

RÉFÉRENCES

1. Kennedy K, Heimal J, Spergel JM. Advances in atopic dermatitis in 2017. *J Allergy Clin Immunol* 2018 ; 142 : 1740-7.
2. Blottière HM, Doré J. Impact des nouveaux outils de métagénomique sur notre connaissance du microbiote intestinal et de son rôle en santé humaine : enjeux diagnostiques et thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 944-51.
3. Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. Microbiote intestinal et développement du système immunitaire. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 961-7.
4. Zachariassen LF, Krych L, Engkilde K, et al. Sensitivity to oxazolone induced dermatitis is transferable with gut microbiota in mice. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 1-11.
5. Kwon MS, Lim SK, Jang JY, et al. *Lactobacillus sakei* WIKIM30 ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions by inducing regulatory T cells and altering gut microbiota structure in mice. *Front Immunol* 2018 ; 9 : 1-11.
6. Lim SK, Kwon MS, Lee J, et al. *Weissella cibaria* WIKIM28 ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions by inducing tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in BALB/c mice. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 1-9.
7. Kim HW, Hong R, Choi EY, et al. A probiotic mixture regulates T cell balance and reduces atopic dermatitis symptoms in mice. *Front Microbiol* 2018 ; 9 : 1-13.
8. Kwon HK, Lee CG, So JS, et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Prot Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 2159-64.
9. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, et al. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 (suppl 1) : 4615-22.
10. Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, et al. A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy* 2018 ; 73 : 145-52.
11. Ren C, Zhang Q, de Haan BJ, et al. Identification of TLR2/6 signalling lactic bacteria for supporting immune regulation. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 1-12.

NOUVELLE

La stimulation des lymphocytes Treg via le TNFR2 et GITR comme nouvelle approche thérapeutique dans les maladies auto-immunes

Morgane Hilaire¹, Nicolas Aubert²

¹Master Biologie Moléculaire et Cellulaire-M2 Parcours Génopath, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, France.

²Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Centre d'immunologie et des maladies infectieuses-Paris, Cimi-Paris, 75013 Paris, France.

morgane.hilaire@etu.univ-lyon1.fr

► La tolérance immunitaire permet de prévenir les réponses immunitaires contre les tissus sains de l'organisme. Les Treg (lymphocytes T régulateurs) participent à ce processus biologique en périphérie via leurs activités immunosuppressives sur les cellules immunitaires impliquées, comme les Tconv (lymphocytes T conventionnels). Les Treg se différencient des Tconv par l'expression constitutive de CD25 (la chaîne α du récepteur de l'interleukine 2) et de FOXP3 (*Forkhead box P3*). Le facteur de transcription FOXP3, spécifique de ces cellules, est impliqué dans leur différenciation, leur fonction et leur stabilité. Pour réguler l'activité du système immunitaire, les Treg agissent en sécrétant des cytokines immunosuppressives ou par contact cellulaire direct. Lors de maladies auto-immunes, des Tconv auto-réactifs échappent au processus de tolérance centrale et périphérique. Les Treg jouent alors un rôle essentiel pour

contrôler ces cellules. Cependant, dans de nombreuses maladies auto-immunes, comme dans la sclérose en plaques, des altérations quantitatives et qualitatives des Treg sont retrouvées [1]. Ces altérations conduisent à l'activation et la prolifération de Tconv auto-réactifs, perturbant l'équilibre entre Tconv et Treg. L'implication des Treg dans les maladies auto-immunes suggère qu'ils pourraient être une cible thérapeutique pour le traitement de ces maladies. Ainsi, restaurer leur nombre ou leur fonction immunosuppressive permettrait de contrôler les réponses immunitaires excessives et de rétablir la tolérance.

