

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « *Immunologie* »

Par

Céline SERAZIN

**« Raffinement de l'identité des lymphocytes T régulateurs CD8⁺
chez l'Homme grâce à l'utilisation des technologies multi-omiques »**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 08 novembre 2022

Unité de recherche : CR2TI – Inserm UMR 1064

Rapporteurs avant soutenance :

Benoit SALOMON
Julien ZUBER

Directeur de recherche – Université Pierre et Marie Curie – CIMI U1135
PhD – MD – Université Paris Descartes – IMAGINE

Composition du Jury :

Présidente :

Sylvie GUERDER
Directrice de recherche – Université de Toulouse – Infinity

Examineurs :

Benoit SALOMON
Directeur de recherche – Université Pierre et Marie Curie – CIMI U1135

Julien ZUBER
PhD – MD – Université Paris Descartes – IMAGINE

Directrice de thèse :

Carole GUILLONNEAU
Directrice de recherche – Nantes Université – CR2TI INSERM 1064

Co-encadrante de thèse :

Séverine BEZIE
PhD – Nantes Université – CR2TI INSERM 1064

Sommaire

Remerciements	4
Abréviations	7
Liste des figures	9
Liste des tableaux	10
Contexte :	11
I. Introduction	15
Chapitre 1 : La tolérance immune	15
A. Importance des lymphocytes T dans les réponses immunes	15
B. Qu'est-ce que la tolérance immune ?	17
C. Conséquences d'une rupture de la tolérance	21
Chapitre 2 : Les lymphocytes T régulateurs, acteurs clés de la tolérance.....	27
A. Rôles et types de cellules régulatrices.....	27
B. Découverte et historique des Tregs :.....	28
C. Tregs : plusieurs origines possibles.....	29
D. Importante hétérogénéité au sein des lymphocytes T régulateurs.....	33
E. Les mécanismes de suppression des Tregs	43
F. Différences et similitudes entre Tregs CD4 ⁺ et Tregs CD8 ⁺	50
G. Implication des Tregs dans les maladies auto-immunes et en transplantation.....	50
Chapitre 3 : Induire la tolérance pour mieux traiter	53
A. Thérapies cellulaires de Tregs pour induire la tolérance (amplification <i>ex vivo</i>)	53
B. Déplétion des cellules T conventionnelles <i>in vivo</i> : exemple d'une thérapie utilisant un anticorps anti-CD45RC	60
C. Activation des Tregs <i>in vivo</i> : thérapie ciblant le TNFR2.....	62
Chapitre 4 : Raffiner l'identité des Tregs CD8 ⁺ pour mieux agir grâce aux nouvelles technologies.....	69

A. Outils d'édition de génome : Génération de modèles pour l'étude des Tregs	69
B. Analyses protéiques :	70
C. Analyses transcriptomiques en bulk :	72
II. Problématique de la thèse	78
III. Le projet de recherche	81
A. Méthodologie	81
B. Publication scientifique	92
C. Résultats complémentaires :	128
IV. Discussion.....	146
Confirmation de l'utilisation de la protéine CD45RC pour identifier les Tregs CD8 ⁺ :	151
Est-ce que TNFR2 a un rôle fonctionnel dans les Tregs CD8 ⁺ ?	152
Quelle est l'origine des Tregs CD8 ⁺ ?	153
Impact des résultats pour l'amplification des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} :	155
La plasticité des Tregs :	157
Intérêt de l'étude des Tregs CD8 ⁺ dans le contexte de MAIs ou de patients transplantés :	
.....	159
V. Annexes	162
Publication n°1: CD4 ⁺ and CD8 ⁺ regulatory T cells characterization in the rat using a unique transgenic Foxp3-EGFP model.	163
Publication n°2: Anti-CD45RC antibody immunotherapy prevents and treats experimental autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome.....	164
Publication n°3: Stable renal function in transplanted patients correlates to a phenotypic signature based on CD45RC T cell subsets	165
Publication n°4: IL-34 deficiency impairs FOXP3 ⁺ Treg function in a model of autoimmune colitis and decreases immune tolerance homeostasis.....	167
Publication n°5: IL-34 actions on FOXP3 ⁺ Tregs and CD14 ⁺ monocytes control human graft rejection.....	168

Publication n°6: Rapid and reproducible differentiation of hematopoietic and T cell progenitors from pluripotent stem cells	170
Publication n°7: Generation of CD34 ⁺ CD43 ⁺ hematopoietic progenitors to induce thymocytes from human pluripotent stem cells	171
Curriculum Vitae.....	172
Conclusion personnelle :	175
VI. Références bibliographiques	178

Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier le Dr Benoit Salomon et le Dr Julien Zuber d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir pris le temps de juger mon travail de ces 3 années de doctorat. Je tenais également à remercier le Dr Sylvie Guerder d'avoir accepté d'être examinatrice de ma thèse.

Je souhaite remercier le Dr Jérôme Jullien et le Dr Xavier Saulquin pour avoir été membres de mon comité de suivi de thèse. Merci pour les encouragements que vous m'avez apporté au cours de ces 2 CSI, ils ont été très appréciés.

Merci également aux membres de l'équipe de Charité à Berlin, notamment Jackie et Stephan pour leur aide et leur disponibilité, bien que nous n'ayons eu que peu d'occasion de nous voir en réel. Merci notamment pour le design de l'expérience de scRNA-seq ainsi que la préparation de la librairie de ce jeu de données.

Laurent, je tenais à te remercier de m'avoir accepté en stage de Licence 3 il y a maintenant déjà 6 ans pour travailler avec toi et Léa sur la différenciation de cellules souches en progéniteurs lymphoïdes, c'est ici que tout a débuté. Tu as été indispensable au développement de ma démarche scientifique et de mon esprit critique. Merci d'avoir été disponible et de m'avoir toujours aidé à me poser les bonnes questions scientifiques et personnelles. Mais surtout, je voulais te remercier de m'avoir laissé partir avec Carole pour faire de l'Immunologie.

Carole, merci pour ces 4 années où tu as été mon encadrante. Merci de m'avoir permis de participer à autant de projets différents, d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours tiré vers le haut. J'ai fortement apprécié ta bienveillance. Forcément, je te remercie de m'avoir autant incité à soumettre des abstracts scientifiques et de m'avoir permis de présenter mes recherches, notamment à FOCIS (San Francisco) et à la TTS (Buenos Aires), j'ai adoré ! J'en profite également pour te présenter mes excuses d'avoir un jour dit que « je ne me voyais pas être comme toi plus tard », je ne suis pas encore prête à avoir autant de responsabilités ni à laisser de côté la paillasse, mais si dans les années à venir je suis « comme toi », ça serait un grand honneur.

Séverine, merci d'avoir accepté de co-encadrer la moitié de ma thèse. J'ai tellement apprécié travailler avec toi. Tu m'as appris beaucoup de choses sur les Tregs CD8⁺ et il m'en reste encore beaucoup à apprendre. Je m'excuse d'être venue tant de fois t'embêter à ton bureau,

alors merci pour ta très grande disponibilité et surtout pour ton expertise, je n'aurai pu rêver mieux comme co-encadrement ! J'espère que tu ne regretteras pas ton choix de me garder avec toi en post-doc, en tout cas je ferais tout pour !

Carole, Séverine, sachez que je suis ravie de rester travailler avec vous à la fin de ce doctorat, j'ai hâte.

Léa, merci pour ton encadrement et merci de m'avoir donné toutes les astuces nécessaires à la survie en thèse. J'espère que ton post doc en Australie se passera aussi bien que tu le souhaites, tu le mérites amplement !

Je tenais également à remercier l'ensemble des membres du CR2TI, notamment les membres de l'équipe 2 ainsi que Laurence pour ta disponibilité et ton aide sur les cytomètres et trieurs.

Enfin, parmi tous les membres du labo, je dois remercier ceux sans qui tout ça n'aurait pas eu la même saveur : Marie, Sita, Thomas et Florian, un énorme merci. J'ai tellement apprécié partager toutes ces années avec vous, surtout à râler sur la terrasse pendant nos pauses et à passer de nombreuses soirées au bar à jeux. Vivek, merci d'avoir partagé ta bonne humeur (en anglais) dans notre bureau, j'espère que ta nouvelle vie à Oxford te plaira.

Je dois également remercier tous mes amis, qui hors du laboratoire ont contribué à ma bonne santé mentale. Merci d'avoir été un soutien sans failles, de vous être autant intéressés à ce que je faisais et surtout de m'avoir permis de déconnecter. Chloé, il n'y a pas assez de merci pour tout ce que tu as fait pour moi scientifiquement et personnellement. Je te souhaite également bon courage à ton tour pour la finalisation de ton doctorat et te souhaite de continuer ta carrière scientifique n'importe où tu iras. Betty, merci d'avoir été la bulle d'air de cette thèse. Merci de m'avoir motivé d'aller courir, courir et encore courir voir même parfois faire quelques kilomètres à la piscine, merci d'avoir été une source de motivation jusqu'à même nous lancer dans cette folle aventure de courir ce marathon. Je te souhaite de réussir tous les projets que tu entreprends et de profiter à fond de ton internat. Je suis persuadée qu'on sera amenées à retravailler ensemble et j'ai hâte !

Merci à vous, papa et maman, pour tout ce que vous avez fait pour moi. J'ai apprécié à quel point vous vous êtes intéressés à ma thèse, à ce que je faisais réellement. J'ai tenté de vulgariser au maximum pour que vous puissiez comprendre, j'espère que ça aura été suffisant, même si papa, je sais que tu penses qu'un Tregs CD8⁺ c'est un peu comme un sapin de Noël

dont les boules correspondent aux marqueurs que j'étudie. Merci d'avoir posé autant de questions comme « Mais est-ce que tu es sûre de ce que tu trouves ? »

Enfin, Arthur, je ne sais pas comment tu as fait pour réussir à me supporter ces dernières semaines/mois, mais merci. Merci d'avoir été un soutien sans faille, d'avoir cru en moi bien plus que je n'en étais capable, merci d'être venu me chercher après les longues journées de manip, d'avoir toujours pris le temps de m'écouter me plaindre en rentrant du labo. Sans toi, tout aurait été bien plus difficile, alors merci. Promis, un jour je te rendrai la pareille.

Un grand merci à vous tous.

Abréviations

3'DGE-seq : séquençage de la partie 3' des ARN messagers, de l'anglais « 3'Digital Gene Expression RNA-sequencing »

ADCC : de l'anglais « Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity »

ADP : Adénosine Di Phosphate

Ag : Antigène

AIRE : De l'anglais « Auto Immune REgulator »

AMP : Adénosine Mono Phosphate

AMPe : Adénosine MonoPhosphate Cyclique

APECED : Syndrome de Polyendocrinopathie Auto immune Candidose Dystrophie Ectodermique

APS-1 : Polyendocrinopathie Auto-immune de type 1

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ATAC-seq : de l'anglais Assay for Transposable Accessible Chromatin with high throughput Sequencing

ATP : Adénosine Tri Phosphate

BCR : Récepteur B, de l'anglais « B cell receptor »

CAR : Récepteur antigénique chimérique, de l'anglais « Chimeric Antigen Receptor »

CFSE : De l'anglais « Carboxyfluorescein succinimidyl ester »

CITE-seq : De l'anglais « Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

CRISPR: de l'anglais « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »

cTEC : Cellule épithéliale thymique corticale

CTG : groupe de patients ayant reçu le traitement de l'essai clinique the One Study

cTregs : Tregs centraux

DC : Cellule dendritique de l'anglais « Dendritic Cell »

EAE : Encéphalomyélite Allergique Expérimentale

EOMES : De l'anglais « eomesodermin »

eTregs : Tregs effecteur

FEZF2 : De l'anglais « FEZ family zing finger 2 »

FOCIS : De l'anglais « Federation Of Clinical Immunology Societies »

FOXP3 : De l'anglais « Forkhead box P3 »

GFP : de l'anglais « Green Fluorescence Protein »

GVHD : Réaction du greffon contre l'autre de l'anglais « Graft Versus Host Disease »

GWAS : De l'anglais « Genome Wide Association Study »

HLA : Antigènes des leucocytes humains

HV : Volontaire sain de l'anglais « Healthy Volunteer »

IFN- γ : Interféron gamma

IL : Interleukine

ILC : Cellule lymphoïde innée, de l'anglais « Innate Lymphoid Cell »

IPEX : Entéropathie lié à l'X

KIR : De l'anglais « Killer cell Immunoglobulin-like receptor »

LPS : LipoPolySaccharide

NFAT : De l'anglais « Nuclear Factor of Activated T cells »

NF- κ B : De l'anglais « Nuclear Factor-kappa B

NK : De l'anglais « Natural Killer »

NKT : Cellule tueuse T, de l'anglais « Natural Killer T »
NSG : NOD/SCID/IL2 γ
MAI : Maladie auto-immune
MAIT : De l'anglais « Mucosal Invariant T cells »
mTEC : Cellule épithéliale thymique médullaire
PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique de l'anglais « Peripheral Blood Mononuclear Cells »
pTregs : Tregs induits en périphérie
RAG : De l'anglais « Recombination Activated Gene »
SCID : Déficit immunitaire combiné sévère
scRNA-seq : Séquençage des ARNm sur cellules uniques
TACE : de l'anglais « TNF- α Converting Enzyme »
TALEN : de l'anglais « Transcription Activator-Like Effector Nucleases »
T-bet : De l'anglais « T box transcription factor TBX21 »
Tc : Lymphocyte T cytotoxique
Tconv : Lymphocyte T conventionnel
TCR : Récepteur T, de l'anglais « T Cell Receptor »
Teff : Lymphocyte T effecteur
TEMRA : de l'anglais « Terminally Differentiated Effector Memory Cells »
TGF- β : De l'anglais « Transforming Growth Factor Beta »
Th : Lymphocyte T helper
TNF- α : De l'anglais « Tumor Necrosis Factor Alpha »
Tregs : Lymphocyte T régulateur
TSDR : De l'anglais « Treg Specific Demethylated Region »
tTregs : Tregs d'origine thymique
TTS : De l'anglais, « The Transplantation Society »
UMI : Identifiant moléculaire unique, de l'anglais « Unique Molecular Identifier »
UPM : UMI par million
WT : type sauvage, de l'anglais « Wild Type »
ZFN : de l'anglais « Zing Finger Nuclease »

Liste des figures

Figure 1 : Vue d'ensemble des sous-types de lymphocytes T conventionnels et non conventionnels.....	16
Figure 2 : Schéma des récepteurs TCR des lymphocytes et recombinaison VDJ.....	18
Figure 3 : Sélection positive et négative des lymphocytes T dans le thymus.	19
Figure 4 : Causes et conséquences d'une rupture de la tolérance.....	23
Figure 5 : Origine thymique, périphérique ou induite des Tregs CD4 ⁺	30
Figure 6 : Caractéristiques des sous-types de Tregs selon leur origine thymique ou périphérique.	32
Figure 7 : Différenciation des sous-types de Tregs.....	37
Figure 8 : Profil d'expression de la protéine CD45RC au sein des lymphocytes T CD8 ⁺ totaux	42
Figure 9 : Protocole de l'essai clinique des Tregs CD8 ⁺	57
Figure 10 : Expression de FOXP3 dans les Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-}	58
Figure 11 : Thérapie utilisant un anticorps anti-CD45RC	62
Figure 12 : TNF- α et ses 2 récepteurs : TNFR1 et TNFR2.....	64
Figure 13 : Nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies auto-immunes.....	67
Figure 14 : Analyse de l'expression protéique de marqueurs associés aux Tregs	71
Figure 15 : Volcano plot représentant les gènes différentiellement exprimés entre les Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} fraîchement isolés du sang périphérique et les Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} amplifiés.....	73
Figure 16 : Analyse différentielle de l'expression des gènes entre les Tregs CD4 ⁺ et les lymphocytes T CD4 ⁺ conventionnels,.....	74
Figure 17 : Connaissances actuelles et caractérisation des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} chez l'Homme.....	78
Figure 18 : Principe du 3'DGE-seq.....	82
Figure 19 : La méthode de scRNA-seq permet d'étudier l'hétérogénéité qui était jusque-là masquée par la méthode de bulk RNA-seq.	83
Figure 20 : Principe du scRNA-seq.....	84
Figure 21 : Etapes du 1 ^{er} jeu de données de scRNA-seq.....	85
Figure 22 : Amplification des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-}	86
Figure 23 : Etapes du CD-screen.....	87
Figure 24 : Etapes du 2 ^{ème} jeu de données de scRNA-seq/CITE-seq.....	89

Figure 25 : Schéma des tests suppressifs	91
Figure 26 : L'hétérogénéité transcriptomique dans les cellules T CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} fraîchement isolées du sang peut être réduite en excluant la sous-population MAIT/NKT	129
Figure 27 : L'identité des Tregs les plus puissants au sein des T CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} CD161 ⁻ a été affinée et correspond au profil des cellules du cluster 1.	131
Figure 28 : L'analyse transcriptomique a mis en évidence l'expression des marqueurs membranaires TNFR2 ⁺ CD29 ⁻ comme étant une stratégie prometteuse pour isoler le sous-ensemble cellulaire le plus suppressif.	133
Figure 29 : Activité suppressive des cellules MAIT	135
Figure 30 : Heatmap montrant le pourcentage d'expression de chaque marqueur du CD-screen dans les T CD8 ⁺ CD45RC ^{high} , T CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} CD56 ⁻ et Tregs CD8 ⁺ amplifiés.....	138
Figure 31 : CD-screen : sélection de potentiels marqueurs de Tregs CD8 ⁺	138
Figure 32 : CD-screen, comparaison des cellules T CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-}	138
Figure 33 : Analyse de CD126 et CD130 comme potentiel marqueurs d'exclusion des Tregs CD8 ⁺	140
Figure 34 : Expression des gènes codant pour les récepteurs des molécules nécessaires pour l'amplification des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} selon le protocole clinique.....	142
Figure 35 : Origine des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} amplifiés.....	143
Figure 36 : Interface de l'application R-shiny	147

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques des sous-types de Tregs CD8 ⁺	39
Tableau 2 : Différences entre Tregs CD4 ⁺ et CD8 ⁺	50
Tableau 3 : Essais cliniques utilisant des Tregs pour traiter les MAIs ou en transplantation..	55
Tableau 4 : Comparaison de tous les jeux de données	88
Tableau 5 : Chiffres clés des 2 jeux de données de scRNA-seq et CITE-seq.....	90

Contexte :

Le système immunitaire a pour fonction d'assurer l'intégrité d'un organisme : sans lui nous ne pourrions pas être. Il s'agit d'un réseau complexe d'organes, de cellules et de protéines qui ensemble ont pour unique but de défendre le corps d'éventuelles infections. Ce système est capable de reconnaître les pathogènes comme les parasites, les virus, les bactéries, les toxines et de les différencier de nos propres cellules. Ce système est présent partout dans notre corps : dans notre peau, nos tissus, nos fluides (comme le sang ou la lymphe) et même dans nos yeux, ce qui le rend d'autant plus complexe. Aujourd'hui, l'Homme bénéficie d'un incroyable système immunitaire résultant de plusieurs millions d'années d'évolution. En effet, le premier système immunitaire complexe est apparu avec les premiers vertébrés il y a 500 millions d'années, il n'a cessé de se développer et de s'adapter à l'environnement qui l'entoure.

En temps normal, le système immunitaire est capable de faire la différence entre nos propres composants définis comme le soi et tout ce qui va être étranger défini comme le non-soi. Dans certains cas, le système immunitaire peut être perturbé pouvant conduire au développement de maladies auto-immunes (MAI) ou bien même de cancers.

Dans le cas d'une MAI le système immunitaire se trompe et considère une partie du soi comme étant étrangère : il reconnaît, attaque et détruit une partie de notre corps. De plus en plus de personnes développent des MAIs parmi lesquelles on retrouve le diabète de type 1, la sclérose en plaques ou bien la polyarthrite rhumatoïde. A ce jour, il n'existe pas de traitements curatifs pour les patients atteints de MAIs, on traite généralement les symptômes. Parmi les traitements utilisés, on retrouve les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou bien les traitements immunosuppresseurs. L'utilisation de traitements immunosuppresseurs est souvent préconisée afin de venir « éteindre » le système immunitaire et éviter les réactions non voulues de celui-ci. Bien qu'ils soient efficaces, leur utilisation entraîne malheureusement des effets indésirables graves tels que l'augmentation du risque d'infections ou de cancers. Dans le cas des transplantations d'organes, ces traitements immunosuppresseurs sont également utilisés comme traitements de routine. L'objectif étant que l'organe transplanté ne soit pas rejeté, la prise de traitements immunosuppresseurs à long terme est donc systématique pour éviter son rejet mais cela entraîne les mêmes effets secondaires indésirables graves. Cependant, le rejet chronique persiste. Pour avoir une transplantation d'organe opérationnelle à long terme, il est nécessaire d'induire la tolérance, cependant, à ce jour il n'y a pas de traitement efficace pour l'induire.

Ainsi, il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies qui soient plus spécifiques, moins toxiques et qui conservent une immunité contre les pathogènes que le patient pourra être amené à rencontrer au cours de sa vie.

La portée de traitements induisant la tolérance est grande : cela permettrait aux patients atteints de MAIs ou ayant subi une transplantation d'envisager la reprise d'une vie normale et la recherche sur ces traitements permet même d'ouvrir des perspectives pour le développement de traitements en oncologie. Aujourd'hui, de nombreuses équipes cherchent comment induire cette tolérance spécifique.

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) ($CD4^+$ et $CD8^+$) étant des acteurs de la tolérance, ils constituent une piste prometteuse. Plusieurs traitements alternatifs aux traitements immunosuppresseurs sont envisagés dont la thérapie cellulaire à partir de Tregs ou bien l'activation de ces cellules via leurs marqueurs cellulaires. L'intérêt de l'utilisation de cellules en immunothérapie a été démontré au cours des dernières années. Cependant, leur usage en routine est limité du fait de la complexité des protocoles cliniques, notamment car ces thérapies sont majoritairement autologues et coûtent cher. Il est donc nécessaire de faciliter l'accessibilité de ces thérapies cellulaires au plus grand nombre. En ce qui concerne l'activation des cellules responsables de la tolérance, l'utilisation d'anticorps agonistes spécifiques dirigés contre les marqueurs présents à la surface des cellules peut induire la tolérance de manière plus spécifique chez les patients. Quelques marqueurs prometteurs sont à l'étude mais il est nécessaire de continuer les efforts pour en identifier de nouveaux.

Les recherches ont permis d'améliorer nos connaissances sur les cellules responsables de la tolérance, tels que les Tregs, cependant il reste encore beaucoup de découvertes à faire, notamment pour comprendre comment ces cellules fonctionnent ? Quels sont leurs mécanismes d'action ? Que sécrètent-elles ? Comment sont-elles générées ? L'identification de nouveaux marqueurs de Tregs (protéines membranaires, protéines sécrétées ou facteurs de transcription) est primordiale pour comprendre leurs mécanismes, mais aussi essentielle pour le diagnostic ou le pronostic ou bien identifier de nouveaux moyens d'activation/d'inhibition des cellules et ainsi développer de nouveaux traitements spécifiques.

Dans cette thèse, sont dans un premier temps abordées les notions de tolérance et de rupture de tolérance avec le développement des maladies auto-immunes. Des acteurs clés de la tolérance, les lymphocytes T régulateurs ($CD4^+$ et $CD8^+$) sont détaillés dans un second temps. Ensuite, un chapitre portant sur les thérapies permettant l'induction de la tolérance permet

d'avoir une vision globale des thérapies en cours de développement et met en avant l'importance de la découverte de nouveaux marqueurs pour le développement de nouvelles thérapies. Enfin, le dernier chapitre de cette thèse porte sur le raffinement de l'identité des Tregs CD8⁺ grâce aux nouvelles technologies afin d'accroître nos connaissances sur ces cellules ainsi que d'ouvrir de nouvelles perspectives de découverte de marqueurs qui pourront par la suite être utilisés en tant que marqueur de diagnostic, de pronostic ou bien en thérapie.

Dans cette thèse, l'objectif a été d'étudier et de caractériser le transcriptome et le phénotype des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low/-} chez l'Homme pour dans un premier temps améliorer nos connaissances sur comment ces cellules fonctionnent, puis dans un second temps d'émettre et de valider des hypothèses quant à l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques de ces cellules.

I - Introduction

I. Introduction

Chapitre 1 : La tolérance immune

Les recherches menées sur les maladies auto-immunes et la transplantation au cours des dernières années ont démontré le rôle clé et fondamental joué par les lymphocytes T et notamment les lymphocytes T régulateurs dans le contrôle des réponses immunitaires. Dans un premier temps, pour comprendre ce projet de recherche, une définition de la tolérance ainsi que des mécanismes impliqués dans cette tolérance est donc nécessaire.

A. Importance des lymphocytes T dans les réponses immunes

Le système immunitaire est divisé en 2 composantes : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Ces 2 systèmes font appel à différents types cellulaires pour défendre l'organisme. Les cellules myéloïdes, issues de la moelle osseuse, participent à l'immunité innée, mais sont également impliquées dans l'immunité adaptative. Parmi elles on retrouve les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les éosinophiles, ainsi que les basophiles. Les réponses immunitaires sont également réalisées par des cellules lymphoïdes, tels que les lymphocytes T et les lymphocytes B qui sont impliquées dans l'immunité adaptative, alors que les cellules lymphoïdes innées (ILCs) et les Natural Killer (NK) sont retrouvés dans les mécanismes de l'immunité innée. La population cellulaire lymphoïde de Natural Killer T (NKT) est à l'interface entre ces 2 systèmes. Les interactions coopératives entre les cellules du système immunitaire sont cruciales pour une réponse immune adéquate.

Les lymphocytes sont des leucocytes (cellules blanches du sang) divisés en 3 grands groupes cellulaires : les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK, bien qu'on retrouve également les ILC et les NKT. Ils sont identifiés par un noyau qui occupe la quasi-totalité de la cellule. Seuls les lymphocytes T et B sont impliqués dans les réponses adaptatives du système immunitaire. Les lymphocytes T sont impliqués dans les réponses à médiation cellulaire. En réponse aux pathogènes rencontrés, certains lymphocytes T vont produire des cytokines pour diriger la réponse immunitaire alors que d'autres vont produire des granules toxiques induisant la mort du pathogène. Les lymphocytes B sont impliqués quant à eux dans les réponses à médiation humorale avec la production d'anticorps. Ces derniers sont également

capables de sécréter des cytokines. En réponse aux pathogènes, les lymphocytes B vont produire une grande quantité d'anticorps afin de les neutraliser. Les lymphocytes T et B ont des récepteurs à leur surface, TCR (récepteur T) et BCR (récepteur B) respectivement, dont la structure et la fonction sont détaillées dans la partie suivante.

Les lymphocytes T naïfs simples positifs sont polarisés grâce à des cytokines donnant lieu à de multiples sous-types de lymphocytes T présentés dans la figure 1.

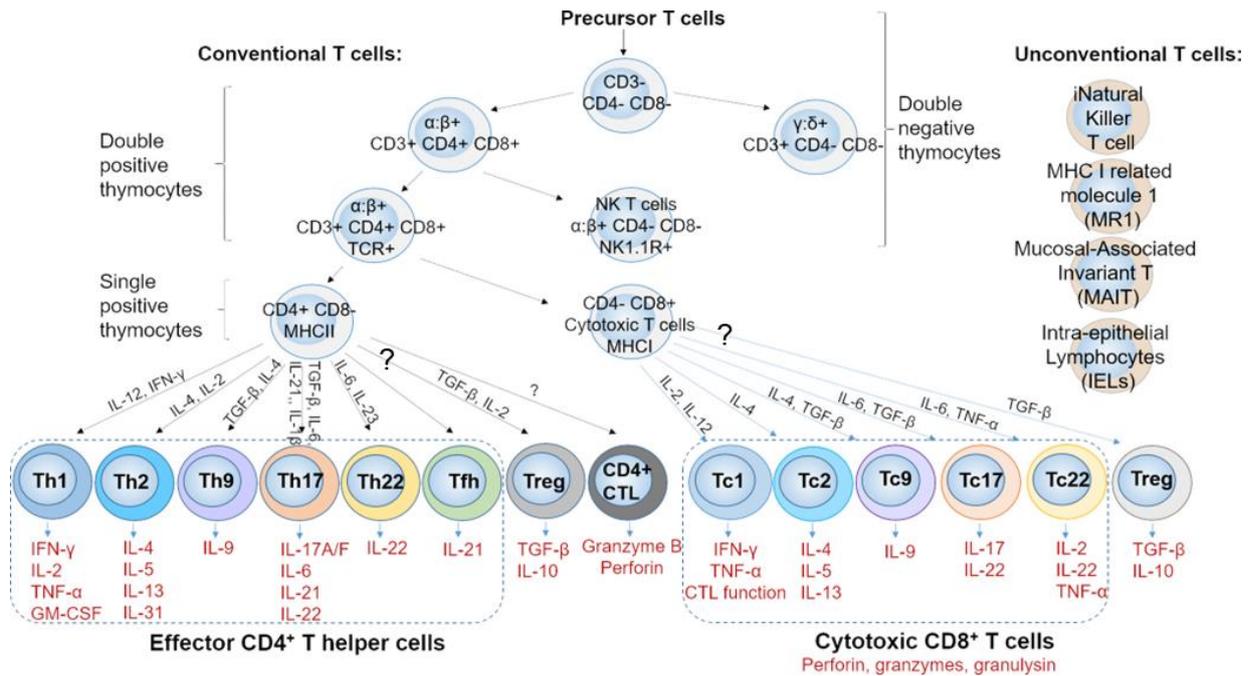


Figure 1 : Vue d'ensemble des sous-types de lymphocytes T conventionnels et non conventionnels.

(Kortekaas Krohn et al., 2022)

D'un côté, on retrouve les lymphocytes T conventionnels qui possèdent un TCRαβ déterminant une spécificité envers un antigène (Ag), qui peuvent être subdivisés en lymphocytes T CD4⁺ et lymphocytes T CD8⁺. Pour les lymphocytes T CD4⁺ dits « helper », noté Th, plusieurs sous-types sont répertoriés et classés selon l'expression de facteurs de transcription, de récepteurs de cytokines ou chimiokines et selon leur production de cytokines, distinguant les Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et les Tfh. De plus, parmi les lymphocytes T CD4⁺ on retrouve une sous-population de cellules T régulatrices exerçant des fonctions suppressives via entre autres l'IL-10 et le TGF-β (Tregs CD4⁺). Pour les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, il y a le même type de classification, avec les Tc1, Tc2, Tc9, Tc17 et Tc22. Finalement, comme pour les lymphocytes T CD4⁺, on retrouve au sein des lymphocytes T CD8⁺, une sous-population cellulaire régulatrice, les Tregs CD8⁺. En plus des lymphocytes T conventionnels,

on retrouve également plusieurs sous-populations cellulaires de lymphocytes T non-conventionnels comme les lymphocytes T $\gamma\delta$, les NKT ou les Mucosal Associated Invariant T cells (MAIT). Ces lymphocytes T non conventionnels ont un TCR semi-invariant, bien que pour certains types de NKT il soit possible de retrouver un TCR variable.

Toutes ces cellules ont des rôles et des fonctions différents qui peuvent varier selon le contexte. Les Tregs (CD4⁺ et CD8⁺) jouent un rôle prépondérant dans la tolérance immune. Leurs caractéristiques sont détaillées dans le chapitre suivant.

B. Qu'est-ce que la tolérance immune ?

La tolérance immune permet l'absence de réponses, entre autres, face aux Ags du soi de notre système immunitaire, au contraire des Ags étrangers. Elle peut être décrite en deux niveaux différents : d'un côté la tolérance centrale (dans les organes lymphoïdes primaires) et d'un autre côté la tolérance périphérique (dans les organes lymphoïdes secondaires). Ces 2 niveaux de tolérance immune impliquent les lymphocytes T et les lymphocytes B. Le corps produit en permanence des lymphocytes capables de reconnaître nos propres Ags, dits auto-réactifs, il est donc nécessaire de les éduquer dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires, pour qu'ils deviennent tolérants. Les mécanismes d'induction et du maintien de la tolérance sont différents entre les lymphocytes B et les lymphocytes T. Dans cette thèse, j'ai choisi de n'aborder que le cas des lymphocytes T.

a. Tolérance centrale

La tolérance centrale est le mécanisme qui a pour but d'éliminer les lymphocytes qui reconnaissent les Ags du soi correspondant aux lymphocytes dits auto-réactifs. Elle permet donc de s'assurer que le système immunitaire ne puisse pas attaquer nos propres cellules. Cette tolérance centrale se déroule dans les organes lymphoïdes primaires : la moelle osseuse et le thymus pour les lymphocytes B et lymphocytes T respectivement.

Avant d'entrer en détails sur les mécanismes liés à la tolérance centrale, il est nécessaire de parler ici du développement des lymphocytes T, ainsi que de leurs récepteurs. Les récepteurs des cellules T (TCRs) sont générés par réarrangement somatique, également appelé la recombinaison VDJ (Figure 2). Ce processus se déroule au cours des premiers stades de maturation des lymphocytes T. Il s'agit d'un réarrangement aléatoire entre le fragment variable (V) avec le segment jonction (J) et parfois le segment de diversité (D). En résulte une nouvelle

séquence en acides aminés dans la région de reconnaissance des TCRs (Krangel 2009). Ce processus permet d'augmenter la diversité des récepteurs et permet ainsi une reconnaissance de tous les Ags.

