentation schématisée du test de suppression. Visualisation des préparations des différentes dilutions de Treg spécifiques de l'OVA. Les Tconv transgéniques spécifiques de l'OVA marqués au CTV ont été stimulés avec la protéine OVA à 200µg/mL en présence de splénocytes irradiés ou des billes activatrices anti-CD3 / CD28 et cultivées en présence ou non d'un ratio 1:1 des différentes dilutions de Treg. Quatre jours après, la prolifération de Tconv et la suppression des Treg sont analysées par cytométrie en flux. **(E)** Le pourcentage de suppression obtenu par les différentes dilutions de Treg après restimulation par l'OVA (**panel de gauche**) ou par des billes activatrices (**panel de droite**) a été déterminé. **(F)** Détection des Treg transgéniques dont le TCR est spécifique à l'OVA par RT-qPCR. Différentes dilutions de Treg, contenant 0%, 0,1%, 1%, 10% et 100% de Treg transgéniques spécifiques de l'OVA issus de souris DO11.10 ont été préparés avec des Treg non transgéniques issus de souris sauvage. Les transcrits ont été amplifiés en utilisant des primers et des sondes TaqMan spécifiques du TCR DO11.10. La droite de corrélation entre le nombre de cycles de PCR en fonction des dilutions de Treg transgéniques valide l'approche de proportionnalité du signal généré avec les différentes dilutions de Treg transgéniques spécifiques de l'OVA. Le gène GADPH a été utilisé comme contrôle. **(G)** Augmentation relative du pourcentage de TCR DO11.10 au sein des Treg (panel de gauche) et des Tconv (panel de droite) issus des groupes de souris protégées (IL-2) ou malades (PBS). Comme contrôles, des cellules issues de souris DO11.10 ou de souris Balb/c sauvages (Wild Type, WT) non sensibilisée (NS) ont été utilisées. Chaque barre représente la moyenne +/- SEM de triplicats (1 échantillon = pool de 2 ou 3 souris). ND, non déterminé.

## Discussion

Au cours de ma thèse, j'ai démontré le rôle immunomodulateur de l'IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie, permettant l'activation des Treg et le contrôle des réponses inflammatoires dans un modèle d'allergie alimentaire chez la souris, répondant ainsi au premier objectif de mon projet. Par la suite, nous avons essayé de comprendre les différents mécanismes immunologiques inhérents à la protection clinique induite par l'IL-2 en se concentrant plus récemment sur la spécificité antigénique des réponses régulatrices mises en place.

Aujourd'hui, plusieurs études rapportent l'effet immunorégulateur de l'administration d'IL-2 faible dose chez l'Homme en objectivant une augmentation préférentielle des Treg (Klatzmann et Abbas 2015). Par ailleurs, l'efficacité thérapeutique de la stratégie a pu être démontrée majoritairement dans des maladies auto-immunes (Tableau 4) ou le contrôle de rejet de greffe (Tableau 4). Cependant le champ d'application de l'IL-2 faible dose s'est récemment élargi, avec la publication récente d'études testant avec succès l'administration d'IL-2 faible dose dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer (Alves et al. 2016; Dansokho et al. 2016). Néanmoins, aucune étude n'avait jusqu'à présent évalué le potentiel thérapeutique de l'IL-2 dans l'allergie, alors qu'il s'agit d'une maladie caractérisée par un dysfonctionnement immunitaire associé à un défaut quantitatif et qualitatif des Treg (Tableau 2). Cette approche ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques contre des maladies de plus en plus préoccupantes pour des raisons épidémiologiques et médico-économiques, qui seront présentées dans la première partie de cette discussion. La place de l'IL-2 faible dose sera plus spécifiquement discutée par rapport à l'ensemble des nouvelles alternatives thérapeutiques de l'allergie alimentaire en cours de développement. Enfin, en deuxième partie de discussion, nous apporterons des éléments permettant de mieux définir les mécanismes immunologiques inhérents à la protection induite par l'IL-2.

## **1. Pourquoi développer une nouvelle immunothérapie par IL-2 faible dose dans le traitement de l'allergie alimentaire ?**

L'allergie alimentaire ne figure pas parmi les manifestations allergiques les plus fréquentes. Pourtant elle constitue un enjeu de santé publique en raison de ses caractéristiques épidémiologiques, de son impact économique pesant sur les sociétés du monde et de l'arsenal thérapeutique disponible, plus que limité actuellement, plaçant le développement d'alternatives thérapeutiques au centre des considérations de santé publique.

### **i. Considérations épidémiologiques et économiques de l'enjeu de santé publique.**

Les allergies sont classées au 4<sup>ème</sup> rang des maladies chroniques par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), derrière les maladies néoplasiques, cardiovasculaires et l'infection par le VIH. La prévalence des maladies allergiques varie en fonction des présentations cliniques. Ainsi l'asthme allergique concerne entre 6% et 12% de la population générale quelque soit la définition adoptée (Delmas et Fuhrman 2010), la rhinite allergique atteint entre 10 à 40% de la population générale (Bauchau et Durham 2005), la dermatite atopique concerne entre 10% et 20% de la population vivant dans des pays développés (T. Nomura et Kabashima 2016) et la prévalence des allergies médicamenteuses concernent 7% de la population générale, grimpant jusqu'à 10% si l'on considère uniquement les sujets hospitalisés (Demoly 2007).

Bien qu'elle ne figure pas parmi les manifestations allergiques les plus fréquentes, l'allergie alimentaire constitue un enjeu de santé publique à plusieurs titres. L'allergie alimentaire concerne principalement des enfants, et notamment ceux vivants dans les pays industrialisés, constituant le premier argument épidémiologique de l'enjeu de santé publique. Sa prévalence est estimée aujourd'hui entre 6,7% et 8% chez les enfants (R. S. Gupta et al. 2011; Soller et al. 2012; W. Yu, Freeland, et Nadeau 2016) (Rona et al. 2007) alors qu'elle ne concerne « que » 3% à 6,6% (Soller et al. 2012; Umetsu, Rachid, et Schneider 2015) (Rona et al. 2007) des personnes adultes vivant dans des pays industrialisés. Bien que ces données restent acceptables, l'inquiétude vient du fait que le nombre de personnes atteintes d'allergies alimentaires est en croissance continue ces dernières années (Sicherer et Sampson 2014), augmentant en dix ans de 18% aux USA (Branum et Lukacs 2009), voire même de 100% en Chine (Hu, Chen, et Li 2010), en lien probable avec une amélioration des conditions de vie et

d'hygiène et une diminution des pathologies infectieuses (Okada et al. 2010). Aujourd'hui, le nombre de patients atteints d'allergie alimentaire est estimé entre 200 et 250 millions de personnes dans le monde (Umetsu, Rachid, et Schneider 2015).

De plus, le nombre de formes sévères nécessitant une hospitalisation est en augmentation et aurait été multiplié par 5 dans certains pays (Liew, Williamson, et Tang 2009), constituant un autre argument épidémiologique. Les allergies alimentaires sont la deuxième cause de choc anaphylactique, devant les médicaments et derrière les piqûres d'hyménoptère (Ponvert 2014; Vezir et al. 2013). Ainsi, 40% des enfants souffrant d'allergie alimentaire ont déjà expérimenté une anaphylaxie (R. S. Gupta et al. 2011). Ceci conduit à une augmentation considérable des consultations aux urgences pour anaphylaxie (Turner et al. 2015) laissant présager la crainte d'une augmentation de la mortalité liée à l'allergie alimentaire. Entre 1997 et 2013, le nombre de décès liés à une allergie alimentaire a en effet augmenté de 9,7% par an (en moyenne) en Australie (Mullins et al. 2016). Cependant, cette tendance n'est pas été retrouvée dans tous les pays. Ainsi, l'augmentation du nombre de cas d'anaphylaxie ne s'est pas accompagné d'une augmentation du nombre de décès en Grande Bretagne (Turner et al. 2015). La mortalité liée à une anaphylaxie aurait même diminuée en France (Pouessel et al. 2017).

L'allergie alimentaire est également une préoccupation économique même si la mesure de son impact économique reste complexe en raison d'un défaut d'études économico-sanitaires fiables en Europe. En plus des coûts directs liés à la prise en charge médicale des patients, les coûts indirects alourdissent significativement l'impact économique de cette pathologie, prenant en compte l'absentéisme au travail et le manque de productivité du patient ou de ses proches. Aux Etats-Unis, le coût global des allergies (concernant 50 millions d'individus selon le « Centers for Disease Control and Prevention ») est estimé autour de plusieurs milliards de dollars par an. Les allergies alimentaires, quant à elles, représentent une perte de 24,8 milliards de dollars par an avec une perte de 4,3 milliards de dollars et de 20,5 milliards de dollars par année, en coûts directs et indirects respectivement (R. Gupta et al. 2013). En Europe, 80 millions d'individus sont atteints d'une des manifestations cliniques de l'allergie. L'impact financier est estimé autour de 100 milliards d'euros par an.

L'ensemble de ces données épidémiologiques et économiques permettent de comprendre l'importance du développement d'alternatives thérapeutiques de l'allergie alimentaire, facile à produire et peu coûteuse afin d'en faire bénéficier rapidement un nombre



important et en constante augmentation de patients, et de limiter l'évolution de la maladie vers des formes graves, potentiellement mortelles.

## **ii. Place de l'IL-2 par rapport aux autres traitements et immunothérapies de l'allergie.**

Le développement de nouvelles biothérapies constitue à l'heure actuelle une urgence de santé publique, en raison d'un manque de thérapie curative actuellement. En effet, les divers traitements pharmacologiques existants (antihistaminiques, corticoïdes...) ne permettent qu'une prise en charge symptomatique de l'allergie. De plus, les traitements reposant sur le régime d'éviction ou la mise à disposition d'un stylo auto-injecteur d'adrénaline ne permettent pas de répondre à l'urgence de santé publique dans la mesure où seuls 13 à 38% des patients utilisent correctement le stylo (O'Keefe et al. 2014) malgré des recommandations claires concernant son utilisation. Cela est en lien avec une incapacité des patients à reconnaître les symptômes d'anaphylaxie ou d'un manque de compréhension de la façon d'utiliser le stylo. Les patients sont également souvent porteurs d'un stylo périmé en raison de la faible fréquence d'utilisation, constituant ainsi autant d'obstacles à son efficacité thérapeutique. De même, l'éviction de l'allergène, constituant la seule approche préventive possible à ce jour, s'heurte également à certains obstacles. Elle semble de principe simple, mais nécessite en pratique plusieurs étapes avec notamment l'identification parfaite du ou des allergènes impliqués, l'éducation des patients, mais également dans le cas d'un enfant, l'éducation des parents et du personnel des établissements scolaires méconnaissant souvent l'existence et les risques du choc anaphylactique (Ercan et al. 2012). Toutefois, la prise en charge de l'allergie alimentaire par la stricte éviction de l'allergène est loin d'être la meilleure option thérapeutique. Dans l'enfance, les besoins nutritionnels pour assurer une bonne croissance et une bonne santé limitent les indications de cette stratégie et l'application d'un régime d'éviction peut entraîner de sévères malnutritions (Groetch et Nowak-Wegrzyn 2013; Flammarion et al. 2011; Diamanti et al. 2011). Il est donc nécessaire de développer des alternatives thérapeutiques moins contraignantes et impactant de façon moindre la qualité de vie. Les immunothérapies spécifiques (ITS) constituent un axe de recherche intéressant et des efforts considérables sont actuellement faits pour améliorer leur efficacité et leur sécurité d'emploi. De même, de nouvelles biothérapies, ciblant les différentes cibles de la physiopathologie de l'allergie, sont en cours de développement. Il est donc primordial de définir la place de l'IL-2 par rapport à l'ensemble de ces biothérapies.

### **a. Les immunothérapies spécifiques de l'allergie alimentaire.**

Les immunothérapies spécifiques (ITS) dans le cadre de l'allergie alimentaire, pourraient constituer une alternative intéressante. Elles consistent à réduire la sensibilité de l'organisme à l'allergène par son administration à dose croissante pour atteindre une dose efficace et permettre l'induction d'une tolérance spécifique. Les profils de tolérance et d'efficacité varient en fonction de la voie d'administration et la nature de l'allergène. L'ITS par voie sous cutanée (SCIT) possède le moins bon profil de tolérance. La SCIT dans le cadre de l'allergie aux arachides ont conduit à un trop grand nombre de chocs anaphylactiques et une erreur pharmaceutique a conduit à un décès (Nelson et al. 1997; Oppenheimer et al. 1992), gelant le développement de cette stratégie. Elle n'est pratiquement plus utilisée bien qu'une étude a été concluante avec l'utilisation de protéines recombinantes hypoallergéniques dans le cadre d'allergie aux poissons (Zuidmeer-Jongejan et al. 2012). Aussi, des considérations pratiques et logistiques ont aussi favorisé le développement d'alternatives moins contraignantes, les patients ne pouvant pas facilement s'injecter les extraits allergéniques seuls. Ainsi, la voie orale (OIT) ou sublinguale (SLIT) ont été envisagées.

Parmi les différents protocoles de désensibilisation, l'OIT a permis d'augmenter significativement le seuil de la dose maximale tolérée lors d'un test de provocation oral chez 55 % (Burks et al. 2012) des patients, pouvant atteindre plus de 80 % (Caminiti et al. 2015; Varshney et al. 2011; Keet et al. 2012) selon les études et l'allergène, témoignant de son bonne efficacité. Néanmoins, 40 % des patients réagissent de nouveau aux protéines de lait après 6 semaines d'arrêt de l'OIT (Keet et al. 2012), soulignant les limites actuelles de l'efficacité à long-terme de ces approches. Concernant la sécurité d'emploi, 10 à 20 % des patients enrôlés dans les essais cliniques d'OIT arrêtent le traitement en raison de réactions secondaires associées (Chiang et Berin 2015). Ces effets indésirables sont dans la plupart des réactions de grade I ou II et touchent plus d'un quart des patients (Vazquez-Ortiz et al. 2014; Vázquez-Ortiz et al. 2013). De plus, la récente caractérisation des œsophagites à éosinophile réversibles observées après traitement OIT des allergies alimentaires alourdit le tableau des réactions secondaires même si leur survenue est peu fréquente, ne dépassant pas 3 % des OIT (Lucendo, Arias, et Tenias 2014). Une nouvelle formulation de l'allergène, en gélule gastro-résistante, est actuellement en essai thérapeutique et permettrait d'améliorer significativement la tolérance de l'OIT (Michaud et al. 2015) (NCT02046083). Ces études démontrent clairement que l'OIT est efficace dans la désensibilisation, cependant la fréquence des

réactions systémiques reste encore importante. De plus, un traitement prolongé, voire ininterrompu, semble nécessaire pour maintenir une efficacité à long terme satisfaisante. Les essais cliniques d'immunothérapie par voie sublinguale (SLIT) menés pour la plupart dans le cadre de l'allergie aux arachides ont été conduits sur une période de 1 à 4 ans (Marogna et al. 2010; Fleischer et al. 2013) afin d'atteindre une dose maximale tolérée satisfaisante. En termes d'efficacité thérapeutique la SLIT présente finalement une efficacité plus faible que l'OIT. La sécurité d'emploi de la SLIT est supérieure à l'OIT avec un taux plus faible de réactions systémiques (Narisety et al. 2015), lié à la richesse de cellules dendritiques protolérologènes de la muqueuse sublinguale, permettant d'utiliser des doses moindres d'allergène (Senna, Calderon, et Milani 2011).

Néanmoins, les risques de réactions graves après administration de l'allergène par voie orale ou sublinguale a conduit au développement de voies d'administration alternatives de l'allergène. La peau constitue un site probable de sensibilisation aux allergènes alimentaires (Tordesillas et al. 2014). Ainsi, différentes équipes se sont intéressées à l'administration de l'allergène par la voie cutanée lors des protocoles d'ITS. Dans la mesure où, l'épiderme n'est pas vascularisé, limitant ainsi les risques de réactions graves, la voie épicutanée constitue une bonne alternative. L'administration épicutanée de l'allergène, à l'aide de patch, a clairement montré son potentiel tolérologénique dans des modèles animaux (Vincent Dioszeghy et al. 2011; V. Dioszeghy et al. 2014; L. Mondoulet et al. 2010; Lucie Mondoulet et al. 2011) et a entraîné une diminution des réactions oesophago-gastro-entéropathiques liées à la réadministration de l'allergène (Lucie Mondoulet et al. 2012). Chez l'Homme, différents essais cliniques sont en cours et les résultats préliminaires apparaissent prometteurs. Une étude pilote visant à démontrer la sécurité d'emploi de l'ITS par voie épicutanée (EPIT) lors d'un traitement de courte durée (90 jours) des allergies au lait a démontré une très bonne tolérance avec seulement comme effet secondaire des signes cutanés et gastro intestinaux bénins (Dupont et al. 2010). Un essai clinique de phase IIb (étude VIPES) a ensuite testé l'efficacité des patchs mettant en évidence une très bonne observance ainsi qu'une efficacité atteignant un taux de réponse de 45 à 48% chez les patients traités, en fonction de la dose d'allergène délivrée (Critère primaire : augmentation d'un facteur 10 de la dose maximale tolérée comparée à la dose « baseline »), passant à environ 60% si l'analyse se concentre sur les enfants de 5 à 11 ans (Jones et al. 2017). Cependant, aucun patient n'a réussi avec succès le test de provocation oral de 5044 mg d'allergène. Deux autres études de phase III testant l'efficacité et l'innocuité de Viaskin Peanut® dans l'allergie à la cacahuète sont en cours,

l'une testant la dose de 250µg de Viaskin Peanut® chez les enfants de 4 à 7 ans (PEPITES NCT02636699) et l'autre, testant deux doses réduites chez des enfants de 1 à 3 ans (EPITOPE, NCT03211247). Les premiers résultats de l'étude VIPES soulignent l'efficacité de l'EPIT avec des taux d'efficacité similaires à ceux de la SLIT et inférieurs à ceux de l'OIT.

Bien que l'ITS soit bien développée dans le cadre de l'allergie respiratoire ou encore de l'allergie aux venins d'hyménoptère, elle reste encore à être validée dans le cadre de l'allergie alimentaire et est de ce fait peu utilisée en routine clinique. L'efficacité relative, le manque de données économiques probantes lors des études coût-efficacité, l'hétérogénéité des protocoles d'immunothérapies constituent les limites actuelles, sans compter la peur de voir apparaître des réactions sévères graves suite à la réintroduction de l'allergène, qui a conduit à délaisser cette thérapie jugée trop dangereuse durant ces dernières décennies.

Ainsi, des équipes de recherche se sont intéressées à la formulation des allergènes afin de limiter les risques encourus suite à la réadministration de ceux-ci chez des patients allergiques. L'encapsulation des allergènes dans des nanostructures (Pohlit et al. 2017) procure certains avantages par rapport à l'ITS classique avec des extraits d'allergènes non encapsulés : la protéine peut être protégée contre la dégradation, des concentrations locales plus élevées peuvent être délivrées et une administration ciblée au niveau du site d'action est désormais possibles. Surtout, la formulation empêche la fixation de l'allergène par les IgE et ainsi limiter les risques de réactions graves. L'ITS en combinaison avec des nanoparticules (NP) permet d'offrir un moyen de traitement plus sûr et potentiellement plus efficace pour les maladies allergiques. Un nombre grandissant d'études précliniques réalisées chez l'animal, utilisant des NP biodégradables (polymères naturels ou synthétiques, liposomes, et pseudo-particule virale dépourvue de génome (virus-like particle (VLP)) ou non biodégradables (dendrimères et NP à base de carbone ou de métal), ont été publiés dans le domaine de l'allergologie avec une efficacité certaine dans différents modèles animaux avec induction de réponse Th1 (Diminution des IgE spécifiques et induction des IgG2a) et augmentation de la synthèse d'IL-10 (Pohlit et al. 2017).

Certaines NP ont également été testées chez l'Homme dans différents essais cliniques. Ainsi, l'immunothérapie avec des allergènes adsorbés à l'alginate (polymère naturel), constituant la stratégie la plus ancienne, a augmenté les taux d'IgG1 et d'IgG4, tandis que les IgE spécifiques de l'allergène ont été réduites (Pegelow et al. 1984; Pastorello et al. 1990). Les essais cliniques utilisant des liposomes chargés avec un allergène lors d'ITS ont révélé

que les formulations liposomales étaient légèrement plus efficaces que les extraits adsorbés, mais le profil de sécurité d'emploi était moins favorable. Combiné à un processus de fabrication complexe, cela a freiné leur utilisation lors des ITS (Galvain et al. 1999), bien qu'une étude ait montré, chez 55 de patients asthmatiques, aucun effet secondaire et une diminution des symptômes chez au moins 60% des patients ayant reçu l'allergène (extrait Der p 1 et Der p 2) encapsulé par liposome comparé à 12 % des patients dans le groupe placebo (Basomba et al. 2002). Depuis peu, de nouvelles études précliniques ont vu le jour testant avec succès la formulation liposomale de l'allergène sous sa forme moléculaire (recombinante) en association ou non avec de l'ADN. Ces stratégies ont permis de réduire les signes cliniques de l'allergie en réorientant les réponses immunitaires vers une réponse Th1 et l'induction de Treg (Tasaniyananda et al. 2016; Nouri et al. 2015).

Enfin concernant les NP non biodégradables, le traitement oral des patients sensibilisés à l'ambrosie avec l'extrait de pollen encapsulé dans des copolymères d'acide polyméthacrylique a conduit à la production de titres élevés d'IgG et IgG4 spécifiques sans induire une diminution des IgE spécifiques. De plus, cela n'a pas induit d'effet secondaire (Litwin et al. 1997). Néanmoins, lorsque le même système a été appliqué pour l'encapsulation du pollen de Phléole des prés, cela a conduit, dans des expériences *in vitro*, à une augmentation des transcrits d'IL-5 (TePas et al. 2004). Ainsi des optimisations sont nécessaires afin de garantir l'innocuité et l'efficacité de NP.

Depuis, se sont développées des stratégies utilisant des pseudo-particules virales (VLP) afin de formuler l'antigène au cœur de la plateforme antigénique. Ces particules ont la structure d'un virus enveloppé ou non, mais sont dépourvues de matériel génétique. Cette vectorisation de l'antigène au sein de VLP aura pour avantage d'assurer une prise en charge efficace de l'antigène par les cellules du système immunitaire (cellules présentatrices d'antigènes) tout en évitant un contact direct de l'antigène par les IgE fixées sur les mastocytes et les basophiles. Dans un essai randomisé contrôlé par placebo, en double aveugle, les patients souffrant d'allergie aux acariens ont été traités avec des VLP formées par l'association de la protéine de bactériophage Q $\beta$  associée à des molécules adjuvantes (CpG oligodéoxynucléotides, puissant inducteur de la réponse Th1), ce qui a entraîné une réorientation du système immunitaire et une diminution des symptômes de rhinoconjonctivite. Aussi, une augmentation d'un facteur 10 de la dose maximale tolérée a été démontrée par un test de provocation conjonctivale (Klimek et al. 2011). Dans un autre essai clinique, ces

mêmes VLP ont été utilisées comme adjuvant de l'ITS avec l'extrait global d'allergène des acariens. Les symptômes de la rhinite et de l'asthme allergique ont été considérablement réduits et une réponse Th1 a été mise en place (Senti et al. 2009). Néanmoins, le profil de tolérance de ces VLP reste peu connu. Tout comme l'IL-2, de nouvelles immunothérapies, s'affranchissant de la ré-administration de l'allergène sous sa forme native, sont en cours de développement.

## **b. Biothérapies alternatives en cours de développement.**

Cibler les différents « checkpoint » de la physiopathologie de l'allergie, constitue autant d'approches intéressantes afin de traiter l'allergie alimentaire. Le pontage des IgE spécifiques par l'allergène est responsable des signes cliniques de l'allergie. Les thérapies visant à bloquer les IgE, notamment grâce à l'omalizumab – anticorps monoclonal anti-IgE, présentent un intérêt certain dans les allergies, y compris alimentaires. Cependant une étude américaine évaluant l'omalizumab en monothérapie chez des patients atteints d'allergies à l'arachide fut interrompue suite aux réactions observées lors de tests d'épreuve oraux (Sampson et al. 2011). Malgré cet arrêt prématuré, des tendances de diminution d'IgE sériques chez les patients traités ont été observées. Aujourd'hui, l'omalizumab est souvent proposé en combinaison avec l'OIT afin de réduire les éventuelles réactions sévères liées à la réintroduction de l'allergène lors de la phase d'escalade. Malheureusement, les résultats n'ont pas montré d'amélioration du taux de désensibilisation (Umetsu, Rachid, et Schneider 2015; Yee et Rachid 2016; Wood et al. s. d.). Alternativement, une thérapie génique visant à bloquer les IgE a été proposée par *Pagovich et al.*, utilisant des vecteurs viraux à l'origine d'une expression d'anti-hIgE. Cette stratégie a démontré son efficacité dans un modèle préventif d'allergie à l'arachide chez des souris humanisées. L'efficacité observée s'est traduite par une diminution des taux sériques d'IgE ainsi que la moindre sévérité des signes cliniques observés (Pagovich et al. 2016). Au final, l'utilisation d'anti-IgE semble être prometteuse, même si les modalités d'administration restent à être définies et des optimisations sont encore requises avant une utilisation à plus large échelle. Bloquer les signaux en amont de la physiopathologie de l'allergie semble également une stratégie thérapeutique présentant un fort potentiel. Notamment, l'allergie est une réponse Th2 exacerbée, caractérisée par une sécrétion importante d'IL-4 et d'IL13. Ainsi, bloquer l'interaction de l'IL-4 avec son récepteur constitue une cible intéressante dans la mesure où une augmentation de l'affinité de l'IL-4 pour son récepteur est suffisante pour induire une allergie alimentaire (Burton et al. 2014). Le

Dupilumab, un anticorps bloquant la sous-unité  $\alpha$ , commune au récepteur de l'IL-4 et de l'IL-13, a démontré son efficacité dans le traitement de l'asthme (Wenzel et al. 2013) et de la dermatite atopique (Beck et al. 2014), en inhibant les signaux induits par l'IL-4 et l'IL-13. Aussi, l'IL-5 est impliquée dans la maturation, l'activation et le recrutement des éosinophiles (A. Mishra et al. 1999; Anil Mishra et al. 2002). Bloquer l'IL-5 par un anticorps monoclonal (Reslizumab, Mepolizumab) permet de réduire le nombre d'éosinophile circulant, ainsi que leur recrutement tissulaire (Rothenberg et al. 2008). Malheureusement, cette stratégie ne s'est pas révélée efficace dans le traitement de l'asthme (Kips et al. 2003) ou de l'œsophagite à éosinophile (Spergel et al. 2012; Assa'ad et al. 2011). Les thérapies anti-cytokines contre une seule cytokine semblent moins efficaces contre les symptômes cliniques, probablement en raison de la redondance des mécanismes d'action des cytokines Th2.

Plutôt que de bloquer les signaux induits par les cytokines Th2, différents auteurs ont su prendre avantage des stratégies permettant de rééquilibrer la balance Th1/Th2. Différents agonistes des TLR, permettant de réorienter les réponses immunitaires vers une réponse Th1, ont été testés avec succès dans des modèles murins d'asthme (Grela et al. 2011) et ont démontré leur capacité *in vitro* à diminuer les réponses Th2 (Pali-Schöll et al. 2013). De même, la flagelline, agoniste des TLR5, possède des propriétés immunomodulatrices. Dans un modèle murin d'allergie alimentaire, Schülke *et al.*, ont démontré que l'administration d'une protéine de fusion associant la flagelline à de l'OVA, permet de prévenir les manifestations d'allergie alimentaire, par diminution de la réponse Th2 et augmentation de la sécrétion d'IL-10, de façon dépendante de la signalisation TLR-5 (Schülke et al. 2011). Chez l'Homme, deux agonistes des TLR9 et 4 ont été efficaces pour traiter des rhinites allergiques (Creticos et al. 2006; Patel et al. 2014)

D'autre part, la stratégie des mimotopes, peptides imitant les épitopes reconnus par les IgE, a également été utilisée en allergologie. Après leur production par des phages, ils sont sélectionnés par des anticorps. Ainsi, ne persistent qu'exclusivement les épitopes reconnus par les cellules B. Associés à des supports ou présentés sous une forme de peptide antigénique, les mimotopes induisent des réponses anticorps spécifiques lors de vaccination. Cette stratégie a été utilisée dans un modèle d'allergie cutanée. L'immunisation de souris BAL/B/c avec un mimotope de Bet v 1 couplé à une protéine de fusion permet la production d'IgG spécifiques d'allergènes inhibant la liaison des IgE à Bet v 1, par compétition (Ganglberger et al. 2001). Une autre équipe a testé l'administration du mimotope de Phl p 5 dans un modèle murin

d'asthme allergique et a démontré une diminution de l'inflammation pulmonnaire et de la réponse Th2 au niveau des lavages broncho-alvéolaires (Wallmann et al. 2010). De nombreux mimotopes ont été défini avec succes, notamment pour la parvalbumine, l'allergène principal du poisson (Untersmayr et al. 2006) et pour les deux principaux allergènes des acariens, Der p 1 et Der p 2 (Szalai et al. 2008). Cependant ils n'ont pas encore étaient testés en clinique.

Enfin et depuis la démonstration des propriétés régulatrices et de l'importance du microbiote intestinal dans la prévention de la sensibilisation allergique (Cahenzli et al. 2013), différentes approches ont été étudiées combinant l'administration mucosale d'un allergène ou d'une molécule tolérogène à l'utilisation des propriétés pro-tolérogènes de certaines souches bactériennes. Ainsi, différentes études ont montré qu'un *Lactococcus lactis* recombinant et sécrétant de l'Ovalbumine, Ara h 2, Der p 2, et / ou de l'IL-10 améliore la tolérance orale et diminue les signes cliniques de l'allergie (Frossard, Steidler, et Eigenmann 2007; Huibregtse et al. 2007; Ai et al. 2016; C. Ren et al. 2014; Ai et al. 2014). Ces résultats suggèrent la possibilité d'utiliser des agents pro-biotiques afin de prévenir voir de traiter les allergies alimentaires et d'envisager l'utilisation d'autres molécules tolérogènes.

L'ensemble de ces stratégies thérapeutiques ne permet pas de répondre à l'urgence de santé publique que représente l'allergie alimentaire soit par manque d'efficacité, soit parce qu'elles n'ont jamais été testées dans ce cadre chez l'Homme, comme le résume le tableau 5. Cependant, les résultats attendus des essais cliniques de certaines biothérapies en cours de test dans l'allergie alimentaire suscitent beaucoup d'espairs (Tableau 5). Notamment, l'anticorps ABN020 (essai de phase II dans l'allergie à la cacahuète, NCT02920021), dirigé contre l'IL-33, semble prometteur, dans la mesure où l'interaction de l'IL-33 avec son récepteur IL-33R (ST2) serait indispensable à l'induction d'une sensibilisation (Chu et al. 2013) bien qu'il s'agisse d'une donnée contradictoire. En effet, Muto *et al*, ont montré que l'IL-33 est dispensable pour induire une sensibilisation cutanée à l'antigène (Muto et al. 2014). Néanmoins, la cytokine est essentielle pour induire une anaphylaxie intestinale IgE dépendante (Muto et al. 2014). Une autre approche consiste en l'administration de particules d'ADN codant pour un extrait allergénique. Cette vaccination administrée par voie orale, permettant l'expression de l'allergène au niveau de l'épithélium intestinal, s'est révélée efficace dans la prévention de l'anaphylaxie dans un modèle d'allergie à la cacahuète (Roy et al. 1999). Cependant, on ne connaît pas le profil de tolérance d'une telle stratégie chez l'Homme et un risque de réaction anaphylactique lié à l'expression de l'allergène au niveau



digestif ne peut être exclu. Un essai clinique de phase I évaluant le profil de sécurité de la vaccination plasmidique codant pour Ara h1, Ara h2, et Ara h3 tentera de répondre à cette question (NCT02851277). Ainsi, du fait de leur utilisation récente en thérapie humaine, nous ne possédons que très peu de recul quant au profil de tolérance et de l'efficacité de ces nouvelles biothérapies.