Certains membres de la famille des récepteurs du TNF (TNFRF pour *tumor necrosis factor receptor family*) sont exprimés préférentiellement par les Treg et interviennent dans leur développement thymique. Bloquer ces récepteurs inhibe le développement et la maturation des Treg et a un impact négatif sur

le contrôle des maladies auto-immunes [2]. Parmi ces récepteurs, TNFR2 (*tumor necrosis factor receptor 2*) et GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) semblent particulièrement importants. Ces récepteurs étant fortement exprimés par les Treg, leur stimulation par des agonistes pourrait permettre l'expansion des Treg et être utilisée comme voie thérapeutique dans les maladies auto-immunes. Les Treg ainsi stimulés permettraient de rétablir la balance perturbée entre les Treg et les Tconv.

Expansion des lymphocytes Treg par des agonistes de TNFR2

TNFR2 : une cible prometteuse

Le TNF α est une cytokine dont l'action est dépendante de deux récepteurs de structure similaire mais fonctionnellement différents : TNFR1 et TNFR2. Le TNFR1, exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, est associé à l'inflam-



	Agoniste	Impact sur les Treg	Impact sur la réponse immunitaire	Réf
Ciblage TNFR2	Anticorps anti-TNFR2 (MR2-1)	Stimulation <i>ex vivo</i>	Réduction de l'inflammation de la peau après transfert de T _{reg} stimulés <i>ex vivo</i>	[4]
	TNCscTNF80	Stimulation <i>in vivo</i>	Réduction de la sévérité de la pathologie dans un modèle d'arthrite auto-immune	[5]
Ciblage G1TR	Fc-G1TR-L	Stimulation <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	Suppression de la réponse immunitaire contre un antigène exogène	[8]
	Ligand naturel (expression constitutive dans des souris transgéniques)	Stimulation <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	Réduction de la sévérité de la pathologie dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale	[9]
	Ac anti-G1TR (DTA-1)	Blocage de l'activité suppressive <i>in vitro</i>		[10]

Tableau 1. Effets de différents agonistes du TNFR2 et de G1TR sur les Treg.

mation, la cytotoxicité et l'apoptose. Le TNFR2 est, quant à lui, présent majoritairement à la surface des lymphocytes et promeut leur survie et leur prolifération. L'expression du TNFR2 est plus élevée sur les Treg que sur les Tconv et corrèle avec une forte activité suppressive des Treg. *In vitro*, la présence de TNF α permet d'activer la prolifération des Treg et de stimuler leur fonction suppressive sur les Tconv. Dans un modèle de sepsis chez la souris, la délétion du gène *Tnfrsf1b*, codant le TNFR2, entraîne un échec de l'expansion des Treg ; l'inflammation n'est alors plus contrôlée et est généralisée [3], montrant ainsi l'importance de ce récepteur pour l'activité des Treg et son rôle dans le maintien de la tolérance immunitaire. Le TNFR2 apparaît donc comme une cible de choix pour augmenter le nombre et la fonction suppressive des Treg.

Utilisation d'agonistes de TNFR2

De nouvelles stratégies de thérapies cellulaires pour le traitement des maladies

auto-immunes sont actuellement envisagées. Elles consistent en l'injection de Treg après une phase d'expansion *ex vivo* dans le but de rétablir la balance Treg/Tconv dérégulée. Cependant, il existe plusieurs obstacles techniques à cette stratégie, notamment la difficulté de la purification des Treg et leur faible stabilité après réinjection. En effet, la purification et l'expansion *ex vivo* de Treg pourrait entraîner une perte d'expression de FOXP3 conduisant à une perte de la stabilité et de la fonction suppressive des Treg [4]. Ils pourraient alors acquérir un phénotype pro-inflammatoire qui serait néfaste dans ce type de traitement.