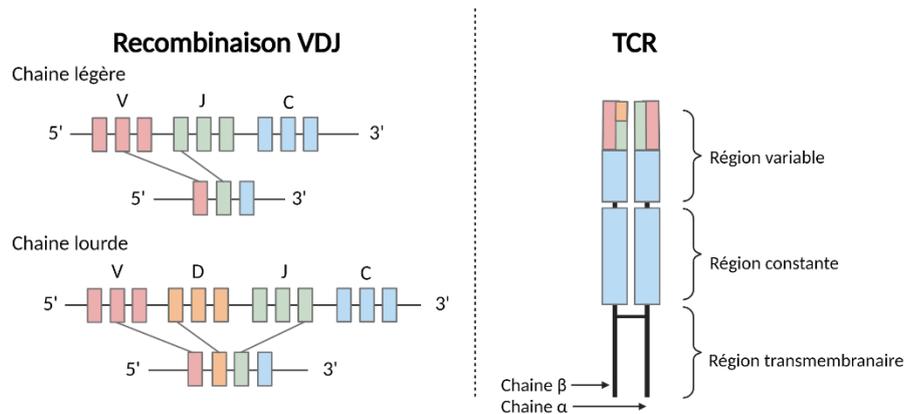
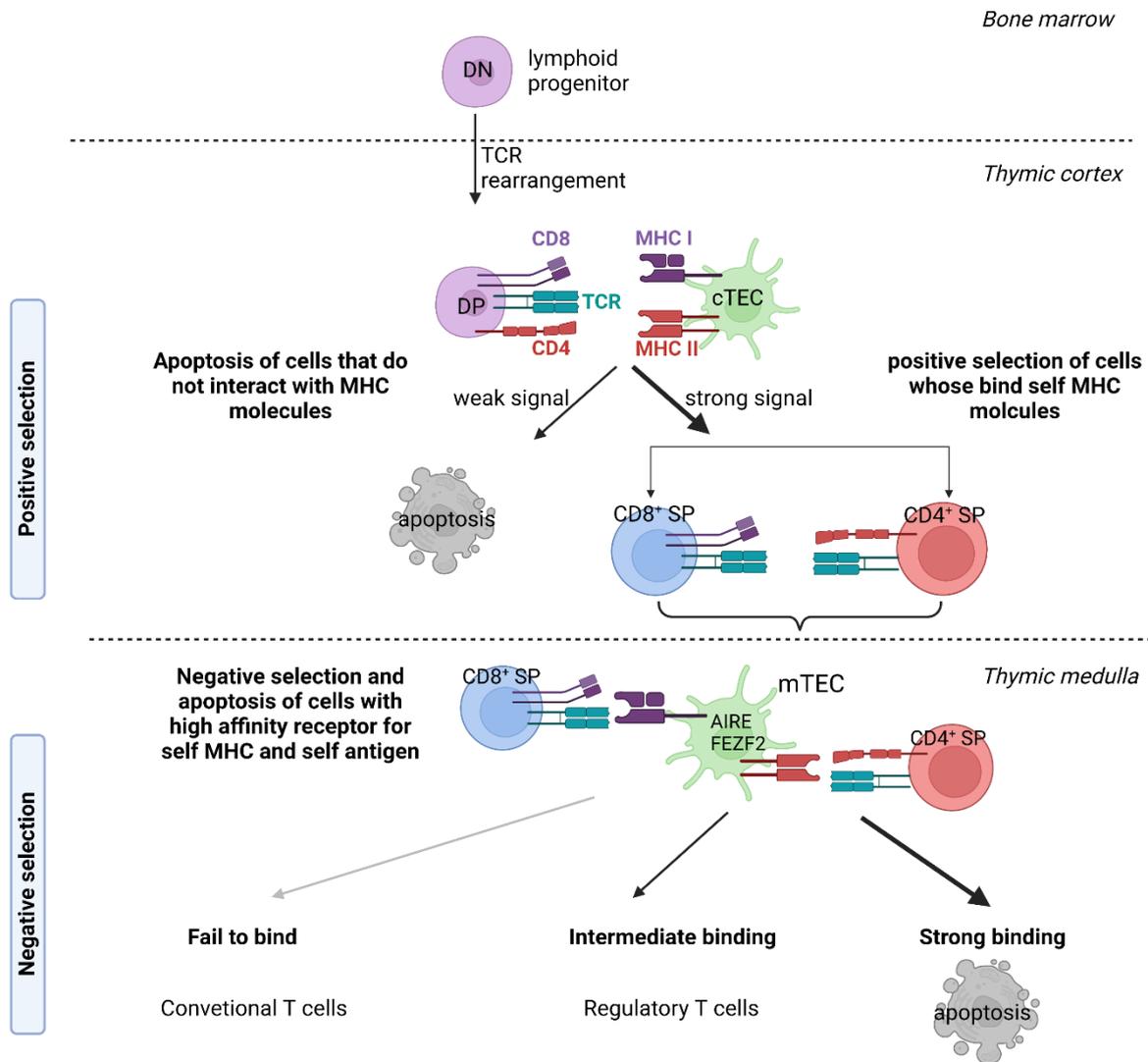


Figure 2 : Schéma des récepteurs TCR des lymphocytes et recombinaison VDJ
Adapté à partir de <https://www.10xgenomics.com>

Du fait de la nature aléatoire du processus de recombinaison VDJ, cela entraîne une génération de TCRs qui peuvent reconnaître des Ags du soi. Afin d'éviter des problèmes d'auto-immunité, c'est là qu'intervient la tolérance centrale en éliminant tous les lymphocytes capables de reconnaître les Ags du soi. Les mêmes mécanismes sont retrouvés pour les lymphocytes B avec leurs BCRs. Il est important de notifier ici que les lymphocytes ne peuvent développer une tolérance que vis-à-vis des Ags qui sont présentés dans la moelle osseuse (lymphocytes B) ou dans le thymus (lymphocytes T).

La tolérance centrale des lymphocytes T se déroule donc dans le thymus. Les lymphocytes T vont subir 2 grandes étapes de sélection dans le thymus : une sélection positive suivie d'une sélection négative (Figure 3) (Klein et al. 2014).



*Figure 3 : Sélection positive et négative des lymphocytes T dans le thymus.
 DN : double négatifs, DP : double positifs, cTEC : cellule épithéliale thymique corticale.
 mTEC : cellule épithéliale thymique médullaire.*

Les progéniteurs de lymphocytes T (doubles négatifs $CD4^-$ et $CD8^-$) entrent dans la partie corticale du thymus. Ici, ils vont subir un réarrangement de leurs récepteurs et devenir des thymocytes doubles positifs $CD4^+CD8^+$. La sélection positive se déroule ensuite dans la partie corticale du thymus à l'aide de cellules épithéliales thymiques (TECs) qui expriment à leur surface les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) I et CMH II. La sélection positive s'assure que le lymphocyte T reconnaisse le CMH avec une affinité suffisante, sans quoi il ne reçoit pas le signal de survie et meurt par apoptose. Selon si le lymphocyte T reconnaît la molécule de CMH I ou de CMH II, il deviendra respectivement un lymphocyte T $CD8^+$ ou un lymphocyte T $CD4^+$. Ensuite les lymphocytes T subissent la

sélection négative, qui elle a pour but de tester l'affinité des TCRs pour les Ags du soi. Ce processus se déroule dans la zone de jonction cortico-médullaire et la médulla du thymus. A cette étape, les TECs vont présenter les Ags du soi à tous les lymphocytes T. Les facteurs de transcription Auto-Immune REgulator (AIRE) et FEZ family zing Finger 2 (FEZF2) jouent un rôle crucial au cours de cette étape de présentation des Ags du soi par les cellules épithéliales (Perry et al. 2014; Takaba et al. 2015). Tous les lymphocytes T interagissant avec une forte affinité avec des Ags du soi liés au CMH, seront alors éliminés par des mécanismes d'apoptose. Au cours de ces étapes, plus de 80% de lymphocytes T sont éliminés. Pour les lymphocytes T ayant une affinité intermédiaire, ils pourront donner des lymphocytes T régulateurs. Il est important de noter ici que tous les Tregs du corps ne sont pas générés à cette étape. En effet, il existe d'autres Tregs qui ne sont pas d'origine thymique mais qui eux sont générés en périphérie (cf chapitre 2). Les études portant sur les Tregs d'origine thymique traitent des Tregs de type CD4⁺, mais à ce jour il n'y a pas de preuve quant à une origine thymique de Tregs CD8⁺. Bien qu'il ne soit pas exclu qu'un sous type de Tregs CD8⁺ puisse également provenir de lymphocytes T CD8⁺ auto-réactifs, il serait intéressant d'étudier leur répertoire TCR pour démontrer leur origine. En effet, le répertoire TCR des Tregs CD8⁺ est très peu étudié chez l'Homme.

b. Tolérance périphérique

La tolérance centrale n'est pas un processus totalement efficace. En effet, il est possible de retrouver des lymphocytes T auto-réactifs dans le sang périphérique qui ont pu échapper à la tolérance centrale (Xing et Hogquist 2012). De plus, tous les Ags du soi n'étant pas exprimés par les cellules présentatrices d'Ags dans le thymus, les clones auto-réactifs contre ces Ags n'ont pas pu être éliminés à cette étape et arrivent en périphérie. C'est pourquoi un autre mécanisme de tolérance se met et place : la tolérance périphérique. Elle se déroule après la tolérance centrale, c'est-à-dire lorsque les lymphocytes quittent les organes lymphoïdes primaires pour aller dans les organes lymphoïdes secondaires (ou périphériques) : les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. L'objectif principal de la tolérance périphérique est d'éliminer les lymphocytes auto-réactifs retrouvés en périphérie, bien qu'il y ait tout de même besoin de garder un répertoire auto-réactif restreint.

Dans le sang, les lymphocytes T auto-réactifs qui pourraient potentiellement s'activer et proliférer doivent être contrôlés. Cette tolérance périphérique se déroule via l'un des 4 mécanismes suivants :

- *L'anergie* : il s'agit du mécanisme majeur permettant d'inactiver les lymphocytes T auto-réactifs. Trois signaux sont nécessaires pour une activation complète des lymphocytes T.
 - Le signal 1 est généré par l'interaction du TCR avec les molécules de CMH présentées par les CPAs.
 - Le signal 2 est le signal de costimulation, le CD28 (entre autres) exprimé par les lymphocytes T se lie aux molécules CD80 et CD86 des CPAs.
 - Quant au signal 3, il correspond à la stimulation des lymphocytes T par des cytokines.

Dans le cas d'induction d'anergie, il y a une absence des signaux 2 et 3, ainsi les lymphocytes T ne peuvent plus s'activer face à un Ag.

- *La délétion clonale* : les lymphocytes T activés sont éliminés par des mécanismes d'apoptose.
- *Le développement de Tregs.*
- *L'ignorance* : Il est également possible que certains lymphocytes T ignorent des Ags du soi ; cela peut être le cas pour des Ags localisés dans des sites immuno-privilegiés.

Il est important de noter ici que la plupart des molécules étrangères qui pénètrent dans notre organisme sont inoffensives, une seule petite partie est néfaste. Ainsi il n'est pas nécessaire de mettre en place des réponses immunitaires adaptatives contre toutes les molécules étrangères. Les allergies sont un exemple de réponses immunitaires adaptatives délétères contre des molécules étrangères inoffensives. En temps normal, le système immunitaire inné ne se charge de faire appel au système immunitaire adaptatif que lorsque celui-ci reconnaît des molécules associées aux pathogènes.

C. Conséquences d'une rupture de la tolérance

Parfois, les mécanismes de tolérance échouent conduisant ainsi à des erreurs de distinction du « danger » et du « non-danger » dont le soi, par le système immunitaire, ce qui

entraîne des réactions dites d'auto-immunité. Les composants du « non-danger » dont le soi, sont identifiés comme appartenant au « danger ». Ainsi, le système immunitaire va réagir de manière destructrice vis-à-vis des propres molécules de l'hôte. Ce défaut du système immunitaire peut entraîner des allergies ou des maladies auto-immunes : il s'agit d'une rupture de la tolérance.

a. Les maladies auto-immunes, principales conséquences d'une rupture de tolérance

L'une des principales conséquences de la rupture de cette tolérance est le développement de MAI. Aujourd'hui on dénombre plus de 80 types de MAI différentes. On estime que 5 à 8% de la population mondiale serait atteinte d'une de ces MAI (Cooper, Bynum, et Somers 2009). Parmi les plus courantes on retrouve la sclérose en plaques, le diabète de type I, le lupus, la polyarthrite rhumatoïde ou bien la maladie de Crohn (Wang, Wang, et Gershwin 2015). Certaines vont être spécifiques à un organe ou à un tissu alors que d'autres sont systémiques avec une pathologie bien plus étendue. Ces MAIs sont caractérisées par la présence d'auto-anticorps et de lymphocytes T auto-réactifs.

Les symptômes communs associés aux MAIs sont : la fatigue, une faible fièvre, des gonflements et rougeurs, une difficulté à se concentrer ou bien des éruptions cutanées. Cependant, chaque MAI peut entraîner d'autres symptômes plus spécifiques, comme c'est le cas pour le diabète de type 1 avec une soif extrême et la perte de poids ou bien dans le cas de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans lesquelles on retrouve de fortes douleurs abdominales et des diarrhées. Ces maladies auto-immunes sont handicapantes et peuvent parfois être mortelles. Il est possible d'en traiter les symptômes mais aujourd'hui, aucun traitement n'est capable de guérir les patients atteints.

b. Quelles sont les causes de la rupture de tolérance ?

De nombreuses études cherchent à comprendre pourquoi ces phénomènes d'auto-immunité apparaissent chez certains individus et pas chez d'autres. Il a été montré que le sexe de l'individu est un facteur important : les maladies auto-immunes sont trois fois plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes (Ngo et al., 2014), bien que les raisons ne soient pas encore claires, les hormones sexuelles comme l'estrogène pourraient jouer un rôle dans l'augmentation de la quantité d'auto-anticorps, mais il est également probable que le chromosome X soit impliqué (Brooks et Renaudineau 2015). Certains facteurs environnementaux sont susceptibles de déclencher des MAIs. Parmi ces facteurs on retrouve notamment certains

microbes de nos intestins (Bellocchi et Volkmann 2018; Clemente, Manasson, et Scher 2018; Khan et Wang 2020; Kirby et Ochoa-Repáraz 2018; Luo et al. 2018; Maeda et al. 2016) ou bien des infections virales comme par exemple le phénomène de COVID long qui a récemment été lié à l'auto-immunité (Rojas et al. 2022). Certaines mutations ou variations génétiques ont été identifiées comme responsables de phénomènes d'auto-immunité comme les mutations des gènes AIRE ou Forkhead Box P3 (FOXP3). La figure 4 reprend les différentes causes et les conséquences d'une rupture de la tolérance. Bien que l'impact de l'environnement soit un élément clé dans la rupture de la tolérance, son implication est difficile à quantifier. Ainsi, j'ai focalisé mon étude sur les mutations génétiques et les prédispositions génétiques,

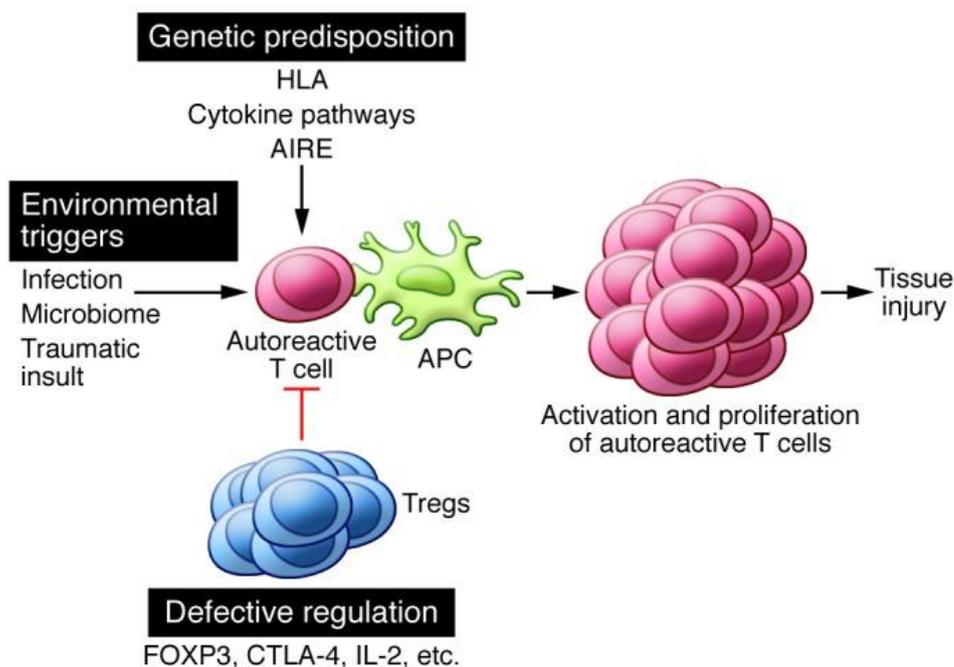


Figure 4 : Causes et conséquences d'une rupture de la tolérance.
(Rosenblum, Remedios, et Abbas 2015)

Mutation du gène AIRE : Parmi les maladies auto-immunes de cause génétique on retrouve le syndrome de PolyEndocrinopathie Auto-immune-Candidose-Dystrophie Ectodermique (APECED) également appelé Polyendocrinopathie Auto-immune de type 1 (APS-1). C'est une maladie héréditaire rare autosomale récessive causée par des mutations dans le gène AIRE. Les premiers signes de ce syndrome sont une infection candidose chronique suivie par un hypoparathyroïdisme auto-immun ainsi que la maladie d'Addison (Ahonen et al. 1990). La prévalence de cette maladie est de 1/500 000 en France mais elle est beaucoup plus élevée dans certains pays scandinaves comme la Finlande avec une prévalence de 1/25 000. Le gène AIRE est nécessaire pour la sélection négative des lymphocytes T dans le thymus car celui-ci est

responsable de l'expression de certains Ags du soi par les cellules épithéliales thymiques. Pour les patients atteints de mutations du gène AIRE, il y a une mauvaise présentation des Ags du soi entraînant à la fois un échappement des lymphocytes T auto-réactifs et une altération de la fonction des Tregs conduisant à l'APECED.

Pendant ce doctorat, j'ai pu participer à des travaux portant sur cette maladie, notamment sur l'étude transcriptomique des Tregs générés après l'utilisation d'anticorps anti-CD45RC pour prévenir et traiter l'APECED chez des rats déficients pour le gène AIRE (Besnard et al. 2022) (article en annexe 3).

Mutations du gène FOXP3 : Une autre maladie auto-immune rare d'origine génétique est le syndrome de dérèglement Immunitaire – Polyendocrinopathie – Entéropathie lié à l'X ou IPEX causée par une mutation dans le gène FOXP3 (Bennett et al. 2001). Cette maladie se développe généralement au cours des premiers mois de vie conduisant généralement à la mort des patients au cours des 2 premières années sans la prise de traitements. Ce syndrome se manifeste par une hypertrophie des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, etc), le développement du diabète de type I ainsi que des infections et des allergies alimentaires et une entéropathie.

FOXP3 est un facteur de transcription clé et nécessaire pour le développement et le maintien des Tregs CD4⁺CD25⁺ (Fontenot, Gavin, et Rudensky 2003). FOXP3 se lie à NFAT (Nuclear Factor of activated T cells) et NFκB ce qui bloque leurs capacités à induire l'expression de gènes codant pour des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4 ou l'IFN-γ (Bettelli, Dastrange, et Oukka 2005). FOXP3 agit également comme un activateur de la transcription de plusieurs gènes, à savoir *CTLA4* et *IL2RA* (CD25) (Hori, Nomura, et Sakaguchi 2003).

Les mutations conduisant à une perte de fonction dans le gène *FOXP3* entraînent une altération du développement des Tregs ainsi que leur dysfonction, ce qui conduit à une activation incontrôlée des cellules T conventionnelles auto-réactives et donc un désordre auto-immun.

Mutations des gènes RAG1 et/ou RAG2 : Des mutations génétiques au niveau des gènes codants pour les recombinaisons RAG1 et/ou RAG2 conduisent à un déficit génétique immunitaire combiné sévère grave (SCID) (Schwarz et al. 1996). Ces mutations empêchent une bonne activité de la recombinaison V(D)J des BCRs et TCRs ce qui entraîne l'arrêt du développement des lymphocytes T et B. Ainsi des phénomènes d'auto-immunité sont observés chez les patients avec des mutations dans ces gènes (K. Chen et al. 2014)

Mutation du gène *PTPN22* : Le gène *PTPN22* code pour une protéine tyrosine phosphatase (LYP) impliquée dans les voies de signalisation des TCRs et BCRs qui a pour rôle d'inhiber l'activation et la prolifération cellulaire (Bottini et Peterson 2014). Des mutations de ce gène ont été associées au développement de MAIs comme le diabète de type 1 (Bottini et al. 2004), à des maladies thyroïdiennes auto-immunes (Smyth et al. 2004), ainsi qu'à la polyarthrite rhumatoïde (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007).

Susceptibilités génétiques liées aux molécules HLA (Human Leucocyte Antigen) : Un large nombre de Genome Wide Association Studies (GWAS) ont montré l'association de polymorphismes génétiques associés à des maladies auto-immunes (Marson, Housley, et Hafler 2015; Zenewicz et al. 2010). Les plus fortes associations sont présentes dans les régions des allèles HLA. Il s'agit de la région la plus dense en gènes du génome humain et représente environ 4 mégabases (Mb), située sur le bras court du chromosome 6. On y retrouve 250 gènes parmi lesquels plus de 40% ont été décrits comme jouant un rôle dans le système immunitaire. Cette région est caractérisée par un très haut degré de polymorphisme. En effet, on retrouve plus de 1000 allèles différents pour HLA-A et HLA-B. Il existe de nombreux exemples d'associations, pour n'en citer qu'un : les individus possédants les allèles HLA-DQB1*03:02 et DQB1*02:01 ont un risque plus élevé de développer le diabète de type 1 que des individus n'ayant pas ces allèles (Barnett et al. 1981).

c. Autres types de tolérance

Il existe d'autres types de tolérance, dont la tolérance fœto-maternelle, qui est nécessaire pendant la grossesse pour permettre à l'embryon/fœtus de ne pas être attaqué par les défenses immunitaires maternelles et cela malgré le fait qu'il exprime des allo-Ags paternels. Ce mécanisme est notamment lié à l'augmentation de l'expression des molécules HLA-G (CMH I non classique) (Gregori et al. 2015) ainsi qu'à l'implication des lymphocytes T régulateurs pour prévenir le développement de réponses immunes contre l'embryon/fœtus (Huang, Chi, et Qiao 2020).

Les phénomènes d'allergie impliquent des réactions immunitaires tolérogènes inefficaces contre des pathogènes non dangereux pour l'organisme comme les acariens ou les pollens. Les lymphocytes T régulateurs sont impliqués dans le maintien de la tolérance immunitaire face aux allergènes, mais les mécanismes par lesquels les Tregs ne parviennent pas à maintenir la tolérance chez les patients allergiques ne sont pas encore complètement élucidés (Rivas et Chatila 2016).

Dans le cadre de transplantation, il est nécessaire d'éviter les phénomènes de rejet de greffe, malgré le fait que les molécules de CMH portées par le greffon soient différentes de celles du receveur. Cela est aujourd'hui possible grâce à la prise de traitements immunosuppresseurs qui vont éteindre de manière aspécifique le système immunitaire et ainsi empêcher le rejet à court terme. Cependant, ces traitements entraînent de nombreux effets secondaires et ne permettent pas d'induire une tolérance vis-à-vis du greffon, ce qui peut entraîner un rejet chronique. L'induction de la tolérance est donc cruciale pour la survie du greffon à long terme. L'objectif majeur en transplantation serait de pouvoir induire une tolérance qui soit à la fois spécifique et non toxique, les Tregs présentent toutes les caractéristiques pour être de bons candidats dans cette induction de la tolérance.

Pour conclure ce chapitre sur la tolérance, que ce soit dans le cas de maladies auto-immunes ou de transplantation, l'induction de la tolérance est un point crucial. Aujourd'hui il n'existe pas de traitement curatif pour les MAIs, ni de traitement spécifique pour éviter le rejet de greffe. Les lymphocytes T régulateurs, un sous-type de lymphocytes T, jouant un rôle important dans les mécanismes de tolérance, ils offrent des possibilités de traitements plus spécifiques pour les MAIs ou les transplantations.

Chapitre 2 : Les lymphocytes T régulateurs, acteurs clés de la tolérance

La tolérance vis à vis des Ags du soi englobe plusieurs mécanismes de contrôle. Dans des conditions physiologiques, le système immunitaire fait appel à la tolérance centrale et à la tolérance périphérique. De plus, il existe un réseau de mécanismes actifs de tolérance qui permet de prévenir l'activation des lymphocytes auto-réactifs : les cellules régulatrices. Ce type de cellules à un rôle de suppression dont les actions peuvent être réalisées par différents mécanismes. Plusieurs types cellulaires ont démontré des capacités régulatrices, cependant la plus importante est la population cellulaire de lymphocytes T régulateurs. Dans des conditions auto-immunes, un des mécanismes de tolérance est altéré, ainsi on a une survie ou une activation de cellules auto réactives pouvant entraîner des dommages tissulaires.

Dans ce chapitre, la notion de cellule régulatrice est détaillée. Les marqueurs associés à la tolérance et utilisés pour identifier et/ou isoler les Tregs ainsi que leurs mécanismes d'action impliqués dans la tolérance sont expliqués. Mon sujet de thèse portant sur la sous-population de lymphocytes T régulateurs de type CD8⁺, une description détaillée de ces cellules et notamment des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} est réalisée. Ensuite, le rôle et l'implication des Tregs dans les MAIs ainsi qu'en transplantation sont développés pour montrer l'importance de ces cellules.

A. Rôles et types de cellules régulatrices

Dans notre organisme nous retrouvons des cellules dites « régulatrices » dont le rôle principal est de réguler ou de supprimer les fonctions d'autres cellules immunitaires. Les cellules régulatrices ont plusieurs fonctions : elles peuvent empêcher le développement de maladies auto-immunes en maintenant une tolérance du soi, éviter les phénomènes d'allergie et d'asthme. Elles sont également responsables de la tolérance fœto-maternelle ainsi que de la tolérance orale (Ags alimentaires).

Il existe plusieurs types de cellules régulatrices parmi lesquelles on retrouve des cellules dendritiques tolérogènes (García-González et al. 2016), des macrophages régulateurs (Fleming et Mosser 2011), des NK régulatrices (Deniz et al. 2008), des lymphocytes B régulateurs (Mizoguchi et al. 2002) et des lymphocytes T régulateurs dont les Tregs CD4⁺ et les Tregs CD8⁺. Ces 2 populations cellulaires de Tregs CD4⁺ et CD8⁺ sont détaillées dans ce chapitre. La

suppression médiée par les Tregs est un mécanisme fondamental et vital permettant une régulation de l'inflammation évitant les désordres auto-immuns.

B. Découverte et historique des Tregs :

La première description de cellules suppressives remonte à 1970 par R. K. Gershon et K. Kondo (Gershon et Kondo 1970), puis en 1972 ils ont pour la première fois introduit le concept de cellules T suppressives (Gershon et al. 1972), mais par manque de marqueurs spécifiques et de gènes régulateurs clairement identifiés pour les distinguer des autres lymphocytes T, elles ont été délaissées. La recherche de nouveaux marqueurs spécifiques des Tregs pour mieux les isoler et ainsi les exploiter, a permis la découverte de marqueurs tels que le CD45RC, le CD25 et FOXP3.

En 1990, Powrie et Mason ont montré que la molécule CD45RC permet de distinguer 2 groupes cellulaires au sein des lymphocytes T CD4⁺ chez le rat : T CD4⁺CD45RC^{high} et T CD4⁺CD45RC^{low/-}, et que les Tregs CD4⁺ étaient dans la fraction T CD4⁺CD45RC^{low/-} (Powrie et Mason 1990). La molécule CD45RC est fortement exprimée par les cellules T conventionnelles, mais peu par les cellules T régulatrices. Cette même observation a été réalisée en 2004 pour les Tregs CD8⁺ qui sont dans la fraction des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} chez le rat (Xystrakis et al. 2004). Ces résultats ont ensuite été confirmés pour les Tregs CD8⁺ chez l'Homme (Bézie et al. 2015; 2018) et sont donc définis comme étant des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-}.

En 1995, Sakaguchi a montré que chez la souris, la déplétion d'une petite population de lymphocytes T CD4⁺ exprimant la chaîne α du récepteur à l'IL-2, le CD25, conduisait à la génération de maladies auto-immunes. De plus, Sakaguchi et son équipe ont montré que le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ permettait de prévenir ces pathologies auto-immunes (Sakaguchi et al. 1995). Ainsi ont été identifiés les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺.

Finalement, en 2003, une équipe a démontré l'importance de FOXP3 dans la fonction des Tregs (Fontenot, Gavin, et Rudensky 2003). En effet, des mutations dans le gène codant pour FOXP3 causant l'IPEX chez l'Homme et également retrouvé chez les souris dites scurfy, ont permis de démontrer son rôle dans les Tregs, ainsi que l'importance des Tregs dans le développement de MAIs. Cependant, il existe un sous-type de Tregs CD4⁺, les Tr1, qui n'expriment pas FOXP3 et ont pourtant des fonctions régulatrices démontrées (Groux et al.

1997). De plus, le rôle de FOXP3 dans les Tregs CD8⁺ n'est pas clair, son rôle n'a pas été démontré. Il semble donc que FOXP3 soit un facteur de transcription clé pour certains types de Tregs mais pas nécessaire pour tous.

De manière générale, que ce soit pour les Tregs CD4⁺ et encore plus pour les Tregs CD8⁺, il y a un réel besoin d'augmenter nos connaissances. En effet, les marqueurs admis pour les isoler ne permettent ni de comprendre l'origine ni l'hétérogénéité de ces cellules. Ces 2 points sont abordés dans les paragraphes suivants.

C. Tregs : plusieurs origines possibles

Il est important de savoir d'où proviennent les Tregs. Premièrement, cela permet d'améliorer nos connaissances générales sur ces cellules. De plus, le fait de connaître leur origine et de savoir comment elles sont générées, cela permettrait d'envisager d'intervenir sur ces mécanismes pour les induire. Finalement, ces connaissances nous permettraient de caractériser leurs mécanismes d'action ainsi que d'identifier les facteurs de transcription clés.

Les lymphocytes T régulateurs peuvent être classés selon leur origine : ils peuvent avoir soit une origine thymique soit une origine périphérique. Il existe une autre source de Tregs, qui ont une origine *induite in vitro*, ce type de Tregs n'est pas retrouvé naturellement dans le corps. La première origine se déroule dans le thymus, des thymocytes se différencient en Tregs et sont appelés tTregs pour Tregs thymiques (anciennement appelés « nTregs » pour Tregs naturels). Les Tregs d'origine périphérique correspondent quant à eux à une conversion de lymphocytes T naïfs en Tregs périphériques (pTregs) (anciennement appelés « iTregs » pour Tregs induits). Finalement, il existe des Tregs induits (iTregs) qui eux, sont générés par protocole de différenciation *in vitro* lors de culture cellulaire en présence de TGF- β . Ces 3 origines de Tregs sont présentées dans la figure 5 et détaillées ci-dessous.

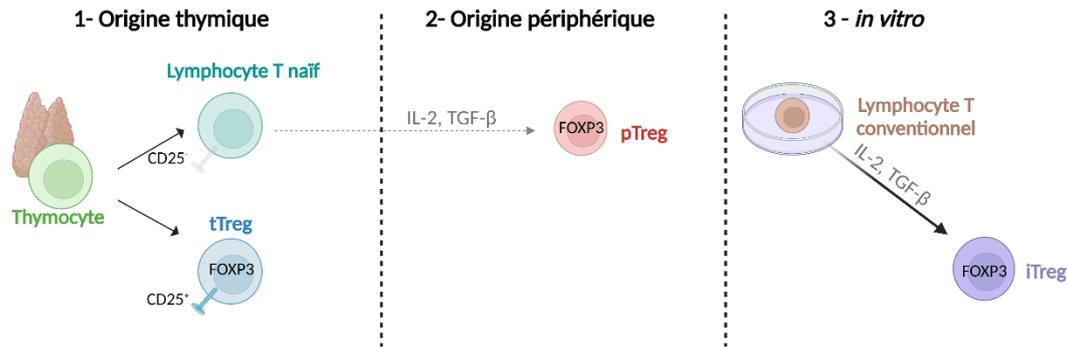


Figure 5 : Origine thymique, périphérique ou induite des Tregs CD4⁺.
Inspiré de (Safinia et al., 2015)).

a. Origine thymique des Tregs :

Les Tregs d'origine thymique, tTregs, sont générés dans le thymus à partir de thymocytes auto-réactifs reconnaissant des Ags du soi. Certains thymocytes arrivent à échapper à la sélection thymique bien qu'ils soient spécifiques à des Ags du soi et se différencient en progéniteurs de Tregs. Ces tTregs sont caractérisés par une augmentation de l'expression protéique des membres de la super-famille des récepteurs au TNF- α dont GITR, OX40 et TNFR2 (Mahmud et al. 2014). L'augmentation de l'expression de ces protéines rend les progéniteurs de Tregs plus sensibles à l'IL-2. L'IL-2 étant une cytokine nécessaire pour une différenciation optimale des Tregs dans le thymus, ces thymocytes vont s'engager dans la voie de Tregs. Ce mécanisme de génération de tTregs impliquant un fort signal TCR pose la question de savoir comment ils sont sélectionnés car ce même fort signal est également responsable de l'induction de la mort d'autres thymocytes. Une hypothèse a été émise selon laquelle l'intensité du signal serait importante. Il semblerait qu'au-dessous d'un certain seuil, une stimulation TCR permettrait l'induction du programme Tregs, alors qu'au-dessus de ce seuil cela conduirait à la mort des thymocytes (Josefowicz, Lu, et Rudensky 2012).