**Tableau 5** : Tableau résumant les biothérapies alternatives de l'allergie.

Biothérapie	Etude préclinique		Etude clinique		Références
	Indication	Efficacité	Indication	Efficacité	
<b>Nanoparticules (np)</b> Alginate Liposomes Np d'acide méthacrylique VLP	na rhinite na na	na ↑Th1, ↑Treg na na	Rhinite Rhinite Rhinite Rhinite	↑IgG1, ↑IgG4, bonne tolérance ↓ symptômes chez 60 % des patients, tolérance +/- ↑IgG, ↑IgG4 mais (↑IL-5) ↓ symptômes	(Tasaniyananda et al. 2016; Nouri et al. 2015; Pegelow et al. 1984; Pastorello et al. 1990; Litwin et al. 1997; TePas et al. 2004; Senti et al. 2009)
<b>Anti-IgE (Omalizumab)</b> <b>Omalizumab + OIT</b> <b>Vecteur viraux codant Anti-hIgE</b>	na na Allergie alimentaire	na na ↓signes cliniques en prévention, ↓IgE	Allergie Arachide Allergie Alimentaire Na	↓IgE, mais Réaction grave suite à TPO Pas d'amélioration du taux de désensibilisation Na	(Umetsu, Rachid, et Schneider 2015; Yee et Rachid 2016; Wood et al. s. d.; Sampson et al. 2011; Pagovich et al. 2016)
<b>Anti-Cytokine</b> Anti-IL4R (Dupilumab) Anti-IL-5 Anti-IL-33 (ABN020)			Asthme et DA Asthme Allergie cacahuète	↓signes cliniques Pas d'efficacité En cours	(A. Mishra et al. 1999; Anil Mishra et al. 2002; Wenzel et al. 2013; Kips et al. 2003; Spergel et al. 2012; Assa'ad et al. 2011) NCT02920021
<b>Agonistes des TLR</b>	asthme Allergie alimentaire	↑Th1 ↓Th2, ↓Th2 ↑IL-10	Rhinite Non testé dans allergie alimentaire	↓ symptômes	(Grela et al. 2011; Schülke et al. 2011; Pali-Schöll et al. 2013)
<b>Mimotopes</b>	allergie cutanée asthme	↑IgG ↓Th2 et ↓inflammation pulmonaire	Na	Na	(Ganglberger et al. 2001; Wallmann et al. 2010)
<b>Stratégie utilisant <i>L.Lactis</i></b>	Rhinite (Der p 2) Allergie alimentaire (Ara h2, OVA, IL-10)	↓Th2, ↓signes cliniques	Na	Na	(Frossard, Steidler, et Eigenmann 2007; Huibregtse et al. 2007; Ai et al. 2016; C. Ren et al. 2014; Ai et al. 2014)
<b>Vaccination tolérogénique (ADN codant extrait allergénique)</b>	Allergie cacahuète	Prévention anaphylaxie	Allergie cacahuète	En cours (ADN codant pour Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3)	(Roy et al. 1999) NCT02851277

Na : non applicable, DA, Dermatite atopique,

### **c. Recul quant à l'utilisation de l'IL-2 : un avantage certain.**

L'IL-2 à forte dose est utilisée depuis 1989 en cancérologie, dans l'adénocarcinome rénal métastatique (France et USA) et le mélanome métastatique (USA). L'IL-2 faible dose, cytokine immunomodulatrice inductrice de Treg, est utilisée, quant à elle, depuis bientôt 10 ans dans de nombreux essais cliniques (Tableau 4). Nous disposons ainsi d'assez de recul quant à son efficacité et à son profil de tolérance, par rapport aux autres biothérapies utilisées dans l'allergie.

L'administration à haute dose (> 9MUI) par voie sous cutanée, d'IL-2, engendre chez plus de la moitié des patients des effets indésirables graves, selon le rapport de la commission de transparence de la haute autorité de santé. Ces réactions concernent en particulier des réactions locales au point d'injection (œdème, érythème), l'apparition d'une fièvre, d'une anorexie et d'une asthénie. Plus grave, ont été rapporté la survenue d'exacerbation d'infections bactériennes (Endocardite, choc septique), et la survenue du syndrome de fuite capillaire pouvant être fatal. Ce mauvais profil de tolérance a conduit à l'arrêt du traitement chez environ 10% des patients. A l'inverse, le bon profil de tolérance de l'IL-2 utilisée à faible dose (1-3MUI), a été établi dans beaucoup d'essais cliniques. La plupart des effets indésirables signalés sont de gravité légère à modérée (grade 1 ou 2) (Edwards et Aronson 2000). Des réactions locales au point d'injection et des syndromes pseudo-grippaux (fatigue, fièvre, malaise et arthralgie) ont été les événements indésirables les plus rapportés, et ce, quelque soit la dose d'IL-2 reçue (Saadoun et al. 2011) (Hartemann et al. 2013). Les seuls événements indésirables graves qui ont été signalés jusqu'à présent (thrombocytopénie et induration) ont eu lieu lors d'essais cliniques dans le cadre de la maladie chronique du greffon contre l'hôte (Koreth et al. 2011). Cependant, les patients ont reçu des doses cumulatives relativement élevées d'IL-2 avec d'autres traitements immunosuppresseurs. Ainsi, le profil de tolérance de l'IL-2 reste bon. Toutefois, la sécurité et la tolérance de l'IL 2 à faible dose ont été évaluées lors d'étude où les patients ont été traités sur des périodes relativement courtes (< à 6 mois). Peu de patients ont été traités pendant une période de temps prolongée. Cependant, l'administration d'IL-2 à long terme a été bien tolérée dans des études précliniques réalisées chez l'animal, n'altérant pas la réponse vaccinale, la réponse anti-tumorale, la réponse anti-infectieuse et la réponse régulatrice mise en place lors de la grossesse (Churlaud et al. 2014). Ainsi, le recul disponible concernant l'IL-2 faible dose obtenu lors d'essais cliniques ou

d'études chez l'animal permet de conclure quant à sa bonne tolérance, ce qui est encourageant pour son utilisation future dans l'allergie alimentaire.

Concernant l'efficacité de l'IL-2 faible dose, les résultats obtenus sont encourageants. Dans le cas des maladies auto-immunes, la négativation des auto-anticorps caractérisant ces maladies, pourraient être un marqueur d'efficacité du traitement. Néanmoins, elle reste très longue à obtenir sous thérapie efficace. De plus, ils ne constituent pas un bon marqueur d'activité clinique de la maladie dans la mesure où ils peuvent être présents sans être associés à une symptomatologie (Arbuckle et al. 2003). La démonstration de la diminution du titre des auto-anticorps n'a pour le moment pas été apportée et constituerait une preuve d'efficacité curative de l'IL-2. Ainsi, l'efficacité de l'IL-2 a été basée sur une diminution des scores d'activité clinique de la maladie (Castela et al. 2014; Saadoun et al. 2011; He et al. 2016) avec une bonne efficacité. Bien que son efficacité varie en fonction des critères primaires utilisés et de l'indication, l'IL-2 affiche un taux d'efficacité variant de 41% dans le cas de la GVHD (Koreth et al. 2011), à plus de 83% dans le cas des maladies auto-immunes (Castela et al. 2014; Saadoun et al. 2011; He et al. 2016). Cette bonne efficacité de l'IL-2 peut être néanmoins nuancée lorsqu'on étudie plus en détail les réponses cliniques chez l'Homme. En effet, dans le cas de la GVH, l'IL-2 n'a été efficace que sur les lésions cutanées (Koreth et al. 2011), et peu d'effets thérapeutiques n'ont été observés sur la GVH hépatique ou digestive (Koreth et al. 2011).

Concernant l'allergie, aucune étude n'a établi le profil d'efficacité et de tolérance de l'IL-2 à faible dose. Néanmoins, dans notre étude préclinique, 60% des souris ont été protégées contre les signes cliniques de l'allergie lorsque l'IL-2 a été administrée en curatif, passant à 90%, en préventif (Article 1). Cette efficacité, comparée à l'efficacité obtenue avec les autres biothérapies exposées auparavant, et combinée au bon profil de tolérance obtenu chez l'Homme, place l'IL-2 faible dose comme une alternative de choix pour induire une tolérance à l'allergène et qui plus est durable dans le temps.

## **2. Mécanismes immunologiques associés à l'effet thérapeutique de l'IL-2 : désensibilisation, tolérance ou immunosuppression Treg-dépendante ?**

Nous avons démontré que le traitement par de faible dose d'IL-2 prévient et contrôle efficacement les manifestations allergiques dans un modèle murin d'allergie alimentaire dès les premières phases d'inductions orales (Article 1). Aussi, nous avons démontré que l'IL-2 permet d'induire une protection efficace à distance de son administration s'étalant sur une période de plus de 7 mois (Article 1). Alors que la régulation de réponses immunologiques associée à la protection immédiate a pu être décrite dans les différentes expériences de l'article 1, ils restent à éclaircir les mécanismes de maintien de cette tolérance à plus long terme.

### **i. L'action protectrice immédiate de l'IL-2 est Treg dépendant et permet de contrôler le recrutement et la dégranulation des cellules mastocytaires.**

Le traitement par de faible dose d'IL-2 prévient clairement le recrutement de mastocytes, d'éosinophiles et de basophiles attesté par une diminution significative de ces cellules dans l'intestin et le sang des souris protégées (Article 1). De même, la dégranulation des mastocytes et basophiles est également diminuée, attestée par une diminution de MCPT-1 sérique et de la MFI de CD63 chez les souris protégées (Article 1). La diminution de ces cellules effectrices et de la libération de médiateurs a également été documentée lors de protocoles d'immunothérapies spécifiques (Novak et al. 2012; van de Veen et al. 2017; Wilson et al. 2001), et interviendrait très précocement chez les patients. En effet, les patients sont protégés des signes cliniques de l'allergie dès les premières phases de l'ITS aux venins ou aux pollens (Alexander, Ying, et al. 2005; Tarzi et al. 2006), alors que la diminution du taux d'IgE sériques n'intervient qu'après plusieurs années d'ITS (Cezmi A. Akdis et Akdis 2011). Dans notre modèle, nous n'avons pas mis en évidence de diminution des IgE spécifiques de l'allergène (Article 1) alors que la protection intervient précocement après le traitement par IL-2 (Article 1). Deux mécanismes possibles peuvent expliquer cette protection alors que les IgE, toujours présentes, peuvent interagir avec les mastocytes et les basophiles et entraîner éventuellement leur dégranulation. Notamment, la diminution de la sensibilité des mastocytes et des basophiles aux IgE, décrit par Akdis *et al*, lors des protocoles d'ITS (Cezmi A. Akdis et Akdis 2011), par diminution de l'expression du FcεRI constitue la première

explication. Néanmoins, nous n'avons pas été en mesure d'objectiver une diminution de la MFI de FcεRI dans notre étude (données non montrées). La deuxième explication implique les lymphocytes Treg. En effet, le transfert adoptif de Treg préalablement activés *in vivo* par l'IL-2 est suffisant pour induire une diminution de la dégranulation des mastocytes et la protection clinique des souris, et ce de façon dépendante de la dose de Treg administrée (Fig. 13). Ces résultats suggèrent une action directe des Treg sur les mastocytes. De plus, l'abolition de la protection chez les souris traitées par IL-2, engendrée par la déplétion précoce des Treg (Article 1), combinée aux corrélations établies entre le taux sérique de mMCPT-1 et les score cliniques d'une part (Article 1), et la proportion de mastocytes présents au niveau de l'intestin et la chute de température corporelle (Fig. 5, article 1) d'autre part, révèlent l'importance de l'action des Treg sur les mastocytes dans de la régulation induite par l'IL-2. Ces résultats pourraient être corrélés aux données démontrant que les Treg sont capables de contrôler la dégranulation des effecteurs via un mécanisme contact dépendant impliquant une interaction OX40-OX40L (Gri et al. 2008). La signalisation cellulaire résultant de l'interaction d'OX40 avec son ligand présent sur les mastocytes, conduit à l'augmentation de l'AMP cyclique induisant une diminution de l'influx  $Ca^{2+}$  et une inhibition de la dégranulation des mastocytes (Hua et al. 2007). Afin d'évaluer cette hypothèse, nous envisageons de réaliser des expériences de co-culture, en chambre Transwell ou non, de mastocytes avec des Treg issus de souris traitées à l'IL-2, associée à une restimulation par l'antigène (IgE/Antigène). Le dosage du mMCPT-1, attestant de la dégranulation des mastocytes, dans le surnageant de culture permettra de savoir si les Treg suppriment la dégranulation des mastocytes de façon contact-dépendant. Par ailleurs et bien que nous n'ayons pas retrouvé ce résultat, la suppression de l'expression de FCεRI à la surface des mastocytes par les Treg (Ryan et al. 2008), pourrait également expliquer l'activité protectrice de l'IL-2.

En plus de contrôler la dégranulation des effecteurs, les Treg sont capables de contrôler le recrutement des effecteurs au niveau du tissu cible, comme cela a pu être montré dans un modèle de transfert adoptif, où les Treg injectés ont considérablement diminué l'afflux d'éosinophiles dans le poumon de souris asthmatiques (Kearley et al. 2005). Nous avons démontré, dans nos expériences, que la chute de température corporelle induite par l'anaphylaxie corrèle avec l'afflux de mastocytes dans l'intestin, tandis que le traitement par IL-2 a prévenu leur recrutement (Fig. 5 Article 1). La prévention du recrutement de mastocytes chez les souris protégées est dépendante des Treg dans la mesure où leur

élimination entraîne un afflux de mastocytes dans l'intestin (Fig. 5 Article 1), suggérant que les Treg sont capables d'agir sur les mastocytes en empêchant leur mobilisation au niveau de l'intestin.

Aussi, l'élimination de Treg dans un modèle inflammatoire de l'intestin, conduit à une exacerbation de l'absorption systémique de dextran-FITC, attestant d'une altération de la perméabilité intestinale (X. Yang et al. 2013). Ainsi, le maintien de la barrière intestinale induit par les Treg permettrait de limiter l'accès de l'allergène aux mastocytes empêchant *in fine*, leur dégranulation et pouvant potentiellement expliquer l'activité protectrice de l'IL-2. Les données préliminaires que nous avons obtenues, comparant l'absorption systémique de dextran-FITC chez des souris malades et non malades, seraient en faveur d'une augmentation de la perméabilité intestinale chez les souris souffrant d'allergie alimentaire. Afin de clairement démontrer le rôle des Treg dans le maintien de l'intégrité intestinale, il conviendrait de refaire ces expériences chez des souris protégées par l'IL-2 et/ou chez qui les Treg ont été éliminés.

Une autre hypothèse de régulation de la fonction mastocytaire implique l'IL-9. Ainsi les Treg sécrétant de l'IL-9 pourraient être impliqués dans le contrôle des manifestations cliniques de l'allergie observé après traitement par IL-2. L'IL-9 est une cytokine importante impliquée dans le développement de l'allergie alimentaire suite à l'administration orale de l'antigène, dans la mesure où la différenciation et la dégranulation des mastocytes ainsi que les signes cliniques de l'allergie sont atténués chez les souris IL-9 KO (Osterfeld et al. 2010; Forbes et al. 2008). Aussi, la neutralisation de la production d'IL-9 conduit à la mise en place d'une tolérance après administration orale d'antigène. Dans nos résultats, l'expression de l'ARNm de l'IL-9 dans le duodénum et le dosage d'IL-9 dans le surnageant de culture cellulaire de MLN et PP après restimulation spécifique montrent une augmentation de la production et de la sécrétion d'IL-9 après traitement par IL-2 (données non montrées). Ces mêmes données ont été retrouvées dans des modèles d'induction de tolérance après administration orale de l'antigène (Yamashita et al. 2012). Or l'IL-9 produite par les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a des effets immunosuppresseurs quant à la tolérance d'allogreffes impliquant les mastocytes (Lu et al. 2006). Ainsi, des niveaux élevés d'IL-9 libérés par les Tregs pourraient expliquer les effets protecteurs de l'IL-2 dans notre modèle d'allergie alimentaire. Pour clairement comprendre le rôle de l'IL-9 dans notre modèle, il conviendrait d'effectuer des expériences en utilisant des anticorps neutralisant l'IL-9 et regarder l'effet quant à la protection induite par l'IL-2.

D'une tout autre façon, le rééquilibrage de la balance Th1/Th2, au travers la diminution de la réponse Th2 et l'induction d'une réponse Th1 par le traitement à l'IL-2, pourrait expliquer l'effet thérapeutique de l'IL-2. En effet, nos résultats montrent que le traitement par IL-2 faible dose permet, chez les souris protégées, de contrôler les réponses Th2 attestées par une diminution significative de l'expression des gènes et de la production de cytokines associées au profil Th2 au niveau de l'intestin et des organes lymphoïdes associés (Article 1). De façon intéressante, nous avons pu noter une production exacerbée de cytokines pro-Th1 (IFN- $\gamma$ ) dans les MLN et les PP (Article 1 et données non montrées). Notamment, la diminution de l'IL-4 induite par l'IL-2, lors de la phase effectrice de l'allergie, serait un point extrêmement critique dans le contrôle de l'allergie dans la mesure où l'IL-4 a été décrit comme étant directement associée à une exacerbation de l'anaphylaxie (Strait et al. 2003; Mathias et al. 2011) et qu'à l'inverse les protocoles d'immunothérapies spécifiques sont associées à une diminution de la production de cytokine Th2 (Cezmi A. Akdis et Akdis 2011; Fujita et al. 2012). L'augmentation des réponses Th1 observées a également déjà été rapportée dans la majorité des publications testant des protocoles d'immunothérapies spécifiques (Ciprandi et al. 2008; Maggi, Vultaggio, et Matucci 2012), y compris pour l'allergie alimentaire (Nieuwenhuizen et Lopata 2005). Les données de la littérature suggèrent que l'immunodéviations Th2/Th1 observée chez les souris protégées, impliquerait les Treg. En effet, il a été démontré que le réengagement des cellules T depuis la réponse Th2 vers la réponse Th1 est corrélé avec l'induction de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Mamessier et al. 2006). De même l'IL-12, en condition inflammatoire, induit la production d'IFN- $\gamma$  par les Treg, pouvant contrôler l'inflammation intestinale (T. Feng et al. 2011). Ainsi, l'augmentation des transcrits intestinaux d'IL-12 observée chez nos souris traitées et protégées par IL-2 (Fig. 4, Article 1) pourrait coïncider avec l'induction Treg IFN $\gamma$ <sup>+</sup> et expliquant l'immunodéviations Th1 observée. En effet, après avoir exercé leur effet immunosuppresseur et contrôler les réponses inflammatoires, ces Treg IFN $\gamma$ <sup>+</sup> se convertissent en LT Th1 amplifiant la réponse Th1 (Daniel et al. 2014).



**ii. Les mécanismes de protection à long-terme impliquent-ils le recrutement local de sous populations de cellules régulatrices ou de Treg spécifiques de l'antigène ?**

**a. Les Treg sont indispensables à l'effet à long terme de l'IL-2.**

Nous avons observé que l'IL-2 faible dose induit initialement l'expansion systémique (rate) et locale (MLN, PP et intestin) des Treg, tandis que leur activation et leur prolifération surviennent principalement au niveau systémique comme le montre l'augmentation des pourcentages des Treg KI67<sup>+</sup>, ICOS<sup>hi</sup> et CTLA4<sup>hi</sup> dans le rate mais pas dans les MLN ou les PP (Article 1 et données non présentées). L'augmentation du nombre de Treg au niveau de l'intestin par l'IL-2 est potentiellement le résultat d'une amélioration de la survie des Treg (Tang et al. 2008) ou du recrutement de Treg au niveau de l'intestin. En effet, l'accumulation des Treg dans la *lamina propria* est dépendante de l'expression de CTLA-4 sur les Treg (Barnes et al. 2013), dont l'expression est augmentée par l'IL-2 (article 1), favorisant ainsi leur recrutement local. Cependant, cette augmentation visible des Treg à la suite de l'administration d'IL-2 est transitoire. En effet, quelques semaines après le traitement par IL-2, nous n'observons plus d'augmentation de Treg CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> chez nos souris protégées (Article 1). Néanmoins, la perte de protection observée quand la déplétion de Treg a lieu entre deux challenges par OVA souligne le rôle des Treg dans l'effet à long terme de l'IL-2. Surtout, la déplétion des Treg après une ITS dans un modèle murin d'allergie respiratoire, n'a pas entraîné de perte d'efficacité clinique de l'ITS (Maazi et al. 2012), suggérant que des mécanismes alternatifs ont été mis en place lors de l'ITS. Ces données renforcent considérablement l'idée que l'effet protecteur à long terme de l'immunothérapie par IL-2 est dépendant des Treg. Néanmoins, les mécanismes immunologiques mis en place à long terme restent à préciser. L'absence visible de Treg à distance du traitement par IL-2 pourrait être expliquée par l'implication de population de cellules régulatrices particulièrement efficaces pour contrôler les réponses allergiques et présentes en fréquence faible ou par la sélection, le recrutement et la restimulation au niveau local de Treg spécifiques de l'OVA, suite à la réadministration de l'antigène.

**b. L'IL-2 sélectionnerait des populations de cellules régulatrices FOXP3- impliquées dans la régulation de l'allergie.**

L'induction de cellules T régulatrices spécifiques de l'allergène qui produisent de l'IL-10 constitue un événement majeur de la mise en place de la tolérance orale (Maggi, Vultaggio, et Matucci 2012). L'accumulation de cellules Tr1 et de cellules de type Th1 au niveau cutané après challenge par l'allergène a également été montré après vaccination tolérogénique avec le peptides Fel d 1 (Alexander, Tarzi, et al. 2005). Les Tr1 suppriment la réponse allergique Th2 en diminuant la production d'IL-4 par les cellules T effectrices via la sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (F. Cottrez et al. 2000). De même l'IL-10 supprime la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les mastocytes, réduit la fonction et l'activité des éosinophiles en supprimant la production d'IL-5 par les Th2, ainsi que l'activation et la fonction des mastocytes et des basophiles (K. Wu et al. 2007). Dans nos résultats, nous avons observé une augmentation à la fois des réponses IL-10 et IFN- $\gamma$  au niveau des PP et du duodénum. Des cellules régulatrices double positive IFN- $\gamma$ /IL-10 FOXP3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> qui ont été décrites chez des souris subissant une stimulation chronique par l'antigène (Trinchieri 2007) ou des cellules Tr1 classiques, pourraient être induite après traitement par IL-2 expliquant le rééquilibrage de la balance Th1/Th2 et la diminution de fonction des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles observées chez les souris protégées malgré un compartiment Treg Foxp3<sup>+</sup> normal après challenge par l'antigène (Article 1). En effet, les Tr1 sont caractérisés par l'absence de l'expression de FOXP3 et n'ont donc pas été comptabilisés dans nos expériences. De plus ils n'expriment pas le CD25 (Sumitomo et Yamamoto 2010) et ne sont donc pas sensibles à l'IL-2. Ainsi, leur induction via l'IL-2 faible dose, suggérerait un mécanisme indirect, en impliquant notamment, les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> de l'intestin qui semblent capables d'induire la génération de Tr1 (Sun et al. 2007). La réalisation d'expériences chez des souris IL-10KO ou l'utilisation d'anticorps neutralisant l'IL-10 semblent indispensables afin de préciser le rôle des Tr1 chez nos souris protégées par l'IL-2. Aussi, les lymphocytes B régulateurs (Breg), caractérisés par leur capacité à sécréter de l'IL-10, participent à la régulation des phénomènes allergiques chez la souris (G. Jin et al. 2013) (Braza et al. 2015) et l'Homme (van der Vlugt et al. 2014) (Noh et al. 2010). Alors que les Breg ont démontré leur rôle dans les protocoles d'ITS (C. A. Akdis et al. 1998), le traitement par IL-2 faible dose ne permet pas d'augmenter significativement les Breg, qu'ils soient définis par l'expression des marqueurs CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> (plasmablastes)

(Matsumoto et al. 2014) ou par l'expression des marqueurs CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> (Evans et al. 2007) (Matsushita et al. 2008) (données non montrées). Aussi, la protection induite par l'IL-2 n'est pas associée à une augmentation des Breg CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, chez les souris comparée au groupe contrôle non traité (Fig. 12E).

Nous avons également étudié la sélection par l'IL-2 de sous-populations de cellules immunosuppressives particulièrement efficaces pour contrôler les réponses allergiques localement et présentes en fréquence faible, afin de comprendre les mécanismes de protection induits par l'IL-2, malgré un nombre de Treg normal retrouvé chez nos souris protégées. Des études récentes ont démontré le rôle particulièrement important des pTreg dans la régulation Th2 (Josefowicz et al. 2012). Nous avons donc choisi d'analyser l'effet de l'IL-2 sur deux sous populations de pTreg, particulièrement présents au niveau de l'intestin, et régulant les réponses allergiques. Les Treg RORγt<sup>+</sup>, définis comme des pTreg (Sefik et al. 2015), représentent une population stable de Treg (B.-H. Yang et al. 2016) clé dans la régulation des manifestations inflammatoires de l'intestin, en contrôlant notamment les réponses Th2 (Ohnmacht et al. 2015) (Lochner, Wang, et Sparwasser 2015). Par ailleurs, les pTreg RORγt<sup>+</sup> caractérisés par l'absence de l'expression de NRP1 sont cruciaux dans le contrôle de la réactivité aux antigènes alimentaires et l'induction de tolérance (K. S. Kim et al. 2016). Cependant, nos données obtenues chez les souris protégées par l'IL-2 ne mettent pas en évidence d'augmentation des ces populations de Treg comparées aux données obtenues chez les souris malades (Fig. 15). Cela pose la question des cellules régulatrices capables de réguler les réponses allergiques et notamment à distance du traitement IL-2. Nos résultats d'induction de Treg en périphérie à partir de cellules FOXP3<sup>+</sup> montrent que l'IL-2 n'a pas pour conséquence la génération massive de pTreg, n'observant pas de génération de cellules GFP<sup>+</sup> à partir des cellules de souris Foxp3/GFP<sup>+</sup> (Fig. 14). Or, des expériences réalisées chez la souris dépourvue en tTreg ou à la fois en tTreg et pTreg ont démontré que les pTreg sont essentiels dans l'induction de la tolérance alors que les tTreg ne le sont pas (Curotto de Lafaille et al. 2008; Mucida 2005). Ceci est également supporté par le fait que les pTreg, plutôt que les tTreg, sont impliqués dans la régulation des réponses allergiques Th2 (Josefowicz et al. 2012). De même, l'induction de pTreg FOXP3<sup>+</sup> après l'immunisation par le peptide OVA323-339 associé à son ADN codant permet d'obtenir une protection clinique dans un modèle d'asthme allergique, contrairement aux tTreg (H. Jin et al. 2008). Ainsi, l'absence d'induction de pTreg par l'IL-2 est étonnante, alors qu'elle permet d'induire une protection clinique contre l'allergie. Ceci peut s'expliquer par les limites expérimentales des

modèles utilisés. En effet, l'induction de Treg en périphérie nécessite une signalisation dépendante de l'engagement du TCR (D. Zhang et al. 2017). Des expériences complémentaires, (i) en réalisant un transfert adoptif de  $CD4^{+}FOXP3^{-}$  issus de souris transgéniques spécifiques d'un antigène qui pourra être administré en même temps que le traitement ou (ii) d'étudier l'induction de pTreg par l'IL-2 après les sensibilisations par l'allergène, sont donc nécessaires afin de pleinement comprendre l'effet de l'IL-2 sur l'induction de pTreg. De même, l'analyse a été effectuée au niveau de la rate, or les données de la littérature suggèrent que l'induction de Treg s'effectue plus volontiers au niveau d'organe pro-toléro-gène et des muqueuses (Mucida 2005). L'expérience demande donc à être reconduite en analysant les pTreg présents au niveau de l'intestin et des organes lymphoïdes associés.

### **c. L'effet protecteur de l'IL-2 serait en lien avec la génération de Treg anti-OVA.**

La sélection de Treg spécifiques de l'OVA par l'IL-2 reste envisageable et constitue une hypothèse mécanistique expliquant l'efficacité à long-terme de notre traitement. En effet, seules les souris traitées par IL-2 sont protégées des réactions cliniques de l'allergie (Article 1), alors que tous les groupes (IL-2 et PBS) ont été challengés par une administration, répétée et régulière, par voie orale, d'OVA, pouvant potentiellement induire une tolérance par induction de Treg (Yamashita et al. 2012). Se pose la question de la spécificité d'action de notre traitement par IL-2? Autrement dit, l'IL-2, administrée dans le cadre de notre protocole d'allergie à l'OVA, induit-elle une protection spécifique contre l'OVA, ou s'agit-il d'une protection plus générale, contre tout allergène? Des expériences de transfert adoptif de Treg dans un modèle de poly-sensibilisation alimentaire sont nécessaires pour clairement répondre à cette question. Pour cela nous utiliserons, en plus du modèle d'allergie à l'OVA, un modèle d'allergie alimentaire à la  $\beta$ -lactoglobuline. Les souris receveuses seront donc sensibilisées à la fois contre l'OVA et la  $\beta$ -lactoglobuline. Les Treg seront prélevés chez des souris donneuses préalablement traitées par l'IL-2 et protégées dans le modèle OVA et seront administrés chez les receveuses malades après les premières inductions à l'OVA. Un deuxième cycle d'induction à l'OVA sera alors réalisé pour démontrer que le transfert adoptif de Treg entraîne une protection clinique. Pour démontrer l'effet protecteur de l'IL-2 spécifiquement contre l'OVA, une dernière série d'induction sera réalisée avec la  $\beta$ -lactoglobuline, lors de laquelle une perte de protection clinique est attendue.

Néanmoins, l'effet protecteur observé pourrait être en lien avec l'induction de Treg spécifiques de l'OVA. Les Treg spécifiques semblent plus actifs que les Treg polyclonaux (Tang et al. 2004; Masteller et al. 2005), capables de supprimer les réponses effectrices même lorsqu'ils sont présents en très faible proportion lorsqu'ils sont restimulés par leur antigène. Ils sont impliqués dans les mécanismes de tolérance orale aux antigènes (Howard L. Weiner et al. 2011; M. Akdis et al. 2004; Aslam et al. 2010; Flurina Meiler et al. 2008) et leur augmentation constituerait donc un des points clefs de l'efficacité des immunothérapies. Pour l'instant, nous avons pu montrer lors d'un transfert adoptif que de faibles quantités de Treg issus de souris protégées par IL-2- et prélevés à distance de la cure d'IL-2 - sont plus efficaces pour induire une protection contre l'allergie comparativement aux Treg issus de souris contrôles (Fig. 16), suggérant l'implication de Treg spécifiques de l'allergène. Ceci corrobore avec les données de Yamashita *et al.*, qui montrent qu'un transfert adoptif d'une dose faible de Treg issus de souris tolérisées par de faible dose d'OVA permet d'obtenir une protection contre l'allergie alimentaire plus efficace par rapport à l'administration de Treg issus de souris naïves (Yamashita et al. 2012). Ceci serait en lien avec l'induction de Treg spécifique de l'antigène à la suite de l'administration répétée de celui-ci (Flurina Meiler et al. 2008; Aslam et al. 2010).

Ainsi, nous avons analysé ces Treg spécifiques dans la protection obtenue par l'IL-2 en analysant l'enrichissement du clone DO11.10 au sein de nos différentes populations de Treg par RT-qPCR avec des primers spécifiques de la séquence DO11.10. Malheureusement, cette stratégie ne nous a pas permis de mettre en évidence un enrichissement de clones spécifiques DO11.10 au sein des Treg pouvant expliquer l'effet protecteur de l'IL-2 (Fig. 17), probablement en raison des limites de spécificité et de sensibilité du test. Ainsi, pour déterminer l'émergence de l'ensemble des clones spécifiques de l'OVA, sans se restreindre à la séquence DO11.10 majoritaire en fond Balb/c, il conviendrait de séquencer l'ensemble des régions variables (CDR3) de la chaîne Beta du TCR des Treg issus de souris protégées par IL-2 et des Treg issus de souris malades et d'étudier leur enrichissement spécifique.

Néanmoins, la suppression de la prolifération de Tconv transgéniques DO11.10 après restimulation spécifique induite par des Treg transgéniques DO11.10 au ratio 1:4, ou des Treg non transgéniques issus de souris protégées par l'IL-2 au ratio 1:1, est comparable se situant autour de 15% (Fig. 17C). Ceci, alors que la suppression est identique entre ces deux populations de Treg après restimulation non spécifiques au ratio 1:1 (Fig. 17D), se situant autour de 15% également, suggérant un « effet bystander » de la suppression médiée par les

Treg non transgéniques, effet décrit initialement comme un phénomène majeur de la mise en place de la tolérance orale (A. Miller, Lider, et Weiner 1991). De ce fait, nous avons essayé de comprendre les différents effets de l'IL-2 quant à la qualité des réponses suppressives des Treg pouvant expliquer une action à long terme.