L'utilisation d'agonistes de TNFR2 *ex vivo* semble être une stratégie prometteuse pour répondre à ces contraintes (Tableau 1). En effet, une stimulation *ex vivo* à l'aide d'un agoniste de TNFR2 (l'anticorps MR2-1) en combinaison avec de l'interleukine 2 (IL-2), des anticorps anti-CD3/CD28 et de la rapamycine (un inhibiteur de la protéine mTOR connu

pour favoriser l'expansion des Treg) permet une expansion importante de Treg CD4⁺CD25⁺ isolés à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (ou PBMC pour *peripheral blood mononuclear cell*) de donneurs sains [4]. Leur stabilité et leur fonction suppressive sont conservées et ils ne présentent pas de phénotype pro-inflammatoire. De plus, cette expansion peut être efficace même si la pureté des Treg triés à partir des PBMC totaux est faible (60 à 80 % de Treg FOXP3⁺). Ces Treg stimulés *ex vivo* permettent *in vivo*, après un transfert, de réduire l'inflammation de la peau dans un modèle de souris dont le système immunitaire est humanisé. Cependant, cette stratégie de thérapie cellulaire requiert l'utilisation d'un protocole lourd à mettre en place et très coûteux. Pour ne pas avoir à effectuer une approche lourde de thérapie cellulaire, une alternative consisterait à injecter directement l'agoniste de TNFR2 chez les patients pour stimuler les Treg endogènes. Dans un modèle murin d'arthrite

auto-immune, le traitement par un agoniste de TNFR2 (TNCscTNF80) permet l'expansion des Treg *in vivo* [5]. La fréquence de Treg au sein de la population de lymphocytes T CD4⁺ est augmentée. Ce traitement permet de diminuer la sévérité des symptômes, suggérant qu'il pourrait être utilisé dans le cadre de traitement contre les maladies auto-immunes. Cependant, l'injection d'agoniste de TNFR2 pourrait également stimuler les Tconv, puisqu'ils expriment aussi ce récepteur. Il serait donc nécessaire de prendre en compte ce paramètre pour éviter une aggravation de la pathologie due à une prolifération non souhaitée des Tconv.

Expansion des Treg par des agonistes de GTR

GTR : une cible potentielle

GTR (*Tnfrsf18*) est une molécule de co-stimulation importante pour le développement et la maturation des Treg. Sans ce signal, la conversion des progéniteurs thymiques en Treg matures, exprimant FOXP3, est altérée [2]. Ce récepteur est fortement exprimé par les Treg et son expression augmente encore lorsqu'ils sont activés [6]. Il est également exprimé par les Tconv mais à des niveaux beaucoup plus faibles. L'expression de GTR semble être associée à une forte activité suppressive des Treg. En effet, chez des patients atteints du syndrome de Sjögren, une maladie auto-immune systémique touchant les glandes exocrines, la fréquence de Treg GTR⁺ dans le sang est plus importante chez les patients avec une forme inactive de la maladie [7]. L'importance de GTR pour les Treg et son rôle dans les maladies auto-immunes, suggèrent que ce récepteur pourrait être une cible thérapeutique dans ces pathologies.

Utilisation d'agonistes de GTR

Des agonistes de GTR sont actuellement à l'étude pour stimuler l'expansion des Treg *ex vivo* et *in vivo* (Tableau I). *In vitro*, l'activation de GTR avec une protéine de fusion constituée du

domaine extracellulaire du ligand de GTR fusionné à la région Fc d'une IgG (Fc-GTR-L) stimule la prolifération de Treg de souris [8]. Les Treg ainsi générés sont stables et leur fonction suppressive est conservée, voire augmentée. De plus, l'administration directement *in vivo* de Fc-GTR-L aux souris, favorise également la prolifération des Treg [8]. Le traitement supprime transitoirement la réponse immunitaire contre un antigène exogène. Ainsi, nous pouvons supposer que l'utilisation d'un agoniste de GTR *ex vivo* favoriserait l'expansion des Treg avant la ré-administration aux patients ou permettrait, *in vivo*, de rétablir une tolérance immunitaire chez les patients auto-immuns.