Les études portant sur les tTregs ne prennent en compte que les Tregs de type CD4⁺. A ma connaissance, jusqu'à aujourd'hui il n'y a pas de preuves quant à l'existence de tTregs CD8⁺ cependant cela n'est pas exclu. En effet, du fait du faible nombre d'études portant sur les Tregs CD8⁺, il est possible que cela n'ait pas encore été découvert. Pour vérifier la présence de Tregs CD8⁺ d'origine thymique il serait intéressant de réaliser une analyse des TCRs portés par les Tregs CD8⁺ totaux et voir s'ils reconnaissent ou non des Ags du soi.

b. Origine périphérique des Tregs :

Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs provenant du thymus peuvent être différenciés en plusieurs types cellulaires avec des rôles complètement différents (cf Figure 1). Certains lymphocytes T périphériques conventionnels sont stimulés par des Ags périphériques pour être convertis en Tregs (Apostolou et von Boehmer 2004). Ils acquièrent ainsi l'expression de FOXP3 et des fonctions régulatrices associées pour devenir ainsi des pTregs (Cobbold et al. 2004; Lafaille et al. 2004). Ces phénomènes d'induction de Tregs apparaissent en réponse à des Ags du non soi comme la nourriture, des allergènes ou des bactéries commensales (Kretschmer et al. 2005). En plus d'une stimulation TCR ainsi qu'une co-stimulation faible (lié au faible niveau de CD28), la génération de pTregs à partir de Tregs naïfs, nécessite la combinaison des cytokines IL-2 et TGF- β . Les pTregs ont un phénotype de Tregs notamment avec l'expression des marqueurs comme CTLA-4, GITR et CD103.

Parmi les Tregs générés en périphérie, il existe plusieurs sous populations : un sous-groupe appelé pTregs (anciennement nommé iTregs), les Th3 et les Tr1 (Figure 6). La sous-population de pTregs exprime FOXP3. Les Th3 ont été identifiés avec un rôle de tolérance et de production du TGF- β (Carrier et al. 2007). Quant aux Tr1, ils sont caractérisés par la production d'IL-10 (Pot, Apetoh, et Kuchroo 2011). Ces Tregs Tr1 n'expriment pas FOXP3 de manière basale, mais il peut être up-régulé uniquement transitoirement après stimulation (Gregori et Roncarolo 2018).

Origine induite : Pour les iTregs : De nombreuses études ont démontré que des lymphocytes T conventionnels FOXP3⁻ pouvaient être convertis en lymphocytes T FOXP3⁺ en présence de TGF- β (W. Chen et al. 2003). Ces cellules induites *in vitro* sont appelées iTregs (selon la nouvelle nomenclature). Des tests *in vivo* de transfert de iTregs dans des souris « scurfy » ont montrés que les iTregs permettaient de supprimer les effets de maladies auto-immunes (Huter et al. 2008).

La figure 6 permet de visualiser les différents groupes de Tregs selon leur origine.

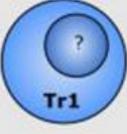
Subtype	Markers	Origin	Activation/ differentiation factor	Main suppressive mechanism
	CD25 ⁺ CD127 ⁻ CTLA-4 ⁺ GITR ⁺ Nrp-1 ⁺ Helios ⁺	Thymus	TCR/CD28 Affinity-dependent IL-2	Cell contact
	HLA-G ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁻	Thymus	TCR/CD28 Affinity-dependent	Cell contact, IL-10, sHLA-G5
	CD25 ^{+/hi} CTLA-4 ⁺ GITR ⁺ Nrp-1 ^{-/+?} Helios ^{-/+?} FoxP3 ^{hi}	Periphery	Antigen-dependent	IL-10, TGF-B
	CD25 ⁻ CTLA-4 ⁺ GITR ⁺ FoxP3 [?] IL-10 ⁺	Periphery	Antigen-dependen, IL-10	IL-10
	CD25 ^{-/+} CTLA-4 ^{lo} GITR ⁻ FoxP3 [?] TGF-β ⁺	Periphery	Antigen-dependent, TGF-β	TGF-β

Figure 6 : Caractéristiques des sous-types de Tregs selon leur origine thymique ou périphérique.

(Jørgensen, Persson, et Hviid 2019)

Une des différences majeures entre les tTregs et les pTregs concerne leur répertoire TCR. Les tTregs ont un répertoire TCR plus auto-réactif que les pTregs. Il n'y a pas distinction phénotypique clairement définie entre les tTregs et pTregs, cependant il serait intéressant de pouvoir les identifier afin de les isoler et tester leurs mécanismes d'action afin de conclure sur des similitudes et/ou différences. De plus, les marqueurs identifiés différenciellement exprimés entre ces 2 types de Tregs pourraient être directement responsables des mécanismes d'action. Chez la souris, les tTregs expriment la Neuropiline 1 (Nrp1) contrairement aux pTregs qui semblent ne pas l'exprimer (Weiss et al. 2012). Cependant cette distinction n'est pas complètement vérifiée chez l'Homme. Il est également suggéré que Hélios (IKZF2) soit un marqueur des tTregs mais pas des pTregs (Thornton et al. 2010), mais pour certains du fait qu'il s'agisse d'un marqueur qui peut être up-régulé lors de l'activation ou de la prolifération cellulaire, il pourrait également être exprimé par les pTregs et ainsi ne constituerait pas un bon marqueur pour différencier les pTregs des tTregs. De plus, par son expression intracellulaire, Hélios n'est pas un bon candidat pour pouvoir isoler les tTregs des pTregs. Aujourd'hui la

distinction des tTregs des pTregs n'est pas claire, ainsi il est difficile de conclure si les mécanismes d'action entre ces 2 types de Tregs sont similaires ou non.

Leurs différences d'origine suggèrent-elle des rôles différents ou des efficacités différentes ? Aujourd'hui, nous ne sommes pas en mesure de répondre à cette question. Il est important de comprendre comment tous les types de Tregs sont générés, pour accroître nos connaissances et élucider leurs mécanismes d'action, les marqueurs exprimés, dans le but d'améliorer l'induction de la tolérance via les Tregs. La plupart des études portant sur les origines des Tregs portent sur les Tregs de type CD4⁺. Aujourd'hui, nous avons peu de connaissances quant aux origines des Tregs CD8⁺. Il est certain qu'une partie des Tregs CD8⁺ ont une origine périphérique, cependant, aucun Tregs CD8⁺ d'origine thymique n'a pour le moment été mis en évidence. Bien que les différentes origines des Tregs (notamment pour le type CD4⁺) permettent de les classer en plusieurs groupes, cela reste une population cellulaire très hétérogène. Plusieurs marqueurs de surface ou intracellulaires ont été étudiés pour mieux définir les Tregs, non pas selon leur origine mais selon leurs caractéristiques phénotypiques. Ces données sont présentées dans le paragraphe suivant.

D. Importante hétérogénéité au sein des lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs constituent une population cellulaire très hétérogène. Ils peuvent être de type CD4⁺ ou de type CD8⁺ et peuvent avoir des origines différentes. De plus, l'expression des marqueurs à leur surface définit les sous-types de Tregs et varie selon l'état d'activation. Dans cette partie, j'ai séparé les Tregs CD4⁺ des CD8⁺, ces derniers étant beaucoup moins décrits que leurs homologues CD4⁺. Bien qu'hétérogènes, ils partagent quelques marqueurs similaires.

a. Les Tregs CD4⁺ :

Au sein des Tregs CD4⁺, plusieurs populations cellulaires ont été identifiées. En effet, on retrouve les Tregs CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ qui sont les plus étudiés, cependant il existe d'autres types de Tregs CD4⁺, tels que les Tr1 qui sont FOXP3⁻, ou les Th3 qui sont caractérisés notamment par l'expression de TFG-β. Les Tregs CD4⁺ correspondent donc à une population cellulaire hétérogène et aujourd'hui il est difficile de savoir si ces sous-types de Tregs CD4⁺ se chevauchent ou non, en termes de phénotype, de mécanismes d'action et/ou de rôles.

Les molécules extra-cellulaires les plus utilisées pour identifier les Tregs CD4⁺ sont le CD25 et le CD127. La molécule CD25 est le premier marqueur qui a été identifié comme étant spécifique des Tregs CD4⁺ (Sakaguchi et al. 1995), cependant, cette molécule est également un marqueur de l'activation des lymphocytes T, limitant donc son applicabilité seule pour leur identification. Le marqueur de surface CD127, codé par le gène *IL7R*, a été démontré corrélant négativement avec les Tregs, les définissant comme étant CD127^{low/-} (W. Liu et al. 2006). Les cellules T CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} correspondent donc aux cellules Tregs CD4⁺ les plus communément acceptées mais ce phénotype ne prend pas en compte l'hétérogénéité des Tregs CD4⁺. Il y a quelques autres marqueurs décrits pour identifier les Tregs CD4⁺ mais qui ne sont pas forcément acceptés et/ou encore trop peu étudiés pour conclure.

La Neuropiline 1, codé par le gène *NRP1* est un marqueur qui peut être retrouvé à la surface de Tregs CD4⁺, mais qui serait également un marqueur lié à l'activation des cellules (Milpied et al. 2009). Une étude a montré que cette molécule semble être nécessaire pour la stabilité des Tregs (Sidaway 2017). Cependant, son utilisation n'est pas totalement acceptée car il n'est pas exprimé par toutes les sous-populations de Tregs. La molécule CD45RA est utilisée pour définir les Tregs naïves alors que le CD45RO permet de définir les Tregs mémoires (Booth et al. 2010). GITR est un point de contrôle immunitaire (« immune checkpoint ») qui est exprimé à la surface des lymphocytes T activés et des Tregs. Il est coexprimé avec CD25 et FOXP3⁺ dans les Tregs CD4⁺ (Tsaknaridis et al. 2003). De plus, plusieurs études qui ont montré le rôle des Tregs dans les maladies auto-immunes, ont identifié GITR comme marqueur de ces cellules (M. Chen et al. 2012; Xufré et al. 2013).

Les marqueurs membranaires sont intéressants car ils permettent d'isoler les cellules alors que les marqueurs intracellulaires ne le permettent pas. Cependant, ces derniers nous permettent d'étudier les mécanismes internes aux cellules, notamment grâce aux facteurs de transcription qui sont responsables des différenciations cellulaires. Il est indispensable d'étudier les facteurs de transcription clés des Tregs pour comprendre comment ces cellules sont générées et comprendre leurs mécanismes d'action.

FOXP3 est le facteur de transcription clé des Tregs identifié en 2003 (Fontenot, Gavin, et Rudensky 2003). Des mutations invalidant ce gène, ont pour conséquence l'IPEX, un syndrome auto-immun avec un défaut des Tregs. Bien que ce soit, entre autres, son taux de méthylation qui soit important pour une expression stable ; le développement et la fonction des Tregs semblent contrôlés par ce facteur de transcription. Il a été suggéré qu'un fort niveau de FOXP3

et un faible taux de méthylation de ce gène indique une bonne fonction suppressive. Le statut de méthylation de la région déméthylée spécifique des Tregs (TSDR), un élément non codant qui est conservé dans le locus du gène *FOXP3*, peut être utilisé pour l'identification des vrais Tregs humains. Cependant l'analyse de la méthylation du TSDR ne permet pas d'isoler les Tregs. Les Tregs $CD4^+$ conventionnels sont à ce jour définis comme étant $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FOXP3^+$. Cependant, le rôle de FOXP3 dans la fonction des Tregs n'est pas si claire. FOXP3 semble être nécessaire pour certains sous-types de Tregs mais pas forcément pour tous comme c'est le cas pour les Tr1. Pour les Tregs $CD8^+$ ($CD8^+CD45RC^{low/-}$), FOXP3 est moins exprimé et présente un moins fort taux de déméthylation comparé aux Tregs $CD4^+$ (Bézie et al. 2018). Son implication dans les Tregs $CD8^+$ n'est pas confirmé. Il serait intéressant d'étudier les autres facteurs de transcription liés à FOXP3. D'autres facteurs de transcription ont été étudiés mais ne sont pas autant acceptés que FOXP3, comme Hélios ou T-bet.

Hélios, le facteur de transcription codé par le gène *IKZF2*, a été démontré comme nécessaire pour la stabilité du phénotype des Tregs $CD4^+$ et Tregs $CD8^+$ par l'équipe de H. Cantor (Kim et al. 2015). Dans des souris déficientes pour *IKZF2*, les Tregs développent un phénotype instable avec une diminution de l'expression de FOXP3, entraînant ainsi un défaut de leur fonction régulatrice conduisant à des phénomènes d'auto-immunité.

Le facteur de transcription T-bet (« T box expressed in T cells »), codé par le gène *TBX21* communément accepté et décrit pour être spécifique des cellules Th1 où il contrôle l'expression de la cytokine IFN- γ (Szabo et al. 2000). Plus récemment, ce facteur de transcription a été associé aux Tregs. Paradoxalement, certains Tregs activés expriment ce facteur de transcription qui semble leur conférer une capacité suppressive accrue. L'élimination des Tregs $CD4^+$ T-bet $^+$ conduit à une auto-immunité Th1 sévère (Levine et al. 2017). Au contraire, avec la déplétion des Tregs $CD4^+$ T-bet $^-$, les Tregs $CD4^+$ T-bet $^+$ restants ont spécifiquement inhibé l'activation des Th1, ce qui est cohérent avec leur colocalisation avec les cellules effectrices T-bet $^+$. D'autres études ont montré que l'expression de T-bet par les Tregs est nécessaire pour la phase précoce de la réponse inflammatoire médiée par les Th1 dans l'intestin (Di Giovangiulio et al. 2019), et également nécessaire pour protéger contre une infection par la toxoplasmose médiée par les Th1 chez la souris (Warunek et al. 2021).

Pour répondre à la question : comment différencier les Tregs des autres lymphocytes T ? L'identification de marqueurs est nécessaire et a permis jusqu'ici l'étude des Tregs $CD4^+$,

notamment grâce aux marqueurs classiques et bien admis tels que CD25 et FOXP3, cependant, ce sont des marqueurs qui peuvent être up-régulés à la suite d'une activation de lymphocytes T non Tregs. Ainsi, ces marqueurs manquent de spécificité et ne sont pas suffisants pour identifier les Tregs.

La conception initiale des Tregs était celle d'une lignée bien spécifiée et nécessaire pour supprimer tous les types de réponses immunitaires. Or, nous nous rendons compte de l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle au sein des Tregs, et il paraît difficile de conclure sur un seul type de Tregs. Une autre proposition de classification des Tregs a été proposée (Sjaastad et al. 2021), et annonce qu'il n'existerait pas un seul type de Tregs CD4⁺ mais plusieurs sous-types de Tregs CD4⁺ qui seraient associés à des sous-ensembles de lymphocytes T CD4⁺ helper (Th1, Th2, Th17, Tf) (Figure 7).

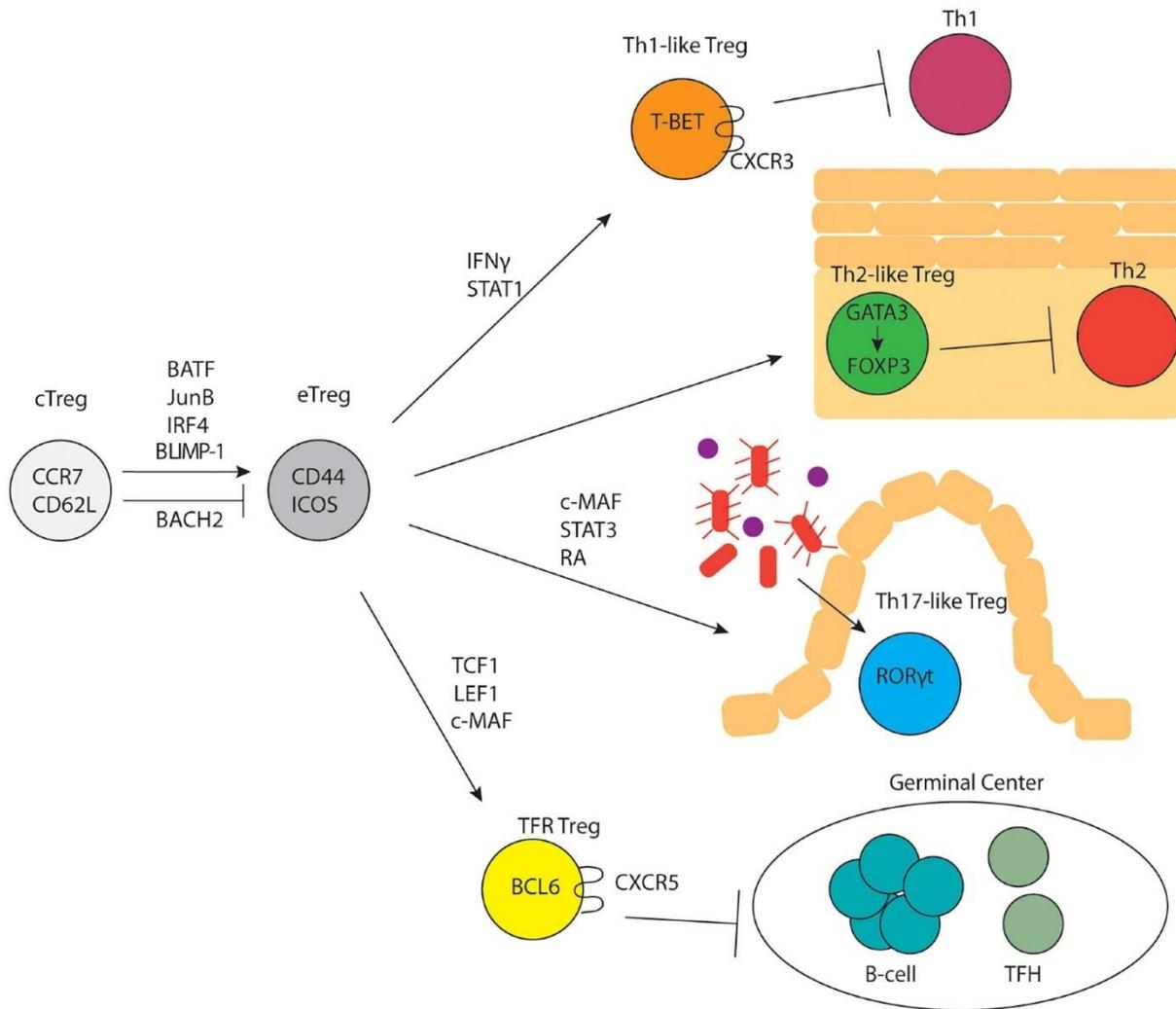


Figure 7 : Différenciation des sous-types de Tregs.

Les cTregs se différencient en eTregs en réponse à une signalisation du TCR et une up-régulation de facteurs de transcription spécifiques. Les eTregs se différencient en sous-types de Tregs parallèlement aux différentes sous-populations des T CD4⁺ et contrôlent ainsi des réponses immunitaires distinctes. (Sjaastad et al. 2021)

Cette équipe propose qu'il y aurait des Tregs centraux (cTregs) avec l'expression des molécules CCR7 et CD62L. Avec une activation via leurs TCRs, ces cTregs vont se convertir en Tregs effecteurs (eTregs), puis se différencier en différents sous-types de Tregs de manière dépendante aux grands sous-groupes des lymphocytes T CD4⁺, bien qu'ayant des fonctions différentes de leurs homologues conventionnels, mais distingués par les mêmes ensembles de facteurs de transcription. Ainsi on aurait des Tregs CD4⁺ Th1-like, des Tregs CD4⁺ Th2-like, des Tregs CD4⁺Th17 like et des Tregs CD4⁺ TFR. Ces différents types de Tregs contrôleraient chacun leurs lymphocytes T CD4⁺ homologues. Cette nouvelle proposition de classification des Tregs CD4⁺ introduit la notion de plasticité des Tregs et interroge sur la vraie identité des Tregs.

b. Les Tregs CD8⁺ :

Contrairement aux Tregs CD4⁺ qui eux sont bien établis, quand bien même plusieurs sous-populations sont décrites, les Tregs CD8⁺ restent les grands oubliés notamment car ces cellules sont dix fois moins présentes que les Tregs CD4⁺ si on se réfère au marqueur FOXP3 (Bézie et al. 2018) et leur phénotype n'est toujours pas clair. En effet, plusieurs phénotypes ont été répertoriés, mais il n'y a pas de phénotype consensus accepté. De plus, les différentes équipes utilisant des panels d'identification différents, on ne connaît pas la redondance entre ces différents phénotypes décrits.

A ce jour, à ma connaissance, il n'existe pas de classification similaire à celle proposée par l'équipe de Sjaastad pour les Tregs CD8⁺. Du fait qu'il n'y a pas de phénotype consensus accepté et du faible nombre d'études portant sur ce type de Tregs vis-à-vis des Tregs CD4⁺, cela rend leur classification plus difficile. Dans ce paragraphe dédié aux phénotypes et marqueurs des Tregs CD8⁺, j'ai décidé de lister dans le tableau 1 les différents phénotypes de Tregs CD8⁺ décrits. Les phénotypes de Tregs soulignés dans le tableau sont détaillés, notamment les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}, qui est l'objet principal de ma thèse.

Les autres phénotypes ne sont pas détaillés, soit car ils se superposent (les Tregs CD8⁺CD122⁺FOXP3⁺ correspondant à la fois aux Tregs CD8⁺CD122⁺ et aux Tregs CD8⁺FOXP3⁺, ou bien les Tregs CD8⁺LAG3⁺FOXP3⁺CTLA4⁺ étant contenus dans les Tregs CD8⁺FOXP3⁺, ou encore les Tregs CD8⁺CD11c^{high} qui semblent être similaires aux Tregs CD8⁺KIR⁺), soit parce que ces phénotypes ont été très faiblement décrits, soit car ces phénotypes sont trop différents des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} principalement étudiés dans cette thèse, comme c'est le cas des Tregs CD8⁺αα ou Tregs CD8⁺ restreints à Qa-1. Cependant, bien que non détaillés, ils ne sont pas exclus de la compréhension globale des Tregs CD8⁺.

Phénotype des Tregs	Références
<u>CD8⁺Foxp3⁺</u>	(Mahic et al. 2008)
<u>CD8⁺CD122⁺</u>	(Rifa'i et al. 2004)
CD8 ⁺ CD122 ⁺ PD-1 ⁺	(Dai et al. 2010)
<u>CD8⁺CD28⁻</u>	(Strioga, Pasukoniene, et Characiejus 2011)
CD8 ⁺ $\alpha\alpha$	(Sheng et al. 2019)
CD8 ⁺ restreints à Qa-1	(Hu et al. 2004; Jiang et Chess 2008; Kim et Cantor 2011)
<u>CD8⁺CD45RC^{low/-}</u>	(Bézie et al. 2018; Guillonnet et al. 2007; Xystrakis et al. 2004)
CD8 ⁺ CD103 ⁺	(Uss et al. 2006)
CD8 ⁺ LAG-3 ⁺ Foxp3 ⁺ CTLA-4 ⁺	(Boor et al. 2011)
CD8 ⁺ IL-10 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RO ⁺	(Wei et al. 2005)
CD8 ⁺ CD11c ^{high}	(Z. Chen et al. 2013)
<u>CD8⁺ KIR⁺</u>	(J. Li et al. 2022)

Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques des sous-types de Tregs CD8⁺
Les phénotypes soulignés sont détaillés ci-dessous.

- Les Tregs CD8⁺ FOXP3⁺ :

Chez l'Homme, dans le sang périphérique, les cellules T CD8⁺FOXP3⁺ représentent de 0,1% à 1% des lymphocytes T CD8⁺ totaux (Bézie et al. 2018; Churlaud et al. 2015). Cette sous population cellulaire, décrite comme Tregs CD8⁺FOXP3⁺ a été étudiée (Mahic et al. 2008). Une analyse transcriptomique a montré que le profil d'expression génique des Tregs CD8⁺FOXP3⁺ est différent du profil des lymphocytes T CD8⁺ conventionnels alors qu'il est similaire à celui des Tregs CD4⁺ (Agle et al. 2018). Les marqueurs partagés entre les Tregs CD8⁺FOXP3⁺ et les Tregs CD4⁺ sont CD25, CD103, GITR et CTLA-4. Il y a très peu d'expression de FOXP3 dans les thymocytes CD8⁺, moins de 5% des thymocytes FOXP3⁺ sont CD8⁺, le reste étant des thymocytes CD4⁺ (Fontenot et al. 2005) ; une hypothèse a été émise selon laquelle les Tregs CD8⁺FOXP3⁺ se développeraieent exclusivement en périphérie. Aujourd'hui il n'y a pas de marqueurs de surface spécifiques associés à l'expression de FOXP3, il n'est donc pas possible

de les isoler de manière pure. Une amplification des Tregs CD8⁺FOXP3⁺ est observée chez les patients atteints de cancers gastriques ou de la prostate (Kiniwa et al. 2007; Peng et al. 2012).

En conclusion, pour les Tregs CD8⁺ comme pour les Tregs CD4⁺, FOXP3 peut être un marqueur nécessaire pour certains types de Tregs, cependant, son absence n'exclut pas l'existence de Tregs CD8⁺, comme le démontre la présence des Tr1 FOXP3⁻.

- Les Tregs CD8⁺CD122⁺ :

La protéine CD122 est encodée par le gène *IL2RB*. Il s'agit d'une sous-unité des récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15. Des souris déficientes pour *IL2RB* développent un phénotype auto-immun, qui peut être restauré par le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺CD122⁺ (Rifa'i et al. 2004). Il a été montré par la suite que le marqueur CD122 seul, n'est pas suffisant pour identifier les Tregs CD8⁺ chez l'Homme. En effet ce marqueur est up-régulé par les cellules mémoires ou les cellules ayant expérimentées un Ag. Il est donc nécessaire d'associer ce marqueur CD122 à d'autres marqueurs comme le CD44, CD62L, CXCR3, PD-1, CD38 ou Ly49. Les mécanismes d'action des Tregs CD8⁺CD122⁺ sont la production d'IL-10 et l'induction d'apoptose via la voie FAS/FAS ligand. Les Tregs CD8⁺CD122⁺PD1⁺ ont été décrits pour supprimer le rejet d'allogreffes de peau via la voie FAS/FAS ligand (H. Liu et al. 2017).

- Les Tregs CD8⁺CD28^{low/-} :

Le CD28 est une molécule co-stimulatrice des lymphocytes T qui se lie à CD80 et CD86 exprimés par les CPAs. Cette molécule induit une prolifération des lymphocytes T, une production de cytokines et permet la survie cellulaire. La perte de la molécule CD28 est une marque qui peut être associée à la senescence des lymphocytes T CD8⁺, montrant ainsi un défaut de la fonction effectrice de ces cellules qui peuvent ainsi avoir des fonctions régulatrices (Huff et al. 2019; J et al. 2013). Dans le cancer, la population T CD8⁺CD28⁻ contribue à la suppression des réponses anti-tumorales ainsi qu'à la résistance de l'immunothérapie (Filaci et al. 2007; Tsukishiro, Donnenberg, et Whiteside 2003). Dans le cas de la transplantation, ces cellules subissent une amplification clonale et permettent de maintenir la tolérance de la greffe. Ces cellules sont capables de supprimer les lymphocytes T CD4⁺ helper ainsi que les lymphocytes T CD8⁺ conventionnelles.

- Les Tregs CD8⁺ KIR⁺ :

L'équipe de Mark Davis a mis en évidence un groupe de lymphocyte T CD8⁺ qui exprime les marqueurs KIRs (Killer Cell Immunoglobuline-like Receptor) (*KIR3DL1* et *KIR2DL3*) qui est capable de supprimer l'auto-immunité en tuant des lymphocytes CD4⁺ conventionnels chez l'Homme (J. Li et al. 2022). Ces lymphocytes T CD8⁺ KIR⁺ semblent avoir un profil transcriptomique similaire aux Tregs CD8⁺ restrictifs au Qa-1b identifiés par le groupe de Cantor (Kim et al. 2010). Cette population de Tregs CD8⁺ KIR semble être augmentée dans les patients atteints de MAIs ou de Covid-19 et sa proportion serait directement associée à la sévérité de la maladie. Pour conforter la fonction suppressive des Tregs CD8⁺ KIR⁺ pendant les infections, la déplétion de ces cellules dans des souris a montré que celles-ci présentaient des inflammations locales plus sévères après des infections virales. Au niveau fonctionnel, mais pas au niveau de la séquence, le gène Ly49 chez la souris est homologue aux gènes KIR humains. Chez la souris, les Tregs CD8⁺CD122^{high}Ly49⁺ sont dépendantes de Hélios et de la cytokine IL-15 (Saligrama et al. 2019).

- Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} :

Notre équipe utilise la protéine CD45RC pour identifier les Tregs CD8⁺ à la fois chez la souris, le rat et l'Homme. Le CD45RC est une isoforme de la protéine tyrosine phosphatase CD45. Plusieurs isoformes de cette protéine existent : CD45RA, CD45RO, CD45RB et CD45RC. Elles sont générées par épissage alternatifs des exons 4, 5 et 6 du gène CD45 (*PTPRC*). Les isoformes CD45RA et CD45RB sont exprimées à la surface des lymphocytes T naïfs et les TEMRA (Terminally differentiated Effector Memory Cells). Le CD45RO est quant à lui exprimé à la surface des cellules activées et mémoires. L'isoforme CD45RC permet de distinguer 2 groupes cellulaires distincts au sein des lymphocytes T CD8⁺ : un groupe n'exprimant pas ou faiblement le CD45RC et un groupe l'exprimant fortement, les CD8⁺CD45RC^{low/-} et CD8⁺CD45RC^{high} respectivement (Figure 8). Les Tregs CD8⁺ sont donc définies comme étant des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} (Guillonnet et al. 2007; Xystrakis et al. 2004). De plus, la population T CD8⁺CD45RC^{high} ne présente pas de propriétés suppressives *in vitro* et *in vivo* (Bézie et al. 2019a) Finalement, les lymphocytes T CD8⁺ exprimant FOXP3 sont dans la fraction CD8⁺CD45RC^{low/-} (Picarda et al. 2017). Pour toutes ces raisons, nous utilisons la molécule CD45RC comme marqueur pour identifier la fraction contenant les Tregs CD8⁺.

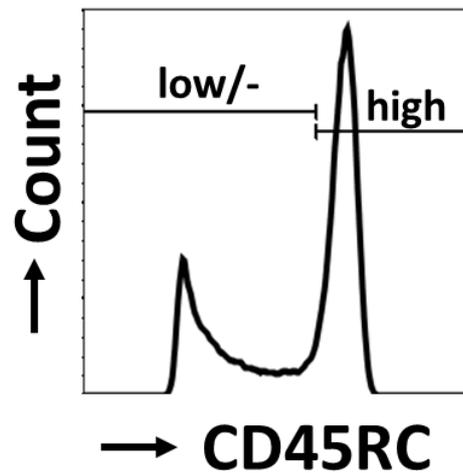


Figure 8 : Profil d'expression de la protéine CD45RC au sein des lymphocytes T CD8⁺ totaux

Depuis plus de 15 ans, notre laboratoire a démontré l'activité suppressive des Tregs CD8⁺ et a mis en évidence leur potentiel rôle en transplantation. Tout d'abord, il a été démontré que le blocage de la voie CD40/CD40L en utilisant CD40Ig, permettait d'induire la survie à long terme d'allogreffes cardiaques chez le rat (Guillot et al. 2002). Ce modèle a mis en évidence le rôle des lymphocytes T CD8⁺ et notamment des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} ont été montrés essentiels dans la survie des animaux greffés (Guillonnet et al. 2007). En effet, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} isolés d'animaux traités avec CD40Ig, dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, a permis la survie à long terme de manière spécifique du donneur.