**d. L'activation et le maintien de la stabilité des Treg par l'IL-2 pourraient expliquer les effets à long terme.**

L'activation des Treg par l'IL-2 leur confère de meilleures capacités suppressives, immédiatement après le traitement par IL-2 en condition de restimulation spécifique ou non spécifique de l'antigène (Fig. 13). Afin de savoir si l'activation préalable des Treg par l'IL-2 permet d'améliorer la suppression à long terme par effet bystander, il convient de renouveler cette expérience en prélevant les Treg, non plus immédiatement après la cure, mais à distance de la cure et d'analyser leur capacité suppressive. Néanmoins, en plus d'induire une expansion des Treg, la stimulation par l'IL-2 permet l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  par les Treg (Brandenburg et al. 2008), l'augmentation de l'expression de CTLA-4 (Article 1) antagonisant les signaux de co-stimulations présents sur les DC, ainsi que l'augmentation de CD39 et CD73 (Barron et al. 2010), expliquant la meilleure activité suppressive des Treg issus de souris traitées par IL-2 (Brandenburg et al. 2008). A plus long terme, l'IL-2 constitue un facteur de survie indispensable pour la fonction et la stabilité des Treg (Barron et al. 2010). Notamment l'absence d'IL-2 entraîne la mort apoptotique de cellules dépendantes de la voie BIMP (Barron et al. 2010) alors qu'à l'inverse, l'IL-2 augmente la résistance des Treg à l'apoptose (Matsuoka et al. 2013). Aussi l'IL-2 induit une déméthylation de la région CNS2 de FOXP3 (Y. Feng et al. 2014), permettant de stabiliser l'expression de FOXP3 (Miyao et al. 2012) alors qu'ils peuvent se convertir en ex-Treg en condition inflammatoire (Murai et al. 2010). Ce gain de fonction et de stabilité conféré par l'IL-2 permet aux Treg de rester actifs de façon durable, expliquant pour partie les effets protecteurs de l'IL-2 dans notre modèle.

## Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons démontré que l'administration d'IL-2 faible dose permet de diminuer les manifestations cliniques de l'allergie alimentaire, qu'elle soit administrée de façon préventive ou curative. De même, plusieurs voies d'administration ont été testées et nous avons démontré l'efficacité de l'IL-2 administrée par voie intrapéritonéale et orale. Ceci constitue un réel espoir dans la prise en charge de l'allergie alimentaire puisqu'il s'agit d'une maladie avec un arsenal thérapeutique actuellement limité. Cependant, le mécanisme associé à la tolérance à long terme n'est pas clairement élucidé. Nous avons démontré au cours de cette étude que la protection est associée à une régulation systémique en diminuant notamment les éosinophiles et la dégranulation des mastocytes et des basophiles. Nous avons également démontré que l'IL-2 induisait un rééquilibrage de la balance Th1/Th2 au moment de la phase d'induction orale, notamment en augmentant la réponse Th1. L'effet thérapeutique de l'IL-2 ne peut être dissocié de l'induction précoce de Treg. L'activation des Treg induite par un traitement par de faibles doses d'IL-2, favorise la suppression de la prolifération spécifique de Tconv transgéniques, par effet bystander en lien probable avec l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 au niveau local (données non montrées). Néanmoins, la contribution de pTreg et de Treg spécifiques de l'allergène dans les mécanismes de suppression à long terme n'est pas à exclure, même si nous ne sommes, pour le moment, pas en mesure de les mettre en évidence. Des investigations supplémentaires sont nécessaires.

Aussi, nous avons démontré, en utilisant d'autres modèles d'allergies, que l'effet thérapeutique de l'IL-2 est indépendant de l'antigène contre lequel on essaie de mettre en place une tolérance. En effet nous avons démontré, en plus du modèle à l'OVA, que l'IL-2 prévient les signes cliniques de l'allergie à la cacahuète. De même, en collaboration avec Stallergène et en utilisant un modèle d'allergie respiratoire, nous avons démontré que l'IL-2 entraîne une protection contre les signes cliniques de l'allergie dans un autre type d'allergie que l'allergie alimentaire. C'est dans ce contexte qu'un essai clinique de phase II testant l'efficacité et la sécurité de l'administration d'IL-2 faible dose dans la rhinoconjonctivite avec syndrome oral associé à la consommation de pomme va prochainement être mise en place par notre centre d'investigation clinique (PHRC 2016). Le critère de jugement principal sera le pourcentage de patient avec un test de provocation oral à la pomme négatif à la fin des 5 mois de traitement, permettant de préjuger de l'efficacité de l'IL-2 dans l'allergie chez l'Homme.

Ainsi, si les résultats chez l'Homme sont favorables, l'IL-2 faible dose constituera une avancée thérapeutique considérable, ouvrant la perspective de pouvoir traiter les patients souffrant de poli-sensibilisation, et d'allergies multiples. Nous espérons ainsi pouvoir développer le premier traitement curatif des allergies chez l'Homme, basé sur le principe des biothérapies.



## Annexes

### **Article 2 : Cibles et immunothérapies innovantes dans le traitement de l'allergie alimentaire (Revue).**

Benjamin Bonnet, Pierre-Axel Vinot, Bertrand Bellier.

Revue de la littérature publiée dans la *revue française d'allergologie*. 57, 327-336. Février 2017.

Au cours de ma thèse, j'ai également rédigé une revue de la littérature dont le but était de resituer le traitement par IL-2 faible dose par rapport aux autres traitements innovants en cours de développement dans le traitement de l'allergie. Ainsi, après avoir rappelé le contexte médico-économique et l'urgence de développer de nouvelles thérapies des allergies alimentaires basées sur le principe des biothérapies, nous avons définis les cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes en se basant sur les connaissances actuelles de la physiopathologie de l'allergie alimentaire. Ainsi, les différentes biothérapies en cours de développement dans l'allergie alimentaire ont été abordées dans cette revue. De façon plus importante, le rationnel de l'utilisation de l'IL-2 faible dose en thérapie ainsi que les différents essais cliniques réalisés établissant les preuves de concept de l'utilisation de l'IL-2 faible dose ont été présentés. Notamment cette revue détaille particulièrement les principaux résultats obtenus de l'utilisation de l'IL-2 faible dose dans des modèles murins d'allergie.



Disponible en ligne sur  
**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

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

REVUE FRANÇAISE  
D'**Allergologie**

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

Revue de la littérature

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

*Targets and innovative immunotherapies for the treatment of food allergy*

B. Bonnet<sup>a,b,c</sup>, P.A. Vinot<sup>a,b,c</sup>, B. Bellier<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne universités, UPMC université Paris 06, UMRS\_959, I<sup>3</sup>, 75013 Paris, France

<sup>b</sup> Inserm, UMRS\_959, I<sup>3</sup>, 75013 Paris, France

<sup>c</sup> Service de biothérapies, centre d'investigation clinique de biothérapies, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP, 75013 Paris, France

Reçu le 10 octobre 2016 ; accepté le 12 novembre 2016

Disponible sur Internet le 9 février 2017

### Résumé

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

© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

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

### Abstract

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

\* Auteur correspondant. Inserm UMRS959, laboratoire d'immunologie-immunopathologie-immunothérapie, bat CERVI, hôpital Pitié-Salpêtrière, 83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Adresse e-mail : [bertrand.bellier@upmc.fr](mailto:bertrand.bellier@upmc.fr) (B. Bellier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2016.11.003>

1877-0320/© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

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

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

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

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

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

### 1.1. Épidémiologie

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

### 1.2. Aspect économique

La mesure de l'impact économique des allergies alimentaires est complexe en raison d'un défaut d'études économico-sanitaires fiables en Europe. En plus des coûts directs liés à la prise en charge médicale des patients, les coûts indirects

alourdissent significativement l'impact économique de cette pathologie, prenant en compte l'absentéisme au travail et le manque de productivité du patient ou de ses proches.

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

### 1.3. Traitements actuels de l'allergie

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

#### 1.3.1. Traitements symptomatiques

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

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

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

### 1.3.2. Éviction stricte de l'allergène

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

## 2. Nouvelles thérapies de l'allergie alimentaire

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

### 2.1. Physiopathologie et cibles thérapeutiques potentielles

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

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

En dehors de ces mécanismes communs aux autres allergies, plusieurs facteurs spécifiques de l'allergie alimentaire sont néanmoins décrits. On peut citer notamment l'implication

probable de la vitamine D dans l'apparition de la pathologie de par son effet dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale au niveau intestinal [14]. Cette relation a été confirmée par la corrélation observée entre une carence de cette vitamine et l'apparition d'allergies à l'arachide dans une population infantile australienne. De plus, les enfants carencés présentaient également une plus forte probabilité de développement d'allergies alimentaires multiples [15].

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

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

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



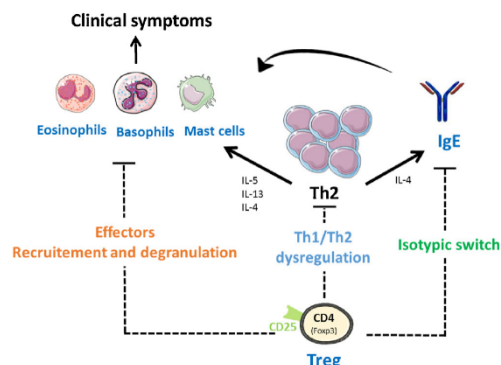


Fig. 1. Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T CD4+ Foxp3+ agissent à différents niveaux de la mise en place des réponses allergiques : de façon précoce agissant sur le compartiment Th2 associé à la sensibilisation ou de façon plus tardive agissant sur les cellules effectrices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

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

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

## 2.2. Avancées thérapeutiques de l'allergie alimentaire

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

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

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

L'ITS par voie sous-cutanée (SCIT) est sujette à controverse et n'est plus utilisée actuellement en raison d'un profil de sécurité insatisfaisant. De plus, seule une étude testant la

SCIT dans le cadre d'une allergie aux poissons a été concluante avec l'utilisation de protéines recombinantes hypoallergéniques [36]. Cette voie a donc logiquement été abandonnée et n'est plus proposée en routine clinique. Des considérations pratiques et logistiques ont également favorisé le développement d'alternatives moins contraignantes avec l'utilisation de la voie orale et sublinguale.

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

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

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

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

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

#### 2.2.2. Anti-IgE

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

#### 2.2.3. Adjuvants pro-Th1

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

#### 2.2.4. Anti-IL-5

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

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

#### 2.2.5. Abatacept

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

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

#### 2.2.6. Microbiote et bactéries recombinantes

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

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

que par l'étude de souches dotées de propriétés tolérigènes intrinsèques.

#### 2.2.7. Thérapie cellulaire ex vivo par Treg

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

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

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

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

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



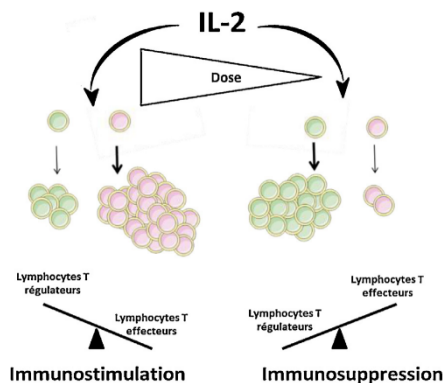


Fig. 2. Les effets pléiotropiques de l'IL-2 en fonction de la dose utilisée. L'IL-2 utilisée à faible dose induit l'expansion préférentielle des Treg qui possèdent le récepteur de haute affinité pour l'IL-2. À l'inverse, l'IL-2 utilisée à forte dose entraîne également le recrutement et l'expansion des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

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

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

En parallèle, d'autres groupes ont démontré l'efficacité clinique de l'administration de faibles doses d'IL-2 dans le traitement de la GVHD [94], du lupus [95] et des alopecies auto-immunes [96]. Ces résultats prometteurs apportent la preuve que

l'IL-2 faible dose constitue une bonne alternative à la thérapie cellulaire ex vivo.

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

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

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

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

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



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

### 3. Conclusion

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

### Déclaration de liens d'intérêts

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

### Références

- [1] Gupta RS, Springston EE, Warrier MR, Smith B, Kumar R, Pongracic J, et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics* 2011;128(1):e9–17.
- [2] Soller L, Ben-Shoshan M, Harrington DW, Fraga-pare J, Joseph L, St. Pierre Y, et al. Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(4):986–8.
- [3] Umetsu DT, Rachid R, Schneider LC. Oral immunotherapy and anti-IgE antibody treatment for food allergy. *World Allergy Organ J* 2015;8(1):20.
- [4] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(2):291–307 [e5].
- [5] Liew WK, Williamson E, Tang MLK. Anaphylaxis fatalities and admissions in Australia. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(2):434–42.
- [6] Moneret-Vautrin D-A. Épidémiologie de l'allergie alimentaire. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2008;48(3):171–8.
- [7] Patel DA, Holdford DA, Edwards E, Carroll NV. Estimating the economic burden of food-induced allergic reactions and anaphylaxis in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(1):110–5 [e5].
- [8] O'Keefe AW, De Schryver S, Mill J, Mill C, Dery A, Ben-Shoshan M. Diagnosis and management of food allergies: new and emerging options: a systematic review. *J Asthma Allergy* 2014;7:141–64.
- [9] Ercan H, Ozen A, Karatepe H, Berber M, Cengizler R. Primary school teachers' knowledge about and attitudes toward anaphylaxis. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23(5):428–32.
- [10] Groetch M, Nowak-Węgrzyn A. Practical approach to nutrition and dietary intervention in pediatric food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24(3):212–21.
- [11] Flammarion S, Santos C, Guimber D, Jouannic L, Thumerelle C, Gottrand F, et al. Diet and nutritional status of children with food allergies. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22(2):161–5.
- [12] Diamanti A, Pedicelli S, D'Argenio P, Panetta F, Alterio A, Torre G. Iatrogenic Kwashiorkor in three infants on a diet of rice beverages. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22(8):878–9.
- [13] Palomares O. The role of regulatory T cells in IgE-mediated food allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013;23(6):371–82 [quiz 2 p preceding 382].
- [14] Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 2007;294(1):G208–16.
- [15] Allen KJ, Koplin JJ, Ponsonby A-L, Gurrin LC, Wake M, Vuillermin P, et al. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(4):1109–16 [e6].
- [16] Stefa AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, et al. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(36):13145–50.
- [17] Metsälä J, Lundqvist A, Virta LJ, Kaila M, Gissler M, Virtanen SM. Mother's and offspring's use of antibiotics and infant allergy to cow's milk. *Epidemiology* 2013;24(2):303–9.
- [18] Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F, et al. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology* 2007;132(5):1705–17.
- [19] Schaub B, Liu J, Höppler S, Haug S, Sattler C, Lluís A, et al. Impairment of T regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(6):1491–9 [1499, e1–13].
- [20] Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004;199(12):1679–88.
- [21] Sletten GBG, Halvorsen R, Egeas E, Halstensen TS. Memory T cell proliferation in cow's milk allergy after CD25+ regulatory T cell removal suggests a role for casein-specific cellular immunity in IgE-mediated but not in non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;142(3):190–8.
- [22] Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy* 2012;2(1):2.
- [23] Smarr CB, Bryce PJ, Miller SD. Antigen-specific tolerance in immunotherapy of Th2-associated allergic diseases. *Crit Rev Immunol* 2013;33(5):389–414.
- [24] Syed A, Garcia MA, Lyu S-C, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, et al. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(2):500–10.
- [25] Yamashita H, Takahashi K, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy* 2012;67(2):201–9.
- [26] Bonnet B, Vigneron J, Levacher B, Vazquez T, Pitoiset F, Brimaud F, et al. Low-dose IL-2 induces regulatory T cell-mediated control of experimental food allergy. *J Immunol* 2016;197(1):188–98.
- [27] Kanjarawi R, Dercamp C, Etchart N, Adel-Patient K, Nicolas J-F, Dubois B, et al. Regulatory T cells control type I food allergy to Beta-lactoglobulin in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156(4):387–96.
- [28] Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of allergen-driven T cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004;363(9409):608–15.



- [29] Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 2000;165(9):4848–53.
- [30] Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* 2005;174(8):4718–26.
- [31] Van Wijk F, Nierkens S, de Jong W, Wehrens EJM, Boon L, van Kooten P, et al. The CD28/CTLA-4-B7 signaling pathway is involved in both allergic sensitization and tolerance induction to orally administered peanut proteins. *J Immunol* 2007;178(11):6894–900.
- [32] Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008;63(11):1455–63.
- [33] Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008;29(5):771–81.
- [34] Kashyap M, Thornton AM, Norton SK, Barnstein B, Macey M, Brenzovich J, et al. Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J Immunol* 2008;180(4):2039–43.
- [35] Rolland JM, Gardner LM, O'Hehir RE. Allergen-related approaches to immunotherapy. *Pharmacol Ther* 2009;121(3):273–84.
- [36] Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Poulsen LK, Neubauer A, Asturias J, Blom L, et al. FAST: towards safe and effective subcutaneous immunotherapy of persistent life-threatening food allergies. *Clin Transl Allergy* 2012;2(1):5.
- [37] Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, Lindblad RW, et al. Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N Engl J Med* 2012;367(3):233–43.
- [38] Caminiti L, Pajno GB, Crisafulli G, Chiera F, Collura M, Panasci G, et al. Oral immunotherapy for egg allergy: a double-blind placebo-controlled study, with postdesensitization follow-up. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;3(4):532–9.
- [39] Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, Perry TT, Kemper A, Steele P, et al. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3):654–60.
- [40] Keet CA, Frischmeyer-Guerrero PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, Boden S, et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(2):448–55 [455, e1–5].
- [41] Chiang D, Berin MC. An examination of clinical and immunologic outcomes in food allergen immunotherapy by route of administration. *Curr Allergy Asthma Rep [Internet]* 2015;15(6) [cited 2015 Jul 7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11882-015-0536-y>].
- [42] Vázquez-Ortiz M, Alvaro M, Piquer M, Domínguez O, Machinena A, Martín-Mateos MA, et al. Baseline specific IgE levels are useful to predict safety of oral immunotherapy in egg-allergic children. *Clin Exp Allergy* 2014;44(1):130–41.
- [43] Vázquez-Ortiz M, Alvaro M, Alsiná L, García-Paba MB, Piquer-Gibert M, Giner-Muñoz MT, et al. Safety and predictors of adverse events during oral immunotherapy for milk allergy: severity of reaction at oral challenge, specific IgE and prick test. *Clin Exp Allergy* 2013;43(1):92–102.
- [44] Lucendo AJ, Arias A, Tenias JM. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014;113(6):624–9.
- [45] Senna GE, Calderon M, Milani M. Allergy immunotherapy tablet: Grazax® for the treatment of grass pollen allergy. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7(1):21–7.
- [46] Kostadinova AI, Willemsen LEM, Knippels LMJ, Garssen J. Immunotherapy – risk/benefit in food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2013;24(7):633–44.
- [47] Marogna M, Spadolini I, Massolo A, Canonica GW, Passalacqua G. Long-lasting effects of sublingual immunotherapy according to its duration: a 15-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(5):969–75.
- [48] Fleischer DM, Burks AW, Vickery BP, Scurlock AM, Wood RA, Jones SM, et al. Sublingual immunotherapy for peanut allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(1):119–27 [e1–7].
- [49] Narisety SD, Frischmeyer-Guerrero PA, Keet CA, Gorelik M, Schroeder J, Hamilton RG, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135(5):1275–82 [e1–6].
- [50] Holt PG, Sly PD, Sampson HA, Robinson P, Loh R, Lowenstein H, et al. Prophylactic use of sublingual allergen immunotherapy in high-risk children: a pilot study. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132(4):991–3 [e1].
- [51] Tordesillas L, Goswami R, Benédé S, Grishina G, Dunkin D, Järvinen KM, et al. Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. *J Clin Invest* 2014;124(11):4965–75.
- [52] Brough HA, Simpson A, Makinson K, Hankinson J, Brown S, Douiri A, et al. Peanut allergy: effect of environmental peanut exposure in children with filaggrin loss-of-function mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134(4):867–75 [e1].
- [53] Fox AT, Sasieni P, du Toit G, Syed H, Lack G. Household peanut consumption as a risk factor for the development of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(2):417–23.
- [54] Dioszeghy V, Mondoulet L, Dhelft V, Ligouis M, Puteaux E, Benhamou P-H, et al. Epicutaneous immunotherapy results in rapid allergen uptake by dendritic cells through intact skin and downregulates the allergen-specific response in sensitized mice. *J Immunol* 2011;186(10):5629–37.
- [55] Dioszeghy V, Mondoulet L, Dhelft V, Ligouis M, Puteaux E, Dupont C, et al. The regulatory T cells induction by epicutaneous immunotherapy is sustained and mediates long-term protection from eosinophilic disorders in peanut-sensitized mice. *Clin Exp Allergy* 2014;44(6):867–81.
- [56] Dupont C, Kalach N, Soulaïnes P, Legoué-Morillon S, Piloquet H, Benhamou P-H. Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(5):1165–7.
- [57] Sampson HA, Agbotounou W, Thébault C, Charles R, Martin L, Yang WH, et al. Epicutaneous immunotherapy (EPIT) is effective and safe to treat peanut allergy: a multi-national double-blind placebo-controlled randomized phase IIb trial. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135(2, Supplement):AB390.
- [58] Sampson HA, Leung DYM, Burks AW, Lack G, Bahna SL, Jones SM, et al. A phase II, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled oral food challenge trial of Xolair (omalizumab) in peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(5):1309–10 [e1].
- [59] Yee CSK, Rachid R. The heterogeneity of oral immunotherapy clinical trials: implications and future directions. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016;16(4):1–19.
- [60] Wood RA, Kim JS, Lindblad R, Nadeau K, Henning AK, Dawson P, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of omalizumab combined with oral immunotherapy for the treatment of cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137(4):1103–10.
- [61] Pagovich OE, Wang B, Chiuchiolio MJ, Kaminsky SM, Sondhi D, Jose CL, et al. Anti-IgE gene therapy of peanut-induced anaphylaxis in a humanized murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138(6):1652–62.
- [62] Wheeler AW, Marshall JS, Ulrich JT. A Th1-inducing adjuvant, MPL, enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;126(2):135–9.
- [63] Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, Sperr WR, Krauth MT, Majlesi Y, et al. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy* 2003;33(9):1198–208.
- [64] Crivellaro M, Senna GE, Pappacoda A, Vanzelli R, Spacal B, Marchi G, et al. Safety of ultrashort-term sit with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A: a prospective Italian survey. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2011;43(2):58–60.
- [65] Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed-toll-like



- receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006;355(14):1445–55.
- [66] Fonseca DM, Wolk PF, Paula MO, Gembre AF, Baruffi MD, Fermino ML, et al. Requirement of MyD88 and Fas pathways for the efficacy of allergen-free immunotherapy. *Allergy* 2015;70(3):275–84.
- [67] Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009;360(10):973–84.
- [68] Nair P, Pizzichini MMM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med* 2009;360(10):985–93.
- [69] Straumann A, Conus S, Grzonka P, Kita H, Kephart G, Bussmann C, et al. Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic oesophagitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Gut* 2010;59(1):21–30.
- [70] Parulekar AD, Boomer JS, Patterson BM, Yin-Declue H, Deppong CM, Wilson BS, et al. A randomized controlled trial to evaluate inhibition of T cell co-stimulation in allergen-induced airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(5):494–501.
- [71] Wesemann DR, Nagler CR. The microbiome, timing, and barrier function in the context of allergic disease. *Immunity* 2016;44(4):728–38.
- [72] Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, Geuking MB, McCoy KD. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* 2013;14(5):559–70.
- [73] Hill DA, Siracusa MC, Abt MC, Kim BS, Kobuley D, Kubo M, et al. Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nat Med* 2012;18(4):538–46.
- [74] Prioult G, Nagler-Anderson C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol Rev* 2005;206:204–18.
- [75] Ai C, Zhang Q, Ding J, Wang G, Liu X, Tian F, et al. Mucosal delivery of allergen peptides expressed by *Lactococcus lactis* inhibit allergic responses in a BALB/c mouse model. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100(4):1915–24.
- [76] Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA. Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(4):952–9.
- [77] Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(3):617–24 [e6].
- [78] Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 2005;202(11):1539–47.
- [79] Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2015;15(5):283–94.
- [80] Royal RE, Steinberg SM, Krouse RS, Heywood G, White DE, Hwu P, et al. Correlates of response to IL-2 therapy in patients treated for metastatic renal cancer and melanoma. *Cancer J Sci Am* 1996;2(2):91–8.
- [81] Nizar S, Copier J, Meyer B, Bodman-Smith M, Galustian C, Kumar D, et al. T regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? *Br J Cancer* 2009;100(11):1697–703.
- [82] Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010;207(9):1871–8.
- [83] Boyman O, Surh CD, Sprent J. Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6(12):1323–31.
- [84] Lee S-Y, Cho M-L, Oh H-J, Ryu J-G, Park M-J, Jhun J-Y, et al. Interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody immune complex suppresses collagen-induced arthritis in mice by fortifying interleukin-2/STAT5 signalling pathways. *Immunology* 2012;137(4):305–16.
- [85] Dinh TN, Kyaw TS, Kanellakis P, To K, Tipping P, Toh B-H, et al. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. *Circulation* 2012;126(10):1256–66.
- [86] Liu R, Zhou Q, La Cava A, Campagnolo DI, Van Kaer L, Shi F-D. Expansion of regulatory T cells via IL-2/anti-IL-2 mAb complexes suppresses experimental myasthenia. *Eur J Immunol* 2010;40(6):1577–89.
- [87] Hao J, Campagnolo D, Liu R, Piao W, Shi S, Hu B, et al. Interleukin-2/interleukin-2 antibody therapy induces target organ natural killer cells that inhibit central nervous system inflammation. *Ann Neurol* 2011;69(4):721–34.
- [88] Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball JG, et al. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 2014;6(258):258ra142.
- [89] Kasahara K, Sasaki N, Yamashita T, Kita T, Yodoi K, Sasaki Y, et al. CD3 antibody and IL-2 complex combination therapy inhibits atherosclerosis by augmenting a regulatory immune response. *J Am Heart Assoc* 2014;3(2):e000719.
- [90] Brandenburg S, Takahashi T, de la Rosa M, Janke M, Karsten G, Muzulini T, et al. IL-2 induces in vivo suppression by CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2008;38(6):1643–53.
- [91] Dietrich T, Hucko T, Schneemann C, Neumann M, Menrad A, Willuda J, et al. Local delivery of IL-2 reduces atherosclerosis via expansion of regulatory T cells. *Atherosclerosis* 2012;220(2):329–36.
- [92] D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, et al. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest* 2009;119(10):2898–913.
- [93] Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, Jacqueminet S, Bourron O, Nicolas N, et al. Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013;1(4):295–305.
- [94] Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2011;365(22):2055–66.
- [95] Von Spee-Mayer C, Siegert E, Abdirama D, Rose A, Klaus A, Alexander T, et al. Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2016;75(7):1407–15.
- [96] Hordinsky M, Kaplan DH. Low-dose interleukin 2 to reverse alopecia areata. *JAMA Dermatol* 2014;150(7):696–7.
- [97] Kosmaczewska A. Low-dose interleukin-2 therapy: a driver of an imbalance between immune tolerance and autoimmunity. *Int J Mol Sci* 2014;15(10):18574–92.
- [98] Cook KD, Kline HC, Whitmire JK. NK cells inhibit humoral immunity by reducing the abundance of CD4+ T follicular helper cells during a chronic virus infection. *J Leukoc Biol* 2015;98(2):153–62.
- [99] Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199(11):1455–65.
- [100] Churlaud G, Jimenez V, Ruberte J, Amadouji Zin M, Fourcade G, Gottrand G, et al. Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. *Clin Immunol* 2014;151(2):114–26.

## Travaux originaux

P-G Ritvo, W Chaara, **B Bonnet**, A Six, E Mariotti-Ferrandiz, D Klatzmann. High resolution Tfh and Tfr repertoire analysis reveals an unexpected high diversity and suggests a bystander activation of follicular T cells. Nature Communications (en soumission)

V. Dupuch, A. Tridon, S Ughetto, S Walrand, **B Bonnet**, C Dubray, A Virolgeux, M-P Vasson, N Saroul, T Mom, L Gilain, B Evrard. Activation state of circulating eosinophils in nasal polyposis. Allergy and Rhinology (soumis).

**B. Bonnet**, L. Blum, C. Charpentier, P. Martres, P-G. Ritvo, B. Autran, A. Guihot. Very profound CD4 lymphopenia but successful immune reconstitution following HIV 1 primary infection. Clinical infectious diseases (Soumis).

**B. Bonnet**, K. Messaoudi, F. Jacomet, E. Michaud; P.O. Rouzaire, J.L. Fauquert, D. Caillaud, B. Evrard. An update on molecular cat allergens: Fel D 1 and What Else? Clinical and Translational Allergy (Soumis)

**B. Bonnet**, P.A. Vinot, B. Bellier. Cibles et immunothérapies innovantes dans le traitement de l'allergie alimentaire. Revue Française d'allergologie, 2017 (57) 327–336

T Vazquez, L Torrieri-Damard, F Pitoiset, B Levacher, J Vigneron, F Brimaud, **B Bonnet**, C Moog, D Klatzmann, B Bellier. Mucosal administration of particulate antigens improves TFH generation, HIV-specific high-quality and long-lasting immunity (In preparation).

**B. Bonnet**, J. Vigneron, B. Levacher, T. Vazquez, F. Pitoiset, F. Brimaud, D. Klatzmann, B. Bellier. Low-dose interleukin 2 induces regulatory T-cell mediated food allergy control in an experimental model. JED, 2016, Communication Affichée

**B. Bonnet**, J. Vigneron, B. Levacher, T. Vazquez, F. Pitoiset, F. Brimaud, D. Klatzmann, B. Bellier. Low-dose interleukin 2 induces regulatory T-cell mediated food allergy control in an experimental model. International Congress of Immunology, 2016, Communication orale

**B. Bonnet**, J. Vigneron, B. Levacher, T. Vazquez, F. Pitoiset, F. Brimaud, D. Klatzmann, B. Bellier. Low-dose interleukin 2 induces regulatory T-cell mediated food allergy control in an experimental model. Journée de recherche en allergologie, 2016, Communication orale

**B. Bonnet**, J. Vigneron, B. Levacher, T. Vazquez, F. Pitoiset, F. Brimaud, D. Klatzmann, B. Bellier. Low-dose interleukin 2 induces regulatory T-cell mediated food allergy control in an experimental model. J Immunol, 2016. 197:188-198

**B. Bonnet**, J. Vigneron, P A. Vinot, B. Levacher, T. Vazquez, F. Pitoiset , F. Brimaud , D. Klatzmann , B. Bellier. L'interleukine-2 faible dose : nouvelle biothérapie immunorégulatrice dans l'allergie alimentaire. 1ère Journée Scientifique des Internes en Pharmacie d'Ile-De-France, 2016, communication orale.

**B. Bonnet**, J. Vigneron, B. Levacher, T. Vazquez, F. Pitoiset, F. Brimaud, D. Klatzmann, B. Bellier. Low-dose interleukin 2 induces regulatory T-cell mediated food allergy control in an experimental model, European Academy of Allergy and Clinical Immunology congress, 2015, session orale modérée.

**B. Bonnet**, J. Vigneron, B. Levacher, T. Vazquez, F. Pitoiset, F. Brimaud, D. Klatzmann, B. Bellier. L'interleukine-2 faible dose induit un contrôle de l'allergie alimentaire médié par les lymphocytes T régulateurs dans un modèle murin d'allergie à l'Ovalbumine. Congrès de la société française d'allergologie, 2015, communication orale

**B. Bonnet**, S. Horowicz, S. Ginisty, P. Batel, P. Calier, P. Eftekhari. Effets indésirables chez les patients recevant du baclofène pour alcool-dépendance : étude descriptive des cas déclarés au Centre Régional de Pharmacovigilance de Paris Fernand Widal. Congrès de physiologie pharmacologie et thérapeutique, 2014 ; communication affichée

**B. Bonnet**, D. Galvez, J. Réveillé, P. Bourgain, D. Maramotti, H. Barreteau. Étude de coût-efficacité d'un emballage innovant en stérilisation: gaine plate ULTRA (Amcor). CEFH 2013 ; communication affichée

**B. Bonnet**, D. Galvez, P. Bourgain, D. Maramotti, H. Barreteau. Validation paramétrique des cycles de stérilisation : le logiciel de supervision est-il un outil infallible? CEFH 2013 ; communication affichée

**B. Bonnet**, J. Marcel, E. Bouscarrut, K. Briot, C. Roux, M. Dougados, E. Flipon. Etude INF'Os : Intérêt d'une consultation pharmaceutique dédiée aux patients souffrant d'Ostéopathies fragilisantes, Congrès de la société française de rhumatologie, 2012, communication affichée

J. Marcel, **B. Bonnet**, E. Bouscarrut, K. Briot, C. Roux, M. Dougados, E. Flipon. Étude INF'Os : évaluation de la satisfaction des patients souffrant d'ostéopathie fragilisante après une consultation pharmaceutique. Société française de rhumatologie 2012, communication affichée

Giraud J, **Bonnet B**, Bocquentin M, Barrail-Tran A, Taburet A-M. Prise en charge thérapeutique des patients infectés par le VIH: synthèse des recommandations du rapport Yeni. J Pharm Clin 2012;31(2):89–103.