L'utilisation d'agonistes de GTR pose cependant le problème de la spécificité et de l'efficacité du traitement sur les Treg et de son impact sur les Tconv. Différentes études menées dans des modèles précliniques soulignent le fait que l'engagement de GTR sur les Treg peut entraîner des effets différents en fonction du type de ligand utilisé. L'expression transgénique dans des souris du ligand naturel de GTR induit une prolifération et une activation des Treg, mais également une accumulation de Tconv, bien que celle-ci soit plus faible [9]. L'induction d'une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (un modèle murin de la sclérose en plaques) dans ces souris transgéniques est d'ailleurs retardée par rapport à des souris non transgéniques, démontrant un effet protecteur de l'augmentation du nombre de Treg [9]. De même, le ligand Fc-GTR-L induit une expansion des Treg *in vivo*, cette expansion semblant plus spécifique puisqu'elle n'affecte pas les Tconv [8]. En revanche, *in vitro*, l'utilisation d'un anticorps agoniste de GTR (Ac anti-GTR, DTA-1) dans une co-culture de Treg et de Tconv murins inhibe la capacité suppressive des Treg sur les Tconv [10]. Selon cette étude, l'engagement de GTR sur les Tconv les rendrait résistants à la suppression par les Treg. Un tel mécanisme pourrait être délétère

lors d'immunothérapies ciblant GTR en aggravant la pathologie. Le choix du ligand utilisé pour stimuler l'expansion des Treg semble donc primordial, et le développement de meilleurs agonistes de GTR, permettant de stimuler préférentiellement les Treg est indispensable dans le cadre de stratégies thérapeutiques utilisées pour le traitement de maladies auto-immunes.

Conclusion

L'utilisation d'agonistes de TNFR2 et GTR, deux membres des TNFRF, permet de stimuler la prolifération et la fonction suppressive des Treg. Ces propriétés pourraient être bénéfiques dans le cadre de futurs traitements de maladies auto-immunes pour rétablir la tolérance. Pour cela, deux stratégies thérapeutiques sont envisageables : 1) Stimuler *ex vivo* l'expansion des Treg purifiés provenant de patients atteints de maladies auto-immunes *via* ces agonistes, puis les réinjecter chez ces patients. 2) Utiliser ces agonistes directement *in vivo* pour induire l'expansion des Treg. Cependant, l'équilibre entre réponse inappropriée et immunosuppression est fragile. Il est donc primordial d'identifier les doses et les traitements permettant de stimuler la réponse Treg, tout en évitant d'une part, d'activer des Tconv auto-réactifs et, d'autre part, de stimuler excessivement les Treg. En conclusion, bien que la stimulation des Treg *via* le TNFR2 et GTR semble prometteuse, de nombreux paramètres restent encore à déterminer afin de pouvoir utiliser cette stratégie de manière optimale. ♦

Boosting Treg activity by TNFR2 and GTR agonists: new therapeutic approaches for autoimmune diseases

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004 ; 199 : 971-9.

RÉFÉRENCES

- Mahmud SA, Manlove LS, Schmitz HM, *et al.* Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat Immunol* 2014 ; 15 : 473-81.
- Chen X, Bäuml M, Männel DN, *et al.* Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2007 ; 179 : 154-61.
- He X, Landman S, Bauland SC, *et al.* A TNFR2-agonist facilitates high purity expansion of human low purity Treg cells. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0156311.
- Lamontain V, Schmid T, Weber-Steffens D, *et al.* Stimulation of TNF receptor type 2 expands regulatory T cells and ameliorates established collagen-induced arthritis in mice. *Cell Mol Immunol* 2019 ; 16 : 65-74
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, *et al.* CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002 ; 16 : 311-23.
- Alunno A, Nocentini G, Bistoni O, *et al.* Expansion of CD4⁺CD25⁺GITR⁺ regulatory T-cell subset in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome: correlation with disease activity. *Reumatismo* 2012 ; 64 : 293-8.
- Liao G, Nayak S, Regueiro JR, *et al.* GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 2010 ; 22 : 259-70.
- van Oeffen RW, Koning N, van Gisbergen KP, *et al.* GITR triggering induces expansion of both effector and regulatory CD4⁺ T cells in vivo. *J Immunol* 2009 ; 182 : 7490-500.
- Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, *et al.* Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol* 2004 ; 173 : 5008-20.