Après avoir démontré les fonctions suppressives des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} dans des modèles de rats (Picarda et al. 2017; 2014; Guillonnet et al. 2007; Bézie et al. 2015), notre équipe a étudié les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} du sang périphérique chez l'Homme. Premièrement, *in vitro*, il a été démontré que les cellules Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} suppriment la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ en réponse à une stimulation allogénique, alors que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} n'ont pas cette capacité (Bézie et al. 2018). Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} pré-stimulés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 sont plus suppressifs que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} non stimulés. Il a également été montré que l'amplification des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} pendant 14 à 21 jours en présence d'anticorps anti-CD3, anti-CD28, d'IL2, d'IL-15 et de rapamycine les rend encore plus suppressifs. *In vivo*, dans des modèles de transplantation de peau chez des souris immunodéficientes NOD/SCID/IL2ry (NSG), le transfert de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés permet de limiter le rejet de greffe, des résultats similaires ont été observés dans des modèles de réaction du greffon contre l'hôte

(GVHD) (Bézie et al. 2018). Finalement, notre équipe a généré des Tregs CD8⁺ en introduisant un récepteur antigénique chimérique (CAR) dérivé d'un anticorps spécifique de l'antigène HLA-A*02 (A2-CAR). Elle a montré que ces Tregs CD8⁺ A2-CAR étaient des suppresseurs plus puissants des réponses immunitaires induites par le mésappariement HLA-A*02 que les Tregs CD8⁺ Control-CAR, à la fois *in vitro* et *in vivo*, dans des modèles de rejet de greffe de peau humaine et de GVHD chez les souris NSG (Bézie et al. 2019a).

De manière générale on peut retenir que quelques marqueurs pour identifier les Tregs CD8⁺ ont été mis en évidence. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, aucun de ces marqueurs ne permettait d'isoler une sous-population de Tregs CD8⁺ de manière très spécifique, ce qui rend leur utilisation plus difficile par rapport aux Tregs CD4⁺. Les Tregs CD8⁺ correspondent donc à une population cellulaire hétérogène avec des phénotypes différents décrits et des caractéristiques fonctionnelles différentes.

Cela soulève plusieurs questions et notamment existe-t-il plusieurs sous populations de Tregs CD8⁺ comme cela semble être le cas pour les Tregs CD4⁺ ? Si oui, partagent-elles des marqueurs communs ? Et ont-elles des propriétés régulatrices similaires ou différentes ?

E. Les mécanismes de suppression des Tregs

Bien que les propriétés et les marqueurs définissant les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ sont étudiés, leurs mécanismes spécifiques par lesquels ils contrôlent les réponses immunitaires ne sont pas entièrement élucidés. Plusieurs mécanismes sont proposés ; il est clair qu'il n'y a pas qu'un seul mécanisme responsable des phénomènes de suppression exercés par les Tregs. Comprendre comment chaque Treg exerce sa fonction suppressive permettra d'affiner les stratégies thérapeutiques pour promouvoir ou favoriser la suppression des Tregs.

Ces mécanismes de suppression (présentés dans la figure 9) peuvent varier en fonction de l'environnement et des différentes sous-populations de Tregs impliqués. Globalement, on retrouve 5 mécanismes dans la fonction des Tregs :

- La sécrétion de cytokines inhibitrices
- L'effet cytotoxique direct : la cytolyse
- La modulation de cellules présentatrices d'Ag
- Les perturbations métaboliques

- La compétition avec des cellules T conventionnelles

Il est important de noter ici que tous les mécanismes de suppression ne sont pas réalisés par une seule sous-population de Tregs, mais plutôt qu'ils reflètent l'hétérogénéité des Tregs en général. Bien qu'il n'y ait eu que peu d'études portant sur les mécanismes d'action des Tregs CD8⁺, ils semblent qu'ils soient semblables à ceux des Tregs CD4⁺.

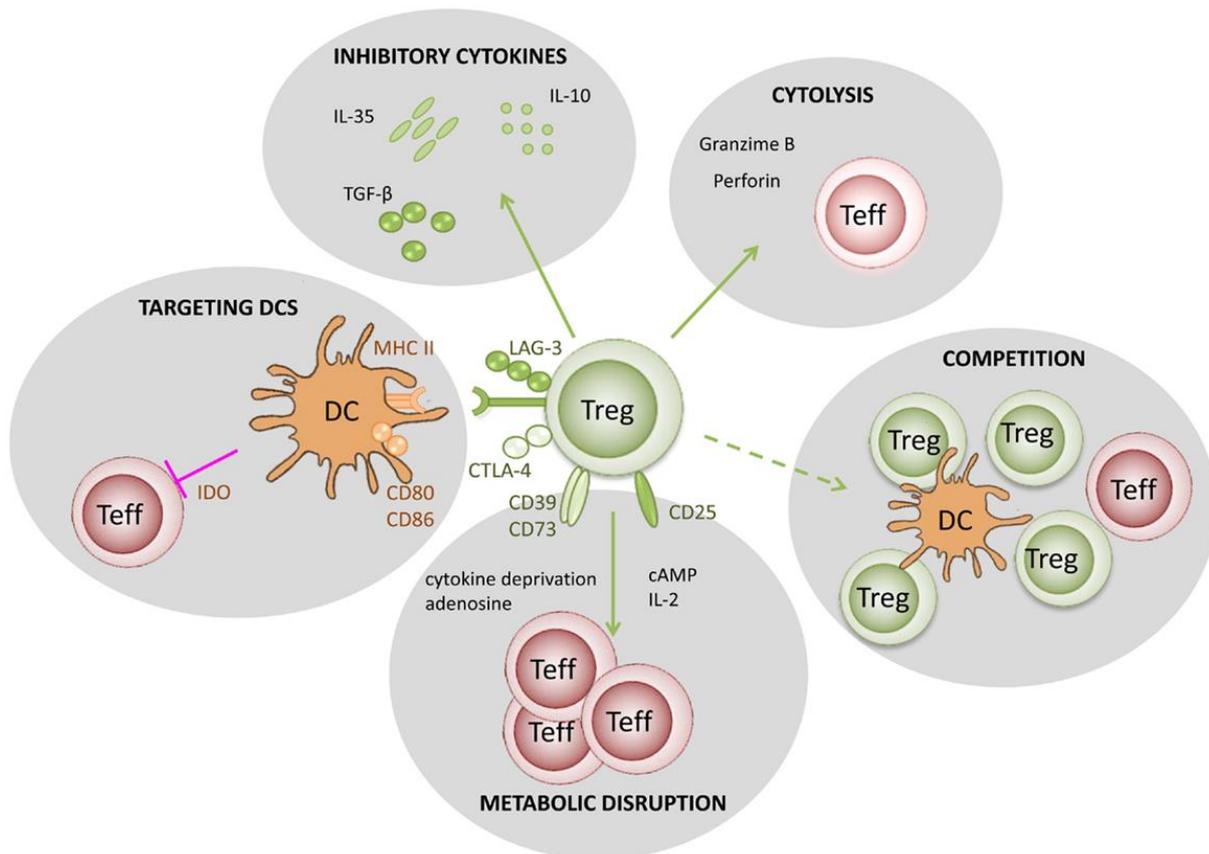


Figure 9 : Vue globale des mécanismes de suppression des Tregs (Caridade, Graca, et Ribeiro 2013)

a. Cytokines inhibitrices :

Les Tregs peuvent agir à distance via des cytokines inhibitrices. Les plus décrites sont l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35. Les Tregs produisent ces cytokines qui permettent de supprimer l'activité des CPAs et des cellules conventionnelles. Les actions de ces cytokines sont décrites ci-dessous.

L'IL-10 est une cytokine de type II, homo-dimérique, ayant des actions inhibitrices. Cette cytokine est produite par différents types cellulaires : comme les monocytes et les lymphocytes T. Des souris déficientes pour l'IL-10 ou traitées avec des anticorps bloquants anti-récepteur de

l'IL-10 meurent avec des doses sous-léthales de lipopolysaccharide (LPS) (Berg et al. 1995). De manière intéressante, chez des souris déficientes pour l'IL-10 le développement des lymphocytes est normal mais ces animaux souffrent d'entérocolite chronique (Kühn et al. 1993). On observe qu'une augmentation de la production d'IL-10 par des Tregs CD4⁺FOXP3⁺ est associée avec la phase de guérison de l'Encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), modèle murin mimant la sclérose en plaques (McGeachy, Stephens, et Anderton 2005). De plus, il a été montré que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} produisant de l'IL-10 (ainsi que de l'IFN- γ) ont des capacités suppressives supérieures à celles qui n'en produisent pas (Bézie et al. 2018). L'IL-10 permet ainsi de prévenir les phénomènes d'auto-immunité et son effet de régulation est médié par ses effets sur les CPAs.

Le TGF- β est une cytokine pléiotropique qui agit à de nombreux niveaux dans les fonctions cellulaires : la prolifération, la différenciation, la migration et la survie. Des souris déficientes pour le gène codant pour le TGF- β (*TGFBI*) développent une maladie auto-immune et succombent vers 4-5 semaines (Kulkarni et al. 1993). Le blocage de TGF- β avec des anticorps neutralisants abroge partiellement la fonction suppressive des Tregs chez l'Homme (Strauss et al. 2007). GARP (gène *LRRC32*) a été identifié comme étant un marqueur spécifique des Tregs CD4⁺ activés (Probst-Kepper et al. 2009). GARP peut se lier au TGF- β latent entraînant son expression membranaire, ce qui par la suite, peut conduire à une sécrétion du TGF- β , qui lui joue un rôle dans la fonction des Tregs CD4⁺ (Tran et al. 2009).

L'IL-35 est une cytokine hétérodimérique composée de 2 chaînes : l'IL-12 α (p35) et de EB13 (IL27 β). Cette cytokine est produite par les Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ et contribue à leurs fonctions suppressives (Collison et al. 2007). De plus, dans des modèles de souris déficientes pour la chaîne *IL12A* ou *EB13*, les Tregs CD4⁺ qui ont un manque d'expression de l'IL-35 ont une capacité réduite pour la suppression de la prolifération des cellules conventionnelles (Collison et al. 2007).

Plus récemment, il a été démontré que la cytokine IL-34 a des propriétés immuno-suppressives. Notre équipe a montré que les Tregs CD4⁺ et CD8⁺ stimulés produisent cette cytokine et que son blocage *in vitro* diminue les capacités suppressives de ces cellules (Bézie et al. 2015). Il a également été montré que le traitement d'un modèle d'allogreffe cardiaque de rat avec un AAV codant pour l'IL-34, induit la tolérance à la greffe grâce à la différenciation de macrophages vers un profil régulateur et par conséquent une induction des Tregs CD4⁺ et CD8⁺ par ces macrophages. Finalement, le traitement par l'IL-34 a retardé l'encéphalomyélite

auto-immune expérimentale chez la souris ainsi que la GVHD et le rejet d'allogreffe de peau humaine chez la souris NSG immunodéficiente humanisée (Freuchet et al. 2022).

D'autres molécules impliquées dans les fonctions suppressives des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ ont été identifiées à savoir : IDO, FGL2 et $IFN-\gamma$. Il a été montré dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, que le blocage d'IDO avec du 1-méthyl tryptophane augmente le rejet de greffe. Ces résultats suggèrent que la tolérance médiée par les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ implique IDO (Guillonnet et al. 2007). L' $IFN-\gamma$ a également été montré comme jouant un rôle dans l'activité suppressive des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$. Les Tregs produisant les cytokines $IFN-\gamma$ et IL-10 ($CD8^+CD45RC^{low/-} IFN-\gamma^+IL-10^+$) sont les Tregs les plus suppressifs parmi le reste des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ (Bézie et al. 2018). Finalement une autre molécule a été mise en évidence, FGL2, comme jouant un rôle dans l'activité suppressive des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ (Bézie et al. 2011). FGL2 est surexprimé dans les greffons de rats traités par AdCD40Ig par rapport à des rats non traités. De plus, les Tregs de rats traités par AdCD40Ig inhibe la prolifération des lymphocytes T en réponse aux pDC allogéniques et cette inhibition est abrogée lorsque des anticorps bloquants sont utilisés. Un traitement avec FGL2 est capable d'induire une survie à long terme du greffon.

Pour autant, ces cytokines immunosuppressives ne permettent pas d'expliquer à elles seules tous les mécanismes d'action des Tregs. Il y a également une nécessité de contacts cellulaires pour l'activité suppressive des Tregs $CD4^+$ et des Tregs $CD8^+$. L'utilisation de ces cytokines en tant que traitement est envisagée pour aider à induire la tolérance que ce soit le cas de MAIs ou de transplantations.

b. L'effet cytotoxique direct : la cytolysse :

La cytolysse (ou cytotoxicité) est un mécanisme de suppression utilisé par certains types de Tregs pour tuer les cellules conventionnelles cibles. En diminuant le nombre de cellules T conventionnelles (Tconvs), les Tregs permettent de mieux contrôler les réponses immunitaires. Il s'agit d'une action directe cellule-cellule. L'effet est médié par la production de granzyme B (gène *GZMB*) et de perforine (gène *PRFI*) ce qui a pour conséquence la mort par apoptose des lymphocytes T conventionnels ou des CPAs (Gondek et al. 2005). Ce type de Tregs possèdent des granules contenant de la perforine et du granzyme B, qui sont exocytés. Une fois libérées de ces Tregs, les molécules de perforine vont s'insérer dans la membrane lipidique des cellules cibles formant un pore qui laisse entrer le granzyme B dans la cellule cible. S'en suit l'apoptose de la cellule cible induite par le granzyme B. Ce mécanisme d'action décrit pour les Tregs $CD4^+$

(Cao et al. 2007; Grossman et al. 2004) ne semble pas être impliqués dans les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}. En effet, peu de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} expriment à la fois la perforine et le granzyme B. De plus des tests de toxicité contre des cellules allogéniques *in vitro* et *in vivo* n'ont pas montré de cytotoxicité des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} (Bézie et al. 2018). Cependant, ce mécanisme semble être impliqué dans les Tregs CD8⁺KIR⁺. Ces Tregs provenant de souris *PRFI*^{-/-} ne sont pas capables de supprimer la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (activés par des antigènes) (Saligrama et al. 2019).

c. Dérèglement métabolique :

Les Tregs exprimant les molécules CD39 et CD73 sont capables d'inhiber les réponses immunitaires en réalisant des dérèglements métaboliques, notamment médiée par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), qui elle est capable de réguler les fonctions des Tconv et des CPAs. Le CD39 convertit l'Adénosine Tri Phosphate (ATP) ou Adénosine Di Phosphate (ADP) en AMP, puis CD73 déphosphoryle l'AMP en adénosine. L'adénosine, en se fixant à ces récepteurs sur les cellules T conventionnelles, induit l'augmentation de l'AMP intracellulaire, notamment via le récepteur 2A. Ainsi, ces Tregs transfèrent de l'adénosine aux cellules cibles ce qui entraîne une cascade d'activations conduisant à l'inhibition des cellules T conventionnelles (Chow et Davis 2000) (Deaglio et al. 2007).

Les Tregs CD4⁺CD39⁺ sont plus stables et ont des capacités prolifératives, suppressives et de survie supérieures aux Tregs CD4⁺CD39⁻ notamment grâce à leurs capacités suppressives dépendantes de l'adénosine (Gu et al. 2017). Ces Tregs sont altérés chez les patients atteints de sclérose en plaques. De plus, des Tregs CD4⁺ déficients pour CD73 ne sont pas capables d'inhiber la gastrite dans un modèle murin (Alam et al. 2009).

Pour les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}, ce mécanisme de suppression n'a pas été mis en évidence. Cependant, une équipe a montré que le CD39 serait impliqué dans la médiation de l'activité suppressive des Tregs CD8⁺ infiltrant les tumeurs chez l'Homme (Parodi et al. 2013).

d. Compétition avec les cellules conventionnelles :

Les Tregs entrent en compétition avec les cellules T conventionnelles pour l'IL-2. Cette cytokine est essentielle pour les lymphocytes T et est indispensable pour leur culture *in vitro*. Le récepteur à l'IL-2 est composé de 3 sous-unités : la chaîne α (CD25), la chaîne β (CD122) et la chaîne γ (CD132). La chaîne α ne participe pas à la transduction du signal car elle possède

un domaine cytoplasmique très court, cependant elle est nécessaire pour augmenter l'affinité de l'IL-2 à son récepteur (Burchill et al. 2007). Les Tregs expriment fortement la chaîne α (CD25), ils possèdent donc une affinité élevée avec l'IL-2 et entrent en compétition avec les cellules qui prolifèrent pour l'accès à cette cytokine. Ainsi, en privant les Tconv de l'IL-2, les Tregs les empêchent de proliférer mais causent également leur mort cellulaire.

La compétition pour l'IL-2 ne semble pas intervenir comme mécanisme de suppression pour les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}. En effet, l'addition d'IL-2 exogène ne restaure que légèrement la prolifération des Tconv en présence de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} (Bézie et al. 2018).

e. Modulation de la fonction des cellules présentatrices d'Ag :

Certains Tregs peuvent également réaliser leur action suppressive en modulant la fonction des cellules présentatrices d'Ag notamment via les molécules CTLA-4 et LAG3.

Pour CTLA-4 : Les Tregs interagissent avec les DC via CTLA-4. Cette molécule se lie aux molécules CD80 et CD86 exprimées à la surface des DC et entre ainsi en compétition avec les cellules T conventionnelles, car elles aussi se lient à CD80 et CD86. Cette interaction va entraîner la production d'IFN- γ dans les CPAs qui vont à leur tour induire la production d'IDO. L'IDO dégrade le tryptophane des CPAs ce qui entraîne une cascade de signalisations conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire (Boasso et al. 2005). De plus, le blocage de CTLA-4 des Tregs CD4⁺CD25⁺ abroge leur fonction (Read et al. 2006).

Pour LAG-3 : LAG-3 est une molécule exprimée à la surface des Tregs. Il s'agit d'un homologue du CD4, capable de se lier aux molécules de CMH II avec une plus forte affinité. La liaison de LAG-3 avec les molécules de CMH II exprimées par les CPAs entraîne une cascade de signalisations qui conduit à une augmentation de l'expression des molécules co-stimulatrices et une diminution de la présentation des Ags par les CPAs (Bitao Liang et al. 2008). Plus récemment, d'autres ligands de LAG-3 ont été identifiés (α -syn, Gal-3, L-SECTin et FGL-1) suggérant un rôle de LAG-3 indépendant des molécules de CMH II (Graydon, Mohideen, et Fowke 2021).

Ainsi, les Tregs exprimant CTLA-4 ou LAG-3 modulent les fonctions des CPAs en diminuant leurs capacités à présenter des Ag aux cellules T conventionnelles.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont un type de cellules dendritiques associées à l'induction des lymphocytes T CD8⁺ *in vivo*. Dans le modèle d'allogreffe cardiaque,

il a été montré qu'il y a une accumulation des pDC au niveau des greffons survivants à long terme (Guillonnet et al. 2007). De plus, dans des expériences *in vitro*, les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ sont plus suppressifs en présence de cellules dendritiques plasmacytoïdes par rapport aux cellules dendritiques classiques ou d'autres types de cellules présentatrices d'Ag (Bézie et al. 2018). Finalement, les interactions entre les Tregs $CD8^+$ et les pDCs sont nécessaires à la suppression des cellules T $CD4^+$ et impliquent différents mécanismes modulés par la présence d'un contact cellulaire entre les Tregs $CD8^+$, les pDCs et les cellules T conventionnelles $CD4^+$ (X. L. Li et al. 2010). Ainsi les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ sont capables de moduler la fonction des cellules présentatrices d'Ag et d'interagir avec les cellules endothéliales (Guillonnet et al. 2007; Bézie et al. 2019b).

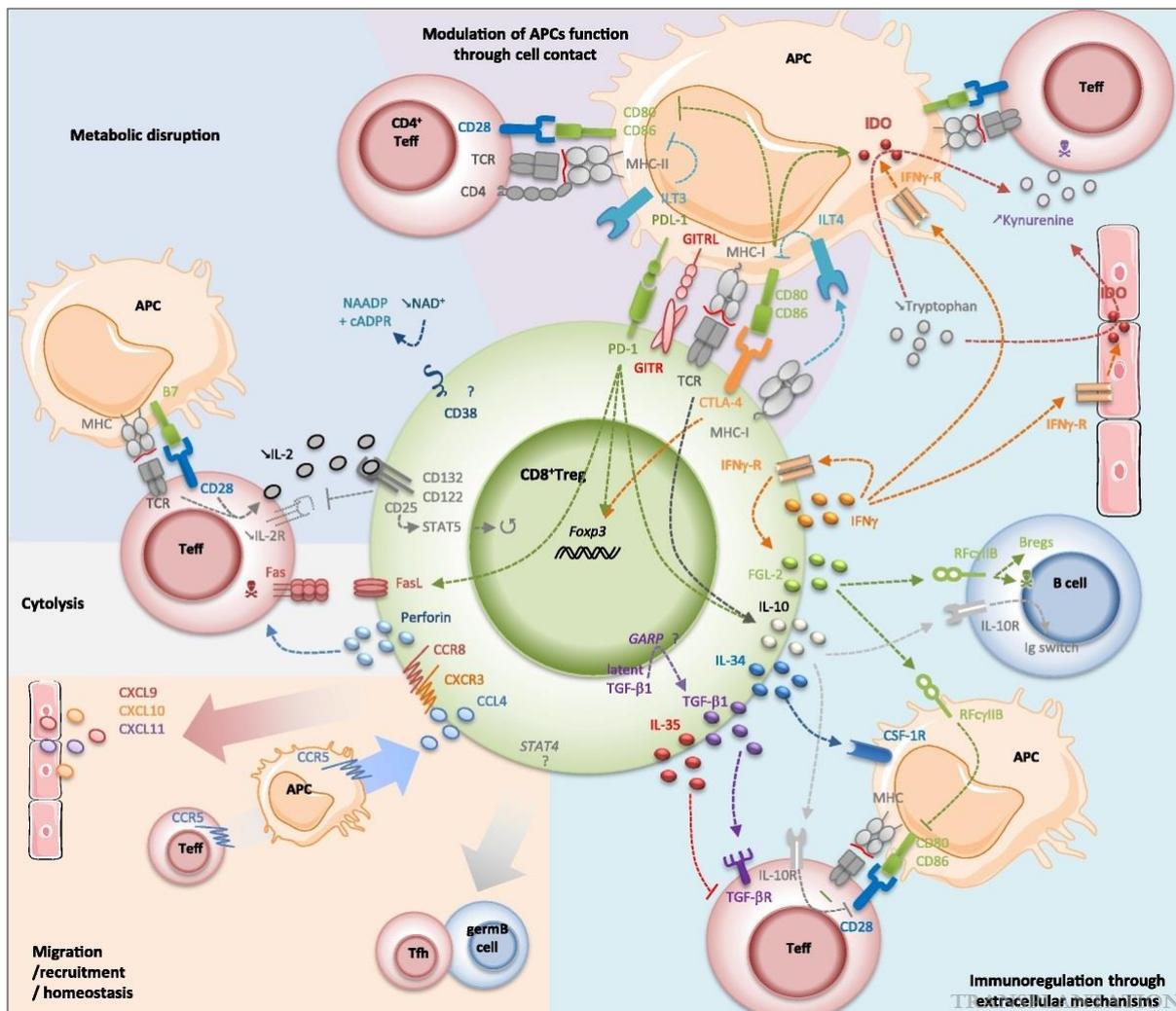


Figure 10 : Caractérisation des Tregs $CD8^+$ et leurs mécanismes d'action (Bézie, Anegon, et Guillonnet 2018)

La figure 10 présente les caractéristiques des Tregs CD8⁺ ainsi que leurs mécanismes d'action décrits jusqu'à ce jour. Que ce soit pour les Tregs CD4⁺ ou les Tregs CD8⁺, plusieurs mécanismes d'action ont été mis en évidence. Il est important de noter que tous les mécanismes d'action décrits ne sont pas réalisés par les mêmes types de Tregs. Cette variété de mécanismes de suppression démontre bien l'hétérogénéité des Tregs.

F. Différences et similitudes entre Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺

Un aspect majeur reste à traiter. Certains Tregs CD4⁺ partagent des marqueurs identiques ainsi que les mêmes mécanismes de suppression que certains Tregs CD8⁺. Quelles sont les similitudes entre les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ ? Et quelles sont leurs différences ? Les différences décrites à ce jour sont présentées (Tableau 2).

Les Tregs CD8⁺ reconnaissent les Ags présentés par les molécules de CMH I alors que les Tregs CD4⁺ les reconnaissent via les molécules de CMH II. Ce qui signifie que les Tregs CD8⁺ peuvent potentiellement exercer leurs fonctions suppressives sur toutes les cellules alors que les Tregs CD4⁺ ont une action limitée sur les cellules exprimant le CMH II. En effet les molécules du CMH I sont présentes sur toutes les cellules nucléées, ainsi que les plaquettes sanguines. Dans des conditions de culture similaires, les propriétés suppressives des Tregs CD8⁺ sont équivalentes voire supérieures aux Tregs CD4⁺ (Bézie et al. 2018).

	Tregs CD8⁺	Tregs CD4⁺
CMH	Classe I, classique et non classique	Classe II
Composition	Principalement mémoires	Naïves et mémoires
Capacité de suppression globale	Tregs CD8 ⁺ > ou = aux Tregs CD4 ⁺	

*Tableau 2 : Différences entre Tregs CD4⁺ et CD8⁺
(Flippe et al., 2019.)*

G. Implication des Tregs dans les maladies auto-immunes et en transplantation

Depuis la découverte du rôle indispensable des Tregs dans la tolérance, comme illustré avec le syndrome IPEX, l'implication des Tregs dans les MAIs ou en transplantation a été étudiée. Comment chez l'homme un défaut de la fonction ou du nombre de Tregs, que ce soit

génétiqnement déterminé ou induit par l'environnement, contribue au développement de MAIs ? Pourquoi certains patients transplantés ont des incidences de rejet alors que d'autres moins ? Quel est l'implication des Tregs dans le cas de transplantation ?

Dans les MAIs, on retrouve souvent un défaut du nombre ou de la fonction des Tregs. Les lymphocytes T régulateurs jouent un rôle dans la maintenance de l'homéostasie et la prévention des maladies auto-immunes. Il a été montré un défaut du nombre et/ou de la fonction des Tregs CD4⁺ dans la majorité des maladies auto-immunes comme le diabète de type I (Lindley et al. 2005), la sclérose en plaques (Viglietta et al. 2004), le lupus (Bonelli et al. 2008), la myasthénie Grave (Thiruppathi et al. 2012) ou bien même la polyarthrite rhumatoïde (van Roon et al. 2010).

Concernant les Tregs CD8⁺, les Tregs CD8⁺CD122⁺ sont impliqués dans la prévention du diabète (Shimokawa et al. 2020). Il a été montré que lorsque des souris sont infectées par un nématode suivi d'une induction du diabète, ces souris ont une augmentation du nombre de Tregs CD8⁺CD122⁺ et présentent moins de diabète que les souris non infectées par ce nématode, ayant donc moins de Tregs CD8⁺CD122⁺. Les mécanismes de suppression de ces Tregs ne sont pas détaillés dans cette étude. De plus, dans un modèle de sclérose en plaques chez la souris, des Tregs CD8⁺ sont capables de réduire la sévérité de la maladie en supprimant les lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs (Saligrama et al. 2019).

Les patients ayant un ratio Tconv CD8⁺CD45RC^{high} : Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} élevé, ont plus de risque de développer un rejet aigu ou de décéder après transplantation et moins de risque de développer un cancer après (Garnier et al. 2019; Lemerle et al. 2019; Ordonez et al. 2013), pouvant laisser penser une implication des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} dans la prévention du rejet de greffe.

L'implication des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} dans des modèles de transplantation ont été démontré. Premièrement, la fonction tolérogène des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} dans un modèle de greffe cardiaque allogénique désapparié pour le CMH chez le rat a été validée (Guillonnet et al. 2007) (résultats détaillés dans les paragraphes précédents). Ensuite, dans 2 modèles de réponses immunitaires humanisées chez la souris NSG (greffe de peau et GVHD), le rôle des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés *ex vivo* a été montré (Bézie et al. 2018). Grâce à ces résultats prometteurs, les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ sont largement étudiés comme un potentiel outil de prévention du rejet de greffe.

Il y a maintenant de plus en plus de preuves affirmant que les Tregs jouent un rôle important dans les MAIs et la tolérance en général. Les stratégies d'augmentation du nombre de Tregs pourraient être intéressantes dans le traitement des maladies auto-immunes, des allergies et d'autres maladies nécessitant une suppression, ainsi que dans le contrôle du rejet de greffes. Parmi ces nouvelles thérapies, quelques-unes sont présentées dans le chapitre suivant.

Pour conclure ce chapitre, il y a des preuves évidentes quant aux propriétés régulatrices de lymphocytes T CD8⁺. Comme décrit précédemment, en plus des tests suppressifs réalisés *in vitro*, des modèles précliniques *in vivo* ont démontré le rôle suppresseur des Tregs CD8⁺. Ces résultats encouragent des applications cliniques des Tregs CD8⁺, néanmoins les Tregs CD8⁺ restent controversés, que ce soit au niveau de leur phénotype, de leur rôle ou de leur fonction.

Aujourd'hui l'un des problèmes majeurs pour l'utilisation des Tregs CD8⁺ est le manque d'une caractérisation poussée de l'expression des protéines et des gènes. Nous avons besoin de définir un phénotype consensus des Tregs CD8⁺ pour le diagnostic, voir même le pronostic de pathologies. De préférence, nous nous intéressons à la découverte de nouveaux marqueurs membranaires 1) ayant un rôle dans la fonction suppressive des cellules, 2) facilitant le monitoring de patients et 3) utilisables comme cibles pour stimuler ou inhiber les Tregs CD8⁺ *in vivo*. Pour ce dernier cas, il est important d'analyser si ces marqueurs ne sont pas ou peu exprimés par d'autres types cellulaires.

Chapitre 3 : Induire la tolérance pour mieux traiter

Du fait des défauts de fonction, de nombre ou du répertoire des Tregs causant le développement de phénomènes auto-immuns, les Tregs pourraient être des cibles dans le traitement et la prévention des maladies auto-immunes en rétablissant/induisant la tolérance. Il existe plusieurs pistes pour induire la tolérance grâce aux Tregs. Il est envisagé de les utiliser soit en thérapie cellulaire, soit de les activer grâce à des anticorps agonistes monoclonaux, soit d'inhiber les cellules conventionnelles avec des anticorps monoclonaux pour favoriser la balance Tregs:Tconv ou bien en favorisant un environnement cellulaire optimal pour les Tregs, comme c'est aujourd'hui le cas avec des traitements avec une faible dose d'IL-2. Dans ce chapitre sont présentées les différentes thérapies ayant émergé au cours de ces dernières années dans le but de traiter les patients atteints de MAIs ou dans le contexte de transplantation. Toutes ces thérapies ont pu se développer grâce à l'identification de marqueurs clés et spécifiques des Tregs. Bien que prometteuses, il est nécessaire de continuer à développer de nouvelles thérapies afin de ne pas se limiter seulement à celles-ci.

A. Thérapies cellulaires de Tregs pour induire la tolérance (amplification *ex vivo*)

Les thérapies cellulaires consistent à introduire de nouvelles cellules fonctionnelles dans le corps d'un patient, afin de remplacer un type cellulaire dysfonctionnel ou d'augmenter la proportion et/ou l'efficacité d'un type cellulaire. Ces thérapies cellulaires peuvent être autologues ou allogéniques. Dans le premier cas, les cellules du patient sont isolées, puis amplifiées avant d'être réintroduites chez ce même patient, alors que pour le deuxième cas, les cellules d'un donneur sont greffées à un receveur, ce qui est le cas par exemple dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques. Le développement de ces thérapies cellulaires dans les champs de la transplantation et du traitement des maladies auto-immunes a montré des premiers résultats prometteurs, notamment pour les thérapies cellulaires autologues. Il y a des essais cliniques qui ont eu lieu ou qui sont en cours avec des lymphocytes T, dont des Tregs CD4⁺, mais pour le moment il n'y eu aucun essai clinique avec des Tregs CD8⁺. Le premier essai clinique utilisant des Tregs CD8⁺, the Eight-Treg, devrait débuter en 2023 (<https://www.reshape-h2020.eu/>) et sera porté par notre équipe.

a. Résultats prometteurs des premiers essais cliniques avec des Tregs CD4⁺

Plusieurs essais cliniques de thérapies cellulaires utilisant des Tregs ont été réalisés, que ce soit dans le but de traiter des maladies auto-immunes ou pour éviter le rejet en transplantation ou plus récemment pour traiter le syndrome de détresse respiratoire aigüe causée par la Covid-19 (NCT05027815).

Les premiers essais cliniques utilisant des Tregs chez des patients souffrants de diabète de type 1 ont été réalisés en 2012 et 2014 (Marek-Trzonkowska et al. 2012; 2014). Depuis, d'autres essais cliniques ont vu le jour, notamment en utilisant des Tregs autologues amplifiés puis réinjectés. Un essai clinique de phase IIa est en cours (NCT04055623) pour tester la sécurité et l'effet de l'injection de Tregs autologues chez des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique en combinaison avec une faible dose d'IL-2. Le but de cet essai clinique est de restaurer le nombre de Tregs et ainsi espérer limiter la progression de la maladie. Les résultats concernant cet essai clinique ne sont pour le moment, pas encore disponibles.