**B. Bonnet**, J. Giraud, C. Barau, S. Grouazel, J. Metreau, AM. Taburet, C. Tiec. Prise en charge des enfants épileptiques sous régime cétogène : adaptation de la ration glucidique des traitements associés. Journée de l'internat 2011, communication affichée.

## Bibliographie

- Agace, William W. 2006. « Tissue-Tropic Effector T Cells: Generation and Targeting Opportunities ». *Nature Reviews. Immunology* 6 (9):682-92. <https://doi.org/10.1038/nri1869>.
- Ai, Chunqing, Qiuxiang Zhang, Junrong Ding, Gang Wang, Xiaoming Liu, Fengwei Tian, Jianxin Zhao, Hao Zhang, et Wei Chen. 2016. « Mucosal Delivery of Allergen Peptides Expressed by *Lactococcus Lactis* Inhibit Allergic Responses in a BALB/c Mouse Model ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (4):1915-24. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7187-8>.
- Ai, Chunqing, Qiuxiang Zhang, Chengcheng Ren, Gang Wang, Xiaoming Liu, Fengwei Tian, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Yong Q. Chen, et Wei Chen. 2014. « Genetically Engineered *Lactococcus lactis* Protect against House Dust Mite Allergy in a BALB/c Mouse Model ». *PLoS ONE* 9 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109461>.
- Akbari, Omid, Gordon J. Freeman, Everett H. Meyer, Edward A. Greenfield, Tammy T. Chang, Arlene H. Sharpe, Gerald Berry, Rosemarie H. DeKruyff, et Dale T. Umetsu. 2002. « Antigen-Specific Regulatory T Cells Develop via the ICOS-ICOS-Ligand Pathway and Inhibit Allergen-Induced Airway Hyperreactivity ». *Nature Medicine* 8 (9):1024-32. <https://doi.org/10.1038/nm745>.
- Akdis, C. A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wüthrich, et K. Blaser. 1998. « Role of Interleukin 10 in Specific Immunotherapy ». *The Journal of Clinical Investigation* 102 (1):98-106. <https://doi.org/10.1172/JCI2250>.
- Akdis, C. A., A. Joss, M. Akdis, A. Faith, et K. Blaser. 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 Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (12):1666-68. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0874fje>.
- Akdis, Cezmi A., et Mübeccel Akdis. 2011. « Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (1):18-27; quiz 28-29. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.030>.
- Akdis, Mübeccel, Johan Verhagen, Alison Taylor, Fariba Karamloo, Christian Karagiannidis, Reto Cramer, Sarah Thunberg, et al. 2004. « Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (11):1567-75. <https://doi.org/10.1084/jem.20032058>.
- Alexander, C., M. Tarzi, M. Larché, et A. B. Kay. 2005. « The Effect of Fel d 1-Derived T-Cell Peptides on Upper and Lower Airway Outcome Measurements in Cat-Allergic Subjects ». *Allergy* 60 (10):1269-74. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00885.x>.
- Alexander, C., S. Ying, A. B. Kay, et M. Larché. 2005. « Fel d 1-Derived T Cell Peptide Therapy Induces Recruitment of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup> Interferon-Gamma<sup>+</sup> T Helper Type 1 Cells to Sites of Allergen-Induced Late-Phase Skin Reactions in Cat-Allergic Subjects ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35 (1):52-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02143.x>.
- Allavena, P., L. Piemonti, D. Longoni, S. Bernasconi, A. Stoppacciaro, L. Ruco, et A. Mantovani. 1997. « IL-10 Prevents the Generation of Dendritic Cells from CD14<sup>+</sup> Blood Monocytes, Promotes the Differentiation to Mature Macrophages and Stimulates Endocytosis of FITC-Dextran ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 417:323-27.
- Allenbach, Yves, Wahiba Chaara, Michelle Rosenzweig, Adrien Six, Nicolas Prevel, Federico Mingozzi, Julia Wanschitz, et al. 2014. « Th1 Response and Systemic Treg Deficiency in Inclusion Body Myositis ». *PloS One* 9 (3):e88788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088788>.
- Allenbach, Yves, Sounkary Solly, Sylvie Grégoire, Odile Dubourg, Benoit Salomon, Gillian Butler-Browne, Lucile Musset, Serge Herson, David Klatzmann, et Olivier Benveniste. 2009. « Role of Regulatory T Cells in a New Mouse Model of Experimental Autoimmune Myositis ». *The American Journal of Pathology* 174 (3):989-98. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080422>.
- Alvarado-Sánchez, Brenda, Berenice Hernández-Castro, Diana Portales-Pérez, Lourdes Baranda, Esther Layseca-Espinosa, Carlos Abud-Mendoza, Ana C. Cubillas-Tejeda, et Roberto González-Amaro. 2006. « Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus ». *Journal of Autoimmunity* 27 (2):110-18. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2006.06.005>.
- Alves, Sandro, Guillaume Churlaud, Mickael Audrain, Kristin Michaelsen-Preusse, Romain Fol, Benoit Souchet, Jérôme Braudeau, Martin Korte, David Klatzmann, et Nathalie Cartier. 2016. « Interleukin-2 Improves Amyloid Pathology, Synaptic Failure and Memory in Alzheimer's Disease Mice ». *Brain: A Journal of Neurology*, décembre. <https://doi.org/10.1093/brain/aww330>.

- Amelsfort, Joesa M. R. van, Kim M. G. Jacobs, Johannes W. J. Bijlsma, Floris P. J. G. Lafeber, et Leonie S. Taams. 2004. « CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis: Differences in the Presence, Phenotype, and Function between Peripheral Blood and Synovial Fluid ». *Arthritis & Rheumatism* 50 (9):2775-85. <https://doi.org/10.1002/art.20499>.
- Anderson, Britt E., Jennifer M. McNiff, Catherine Matte, Ionna Athanasiadis, Warren D. Shlomchik, et Mark J. Shlomchik. 2004. « Recipient CD4+ T Cells That Survive Irradiation Regulate Chronic Graft-versus-Host Disease ». *Blood* 104 (5):1565-73. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0328>.
- Andrés, Clara de, Carol Aristimuño, Virginia de Las Heras, M. Luisa Martínez-Ginés, Manuel Bartolomé, Rafael Arroyo, Joaquín Navarro, Santiago Giménez-Roldán, Eduardo Fernández-Cruz, et Silvia Sánchez-Ramón. 2007. « Interferon Beta-1a Therapy Enhances CD4+ Regulatory T-Cell Function: An Ex Vivo and in Vitro Longitudinal Study in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 182 (1-2):204-11. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.09.012>.
- Apostolou, Irina, Adelaida Sarukhan, Ludger Klein, et Harald von Boehmer. 2002. « Origin of Regulatory T Cells with Known Specificity for Antigen ». *Nature Immunology* 3 (8):756-63. <https://doi.org/10.1038/ni816>.
- Arbuckle, Melissa R., Micah T. McClain, Mark V. Rubertone, R. Hal Scofield, Gregory J. Dennis, Judith A. James, et John B. Harley. 2003. « Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus ». *The New England Journal of Medicine* 349 (16):1526-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021933>.
- Arock, M., C. Zuany-Amorim, M. Singer, M. Benhamou, et M. Pretolani. 1996. « Interleukin-10 Inhibits Cytokine Generation from Mast Cells ». *European Journal of Immunology* 26 (1):166-70. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260126>.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, et S. Sakaguchi. 1996. « Autoimmune Disease as a Consequence of Developmental Abnormality of a T Cell Subpopulation ». *The Journal of Experimental Medicine* 184 (2):387-96.
- Aschenbrenner, Katharina, Louise M. D'Cruz, Elisabeth H. Vollmann, Maria Hinterberger, Jan Emmerich, Lee Kim Swee, Antonius Rolink, et Ludger Klein. 2007. « Selection of Foxp3+ Regulatory T Cells Specific for Self Antigen Expressed and Presented by Aire+ Medullary Thymic Epithelial Cells ». *Nature Immunology* 8 (4):351-58. <https://doi.org/10.1038/ni1444>.
- Asigbetse, K. E., P. A. Eigenmann, et C. P. Frossard. 2010. « Intestinal Lamina Propria TcRgamma delta+ Lymphocytes Selectively Express IL-10 and IL-17 ». *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 20 (5):391-401.
- Aslam, Aamir, Hsien Chan, David A. Warrell, Siraj Misbah, et Graham S. Ogg. 2010. « Tracking Antigen-Specific T-Cells during Clinical Tolerance Induction in Humans ». *PloS One* 5 (6):e11028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011028>.
- Assa'ad, Amal H., Sandeep K. Gupta, Margaret H. Collins, Mike Thomson, Amy T. Heath, Deborah A. Smith, Teresa L. Perschy, Cynthia H. Jurgensen, Hector G. Ortega, et Seema S. Aceves. 2011. « An Antibody against IL-5 Reduces Numbers of Esophageal Intraepithelial Eosinophils in Children with Eosinophilic Esophagitis ». *Gastroenterology* 141 (5):1593-1604. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.044>.
- Astier, Anne L., et David A. Hafler. 2007. « Abnormal Tr1 Differentiation in Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 191 (1-2):70-78. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.09.018>.
- Atarashi, Koji, Takeshi Tanoue, Tatsuichiro Shima, Akemi Imaoka, Tomomi Kuwahara, Yoshika Momose, Genhong Cheng, et al. 2011. « Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species ». *Science* 331 (6015):337-41. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>.
- Awasthi, Amit, Yijun Carrier, Jean P. S. Peron, Estelle Bettelli, Masahito Kamanaka, Richard A. Flavell, Vijay K. Kuchroo, Mohamed Oukka, et Howard L. Weiner. 2007. « A Dominant Function for Interleukin 27 in Generating Interleukin 10-Producing Anti-Inflammatory T Cells ». *Nature Immunology* 8 (12):1380-89. <https://doi.org/10.1038/ni1541>.
- Ayyoub, Maha, Florence Deknuydt, Isabelle Raimbaud, Christelle Dousset, Lucie Leveque, Gilles Bioley, et Danila Valmori. 2009. « Human Memory FOXP3+ Tregs Secrete IL-17 Ex Vivo and Constitutively Express the T(H)17 Lineage-Specific Transcription Factor RORgamma T ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (21):8635-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900621106>.
- Bagavant, Harini, et Kenneth S. K. Tung. 2005. « Failure of CD25+ T Cells from Lupus-Prone Mice to Suppress Lupus Glomerulonephritis and Sialoadenitis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (2):944-50.

- Bakdash, G., L. T. C. Vogelpoel, T. M. M. van Capel, M. L. Kapsenberg, et E. C. de Jong. 2015. « Retinoic Acid Primes Human Dendritic Cells to Induce Gut-Homing, IL-10-Producing Regulatory T Cells ». *Mucosal Immunology* 8 (2):265-78. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.64>.
- Banham, Alison H., Fiona M. Powrie, et Elisabeth Suri-Payer. 2006. « FOXP3+ Regulatory T Cells: Current Controversies and Future Perspectives ». *European Journal of Immunology* 36 (11):2832-36. <https://doi.org/10.1002/eji.200636459>.
- Barnes, M J, T Griseri, A M F Johnson, W Young, F Powrie, et A Izcue. 2013. « CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria ». *Mucosal Immunology* 6 (2):324-34. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.75>.
- Barra, Melanie M., David M. Richards, Ann-Cathrin Hofer, Michael Delacher, et Markus Feuerer. 2015. « Premature Expression of Foxp3 in Double-Negative Thymocytes ». *PloS One* 10 (5):e0127038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127038>.
- Barron, Luke, Hans Doms, Katrina K. Hoyer, Wilson Kuswanto, Jerry Hofmann, William E. O’Gorman, et Abul K. Abbas. 2010. « Cutting Edge: Mechanisms of IL-2-Dependent Maintenance of Functional Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (11):6426-30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903940>.
- Barzaghi, Federica, Laura Passerini, et Rosa Bacchetta. 2012. « Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: A Paradigm of Immunodeficiency with Autoimmunity ». *Frontiers in Immunology* 3 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00211>.
- Basomba, Antonio, Ana I. Tabar, Dolores Hernández F. de Rojas, Blanca E. García, Remedios Alamar, José M. Olaguibel, Jaime Moscoso del Prado, Santiago Martín, et Pilar Rico. 2002. « Allergen Vaccination with a Liposome-Encapsulated Extract of *Dermatophagoides Pteronyssinus*: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Asthmatic Patients ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109 (6):943-48. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.124465>.
- Battaglia, Manuela, Carmen Gianfrani, Silvia Gregori, et Maria-Grazia Roncarolo. 2004. « IL-10-Producing T Regulatory Type 1 Cells and Oral Tolerance ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029 (décembre):142-53. <https://doi.org/10.1196/annals.1309.031>.
- Bauchau, V., et S. R. Durham. 2005. « Epidemiological Characterization of the Intermittent and Persistent Types of Allergic Rhinitis ». *Allergy* 60 (3):350-53. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00751.x>.
- Beck, Lisa A., Diamant Thaçi, Jennifer D. Hamilton, Neil M. Graham, Thomas Bieber, Ross Rocklin, Jeffrey E. Ming, et al. 2014. « Dupilumab Treatment in Adults with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis ». *New England Journal of Medicine* 371 (2):130-39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314768>.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, et H. D. Ochs. 2001. « The Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome (IPEX) Is Caused by Mutations of FOXP3 ». *Nature Genetics* 27 (1):20-21. <https://doi.org/10.1038/83713>.
- Benson, Micah J., Karina Pino-Lagos, Mario Roseblatt, et Randolph J. Noelle. 2007. « All-Trans Retinoic Acid Mediates Enhanced T Reg Cell Growth, Differentiation, and Gut Homing in the Face of High Levels of Co-Stimulation ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (8):1765-74. <https://doi.org/10.1084/jem.20070719>.
- Bilate, Angelina M., et Juan J. Lafaille. 2012. « Induced CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Immune Tolerance ». *Annual Review of Immunology* 30 (1):733-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075043>.
- Biton, Jérôme, Luca Semerano, Laure Delavallée, Delphine Lemeiter, Marion Laborie, Géraldine Grouard-Vogel, Marie-Christophe Boissier, et Natacha Bessis. 2011. « Interplay between TNF and Regulatory T Cells in a TNF-Driven Murine Model of Arthritis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (7):3899-3910. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003372>.
- Blat, Dan, Ehud Zigmond, Zoya Alteber, Tova Waks, et Zelig Eshhar. 2014. « Suppression of Murine Colitis and Its Associated Cancer by Carcinoembryonic Antigen-Specific Regulatory T Cells ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (5):1018-28. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.41>.
- Bluestone, Jeffrey A., Jane H. Buckner, Mark Fitch, Stephen E. Gitelman, Shipra Gupta, Marc K. Hellerstein, Kevan C. Herold, et al. 2015. « Type 1 Diabetes Immunotherapy Using Polyclonal Regulatory T Cells ». *Science Translational Medicine* 7 (315):315ra189. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad4134>.
- Bluestone, Jeffrey A., Eleonora Trotta, et Daqi Xu. 2015. « The Therapeutic Potential of Regulatory T Cells for the Treatment of Autoimmune Disease ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 19 (8):1091-1103. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1037282>.



- Bogunovic, Milena, Florent Ginhoux, Julie Helft, Limin Shang, Daigo Hashimoto, Melanie Greter, Kang Liu, et al. 2009. « Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network ». *Immunity* 31 (3):513-25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.010>.
- Bohm, L., J. Maxeiner, H. Meyer-Martin, S. Reuter, S. Finotto, M. Klein, H. Schild, E. Schmitt, T. Bopp, et C. Taube. 2015. « IL-10 and Regulatory T Cells Cooperate in Allergen-Specific Immunotherapy To Ameliorate Allergic Asthma ». *The Journal of Immunology* 194 (3):887-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401612>.
- Bonelli, Michael, Anastasia Savitskaya, Karolina von Dalwigk, Carl Walter Steiner, Daniel Aletaha, Josef S. Smolen, et Clemens Scheinecker. 2008. « Quantitative and Qualitative Deficiencies of Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) ». *International Immunology* 20 (7):861-68. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn044>.
- Boyer, Olivier, David Saadoun, Julien Abriol, Mélanie Dodille, Jean-Charles Piette, Patrice Cacoub, et David Klatzmann. 2004. « CD4+CD25+ Regulatory T-Cell Deficiency in Patients with Hepatitis C-Mixed Cryoglobulinemia Vasculitis ». *Blood* 103 (9):3428-30. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2598>.
- Boyman, O., C. Krieg, S. Letourneau, K. Webster, C. D. Surh, et J. Sprent. 2012. « Selectively Expanding Subsets of T Cells in Mice by Injection of Interleukin-2/Antibody Complexes: Implications for Transplantation Tolerance ». *Transplantation Proceedings* 44 (4):1032-34. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.01.093>.
- Boyman, Onur, Marek Kovar, Mark P. Rubinstein, Charles D. Surh, et Jonathan Sprent. 2006. « Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes ». *Science (New York, N.Y.)* 311 (5769):1924-27. <https://doi.org/10.1126/science.1122927>.
- Boyman, Onur, Charles D. Surh, et Jonathan Sprent. 2006. « Potential Use of IL-2/Anti-IL-2 Antibody Immune Complexes for the Treatment of Cancer and Autoimmune Disease ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 6 (12):1323-31. <https://doi.org/10.1517/14712598.6.12.1323>.
- Brandenburg, Susan, Takeshi Takahashi, Maurus de la Rosa, Marko Janke, Gabriele Karsten, Till Muzzulini, Zane Orinska, Silvia Bulfone-Paus, et Alexander Scheffold. 2008. « IL-2 Induces in Vivo Suppression by CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells ». *European Journal of Immunology* 38 (6):1643-53. <https://doi.org/10.1002/eji.200737791>.
- Branum, Amy M., et Susan L. Lukacs. 2009. « Food Allergy among Children in the United States ». *Pediatrics* 124 (6):1549-55. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-1210>.
- Braza, F., J. Chesne, M. Durand, S. Dirou, C. Brosseau, G. Mahay, M. A. Cheminant, A. Magnan, et S. Brouard. 2015. « A Regulatory CD9(+) B-Cell Subset Inhibits HDM-Induced Allergic Airway Inflammation ». *Allergy* 70 (11):1421-31. <https://doi.org/10.1111/all.12697>.
- Brockmann, Leonie, Nicola Gagliani, Babett Steglich, Anastasios D. Giannou, Jan Kempfski, Penelope Pelczar, Maria Geffken, et al. 2017. « IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 198 (3):1130-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601045>.
- Brough, Helen A., Angela Simpson, Kerry Makinson, Jenny Hankinson, Sara Brown, Abdel Douiri, Danielle C. M. Belgrave, et al. 2014. « Peanut Allergy: Effect of Environmental Peanut Exposure in Children with Filaggrin Loss-of-Function Mutations ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134 (4):867-875.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.011>.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepers, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, et F. Ramsdell. 2001. « Disruption of a New Forkhead/Winged-Helix Protein, Scurfin, Results in the Fatal Lymphoproliferative Disorder of the Scurfy Mouse ». *Nature Genetics* 27 (1):68-73. <https://doi.org/10.1038/83784>.
- Brunstein, Claudio G., Jeffrey S. Miller, Qing Cao, David H. McKenna, Keli L. Hippen, Julie Curtsinger, Todd Defor, et al. 2011. « Infusion of Ex Vivo Expanded T Regulatory Cells in Adults Transplanted with Umbilical Cord Blood: Safety Profile and Detection Kinetics ». *Blood* 117 (3):1061-70. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-293795>.
- Brusko, Todd M., Clive H. Wasserfall, Michael J. Clare-Salzler, Desmond A. Schatz, et Mark A. Atkinson. 2005. « Functional Defects and the Influence of Age on the Frequency of CD4+ CD25+ T-Cells in Type 1 Diabetes ». *Diabetes* 54 (5):1407-14.
- Burchill, Matthew A., Jianying Yang, Christine Vogtenhuber, Bruce R. Blazar, et Michael A. Farrar. 2007. « IL-2 Receptor Beta-Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3+ Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (1):280-90.
- Burks, A. Wesley, Stacie M. Jones, Robert A. Wood, David M. Fleischer, Scott H. Sicherer, Robert W. Lindblad, Donald Stablein, et al. 2012. « Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in

- Children ». *The New England Journal of Medicine* 367 (3):233-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200435>.
- Burt, Richard K., Ann Traynor, Laisvyde Statkute, Walter G. Barr, Robert Rosa, James Schroeder, Larissa Verda, et al. 2006. « Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Systemic Lupus Erythematosus ». *JAMA* 295 (5):527-35. <https://doi.org/10.1001/jama.295.5.527>.
- Burton, Oliver T., Magali Noval Rivas, Joseph S. Zhou, Stephanie L. Logsdon, Alanna R. Darling, Kyle J. Koleoglou, Axel Roers, et al. 2014. « Immunoglobulin E Signal Inhibition during Allergen Ingestion Leads to Reversal of Established Food Allergy and Induction of Regulatory T Cells ». *Immunity* 41 (1):141-51. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.017>.
- Busse, Mandy, Mathias Krech, Almut Meyer-Bahlburg, Christian Hennig, et Gesine Hansen. 2012. « ICOS Mediates the Generation and Function of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Conveying Respiratory Tolerance ». *The Journal of Immunology* 189 (4):1975-82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103581>.
- Cahenzli, Julia, Yasmin Köller, Madeleine Wyss, Markus B. Geuking, et Kathy D. McCoy. 2013. « Intestinal Microbial Diversity during Early-Life Colonization Shapes Long-Term IgE Levels ». *Cell Host & Microbe* 14 (5):559-70. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.004>.
- Caminiti, Lucia, Giovanni B. Pajno, Giuseppe Crisafulli, Fernanda Chiera, Mirella Collura, Girolamo Panasci, Paolo Ruggeri, Francesco Guglielmo, et Giovanni Passalacqua. 2015. « Oral Immunotherapy for Egg Allergy: A Double-Blind Placebo-Controlled Study, with Postdesensitization Follow-Up ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice* 3 (4):532-39. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.01.017>.
- Cao, Xuefang, Sheng F. Cai, Todd A. Fehniger, Jiling Song, Lynne I. Collins, David R. Piwnica-Worms, et Timothy J. Ley. 2007. « Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance ». *Immunity* 27 (4):635-46. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.014>.
- Caramalho, Íris, Helena Nunes-Cabaço, Russell B. Foxall, et Ana E. Sousa. 2015. « Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus ». *Frontiers in Immunology* 6:395. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00395>.
- Caramalho, Iris, Vânia Nunes-Silva, Ana R. Pires, Catarina Mota, Ana I. Pinto, Helena Nunes-Cabaço, Russell B. Foxall, et Ana E. Sousa. 2015. « Human Regulatory T-Cell Development Is Dictated by Interleukin-2 and -15 Expressed in a Non-Overlapping Pattern in the Thymus ». *Journal of Autoimmunity* 56 (janvier):98-110. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.11.002>.
- Carranza, Franco, Cristian Roberto Falcón, Nicolás Nuñez, Carolina Knubel, Silvia Graciela Correa, Ismael Bianco, Mariana Maccioni, et al. 2012. « Helminth Antigens Enable CpG-Activated Dendritic Cells to Inhibit the Symptoms of Collagen-Induced Arthritis through Foxp3+ Regulatory T Cells ». *PloS One* 7 (7):e40356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040356>.
- Carrier, Yijun, Jing Yuan, Vijay K. Kuchroo, et Howard L. Weiner. 2007. « Th3 Cells in Peripheral Tolerance. I. Induction of Foxp3-Positive Regulatory T Cells by Th3 Cells Derived from TGF- $\beta$  T Cell-Transgenic Mice ». *The Journal of Immunology* 178 (1):179-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.179>.
- Castela, Emeline, Florence Le Duff, Catherine Butori, Michel Tichioni, Paul Hofman, Philippe Bahadoran, Jean-Philippe Lacour, et Thierry Passeron. 2014. « Effects of Low-Dose Recombinant Interleukin 2 to Promote T-Regulatory Cells in Alopecia Areata ». *JAMA Dermatology* 150 (7):748-51. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.504>.
- Caudy, Amy A., Sreelatha T. Reddy, Talal Chatila, John P. Atkinson, et James W. Verbsky. 2007. « CD25 Deficiency Causes an Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked-like Syndrome, and Defective IL-10 Expression from CD4 Lymphocytes ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (2):482-87. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.10.007>.
- Cazac, B. B., et J. Roes. 2000. « TGF-Beta Receptor Controls B Cell Responsiveness and Induction of IgA in Vivo ». *Immunity* 13 (4):443-51.
- Chang, Hua-Chen, Sarita Sehra, Ritobrata Goswami, Weiguo Yao, Qing Yu, Gretta L. Stritesky, Rukhsana Jabeen, et al. 2010. « The Transcription Factor PU.1 Is Required for the Development of IL-9-Producing T Cells and Allergic Inflammation ». *Nature Immunology* 11 (6):527-34. <https://doi.org/10.1038/ni.1867>.
- Chatila, T. A., F. Blaeser, N. Ho, H. M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, et A. M. Bowcock. 2000. « JM2, Encoding a Fork Head-Related Protein, Is Mutated in X-Linked Autoimmunity-Allergic Disregulation Syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 106 (12):R75-81. <https://doi.org/10.1172/JCI11679>.
- Chatila, Talal A., Ning Li, Maria Garcia-Lloret, Hyon-Jeen Kim, et Andre E. Nel. 2008. « T-Cell Effector Pathways in Allergic Diseases: Transcriptional Mechanisms and Therapeutic Targets ». *The Journal of*

- Allergy and Clinical Immunology* 121 (4):812-823; quiz 824-825. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.025>.
- Chaudhry, Ashutosh, Dipayan Rudra, Piper Treuting, Robert M. Samstein, Yuqiong Liang, Arnold Kas, et Alexander Y. Rudensky. 2009. « CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells Control T<sub>H</sub>17 Responses in a Stat3-Dependent Manner ». *Science* 326 (5955):986-91. <https://doi.org/10.1126/science.1172702>.
- Chaudhry, Ashutosh, Robert M. Samstein, Piper Treuting, Yuqiong Liang, Marina C. Pils, Jan-Michael Heinrich, Robert S. Jack, et al. 2011. « Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation ». *Immunity* 34 (4):566-78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>.
- Chavele, Konstantia-Maria, Deepa Shukla, Tracey Ketepe-Arachi, Judith Anna Seidel, Dietmar Fuchs, Charles D. Pusey, et Alan D. Salama. 2010. « Regulation of Myeloperoxidase-Specific T Cell Responses during Disease Remission in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis: The Role of Treg Cells and Tryptophan Degradation ». *Arthritis and Rheumatism* 62 (5):1539-48. <https://doi.org/10.1002/art.27403>.
- Chehade, Mirna, et Lloyd Mayer. 2005. « Oral Tolerance and Its Relation to Food Hypersensitivities ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115 (1):3-12; quiz 13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.11.008>.
- Chen, Chun-Yu, Jee-Boong Lee, Bo Liu, Shoichiro Ohta, Pin-Yi Wang, Andrey V. Kartashov, Luke Mugge, et al. 2015. « Induction of Interleukin-9-Producing Mucosal Mast Cells Promotes Susceptibility to IgE-Mediated Experimental Food Allergy ». *Immunity* 43 (4):788-802. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.020>.
- Chen, WanJun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-Jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, et Sharon M. Wahl. 2003. « Conversion of Peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Naive T Cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3 ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (12):1875-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>.
- Chen, Xin, Xueqiang Wu, Qiong Zhou, O. M. Zack Howard, Mihai G. Netea, et Joost J. Oppenheim. 2013. « TNFR2 Is Critical for the Stabilization of the CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T. Cell Phenotype in the Inflammatory Environment ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (3):1076-84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202659>.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, et H. L. Weiner. 1994. « Regulatory T Cell Clones Induced by Oral Tolerance: Suppression of Autoimmune Encephalomyelitis ». *Science (New York, N.Y.)* 265 (5176):1237-40.
- Chen, Zhibin, Ann E. Herman, Michael Matos, Diane Mathis, et Christophe Benoist. 2005. « Where CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Reg Cells Impinge on Autoimmune Diabetes ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (10):1387-97. <https://doi.org/10.1084/jem.20051409>.
- Chiang, David, et M. Cecilia Berin. 2015. « An Examination of Clinical and Immunologic Outcomes in Food Allergen Immunotherapy by Route of Administration ». *Current Allergy and Asthma Reports* 15 (6). <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0536-y>.
- Christodoulou, Maria I., Efstathia K. Kapsogeorgou, Niki M. Moutsopoulos, et Haralampos M. Moutsopoulos. 2008. « Foxp3<sup>+</sup> T-Regulatory Cells in Sjogren's Syndrome: Correlation with the Grade of the Autoimmune Lesion and Certain Adverse Prognostic Factors ». *The American Journal of Pathology* 173 (5):1389-96. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080246>.
- Chu, Derek K., Alba Llop-Guevara, Tina D. Walker, Kristin Flader, Susanna Goncharova, Jeanette E. Boudreau, Cheryl Lynn Moore, et al. 2013. « IL-33, but Not Thymic Stromal Lymphopoietin or IL-25, Is Central to Mite and Peanut Allergic Sensitization ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (1):187-200.e1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.08.002>.
- Churlaud, Guillaume, Veronica Jimenez, Jesus Ruberte, Martin Amadoudji Zin, Gwladys Fourcade, Gaëlle Gottrand, Estefania Casana, et al. 2014. « Sustained Stimulation and Expansion of Tregs by IL2 Control Autoimmunity without Impairing Immune Responses to Infection, Vaccination and Cancer ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 151 (2):114-26. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.02.003>.
- Ciprandi, Giorgio, Maria Pia Sormani, Gilberto Filaci, et Daniela Fenoglio. 2008. « Carry-over Effect on IFN- $\gamma$  Production Induced by Allergen-Specific Immunotherapy ». *International Immunopharmacology* 8 (12):1622-25. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.07.007>.
- Cohen, José L., Aurélie Trenado, Douglas Vasey, David Klatzmann, et Benoît L. Salomon. 2002. « CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells: New Therapeutics for Graft-versus-Host Disease ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (3):401-6.
- Collison, Lauren W., Creg J. Workman, Timothy T. Kuo, Kelli Boyd, Yao Wang, Kate M. Vignali, Richard Cross, David Sehy, Richard S. Blumberg, et Dario A. A. Vignali. 2007. « The Inhibitory Cytokine IL-