NOUVELLE

Cellules souches leucémiques Cibler leur quiescence afin d'optimiser les thérapies

Mélanie Bellina

Master Biologie Moléculaire et Cellulaire-M2
Parcours Génopath, Université Claude Bernard
Lyon 1, Université de Lyon, France.
melanie.bellina@etu.univ-lyon1.fr

Les CSL (cellules souches leucémiques) ont été identifiées pour la première fois en 1997 dans la LMA (leucémie myéloïde aiguë) [1]. Elles forment une petite population hétérogène de cellules leucémiques, provenant de la transformation de CSH (cellules souches hématopoïétiques) ou de cellules myéloïdes progénitrices [2]. Les CSL possèdent des propriétés d'autorenouvellement, de quiescence cellulaire et de chimiorésistance [2, 3]. L'hétérogénéité de cette population est marquée par l'expression différentielle de certains marqueurs à la surface des cellules qui la constituent. Cette hétérogénéité rend leur ciblage thérapeutique particulièrement difficile [2]. Les traitements standards cytotoxiques, qui visent les cellules fortement prolifératrices, ne sont pas efficaces contre les CSL quiescentes. Ainsi, les CSL peuvent persister dans l'organisme alors qu'un patient est en rémission, puis sortir de leur état de quiescence et se mettre à proliférer, ce qui peut mener à une rechute [3, 4]. Il est essentiel d'élucider les caractéristiques fonctionnelles des CSL, ainsi

que leurs altérations intracellulaires, afin d'optimiser les approches thérapeutiques qui doivent avoir une toxicité minimale pour les cellules hématopoïétiques saines [5].

Les CSL sont essentiellement régulées par leur microenvironnement, des voies de signalisation intrinsèques et des ARN non codants [2]. Il a été observé que des voies de signalisation associées à la progression dans le cycle cellulaire, la survie et le métabolisme des cellules, comme, par exemple, la voie mTOR, étaient inhibées dans les CSL en comparaison avec les CSH saines [6, 7, 8]. L'inhibition de ces voies participe au maintien de la quiescence et ainsi à la résistance des CSL à la chimiothérapie. Deux molécules ont récemment été identifiées comme ayant un rôle important dans le maintien dans cet état des CSL : miR126 et GSK3.

Les régulateurs de la quiescence cellulaire miR126

Les micro-ARN (ou miARN) sont de courts acides ribonucléiques simples

brins synthétisés sous forme de pré-miARN dans le noyau, puis exportés dans le cytosol où ils sont clivés en miARN. Les miARN matures sont des régulateurs de l'expression des gènes : ils induisent une répression traductionnelle ou une dégradation des ARN messagers cible.

En 2014, l'équipe de de Leeuw a mis en évidence des différences d'expression de miARN entre CSL et CSH [7]. Les miARN concernés par ces différences sont, pour une partie d'entre eux, potentiellement oncogéniques, car surexprimés dans les CSL par rapport aux CSH. Les auteurs ont également identifié le miARN126 comme étant sous-exprimé dans les CSL par rapport aux CSH, mais avec une expression plus forte dans les CSL par rapport à des cellules progénitrices leucémiques [7]. Ces observations suggèrent que l'expression de ce miARN peut être associée à un phénotype « cellule souche ». Les auteurs ont donc mené des études supplémentaires pour caractériser les fonctions et les cibles de miR126 [7]. L'inhibition de miR126 grâce à l'infection par un lentivirus KD (*knock-down*) de miR126 entraîne