En plus d'être utilisés dans le but de traiter les maladies auto-immunes, les thérapies cellulaires utilisant des Tregs sont également envisagées pour aider à la tolérance dans le cas de patients transplantés (organes solides ou cellules). En effet, l'utilisation de Tregs CD4⁺ en tant que thérapie cellulaire chez des patients ayant reçu des greffes de cellules souches hématopoïétiques permet d'éviter la maladie du greffon contre l'hôte, qui elle, entraîne une forte mortalité chez ses patients (Elias et Rudensky 2019). Plusieurs essais cliniques ont été réalisés ou sont toujours en cours.

Une liste non exhaustive des essais cliniques utilisant des Tregs pour traiter les MAIs ou en transplantation d'organes est présentée dans le tableau 3.

Essai clinique	Nom	Numéro
Auto-immunité	T1DM Immunotherapy Using Polyclonal Tregs + IL-2 (TILT)	NCT02772679
Auto-immunité	T1DM Immunotherapy Using CD4 ⁺ CD127 ^{lo/-} CD25 ⁺ Polyclonal Tregs (Treg)	NCT01210664
Auto-immunité	Polyclonal Regulatory T Cells (PolyTregs) for Pemphigus	NCT03239470
Auto-immunité	Autologous Polyclonal Tregs for Lupus	NCT02428309
Transplantation	Donor Alloantigen Reactive Tregs (darTregs) for Calcineurin Inhibitor (CNI) Reduction (ARTEMIS)	NCT02474199
Transplantation	Treg Therapy in Subclinical Inflammation in Kidney Transplantation (TASKp)	NCT02088931
Transplantation	Treg Therapy in Subclinical Inflammation in Kidney Transplantation (TASK)	NCT02711826
Transplantation	Donor-Alloantigen-Reactive Regulatory T Cell (darTregs) in Liver Transplantation (deLTa)	NCT02188719
Transplantation	Donor-Alloantigen-Reactive Regulatory T Cell (darTreg) Therapy in Renal Transplantation (<u>The ONE Study</u>) (DART)	NCT02244801

Tableau 3 : Essais cliniques utilisant des Tregs pour traiter les MAIs ou en transplantation.

L'essai clinique « The ONE Study » est détaillé dans le paragraphe suivant.

➔ The ONE Study :

« The One Study » est un consortium qui a regroupé plusieurs essais cliniques répartis dans différents hôpitaux dans plusieurs pays (France, Allemagne, Italie, Royaume Uni et Etats-Unis). L'objectif a été d'étudier l'impact de la thérapie cellulaire utilisant des cellules régulatrices (Tregs, cellules dendritiques régulatrices ou macrophages régulateurs) dans le cadre de transplantations rénales issues de donneurs vivants. Cet essai clinique a débuté en 2012 et s'est achevé en 2018. Parmi les 104 patients inclus dans cet essai, 38 ont été traités avec l'une des thérapies cellulaires. Les cas de rejet aigu ont été mesurés au cours des 60 semaines suivant la transplantation.

OneTreg1 (NCT02129881), un des essais cliniques inclus dans la One Study a utilisé des Tregs CD4⁺ autologues de patients, qui ont été transfusés 5 jours après la transplantation rénale (1 à 10 millions de cellules/kg). En outre de cette thérapie cellulaire, les patients ont reçu des traitements immunosuppresseurs pour prévenir le rejet (de la prednisolone, du mycophenolate mofétil et du tacrolimus). Au cours de l'essai, un ou plusieurs traitements immunosuppresseurs ont pu être retirés en fonction de l'état du patient.

Les résultats de cet essai ont été analysés dans leur globalité, sans distinction du type de cellules injectées, que ce soit des Tregs, des DC régulateurs ou des macrophages régulateurs (Sawitzki et al. 2020). L'objectif principal de cette étude qui était de démontrer l'absence de toxicité a été validé. Il y a eu autant de rejet aigu dans le groupe contrôle (RGT) (12%) que dans le groupe traité avec l'une des thérapies cellulaires (CTG) (16%). A la fin des 60 semaines de suivi, 40% des patients du groupe CTG n'avaient plus qu'un seul traitement immunosuppresseur (tacrolimus), alors que 98% des patients du groupe contrôle était encore au moins sous une double immunosuppression. Les patients du groupe CGT ont en général moins développé d'infections virales par rapport aux patients du groupe contrôle. Il n'a pas été observé de différence significative de proportion des Tregs CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} entre les 2 groupes, 60 semaines après transplantation. De plus, les patients recevant une des thérapies cellulaires ont montré une augmentation de l'expression de certains gènes décrits comme jouant un rôle dans l'immunosuppression (*MS4A1*, *CD200*) mais une réduction de l'expression de gènes associés au rejet (*HMMR*). L'ensemble des résultats est basé sur le regroupement des 6 essais cliniques utilisant différents types de cellules régulatrices. Les résultats concernant uniquement les Tregs CD4⁺ ne sont pas disponibles pour le moment. Ces résultats restent tout de même très prometteurs.

b. The Eight-Treg : le premier essai clinique avec Tregs CD8⁺ chez l'Homme :

Le premier essai clinique utilisant des Tregs CD8⁺ en thérapie cellulaire chez des patients transplantés rénaux va débiter d'ici 2023, dans le cadre du projet Européen ReSHAPE. Celui-ci sera porté par notre équipe.

Un des avantages majeurs de l'utilisation de Tregs CD8⁺ en thérapie cellulaire par rapport aux Tregs CD4⁺ réside dans la propriété des Tregs CD8⁺ à reconnaître les Ags présentés par les molécules de CMH I. En effet, c'est grâce aux molécules de CMH I qui sont exprimées à la surface de toutes les cellules du greffon ainsi qu'à la surface des cellules dendritiques du receveur qu'elles sont capables de présenter de manière indirecte les Ags du donneur

(Wieczorek et al. 2017). En revanche, les Tregs $CD4^+$ ne sont capables de s'activer qu'au contact des molécules de CMH II, qui elles sont exprimées à la surface des cellules dendritiques et des lymphocytes B du receveur mais pas par les cellules du greffon, sauf les cellules endothéliales du greffon mais qui disparaissent à long terme. Cet avantage peut être compensé grâce à l'apport d'un CAR anti-CMH I dans les Tregs $CD4^+$.

Pour ce premier essai clinique de thérapie cellulaire utilisant des Tregs $CD8^+$ chez le patient transplanté rénal à partir d'un donneur vivant (phase I/IIa), les objectifs sont de démontrer dans un premier temps la non-toxicité des cellules injectées, puis dans un second temps de prouver l'efficacité du traitement par la réduction des traitements immunosuppresseurs de maintenance et la réduction du taux d'infections (comme dans la One Study). Le protocole clinique est présenté dans la figure suivante et décrit ci-après.

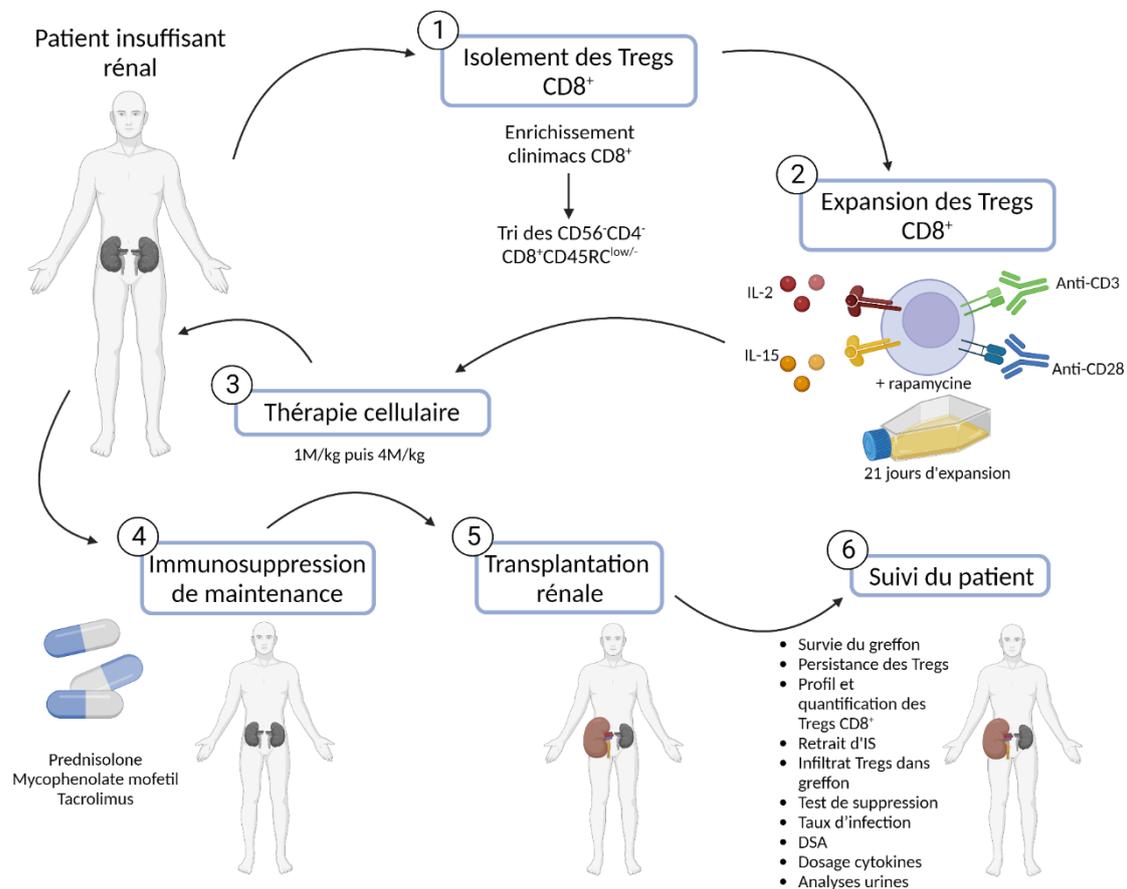


Figure 9 : Protocole de l'essai clinique des Tregs $CD8^+$

Les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}CD4^+CD56^-$ d'un patient en insuffisance rénale (en attente d'une transplantation issue d'un donneur vivant) sont triés à partir de son sang périphérique.

Ces cellules sont mises en culture en présence d'anticorps anti-CD3, d'anticorps anti-CD28, d'IL-2, d'IL-15 et de rapamycine. Après 21 jours d'amplification des cellules, le produit de thérapie cellulaire est obtenu. Des contrôles qualités sur les cellules sont réalisés pour affirmer que le produit cellulaire injecté est conforme, c'est-à-dire qu'au moins 80% des cellules obtenues sont $CD3^+CD8^+CD4^-CD45RC^{low/-}CD14^-CD19^-GITR^+CD127^-$. Le patient qui recevra sa greffe d'un donneur vivant aura une injection de ses Tregs $CD8^+$ amplifiés autologues. Pour la phase I/IIa de cet essai clinique, des traitements immunosuppresseurs de maintenance seront également prescrits au patient greffé par sécurité afin d'éviter le rejet de greffe.

L'amplification des Tregs $CD8^+$ a pour but d'augmenter le nombre de Tregs disponibles pour la thérapie cellulaire et ainsi faire pencher la balance Tregs:Tconv en faveur de l'activité suppressive des Tregs. De plus, après amplification, les Tregs ont des capacités suppressives supérieures à celles avant amplification. L'expression de FOXP3 est up-régulée avec l'amplification. Dans le sang périphérique, environ 1% des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ expriment FOXP3, alors qu'après amplification la quasi-totalité des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ l'expriment (voir Figure 10), bien que la méthylation de *FOXP3* reste élevée dans ces cellules en comparaison aux $CD4^+$ Tregs. Cependant, le rôle de FOXP3 dans les Tregs $CD8^+$ n'est pas directement prouvé.

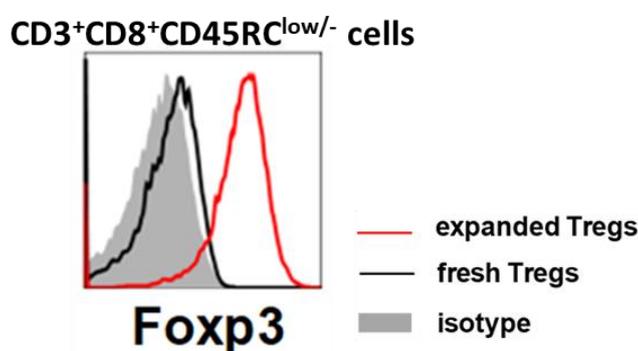


Figure 10 : Expression de FOXP3 dans les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ avant amplification (en noir) et après amplification (en rouge).

Les premiers patients de cet essai clinique devraient être traités au cours de l'année 2023. Si les résultats montrent une absence de toxicité, d'autres essais cliniques pourront voir le jour dans le but de démontrer un effet d'augmentation de la tolérance du greffon.

Pour conclure sur cette partie, pour restaurer la tolérance, les thérapies cellulaires de Tregs $CD4^+$ ou de Tregs $CD8^+$ sont prometteuses. Il est même envisagé de combiner ces 2 thérapies cellulaires, injecter à la fois des Tregs $CD4^+$ et des Tregs $CD8^+$, ce qui aurait pour

avantage d'avoir un nombre de cellules de départ plus important ainsi que des cellules cibles différentes.

c. Modifications génétiques pour améliorer les Tregs :

Une des limitations de la thérapie cellulaire de Tregs est que la fonction des Tregs peut être altérée dans des conditions inflammatoires. Il est donc important d'identifier les acteurs clés de la stabilité des Tregs afin de générer des Tregs génétiquement modifiés qui soient plus stables. Parmi les cibles intéressantes on retrouve le facteur de transcription *FOXP3*. De plus, l'inhibition des gènes *HIF- α* , *IL6R* ou *P2X7* ainsi que la surexpression du gène *AHR* ou bien des gènes codant pour les cytokines immuno-régulatrices (telles que *Il-10*, *TGF- β* , *Il-34*, *FGL2*, *IL-35*) permettraient d'augmenter la stabilité des Tregs (Amini et al. 2021).

Finalement, la tolérance médiée par les Tregs peut désormais être améliorée grâce aux modifications génétiques permettant d'augmenter la spécificité antigénique des Tregs. Ils peuvent notamment être redirigés grâce aux CAR (Brentjens et al. 2003; Eshhar et al. 1993; Maher et al. 2002). Il s'agit d'une modification génétique qui apporte un nouveau récepteur à la surface des lymphocytes T qui est capable de reconnaître spécifiquement un antigène donné. La génération de CAR-Tregs pour induire la tolérance est une approche très prometteuse (Arjomandnejad, Kopec, et Keeler 2022; Zhang et al. 2018). En effet, les CAR-Tregs sont indépendants des molécules de CMH et moins dépendants de l'IL-2 par rapport aux Tregs classiques. Ces CAR-Tregs présentent un fort intérêt pour les transplantations, notamment car des CAR-Tregs spécifiques de la molécule HLA-A2 sont capables de migrer vers les allogreffes HLA-A2⁺, contrairement aux Tregs polyclonaux, entraînant ainsi l'augmentation de la survie des allogreffes HLA-A2⁺ dans des modèles de souris humanisées (Bézie et al. 2019b; Gille et al. 2022). La société Sangamo a annoncé en mars 2022 l'inclusion du premier patient de l'essai clinique de phase I/II utilisant des CAR-Tregs dans la prévention du rejet lors de transplantations rénales issues de donneur vivant pour lesquels il y a un mésappariement du HLA-A2 (STEADFAST). Cette approche est également utilisée dans le traitement de cancers ou cette fois, un CAR est ajouté à des lymphocytes T cytotoxiques afin de reconnaître les cellules cancéreuses puis les détruire (Miliotou et Papadopoulou 2018). Cependant, ces cellules causent parfois des effets indésirables tels que des tempêtes de cytokines (Schubert et al. 2021).

Bien que cela soit prometteur, ces thérapies cellulaires posent plusieurs inconvénients. Premièrement, la culture de cellules autologues est longue, coûteuse et est dépendante de chaque patient : à grande échelle, cela n'est pas envisageable. Finalement, pour les

transplantations, la culture cellulaire devant être réalisée avant la greffe, cela n'est donc possible que lorsque celle-ci est réalisée à partir d'un donneur vivant, là où la date de transplantation est définie à l'avance. Il est donc envisagé d'avoir recours à des thérapies cellulaires utilisant non pas des Tregs autologues mais allogéniques. Pour éviter leur rejet, les cellules seront modifiées génétiquement pour éteindre l'expression des molécules de CMH I et de CMH II, en réalisant un KO des gènes *B2M* et *CIITA*. La génération de Tregs allogéniques génétiquement modifiés permettrait d'avoir à disposition une grande quantité de Tregs pour directement traiter tous les patients, dont ceux ou les transplants ne sont pas issus de donneurs vivants. Il est important de noter ici que ce genre de thérapies comporte des risques, notamment du fait qu'on pourrait ne plus contrôler ces Tregs. Certaines équipes travaillent pour contrôler ces cellules à distance avec un système de « switch on/off », notamment celles portant un CAR (Crunkhorn 2021).

B. Déplétion des cellules T conventionnelles *in vivo* : exemple d'une thérapie utilisant un anticorps anti-CD45RC

Il est également possible d'induire la tolérance, via les Tregs sans avoir recours à la thérapie cellulaire, par exemple en activant les Tregs avec des anticorps spécifiques agonistes ou bien en inhibant ou déplaçant les lymphocytes T conventionnels en utilisant des anticorps spécifiques antagonistes. Pour cela, il est nécessaire d'identifier des marqueurs qui pourront être ciblés. Plusieurs marqueurs ont déjà été mis en évidence comme le CD45RC (Picarda et al. 2017), il est crucial d'en identifier de nouveaux et cela notamment des agonistes pour les Tregs CD8⁺.

➔ Preuve de concept d'une thérapie à l'aide d'anticorps anti-CD45RC :

Aujourd'hui, en ce qui concerne les Tregs CD8⁺, peu de marqueurs permettent de les identifier clairement. Le CD45RC permet de séparer les T CD8⁺ totales en 2 groupes distincts : les T CD8⁺CD45RC^{high} et les T CD8⁺CD45RC^{low/-}. Cette dernière fraction est celle qui contient les Tregs CD8⁺ (cf chapitre 2) (Picarda et al. 2017). En effet, la molécule CD45RC est exprimée par les cellules T conventionnelles mais n'est pas exprimée (ou peu) par les cellules T régulatrices. Notre équipe a étudié le potentiel thérapeutique d'anticorps anti-CD45RC pour cibler les cellules conventionnelles et rétablir la tolérance. Les principaux résultats sont présentés ci-après.

Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, l'administration d'anticorps monoclonaux ciblant le CD45RC induit la tolérance du greffon. Les mécanismes impliqués sont

l'inhibition des réponses humorales allogéniques et le maintien des réponses contre les Ags exogènes (Picarda et al. 2017). Ce traitement induit rapidement la mort des lymphocytes T exprimant la molécule CD45RC grâce à une signalisation cellulaire intrinsèque, cependant, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} sont préservés et potentialisés. Il a également été montré que le transfert adoptif de Tregs CD4⁺ et de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} induits après un traitement transitoire anti-CD45RC, permettait d'induire une tolérance au donneur à des receveurs d'allogreffes cardiaques chez le rat (Picarda et al. 2017). Ces résultats ont été également démontrés dans des modèles de GVHD chez des souris humanisées (NSG).

Une autre étude a démontré le rôle prometteur du traitement anti-CD45RC. Dans des modèles de rat et souris souffrants de GVHD, la déplétion des lymphocytes T CD45RC^{high} *ex-vivo* ou un traitement utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD45RC *in vivo* permettaient d'inhiber la GVHD (Boucault et al. 2020). De plus, dans un modèle de rat, les animaux traités avec l'anticorps anti-CD45RC qui survivent ont montré une tolérance spécifique aux cellules du donneur.

Pour étudier l'effet du traitement anti-CD45RC dans le contexte de maladie auto-immune, un modèle de rat déficient pour le gène *AIRE* a été généré. Les animaux possèdent des symptômes similaires à l'APECED (maladie auto-immune décrite dans le chapitre 1). Il a été montré que dans ce modèle de rat, le traitement anti-CD45RC permettait à la fois de prévenir et de traiter les symptômes auto-immuns ainsi que d'inhiber le développement d'auto-anticorps (Besnard et al. 2022).

➔ Mécanisme d'action du traitement anti-CD45RC :

Les cellules conventionnelles exprimant fortement la molécule CD45RC sont déplétées par l'anticorps monoclonal anti-CD45RC mais pas les cellules Tregs exprimant peu ou pas le CD45RC à leur surface (Figure 11). Cette déplétion spécifique permet de rétablir la balance Tregs:Tconv en faveur des Tregs ce qui permet à la fois de traiter les problèmes auto-immuns ou bien d'instaurer une tolérance dans le cas de transplantation.

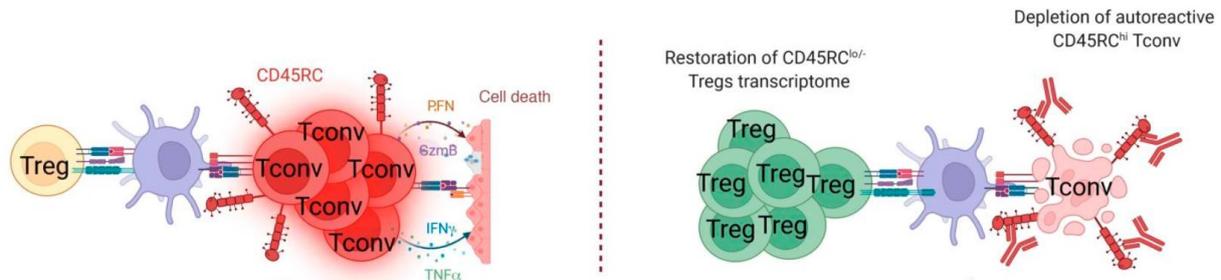


Figure 11 : Thérapie utilisant un anticorps anti-CD45RC
(Besnard et al. 2022).

L'utilisation d'anticorps anti-CD45RC pour induire la tolérance est dépendante à la fois des Tregs CD4⁺ et des Tregs CD8⁺. Notre équipe a démontré que l'utilisation d'anticorps spécifiques au CD45RC permettait d'induire la tolérance, ainsi que d'activer les Tregs chez le rat et chez l'Homme *in vitro*. L'objectif de la thérapie utilisant un anticorps monoclonal anti-CD45RC est de favoriser la tolérance face aux Ags du soi ainsi que de limiter les réponses immunitaires face aux Ags du non-soi.

➔ Développement d'un traitement anti-CD45RC en clinique :

La preuve de concept de l'effet tolérogène de l'anticorps anti-CD45RC étant démontrée, l'utilisation de cette thérapie en clinique est le prochain objectif. Ce projet est désormais supporté par la start-up AbolerIS Pharma (<https://aboleris-pharma.com/>). Un essai clinique est en cours de préparation et devrait voir le jour, soit dans le cadre de maladies auto-immunes ou de transplantation.

C. Activation des Tregs *in vivo* : thérapie ciblant le TNFR2

L'anticorps anti-CD45RC cible les cellules T conventionnelles pour les détruire et ainsi favoriser les Tregs. Cependant, pour induire la tolérance, il est également possible de cibler les cellules régulatrices avec des anticorps monoclonaux spécifiques dans le but de les activer. Plusieurs anticorps sont en cours de développement dont l'anticorps anti-TNFR2.

Bien qu'il existe plusieurs marqueurs pouvant être ciblés pour activer les Tregs, le TNFR2 est une molécule intéressante, notamment car il a été identifié comme étant un marqueur des Tregs CD4⁺ (X. Chen et al. 2013) et a également été identifié comme marqueur des Tregs CD8⁺ au cours de cette thèse, ainsi que dans un autre article (Ye et al. 2018). Ce marqueur et son utilisation dans l'induction de la tolérance sont donc détaillés.

➔ Qu'est-ce que TNFR2 ?

Le TNFR2 est une protéine transmembranaire codée par le gène *TNFRSF1B*, qui porte également le nom de CD120B. Afin de simplifier la compréhension, le terme TNFR2 sera employé plus généralement. Le TNFR2 possède 2 ligands, le TNF- α et la lymphotoxine (dans une moindre mesure).

Le TNF- α , est une cytokine pléiotropique codée par un gène présent sur le chromosome 6. Il joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions vitales (Kriegler et al. 1988; P. Tang, Hung M-C, et Klostergaard 1996). Il est essentiellement produit par les macrophages et monocytes activés, mais d'autres types cellulaires tels que des lymphocytes T, des NK ou des neurones peuvent également en produire. Cette molécule est surtout décrite pour son action pro-inflammatoire. Le TNF- α existe sous 2 formes : soluble et membranaire. Il s'agit d'abord d'une molécule transmembranaire de type 2, qu'on appelle communément mTNF- α . Cette protéine est composée de 76 acides aminés qui contient un peptide signal afin d'être adressée à la membrane plasmique. Le mTNF- α peut être clivé par la protéine TACE (TNF- α converting enzyme) encodé par le gène *ADAM17* et donnera ainsi le TNF- α soluble (sTNF- α) (Black et al. 1997). Le TNF- α (sTNF- α ou mTNF- α) peut être à la fois sous la forme monomérique, dimérique ou trimérique, mais son action biologique n'est exercée que lorsque qu'il se retrouve sous la forme trimérique lié de manière non covalente.

Le TNF- α exerce son action via 2 récepteurs : le TNF récepteur 1 (TNFR1) ou CD120a et le TNF récepteur 2 (TNFR2) = CD120b (Figure 12). Le sTNF- α a une affinité plus forte pour se lier au TNFR1, alors que le mTNF- α se liera préférentiellement à TNFR2. Ces 2 récepteurs ont des rôles et activités différents, principalement car ils sont constitués différemment. Le TNFR1 est une protéine transmembranaire de 55kDa qui possède un domaine de mort intracellulaire. Cette protéine est exprimée de manière constitutive, mais à de faibles niveaux, sur toutes les cellules nucléées. Quant au TNFR2, c'est une protéine transmembranaire de 75kDa qui ne possède pas de domaine de mort intracellulaire. Son expression est restreinte aux cellules de la lignée myéloïde ainsi qu'aux lymphocytes T (Zola, Flego, et Weedon 1993). Les 2 récepteurs ont des domaines intracellulaires différents et activent ainsi des voies de signalisation différentes. Dès 1995, la différence des 2 formes de TNF- α sur les 2 récepteurs TNFR1 et TNFR2 a été mise en évidence et suggérait même un rôle physiologique important

du TNFR2 (appelé TNFR80) dans les réponses inflammatoires locales. (Matthias Grell et al. 1995).

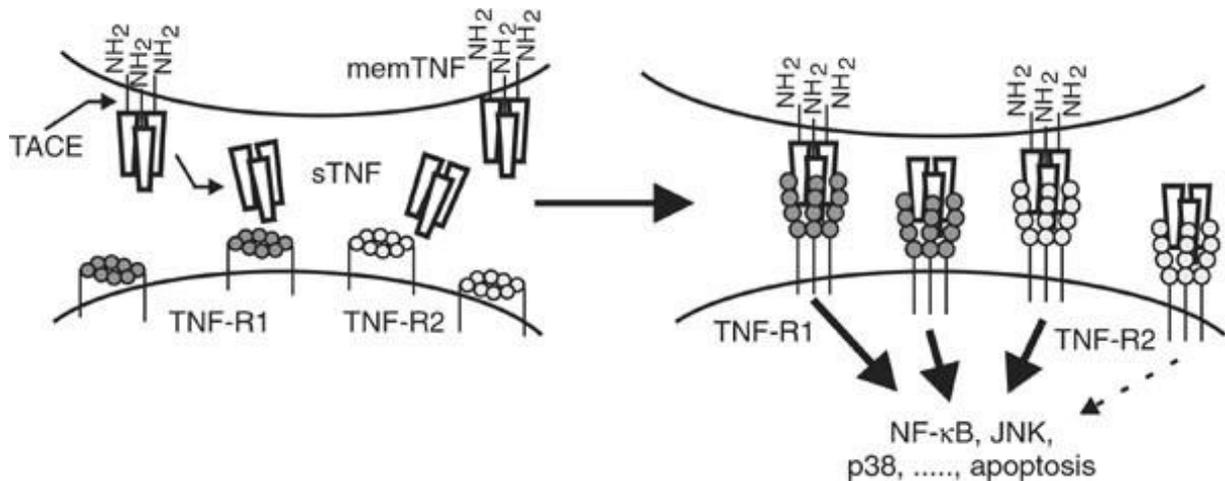


Figure 12 : TNF- α et ses 2 récepteurs : TNFR1 et TNFR2
(Wajant, Pfizenmaier, et Scheurich 2003)

La voie de signalisation induite par la liaison de sTNF- α au TNFR1 déclenche principalement des voies pro-inflammatoires, alors que le mTNF- α qui se lie au TNFR2 va plutôt initier la modulation immune et la régénération de tissus. TNFR2 ne peut être entièrement activé que par le mTNF- α , mais pas par le sTNF- α (M. Grell et al. 1995). Du fait que TNFR1 possède un domaine de mort intracellulaire dans sa partie cytoplasmique, il représente un activateur direct des caspases apoptotiques après le recrutement de TRADD et FADD. En plus de son activité cytotoxique, TNFR1 est un fort activateur de l'induction des gènes. Quand la voie de signalisation du TNFR2 est activée, cela permet d'augmenter la stabilité des Tregs, d'augmenter les réponses face à la stimulation TCR et d'augmenter leur fonction et amplification. Cela permet de renforcer les Tregs et les Tconv à produire de l'IL-2. Dans des conditions inflammatoires, le mTNFR2 peut se convertir en sTNFR2 afin de neutraliser le TNF- α et empêcher l'expression d'IL-6. (Yang et al. 2018).

Le rôle du TNF- α a été démontré dans la polyarthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune chronique évoluant par poussées où les articulations sont enflammées (Vasanthi, Nalini, et Rajasekhar 2007). Le TNF- α va favoriser la destruction de l'os et ainsi provoquer une inflammation qui entraînera la dégradation du cartilage. Afin de traiter cette maladie, des agents anti-TNF sont utilisés (Radner et Aletaha 2015). Dans le cadre de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), le TNF- α est synthétisé en trop grande quantité (Sartor 2006). Des souris qui expriment un TNF- α non clivable, qui ne peut donc pas

être converti en sTNF- α ont une capacité à résister aux pathogènes qui est diminuée. En effet, les souris avec un TNF- α non clivable vont développer une immunité diminuée contre la *Listéria*, alors que les souris TNF- $\alpha^{-/-}$ vont mourir après contact d'une faible dose de *Listéria*. En revanche les souris avec du mTNF- α vont succomber après une forte dose. De manière intéressante, lorsque des lymphocytes des souris mTNF- α immunisées sont transférées à des souris TNF- $\alpha^{-/-}$, cela protège les souris lors de l'infection qui normalement est mortelle (Musicki et al. 2006) (Torres et al. 2005). Cela démontre que la plupart des fonctions pro-inflammatoires liées au TNF- α sont en réalité liées au sTNF- α médiées par la signalisation avec TNFR1 alors que le mTNF- α , principalement via le TNFR2, peut partiellement aider le système immunitaire à fournir une protection contre certains pathogènes.

Avec l'utilisation d'inhibiteurs du TNF- α on observe une amélioration des symptômes de l'arthrite induite par le collagène, semblable au déficit en TNFR1 (Piguet et al., 1992) (Mori et al., 1996) Des polymorphismes au sein du gène codant pour TNFR2 montrent une corrélation positive importante avec des maladies auto-immunes (la polyarthrite rhumatoïde (Barton et al. 2001), la maladie de Crohn (Sashio et al. 2002), la spondylarthrite ankylosante (Chatzikyriakidou et al. 2009), la colite ulcéreuse (Pierik et al. 2004) ou la GVHD associée au risque de sclérodémie (Ishikawa et al. 2002)).

Il a été montré que TNFR2 est préférentiellement exprimé par les Tregs CD4⁺FOXP3⁺ par rapport aux cellules T CD4⁺FOXP3⁻ (X. Chen et al. 2013). TNFR2 est exprimé par plus de 80% des Tregs CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ dans le sang périphérique chez l'Homme (X. Chen et al. 2010). Cette molécule a également été associée aux Tregs CD8⁺ (Ye et al. 2018). De plus, TNFR2 est up-régulé dans les Tregs après une stimulation du TCR, ce qui suggère que TNFR2 n'est pas exprimé par les Tregs naïfs (X. Chen et al. 2007).

Au vu de ces résultats, plusieurs stratégies sont possibles quant à l'induction de la tolérance dans les maladies auto-immunes ou en transplantation. Premièrement, l'inhibition de la voie TNFR1, soit en bloquant le sTNF- α (bien que TNFR1 puisse être également activé par le mTNF- α) soit en bloquant le TNFR1 avec des anticorps bloquants. Deuxièmement, l'activation de TNFR2 est également une bonne cible pour induire la tolérance, avec l'utilisation d'agonistes ou de ligands.