- 35 Contributes to Regulatory T-Cell Function ». *Nature* 450 (7169):566-69. <https://doi.org/10.1038/nature06306>.
- Cortes-Perez, N. G., D. Lozano-Ojalvo, M. A. Maiga, S. Hazebrouck, et K. Adel-Patient. 2017. « Intra-gastric Administration of Lactobacillus Casei BL23 Induces Regulatory FoxP3+RORγt+ T Cells Subset in Mice ». *Beneficial Microbes* 8 (3):433-38. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0174>.
- Cottrez, F., S. D. Hurst, R. L. Coffman, et H. Groux. 2000. « T Regulatory Cells 1 Inhibit a Th2-Specific Response in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (9):4848-53.
- Cottrez, Françoise, et Hervé Groux. 2004. « Specialization in Tolerance: Innate CD(4+)CD(25+) versus Acquired TR1 and TH3 Regulatory T Cells ». *Transplantation* 77 (1 Suppl):S12-15. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000106471.23410.32>.
- Creticos, Peter S., John T. Schroeder, Robert G. Hamilton, Susan L. Balcer-Whaley, Arouna P. Khattignavong, Robert Lindblad, Henry Li, et al. 2006. « Immunotherapy with a Ragweed-Toll-Like Receptor 9 Agonist Vaccine for Allergic Rhinitis ». *New England Journal of Medicine* 355 (14):1445-55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052916>.
- Crispin, Jose C., Araceli Martínez, et Jorge Alcocer-Varela. 2003. « Quantification of Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus ». *Journal of Autoimmunity* 21 (3):273-76.
- Curotto de Lafaille, Maria A., Nino Kutchukhidze, Shiqian Shen, Yi Ding, Herman Yee, et Juan J. Lafaille. 2008. « Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation ». *Immunity* 29 (1):114-26. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.010>.
- D'Alessio, Franco R., Kenji Tsushima, Neil R. Aggarwal, Erin E. West, Matthew H. Willett, Martin F. Britos, Matthew R. Pipeling, et al. 2009. « CD4+CD25+Foxp3+ Tregs Resolve Experimental Lung Injury in Mice and Are Present in Humans with Acute Lung Injury ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (10):2898-2913. <https://doi.org/10.1172/JCI36498>.
- Daniel, Volker, Haihao Wang, Mahmoud Sadeghi, et Gerhard Opelz. 2014. « Interferon-Gamma Producing Regulatory T Cells as a Diagnostic and Therapeutic Tool in Organ Transplantation ». *International Reviews of Immunology* 33 (3):195-211. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.845181>.
- Dansokho, Cira, Dylla Ait Ahmed, Saba Aid, Cécile Toly-Ndour, Thomas Chaigneau, Vanessa Calle, Nicolas Cagnard, et al. 2016. « Regulatory T Cells Delay Disease Progression in Alzheimer-like Pathology ». *Brain: A Journal of Neurology* 139 (Pt 4):1237-51. <https://doi.org/10.1093/brain/awv408>.
- Davies, J. D., E. O'Connor, D. Hall, T. Krahl, J. Trotter, et N. Sarvetnick. 1999. « CD4+ CD45RB Low-Density Cells from Untreated Mice Prevent Acute Allograft Rejection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (10):5353-57.
- Deaglio, Silvia, Karen M. Dwyer, Wenda Gao, David Friedman, Anny Usheva, Anna Erat, Jiang-Fan Chen, et al. 2007. « Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (6):1257-65. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>.
- Delmas, M.-C., et C. Fuhrman. 2010. « L'asthme en France : synthèse des données épidémiologiques descriptives ». *Revue des Maladies Respiratoires* 27 (2):151-59. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2009.09.001>.
- Demoly, Pascal. 2007. « Les allergies médicamenteuses ». *Médecine thérapeutique / Pédiatrie* 10 (1):34-43. <https://doi.org/10.1684/mtp.2006.0042>.
- Denning, Timothy L., Yi-chong Wang, Seema R. Patel, Ifor R. Williams, et Bali Pulendran. 2007. « Lamina Propria Macrophages and Dendritic Cells Differentially Induce Regulatory and Interleukin 17-Producing T Cell Responses ». *Nature Immunology* 8 (10):1086-94. <https://doi.org/10.1038/ni1511>.
- Derbinski, Jens, Jana Gäbler, Benedikt Brors, Sascha Tierling, Sunitha Jonnakuty, Manfred Hergenbahn, Leena Peltonen, Jörn Walter, et Bruno Kyewski. 2005. « Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells Is Regulated at Multiple Levels ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (1):33-45. <https://doi.org/10.1084/jem.20050471>.
- Desreumaux, Pierre, Arnaud Foussat, Matthieu Allez, Laurent Beaugerie, Xavier Hébuterne, Yoram Bouhnik, Maria Nachury, et al. 2012. « Safety and Efficacy of Antigen-Specific Regulatory T-Cell Therapy for Patients with Refractory Crohn's Disease ». *Gastroenterology* 143 (5):1207-1217.e1-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.116>.
- Di Ianni, Mauro, Franca Falzetti, Alessandra Carotti, Adelmo Terenzi, Flora Castellino, Elisabetta Bonifacio, Beatrice Del Papa, et al. 2011. « Tregs Prevent GVHD and Promote Immune Reconstitution in HLA-Haploidentical Transplantation ». *Blood* 117 (14):3921-28. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-311894>.
- Diamanti, A., S. Pedicelli, P. D'Argenio, F. Panetta, A. Alterio, et G. Torre. 2011. « Iatrogenic Kwashiorkor in Three Infants on a Diet of Rice Beverages ». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of*

- the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 22 (8):878-79. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01180.x>.
- Dietrich, Thore, Thomas Hucko, Christiane Schneemann, Marleen Neumann, Andreas Menrad, Joerg Willuda, Kirstin Atrott, et al. 2012. « Local Delivery of IL-2 Reduces Atherosclerosis via Expansion of Regulatory T Cells ». *Atherosclerosis* 220 (2):329-36. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.050>.
- Dinh, Tam Nguyen, Tin Soe Kyaw, Peter Kanellakis, Kelly To, Peter Tipping, Ban-Hock Toh, Alexander Bobik, et Alex Agrotis. 2012. « Cytokine Therapy with Interleukin-2/Anti-Interleukin-2 Monoclonal Antibody Complexes Expands CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells and Attenuates Development and Progression of Atherosclerosis ». *Circulation* 126 (10):1256-66. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.099044>.
- Dioszeghy, V., L. Mondoulet, V. Dhelft, M. Ligouis, E. Puteaux, C. Dupont, et P.-H. Benhamou. 2014. « The Regulatory T Cells Induction by Epicutaneous Immunotherapy Is Sustained and Mediates Long-Term Protection from Eosinophilic Disorders in Peanut-Sensitized Mice ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44 (6):867-81. <https://doi.org/10.1111/cea.12312>.
- Dioszeghy, Vincent, Lucie Mondoulet, Véronique Dhelft, Mélanie Ligouis, Emilie Puteaux, Pierre-Henri Benhamou, et Christophe Dupont. 2011. « Epicutaneous Immunotherapy Results in Rapid Allergen Uptake by Dendritic Cells through Intact Skin and Downregulates the Allergen-Specific Response in Sensitized Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (10):5629-37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003134>.
- DiPaolo, Richard J., Carine Brinster, Todd S. Davidson, John Andersson, Deborah Glass, et Ethan M. Shevach. 2007. « Autoantigen-Specific TGFbeta-Induced Foxp3+ Regulatory T Cells Prevent Autoimmunity by Inhibiting Dendritic Cells from Activating Autoreactive T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (7):4685-93.
- Dombrowski, Yvonne, Thomas O'Hagan, Marie Dittmer, Rosana Penalva, Sonia R. Mayoral, Peter Bankhead, Samara Fleville, et al. 2017. « Regulatory T Cells Promote Myelin Regeneration in the Central Nervous System ». *Nature Neuroscience* 20 (5):674-80. <https://doi.org/10.1038/nn.4528>.
- Dupont, Christophe, Nicolas Kalach, Pascale Soulaïnes, Sandrine Legoué-Morillon, Hughes Piloquet, et Pierre-Henri Benhamou. 2010. « Cow's Milk Epicutaneous Immunotherapy in Children: A Pilot Trial of Safety, Acceptability, and Impact on Allergic Reactivity ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (5):1165-67. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.02.029>.
- Edwards, I. R., et J. K. Aronson. 2000. « Adverse Drug Reactions: Definitions, Diagnosis, and Management ». *Lancet (London, England)* 356 (9237):1255-59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02799-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02799-9).
- Ehrenstein, Michael R., Jamie G. Evans, Animesh Singh, Samantha Moore, Gary Warnes, David A. Isenberg, et Claudia Mauri. 2004. « Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNFalpha Therapy ». *The Journal of Experimental Medicine* 200 (3):277-85. <https://doi.org/10.1084/jem.20040165>.
- Ercan, Hulya, Ahmet Ozen, Hande Karatepe, Mustafa Berber, et Reha Cengizlier. 2012. « Primary School Teachers' Knowledge about and Attitudes toward Anaphylaxis ». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 23 (5):428-32. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2012.01307.x>.
- Ermann, Joerg, Petra Hoffmann, Matthias Edinger, Suparna Dutt, Francis G. Blankenberg, John P. Higgins, Robert S. Negrin, C. Garrison Fathman, et Samuel Strober. 2005. « Only the CD62L+ Subpopulation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells Protects from Lethal Acute GVHD ». *Blood* 105 (5):2220-26. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2044>.
- Evans, Jamie G., Karina A. Chavez-Rueda, Ayad Eddaoudi, Almut Meyer-Bahlburg, David J. Rawlings, Michael R. Ehrenstein, et Claudia Mauri. 2007. « Novel Suppressive Function of Transitional 2 B Cells in Experimental Arthritis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (12):7868-78.
- Feng, Ting, Anthony T. Cao, Casey T. Weaver, Charles O. Elson, et Yingzi Cong. 2011. « Interleukin-12 Converts Foxp3+ Regulatory T Cells to Interferon-gamma-Producing Foxp3+ T Cells That Inhibit Colitis ». *Gastroenterology* 140 (7):2031-43. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.009>.
- Feng, Yongqiang, Aaron Arvey, Takatoshi Chinen, Joris van der Veen, Georg Gasteiger, et Alexander Y. Rudensky. 2014. « Control of the Inheritance of Regulatory T Cell Identity by a Cis Element in the Foxp3 Locus ». *Cell* 158 (4):749-63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.031>.
- Feuerer, Markus, Yuele Shen, Dan R. Littman, Christophe Benoist, et Diane Mathis. 2009. « How Punctual Ablation of Regulatory T Cells Unleashes an Autoimmune Lesion within the Pancreatic Islets ». *Immunity* 31 (4):654-64. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.023>.

- Fisson, Sylvain, Guillaume Darrasse-Jèze, Elena Litvinova, Franck Septier, David Klatzmann, Roland Liblau, et Benoît L. Salomon. 2003. « Continuous Activation of Autoreactive CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in the Steady State ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (5):737-46. <https://doi.org/10.1084/jem.20030686>.
- Flammarion, Sophie, Clarisse Santos, Dominique Guimber, Lyne Jouannic, Caroline Thumerelle, Frédéric Gottrand, et Antoine Deschildre. 2011. « Diet and Nutritional Status of Children with Food Allergies ». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 22 (2):161-65. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01028.x>.
- Fleischer, David M., A. Wesley Burks, Brian P. Vickery, Amy M. Scurlock, Robert A. Wood, Stacie M. Jones, Scott H. Sicherer, et al. 2013. « Sublingual Immunotherapy for Peanut Allergy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Multicenter Trial ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (1):119-127.e1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.011>.
- Fontenot, Jason D., Marc A. Gavin, et Alexander Y. Rudensky. 2003. « Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells ». *Nature Immunology* 4 (4):330-36. <https://doi.org/10.1038/ni904>.
- Fontenot, Jason D., Jeffrey P. Rasmussen, Marc A. Gavin, et Alexander Y. Rudensky. 2005. « A Function for Interleukin 2 in Foxp3-Expressing Regulatory T Cells ». *Nature Immunology* 6 (11):1142-51. <https://doi.org/10.1038/ni1263>.
- Forbes, Elizabeth E., Katherine Groschwitz, J. Pablo Abonia, Eric B. Brandt, Elizabeth Cohen, Carine Blanchard, Richard Ahrens, et al. 2008. « IL-9- and Mast Cell-Mediated Intestinal Permeability Predisposes to Oral Antigen Hypersensitivity ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (4):897-913. <https://doi.org/10.1084/jem.20071046>.
- Foussat, Arnaud, Françoise Cottrez, Valérie Brun, Nathalie Fournier, Jean-Philippe Breitmayer, et Hervé Groux. 2003. « A Comparative Study between T Regulatory Type 1 and CD4+CD25+ T Cells in the Control of Inflammation ». *The Journal of Immunology* 171 (10):5018-26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5018>.
- Fowell, D., et D. Mason. 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 ». *The Journal of Experimental Medicine* 177 (3):627-36.
- Fox, Adam T., Peter Sasieni, George du Toit, Huma Syed, et Gideon Lack. 2009. « Household Peanut Consumption as a Risk Factor for the Development of Peanut Allergy ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 (2):417-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.014>.
- Fransson, Moa, Elena Piras, Joachim Burman, Berith Nilsson, Magnus Essand, BinFeng Lu, Robert A. Harris, Peetra U. Magnusson, Eva Brittebo, et Angelica SI Loskog. 2012. « CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery ». *Journal of Neuroinflammation* 9:112. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-112>.
- Free, Meghan E., Donna O'Dell Bunch, Julie Anne McGregor, Britta E. Jones, Elisabeth A. Berg, Susan L. Hogan, Yichun Hu, et al. 2013. « Patients with Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Have Defective Treg Cell Function Exacerbated by the Presence of a Suppression-Resistant Effector Cell Population ». *Arthritis and Rheumatism* 65 (7):1922-33. <https://doi.org/10.1002/art.37959>.
- Frey, Oliver, Peter K. Petrow, Mieczyslaw Gajda, Kerstin Siegmund, Jochen Huehn, Alexander Scheffold, Alf Hamann, Andreas Radbruch, et Rolf Bräuer. 2005. « The Role of Regulatory T Cells in Antigen-Induced Arthritis: Aggravation of Arthritis after Depletion and Amelioration after Transfer of CD4+CD25+ T Cells ». *Arthritis Research & Therapy* 7 (2):R291-301. <https://doi.org/10.1186/ar1484>.
- Frossard, Christophe P., Lothar Steidler, et Philippe A. Eigenmann. 2007. « Oral Administration of an IL-10-Secreting Lactococcus Lactis Strain Prevents Food-Induced IgE Sensitization ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (4):952-59. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.615>.
- Fujita, Hiroyuki, Michael B. Soyka, Mübeccel Akdis, et Cezmi A. Akdis. 2012. « Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy ». *Clinical and Translational Allergy* 2 (1):2. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-2-2>.
- Furuzawa-Carballeda, Janette, Gabriela Hernández-Molina, Guadalupe Lima, Yahaira Rivera-Vicencio, Karen Férrez-Blando, et Luis Llorente. 2013. « Peripheral Regulatory Cells Immunophenotyping in Primary Sjögren's Syndrome: A Cross-Sectional Study ». *Arthritis Research & Therapy* 15 (3):R68. <https://doi.org/10.1186/ar4245>.
- Galvain, Sylvie, Claude André, Christine Vatrinet, et Bertrand Villet. 1999. « Safety and efficacy studies of liposomes in specific immunotherapy ». *Current Therapeutic Research* 60 (5):278-94. [https://doi.org/10.1016/S0011-393X\(99\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S0011-393X(99)80004-6).

- Ganglberger, E., null Barbara Sponer, I. Schöll, U. Wiedermann, S. Baumann, C. Hafner, H. Breiteneder, et al. 2001. « Monovalent Fusion Proteins of IgE Mimotopes Are Safe for Therapy of Type I Allergy ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (13):2524-26. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0888fje>.
- Golovina, Tatiana N., Tatiana Mikheeva, Megan M. Suhoski, Nicole A. Aquí, Victoria C. Tai, Xiaochuan Shan, Ronghua Liu, et al. 2008. « CD28 Costimulation Is Essential for Human T Regulatory Expansion and Function ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (4):2855-68.
- Gondek, David C., Victor Devries, Elizabeth C. Nowak, Li-Fan Lu, Kathryn A. Bennett, Zachary A. Scott, et Randolph J. Noelle. 2008. « Transplantation Survival Is Maintained by Granzyme B+ Regulatory Cells and Adaptive Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (7):4752-60.
- Gondek, David C., Li-Fan Lu, Sergio A. Quezada, Shimon Sakaguchi, et Randolph J. Noelle. 2005. « Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (4):1783-86.
- Gonzalez-Rey, E., M. A. Gonzalez, N. Varela, F. O'Valle, P. Hernandez-Cortes, L. Rico, D. Büscher, et M. Delgado. 2010. « Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduce Inflammatory and T Cell Responses and Induce Regulatory T Cells in Vitro in Rheumatoid Arthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (1):241-48. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.101881>.
- Goswami, Sangeeta, Pornpimon Angkasekwinai, Ming Shan, Kendra J. Greenlee, Wade T. Barranco, Sumanth Polikepahad, Alexander Seryshev, et al. 2009. « Divergent Functions for Airway Epithelial Matrix Metalloproteinase 7 and Retinoic Acid in Experimental Asthma ». *Nature Immunology* 10 (5):496-503. <https://doi.org/10.1038/ni.1719>.
- Gottschalk, Rachel A., Emily Corse, et James P. Allison. 2012. « Expression of Helios in Peripherally Induced Foxp3+ Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (3):976-80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102964>.
- Graca, Luis, Stephen P. Cobbold, et Herman Waldmann. 2002. « Identification of Regulatory T Cells in Tolerated Allografts ». *The Journal of Experimental Medicine* 195 (12):1641-46.
- Gray, Daniel, Jakub Abramson, Christophe Benoist, et Diane Mathis. 2007. « Proliferative Arrest and Rapid Turnover of Thymic Epithelial Cells Expressing Aire ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (11):2521-28. <https://doi.org/10.1084/jem.20070795>.
- Grégoire, Sylvie, Céline Terrada, Gaele H. Martin, Gwladys Fourcade, Audrey Baeyens, Gilles Marodon, Sylvain Fisson, et al. 2016. « Treatment of Uveitis by In Situ Administration of Ex Vivo-Activated Polyclonal Regulatory T Cells ». *The Journal of Immunology* 196 (5):2109-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501723>.
- Gregori, Silvia, Nadia Giarratana, Simona Smirollo, et Luciano Adorini. 2003. « Dynamics of Pathogenic and Suppressor T Cells in Autoimmune Diabetes Development ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (8):4040-47.
- Grela, Françoise, Aude Aumeunier, Emilie Bardel, Linh Pham Van, Elvire Bourgeois, Jeroen Vanoirbeek, Maria Leite-de-Moraes, et al. 2011. « The TLR7 Agonist R848 Alleviates Allergic Inflammation by Targeting Invariant NKT Cells to Produce IFN-Gamma ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (1):284-90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001348>.
- Gri, Giorgia, Silvia Piconese, Barbara Frossi, Vanessa Manfroi, Sonia Merluzzi, Claudio Tripodo, Antonella Viola, et al. 2008. « CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic Responses through OX40-OX40L Interaction ». *Immunity* 29 (5):771-81. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.018>.
- Grinberg-Bleyer, Yenkel, Audrey Baeyens, Sylvaine You, Rima Elhage, Gwladys Fourcade, Sylvie Gregoire, Nicolas Cagnard, et al. 2010. « IL-2 Reverses Established Type 1 Diabetes in NOD Mice by a Local Effect on Pancreatic Regulatory T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (9):1871-78. <https://doi.org/10.1084/jem.20100209>.
- Griseri, Thibault, Mark Asquith, Claire Thompson, et Fiona Powrie. 2010. « OX40 Is Required for Regulatory T Cell-Mediated Control of Colitis ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (4):699-709. <https://doi.org/10.1084/jem.20091618>.
- Groetch, Marion, et Anna Nowak-Węgrzyn. 2013. « Practical Approach to Nutrition and Dietary Intervention in Pediatric Food Allergy ». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 24 (3):212-21. <https://doi.org/10.1111/pai.12035>.
- Grohmann, Ursula, Ciriana Orabona, Francesca Fallarino, Carmine Vacca, Filippo Calcinaro, Alberto Falorni, Paola Candeloro, et al. 2002. « CTLA-4-Ig Regulates Tryptophan Catabolism in Vivo ». *Nature Immunology* 3 (11):1097-1101. <https://doi.org/10.1038/ni846>.

- Grossman, William J., James W. Verbsky, Benjamin L. Tollefsen, Claudia Kemper, John P. Atkinson, et Timothy J. Ley. 2004. « Differential Expression of Granzymes A and B in Human Cytotoxic Lymphocyte Subsets and T Regulatory Cells ». *Blood* 104 (9):2840-48. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0859>.
- Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries, et M. G. Roncarolo. 1996. « Interleukin-10 Induces a Long-Term Antigen-Specific Anergic State in Human CD4<sup>+</sup> T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 184 (1):19-29.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, et M. G. Roncarolo. 1997. « A CD4<sup>+</sup> T-Cell Subset Inhibits Antigen-Specific T-Cell Responses and Prevents Colitis ». *Nature* 389 (6652):737-42. <https://doi.org/10.1038/39614>.
- Groux, Hervé. 2003. « Type 1 T-Regulatory Cells: Their Role in the Control of Immune Responses ». *Transplantation* 75 (9 Suppl):8S-12S. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000067944.90241.BD>.
- Gupta, Ruchi, David Holdford, Lucy Bilaver, Ashley Dyer, Jane L. Holl, et David Meltzer. 2013. « The Economic Impact of Childhood Food Allergy in the United States ». *JAMA Pediatrics* 167 (11):1026-31. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.2376>.
- Gupta, Ruchi S., Elizabeth E. Springston, Manoj R. Warriar, Bridget Smith, Rajesh Kumar, Jacqueline Pongracic, et Jane L. Holl. 2011. « The Prevalence, Severity, and Distribution of Childhood Food Allergy in the United States ». *Pediatrics* 128 (1):e9-17. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-0204>.
- Guy-Grand, Delphine, Pierre Vassalli, Gerard Eberl, Pablo Pereira, Odile Burlen-Defranoux, Fabrice Lemaitre, James P. Di Santo, Antonio A. Freitas, Ana Cumano, et Antonio Bandeira. 2013. « Origin, Trafficking, and Intraepithelial Fate of Gut-Tropic T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (9):1839-54. <https://doi.org/10.1084/jem.20122588>.
- Haas, Juergen, Mirjam Korporal, Bettina Balint, Benedikt Fritzsching, Alexander Schwarz, et Brigitte Wildemann. 2009. « Glatiramer Acetate Improves Regulatory T-Cell Function by Expansion of Naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> T-Cells in Patients with Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 216 (1-2):113-17. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.06.011>.
- Haas, Jürgen, Andreas Hug, Andrea Viehöver, Benedikt Fritzsching, Christine S. Falk, Andrea Filser, Tina Vetter, et al. 2005. « Reduced Suppressive Effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Regulatory T Cells on the T Cell Immune Response against Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Patients with Multiple Sclerosis ». *European Journal of Immunology* 35 (11):3343-52. <https://doi.org/10.1002/eji.200526065>.
- Hadaschik, Eva N., Xiaoying Wei, Harald Leiss, Britta Heckmann, Birgit Niederreiter, Günter Steiner, Walter Ulrich, Alexander H. Enk, Josef S. Smolen, et Georg H. Stummvoll. 2015. « Regulatory T Cell-Deficient Scurfy Mice Develop Systemic Autoimmune Features Resembling Lupus-like Disease ». *Arthritis Research & Therapy* 17 (février):35. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0538-0>.
- Hadis, Usriansyah, Benjamin Wahl, Olga Schulz, Matthias Hardtke-Wolenski, Angela Schippers, Norbert Wagner, Werner Müller, Tim Sparwasser, Reinhold Förster, et Oliver Pabst. 2011. « Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in the Lamina Propria ». *Immunity* 34 (2):237-46. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.016>.
- Halim, Timotheus Y. F., Catherine A. Steer, Laura Mathä, Matthew J. Gold, Itziar Martinez-Gonzalez, Kelly M. McNagny, Andrew N. J. McKenzie, et Fumio Takei. 2014. « Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Critical for the Initiation of Adaptive T Helper 2 Cell-Mediated Allergic Lung Inflammation ». *Immunity* 40 (3):425-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.011>.
- Hall, B. M., N. W. Pearce, K. E. Gurley, et S. E. Dorsch. 1990. « Specific Unresponsiveness in Rats with Prolonged Cardiac Allograft Survival after Treatment with Cyclosporine. III. Further Characterization of the CD4<sup>+</sup> Suppressor Cell and Its Mechanisms of Action ». *The Journal of Experimental Medicine* 171 (1):141-57.
- Hall, Bruce M., Catherine M. Robinson, Karren M. Plain, Nirupama D. Verma, Nicole Carter, Rochelle A. Boyd, Giang T. Tran, et Suzanne J. Hodgkinson. 2008. « Studies on Naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T Cells Inhibition of Naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Cells in Mixed Lymphocyte Cultures ». *Transplant Immunology* 18 (4):291-301. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2007.09.002>.
- Hamann, A., D. P. Andrew, D. Jablonski-Westrich, B. Holzmann, et E. C. Butcher. 1994. « Role of Alpha 4- Integrins in Lymphocyte Homing to Mucosal Tissues in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 152 (7):3282-93.
- Hanabuchi, Shino, Tomoki Ito, Woon-Ryon Park, Norihiko Watanabe, Joanne L. Shaw, Eulogia Roman, Kazuhiko Arima, et al. 2010. « Thymic Stromal Lymphopoietin-Activated Plasmacytoid Dendritic Cells Induce the Generation of FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Human Thymus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (6):2999-3007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804106>.
- Hao, Junwei, Denise Campagnolo, Ruolan Liu, Wenhua Piao, Samuel Shi, Baoyang Hu, Rong Xiang, et al. 2011. « Interleukin-2/Interleukin-2 Antibody Therapy Induces Target Organ Natural Killer Cells That



- Inhibit Central Nervous System Inflammation ». *Annals of Neurology* 69 (4):721-34. <https://doi.org/10.1002/ana.22339>.
- Haque, Rizwanul, Fengyang Lei, Xiaofang Xiong, Yuzhang Wu, et Jianxun Song. 2010. « FoxP3 and Bcl-XL Cooperatively Promote Regulatory T Cell Persistence and Prevention of Arthritis Development ». *Arthritis Research & Therapy* 12 (2):R66. <https://doi.org/10.1186/ar2983>.
- Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie, et K. J. Wood. 2001. « IL-10 Is Required for Regulatory T Cells to Mediate Tolerance to Alloantigens in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (6):3789-96.
- Hartemann, Agnès, Gilbert Bensimon, Christine A. Payan, Sophie Jacqueminet, Olivier Bourron, Nathalie Nicolas, Michèle Fonfrede, Michelle Rosenzweig, Claude Bernard, et David Klatzmann. 2013. « Low-Dose Interleukin 2 in Patients with Type 1 Diabetes: A Phase 1/2 Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 1 (4):295-305. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70113-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70113-X).
- Hartl, Dominik, Barbara Koller, Alexander T. Mehlhorn, Dietrich Reinhardt, Thomas Nicolai, Dolores J. Schendel, Matthias Griesse, et Susanne Krauss-Etschmann. 2007. « Quantitative and Functional Impairment of Pulmonary CD4+CD25hi Regulatory T Cells in Pediatric Asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (5):1258-66. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.02.023>.
- He, Jing, Xia Zhang, Yunbo Wei, Xiaolin Sun, Yaping Chen, Jun Deng, Yuebo Jin, et al. 2016. « Low-Dose Interleukin-2 Treatment Selectively Modulates CD4(+) T Cell Subsets in Patients with Systemic Lupus Erythematosus ». *Nature Medicine* 22 (9):991-93. <https://doi.org/10.1038/nm.4148>.
- Heinrich, Melanie, Douglas Burger, Limei Wang, Georges Tahhan, Peter Reinhold, Menghan Zhao, Elise Hsu, Sarah Warden, Danielle Baum, et Denise Faustman. 2015. « TNFR1 and TNFR2 Expression and Induction on Human Treg Cells from Type 1 Diabetic Subjects ». *Antibodies* 4 (1):34-47. <https://doi.org/10.3390/antib4010034>.
- Hoffmann, Petra, Joerg Ermann, Matthias Edinger, C. Garrison Fathman, et Samuel Strober. 2002. « Donor-Type CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (3):389-99.
- Holt, P. G., J. E. Batty, et K. J. Turner. 1981. « Inhibition of Specific IgE Responses in Mice by Pre-Exposure to Inhaled Antigen ». *Immunology* 42 (3):409-17.
- Hong, Jian, Ningli Li, Xuejun Zhang, Biao Zheng, et Jingwu Z. Zhang. 2005. « Induction of CD4+CD25+ Regulatory T Cells by Copolymer-I through Activation of Transcription Factor Foxp3 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (18):6449-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502187102>.
- Hordinsky M, et Kaplan DH. 2014. « LOW-dose interleukin 2 to reverse alopecia areata ». *JAMA Dermatology* 150 (7):696-97. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.510>.
- Hori, Shohei, Takashi Nomura, et Shimon Sakaguchi. 2003. « Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3 ». *Science (New York, N.Y.)* 299 (5609):1057-61. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>.
- Horwitz, David A., Song Guo Zheng, Juhua Wang, et J. Dixon Gray. 2008. « Critical Role of IL-2 and TGF- $\beta$  in Generation, Function and Stabilization of Foxp3+CD4+ Treg ». *European Journal of Immunology* 38 (4):912-15. <https://doi.org/10.1002/eji.200738109>.
- Hsieh, Chyi-Song, Hyang-Mi Lee, et Chan-Wang J. Lio. 2012. « Selection of Regulatory T Cells in the Thymus ». *Nature Reviews. Immunology* 12 (3):157-67. <https://doi.org/10.1038/nri3155>.
- Hu, Yan, Jing Chen, et Haiqi Li. 2010. « Comparison of Food Allergy Prevalence among Chinese Infants in Chongqing, 2009 versus 1999 ». *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society* 52 (5):820-24. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2010.03166.x>.
- Hua, Xiaoyang, Martina Kovarova, Kelly D. Chason, MyTrang Nguyen, Beverly H. Koller, et Stephen L. Tilley. 2007. « Enhanced mast cell activation in mice deficient in the A2b adenosine receptor ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (1):117-28. <https://doi.org/10.1084/jem.20061372>.
- Huan, Jianya, Nicole Culbertson, Leslie Spencer, Richard Bartholomew, Gregory G. Burrows, Yuan K. Chou, Dennis Bourdette, Steven F. Ziegler, Halina Offner, et Arthur A. Vandenbark. 2005. « Decreased FOXP3 Levels in Multiple Sclerosis Patients ». *Journal of Neuroscience Research* 81 (1):45-52. <https://doi.org/10.1002/jnr.20522>.
- Huang, Ching-Tai, Creg J. Workman, Dallas Flies, Xiaoyu Pan, Aimee L. Marson, Gang Zhou, Edward L. Hipkiss, et al. 2004. « Role of LAG-3 in Regulatory T Cells ». *Immunity* 21 (4):503-13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.010>.
- Huibregtse, Inge L., Veerle Snoeck, An de Creus, Henri Braat, Ester C. De Jong, Sander J. H. Van Deventer, et Pieter Rottiers. 2007. « Induction of Ovalbumin-Specific Tolerance by Oral Administration of

- Lactococcus Lactis Secreting Ovalbumin ». *Gastroenterology* 133 (2):517-28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.073>.
- Humrich, Jens Y., Henner Morbach, Reinmar Undeutsch, Philipp Enghard, Stefan Rosenberger, Olivia Weigert, Lutz Kloke, et al. 2010. « Homeostatic Imbalance of Regulatory and Effector T Cells Due to IL-2 Deprivation Amplifies Murine Lupus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (1):204-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903158107>.
- Humrich, Jens Y., Caroline von Spee-Mayer, Elise Siegert, Tobias Alexander, Falk Hiepe, Andreas Radbruch, Gerd-Rüdiger Burmester, et Gabriela Riemekasten. 2015. « Rapid Induction of Clinical Remission by Low-Dose Interleukin-2 in a Patient with Refractory SLE ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (4):791-92. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206506>.
- Humrich, Jens Y., Caroline von Spee-Mayer, Elise Siegert, Martina Bertolo, Dimas Abdirama, Angelika Rose, Philipp Enghard, et al. 2017. « 06.08 Low-Dose IL-2 Therapy in Refractory SLE: Results from a Single Centre Phase I/IIa Clinical Trial ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76 (Suppl 1):A62-63. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-211053.8>.
- Huter, Eva N., George A. Punkosdy, Deborah D. Glass, Lily I. Cheng, Jerrold M. Ward, et Ethan M. Shevach. 2008. « TGF- $\beta$ -Induced Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Rescue Scurfy Mice ». *European Journal of Immunology* 38 (7):1814-21. <https://doi.org/10.1002/eji.200838346>.
- Huter, Eva N., Georg H. Stummvoll, Richard J. DiPaolo, Deborah D. Glass, et Ethan M. Shevach. 2008. « Cutting Edge: Antigen-Specific TGF  $\beta$ -Induced Regulatory T Cells Suppress Th17-Mediated Autoimmune Disease ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (12):8209-13.
- Ito, Tomoki, Yui-Hsi Wang, Omar Duramad, Toshiyuki Hori, Guy J. Delespesse, Norihiko Watanabe, F. Xiao-Feng Qin, Zhengbin Yao, Wei Cao, et Yong-Jun Liu. 2005. « TSLP-Activated Dendritic Cells Induce an Inflammatory T Helper Type 2 Cell Response through OX40 Ligand ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (9):1213-23. <https://doi.org/10.1084/jem.20051135>.
- Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, et S. Sakaguchi. 1999. « Thymus and Autoimmunity: Production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (9):5317-26.
- Jiang, Qi, Hua Su, Geoffrey Knudsen, Whitney Helms, et Lishan Su. 2006. « Delayed Functional Maturation of Natural Regulatory T Cells in the Medulla of Postnatal Thymus: Role of TSLP ». *BMC Immunology* 7 (avril):6. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-7-6>.
- Jin, Guihua, Yasuhito Hamaguchi, Takashi Matsushita, Minoru Hasegawa, Doanh Le Huu, Nobuko Ishiura, Kazuhito Naka, Atsushi Hirao, Kazuhiko Takehara, et Manabu Fujimoto. 2013. « B-Cell Linker Protein Expression Contributes to Controlling Allergic and Autoimmune Diseases by Mediating IL-10 Production in Regulatory B Cells ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (6):1674-82. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.044>.
- Jin, Huali, Chong Xiao, Shuang Geng, Yanxin Hu, Ruiping She, Yang Yu, Youmin Kang, et Bin Wang. 2008. « Protein/DNA Vaccine-Induced Antigen-Specific Treg Confer Protection against Asthma ». *European Journal of Immunology* 38 (9):2451-63. <https://doi.org/10.1002/eji.200737899>.
- Joetham, Anthony, Katsuyuki Takeda, Katsuyuki Takada, Christian Taube, Nobuaki Miyahara, Shigeki Matsubara, Satoko Matsubara, et al. 2007. « Naturally Occurring Lung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cell Regulation of Airway Allergic Responses Depends on IL-10 Induction of TGF- $\beta$  ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (3):1433-42.
- Jones, Stacie M., Scott H. Sicherer, A. Wesley Burks, Donald Y. M. Leung, Robert W. Lindblad, Peter Dawson, Alice K. Henning, et al. 2017. « Epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy in children and young adults ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (4):1242-1252.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.017>.
- Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Naji, et A. J. Caton. 2001. « Thymic Selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Induced by an Agonist Self-Peptide ». *Nature Immunology* 2 (4):301-6. <https://doi.org/10.1038/86302>.
- Josefowicz, Steven Z., Rachel E. Niec, Hye Young Kim, Piper Treuting, Takatoshi Chinen, Ye Zheng, Dale T. Umetsu, et Alexander Y. Rudensky. 2012. « Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation ». *Nature* 482 (7385):395-99. <https://doi.org/10.1038/nature10772>.
- Kakkar, Rahul, et Richard T. Lee. 2008. « The IL-33/ST2 Pathway: Therapeutic Target and Novel Biomarker ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (10):827-40. <https://doi.org/10.1038/nrd2660>.
- Kang, Chun-Mi, An-Soo Jang, Mi-Hyun Ahn, Jeong-Ah Shin, Ji-Hye Kim, Yun-Sung Choi, Tai-Youn Rhim, et Choon-Sik Park. 2005. « Interleukin-25 and Interleukin-13 Production by Alveolar Macrophages in

- Response to Particles ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33 (3):290-96. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0003OC>.
- Kanjarawi, Reem, Christophe Dercamp, Nathalie Etchart, Karine Adel-Patient, Jean-François Nicolas, Bertrand Dubois, et Dominique Kaiserlian. 2011. « Regulatory T Cells Control Type I Food Allergy to Beta-Lactoglobulin in Mice ». *International Archives of Allergy and Immunology* 156 (4):387-96. <https://doi.org/10.1159/000323940>.
- Karlsson, Malin R., Jarle Rugtveit, et Per Brandtzaeg. 2004. « Allergen-Responsive CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Children Who Have Outgrown Cow's Milk Allergy ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (12):1679-88. <https://doi.org/10.1084/jem.20032121>.
- Kasahara, Kazuyuki, Naoto Sasaki, Tomoya Yamashita, Tomoyuki Kita, Keiko Yodoi, Yoshihiro Sasaki, Masafumi Takeda, et Ken-Ichi Hirata. 2014. « CD3 Antibody and IL-2 Complex Combination Therapy Inhibits Atherosclerosis by Augmenting a Regulatory Immune Response ». *Journal of the American Heart Association* 3 (2):e000719. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000719>.
- Kashyap, Mohit, Angela M. Thornton, Sarah Kennedy Norton, Brian Barnstein, Matthew Macey, Jennifer Brenzovich, Ethan Shevach, Warren J. Leonard, et John J. Ryan. 2008. « Cutting Edge: CD4 T Cell-Mast Cell Interactions Alter IgE Receptor Expression and Signaling ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (4):2039-43.
- Kearley, Jennifer, Jane E. Barker, Douglas S. Robinson, et Clare M. Lloyd. 2005. « Resolution of Airway Inflammation and Hyperreactivity after in Vivo Transfer of CD4+CD25+ Regulatory T Cells Is Interleukin 10 Dependent ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (11):1539-47. <https://doi.org/10.1084/jem.20051166>.
- Kearley, Jennifer, Douglas S. Robinson, et Clare M. Lloyd. 2008. « CD4+CD25+ Regulatory T Cells Reverse Established Allergic Airway Inflammation and Prevent Airway Remodeling ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122 (3):617-624.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.05.048>.
- Keet, Corinne A., Pamela A. Frischmeyer-Guerrerio, Ananth Thyagarajan, John T. Schroeder, Robert G. Hamilton, Stephen Boden, Pamela Steele, Sarah Driggers, A. Wesley Burks, et Robert A. Wood. 2012. « The Safety and Efficacy of Sublingual and Oral Immunotherapy for Milk Allergy ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (2):448-55, 455.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.10.023>.
- Kelchtermans, H., L. Geboes, T. Mitera, D. Huskens, G. Leclercq, et P. Matthys. 2009. « Activated CD4+CD25+ Regulatory T Cells Inhibit Osteoclastogenesis and Collagen-Induced Arthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 68 (5):744-50. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.086066>.
- Kelchtermans, Hilde, Bert De Klerck, Tania Mitera, Maarten Van Balen, Dominique Bullens, Alfons Billiau, Georges Leclercq, et Patrick Matthys. 2005. « Defective CD4+CD25+regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN- $\gamma$  ». *Arthritis Res Ther* 7:R402. <https://doi.org/10.1186/ar1500>.
- Kennedy-Nasser, Alana A., Stephanie Ku, Paul Castillo-Caro, Yasmin Hazrat, Meng-Fen Wu, Hao Liu, Jos Melenhorst, et al. 2014. « Ultra Low-Dose IL-2 for GVHD Prophylaxis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Mediates Expansion of Regulatory T Cells without Diminishing Antiviral and Antileukemic Activity ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (8):2215-25. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3205>.
- Kim, Jeong M., et Alexander Rudensky. 2006. « The Role of the Transcription Factor Foxp3 in the Development of Regulatory T Cells ». *Immunological Reviews* 212 (août):86-98. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00426.x>.
- Kim, Kwang Soon, Sung-Wook Hong, Daehee Han, Jaew Yi, Jisun Jung, Bo-Gie Yang, Jun Young Lee, Minji Lee, et Charles D. Surh. 2016. « Dietary Antigens Limit Mucosal Immunity by Inducing Regulatory T Cells in the Small Intestine ». *Science* 351 (6275):858-63. <https://doi.org/10.1126/science.aac5560>.
- Kips, Johan C., Brian J. O'Connor, Stephen J. Langley, Ashley Woodcock, Huib A. M. Kerstjens, Dirkje S. Postma, Mel Danzig, Francis Cuss, et Romain A. Pauwels. 2003. « Effect of SCH55700, a Humanized Anti-Human Interleukin-5 Antibody, in Severe Persistent Asthma: A Pilot Study ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167 (12):1655-59. <https://doi.org/10.1164/rccm.200206-525OC>.
- Klatzmann, David, et Abul K. Abbas. 2015. « The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases ». *Nature Reviews Immunology* 15 (5):283-94. <https://doi.org/10.1038/nri3823>.
- Kleinewietfeld, Markus, et David A. Hafler. 2014. « Regulatory T Cells in Autoimmune Neuroinflammation ». *Immunological Reviews* 259 (1):231-44. <https://doi.org/10.1111/imr.12169>.
- Klimek, L., J. Willers, A. Hammann-Haenni, O. Pfaar, H. Stocker, P. Mueller, W. A. Renner, et M. F. Bachmann. 2011. « Assessment of Clinical Efficacy of CYT003-QbG10 in Patients with Allergic Rhinoconjunctivitis: A Phase IIb Study ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British*

- Society for Allergy and Clinical Immunology* 41 (9):1305-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03783.x>.
- Klose, Christoph S. N., et David Artis. 2016. « Innate Lymphoid Cells as Regulators of Immunity, Inflammation and Tissue Homeostasis ». *Nature Immunology* 17 (7):765-74. <https://doi.org/10.1038/ni.3489>.
- Koch, Meghan A., Gladys Tucker-Heard, Nikole R. Perdue, Justin R. Killebrew, Kevin B. Urdahl, et Daniel J. Campbell. 2009. « The Transcription Factor T-Bet Controls Regulatory T Cell Homeostasis and Function during Type 1 Inflammation ». *Nature Immunology* 10 (6):595-602. <https://doi.org/10.1038/ni.1731>.
- Komatsu, Noriko, Maria Encarnita Mariotti-Ferrandiz, Ying Wang, Bernard Malissen, Herman Waldmann, et Shohei Hori. 2009. « Heterogeneity of Natural Foxp3+ T Cells: A Committed Regulatory T-Cell Lineage and an Uncommitted Minor Population Retaining Plasticity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6):1903-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811556106>.
- Koreth, John, Ken-ichi Matsuoka, Haesook T. Kim, Sean M. McDonough, Bhavjot Bindra, Edwin P. Alyea, Philippe Armand, et al. 2011. « Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease ». *The New England journal of medicine* 365 (22):2055-66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108188>.
- Kosmaczewska, Agata, Lidia Ciszak, Jerzy Swierkot, Aleksandra Szeblach, Katarzyna Kosciow, et Irena Frydecka. 2015. « Exogenous IL-2 Controls the Balance in Th1, Th17, and Treg Cell Distribution in Patients with Progressive Rheumatoid Arthritis Treated with TNF-Alpha Inhibitors ». *Inflammation* 38 (2):765-74. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9987-x>.
- Kukreja, Anjali, Giulia Cost, John Marker, Chenhui Zhang, Zhong Sun, Karen Lin-Su, Svetlana Ten, et al. 2002. « Multiple Immuno-Regulatory Defects in Type-1 Diabetes ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (1):131-40. <https://doi.org/10.1172/JCI13605>.
- Kung, T. T., B. Luo, Y. Crawley, C. G. Garlisi, K. Devito, M. Minnicozzi, R. W. Egan, W. Kreutner, et R. W. Chapman. 2001. « Effect of Anti-MIL-9 Antibody on the Development of Pulmonary Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Allergic Mice ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25 (5):600-605. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.5.4533>.
- Kuniyasu, Y., T. Takahashi, M. Itoh, J. Shimizu, G. Toda, et S. Sakaguchi. 2000. « Naturally Anergic and Suppressive CD25(+)CD4(+) T Cells as a Functionally and Phenotypically Distinct Immunoregulatory T Cell Subpopulation ». *International Immunology* 12 (8):1145-55.
- Kurobe, Hirotugu, Cunlan Liu, Tomoo Ueno, Fumi Saito, Izumi Ohigashi, Natalie Seach, Rieko Arakaki, et al. 2006. « CCR7-Dependent Cortex-to-Medulla Migration of Positively Selected Thymocytes Is Essential for Establishing Central Tolerance ». *Immunity* 24 (2):165-77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.12.011>.
- Kwilasz, A. J., P. M. Grace, P. Serbedzija, S. F. Maier, et L. R. Watkins. 2015. « The Therapeutic Potential of Interleukin-10 in Neuroimmune Diseases ». *Neuropharmacology* 96 (Pt A):55-69. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.020>.
- Lawson, C. A., A. K. Brown, V. Bejarano, S. H. Douglas, C. H. Burgoyne, A. S. Greenstein, A. W. Boylston, P. Emery, F. Ponchel, et J. D. Isaacs. 2006. « Early Rheumatoid Arthritis Is Associated with a Deficit in the CD4+CD25high Regulatory T Cell Population in Peripheral Blood ». *Rheumatology (Oxford, England)* 45 (10):1210-17. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei089>.
- Lee, Seon-Yeong, Mi-La Cho, Hye-Jwa Oh, Jun-Geol Ryu, Min-Jung Park, Joo-Yeon Jhun, Mi-Kyung Park, et al. 2012. « Interleukin-2/Anti-Interleukin-2 Monoclonal Antibody Immune Complex Suppresses Collagen-Induced Arthritis in Mice by Fortifying Interleukin-2/STAT5 Signalling Pathways ». *Immunology* 137 (4):305-16. <https://doi.org/10.1111/imm.12008>.
- Leech, Melanie D., Robert A. Benson, Annick De Vries, Paul M. Fitch, et Sarah E. M. Howie. 2007. « Resolution of Der P1-Induced Allergic Airway Inflammation Is Dependent on CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (10):7050-58.
- Létourneau, Sven, Ester M. M. van Leeuwen, Carsten Krieg, Chris Martin, Giuseppe Pantaleo, Jonathan Sprent, Charles D. Surh, et Onur Boyman. 2010. « IL-2/Anti-IL-2 Antibody Complexes Show Strong Biological Activity by Avoiding Interaction with IL-2 Receptor Alpha Subunit CD25 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (5):2171-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909384107>.
- Lewkowich, Ian P., Nancy S. Herman, Kathleen W. Schleifer, Matthew P. Dance, Brian L. Chen, Krista M. Dienger, Alyssa A. Sproles, et al. 2005. « CD4+CD25+ T Cells Protect against Experimentally Induced Asthma and Alter Pulmonary Dendritic Cell Phenotype and Function ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (11):1549-61. <https://doi.org/10.1084/jem.20051506>.

- Li, Ming O., Yisong Y. Wan, et Richard A. Flavell. 2007. « T Cell-Produced Transforming Growth Factor-Beta1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation ». *Immunity* 26 (5):579-91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.014>.
- Li, Xiaomei, Xiangpei Li, Long Qian, Guosheng Wang, Hong Zhang, Xiaoqiu Wang, Ke Chen, et al. 2007. « T Regulatory Cells Are Markedly Diminished in Diseased Salivary Glands of Patients with Primary Sjögren's Syndrome ». *The Journal of Rheumatology* 34 (12):2438-45.
- Liao, Wei, Jian-Xin Lin, et Warren J. Leonard. 2013. « Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy ». *Immunity* 38 (1):13-25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>.
- Liesz, Arthur, Elisabeth Suri-Payer, Claudia Veltkamp, Henrike Doerr, Clemens Sommer, Serge Rivest, Thomas Giese, et Roland Veltkamp. 2009. « Regulatory T Cells Are Key Cerebroprotective Immunomodulators in Acute Experimental Stroke ». *Nature Medicine* 15 (2):192-99. <https://doi.org/10.1038/nm.1927>.
- Liew, Woei Kang, Elizabeth Williamson, et Mimi L. K. Tang. 2009. « Anaphylaxis Fatalities and Admissions in Australia ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 (2):434-42. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.049>.
- Lim, Hyung W., Peter Hillsamer, et Chang H. Kim. 2004. « Regulatory T Cells Can Migrate to Follicles upon T Cell Activation and Suppress GC-Th Cells and GC-Th Cell-Driven B Cell Responses ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (11):1640-49. <https://doi.org/10.1172/JCI22325>.
- Lin, Wen, Nga Truong, William J. Grossman, Dipica Haribhai, Calvin B. Williams, Jiafang Wang, Martín G. Martín, et Talal A. Chatila. 2005. « Allergic Dysregulation and Hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 Mutant Mice ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116 (5):1106-15. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.08.046>.
- Lindley, Shelley, Colin M. Dayan, Amanda Bishop, Bart O. Roep, Mark Peakman, et Timothy I. M. Tree. 2005. « Defective Suppressor Function in CD4(+)CD25(+) T-Cells from Patients with Type 1 Diabetes ». *Diabetes* 54 (1):92-99.
- Ling, Eleanor M., Trevor Smith, X. Dao Nguyen, Carol Pridgeon, Margaret Dallman, Justine Arbery, Victoria A. Carr, et Douglas S. Robinson. 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):608-15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15592-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15592-X).
- Lio, Chan-Wang Joaquim, et Chyi-Song Hsieh. 2008. « A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development ». *Immunity* 28 (1):100-111. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.021>.
- Little, Matthew C., Louise V. Bell, Laura J. Cliffe, et Kathryn J. Else. 2005. « The Characterization of Intraepithelial Lymphocytes, Lamina Propria Leukocytes, and Isolated Lymphoid Follicles in the Large Intestine of Mice Infected with the Intestinal Nematode Parasite *Trichuris Muris* ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (10):6713-22.
- Litwin, A., M. Flanagan, G. Entis, G. Gottschlich, R. Esch, P. Gartside, et J. G. Michael. 1997. « Oral Immunotherapy with Short Ragweed Extract in a Novel Encapsulated Preparation: A Double-Blind Study ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100 (1):30-38.
- Liu, M.-F., L.-H. Lin, C.-T. Weng, et M.-Y. Weng. 2008. « Decreased CD4+CD25+bright T Cells in Peripheral Blood of Patients with Primary Sjogren's Syndrome ». *Lupus* 17 (1):34-39. <https://doi.org/10.1177/0961203307085248>.
- Liu, M.-F., C.-R. Wang, L.-L. Fung, et C.-R. Wu. 2004. « Decreased CD4+CD25+ T Cells in Peripheral Blood of Patients with Systemic Lupus Erythematosus ». *Scandinavian Journal of Immunology* 59 (2):198-202.
- Liu, Ruolan, Qinghua Zhou, Antonio La Cava, Denise I. Campagnolo, Luc Van Kaer, et Fu-Dong Shi. 2010. « Expansion of Regulatory T Cells via IL-2/Anti-IL-2 MAb Complexes Suppresses Experimental Myasthenia ». *European Journal of Immunology* 40 (6):1577-89. <https://doi.org/10.1002/eji.200939792>.
- Liu, Weihong, Amy L. Putnam, Zhou Xu-Yu, Gregory L. Szot, Michael R. Lee, Shirley Zhu, Peter A. Gottlieb, et al. 2006. « CD127 Expression Inversely Correlates with FoxP3 and Suppressive Function of Human CD4+ T Reg Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (7):1701-11. <https://doi.org/10.1084/jem.20060772>.
- Lloyd, Clare M., et Catherine M. Hawrylowicz. 2009. « Regulatory T Cells in Asthma ». *Immunity* 31 (3):438-49. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.007>.
- Lochner, Matthias, Lucie Peduto, Marie Cherrier, Shinichiro Sawa, Francina Langa, Rosa Varona, Dieter Riethmacher, Mustapha Si-Tahar, James P. Di Santo, et Gérard Eberl. 2008. « In Vivo Equilibrium of Proinflammatory IL-17+ and Regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma T+ T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (6):1381-93. <https://doi.org/10.1084/jem.20080034>.

- Lochner, Matthias, Zuobai Wang, et Tim Sparwasser. 2015. « The Special Relationship in the Development and Function of T Helper 17 and Regulatory T Cells ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 136:99-129. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.013>.
- Long, S. Alice, Karen Cerosaletti, Paul L. Bollyky, Megan Tatum, Heather Shilling, Sheng Zhang, Zhong-Yin Zhang, et al. 2010. « Defects in IL-2R Signaling Contribute to Diminished Maintenance of FOXP3 Expression in CD4(+)CD25(+) Regulatory T-Cells of Type 1 Diabetic Subjects ». *Diabetes* 59 (2):407-15. <https://doi.org/10.2337/db09-0694>.
- Lorentz, A., S. Schwengberg, G. Sellge, M. P. Manns, et S. C. Bischoff. 2000. « Human Intestinal Mast Cells Are Capable of Producing Different Cytokine Profiles: Role of IgE Receptor Cross-Linking and IL-4 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (1):43-48.
- Louahed, J., M. Toda, J. Jen, Q. Hamid, J. C. Renaud, R. C. Levitt, et N. C. Nicolaides. 2000. « Interleukin-9 Upregulates Mucus Expression in the Airways ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 22 (6):649-56. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.6.3927>.
- Lu, Li-Fan, Evan F. Lind, David C. Gondek, Kathy A. Bennett, Michael W. Gleeson, Karina Pino-Lagos, Zachary A. Scott, et al. 2006. « Mast Cells Are Essential Intermediaries in Regulatory T-Cell Tolerance ». *Nature* 442 (7106):997-1002. <https://doi.org/10.1038/nature05010>.
- Lucendo, Alfredo J., Angel Arias, et José M. Tenias. 2014. « Relation between Eosinophilic Esophagitis and Oral Immunotherapy for Food Allergy: A Systematic Review with Meta-Analysis ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 113 (6):624-29. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.08.004>.
- Lyssuk, Elena Yu, Anna V. Torgashina, Sergey K. Soloviev, Evgeny L. Nassonov, et Svetlana N. Bykovskaia. 2007. « Reduced Number and Function of CD4+CD25highFoxP3+ Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 601:113-19.
- Maazi, H., S. Shirinbak, M. Willart, H. M. Hammad, M. Cabanski, L. Boon, V. Ganesh, et al. 2012. « Contribution of Regulatory T Cells to Alleviation of Experimental Allergic Asthma after Specific Immunotherapy ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 42 (10):1519-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.04064.x>.
- Maggi, Enrico, Alessandra Vultaggio, et Andrea Matucci. 2012. « T-Cell Responses during Allergen-Specific Immunotherapy ». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 12 (1):1-6. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32834ecc9a>.
- Magnan, A., et M. Humbert. 2005. « Is Deficient Tolerance the True Paradigm for Atopic Diseases? ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35 (12):1507-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02392.x>.
- Mamessier, E., J. Birnbaum, P. Dupuy, D. Vervloet, et A. Magnan. 2006. « Ultra-Rush Venom Immunotherapy Induces Differential T Cell Activation and Regulatory Patterns According to the Severity of Allergy ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36 (6):704-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02487.x>.
- Mamessier, E., A. Nieves, A.-M. Lorec, P. Dupuy, D. Pinot, C. Pinet, D. Vervloet, et A. Magnan. 2008. « T-Cell Activation during Exacerbations: A Longitudinal Study in Refractory Asthma ». *Allergy* 63 (9):1202-10. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01687.x>.
- Manirarora, Jean N., et Cheng-Hong Wei. 2015. « Combination Therapy Using IL-2/IL-2 Monoclonal Antibody Complexes, Rapamycin, and Islet Autoantigen Peptides Increases Regulatory T Cell Frequency and Protects against Spontaneous and Induced Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195 (11):5203-14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402540>.
- Mann, Monica K., Katarzyna Maresz, Leah P. Shriver, Yanping Tan, et Bonnie N. Dittel. 2007. « B Cell Regulation of CD4+CD25+ T Regulatory Cells and IL-10 via B7 Is Essential for Recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (6):3447-56.
- Manolova, Irena, Julieta Gerenova, et Mariana Ivanova. 2013. « Serum Levels of Transforming Growth Factor-B1 (TGF-B1) in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Hashimoto's Thyroiditis ». *European Cytokine Network* 24 (1):69-74. <https://doi.org/10.1684/ecn.2013.0331>.
- Marek-Trzonkowska, Natalia, Malgorzata Mysliwiec, Anita Dobyszek, Marcelina Grabowska, Ilona Techmanska, Jolanta Juscinska, Magdalena A. Wujtewicz, et al. 2012. « Administration of CD4+CD25highCD127- Regulatory T Cells Preserves  $\beta$ -Cell Function in Type 1 Diabetes in Children ». *Diabetes Care* 35 (9):1817-20. <https://doi.org/10.2337/dc12-0038>.
- Marinaki, S., I. Neumann, A.-I. Kalsch, P. Grimminger, A. Breedijk, R. Birck, W. Schmitt, R. Waldherr, B. A. Yard, et F. J. Van Der Woude. 2005. « Abnormalities of CD4 T Cell Subpopulations in ANCA-

- Associated Vasculitis ». *Clinical and Experimental Immunology* 140 (1):181-91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02731.x>.
- Marinho, F. A. V., L. G. G. Pacifico, A. Miyoshi, V. Azevedo, Y. Le Loir, V. D. Guimarães, P. Langella, G. D. Cassali, C. T. Fonseca, et S. C. Oliveira. 2010. « An Intranasal Administration of Lactococcus Lactis Strains Expressing Recombinant Interleukin-10 Modulates Acute Allergic Airway Inflammation in a Murine Model: Lactococcus Lactis Expressing RIL-10 Modulates Airway Inflammation ». *Clinical & Experimental Allergy* 40 (10):1541-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03502.x>.
- Marogna, Maurizio, Igino Spadolini, Alessandro Massolo, Giorgio Walter Canonica, et Giovanni Passalacqua. 2010. « Long-Lasting Effects of Sublingual Immunotherapy According to Its Duration: A 15-Year Prospective Study ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (5):969-75. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.030>.
- Martin, Helen, Sebastian Reuter, Nina Dehzad, Anke Heinz, Iris Bellinghausen, Joachim Saloga, Ina Haasler, et al. 2012. « CD4-Mediated Regulatory T-Cell Activation Inhibits the Development of Disease in a Humanized Mouse Model of Allergic Airway Disease ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (2):521-28, 528.e1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.038>.
- Masteller, Emma L., Matthew R. Warner, Qizhi Tang, Kristin V. Tarbell, Hugh McDevitt, et Jeffrey A. Bluestone. 2005. « Expansion of Functional Endogenous Antigen-Specific CD4+CD25+ Regulatory T Cells from Nonobese Diabetic Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (5):3053-59.
- Masterodemos, Vasileios, Marianna Ioannou, et Panayotis Verginis. 2015. « Cell-Based Modulation of Autoimmune Responses in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Therapeutic Implications ». *Neuroimmunomodulation* 22 (3):181-95. <https://doi.org/10.1159/000362370>.
- Mathias, Clinton B., Suejy A. Hobson, Maria Garcia-Lloret, Greg Lawson, Dimitri Poddighe, Eva-Jasmin Freyschmidt, Wei Xing, Michael F. Gurish, Talal A. Chatila, et Hans C. Oettgen. 2011. « IgE-mediated systemic anaphylaxis and impaired tolerance to food antigens in mice with enhanced IL-4 receptor signaling ». *The Journal of allergy and clinical immunology* 127 (3):795-805.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.009>.
- Matsumoto, Masanori, Akemi Baba, Takafumi Yokota, Hiroyoshi Nishikawa, Yasuyuki Ohkawa, Hisako Kayama, Axel Kallies, et al. 2014. « Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation ». *Immunity* 41 (6):1040-51. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.016>.
- Matsuoka, Ken-ichi, John Koreth, Haesook T. Kim, O. Gregory Bascug, Sean McDonough, Yutaka Kawano, Kazuyuki Murase, et al. 2013. « Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease ». *Science translational medicine* 5 (179):179ra43. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005265>.
- Matsushita, Takashi, Koichi Yanaba, Jean-David Bouaziz, Manabu Fujimoto, et Thomas F. Tedder. 2008. « Regulatory B Cells Inhibit EAE Initiation in Mice While Other B Cells Promote Disease Progression ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (10):3420-30. <https://doi.org/10.1172/JCI36030>.
- Matteoli, Gianluca, Elisa Mazzini, Iliyan D. Iliev, Erika Mileti, Francesca Fallarino, Paolo Puccetti, Marcello Chieppa, et Maria Rescigno. 2010. « Gut CD103+ Dendritic Cells Express Indoleamine 2,3-Dioxygenase Which Influences T Regulatory/T Effector Cell Balance and Oral Tolerance Induction ». *Gut* 59 (5):595-604. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.185108>.
- Maury, Sébastien, François M. Lemoine, Yosr Hicheri, Michelle Rosenzweig, Cécile Badoual, Mustapha Cherai, Jean-Louis Beaumont, et al. 2010. « CD4+CD25+ Regulatory T Cell Depletion Improves the Graft-versus-Tumor Effect of Donor Lymphocytes after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Science Translational Medicine* 2 (41):41ra52. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001302>.
- McGeachy, Mandy J., Leigh A. Stephens, et Stephen M. Anderton. 2005. « Natural Recovery and Protection from Autoimmune Encephalomyelitis: Contribution of CD4+CD25+ Regulatory Cells within the Central Nervous System ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (5):3025-32.
- McHugh, Rebecca S., Matthew J. Whitters, Ciriaco A. Piccirillo, Deborah A. Young, Ethan M. Shevach, Mary Collins, et Michael C. Byrne. 2002. « CD4(+)CD25(+) Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor ». *Immunity* 16 (2):311-23.
- Meiler, F., S. Klunker, M. Zimmermann, C. A. Akdis, et M. Akdis. 2008. « Distinct Regulation of IgE, IgG4 and IgA by T Regulatory Cells and Toll-like Receptors ». *Allergy* 63 (11):1455-63. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01774.x>.