➔ Thérapies anti-TNFR2 :

L'activation thérapeutique de TNFR2 afin d'expandre les Tregs semble avoir toutes les chances d'être bénéfique pour les patients atteints de maladies auto-immunes. TNFR2 présente

plusieurs avantages. Par son expression quasi exclusivement restreinte à certaines sous-populations de lymphocytes, peu de cellules seront ciblées par le traitement. Bien que prometteurs, le développement de ces anticorps agonistes est difficile notamment à cause de la nécessité de trimérisation pour une efficacité optimale mais faisable. En effet, la signalisation induite par le récepteur TNFR2 nécessite un regroupement de plusieurs récepteurs, permettant d'avoir une signalisation suffisante et une transduction efficace du signal (Vanamee et Faustman 2018), c'est pourquoi il est nécessaire d'avoir une molécule agoniste déjà trimérisée comme c'est le cas avec la molécule STAR2 (Chopra et al. 2016).

L'utilisation d'un anticorps agoniste anti-TNFR2 permet d'expandre les Tregs *in vitro* et permet d'induire une signature transcriptomique de Tregs plus suppressifs comme *IL2RA* (CD25), *IKZF2* (Helios) ou *FOXP3* (Torrey et al. 2020). Le développement de cet anticorps en clinique est en cours.

Finalement, TNFR2 peut être surexprimé par des cellules de l'environnement tumoral, ainsi son inhibition représente un fort intérêt dans le traitement de certains cancers. Deux essais cliniques utilisant des anticorps antagonistes de TNFR2 pour traiter les cancers sont en cours (Bai, Ding, et Li 2022). Ils permettent à la fois de cibler et détruire les Tregs TNFR2⁺ et les cellules tumorales TNFR2⁺. Cependant, il a également été montré que l'utilisation d'agonistes de TNFR2 induit un effet antitumoral *in vivo* (Spira et al. 2022). Ainsi, ces 2 thérapies aux rôles opposés, peuvent contribuer à la diminution de la progression de cancers, et cela en fonction du type de tumeurs.

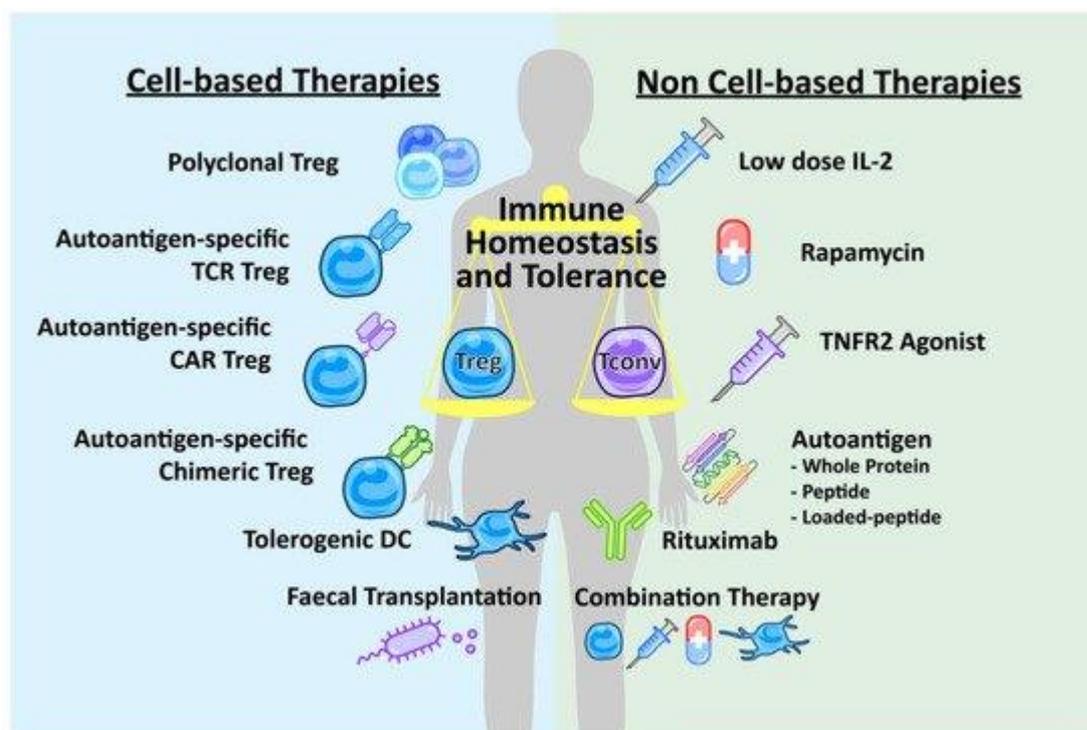


Figure 13 : Nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies auto-immunes. (Eggenhuizen, Ng, et Ooi 2020)

Finalement, une autre thérapie est envisageable pour traiter les maladies auto-immunes ou en transplantation. Cette dernière repose sur l'induction des Tregs en utilisant une faible dose d'IL-2 (Figure 13), cependant cela nécessite que tous les types de Tregs soient réceptifs à l'IL-2. De nombreuses études cliniques ont été réalisées pour démontrer le rôle de cette thérapie à la fois dans le traitement des maladies auto-immunes mais également pour les transplantations (Graßhoff et al. 2021; Tahvildari et Dana 2019). Une étude de phase I/IIa comportant des patients ayant divers troubles d'auto-immunité a été réalisée. Tous les patients ont reçu une faible dose d'IL-2 (1 million IU/jour) pendant 5 jours, suivi d'injection 2 fois par mois pendant 6 mois. Les résultats suggèrent que la faible dose d'IL-2 est bien tolérée par les patients atteints de maladies auto-immunes et ils observent également une amplification ainsi qu'une activation des Tregs chez tous les patients et cela sans activation des cellules conventionnelles (Todd et al. 2016) (Rosenzwajg et al. 2019).

Pour conclure, un objectif majeur dans le traitement des maladies auto-immunes ou en transplantation est le développement de thérapies permettant de contenir les réponses immunitaires délétères. Pour cela, l'induction de la tolérance est une piste intéressante. En effet, l'induction de la tolérance en modulant les Tregs permettrait de limiter le développement des

maladies auto-immunes et/ou d'éviter le rejet de greffe. Pour cela, plusieurs thérapies sont possibles. Premièrement il est possible de réaliser des thérapies cellulaires à base de Tregs (ex : Tregs CD4⁺/CD8⁺ autologues, Tregs CD4⁺/CD8⁺ allogéniques génétiquement modifiés). Dans d'autres cas il est possible d'utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre, soit les cellules conventionnelles pour les détruire et ainsi favoriser l'action des Tregs (anti-CD45RC), soit dirigés contre les Tregs eux-mêmes pour les activer (anti-TNFR2).

Toutes les thérapies décrites dans ce chapitre reposent sur nos connaissances actuelles des Tregs. En effet, chaque thérapie cible des marqueurs. Il est donc nécessaire d'améliorer nos connaissances pour identifier de nouveaux marqueurs qui pourraient à la fois servir pour le diagnostic et/ou pronostic mais également permettre de générer par la suite de nouveaux traitements.

Chapitre 4 : Raffiner l'identité des Tregs CD8⁺ pour mieux agir grâce aux nouvelles technologies

Aujourd'hui, il n'existe pas de phénotype consensus accepté pour l'identification des Tregs CD8⁺. Pour affiner leur phénotype, nous avons procédé par l'élimination de sous-populations selon des marqueurs décrits pour les Tregs CD4⁺, ainsi que des tests fonctionnels *in vitro*. Ces travaux de recherches longs, laborieux et limités à quelques marqueurs déjà connus pour les Tregs CD4⁺, n'ont pas permis d'identifier de marqueur clé des Tregs CD8⁺ (Bézie et al. 2018). De plus, l'expression de certains marqueurs, tel que le CD25 ou GITR varient selon l'état d'activation des cellules, rendant plus difficile leur caractérisation. Il est donc crucial de cribler d'autres molécules sans biais de sélection préalable, pour raffiner l'identité des Tregs CD8⁺ tout en améliorant/augmentant nos connaissances sur leurs mécanismes d'action. L'accessibilité des nouvelles technologies telles que l'édition de génome, la cytométrie spectrale ou alors le single-cell RNA-sequencing permettent désormais d'étudier les Tregs CD8⁺ sous un nouvel angle et permet d'envisager leur meilleure caractérisation avec la découverte de marqueurs spécifiques. L'identification et la validation de biomarqueurs pour une utilisation de routine en clinique, sont non seulement essentielles pour suivre l'évolution des maladies, mais également pour personnaliser et développer de nouvelles thérapies.

A. Outils d'édition de génome : Génération de modèles pour l'étude des Tregs

Les outils d'édition de génome tels que ZFN (Zinc Finger Nuclease), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) ou CRISPR/cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) sont utilisés dans de nombreux cas, notamment pour la génération d'animaux transgéniques, l'analyse fonctionnelle des gènes, le développement de modèles de maladies ou bien de traitements (Khalil 2020). Notre équipe a généré un modèle de rat eGFP-Foxp3 grâce au système CRISPR/CAS9, c'est-à-dire que lorsque les cellules expriment la protéine FOXP3, elles coexpriment la molécule fluorescente eGFP. Ainsi, ce modèle permet de trier les cellules selon la détection ou non de la eGFP et ainsi isoler les cellules FOXP3⁺ des cellules FOXP3⁻, notamment pour en étudier leurs transcriptomes respectifs, alors qu'en temps normal cela est impossible du fait de l'expression intracellulaire de FOXP3. Ces travaux font l'objet d'un article scientifique déposé sur Biorxiv (Ménoret et al. 2021), dans lequel j'ai pu apporter ma contribution notamment concernant la partie analyse transcriptomique des Tregs CD4⁺ et CD8⁺ GFP⁺.

Ces outils de modifications de génomes permettent également de faire de la thérapie génique, permettant de remplacer un gène déficient ou défectueux dans un but curatif *in vitro*, *in vivo* en systémique ou ciblé. (H. Li et al. 2020). Dans le cas de MAIs ou transplantations, la combinaison de la thérapie génique et le transfert adoptif de Tregs pourrait permettre d'améliorer l'efficacité, notamment avec les CAR-Tregs dirigés spécifiquement contre un antigène (cf chapitre précédent) (Biswas et al. 2018).

Ainsi, l'accessibilité des outils de modifications du génome ont permis la génération de nouveaux modèles d'études afin de comprendre les mécanismes des Tregs, et ont rendu possible la thérapie génique pour le traitement de patients dans certains cas. Cependant, l'amélioration des techniques actuelles ou l'émergence de nouvelles technologies permettent également la redécouverte des Tregs sous un nouvel angle.

B. Analyses protéiques :

La cytométrie en flux est une technique qui mesure simultanément des caractéristiques physiques des cellules comme la taille ou la granulosité et qui fonctionne sur le principe de détection de fluorescence de cellules marquées avec des sondes spécifiques (Adan et al. 2017). Elle permet ainsi l'analyse de l'expression de marqueurs cellulaires au niveau de la cellule unique (extracellulaire ou intracellulaire). De plus, il est possible de trier physiquement les cellules et les séparer en sous-populations en fonction des marqueurs extracellulaires souhaités et de cytokines sécrétées, grâce aux kits Miltenyi qui ont notamment été utilisés pour trier des sous-types de Tregs CD8⁺ (Bézie et al. 2018). Les applications principales sont l'immunophénotypage, la détection de cytokines, l'analyse de la prolifération ou de l'apoptose. L'avantage principal de cette méthode est de pouvoir analyser le niveau protéique d'un grand nombre de cellules en même temps. Bien qu'il s'agisse de techniques de routine, elles présentent des limites : seuls quelques dizaines de marqueurs peuvent être étudiés simultanément sur les mêmes cellules. De plus, la mise au point de grands panels est longue. Cette technique ne permet de détecter les cytokines que lorsque les cellules sont stimulées.

Pour affiner le phénotype des Tregs CD8⁺ et étudier leur hétérogénéité, notre équipe a réalisé un criblage de l'expression de molécules membranaires décrites comme jouant un rôle dans la fonction suppressive des Tregs CD4⁺ en utilisant la technique de cytométrie en flux (Figure 14) (Bézie et al. 2018). Ce criblage molécule par molécule a permis d'identifier des molécules exprimées de manière hétérogène à la surface des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}.

L'isolement des cellules exprimant ou non ces marqueurs, suivi de tests suppressifs n'ont pas permis d'isoler de sous-populations de Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ plus suppressives que la population cellulaire globale à l'état basal. De plus, aucun de ces marqueurs membranaires ne corrèle avec FOXP3, sauf GITR. Cependant, lorsque les cellules sont pré-stimulées, le marqueur GITR permet d'isoler 2 sous populations : Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}GITR^-$ et les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}GITR^+$; ces dernières possédant les capacités suppressives les plus importantes.

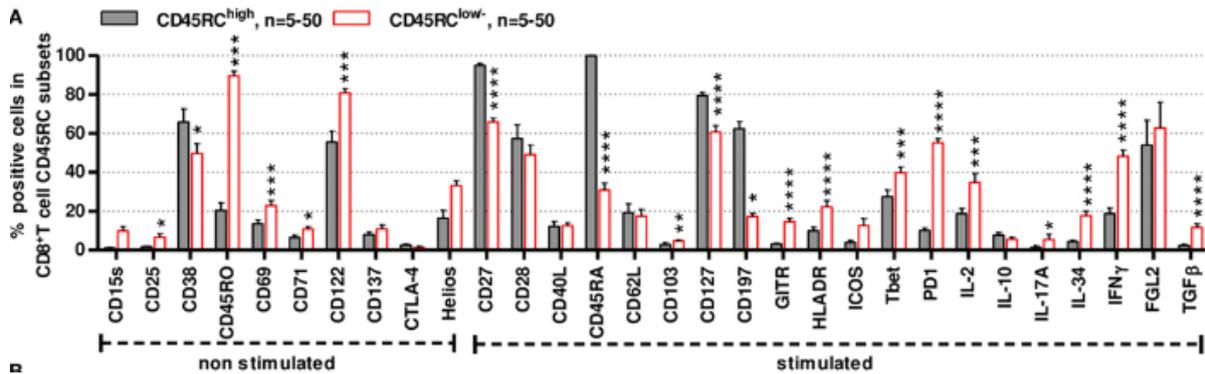


Figure 14 : Analyse de l'expression protéique de marqueurs associés aux Tregs (Bézie et al. 2018)

Il est accepté que l'un des mécanismes d'action des Tregs est la production de cytokines immunosuppressives. La caractérisation des cytokines produites par les Tregs $CD8^+$ est nécessaire pour bien les définir et comprendre leurs mécanismes d'actions, ainsi que leurs cibles. De plus, il existe désormais des outils permettant de trier les cellules selon les cytokines qu'elles produisent. Notre équipe a déjà identifié que les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ produisant de l'IL-10 et l'IFN- γ sont les plus suppressives. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres cytokines soient impliquées, d'où l'importance d'étudier toutes les cytokines produites par les Tregs $CD8^+$.

De récents progrès en cytométrie ont permis l'émergence de la cytométrie spectrale avec la possibilité de combiner plus de 40 marqueurs et ainsi aborder l'hétérogénéité protéomique des Tregs sous un nouvel angle. Cette technique permet de capturer tout le spectre d'émission des molécules fluorochromes, alors qu'en cytométrie conventionnelle, seule une partie du spectre est analysé. Nous n'avons pas réalisé d'expériences de cytométrie spectrale, bien que nous ayons le matériel nécessaire au laboratoire, cependant, il est planifié de le faire. En effet, comme il faut choisir un nombre limité de protéines à regarder, nous avons préféré regarder l'ensemble des molécules CD (CD-screen) et d'analyser le transcriptome pour identifier les cibles les plus

intéressantes à analyser dans un premier temps. Ces marqueurs intéressants seront par la suite analysés par cytométrie spectrale, notamment pour le monitoring des patients qui seront inclus dans l'essai clinique. Nous n'avons également pas réalisé d'expérience de cytométrie de masse sur les Tregs CD8⁺, expérience quasi similaire à la cytométrie en flux permettant de caractériser le protéome des cellules non pas avec de la détection fluorescence mais grâce à la masse des isotopes couplés aux anticorps (Spitzer et Nolan 2016), du fait de son cout et de sa complexité à mettre en place. En revanche, pour caractériser les Tregs CD8⁺, nous avons réalisé une expérience de CD-screen, 361 molécules membranaires ont été criblées par cytométrie en flux classique. Cette méthode et ces résultats sont détaillés dans la partie III de cette thèse.

C. Analyses transcriptomiques en bulk :

En parallèle des analyses protéomiques, le développement des analyses du transcriptome a également permis d'approfondir nos connaissances sur les Tregs. Pour raffiner leur identité, notre équipe a réalisé des analyses transcriptomiques, dites « en bulk », le transcriptome d'une population cellulaire est analysé dans sa globalité. Cette technique est décrite dans la partie II de cette thèse. Tout d'abord, notre équipe a réalisé des expériences sur des Tregs de rats, notamment dans les modèles de rats eGFP-FOXP3 (Ménoret et al. 2021), des rats AIRE^{-/-} (Besnard et al. 2022) ou des rats IL34^{-/-} (Freuchet et al. 2022) et j'ai pu participer aux analyses transcriptomiques. Les analyses des Tregs CD8⁺ des rats eGFP-FOXP3 ont notamment permis de mettre en évidence qu'en plus du gène *FOXP3*, les gènes *IL2RA* (CD25), *LRRC32* (GARP) et *ILAR* (CD124) sont significativement sur-exprimés dans les Tregs CD8⁺FOXP3⁺ par rapport aux Tregs CD8⁺FOXP3⁻.

Ensuite ce type d'analyse a été réalisé chez l'Homme. Ces analyses ont permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} (cellules conventionnelles) et les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}, ainsi que les gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} isolés du sang périphérique vs amplifiés (Bézie et al. 2018). Ces analyses ont montré l'up-régulation de molécules suppressives avec l'amplification des Tregs CD8⁺, tels que *IL2RA* (CD25), *CTLA-4*, *TNFRSF18* (GITR) ou *FOXP3* (Figure 15). Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} fraîchement isolés du sang périphérique étant une population cellulaire hétérogène et importance en fréquence (environ 50% des lymphocytes T CD8⁺ totaux), l'analyse de leur transcriptome en bulk-RNA-seq n'est pas optimale et n'a pas permis de mettre en évidence de marqueur clé des Tregs CD8⁺.

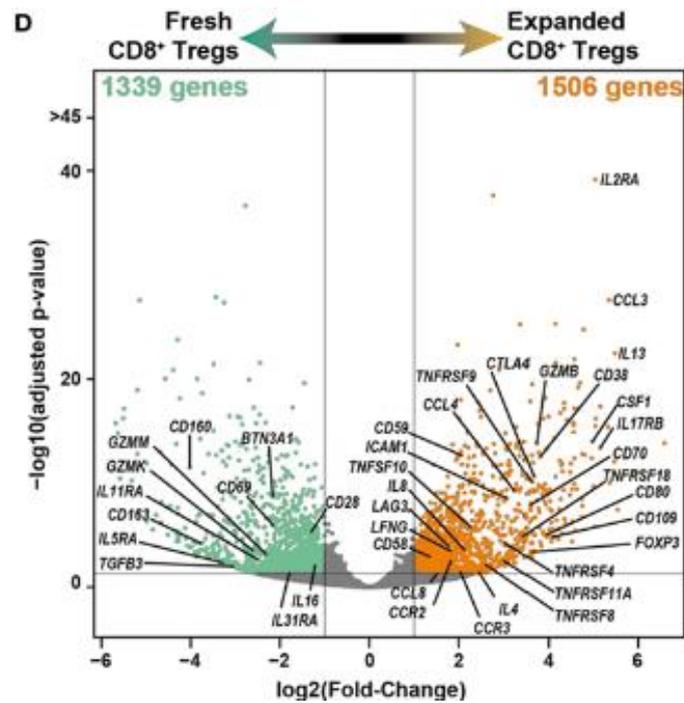


Figure 15 : Volcano plot représentant les gènes différentiellement exprimés entre les Tregs $CD8^+ CD45RC^{low/-}$ fraîchement isolés du sang périphérique et les Tregs $CD8^+ CD45RC^{low/-}$ amplifiés.
(Bézie et al. 2018).

Ces analyses protéomiques et transcriptomiques en bulk ont démontré une forte hétérogénéité présente au sein des Tregs $CD8^+ CD45RC^{low/-}$ du sang périphérique mais n'ont pas permis d'identifier de nouveaux marqueurs clés (membranaires ou non) associés à la fonction régulatrice, ni de mettre en évidence un phénotype précis des Tregs $CD8^+$, sauf GITR pour les Tregs $CD8^+ CD45RC^{low/-}$ stimulés.

D. Nouvelles perspectives quant à la compréhension de l'hétérogénéité des Tregs grâce à l'étude du transcriptome au niveau de cellules uniques :

L'émergence de nouvelles technologies, telles que le single cell RNA-seq, permet d'envisager l'étude des Tregs $CD8^+$ sous un nouvel angle et ainsi espérer comprendre leur hétérogénéité et d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques de ces cellules. Depuis la première étude de transcriptome en cellules uniques (scRNA-seq) publié en 2009 (F. Tang et al. 2009), de nombreux travaux ont permis de caractériser et de délimiter l'hétérogénéité de différentes populations cellulaires. Cette technique est présentée en détails dans la partie III de cette thèse. Avec l'amélioration de cette technique, en plus de séquencer l'ARNs de chaque cellule unique, on est désormais capable de séquencer les récepteurs TCR et/ou BCR. On a également la possibilité d'étudier les marques épigénétiques au niveau de la cellule unique ou

bien même d'étudier l'expression protéique (pour les molécules membranaires uniquement pour le moment). Ces améliorations vont permettre de stratifier les cellules au plus fin niveau possible.

En ce qui concerne les Tregs $CD4^+$, une analyse du transcriptome en cellules uniques de Tregs $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ et lymphocytes T $CD4^+$ conventionnels ($CD4^+CD25^-CD127^{\text{high}}$) provenant du sang périphérique de volontaires sains a été réalisée (Zemmour et al. 2018). Ces analyses ont confirmé l'identité transcriptomique des Tregs $CD4^+$ avec l'expression de *FOXP3*, *IL2RA* (CD25), *IKZF2* (Helios) et *CTLA4*. De nouveaux gènes moins décrits ont été mis en évidence, tel que *TNFRSF1B* (TNFR2) et *ITGB1* (CD29), présentés dans la figure 16 ci-dessous.

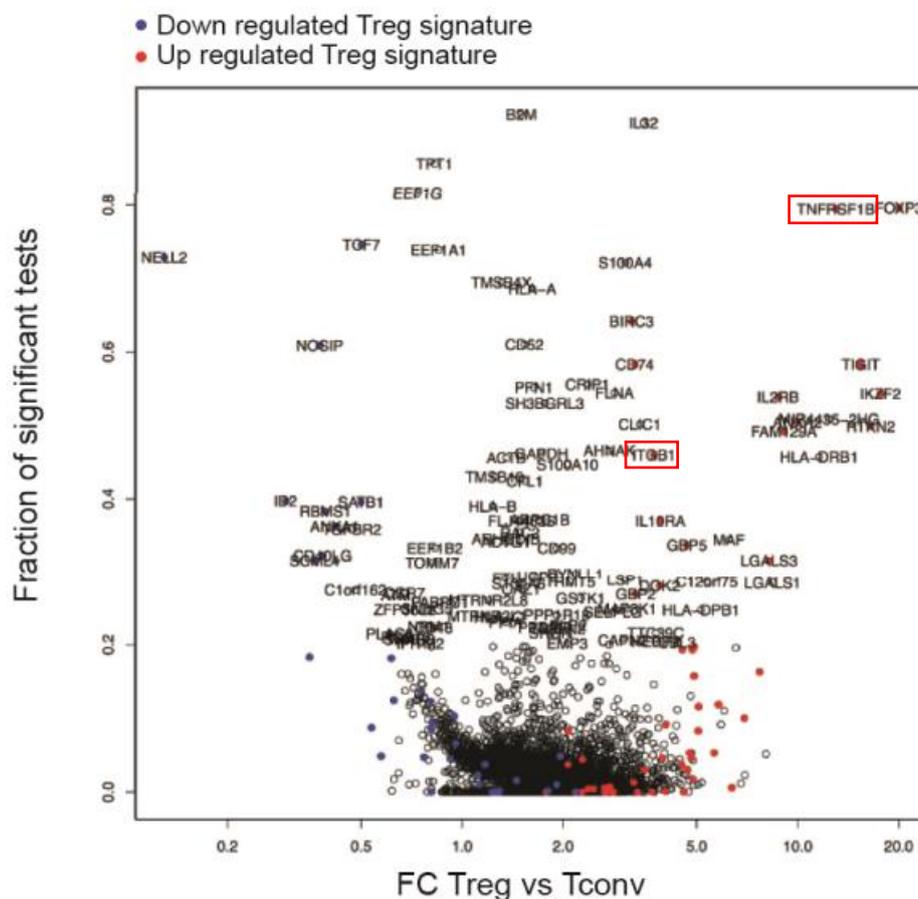


Figure 16 : Analyse différentielle de l'expression des gènes entre les Tregs $CD4^+$ et les lymphocytes T $CD4^+$ conventionnels, (Zemmour et al. 2018)

Une autre analyse de scRNA-seq sur des Tregs $CD4^+$ a été réalisée (Miragaia et al. 2019). Cette étude a confirmé l'importance de la voie de signalisation TNFRSF-NF κ B dans la

signature transcriptomique des Tregs CD4⁺. Depuis la découverte du CD25 en 1995 et de FOXP3 en 2003 comme étant des marqueurs spécifiques des Tregs CD4⁺, bien qu'aussi des marqueurs d'activation, peu de nouveaux marqueurs spécifiques de ces cellules ont été découverts. Grâce aux avancées technologiques et notamment grâce aux nouvelles technologies décrites précédemment, l'intérêt des marqueurs CD25 et FOXP3 pour les Tregs CD4⁺ a été confirmé mais elles ouvrent les possibilités de découverte de nouveaux marqueurs, qui pourraient être à leur tour utilisés pour activer ou inhiber les Tregs dans le cadre de thérapies : TNFR2 est l'un de ces nouveaux marqueurs (décrit dans le chapitre précédent).

A notre connaissance, il n'y a, à ce jour, aucune donnée de scRNA-seq caractérisant l'hétérogénéité présente au sein des lymphocytes T CD8⁺ fraîchement isolés du sang périphérique montrant une sous-population cellulaire de Tregs CD8⁺.

Les intérêts principaux dans l'identification des marqueurs membranaires spécifiques des Tregs CD8⁺ sont à la fois de pouvoir étudier de manière plus approfondie les Tregs ainsi que leurs mécanismes de suppression, mais aussi d'utiliser ces marqueurs pour isoler les Tregs ou de s'en servir comme moyen de diagnostic ou pour le suivi de patients, et finalement de pouvoir les activer ou les inhiber avec des anticorps agonistes ou antagonistes spécifiques de ces marqueurs. Bien que l'intérêt de l'identification de marqueurs membranaires soit grand, il n'en demeure pas moins utile qu'il faut comprendre la biologie des Tregs et les mécanismes cellulaires impliqués dans leurs fonctions suppressives. Ainsi, les facteurs intra-cellulaires sont également importants à identifier.

FOXP3 est un facteur de transcription clé identifié dans les Tregs CD4⁺ les plus étudiés, bien qu'il ne soit pas indispensable pour tous les types de Tregs, comme c'est le cas pour les Tr1. Son rôle dans la fonction ou la génération des Tregs CD8⁺ n'est pas entièrement démontré. En effet, à l'état basal, peu de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} expriment FOXP3 bien qu'elles aient une forte capacité suppressive. Il est envisageable que d'autres facteurs de transcription soient impliqués dans le développement et la fonction des Tregs CD8⁺, c'est pourquoi il est donc important de les explorer. Les méthodes d'analyses protéomiques et transcriptomiques permettent d'émettre des hypothèses quant à de potentiels facteurs de transcription clés, mais d'autres méthodes complémentaires comme des analyses scATAC-seq permettraient d'identifier les facteurs de transcription des Tregs CD8⁺. A ce jour, il n'y a pas d'analyse par scATAC-seq réalisée sur les Tregs CD8⁺.

Pour conclure cette introduction, les nouvelles technologies (scRNA-seq et scATAC-seq) offrent de nouvelles possibilités quant à la compréhension de l'hétérogénéité des Tregs CD8⁺ ainsi que pour la découverte de nouveaux marqueurs spécifiques de ces cellules. Pour toutes les raisons, il a été nécessaire de réaliser une expérience de scRNA-seq pour étudier l'hétérogénéité des TCD8⁺CD45RC^{low/-} afin de tenter de définir un phénotype consensus, d'identifier de nouveaux marqueurs ainsi que d'étudier les facteurs de transcription corrélant avec les fonctions suppressives.

II – Problématique

II. Problématique de la thèse

Après avoir commencé à travailler dès mon stage de Licence 3 dans l'équipe 2, mes stages de Master 1, puis de Master 2 m'ont orienté vers ce projet de recherche portant sur les lymphocytes T régulateurs de type CD8⁺. Comme présenté dans l'introduction, notre équipe définit les Tregs CD8⁺ comme étant la population de lymphocytes T CD8⁺ exprimant faiblement ou non la molécule CD45RC : les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}. Nous avons démontré dans de nombreuses publications leur rôle suppressif *in vitro* et *in vivo* chez la souris, le rat et chez l'Homme. Il s'agit d'une large population cellulaire qui représente environ 50% des lymphocytes T CD8⁺ totaux (Figure 17). De plus, nous avons également démontré que cette population cellulaire est hétérogène ; cela suggère qu'il existe des sous-populations de cellules au sein du pool de cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} possédant des propriétés suppressives différentes. Il est critique de trouver de bons marqueurs pour les isoler et surtout comprendre les mécanismes complexes de cette population cellulaire encore trop peu décrite.

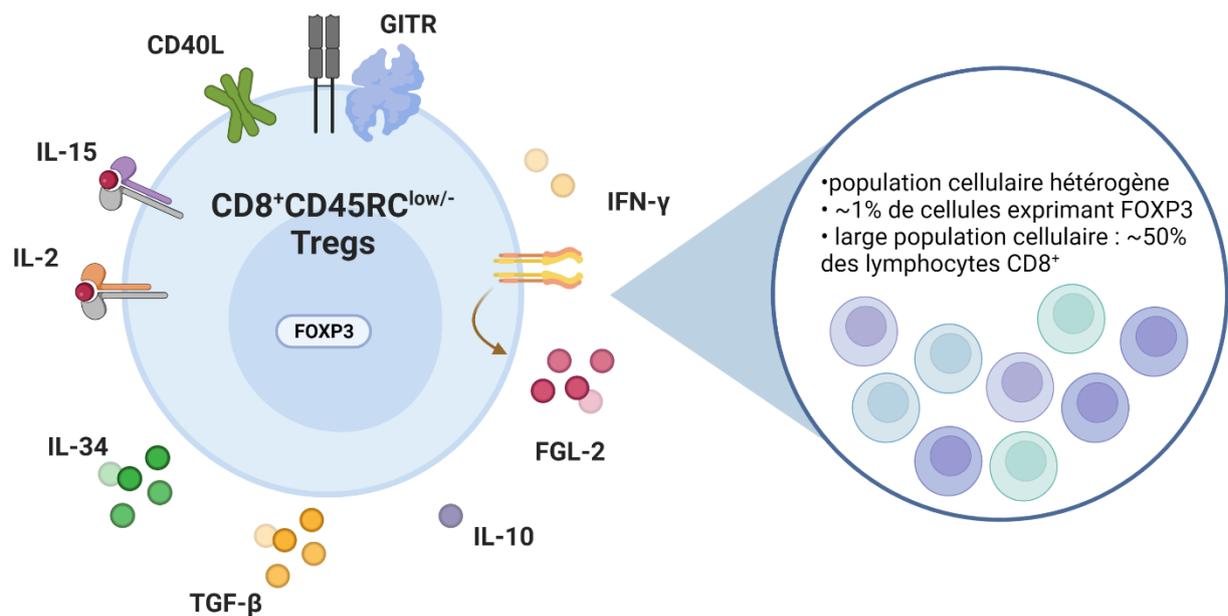


Figure 17 : Connaissances actuelles et caractérisation des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} chez l'Homme.

L'objectif principal de ma thèse a été d'étudier l'hétérogénéité présente au sein des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} fraîchement isolés du sang périphérique afin de mieux comprendre cette population cellulaire. Dans un second temps, l'objectif a été d'identifier de nouveaux marqueurs pour délimiter cette hétérogénéité et définir des sous-types cellulaires au sein des T CD8⁺CD45RC^{low/-}. Finalement, le dernier objectif a été de tester si parmi les sous-populations identifiées nous étions capables d'enrichir les cellules ayant le plus fort potentiel régulateur/suppressif.