- Meiler, Flurina, Judith Zumkehr, Sven Klunker, Beate Rückert, Cezmi A. Akdis, et Mübeccel Akdis. 2008. « In Vivo Switch to IL-10-Secreting T Regulatory Cells in High Dose Allergen Exposure ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (12):2887-98. <https://doi.org/10.1084/jem.20080193>.
- Mellanby, Richard J, David Thomas, Jenny M Phillips, et Anne Cooke. 2007. « Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells ». *Immunology* 121 (1):15-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02546.x>.
- Michaud, Elodie, Bertrand Evrard, Bruno Pereira, Emmanuelle Rochette, Lise Bernard, Paul-Olivier Rouzaire, Nelly Gourdon-Dubois, Etienne Merlin, et Jean-Luc Fauquert. 2015. « Peanut Oral Immunotherapy in Adolescents: Study Protocol for a Randomized Controlled Trial ». *Trials* 16 (avril):197. <https://doi.org/10.1186/s13063-015-0717-y>.
- Miller, A., O. Lider, et H. L. Weiner. 1991. « Antigen-Driven Bystander Suppression after Oral Administration of Antigens ». *The Journal of Experimental Medicine* 174 (4):791-98.
- Miller, J. F. A. P. 1962. « Immunological significance of the thymus of the adult mouse. » *Nature*, 1962.
- Mills, E. N. C., A. R. Mackie, P. Burney, K. Beyer, L. Frewer, C. Madsen, E. Botjes, R. W. R. Crevel, et R. van Ree. 2007. « The Prevalence, Cost and Basis of Food Allergy across Europe ». *Allergy* 62 (7):717-22. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01425.x>.
- Mirchandani, Ananda S., Anne-Gaelle Besnard, Edwin Yip, Charlotte Scott, Calum C. Bain, Vuk Cerovic, Robert J. Salmond, et Foo Y. Liew. 2014. « Type 2 Innate Lymphoid Cells Drive CD4<sup>+</sup> Th2 Cell Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (5):2442-48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300974>.
- Mishra, A., S. P. Hogan, J. J. Lee, P. S. Foster, et M. E. Rothenberg. 1999. « Fundamental Signals That Regulate Eosinophil Homing to the Gastrointestinal Tract ». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (12):1719-27. <https://doi.org/10.1172/JCI6560>.
- Mishra, Anil, Simon P. Hogan, Eric B. Brandt, et Marc E. Rothenberg. 2002. « IL-5 Promotes Eosinophil Trafficking to the Esophagus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (5):2464-69.
- Miyao, Takahisa, Stefan Floess, Ruka Setoguchi, Hervé Luche, Hans Joerg Fehling, Herman Waldmann, Jochen Huehn, et Shohei Hori. 2012. « Plasticity of Foxp3(+) T Cells Reflects Promiscuous Foxp3 Expression in Conventional T Cells but Not Reprogramming of Regulatory T Cells ». *Immunity* 36 (2):262-75. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.012>.
- Miyara, Makoto, Zahir Amoura, Christophe Parizot, Cécile Badoual, Karim Dorgham, Salim Trad, Dominique Nochy, Patrice Debré, Jean-Charles Piette, et Guy Gorochov. 2005. « Global Natural Regulatory T Cell Depletion in Active Systemic Lupus Erythematosus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (12):8392-8400.
- Miyara, Makoto, Yumiko Yoshioka, Akihiko Kitoh, Tomoko Shima, Kajsa Wing, Akira Niwa, Christophe Parizot, et al. 2009. « Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4<sup>+</sup> T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor ». *Immunity* 30 (6):899-911. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019>.
- Mondoulet, L., V. Dioszeghy, M. Ligouis, V. Dhelft, C. Dupont, et P.-H. Benhamou. 2010. « Epicutaneous Immunotherapy on Intact Skin Using a New Delivery System in a Murine Model of Allergy ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40 (4):659-67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03430.x>.
- Mondoulet, Lucie, Vincent Dioszeghy, Thibaut Larcher, Mélanie Ligouis, Véronique Dhelft, Emilie Puteaux, Yan Cherel, Franck Letourneur, Christophe Dupont, et Pierre-Henri Benhamou. 2012. « Epicutaneous Immunotherapy (EPIT) Blocks the Allergic Esophago-Gastro-Enteropathy Induced by Sustained Oral Exposure to Peanuts in Sensitized Mice ». *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031967>.
- Mondoulet, Lucie, Vincent Dioszeghy, Jeroen A. J. Vanoirbeek, Benoit Nemery, Christophe Dupont, et Pierre-Henri Benhamou. 2011. « Epicutaneous Immunotherapy Using a New Epicutaneous Delivery System in Mice Sensitized to Peanuts ». *International Archives of Allergy and Immunology* 154 (4):299-309. <https://doi.org/10.1159/000321822>.
- Moneret-Vautrin, D.-A. 2008. « Épidémiologie de l'allergie alimentaire ». *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 48 (3):171-78. <https://doi.org/10.1016/j.allerg.2008.01.018>.
- Moon, C., S. H. Kim, K. S. Park, B. K. Choi, H. S. Lee, J. B. Park, G. S. Choi, J. H. Kwan, J. W. Joh, et S. J. Kim. 2009. « Use of Epigenetic Modification to Induce FOXP3 Expression in Naïve T Cells ». *Transplantation Proceedings* 41 (5):1848-54. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.02.101>.
- Morgan, Mary E., Roelof Flierman, Leonie M. van Duivenvoorde, Hendrik J. Witteveen, Willem van Ewijk, Jacob M. van Laar, René R. P. De Vries, et René E. M. Toes. 2005. « Effective Treatment of Collagen-



- Induced Arthritis by Adoptive Transfer of CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells ». *Arthritis & Rheumatism* 52 (7):2212-21. <https://doi.org/10.1002/art.21195>.
- Morita, Hideaki, Kazuyo Moro, et Shigeo Koyasu. 2016. « Innate Lymphoid Cells in Allergic and Nonallergic Inflammation ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (5):1253-64. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.011>.
- Mottet, Christian, Holm H. Uhlig, et Fiona Powrie. 2003. « Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (8):3939-43.
- Mowat, Allan McI. 2003. « Anatomical Basis of Tolerance and Immunity to Intestinal Antigens ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (4):331-41. <https://doi.org/10.1038/nri1057>.
- Mucida, D. 2005. « Oral Tolerance in the Absence of Naturally Occurring Tregs ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (7):1923-33. <https://doi.org/10.1172/JCI24487>.
- Mullins, R. J., B. K. Wainstein, E. H. Barnes, W. K. Liew, et D. E. Campbell. 2016. « Increases in Anaphylaxis Fatalities in Australia from 1997 to 2013 ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 46 (8):1099-1110. <https://doi.org/10.1111/cea.12748>.
- Murai, M., P. Krause, H. Cheroutre, et M. Kronenberg. 2010. « Regulatory T-Cell Stability and Plasticity in Mucosal and Systemic Immune Systems ». *Mucosal Immunology* 3 (5):443-49. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.27>.
- Muto, Taichiro, Ayumi Fukuoka, Kenji Kabashima, Steven F. Ziegler, Kenji Nakanishi, Kazufumi Matsushita, et Tomohiro Yoshimoto. 2014. « The Role of Basophils and Proallergic Cytokines, TSLP and IL-33, in Cutaneously Sensitized Food Allergy ». *International Immunology* 26 (10):539-49. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu058>.
- Nanke, Yuki, Shigeru Kotake, Mari Goto, Hiroshi Ujihara, Masao Matsubara, et Naoyuki Kamatani. 2008. « Decreased Percentages of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Behcet's Disease before Ocular Attack: A Possible Predictive Marker of Ocular Attack ». *Modern Rheumatology* 18 (4):354-58. <https://doi.org/10.1007/s10165-008-0064-x>.
- Narisety, Satya D., Pamela A. Frischmeyer-Guerrero, Corinne A. Keet, Mark Gorelik, John Schroeder, Robert G. Hamilton, et Robert A. Wood. 2015. « A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Sublingual versus Oral Immunotherapy for the Treatment of Peanut Allergy ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (5):1275-1282.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.005>.
- Nelson, H. S., J. Lahr, R. Rule, A. Bock, et D. Leung. 1997. « Treatment of Anaphylactic Sensitivity to Peanuts by Immunotherapy with Injections of Aqueous Peanut Extract ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99 (6 Pt 1):744-51.
- Nieuwenhuizen, Natalie E., et Andreas L. Lopata. 2005. « Fighting Food Allergy: Current Approaches ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1056 (novembre):30-45. <https://doi.org/10.1196/annals.1352.003>.
- Nizar, S., J. Copier, B. Meyer, M. Bodman-Smith, C. Galustian, D. Kumar, et A. Dalgleish. 2009. « T-Regulatory Cell Modulation: The Future of Cancer Immunotherapy? » *British Journal of Cancer* 100 (11):1697-1703. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605040>.
- Noack, Mélissa, et Pierre Miossec. 2014. « Th17 and Regulatory T Cell Balance in Autoimmune and Inflammatory Diseases ». *Autoimmunity Reviews* 13 (6):668-77. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.12.004>.
- Noh, Joonyong, Jae Ho Lee, Geunwoong Noh, So Young Bang, Hyuk Soon Kim, Wahn Soo Choi, Sunheui Cho, et Sang Sun Lee. 2010. « Characterisation of Allergen-Specific Responses of IL-10-Producing Regulatory B Cells (Br1) in Cow Milk Allergy ». *Cellular Immunology* 264 (2):143-49. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.05.013>.
- Nomura, Masaru, Karren M. Plain, Nirupama Verma, Catherine Robinson, Rochelle Boyd, Suzanne J. Hodgkinson, et Bruce M. Hall. 2006. « The Cellular Basis of Cardiac Allograft Rejection. IX. Ratio of Naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Cells Determines Rejection or Tolerance ». *Transplant Immunology* 15 (4):311-18. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2006.01.003>.
- Nomura, Takashi, et Kenji Kabashima. 2016. « Advances in atopic dermatitis in 2015 ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (6):1548-55. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.10.004>.
- Noori-Zadeh, Ali, Seyed Alireza Mesbah-Namin, Sara Bistoon-Beigloo, Salar Bakhtiyari, Hojjat-Allah Abbaszadeh, Shahram Darabi, Masoumeh Rajabibazl, et Alireza Abdanipour. 2016. « Regulatory T Cell Number in Multiple Sclerosis Patients: A Meta-Analysis ». *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 5 (janvier):73-76. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.11.004>.
- Noori-Zadeh, Ali, Seyed Alireza Mesbah-Namin, et Ali Akbar Saboor-Yaraghi. 2017. « Epigenetic and Gene Expression Alterations of FOXP3 in the T Cells of EAE Mouse Model of Multiple Sclerosis ». *Journal of the Neurological Sciences* 375 (avril):203-8. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.01.060>.

- Nouri, Hamid Reza, Abdolreza Varasteh, Mahmoud Reza Jaafari, Janet M. Davies, et Mojtaba Sankian. 2015. « Induction of a Th1 Immune Response and Suppression of IgE via Immunotherapy with a Recombinant Hybrid Molecule Encapsulated in Liposome–protamine–DNA Nanoparticles in a Model of Experimental Allergy ». *Immunologic Research* 62 (3):280-91. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8659-8>.
- Novak, Natalija, Nihal Mete, Caroline Bussmann, Laura Maintz, Thomas Bieber, Mübeccel Akdis, Judith Zumkehr, Marek Jutel, et Cezmi Akdis. 2012. « Early Suppression of Basophil Activation during Allergen-Specific Immunotherapy by Histamine Receptor 2 ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (5):1153-1158.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.039>.
- Noval Rivas, Magali, Oliver T. Burton, Hans C. Oettgen, et Talal Chatila. 2016. « IL-4 Production by Group 2 Innate Lymphoid Cells Promotes Food Allergy by Blocking Regulatory T-Cell Function ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.030>.
- Noval Rivas, Magali, Oliver T. Burton, Petra Wise, Louis-Marie Charbonnier, Peter Georgiev, Hans C. Oettgen, Rima Rachid, et Talal A. Chatila. 2015. « Regulatory T Cell Reprogramming toward a Th2-Cell-like Lineage Impairs Oral Tolerance and Promotes Food Allergy ». *Immunity* 42 (3):512-23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.004>.
- Noval Rivas, Magali, et Talal A. Chatila. 2016. « Regulatory T Cells in Allergic Diseases ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (3):639-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.003>.
- Ochando, Jordi C., Adam C. Yopp, Yu Yang, Alexandre Garin, Yansui Li, Peter Boros, Jaime Llodra, et al. 2005. « Lymph Node Occupancy Is Required for the Peripheral Development of Alloantigen-Specific Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (11):6993-7005.
- Ohkura, Naganari, Masahide Hamaguchi, Hiromasa Morikawa, Kyoko Sugimura, Atsushi Tanaka, Yoshinaga Ito, Motono Osaki, et al. 2012. « T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development ». *Immunity* 37 (5):785-99. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.010>.
- Ohnmacht, Caspar, Joo-Hong Park, Sascha Cording, James B. Wing, Koji Atarashi, Yuuki Obata, Valérie Gaboriau-Routhiau, et al. 2015. « MUCOSAL IMMUNOLOGY. The Microbiota Regulates Type 2 Immunity through RORγ<sup>+</sup> T Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 349 (6251):989-93. <https://doi.org/10.1126/science.aac4263>.
- Okada, H., C. Kuhn, H. Feillet, et J.-F. Bach. 2010. « The “Hygiene Hypothesis” for Autoimmune and Allergic Diseases: An Update ». *Clinical and Experimental Immunology* 160 (1):1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x>.
- O’Keefe, Andrew W., Sarah De Schryver, Jennifer Mill, Christopher Mill, Alizee Dery, et Moshe Ben-Shoshan. 2014. « Diagnosis and Management of Food Allergies: New and Emerging Options: A Systematic Review ». *Journal of Asthma and Allergy* 7:141-64. <https://doi.org/10.2147/JAA.S49277>.
- Olivares-Villagómez, D., Y. Wang, et J. J. Lafaille. 1998. « Regulatory CD4(+) T Cells Expressing Endogenous T Cell Receptor Chains Protect Myelin Basic Protein-Specific Transgenic Mice from Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (10):1883-94.
- Onishi, Yasushi, Zoltan Fehervari, Tomoyuki Yamaguchi, et Shimon Sakaguchi. 2008. « Foxp3<sup>+</sup> Natural Regulatory T Cells Preferentially Form Aggregates on Dendritic Cells in Vitro and Actively Inhibit Their Maturation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29):10113-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711106105>.
- Oppenheimer, J. J., H. S. Nelson, S. A. Bock, F. Christensen, et D. Y. Leung. 1992. « Treatment of Peanut Allergy with Rush Immunotherapy ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90 (2):256-62.
- Osterfeld, Heather, Richard Ahrens, Richard Strait, Fred D. Finkelman, Jean-Christophe Renauld, et Simon P. Hogan. 2010. « Differential Roles for the IL-9/IL-9 Receptor Alpha-Chain Pathway in Systemic and Oral Antigen-Induced Anaphylaxis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2):469-476.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.054>.
- Ostroukhova, Marina, Carole Seguin-Devaux, Timothy B. Oriss, Barbara Dixon-McCarthy, Liyan Yang, Bill T. Ameredes, Timothy E. Corcoran, et Anuradha Ray. 2004. « Tolerance Induced by Inhaled Antigen Involves CD4(+) T Cells Expressing Membrane-Bound TGF-Beta and FOXP3 ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (1):28-38. <https://doi.org/10.1172/JCI20509>.
- Oyama, Tokushige, Soichiro Miura, Chikako Watanabe, Ryota Hokari, Yoichi Fujiyama, Shunsuke Komoto, Yoshikazu Tsuzuki, Naoki Hosoe, Hiroshi Nagata, et Toshifumi Hibi. 2007. « CXCL12 and CCL20 Play a Significant Role in Mucosal T-Lymphocyte Adherence to Intestinal Microvessels in Mice ». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 14 (7):753-66. <https://doi.org/10.1080/10739680701409993>.
- Pagovich, Odelya E., Bo Wang, Maria J. Chiuchiolo, Stephen M. Kaminsky, Dolan Sondhi, Clarisse L. Jose, Christina C. Price, Sarah F. Brooks, Jason G. Mezey, et Ronald G. Crystal. 2016. « Anti-HIgE Gene

- Therapy of Peanut-Induced Anaphylaxis in a Humanized Murine Model of Peanut Allergy ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, juin. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.053>.
- Pali-Schöll, Isabella, Helen Szöllösi, Philipp Starkl, Bernhard Scheicher, Caroline Stremmitzer, Alexander Hofmeister, Franziska Roth-Walter, et al. 2013. « Protamine Nanoparticles with CpG-Oligodeoxynucleotide Prevent an Allergen-Induced Th2-Response in BALB/c Mice ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 85 (3 Pt A):656-64. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.03.003>.
- Palomares, O. 2013. « The Role of Regulatory T Cells in IgE-Mediated Food Allergy ». *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 23 (6):371-382; quiz 2 p preceding 382.
- Parietti, Véronique, Fanny Monneaux, Marion Décossas, et Sylviane Muller. 2008. « Function of CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> Treg Cells in MRL/Lpr Mice Is Compromised by Intrinsic Defects in Antigen-Presenting Cells and Effector T Cells ». *Arthritis and Rheumatism* 58 (6):1751-61. <https://doi.org/10.1002/art.23464>.
- Park, Min-Jung, Hyun-Sil Park, Mi-La Cho, Hye-Joa Oh, Young-Gue Cho, So-Youn Min, Byung-Ha Chung, Jong-Wook Lee, Ho-Youn Kim, et Seok-Goo Cho. 2011. « Transforming Growth Factor  $\beta$ -Transduced Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Arthritis through Reciprocal Regulation of Treg/Th17 Cells and Osteoclastogenesis ». *Arthritis and Rheumatism* 63 (6):1668-80. <https://doi.org/10.1002/art.30326>.
- Pastorello, E. A., C. Ortolani, C. Incorvaia, L. Farioli, M. Italia, V. Pravettoni, R. J. Harris, et al. 1990. « A Double-Blind Study of Hyposensitization with an Alginate-Conjugated Extract of Dermatophagoides Pteronyssinus (Conjuvac®) in Patients with Perennial Rhinitis ». *Allergy* 45 (7):505-14. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1990.tb00526.x>.
- Patel, Piyush, Tom Holdich, Karl J. Fischer von Weikersthal-Drachenberg, et Birgit Huber. 2014. « Efficacy of a Short Course of Specific Immunotherapy in Patients with Allergic Rhinoconjunctivitis to Ragweed Pollen ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (1):121-129.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.05.032>.
- Pegelow, K. O., L. Belin, P. Broman, H. Heilborn, B. Sundin, et K. Watson. 1984. « Immunotherapy with Alginate-Conjugated and Alum-Precipitated Grass Pollen Extracts in Patients with Allergic Rhinoconjunctivitis ». *Allergy* 39 (4):275-90.
- Penhale, W. J., A. Farmer, R. P. McKenna, et W. J. Irvine. 1973. « Spontaneous Thyroiditis in Thymectomized and Irradiated Wistar Rats ». *Clinical and Experimental Immunology* 15 (2):225-36.
- Penhale, W. J., P. A. Stumbles, C. R. Huxtable, R. J. Sutherland, et D. W. Pethick. 1990. « Induction of Diabetes in PVG/c Strain Rats by Manipulation of the Immune System ». *Autoimmunity* 7 (2-3):169-79.
- Petzold, Cathleen, Julia Riewaldt, Deepika Watts, Tim Sparwasser, Sonja Schallenberg, et Karsten Kretschmer. 2013. « Foxp3(+) Regulatory T Cells in Mouse Models of Type 1 Diabetes ». *Journal of Diabetes Research* 2013:940710. <https://doi.org/10.1155/2013/940710>.
- Pohlit, H., I. Bellinghausen, H. Frey, et J. Saloga. 2017. « Recent Advances in the Use of Nanoparticles for Allergen-Specific Immunotherapy ». *Allergy* 72 (10):1461-74. <https://doi.org/10.1111/all.13199>.
- Ponvert, C. 2014. « Quoi de neuf en allergologie pédiatrique en 2013 ? Épidémiologie générale, diagnostic (précoce), traitement, anaphylaxie, allergie alimentaire, médicamenteuse et aux venins et salives d'insectes (une revue de la littérature internationale 2013) ». *Revue Française d'Allergologie* 54 (5):397-419. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2014.01.002>.
- Pouessel, Guillaume, Claire Clavierie, Julien Labreuche, Aimée Dorkenoo, Jean-Marie Renaudin, Mireille Eb, Stéphanie Lejeune, Antoine Deschildre, et Stéphane Leteurre. 2017. « Fatal Anaphylaxis in France: Analysis of National Anaphylaxis Data, 1979-2011 ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, mars. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.02.014>.
- Povoleri, Giovanni Antonio Maria, Cristiano Scottà, Estefania Andrea Nova-Lamperti, Susan John, Giovanna Lombardi, et Behdad Afzali. 2013. « Thymic versus Induced Regulatory T Cells - Who Regulates the Regulators? » *Frontiers in Immunology* 4:169. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00169>.
- Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, L. B. Caddle, et R. L. Coffman. 1993. « Phenotypically Distinct Subsets of CD4<sup>+</sup> T Cells Induce or Protect from Chronic Intestinal Inflammation in C. B-17 Scid Mice ». *International Immunology* 5 (11):1461-71.
- Powrie, F., et D. Mason. 1990. « OX-22high CD4<sup>+</sup> T Cells Induce Wasting Disease with Multiple Organ Pathology: Prevention by the OX-22low Subset ». *The Journal of Experimental Medicine* 172 (6):1701-8.
- Prince, Benjamin T., Ashley L. Devonshire, Kristin A. Erickson, Jenna Bergerson, Dalia Fuleihan, Christine Szychliński, Robert P. Schleimer, Paul J. Bryce, et Anne Marie Singh. 2017. « Regulatory T Cell Populations in Children Are Affected by Age and Food Allergy Diagnosis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.039>.

- Proietto, Anna I., Serani van Dommelen, Penghui Zhou, Alexandra Rizzitelli, Angela D'Amico, Raymond J. Steptoe, Shalin H. Naik, et al. 2008. « Dendritic Cells in the Thymus Contribute to T-Regulatory Cell Induction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (50):19869-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810268105>.
- Provoost, S., T. Maes, Y. M. van Durme, P. Gevaert, C. Bachert, C. B. Schmidt-Weber, G. G. Brusselle, G. F. Joos, et K. G. Tournoy. 2009. « Decreased FOXP3 Protein Expression in Patients with Asthma ». *Allergy* 64 (10):1539-46. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02056.x>.
- Punnonen, J., R. de Waal Malefyt, P. van Vlasselaer, J. F. Gauchat, et J. E. de Vries. 1993. « IL-10 and Viral IL-10 Prevent IL-4-Induced IgE Synthesis by Inhibiting the Accessory Cell Function of Monocytes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 151 (3):1280-89.
- Qamar, N., A. B. Fishbein, K. A. Erickson, M. Cai, C. Szychliński, P. J. Bryce, R. P. Schleimer, R. L. Fuleihan, et A. M. Singh. 2015. « Naturally Occurring Tolerance Acquisition to Foods in Previously Allergic Children Is Characterized by Antigen Specificity and Associated with Increased Subsets of Regulatory T Cells ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 45 (11):1663-72. <https://doi.org/10.1111/cea.12570>.
- Redpath, Stephen A., Nienke van der Werf, Ana M. Cervera, Andrew S. MacDonald, David Gray, Rick M. Maizels, et Matthew D. Taylor. 2013. « ICOS Controls Foxp3+ Regulatory T-Cell Expansion, Maintenance and IL-10 Production during Helminth Infection ». *European Journal of Immunology* 43 (3):705-15. <https://doi.org/10.1002/eji.201242794>.
- Ren, Chengcheng, Qiuxiang Zhang, Gang Wang, Chunqing Ai, Mengsha Hu, Xiaoming Liu, Fengwei Tian, et al. 2014. « Modulation of Peanut-Induced Allergic Immune Responses by Oral Lactic Acid Bacteria-Based Vaccines in Mice ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (14):6353-64. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5678-7>.
- Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong, et Y. Wang. 2007. « Involvement of Cellular Death in TRAIL/DR5-Dependent Suppression Induced by CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells ». *Cell Death and Differentiation* 14 (12):2076-84. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402220>.
- Robb, R. J. 1984. « Interleukin 2: The Molecule and Its Function ». *Immunology Today* 5 (7):203-9. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(84\)90224-X](https://doi.org/10.1016/0167-5699(84)90224-X).
- Rona, Roberto J., Thomas Keil, Colin Summers, David Gislason, Laurian Zuidmeer, Eva Sodergren, Sigurveig T. Sigurdardottir, et al. 2007. « The Prevalence of Food Allergy: A Meta-Analysis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (3):638-46. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.05.026>.
- Roncador, Giovanna, Philip J. Brown, Lorena Maestre, Sophie Hue, Jorge L. Martínez-Torrecuadrada, Khoon-Lin Ling, Sarah Pratap, et al. 2005. « Analysis of FOXP3 Protein Expression in Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells at the Single-Cell Level ». *European Journal of Immunology* 35 (6):1681-91. <https://doi.org/10.1002/eji.200526189>.
- Rothenberg, Marc E., Amy D. Klion, Florence E. Roufosse, Jean Emmanuel Kahn, Peter F. Weller, Hans-Uwe Simon, Lawrence B. Schwartz, et al. 2008. « Treatment of Patients with the Hypereosinophilic Syndrome with Mepolizumab ». *The New England Journal of Medicine* 358 (12):1215-28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070812>.
- Roy, K., H. Q. Mao, S. K. Huang, et K. W. Leong. 1999. « Oral Gene Delivery with Chitosan-DNA Nanoparticles Generates Immunologic Protection in a Murine Model of Peanut Allergy ». *Nature Medicine* 5 (4):387-91. <https://doi.org/10.1038/7385>.
- Royal, R. E., S. M. Steinberg, R. S. Krouse, G. Heywood, D. E. White, P. Hwu, F. M. Marincola, et al. 1996. « Correlates of Response to IL-2 Therapy in Patients Treated for Metastatic Renal Cancer and Melanoma ». *The Cancer Journal from Scientific American* 2 (2):91-98.
- Rubtsov, Yuri P., Jeffrey P. Rasmussen, Emil Y. Chi, Jason Fontenot, Luca Castelli, Xin Ye, Piper Treuting, et al. 2008. « Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces ». *Immunity* 28 (4):546-58. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.017>.
- Ryan, John J., Brian Barnstein, Matthew Macey, Warren Leonard, Ethan Shevach, Angela Thornton, et Mohit Kashyap. 2008. « Regulation of Mast Cell Function by Regulatory T Cells ». *The FASEB Journal* 22 (1\_MeetingAbstracts):1075.8.
- Ryba-Stanisławowska, Monika, Karolina Rybarczyk-Kapturska, Małgorzata Myśliwiec, et Jolanta Myśliwska. 2014. « Elevated Levels of Serum IL-12 and IL-18 Are Associated with Lower Frequencies of CD4(+)CD25 (High)FOXP3 (+) Regulatory t Cells in Young Patients with Type 1 Diabetes ». *Inflammation* 37 (5):1513-20. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9878-1>.
- Saadoun, David, Michelle Rosenzweig, Florence Joly, Adrien Six, Fabrice Carrat, Vincent Thibault, Damien Sene, Patrice Cacoub, et David Klatzmann. 2011. « Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis ». *New England Journal of Medicine* 365 (22):2067-2077.

- Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, et T. Masuda. 1985. « Organ-Specific Autoimmune Diseases Induced in Mice by Elimination of T Cell Subset. I. Evidence for the Active Participation of T Cells in Natural Self-Tolerance; Deficit of a T Cell Subset as a Possible Cause of Autoimmune Disease ». *The Journal of Experimental Medicine* 161 (1):72-87.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, et M. Toda. 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 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 155 (3):1151-64.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, et T. Takahashi. 2001. « Immunologic Tolerance Maintained by CD25+ CD4+ Regulatory T Cells: Their Common Role in Controlling Autoimmunity, Tumor Immunity, and Transplantation Tolerance ». *Immunological Reviews* 182 (août):18-32.
- Sakaguchi, S., T. Takahashi, et Y. Nishizuka. 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 ». *The Journal of Experimental Medicine* 156 (6):1577-86.
- Sakaguchi, Shimon, Masahiro Ono, Ruka Setoguchi, Haruhiko Yagi, Shohei Hori, Zoltan Fehervari, Jun Shimizu, Takeshi Takahashi, et Takashi Nomura. 2006. « Foxp3+ CD25+ CD4+ Natural Regulatory T Cells in Dominant Self-Tolerance and Autoimmune Disease ». *Immunological Reviews* 212 (août):8-27. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x>.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, et J. A. Bluestone. 2000. « B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells That Control Autoimmune Diabetes ». *Immunity* 12 (4):431-40.
- Sampson, Hugh A., Donald Y. M. Leung, A. Wesley Burks, Gideon Lack, Sami L. Bahna, Stacie M. Jones, et Dennis A. Wong. 2011. « A Phase II, Randomized, Double-blind, Parallel-group, Placebo-controlled Oral Food Challenge Trial of Xolair (Omalizumab) in Peanut Allergy ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (5):1309-1310.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.051>.
- Sánchez-Fueyo, Alberto, Martina Weber, Christoph Domenig, Terry B. Strom, et Xin Xiao Zheng. 2002. « Tracking the Immunoregulatory Mechanisms Active during Allograft Tolerance ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (5):2274-81.
- Sarris, Milka, Kristian G. Andersen, Felix Randow, Luzia Mayr, et Alexander G. Betz. 2008. « Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition ». *Immunity* 28 (3):402-13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.012>.
- Sather, Blythe D., Piper Treuting, Nikole Perdue, Mike Miazgowiec, Jason D. Fontenot, Alexander Y. Rudensky, et Daniel J. Campbell. 2007. « Altering the Distribution of Foxp3+ Regulatory T Cells Results in Tissue-Specific Inflammatory Disease ». *Journal of Experimental Medicine* 204 (6):1335-47. <https://doi.org/10.1084/jem.20070081>.
- Scalapino, Kenneth J., Qizhi Tang, Jeffrey A. Bluestone, Mark L. Bonyhadi, et David I. Daikh. 2006. « Suppression of Disease in New Zealand Black/New Zealand White Lupus-Prone Mice by Adoptive Transfer of Ex Vivo Expanded Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (3):1451-59.
- Schaub, Bianca, Jing Liu, Sabine Höppler, Severine Haug, Christine Sattler, Anna Lluís, Sabina Illi, et Erika von Mutius. 2008. « Impairment of T-Regulatory Cells in Cord Blood of Atopic Mothers ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (6):1491-99, 1499.e1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.010>.
- Scherf, Wiebke, Stefan Burdach, et Gesine Hansen. 2005. « Reduced Expression of Transforming Growth Factor Beta 1 Exacerbates Pathology in an Experimental Asthma Model ». *European Journal of Immunology* 35 (1):198-206. <https://doi.org/10.1002/eji.200425209>.
- Schiering, Chris, Thomas Krausgruber, Agnieszka Chomka, Anja Fröhlich, Krista Adelmann, Elizabeth A. Wohlfert, Johanna Pott, et al. 2014. « The Alarmin IL-33 Promotes Regulatory T-Cell Function in the Intestine ». *Nature* 513 (7519):564-68. <https://doi.org/10.1038/nature13577>.
- Schülke, Stefan, Manja Burggraf, Zoe Waibler, Andrea Wangorsch, Sonja Wolfheimer, Ulrich Kalinke, Stefan Vieths, Masako Toda, et Stephan Scheurer. 2011. « A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (6):1340-1348.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.036>.
- Schulz, Olga, Elin Jaensson, Emma K. Persson, Xiaosun Liu, Tim Worbs, William W. Agace, et Oliver Pabst. 2009. « Intestinal CD103+, but Not CX3CR1+, Antigen Sampling Cells Migrate in Lymph and Serve Classical Dendritic Cell Functions ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (13):3101-14. <https://doi.org/10.1084/jem.20091925>.

- Seddiki, Nabila, Brigitte Santner-Nanan, Jeff Martinson, John Zaunders, Sarah Sasson, Alan Landay, Michael Solomon, et al. 2006. « Expression of Interleukin (IL)-2 and IL-7 Receptors Discriminates between Human Regulatory and Activated T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (7):1693-1700. <https://doi.org/10.1084/jem.20060468>.
- Sefik, Esen, Naama Geva-Zatorsky, Sungwhan Oh, Liza Konnikova, David Zemmour, Abigail Manson McGuire, Dalia Burzyn, et al. 2015. « MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual Intestinal Symbionts Induce a Distinct Population of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> Regulatory T Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 349 (6251):993-97. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9420>.
- Senna, Gian Enrico, Moises Calderon, et Massimo Milani. 2011. « Allergy Immunotherapy Tablet: Grazax® for the Treatment of Grass Pollen Allergy ». *Expert Review of Clinical Immunology* 7 (1):21-27. <https://doi.org/10.1586/eci.10.89>.
- Senti, G., P. Johansen, S. Haug, C. Bull, C. Gottschaller, P. Müller, T. Pfister, et al. 2009. « Use of A-Type CpG Oligodeoxynucleotides as an Adjuvant in Allergen-Specific Immunotherapy in Humans: A Phase I/IIa Clinical Trial ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39 (4):562-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03191.x>.
- Sharma, Naveen, Alexandre P. Benechet, Leo Lefrançois, et Kamal M. Khanna. 2015. « CD8 T Cells Enter the Splenic T Cell Zones Independently of CCR7, but the Subsequent Expansion and Trafficking Patterns of Effector T Cells after Infection Are Dysregulated in the Absence of CCR7 Migratory Cues ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195 (11):5227-36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500993>.
- Shevach, Ethan M., et Angela M. Thornton. 2014. « tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences ». *Immunological reviews* 259 (1):88-102.
- Shim, Jua, Eun-So Lee, Sun Park, Dongsik Bang, et Seonghyang Sohn. 2011. « CD4(+) CD25(+) Regulatory T Cells Ameliorate Behcet's Disease-like Symptoms in a Mouse Model ». *Cytotherapy* 13 (7):835-47. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.571245>.
- Shimizu, Jun, Sayuri Yamazaki, Takeshi Takahashi, Yasumasa Ishida, et Shimon Sakaguchi. 2002. « Stimulation of CD25(+)CD4(+) Regulatory T Cells through GITR Breaks Immunological Self-Tolerance ». *Nature Immunology* 3 (2):135-42. <https://doi.org/10.1038/ni759>.
- Shiokawa, Aya, Kosuke Tanabe, Noriko M. Tsuji, Ryuichiro Sato, et Satoshi Hachimura. 2009. « IL-10 and IL-27 Producing Dendritic Cells Capable of Enhancing IL-10 Production of T Cells Are Induced in Oral Tolerance ». *Immunology Letters* 125 (1):7-14. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.05.002>.
- Shreffler, Wayne G., Russell R. Castro, Z. Yesim Kucuk, Zachary Charlop-Powers, Galina Grishina, Steven Yoo, A. Wesley Burks, et Hugh A. Sampson. 2006. « The Major Glycoprotein Allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, Is a Ligand of Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin and Acts as a Th2 Adjuvant in Vitro ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (6):3677-85.
- Sicherer, Scott H., et Hugh A. Sampson. 2014. « Food Allergy: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (2):291-307.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020>.
- Singh, Kailash, Marcus Hjort, Lina Thorvaldson, et Stellan Sandler. 2015. « Concomitant Analysis of Helios and Neuropilin-1 as a Marker to Detect Thymic Derived Regulatory T Cells in Naïve Mice ». *Scientific Reports* 5 (janvier):7767. <https://doi.org/10.1038/srep07767>.
- Sletten, Gaynour B. G., Ragnhild Halvorsen, Eliann Egaas, et Trond S. Halstensen. 2007. « Memory T Cell Proliferation in Cow's Milk Allergy after CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Removal Suggests a Role for Casein-Specific Cellular Immunity in IgE-Mediated but Not in Non-IgE-Mediated Cow's Milk Allergy ». *International Archives of Allergy and Immunology* 142 (3):190-98. <https://doi.org/10.1159/000097021>.
- Smarr, Charles B., Paul J. Bryce, et Stephen D. Miller. 2013. « Antigen-Specific Tolerance in Immunotherapy of Th2-Associated Allergic Diseases ». *Critical Reviews in Immunology* 33 (5):389-414.
- Soller, Lianne, Moshe Ben-Shoshan, Daniel W. Harrington, Joseph Fragapane, Lawrence Joseph, Yvan St. Pierre, Samuel B. Godefroy, Sebastien La Vieille, Susan J. Elliott, et Ann E. Clarke. 2012. « Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (4):986-88. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.029>.
- Solomou, E. E., Y. T. Juang, M. F. Gourley, G. M. Kammer, et G. C. Tsokos. 2001. « Molecular Basis of Deficient IL-2 Production in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (6):4216-22.
- Spahn, Thomas W., Howard L. Weiner, Paul D. Rennert, Norbert Lügering, Adriano Fontana, Wolfram Domschke, et Torsten Kucharzik. 2002. « Mesenteric Lymph Nodes Are Critical for the Induction of High-Dose Oral Tolerance in the Absence of Peyer's Patches ». *European Journal of Immunology* 32