Les étapes permettant de répondre à cette problématique ont été :

- 1) D'explorer l'hétérogénéité présente au sein des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} et d'identifier des sous-populations *in silico*.
- 2) D'analyser l'expression protéique des marqueurs prédits *in silico*.
- 3) Puis de valider fonctionnellement l'activité suppressive des différentes sous-populations identifiées *in vitro*.

L'objectif secondaire de ma thèse a été de proposer un phénotype amélioré pour les Tregs CD8⁺, ainsi que de comprendre comment ces cellules agissent.

III – Projet de recherche

III. Le projet de recherche

A. Méthodologie

Dans ce projet, j'ai eu l'opportunité de pouvoir faire des expériences avec des technologies de pointe, puis de réaliser les analyses bio-informatiques correspondantes. Sont présentés ci-dessous les principales techniques et expériences réalisées au cours de ma thèse :

- 1) 3'DGE-seq 3'Digital Gene Expression RNA-sequencing (3'DGE-seq)
- 2) scRNA-seq
- 3) CD-screen
- 4) CITE-seq
- 5) Tests suppressifs

a. 3'Digital Gene Expression RNA-sequencing (3'DGE-seq)

Le 3'DGE-seq est une technique de séquençage à haut débit, qui ne séquence que la partie 3' des ARN messagers (ARNm). Cette technique ne donne pas d'informations sur la structure des transcrits comme pourrait le faire du RNA-seq classique. Le 3'DGE-seq permet de faire une analyse quantitative de plusieurs échantillons simultanément, réduisant grandement les coûts de séquençage.

Des adaptateurs ou code-barres sont ligés aux fragments d'ARNm (Figure 18). Chaque code-barre étant spécifique à un seul échantillon, cela permet l'identification des échantillons entre eux. De plus, des identifiants moléculaires uniques (UMI) sont ajoutés à chacun des brins d'ADNc correspondant à un ARNm. Les UMI sont des séquences de 10pb générés aléatoirement. Grâce à ces 2 adaptateurs, on peut identifier les brins et quantifier l'expression des gènes, en comptant le nombre d'UMI pour chaque gène. Les librairies sont ensuite séquencées.

Le profil DGE est généré en comptant pour chaque échantillon le nombre d'UMI associé à chaque gène. Ces expressions sont normalisées par rapport à un million de transcrits (UPM : Unité par million), permettant ainsi de comparer les niveaux d'expression entre les échantillons.

L'avantage principal de cette technique est qu'elle coute relativement peu cher par rapport au nombre d'échantillons étudiés : 96 échantillons par plaque peuvent être séquencés en même temps. En combinant plusieurs index, il y a la possibilité de multiplier le nombre de

plaques séquencées en parallèle. Cela permet donc de diminuer les coûts de séquençage. Cette technique est intéressante pour étudier les gènes différentiellement exprimés entre plusieurs conditions de culture, comme par exemple étudier l'effet d'un traitement.

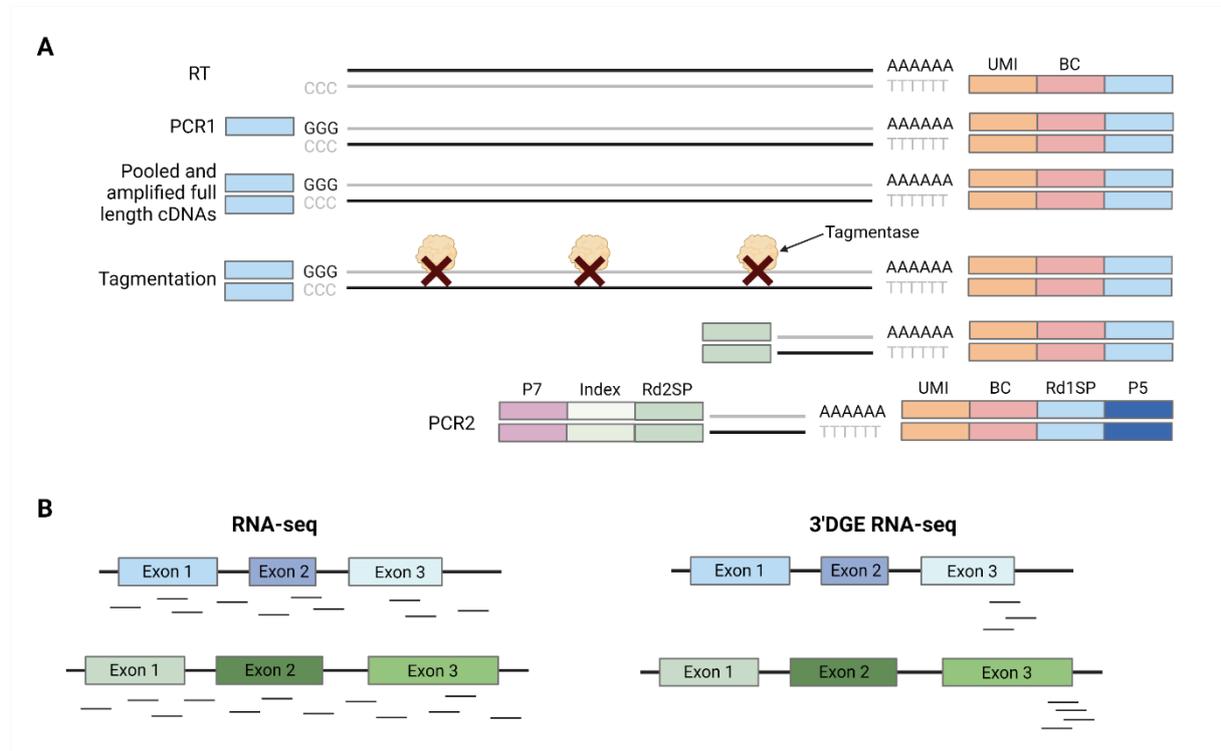


Figure 18 : Principe du 3'DGE-seq

(A) Etapes pour la génération de la librairie 3'DGE-seq. (B) Comparaison RNA-seq et 3'DGE-seq.

Plusieurs jeux de données ont été obtenus grâce à cette technique : des Tregs $CD4^+CD25^{high}$ (frais ou stimulés), des T $CD4^+CD25^-$ (frais ou stimulés), des T $CD8^+CD45RC^{high}$ (frais ou stimulés), des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ (frais ou stimulés ou en présence de plusieurs cytokines inflammatoires) et des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ amplifiés.

Bien que cette technique ait permis de mieux caractériser des types cellulaires, elle pose un problème quand la population cellulaire étudiée est hétérogène. De nouvelles techniques ont émergé ces dernières années et permettent d'envisager de nouvelles expériences pour approfondir la caractérisation des Tregs $CD8^+$ chez l'Homme.

En parallèle de mon projet principal de thèse, j'ai pu participer à d'autres projets de 3'DGE-seq en lien avec l'étude des Tregs $CD8^+$ ayant permis la publication d'articles scientifiques (Besnard et al. 2022; Bézie et al. 2020; Flippe et al. 2020; Freuchet et al. 2022).

b. scRNA-seq : pour étudier l'hétérogénéité des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$

Pour caractériser l'hétérogénéité transcriptomique des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ du sang périphérique, une première expérience de scRNA-seq a été réalisée.

Pour un séquençage en masse (bulk), ou toutes les cellules sont mélangées, on obtient une moyenne d'expression de chaque gène pour l'ensemble des cellules. Cette méthode masque complètement l'hétérogénéité (Figure 19). Le séquençage en cellule unique quant à lui permet d'étudier l'hétérogénéité d'une population cellulaire. En effet, on obtient le transcriptome pour chaque cellule unique. Ainsi on est capable de regrouper les cellules proches permettant ainsi d'étudier de nouvelles sous-populations cellulaires.

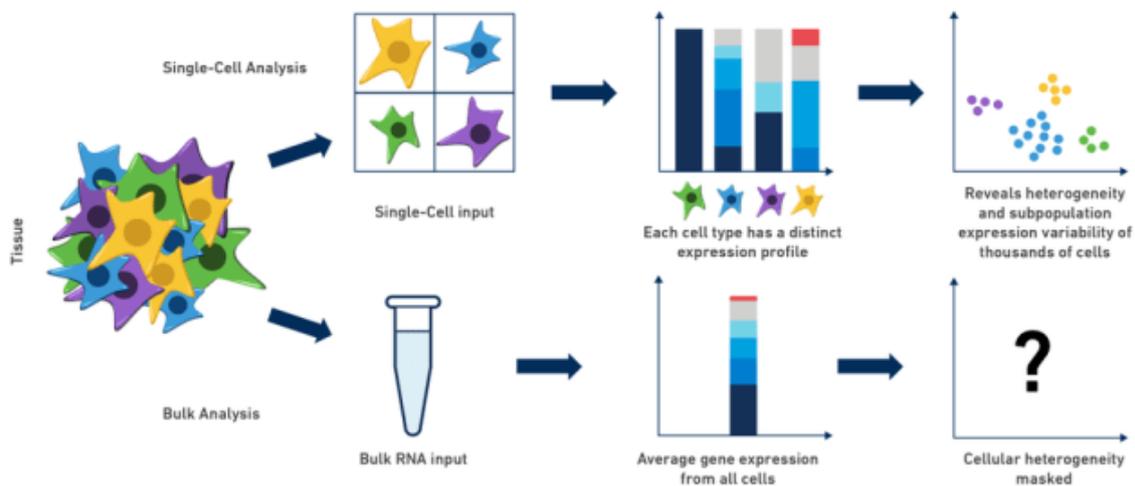


Figure 19 : La méthode de scRNA-seq permet d'étudier l'hétérogénéité qui était jusque-là masquée par la méthode de bulk RNA-seq.

<https://www.10xgenomics.com/>

Le scRNA-seq permet d'analyser en parallèle le transcriptome de plusieurs milliers de cellules uniques. Cela a pour objectif de regarder les variabilités de l'expression des gènes et identifier des sous-types de cellules au sein d'une population cellulaire hétérogène.

Dans ce projet nous avons utilisé la technologie 10X genomics (<https://www.10xgenomics.com/>). Cette technologie repose sur l'utilisation de « Gel Beads », ce sont des billes recouvertes avec des primers possédant des codes-barres. L'étape principale est la génération de Gel Bead in Emulsion (GEM) : les Gel Beads sont mélangées avec les cellules, les enzymes puis l'huile de partitionnement formant ainsi les GEM, correspondant à des gouttelettes d'émulsion (Figure 20). Ces émulsions contiennent ainsi une bille spécialisée, une cellule unique ainsi que tous les réactifs nécessaires. Les cellules étant en nombre limitant, la

majorité des GEM ne contient pas de cellules, cela permet de limiter le nombre de GEM contenant 2 cellules ou plus, appelés doublets.

Dans chaque GEM, de manière individuelle, les gel beads sont dissoutes et les molécules d'intérêt des cellules (ARNm) sont capturées et le code-barre est ajouté au cours de l'étape de transcription reverse (RT). Chaque gel bead contenant un code-barre spécifique, tous les fragments d'une cellule unique (ADNc) partagent ainsi le même code-barre en plus d'un UMI spécifique à chaque fragment. Un UMI correspond à une séquence unique permettant de différencier les fragments d'une même bille, cela permet d'avoir la quantité de transcrits d'un même gène. Finalement, tous les ADNc sont mélangés ensemble, puis les bibliothèques sont créées.

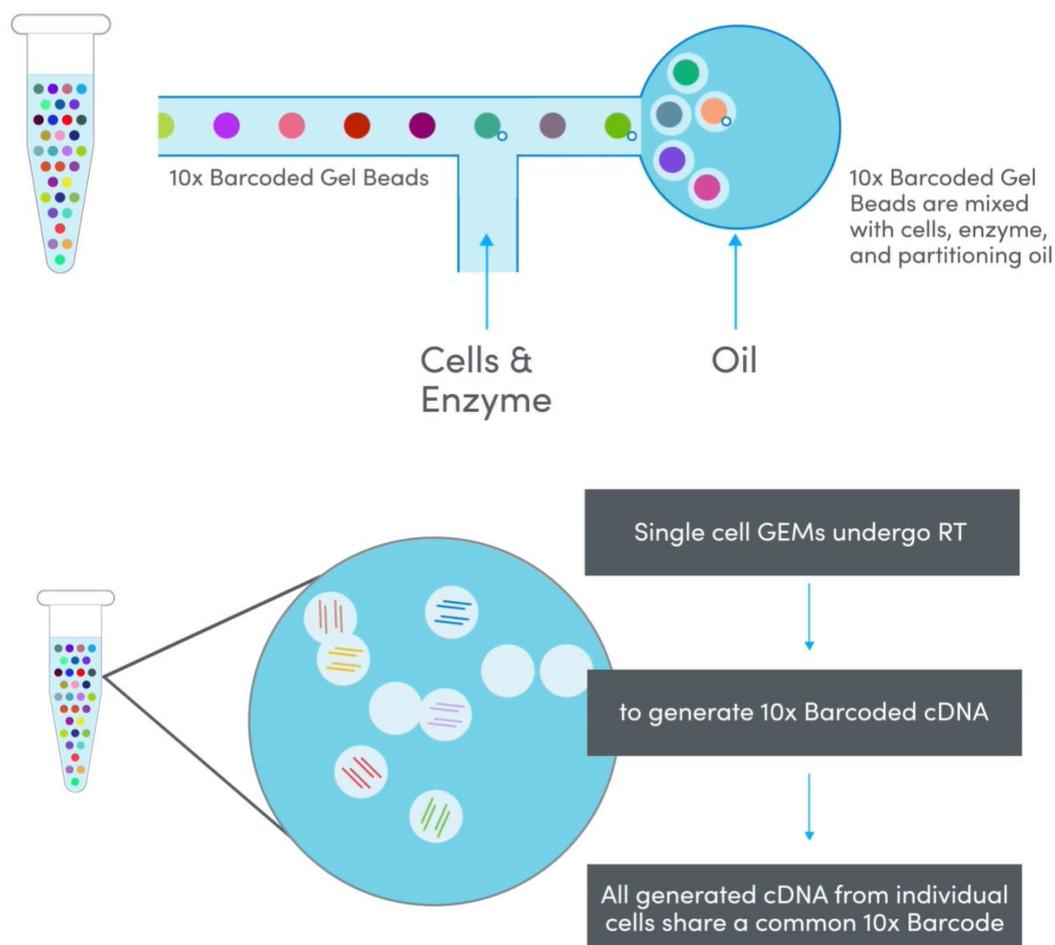


Figure 20 : Principe du scRNA-seq
<https://www.10xgenomics.com/>

Les principales étapes de l'expérience réalisée sont présentées dans la figure 21 suivante. Des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ fraîchement isolés du sang périphérique de 3 volontaires

sains (HV) ont été triés, puis marqués avec des anticorps hashtags total seq-A (Biolegend). Ces anticorps portent des code-barres, permettant ainsi d'identifier les cellules des 3 individus. Les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ des 3 HV ont ensuite été regroupées. Au total 40 000 Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ ont été chargées dans une plaque de single cell (chip A 10X genomics) puis placées dans le Chromium Controller (machine réalisant l'émulsion). Deux bibliothèques ont été préparées : une pour les ARNm et une pour les hashtags portés par les anticorps (ADT). Les 2 bibliothèques sont regroupées au ratio 1:9 (ADT:ARN), puis séquencées avec le NovaSeq 6000 (Illumina). Les analyses bio-informatiques ont été réalisées en 2 temps : l'analyse primaire, puis l'analyse secondaire. L'analyse primaire consiste à générer des fichiers FASTQ à partir des fichiers bruts du séquenceur avec le package Cell Ranger. Ces fichiers FASTQ sont démultiplexés puis alignés sur le génome de référence humain (hg38). Pour l'analyse secondaire, la matrice de comptage a été analysée avec le package Seurat sur R studio. Les cellules ne portant pas d'ADT, ou celles en portant 2 ou plus (doublets) ont été exclues de l'analyse.

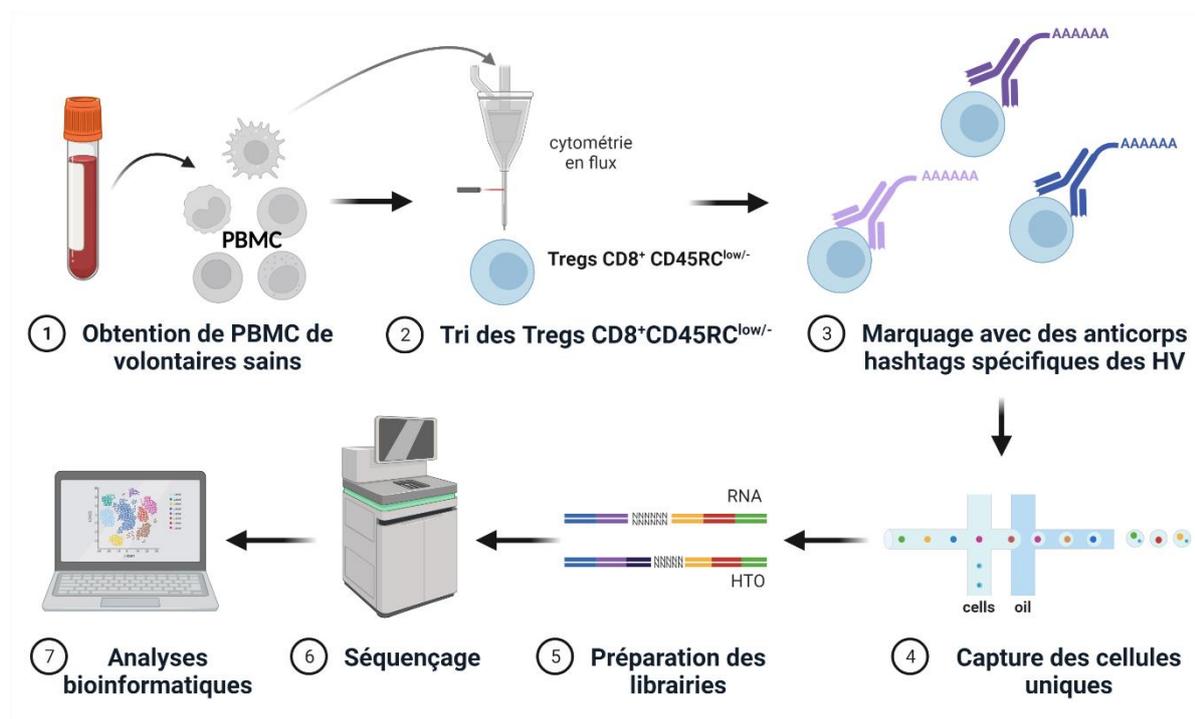


Figure 21 : Etapes du 1^{er} jeu de données de scRNA-seq

Les deux premières années de ma thèse ont été basées sur ce jeu de données que j'ai analysé. Il nous a permis de prédire de potentiels marqueurs des Tregs $CD8^+$ dont TNFR2.

Plusieurs limites se posent dans ce jeu de données : premièrement, il y a peu de gènes détectés par cellules (425 gènes). De plus, ce jeu de données ne comporte que des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$, il est donc impossible de comparer les niveaux d'expression des gènes par rapport aux lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{high}$. J'ai choisi de refaire une analyse plus complète en intégrant des lymphocytes T $CD8^+$ totaux et des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ amplifiés, ainsi que des anticorps de CITE-seq. Cette expérience est détaillée dans le paragraphe d) de cette partie.

c. CD-screen : Analyse de l'expression protéique de 361 molécules membranaires

Notre équipe a démontré l'hétérogénéité au niveau protéomique/protéique des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ du sang périphérique, notamment grâce à l'étude de certains marqueurs associés aux fonctions régulatrices des Tregs $CD4^+$. Cependant, cette première analyse est biaisée, car elle n'est basée que sur des marqueurs choisis. Afin de mieux caractériser l'hétérogénéité présente au sein des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ nous avons réalisé (en collaboration avec Charité, Berlin) un criblage de 361 protéines membranaires. Un schéma récapitulatif de cette expérience est présenté en figure 22. Le criblage a été réalisé à partir de PBMC fraîches (n=4) contenant les populations Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ et T $CD8^+CD45RC^{high}$ ainsi qu'à partir de Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ amplifiés (n=2) (Figure 23).

Concernant l'amplification, nous avons isolé des PBMC à partir du sang périphérique de volontaires sains. Après avoir trié les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}CD56^-$, nous avons réalisé une amplification des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ pendant 21 jours en présence d'anticorps anti-CD3, d'anticorps anti-CD28 ainsi qu'en présence d'IL-2, d'IL-15 et de rapamycine. Après amplification, les Tregs $CD8^+$ ont été congelés, ainsi que des PBMC des mêmes volontaires sains.

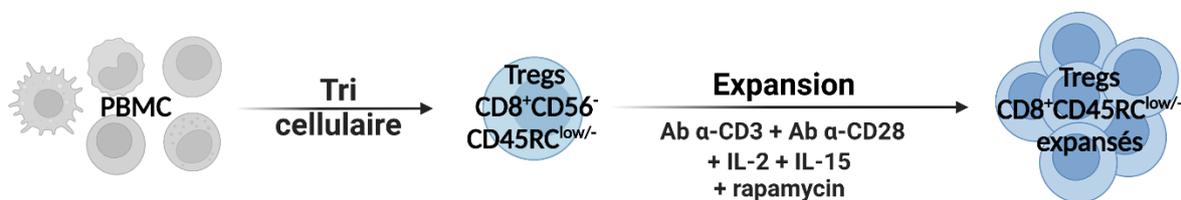


Figure 22 : Amplification des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$

Pour réaliser le CD-screen, des plaques spécialisées de la marque Biolegend ont été utilisées (LEGENDScreen™ Human PE Kit (cat # 700007)). Chaque puit contient un anticorps

monoclonal dirigé contre l'un des 361 marqueurs membranaires humains sélectionnés. Les anticorps sont couplés au PE, lyophilisés et pré-titrés aux concentrations optimales. De plus, 10 isotypes contrôles ont été ajoutés.

Les PBMC totaux ou Tregs amplifiés sont disposés dans chacun des puits des plaques. Afin d'identifier les sous populations de Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ et de Tconv $CD8^+CD45RC^{high}$ au sein des PBMC, un mélange d'anticorps (anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45RC, anti-CD161, anti-CD25 et anti-CD127) a été ajouté (Figure 23). Après un protocole de marquage de cytométrie en flux classique, les plaques sont lues au cytomètre en flux.

Les données générées ont été traitées par le logiciel Kaluza (<https://www.beckman.fr/flow-cytometry/software/kaluza>) afin de placer correctement les fenêtres des sous-populations et des isotypes. Ensuite, les données ont été exportées et analysées avec le logiciel RStudio (rstudio.com). Une première étape a consisté à réattribuer pour chaque anticorps l'isotype correspondant et ainsi placer pour chaque marqueur la fenêtre au bon endroit. Ces analyses ont permis d'avoir pour chaque population cellulaire la proportion de cellules exprimant chacun des 361 marqueurs.

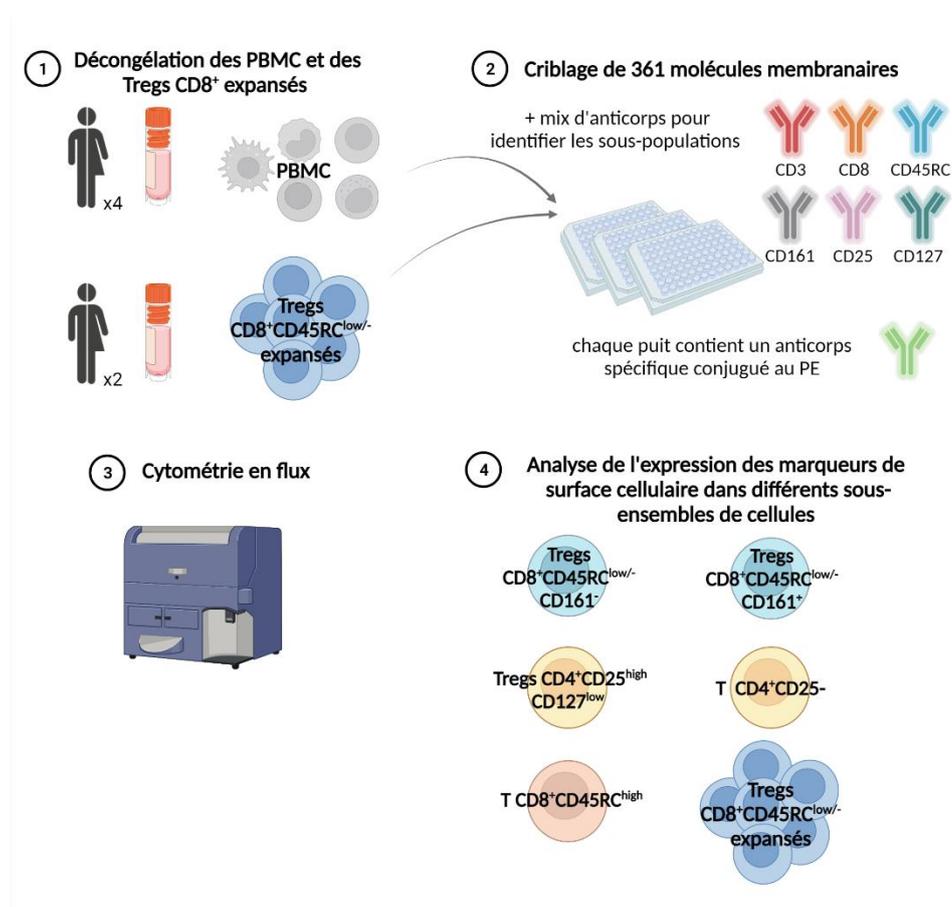


Figure 23 : Etapes du CD-screen

Les résultats générés par cette analyse bio-informatique ne sont pas présentés dans l'article scientifique. Cette étude nous a permis dans un premier temps de valider l'utilisation de CD45RC, puis dans un second temps de générer des pistes sur d'éventuels marqueurs potentiels de Tregs CD8⁺ : que ce soient des marqueurs corrélant positivement avec la fonction régulatrice ou des marqueurs d'exclusion. Certaines de ces pistes ont été étudiées alors que d'autres ont permis d'aider au design expérimental d'expériences du CITE-seq présenté ci-après.

d. CITE-seq : combiner la technologie de scRNA-seq et de marquage protéique membranaire

Le CITE-seq (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes) est une technique qui permet de réaliser du scRNA-seq classique comme décrit précédemment et d'y ajouter des informations sur le phénotype des cellules uniques. Des anticorps dirigés contre des protéines membranaires couplés à des code-barres spécifiques sont utilisés.

Les avantages de cette technique par rapport aux autres expériences réalisées précédemment sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous. Bien que toutes les données générées par ces expériences soient complémentaires, l'analyse en CITE-seq est la plus complète du fait qu'elle combine à la fois les informations sur le transcriptome complet, l'information protéique (30) ainsi que la séquence des TCR, et ce, pour chaque cellule unique.

	3'DGE-seq	CD-screen	scRNA-seq	CITE-seq
Transcriptome	En bulk	Non	En cellule unique	En cellule unique
Protéines membranaires	Non	361	Non	30
Prix	+	++	++++	+++++
Séquençage TCR	Non	Non	Non	Oui

Tableau 4 : Comparaison de tous les jeux de données

Cette expérience de CITE-seq n'a pas pu être réalisée plus rapidement. En effet, nous avons déjà réalisé la première expérience de sc RNA-seq sur les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}, nous avons donc choisi d'attendre les résultats du CD-screen pour sélectionner au mieux les anticorps pour pouvoir réaliser cette expérience de CITE-seq. En effet, les hypothèses générées grâce au

premier jeu de scRNA-seq et celles grâce au CD-screen ont révélées de potentiels marqueurs membranaires pour isoler des sous-populations au sein des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$. Afin de combiner ces informations, un autre jeu de scRNA-seq a été réalisé (Figure 24), mais cette fois-ci en comparant les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ avec les T $CD8^+CD45RC^{high}$. De plus des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ amplifiées pendant 21 jours ont été ajoutés. Nous avons utilisé 30 anticorps « barre-codés » : dont l'anticorps anti-CD45RC.

Dans cette analyse, des PBMC totaux ou des lymphocytes T $CD4^+$ n'ont pas été inclus. En effet, l'analyse du transcriptome de lymphocytes T $CD4^+$ en CITE-seq a été réalisée par nos collaborateurs de ReSHAPE à Charité, Berlin. Le consortium ReSHAPE regroupe différentes équipes de chercheurs dans le but d'améliorer le développement de Tregs pour une utilisation en clinique. De plus, il est prévu de réaliser par la suite une expérience de CITE-seq en comparant les Tregs $CD4^+$ et les Tregs $CD8^+$ dans le cadre de l'essai clinique EightTreg.

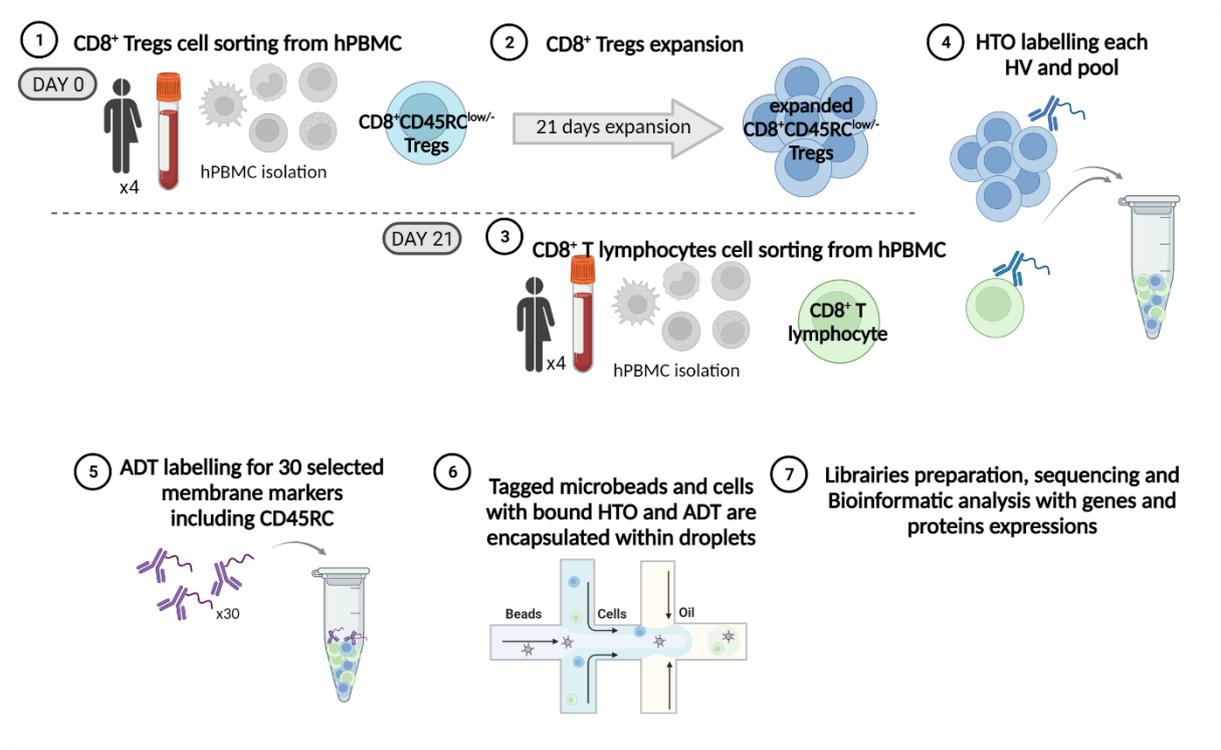


Figure 24 : Etapes du 2^{ème} jeu de données de scRNA-seq/CITE-seq

Chiffres clés :

	1 ^{er} scRNA-seq	2 ^{ème} scRNA-seq/CITE-seq
Version 10X genomics	Chromium Single Cell 3' library & Gel Bead Kit v2	Chromium Next GEM Single Cell 5-v2
Nombre d'individus sains	3	4
Nombre de cellules injectées	40 000	80 000
Nombre de cellules récupérées	14 093	21 988
Nombre de singulets	10 947	17 592
Nombre de reads / cellules en moyenne	~ 33 000	~40 000
Nombre de gènes / cellules en moyenne	425	1454 (fraîches) 4051 (amplifiées)
Séquençage TCR	Non	Oui

Tableau 5 : Chiffres clés des 2 jeux de données de scRNA-seq et CITE-seq

Ce jeu de données de CITE-seq comporte plusieurs avantages par rapport au scRNA-seq précédent (Tableau 5) :

- Plus de gènes sont détectés : les hypothèses générées sont donc plus précises.
- Il y a la possibilité de comparer les niveaux d'expression des gènes par rapport aux lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high}.
- L'information protéique permet de valider les marqueurs de Tregs, ainsi que d'exclure des populations cellulaires au cours de l'analyse (exemple : contaminants ou cellules MAIT/NKT).
- Nous avons également obtenu les séquences des TCR des cellules.

e. Analyse de l'activité suppressive des sous-populations de Tregs CD8⁺

Afin de valider les hypothèses générées par les analyses de scRNA-seq, CD-screen et CITE-seq, quant à la découverte de nouveaux marqueurs permettant d'identifier des sous-populations cellulaires de Tregs CD8⁺ ayant des propriétés suppressives supérieures, des analyses de l'activité suppressive des différentes sous-populations de Tregs CD8⁺ ont été réalisées lors d'expériences de Réaction Lymphocytaires Mixtes (MLR) dont le principe est présenté ci-dessous (Figure 25). Les cellules T conventionnelles CD4⁺CD25⁻ marquées au

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) ont été mises en culture en présence de cellules présentatrices d'Ag (CPAs) allogéniques irradiées de 3 donneurs sains (mimant une réaction de rejet de greffe). Cela a pour but de faire proliférer les cellules T conventionnelles. Après 5 jours de co-culture à 37°C à 5% de CO₂ la prolifération des Tconv est mesurée grâce au CFSE. Les cellules ayant proliférées ont une expression du CFSE diluée. L'ajout de cellules régulatrices à cette co-culture entraîne une inhibition de la prolifération des Tconv. Ainsi, les sous-populations de Tregs CD8⁺ ayant les propriétés les plus fortes inhiberont plus fortement la prolifération des Tconv.