- (4):1109-13. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200204\)32:4<1109::AID-IMMU1109>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200204)32:4<1109::AID-IMMU1109>3.0.CO;2-K).
- Spee-Mayer, Caroline von, Elise Siegert, Dimas Abdirama, Angelika Rose, Anika Klaus, Tobias Alexander, Philipp Enghard, et al. 2015. « Low-Dose Interleukin-2 Selectively Corrects Regulatory T Cell Defects in Patients with Systemic Lupus Erythematosus ». *Annals of the Rheumatic Diseases*, août. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207776>.
- Spergel, Jonathan M., Marc E. Rothenberg, Margaret H. Collins, Glenn T. Furuta, Jonathan E. Markowitz, George Fuchs, Molly A. O’Gorman, et al. 2012. « Reslizumab in Children and Adolescents with Eosinophilic Esophagitis: Results of a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (2):456-463.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.11.044>.
- Staudt, Valérie, Evita Bothur, Matthias Klein, Karen Lingnau, Sebastian Reuter, Nadine Grebe, Bastian Gerlitzki, et al. 2010. « Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells ». *Immunity* 33 (2):192-202. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.014>.
- Stefka, Andrew T., Taylor Feehley, Prabhanshu Tripathi, Ju Qiu, Kathy McCoy, Sarkis K. Mazmanian, Melissa Y. Tjota, et al. 2014. « Commensal Bacteria Protect against Food Allergen Sensitization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (36):13145-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412008111>.
- Steinbach, Erin C., et Scott E. Plevy. 2014. « The Role of Macrophages and Dendritic Cells in the Initiation of Inflammation in IBD ». *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (1):166-75. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e3182a69dca>.
- Stelmaszczyk-Emmel, Anna, Anna Zawadzka-Krajewska, Eliza Głodkowska-Mrówka, et Urszula Demkow. 2015. « FoxP3 Tregs Response to Sublingual Allergen Specific Immunotherapy in Children Depends on the Manifestation of Allergy ». *Journal of Immunology Research* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/731381>.
- Stenstad, Hanna, Anna Ericsson, Bengt Johansson-Lindbom, Marcus Svensson, Jan Marsal, Matthias Mack, Dominic Picarella, et al. 2006. « Gut-Associated Lymphoid Tissue-primed CD4+ T Cells Display CCR9-Dependent and -Independent Homing to the Small Intestine ». *Blood* 107 (9):3447-54. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2860>.
- Stone, Kelly D., Calman Prussin, et Dean D. Metcalfe. 2010. « IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2):S73-80. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017>.
- Strait, Richard T., Suzanne C. Morris, Kristi Smiley, Joseph F. Urban, et Fred D. Finkelman. 2003. « IL-4 Exacerbates Anaphylaxis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (7):3835-42.
- Suffia, Isabelle, Stacie K. Reckling, Gerson Salay, et Yasmine Belkaid. 2005. « A Role for CD103 in the Retention of CD4+CD25+ Treg and Control of Leishmania Major Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (9):5444-55.
- Sugihara, S., Y. Izumi, T. Yoshioka, H. Yagi, T. Tsujimura, O. Tarutani, Y. Kohno, S. Murakami, T. Hamaoka, et H. Fujiwara. 1988. « Autoimmune Thyroiditis Induced in Mice Depleted of Particular T Cell Subsets. I. Requirement of Lyt-1 Dull L3T4 Bright Normal T Cells for the Induction of Thyroiditis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 141 (1):105-13.
- Sugita, Sunao, Yukiko Yamada, Satoshi Kaneko, Shintaro Horie, et Manabu Mochizuki. 2011. « Induction of Regulatory T Cells by Infliximab in Behcet’s Disease ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (1):476-84. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5916>.
- Sumitomo, Shuji, et Kazuhiko Yamamoto. 2010. « CD4+CD25-LAG-3+ T Cells in Mouse and Human ». *Nihon Rinsho Men’eki Gakkai Kaishi = Japanese Journal of Clinical Immunology* 33 (2):92-98.
- Sun, Cheng-Ming, Jason A. Hall, Rebecca B. Blank, Nicolas Bouladoux, Mohamed Oukka, J. Rodrigo Mora, et Yasmine Belkaid. 2007. « Small Intestine Lamina Propria Dendritic Cells Promote de Novo Generation of Foxp3 T Reg Cells via Retinoic Acid ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (8):1775-85. <https://doi.org/10.1084/jem.20070602>.
- Syed, Aleena, Marco A. Garcia, Shu-Chen Lyu, Robert Bucayu, Arunima Kohli, Satoru Ishida, Jelena P. Berglund, et al. 2014. « Peanut Oral Immunotherapy Results in Increased Antigen-Induced Regulatory T-Cell Function and Hypomethylation of Forkhead Box Protein 3 (FOXP3) ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (2):500-510. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1037>.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, et L. H. Glimcher. 2000. « A Novel Transcription Factor, T-Bet, Directs Th1 Lineage Commitment ». *Cell* 100 (6):655-69.
- Szalai, Krisztina, Jan Fuhrmann, Tea Pavkov, Michael Scheidl, Julia Wallmann, Kira H. Brämshwig, Susanne Vrtala, et al. 2008. « Mimotopes Identify Conformational B-Cell Epitopes on the Two Major House

- Dust Mite Allergens Der p 1 and Der p 2 ». *Molecular Immunology* 45 (5):1308-17. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.012>.
- Szanya, Veronika, Joerg Ermann, Cariel Taylor, Claire Holness, et C. Garrison Fathman. 2002. « The Subpopulation of CD4+CD25+ Splenocytes That Delays Adoptive Transfer of Diabetes Expresses L-Selectin and High Levels of CCR7 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (5):2461-65.
- Tadokoro, Carlos E., Guy Shakh, Shiqian Shen, Yi Ding, Andreia C. Lino, Antonio Maraver, Juan J. Lafaille, et Michael L. Dustin. 2006. « Regulatory T Cells Inhibit Stable Contacts between CD4+ T Cells and Dendritic Cells in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (3):505-11. <https://doi.org/10.1084/jem.20050783>.
- Taguchi, O., et Y. Nishizuka. 1981. « Experimental Autoimmune Orchitis after Neonatal Thymectomy in the Mouse ». *Clinical and Experimental Immunology* 46 (2):425-34.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, et S. Sakaguchi. 1998. « Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells: Induction of Autoimmune Disease by Breaking Their Anergic/Suppressive State ». *International Immunology* 10 (12):1969-80.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, et S. Sakaguchi. 2000. « Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25(+)CD4(+) Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (2):303-10.
- Takanashi, S., R. Nonaka, Z. Xing, P. O'Byrne, J. Dolovich, et M. Jordana. 1994. « Interleukin 10 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Survival and Cytokine Production by Human Peripheral Blood Eosinophils ». *The Journal of Experimental Medicine* 180 (2):711-15.
- Tang, Qizhi, Jason Y. Adams, Cristina Penaranda, Kristin Melli, Eliane Piaggio, Evridiki Sgouroudis, Ciriaco A. Piccirillo, Benoit L. Salomon, et Jeffrey A. Bluestone. 2008. « Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction ». *Immunity* 28 (5):687-97. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.016>.
- Tang, Qizhi, et Jeffrey A. Bluestone. 2008. « The Foxp3+ Regulatory T Cell: A Jack of All Trades, Master of Regulation ». *Nature Immunology* 9 (3):239-44. <https://doi.org/10.1038/ni1572>.
- . 2013. « Regulatory T-Cell Therapy in Transplantation: Moving to the Clinic ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015552>.
- Tang, Qizhi, Kammi J. Henriksen, Mingying Bi, Erik B. Finger, Greg Szot, Jianqin Ye, Emma L. Masteller, Hugh McDevitt, Mark Bonyhadi, et Jeffrey A. Bluestone. 2004. « In Vitro-Expanded Antigen-Specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (11):1455-65. <https://doi.org/10.1084/jem.20040139>.
- Tang, Qizhi, Kammi J. Henriksen, Elisa K. Boden, Aaron J. Tooley, Jianqin Ye, Sumit K. Subudhi, Xin X. Zheng, Terry B. Strom, et Jeffrey A. Bluestone. 2003. « Cutting Edge: CD28 Controls Peripheral Homeostasis of CD4+CD25+ Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (7):3348-52.
- Tanoue, Takeshi, Koji Atarashi, et Kenya Honda. 2016. « Development and Maintenance of Intestinal Regulatory T Cells ». *Nature Reviews. Immunology* 16 (5):295-309. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.36>.
- Tarbell, Kristin V., Lucine Petit, Xiaopan Zuo, Priscilla Toy, Xunrong Luo, Amina Mqadmi, Hua Yang, Manikkam Suthanthiran, Svetlana Mojsov, et Ralph M. Steinman. 2007. « Dendritic Cell-Expanded, Islet-Specific CD4+ CD25+ CD62L+ Regulatory T Cells Restore Normoglycemia in Diabetic NOD Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (1):191-201. <https://doi.org/10.1084/jem.20061631>.
- Tartar, Danielle M., Amie M. VanMorlan, Xiaoxiao Wan, F. Betul Guloglu, Renu Jain, Cara L. Haymaker, Jason S. Ellis, et al. 2010. « FoxP3+RORgammat+ T Helper Intermediates Display Suppressive Function against Autoimmune Diabetes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (7):3377-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903324>.
- Tarzi, M., S. Klunker, C. Texier, A. Verhoef, S. O. Stapel, C. A. Akdis, B. Maillere, A. B. Kay, et M. Larché. 2006. « Induction of Interleukin-10 and Suppressor of Cytokine Signalling-3 Gene Expression Following Peptide Immunotherapy ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36 (4):465-74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02469.x>.
- Tasaniyananda, Natt, Urai Chaisri, Anchalee Tungtrongchitr, Wanpen Chaicumpa, et Nitat Sookrung. 2016. « Mouse Model of Cat Allergic Rhinitis and Intranasal Liposome-Adjuvanted Refined Fel d 1 Vaccine ». *PLoS ONE* 11 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150463>.



- Taylor, P. A., R. J. Noelle, et B. R. Blazar. 2001. « CD4(+)CD25(+) Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (11):1311-18.
- Taylor, Patricia A., Christopher J. Lees, et Bruce R. Blazar. 2002. « The Infusion of Ex Vivo Activated and Expanded CD4(+)CD25(+) Immune Regulatory Cells Inhibits Graft-versus-Host Disease Lethality ». *Blood* 99 (10):3493-99.
- Teixeira, Leonardo K., Bruna P. F. Fonseca, Bianca A. Barboza, et João P. B. Viola. 2005. « The Role of Interferon-Gamma on Immune and Allergic Responses ». *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1 (mars):137-44. <https://doi.org/S0074-02762005000900024>.
- Temann, U. A., G. P. Geba, J. A. Rankin, et R. A. Flavell. 1998. « Expression of Interleukin 9 in the Lungs of Transgenic Mice Causes Airway Inflammation, Mast Cell Hyperplasia, and Bronchial Hyperresponsiveness ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (7):1307-20.
- TePas, Elizabeth C., Elisabeth G. Hoyte, Jennifer J. McIntire, et Dale T. Umetsu. 2004. « Clinical Efficacy of Microencapsulated Timothy Grass Pollen Extract in Grass-Allergic Individuals ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 92 (1):25-31. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61706-1](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61706-1).
- Thornton, Angela M., Patricia E. Kory, Dat Q. Tran, Elizabeth A. Wohlfert, Patrick E. Murray, Yasmine Belkaid, et Ethan M. Shevach. 2010. « Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (7):3433-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904028>.
- Tordesillas, Leticia, Ritobrata Goswami, Sara Benedé, Galina Grishina, David Dunkin, Kirsi M. Järvinen, Soheila J. Maleki, Hugh A. Sampson, et M. Cecilia Berin. 2014. « Skin Exposure Promotes a Th2-Dependent Sensitization to Peanut Allergens ». *The Journal of Clinical Investigation* 124 (11):4965-75. <https://doi.org/10.1172/JCI75660>.
- Torgerson, Troy R., Avriel Linane, Nicolette Moes, Stephanie Anover, Véronique Mateo, Frédéric Rieux-Laucat, Olivier Hermine, et al. 2007. « Severe Food Allergy as a Variant of IPEX Syndrome Caused by a Deletion in a Noncoding Region of the FOXP3 Gene ». *Gastroenterology* 132 (5):1705-17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.044>.
- Tran, Dat Q., Heather Ramsey, et Ethan M. Shevach. 2007. « Induction of FOXP3 Expression in Naive Human CD4+FOXP3 T Cells by T-Cell Receptor Stimulation Is Transforming Growth Factor-Beta Dependent but Does Not Confer a Regulatory Phenotype ». *Blood* 110 (8):2983-90. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094656>.
- Trinchieri, Giorgio. 2007. « Interleukin-10 Production by Effector T Cells: Th1 Cells Show Self Control ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (2):239-43. <https://doi.org/10.1084/jem.20070104>.
- Trompette, Aurelien, Senad Divanovic, Alberto Visintin, Carine Blanchard, Rashmi S. Hegde, Rajat Madan, Peter S. Thorne, et al. 2009. « Allergenicity Resulting from Functional Mimicry of a Toll-like Receptor Complex Protein ». *Nature* 457 (7229):585-88. <https://doi.org/10.1038/nature07548>.
- Trzonkowski, Piotr, Maria Bieniaszewska, Jolanta Juścińska, Anita Dobyszek, Adam Krzystyniak, Natalia Marek, Jolanta Myśliwska, et Andrzej Hellmann. 2009. « First-in-Man Clinical Results of the Treatment of Patients with Graft versus Host Disease with Human Ex Vivo Expanded CD4+CD25+CD127- T Regulatory Cells ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 133 (1):22-26. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.06.001>.
- Turner, Paul J., M. Hazel Gowland, Vibha Sharma, Despo Ierodiakonou, Nigel Harper, Tomaz Garcez, Richard Pumphrey, et Robert J. Boyle. 2015. « Increase in Anaphylaxis-Related Hospitalizations but No Increase in Fatalities: An Analysis of United Kingdom National Anaphylaxis Data, 1992-2012 ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (4):956-963.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.021>.
- Umetsu, Dale T., Rima Rachid, et Lynda C. Schneider. 2015. « Oral Immunotherapy and Anti-IgE Antibody Treatment for Food Allergy ». *The World Allergy Organization Journal* 8 (1):20. <https://doi.org/10.1186/s40413-015-0070-3>.
- Untersmayr, Eva, Krisztina Szalai, Angelika B. Riemer, Wolfgang Hemmer, Ines Swoboda, Brigitte Hantusch, Isabella Schöll, et al. 2006. « Mimotopes Identify Conformational Epitopes on Parvalbumin, the Major Fish Allergen ». *Molecular Immunology* 43 (9):1454-61. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.07.038>.
- Valencia, Xavier, Cheryl Yarboro, Gabor Illei, et Peter E. Lipsky. 2007. « Deficient CD4+CD25high T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (4):2579-88.

- Van de Keere, F., et S. Tonegawa. 1998. « CD4(+) T Cells Prevent Spontaneous Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Anti-Myelin Basic Protein T Cell Receptor Transgenic Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (10):1875-82.
- Varshney, Pooja, Stacie M. Jones, Amy M. Scurlock, Tamara T. Perry, Alex Kemper, Pamela Steele, Anne Hiegel, et al. 2011. « A Randomized Controlled Study of Peanut Oral Immunotherapy: Clinical Desensitization and Modulation of the Allergic Response ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (3):654-60. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1111>.
- Vazquez-Ortiz, M., M. Alvaro, M. Piquer, O. Dominguez, A. Machinena, M. A. Martín-Mateos, et A. M. Plaza. 2014. « Baseline Specific IgE Levels Are Useful to Predict Safety of Oral Immunotherapy in Egg-Allergic Children ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44 (1):130-41. <https://doi.org/10.1111/cea.12233>.
- Vázquez-Ortiz, M., M. Alvaro-Lozano, L. Alsina, M. B. Garcia-Paba, M. Piquer-Gibert, M. T. Giner-Muñoz, J. Lozano, et al. 2013. « Safety and Predictors of Adverse Events during Oral Immunotherapy for Milk Allergy: Severity of Reaction at Oral Challenge, Specific IgE and Prick Test ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 43 (1):92-102. <https://doi.org/10.1111/cea.12012>.
- Veen, Willem van de, Oliver F Wirz, Anna Globinska, et Mübeccel Akdis. 2017. « Novel mechanisms in immune tolerance to allergens during natural allergen exposure and allergen-specific immunotherapy ». *Current Opinion in Immunology* 48 (octobre):74-81. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.08.012>.
- Veldhoen, Marc, Catherine Uyttenhove, Jacques van Snick, Helena Helmbj, Astrid Westendorf, Jan Buer, Bruno Martin, Christoph Wilhelm, et Brigitta Stockinger. 2008. « Transforming Growth Factor-Beta "Reprograms" the Differentiation of T Helper 2 Cells and Promotes an Interleukin 9-Producing Subset ». *Nature Immunology* 9 (12):1341-46. <https://doi.org/10.1038/ni.1659>.
- Venuprasad, K., K. Venuprasad Poojary, Yi-Chi M. Kong, et Michael A. Farrar. 2010. « Control of Th2-Mediated Inflammation by Regulatory T Cells ». *The American Journal of Pathology* 177 (2):525-31. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090936>.
- Verbsky, James W., et Talal A. Chatila. 2013. « Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked (IPEX) and IPEX-Related Disorders: An Evolving Web of Heritable Autoimmune Diseases ». *Current Opinion in Pediatrics* 25 (6):708-14. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000029>.
- Vezir, Emine, Mustafa Erkoçoğlu, Ayşenur Kaya, Müge Toyran, Celal Özcan, Ayşegül Akan, Dilek Azkur, Tayfur Giniş, Ersoy Civelek, et Can Naci Kocabaş. 2013. « Characteristics of Anaphylaxis in Children Referred to a Tertiary Care Center ». *Allergy and Asthma Proceedings: The Official Journal of Regional and State Allergy Societies* 34 (3):239-46. <https://doi.org/10.2500/aap.2013.34.3654>.
- Viglietta, Vissia, Clare Baecher-Allan, Howard L. Weiner, et David A. Hafler. 2004. « Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (7):971-79. <https://doi.org/10.1084/jem.20031579>.
- Vignali, Dario A. A., Lauren W. Collison, et Creg J. Workman. 2008. « How Regulatory T Cells Work ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (7):523-32. <https://doi.org/10.1038/nri2343>.
- Villalta, S. Armando, Wendy Rosenthal, Leonel Martinez, Amanjot Kaur, Tim Sparwasser, James G. Tidball, Marta Margeta, Melissa J. Spencer, et Jeffrey A. Bluestone. 2014. « Regulatory T Cells Suppress Muscle Inflammation and Injury in Muscular Dystrophy ». *Science Translational Medicine* 6 (258):258ra142. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009925>.
- Vlugt, L. E. P. M. van der, E. Mlejnek, A. Ozir-Fazalalikhani, M. Janssen Bonas, T. R. Dijkman, L. A. Labuda, R. Schot, et al. 2014. « CD24(Hi)CD27(+) B Cells from Patients with Allergic Asthma Have Impaired Regulatory Activity in Response to Lipopolysaccharide ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44 (4):517-28. <https://doi.org/10.1111/cea.12238>.
- Vocanson, Marc, Aurore Rozieres, Anca Hennino, Gaelle Poyet, Vincent Gaillard, Sarah Renaudineau, Amine Achachi, et al. 2010. « Inducible Costimulator (ICOS) Is a Marker for Highly Suppressive Antigen-Specific T Cells Sharing Features of TH17/TH1 and Regulatory T Cells ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (2):280-89, 289.e1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.05.022>.
- Walker, Jennifer A., Jillian L. Barlow, et Andrew N. J. McKenzie. 2013. « Innate lymphoid cells — how did we miss them? » *Nature Reviews Immunology* 13 (2):75-87. <https://doi.org/10.1038/nri3349>.
- Walker, Jennifer A., et Andrew N. J. McKenzie. 2013. « Development and Function of Group 2 Innate Lymphoid Cells ». *Current Opinion in Immunology* 25 (2):148-55. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.02.010>.
- Walker, Lucy S. K. 2009. « Regulatory T Cells Overturned: The Effectors Fight Back ». *Immunology* 126 (4):466-74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03053.x>.

- Wallmann, J., M. M. Epstein, P. Singh, R. Brunner, K. Szalai, L. El-Housseiny, I. Pali-Schöll, et E. Jensen-Jarolim. 2010. « Mimotope vaccination for therapy of allergic asthma: anti-inflammatory effects in a mouse model ». *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40 (4):650-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03392.x>.
- Weiner, H. L. 2001. « The Mucosal Milieu Creates Tolerogenic Dendritic Cells and T(R)1 and T(H)3 Regulatory Cells ». *Nature Immunology* 2 (8):671-72. <https://doi.org/10.1038/90604>.
- Weiner, Howard L., Andre Pires da Cunha, Francisco Quintana, et Henry Wu. 2011. « Oral Tolerance ». *Immunological Reviews* 241 (1):241-59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x>.
- Wenzel, Sally, Linda Ford, David Pearlman, Sheldon Spector, Lawrence Sher, Franck Skobieranda, Lin Wang, et al. 2013. « Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels ». *New England Journal of Medicine* 368 (26):2455-66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304048>.
- Wijk, F. van, E. J. M. Wehrens, S. Nierkens, L. Boon, A. Kasran, R. Pieters, et L. M. J. Knippels. 2007. « CD4+CD25+ T Cells Regulate the Intensity of Hypersensitivity Responses to Peanut, but Are Not Decisive in the Induction of Oral Sensitization ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37 (4):572-81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02681.x>.
- Wilson, D. R., A. M. Irani, S. M. Walker, M. R. Jacobson, I. S. Mackay, L. B. Schwartz, et S. R. Durham. 2001. « Grass Pollen Immunotherapy Inhibits Seasonal Increases in Basophils and Eosinophils in the Nasal Epithelium ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 31 (11):1705-13.
- Wisniewski, Julia A., et Larry Borish. 2011. « Novel Cytokines and Cytokine-Producing T Cells in Allergic Disorders ». *Allergy and Asthma Proceedings* 32 (2):83-94. <https://doi.org/10.2500/aap.2011.32.3428>.
- Wohlfert, Elizabeth A., John R. Grainger, Nicolas Bouladoux, Joanne E. Konkel, Guillaume Oldenhove, Carolina Hager Ribeiro, Jason A. Hall, et al. 2011. « GATA3 controls Foxp3+ regulatory T cell fate during inflammation in mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (11):4503-15. <https://doi.org/10.1172/JCI57456>.
- Wood, Robert A., Jennifer S. Kim, Robert Lindblad, Kari Nadeau, Alice K. Henning, Peter Dawson, Marshall Plaut, et Hugh A. Sampson. s.d. « A randomized, double-blind, placebo-controlled study of omalizumab combined with oral immunotherapy for the treatment of cow's milk allergy ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Consulté le 14 décembre 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.005>.
- Worbs, Tim, Ulrike Bode, Sheng Yan, Matthias W. Hoffmann, Gabriele Hintzen, Günter Bernhardt, Reinhold Förster, et Oliver Pabst. 2006. « Oral Tolerance Originates in the Intestinal Immune System and Relies on Antigen Carriage by Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (3):519-27. <https://doi.org/10.1084/jem.20052016>.
- Wright, Graham P., Clare A. Notley, Shao-An Xue, Gavin M. Bendle, Angelika Holler, Ton N. Schumacher, Michael R. Ehrenstein, et Hans J. Stauss. 2009. « Adoptive Therapy with Redirected Primary Regulatory T Cells Results in Antigen-Specific Suppression of Arthritis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (45):19078-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907396106>.
- Wu, Ava J., Hong Hua, Sibyl H. Munson, et Hugh O. McDevitt. 2002. « Tumor Necrosis Factor-Alpha Regulation of CD4+CD25+ T Cell Levels in NOD Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19):12287-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.172382999>.
- Wu, H. Y., et N. A. Staines. 2004. « A Deficiency of CD4+CD25+ T Cells Permits the Development of Spontaneous Lupus-like Disease in Mice, and Can Be Reversed by Induction of Mucosal Tolerance to Histone Peptide Autoantigen ». *Lupus* 13 (3):192-200. <https://doi.org/10.1191/0961203303lu1002oa>.
- Wu, Kui, Yutian Bi, Kun Sun, et Changzheng Wang. 2007. « IL-10-Producing Type 1 Regulatory T Cells and Allergy ». *Cellular & Molecular Immunology* 4 (4):269-75.
- Xiao, Hong, Shun Wang, Runsheng Miao, et Wusheng Kan. 2011. « TRAIL Is Associated with Impaired Regulation of CD4+CD25- T Cells by Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis ». *Journal of Clinical Immunology* 31 (6):1112-19. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9559-x>.
- Xu, Junji, Dandan Wang, Dayong Liu, Zhipeng Fan, Huayong Zhang, Ousheng Liu, Gang Ding, et al. 2012. « Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Alleviates Experimental and Clinical Sjögren Syndrome ». *Blood* 120 (15):3142-51. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-391144>.
- Xufré, Cristina, Manuela Costa, Carme Roura-Mir, Eva Codina-Busqueta, Lorena Usero, Eduarda Pizarro, Gabriel Obiols, Dolores Jaraquemada, et Mercè Martí. 2013. « Low Frequency of GITR+ T Cells in Ex Vivo and in Vitro Expanded Treg Cells from Type 1 Diabetic Patients ». *International Immunology* 25 (10):563-74. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxt020>.

- Yadav, M., C. Louvet, D. Davini, J. M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B. A. Anthony, et al. 2012. « Neuropilin-1 Distinguishes Natural and Inducible Regulatory T Cells among Regulatory T Cell Subsets in Vivo ». *Journal of Experimental Medicine* 209 (10):1713-22. <https://doi.org/10.1084/jem.20120822>.
- Yamashita, H., K. Takahashi, H. Tanaka, H. Nagai, et N. Inagaki. 2012. « Overcoming Food Allergy through Acquired Tolerance Conferred by Transfer of Tregs in a Murine Model ». *Allergy* 67 (2):201-9. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02742.x>.
- Yan, Yaping, Guang-Xian Zhang, Bruno Gran, Francesca Fallarino, Shuo Yu, Hongmei Li, Melissa L. Cullimore, Abdolmohamad Rostami, et Hui Xu. 2010. « IDO Upregulates Regulatory T Cells via Tryptophan Catabolite and Suppresses Encephalitogenic T Cell Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (10):5953-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001628>.
- Yang, B.-H., S. Hagemann, P. Mamareli, U. Lauer, U. Hoffmann, M. Beckstette, L. Föhse, et al. 2016. « Foxp3(+) T Cells Expressing ROR $\gamma$ t Represent a Stable Regulatory T-Cell Effector Lineage with Enhanced Suppressive Capacity during Intestinal Inflammation ». *Mucosal Immunology* 9 (2):444-57. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.74>.
- Yang, Cui-Hong, Lina Tian, Guang-Sheng Ling, Nigel J. Trendell-Smith, Liang Ma, Chi-Kin Lo, David I. Stott, Foo Y. Liew, et Fang-Ping Huang. 2008. « Immunological Mechanisms and Clinical Implications of Regulatory T Cell Deficiency in a Systemic Autoimmune Disorder: Roles of IL-2 versus IL-15 ». *European Journal of Immunology* 38 (6):1664-76. <https://doi.org/10.1002/eji.200838190>.
- Yang, Xuekang, Hua Bai, Yunchuan Wang, Jun Li, Qin Zhou, Weixia Cai, Juntao Han, Xiongxiang Zhu, Maolong Dong, et Dahai Hu. 2013. « Deletion of Regulatory T Cells Supports the Development of Intestinal Ischemia-Reperfusion Injuries ». *Journal of Surgical Research* 184 (2):832-37. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.05.014>.
- Yee, Christina S. K., et Rima Rachid. 2016. « The Heterogeneity of Oral Immunotherapy Clinical Trials: Implications and Future Directions ». *Current Allergy and Asthma Reports* 16 (4):1-19. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0602-0>.
- Yu, Aixin, Isaac Snowwhite, Francesco Vendrame, Michelle Rosenzweig, David Klatzmann, Alberto Pugliese, et Thomas R. Malek. 2015. « Selective IL-2 Responsiveness of Regulatory T Cells through Multiple Intrinsic Mechanisms Supports the Use of Low-Dose IL-2 Therapy in Type 1 Diabetes ». *Diabetes* 64 (6):2172-83. <https://doi.org/10.2337/db14-1322>.
- Yu, Wong, Deborah M. Hussey Freeland, et Kari C. Nadeau. 2016. « Food Allergy: Immune Mechanisms, Diagnosis and Immunotherapy ». *Nature Reviews Immunology* 16 (12):751-65. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.111>.
- Zarek, Paul E., Ching-Tai Huang, Eric R. Lutz, Jeanne Kowalski, Maureen R. Horton, Joel Linden, Charles G. Drake, et Jonathan D. Powell. 2008. « A2A Receptor Signaling Promotes Peripheral Tolerance by Inducing T-Cell Anergy and the Generation of Adaptive Regulatory T Cells ». *Blood* 111 (1):251-59. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-081646>.
- Zeng, Hanyu, Rong Zhang, Boquan Jin, et Lihua Chen. 2015. « Type 1 Regulatory T Cells: A New Mechanism of Peripheral Immune Tolerance ». *Cellular & Molecular Immunology* 12 (5):566-71. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.44>.
- Zhang, Dunfang, Cheryl Chia, Xue Jiao, Wenwen Jin, Shimpei Kasagi, Ruiqing Wu, Joanne E. Konkel, et al. 2017. « D-Mannose Induces Regulatory T Cells and Suppresses Immunopathology ». *Nature Medicine* 23 (9):1036-45. <https://doi.org/10.1038/nm.4375>.
- Zhang, Li, Anne M. Bertucci, Rosalind Ramsey-Goldman, Richard K. Burt, et Syamal K. Datta. 2009. « Regulatory T Cell (Treg) Subsets Return in Patients with Refractory Lupus Following Stem Cell Transplantation, and TGF-Beta-Producing CD8+ Treg Cells Are Associated with Immunological Remission of Lupus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (10):6346-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901773>.
- Zhang, Xingmin, Djordje N. Koldzic, Leonid Izikson, Jayagopala Reddy, Remedios F. Nazareno, Shimon Sakaguchi, Vijay K. Kuchroo, et Howard L. Weiner. 2004. « IL-10 Is Involved in the Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by CD25+CD4+ Regulatory T Cells ». *International Immunology* 16 (2):249-56.
- Zhao, Dongchang, Chunyan Zhang, Tangsheng Yi, Chia-Lei Lin, Ivan Todorov, Fouad Kandeel, Stephen Forman, et Defu Zeng. 2008. « In Vivo-Activated CD103+CD4+ Regulatory T Cells Ameliorate Ongoing Chronic Graft-versus-Host Disease ». *Blood* 112 (5):2129-38. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140277>.

- Zhao, Dong-Mei, Angela M. Thornton, Richard J. DiPaolo, et Ethan M. Shevach. 2006. « Activated CD4+CD25+ T Cells Selectively Kill B Lymphocytes ». *Blood* 107 (10):3925-32. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4502>.
- Zhou, Liang, Jared E. Lopes, Mark M. W. Chong, Ivaylo I. Ivanov, Roy Min, Gabriel D. Victora, Yuelei Shen, et al. 2008. « TGF-Beta-Induced Foxp3 Inhibits T(H)17 Cell Differentiation by Antagonizing RORgammat Function ». *Nature* 453 (7192):236-40. <https://doi.org/10.1038/nature06878>.
- Zhou, Xuyu, Samantha L. Bailey-Bucktrout, Lukas T. Jeker, Cristina Penaranda, Marc Martínez-Llordella, Meredith Ashby, Maki Nakayama, Wendy Rosenthal, et Jeffrey A. Bluestone. 2009. « Instability of the Transcription Factor Foxp3 Leads to the Generation of Pathogenic Memory T Cells in Vivo ». *Nature Immunology* 10 (9):1000-1007. <https://doi.org/10.1038/ni.1774>.
- Zhu, Jinfang, Hidehiro Yamane, et William E. Paul. 2010. « Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations (\*) ». *Annual Review of Immunology* 28:445-89. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>.
- Zuidmeer-Jongejan, Laurian, Montserrat Fernandez-Rivas, Lars K. Poulsen, Angela Neubauer, Juan Asturias, Lars Blom, Joyce Boye, et al. 2012. « FAST: Towards Safe and Effective Subcutaneous Immunotherapy of Persistent Life-Threatening Food Allergies ». *Clinical and Translational Allergy* 2 (1):5. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-2-5>.