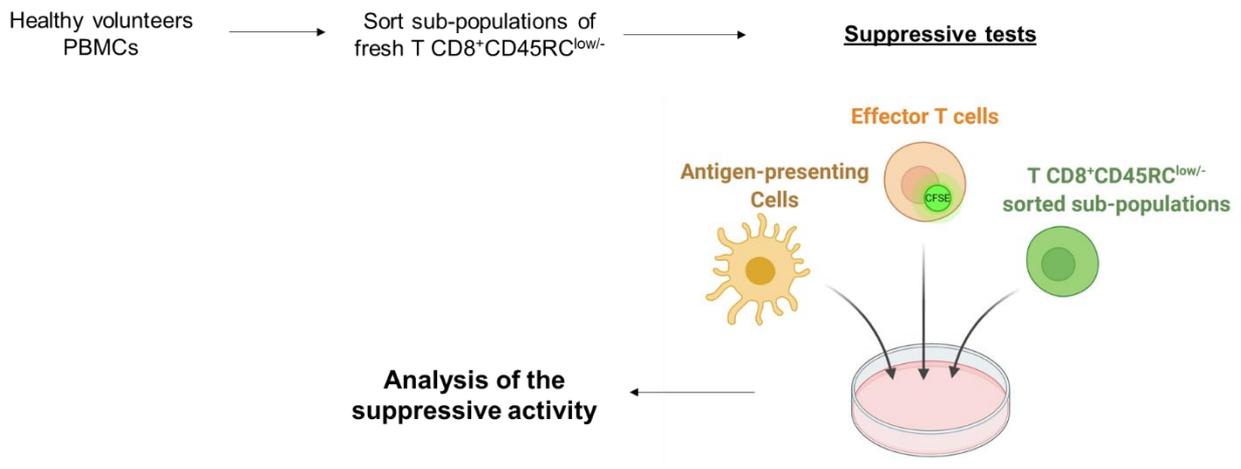


Figure 25 : Schéma des tests suppressifs

B. Publication scientifique

**Single-cell transcriptomic analysis further delineates human
CD8⁺ T regulatory cell subsets**

Céline Sérazin¹, Léa Flippe¹, Mathias Streitz², Désirée-Jacqueline Wending², Stephan Schlickeiser², Hans Dieter Volk², Ignacio Anegón¹, Laurent David¹, Séverine Bézie¹, Carole Guillonnet¹

¹ Nantes Université, INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, ITUN, CNRS, F-44000 Nantes, France

² BIH Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

³ Institute of Medical Immunology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

Corresponding author: Dr. Carole Guillonnet, INSERM UMR1064 – Center for Research in Transplantation and Immunology-ITUN, 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes Cedex 01, France. Phone: (+33) 2 40087410, Fax: (+33) 2 40087411. E-mail address: carole.guillonnet@univ-nantes.fr

Keywords: CD8⁺ Tregs, single cell RNA-seq, TNFR2, CD29

ABSTRACT

Although described in the 70's, CD8⁺ regulatory T cells (Tregs) remains incompletely understood and to date, although several markers are used to define them, they remain inconsistent. The identification of good markers, as it was done for CD4⁺ Tregs; remains an urgent task and a challenge to advance our understanding. Herein, we addressed the heterogeneity within total CD8⁺ T cells using single cell CITEseq and VDJ T cell receptor sequencing. We included markers used to previously identify Tregs, in particular CD45RC described by our team and others to divide effector (CD45RC^{high}) and pro-regulatory (CD45RC^{low/-}) CD8⁺ T cells. 7K non-stimulated CD8⁺ T lymphocytes, including CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs and CD8⁺CD45RC^{high} T cells of 4 healthy volunteers were analyzed. These analyses enabled the characterization of the transcriptomic heterogeneity at a single cell level from steady state total CD8⁺ T cells and allowed definition of regulatory CD8⁺CD45RC^{low/-} Treg subsets. Functional analysis using cell sorting and suppressive assays highlighted the suppressive potential of the CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{low} Tregs subset. To date, to our knowledge, this is the largest characterization study of human CD8⁺ Tregs, this huge data resource will help in the current revival of CD8⁺ Tregs in research, will improve our understanding of T cell heterogeneity and will help translate CD8⁺ Tregs to the clinic.

INTRODUCTION

Regulatory T cells are key components of the immune system involved in the maintenance of tolerance and acting to suppress immune responses in many pathological situations. CD4⁺ Tregs are the most described immunosuppressive cells since the discovery in 1995 of CD25 as a marker for their identification ¹. Since then, numerous efforts have been made for the comprehension of these cells critical in the regulation of the balance of the immune system, including the characterization of their origin (thymus vs periphery) and their transcriptional landscape with the discovery of a Treg specific transcription factor forkhead box protein P3 (FOXP3). Thereafter, a role for FOXP3 in other cell subsets like CD8⁺ T cells has been poorly described and controversial, and the existence of a CD8⁺ Tregs lineage specific transcription factor still debatable, leading to a disregard of the existence of CD8⁺ Tregs for decades despite that they were the first cells described to have suppressive functions in 1972 ².

The rapid development in the last years of technologies and methods to gain detailed information on the transcriptome and proteome at a single cell level has allowed the discovery of rare cell populations, as well as their lineage specifications, however to date, most studies on regulatory cells have focused on CD4⁺ Tregs, and there has been no true attempt to reveal CD8⁺ regulatory cell subsets and understand the heterogeneity within them and relationship between CD8⁺ T cell subsets. Indeed, as for other cell populations, one could expect that CD8⁺ Tregs exist under different identities related to distinct functional characteristics and differentiation pathways.

So far, our team and others have demonstrated that CD8⁺ Tregs identified by low and/or negative expression of the marker CD45RC, one of the isoforms of the CD45 molecule, show potent suppressive activity *in vitro* and *in vivo*, while cells expressing high levels of CD45RC do not including in mice, rat and human. CD45RC is an isoform of the CD45 protein tyrosine phosphatase and it has been revealed as a critical marker to distinguish within both CD4⁺ ³ and CD8⁺ ⁴ pro-inflammatory cells (CD45RC^{high}) from pro-regulatory cells (CD45RC^{low}). Based on these observations, since more than 15 years, our team isolates CD8⁺ Tregs based on the following definition: CD3⁺CD56⁻CD8⁺CD45RC^{low/-}. We have demonstrated the suppressive function of these cells freshly isolated and/or expanded and demonstrated their potential to prevent transplantation rejection, GvHD and multiple sclerosis ⁵⁻¹². We demonstrated that isolated and expanded CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs show an increased suppressive activity compared to the fresh one and differences in their phenotype ⁵. According to phenotype analysis by flow cytometry, CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs is a heterogeneous population in peripheral blood, and this heterogeneity is decreasing with ex vivo expansion. It suggests that either a fraction of

the fresh/circulating population is tolerogenic, or the induction of tolerance is due to a combination of cells forming an "immunological niche". Our team already assessed and screened expression of some markers related to Tregs in the literature without success for finding a more specific marker ⁵. Thus, a deep characterization of fresh CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells is needed for delineating their heterogeneity and to clearly define a strong and accepted consensus phenotype for CD8⁺ Tregs mostly with the finding of new highly specific markers.

In addition, understanding key markers of CD8⁺Tregs will help monitor outcome of patients after transplant or with autoimmune diseases to adapt their treatment, and predict the efficacy of CD8⁺Treg therapy in the upcoming phase I/IIa trial as part of the ReSHAPE consortium ¹³. Thus, we used single cell CITEseq including VDJ sequencing to analyze CD8⁺ T cells and resolve CD8⁺ Treg identity in human peripheral blood.

RESULTS

Single cell RNA-seq coupled to CITE-seq mapping of CD8⁺ T cells resolves subsets distribution and demonstrates cellular heterogeneity.

To explore the heterogeneity at transcriptomic level of total CD8⁺ T lymphocytes, we freshly isolated CD8⁺ T cells on expression of CD4⁻ and CD3⁺ from the blood of 4 healthy volunteers (**Suppl. Figure 1A**) and analyzed by single-cell RNA-seq coupled with 30 CITE-seq antibodies (**Figure 1A**), the distribution of distinctive cell subsets. To account for CD8⁺ regulatory T cells, we included the marker CD45RC at proteomic level since isoforms of CD45 could not be distinguished by transcriptomic analysis. We excluded NKT cells based on the coexpression of the markers CD56 and CD16. CD8⁺ T cell purity was checked at transcriptomic level (**Suppl. Figure 1B**).

A total of 7517 single cells evenly distributed among healthy individuals meeting the inclusion criteria (**Suppl. Figure 2A-C**) were normalized, integrated in Seurat, projected by principal component analysis and visualized by Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP). The analysis allowed identification of 12 distinctive cell clusters of fresh CD8⁺ T cells on the UMAP based on gene expression (**Figure 1B**) and clustree (**Suppl. Figure 2D**). Among the 12 cell clusters, there were some obvious subpopulations according to T cell development stage (**Figure 1B-D**). Notably we found a cell cluster bringing together cell clusters 0, 7 and 10 and accounting for naive T cells according to expression of classical gene markers (*SELL*, *CCR7*, *CD27* and *LEF1*) and protein markers (CD45RA and CD28). We also observed that cell clusters 1, 2 and 8 clustered together and expressed markers of effector memory 1 (EM1) stage (higher level of *ZBTB16*, *RORC*, *SLC4A10*, *KLRB1*, *NCR3*, *CD28*, *CD27* and low/no expression of *CCR7*, with a CD45RA⁻CD28⁺ phenotype). There were no obvious subpopulations among the remaining cell clusters, however, according to key developmental genes, we were able to subcategorize cell clusters 3 and 4 as E/EM3 T cells (on the higher expression of *FGFBP2*, *GZMB*, *GZMH*, low expression of *CD27* and no expression of *CCR7* and, and CD45RA⁻CD28⁻ phenotype), cell clusters 5, 6 and 9 as central memory (CM) stage (positive expression of *CCR7* and *CD27* and CD45RA⁻CD28⁺ phenotype) and cell cluster 11, which represented a small population, could be clustered as EM2/pE2 stage (high expression of *CD27*, no expression of *CCR7*, and a CD45RA^{low}-CD28⁻ phenotype). The CD45RC marker allowed a clear clustering between cell clusters 0,7 and 10 and the remaining cell clusters (**Figure 1D**), suggesting that the pro-regulatory cells are contained within the remaining cell clusters according to our previous demonstration^{5,6,11,12}. It also demonstrated that the transcriptomes of CD8⁺CD45RC^{low/-} and CD8⁺CD45RC^{high} T cells are clearly distinct.

The relative abundance of the TCR repertoire groups was then analyzed per cell cluster based on the frequency of clonotypes ranging from small (<0.01), medium (between 0.01 and 0.1) and large (>0.1). Most cell clusters demonstrated small clonotype frequency, however we observed that cell clusters 3/4 and cell cluster 11 demonstrated large clonotype groups i.e. more abundant clonotypes (**Figure 1E**). These findings suggest that some cell clusters (i.e. 3, 4 and 11) are dominated by some expanded clonotypes compared to the other cell clusters, correlating with the memory status of the cells we defined.

To distinguish MAIT cells from the CD8⁺ T cells of interest, we then focused on the expression of specific TCR $\alpha\beta$ chains (**Suppl. Figure 2E**) in addition to specific markers (**Figure 1C**). Indeed, MAIT cells are restricted to MHC-I related protein MR1 and they expressed semi-invariant T cell receptors TRAV1-2-TRAJ33 in humans ¹⁴. We observed that in CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells, cells of cell cluster 1,2 and 8 clearly showed a MAIT cell profile with the expression of the *TRAV1-2* and *TRAJ33* TCR chains and the *KLRB1* (which encodes for CD161), *SLC4A10*, *CCR6* and *CXCR6* genes, which are defining MAIT cells ¹⁵. In accordance with literature describing a memory phenotype in blood for MAIT cells (i.e. CD95^{hi}CD62L^{lo}CD45RO⁺CD45RA^{lo}CD27⁺CD122⁺ ¹⁶), the cells are found within cell cluster 1, 2 and 8 defined as EM1. Suppressive assays on subpopulations of CD161^{high/int/-} clearly demonstrated the absence of suppressive properties for MAIT cells (**Data not shown**), they were thus excluded from further analysis of the transcriptomic data.

Identification of cell clusters containing CD8⁺ regulatory and characterization of their features.

To further understand heterogeneity within CD8⁺ T cells, we projected by principal component analysis and visualized by UMAP the cells excluding the MAIT cells defined previously allowing now a definition of 10 new cell clusters (**Figure 2A**). We observed that the distribution according to T cell development stage was similar to what we previously observed (**Suppl. Figure 3A**). A total of 2314 genes were differentially expressed between cell clusters allowing better definition of each cell clusters with more than 80 differentially expressed genes per cell cluster and up to 540 genes (**Figure 2B**). Analysis using the CD45RC marker showed a total of 1179 genes differentially expressed between CD8⁺CD45RC^{high} (clusters 0, 5 and 7) and CD8⁺CD45RC^{low/-} (clusters 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 9) T cells (**Figure 2C**) that were evenly distributed among healthy individuals (**Suppl. Figure 3B**). Volcano plot analysis comparing CD8⁺CD45RC^{high} and CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells (**Figure 2C**) together with heatmap analysis of classical T regulatory cells-associated genes (**Figure 2D-E**) highlighted some signature

genes and demonstrated the lower expression of regulatory genes in the CD8⁺CD45RC^{high} T cells. CD8⁺CD45RC^{high} T cells gene signature was associated to significant higher expression of membrane proteins such as *MAL*, *LRRN3* and *CCR7* or transcription factors such as *LEF1*. Analysis of total CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells highlighted significant higher expression of some genes encoding membrane proteins (*CD99*, *KLRG1*, *PLEK*, *KLRD1* (i.e. CD94), *IL10RA*, *IL2RB*, *ITGB1* and *TNFRSF1B* (i.e. TNFR2)) and secreted proteins (*CCL5*, *CST7*, *GZMA* and *TGFBI*) or transcription factors such as *IKZF2* (i.e. HELIOS) compared to CD8⁺CD45RC^{high} T cells. *IKZF2* was found more expressed in particular by cell cluster 8 and 9 (**Figure 2D-E**), which represented small cell clusters in size with 146 and 44 cells, respectively. Expression of *FOXP3* in contrast was not differentially expressed between cell clusters and remained rarely detected (**Suppl. Figure 3C**), it was thus not further investigated.

Analysis of classical Treg-associated genes (**Figure 2D-E and Suppl. Figure 3D**) clearly demonstrated that Treg-associated genes were less expressed within CD8⁺CD45RC^{high} T cells compared with CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells and that within CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells some cell clusters were of particular interest, namely cell cluster 8 and 9 showing a higher expression of *IKZF2* (HELIOS) and cell clusters 1 and 2 showing a higher expression of *TNFRSF1B* (TNFR2) (cluster 2 in particular) and a lower expression of *IL7R* (CD127) and *CD28*. Finally, we observed expression of *FGL2* in cell cluster 2, a gene associated to CD4⁺ Tregs suppressive function and that we have also previously described as involved in CD8⁺ Tregs suppressive function¹⁷.

Further analysis of cytokines/chemokines receptor (**Figure 2F**) highlighted *TNFRSF14* (HVEM), *CXCR3*, *TGFBR3* in addition to *TNFRSF1B* (TNFR2) higher expression by cell cluster 1, 2 and 9. *IL2RB* and *CXCR3* were more expressed by cell cluster 8. Cell cluster 0, 5 and 7 showed higher expression of *CCR7*, *CD27*, *IL6ST* and *TGFBR2*.

Analysis of cytokines/chemokines signature genes (**Figure 2G and Supp 3D**) demonstrated a similar pattern between cell clusters with cell cluster 1, 2 and 9 expressing similar cytokines (*FGFBP2*, *CCLA*, *CCL5*, and *TGFBI*). Cell cluster 8 expressed higher levels of *IL32*, *TGFBI*, *LTB* and *IL16*, while cell clusters 0, 5 and 7 expressed higher levels of *FLT3LG*, *LTB* and *IL16* than others. We observed no specific association between expression of senescence/activation or exhaustion associated markers and cell clusters (**Suppl. Figure 3F**).

Finally, we then investigated the expression of lineage-defining transcription factors for each cell cluster and projected on a heatmap and feature plot the genes differentially expressed between cell clusters (**Figure 2H-I**). Interestingly, we were able to identify specific signatures per cell clusters. We observed a common signature of transcription factors for the all

CD8⁺CD45RC^{high} T cells (clusters 0, 5, 7) with in particular higher expression of *LEF1* essential for repressing CD4⁺ lineage-associated genes including *CD4*, *FOXP3* and *RORC* in CD8⁺ T cells¹⁸. In contrast, we found that *KLRG1*, *MYBL1*, *ANXA1* and *KLF6* were associated with total CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells.

Cell cluster 8 and 9 show a common expression of *IKZF2*, a transcription factor already associated to regulatory function of both CD4⁺ and CD8⁺ Tregs¹⁹. Cell cluster 8 also show with cell clusters 2 and 9 a common expression of *ZNF683*, a tissue resident T-cell transcription regulator. We observed that cell cluster 1/2 has a similar signature although the one of cell cluster 2 was more pronounced with for example expression of *ASCL2*, *ZEB2* or *TBX21*, transcription factors associated to activated T cell and polarized Tregs²⁰. We observed the higher expression of *FOS* in cell cluster 3/4 and of *EOMES* in cell cluster 6. Finally, cell cluster 9 also displayed a unique transcriptional signature with expression of *ZNF80* in addition to the previously mentioned expression of *IKZF2*.

Given these results, we speculated that based on unsupervised clustering of single cell RNA-seq data, several distinct human CD8⁺ Treg subsets might exist at steady state and could correspond to cell clusters 1/2, 8 and 9 and exhibit distinct status of maturation and possibly function. We excluded the possibility that mature and functional CD8⁺ Treg subsets might exist within the remaining cell clusters.

Single cell alpha and beta chain TCR profiling of CD8⁺ T cells

Since natural Tregs selected in the thymus have been shown (at least for CD4⁺ Tregs) to express TCRs that are distinct to some extent from the TCR repertoire of effector T cells, we sought to further determine the TCR alpha and beta chain preferential usage of the different cell clusters and sharing in between them. For this, we assessed the diversity of TCRs and performed a chord plot analysis of the TCR clonotypes (both alpha and beta chains) (**Figure 3A and Suppl. Figure 3F**). Cell cluster analysis per individuals showed a vast and diverse repertoire for all 4 individuals. We also observed that most cell clusters demonstrated some sharing of the clonotypes, we observed the most important sharing of the clonotypes in cell clusters 1/2 for all the 4 donors, 8 for 2 out of 4 donors, and 9 for 1 donor and less sharing for cell clusters 0, 5 and 3. Further analysis of the alpha and beta chain usage per cell clusters demonstrated a strong bias for cell cluster 9 toward TRAV29 and TRBV20-1 (**Figure 3B**), suggesting that this cell cluster was associated to a T cell response. Further analysis of the alpha and beta chain usage did not reveal a specific bias toward a particular alpha and beta chain for any cell cluster. Similarly, analysis of CDR3 α and CDR3 β amino acid (aa) length, did not revealed a particular

bias toward a specific length for all cell clusters, except cell cluster 9 for which we observed a strong bias of the CDR3 α and CDR3 β aa length usage toward 19 and 11 aa, respectively (**Figure 3C**). While cell clusters 1, 2 and 8 may contain thymic derived Tregs. Cell cluster 9 can only contain Tregs-differentiated in periphery.

Characterization of CD8 T regulatory cell clusters highlights potential markers

To better comprehend the specific features of the cell clusters contained within the CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells and in particular for cell clusters with demonstrated potential interest as human CD8⁺ Treg subsets i.e. cell clusters 1/2, 8 and 9, we excluded the CD8⁺CD45RC^{high} T cells and projected the CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells by principal component analysis, visualized by UMAP (**Figure 4A and Suppl. Figure 4A**) and compared by volcano plot the transcriptomes (**Figure 4B-E**) of the cell clusters of interest vs the remaining cell clusters. The analysis allowed identification of 7 distinctive cell clusters on the UMAP (**Figure 4A**) and to facilitate the comprehension we attributed to the new cell clusters the same numbers and colors as described in **Figure 2A**. We then projected on a volcano plot the genes differentially expressed between cell cluster 1/2 and the remaining cell clusters (**Figure 4B**), cell cluster 8 and the remaining cell clusters (**Figure 4C**) and cell cluster 9 and the remaining cell clusters (**Figure 4D**). We found overall that each of these specific cell clusters (i.e. 1/2, 8 and 9) showed a specific gene signature possibly associated with Tregs using different mechanisms of suppression or different suppressive capacity, and suggesting that Tregs may be included in each of these cell clusters. Further analysis of gene differentially expressed for these cell clusters highlighted several interesting genes already associated with Tregs and tolerance for cell cluster 1/2 such as *ITGB1*, *TNFRSF1B*, *GPR56* and *CX3CR1*, *PERF* and *GZMB* suggesting they could suppress by cytotoxicity (**Figure 4B**). In cell cluster 8, we found the interesting expression of *FUT7*, a gene mediating synthesis of CD15s, a molecule expressed in eTregs and identifying the most suppressive Tregs²¹. Analysis of cell cluster 9 demonstrated the specific expression of *KIR2DL3* (**Figure 4D and Suppl. Figure 4B**), suggesting altogether with *IKZF2* expression, that this cell cluster was related to a SAR-CoV-2 specific memory response based on recent work published²² and that the cell cluster 9 could correspond to a CD8⁺ Treg subset involved to suppress pathogenic T cells in infectious diseases.

In an attempt to decipher if both cell cluster 1 and cell cluster 2 contain Treg cells, we analyzed their transcriptomic differences using a volcano plot (**Figure 4E**). This analysis revealed that most of the interesting Treg-related genes were contained within cell cluster 2, rather than in

cell cluster 1 for which we found *GZMK*, *IL7R*, *SELL*, *CD27* and *TCF7* to be differentially expressed.

Altogether this analysis confirms that several distinct CD8⁺ Treg subsets exhibiting different transcriptomic and TCR signatures might exist in human.

Isolation of CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells based on TNFR2⁺CD29^{low} expression results in higher suppressive function in functional assays

Finally, to assess the suppressive function of cells of cell cluster 2 which includes the most of potentially regulatory cells, we considered genes encoding for membrane proteins highlighted by the single cell transcriptomic analysis. We thus selected 2 markers *TNFRSF1B* (TNFR2) and *ITGB1* (CD29) (**Figure 5A**). At proteomic level, TNFR2 and CD29 surface markers allowed identification of four subsets in peripheral blood CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells (**Figure 5B**). Interestingly, we found significantly more CD29^{high}TNFR2⁻ cells and less CD29^{low}TNFR2⁻ cells in CD8⁺CD45RC^{low/-} T compared to CD8⁺CD45RC^{high} T cells (**Figure 5B**). Although FOXP3 was not specific of cell cluster 2 in the single cell RNA-seq dataset, we further analysed a potential correlation with the protein expression of FOXP3 as shown in the literature for CD4⁺ Tregs²³, and observed a positive correlation of FOXP3 with TNFR2 expression but not CD29 (**Figure 5C**). We thus hypothesised that TNFR2⁺CD29^{low} expression could identify a subset with increased suppressive properties. We thus sorted the four subsets on TNFR2^{-/+}CD29^{low/high} expression from peripheral blood of healthy subjects and tested their suppressive functions on allogenic CD4⁺ effector T cells stimulated with irradiated allogenic Antigen Presenting Cells (APC) (**Figure 5D**). Interestingly, we found that the TNFR2⁺CD8⁺CD45RC^{low/-} T cell subsets (both CD29^{high} or CD29^{low}) were significantly more suppressive than the total CD8⁺CD45RC^{low/-} T cell population (**Figure 5E**), suggesting a role for TNFR2. We observed a trend for even a stronger suppressive activity for the TNFR2⁺CD29^{low} Tregs compared to the other subsets.

We further investigated the role of TNFR2 in CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs mediated suppressive function. TNFR2 is one of the receptors of TNF- α with TNFR1²⁴. We thus assessed the impact of blocking TNFR2 signalling by neutralizing TNFR2 in coculture assays (**Figure 5F**). Accordingly, the addition of anti-TNFR2 blocking antibody partially annihilated the suppression induced by TNFR2⁺CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs. These results suggest that signalling through TNFR2 is important for TNFR2⁺ Tregs to suppress, but as shown previously⁵, since other mechanisms are involved we could not fully restore the proliferation of effector T cells.

DISCUSSION

In transplantation and inflammatory pathologies, one big and current challenge is to develop new strategies to control the inflammation with more specificity and less toxicity compared to immunosuppressive gold standard treatments. Recent clinical trials using CD4⁺ Tregs as cell therapy demonstrated good results²⁵. CD8⁺ Tregs present at least equivalent suppressive activity compared to their CD4 counterparts⁵. Notably in transplantation, CD8⁺ Tregs can take advantages of direct presentation by MHC-I graft cells over the time by contrast of CD4⁺ Tregs that can only benefit of the short live time of APC donor cells and transient activation of endothelial cells by MHC-II presentation. CD8⁺ Tregs (expanded CD3⁺CD56⁻CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs) will be for the first time used as cell therapy for solid organ transplantation in the Eight-Treg clinical trial within the Reshape consortium (<http://www.reshape.org>). Investigations are ongoing to improve CD8⁺ Tregs therapy efficacy, persistence and stability, through genetic modifications, associated treatments, and specific stimulation to further increase their therapeutic properties and expand their use¹³. This requires deep characterization and a better understanding that is now possible with the development of new bioinformatic tools.

To the best of our knowledge, here we reported the first single cell RNA-seq dataset of human CD8⁺ T cells focusing on CD8⁺ Tregs. The data presented here characterize the transcriptomic heterogeneity inside CD8⁺ T lymphocytes from peripheral blood with the confirmation of 2 distinct subsets of cells: CD8⁺CD45RC^{high} and CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells, highlighting CD45RC as a marker of pro-inflammatory vs pro-regulatory populations, as shown previously by us and by others^{3,4,26,27}. This delineation of pro-inflammatory vs pro-regulatory populations is critical for the generation of a new therapeutic strategy as we have done with anti-CD45RC monoclonal antibodies and that is under development for clinical trial (<https://www.aboleris-pharma.com>). Using the data generated here, pro-inflammatory or pro-regulatory specific targets could be identified for autoimmune diseases or cancer. A previous comparison between transcriptomes of CD8⁺CD45RC^{high} and CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells was already done by 3'DGE-seq in both human and rat^{5,26}, however this is the first time that their transcriptomic differences were highlighted with single cell RNA-seq data coupled to CITE-seq and TCR analysis. We were thus able not only to identify of new membrane markers, but also transcription factors. It has been clearly established that CD8⁺ T cells with regulatory properties are within the CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells fraction^{5,9,26}, which was overall to some extent homogenous. We excluded cells with more innate properties such as NKT cells excluded on CD56⁺CD16⁺ protein expression by CITEseq and MAIT cells on CD161⁺ cells and TCRVA1-

2⁺ TRAJ33⁺ expression, to further focus on the CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells pool, without losing any chance to detect CD56⁺ Tregs^{28,29} or CD161⁺ Tregs³⁰. We observed that MAIT cells represented a significant population in our single cell dataset and this is probably due to the age of our HV population (+/-27 years old)³¹. Thus, with this dataset, a new analysis could be conducted on these cell populations, but is out of the scope of this manuscript.

Interestingly, this bioinformatic work highlighted three particular cell clusters and in one of these cell clusters of CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells, we observed higher levels of several genes associated with Tregs such as *TNFR2*, *PDI*, *FASLG*, *IFNG*, and *FGL2* and lower levels of genes associated with T effector cells (*CD28*, *CD27* and *CD127*). We selected two genes encoding for membrane proteins with previous occurrence of association with Tregs, notably *TNFR2*^{23,32-34} and *CD29*³⁵ to further specifically isolate this cell cluster for functional studies. We highlighted four subsets based on the expression of these two markers within peripheral blood fresh CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells and demonstrated that the CD8⁺CD45RC^{low/-} *TNFR2*⁺*CD29*^{low} T cell subset corresponded to the most suppressive CD8⁺ Tregs. Of note, previous markers like *GITR* tested to isolate subsets within CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs required overnight polyclonal stimulation to achieve a similar 80% suppression at ratio Teff:Tregs 1:1⁵. In contrast, here we show that isolation on *TNFR2*⁺*CD29*^{low} expression could achieve 90% suppression at similar ratio at steady state (without pre-stimulation). This association of function with *TNFR2* expression is of great interest since several agonist strategies targeting *TNFR2* are under development and could lead to improve CD8⁺ Treg functional properties³⁶. We have shown that blocking *TNFR2* signaling partially annihilated suppression mediated by CD8⁺ Tregs and we previously showed that cytokines were also involved. We need to perform further experiments with a *TNFR2* agonist to understand the role of *TNFR2* for CD8⁺ Treg function, the downstream pathways activated by *TNFR2* ligation with *TNF* α and the role of *TNFR2* signaling in the production of immunoregulatory cytokines.

We observed that the CD8⁺CD45RC^{low/-}*TNFR2*⁺ subset is CD28⁻ correlating with work previously described by others³⁷. Our team demonstrated that expression of *IFN*- γ and *IL*-10 is important for CD8⁺CD45RC^{low/-} Treg mediated suppression. Although *IL*-10 is not detected in this dataset, gene encoding for *IFNG* correlated with the cell cluster of interest.

Although *FOXP3* mRNA expression was not detected in enough cells of this dataset to draw conclusions, we observed that CD8⁺CD45RC^{low/-}*TNFR2*⁺ cells expressed *FOXP3* in higher proportions compared to CD8⁺CD45RC^{low/-}*TNFR2*⁻ cells. *IKZF2* (*HELIOS*) was in contrast detected and correlated with two other cell clusters of interest. Interestingly, further transcriptomic analysis of these cell clusters demonstrated an interesting gene signature with

one of these two cell clusters resembling the TCR-biased CD8⁺KIR⁺ Treg cell subset described by the recent work of the Davis' group²² indicative of a CD8⁺ Treg subset involved to suppress pathogenic T cells in infectious diseases and in particular SAR-CoV-2 based on the TCR analysis.

Even if CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{low} cells represent a small population that could be difficult to isolate and amplify for cell therapy, they could serve as biomarker or biotarget and be expanded *in vivo* using agonists antibodies for autoimmune diseases or in the context of transplantation or using inhibitors to deplete or annihilate their function in cancer.

CD29 is widely expressed in human body such as epithelial cells, has been reported for a role for attachment of cells to matrix and signal transduction, but its role in T cell function is not clear. Thus, its relevance and role of Tregs should be further investigated.

Finally, additional membrane markers were identified such as *IL6R/IL6ST* (CD126/CD130) and should be investigated to better comprehend and define CD8⁺ Treg subsets that could have higher stability in inflamed environment. As for CD4⁺ Tregs for which studies on heterogeneity revealed distinct subsets with different functions playing a particular role in some pathologic situations³⁸, it is highly probable that there are many populations of CD8⁺ Tregs with specific properties and playing a role in different situations. Understanding this could lead to specific therapeutic approaches in specific human conditions.

To conclude, using bioinformatic methodology, we portrayed the heterogeneity of CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs and highlighted among thousand genes 2 genes encoding for membrane markers that are usable as biomarkers and promising targets for optimizing CD8⁺ Tregs cell therapy in transplantation and autoimmune diseases.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) of healthy volunteers

Blood samples from healthy volunteers were collected in EthyleneDiamineTetraAcetic acid (EDTA) coated tubes or from buffy coats at Etablissement Francais du Sang (EFS). PBMC were isolated with Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Eurobio, Courtaboeuf, France). Red blood cells and platelets were removed with hypotonic lysis solution and centrifugation.

Staining and cell sorting of cells

For CITE-seq, PBMC were diluted in Phosphate Buffered Saline (PBS) – FCS 2% -EDTA 0.5mM and labelled with surface antibody anti-CD3 (BD Biosciences, SK7 clone), anti-CD4 (BD Biosciences, RPA-T4 clone) and with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) labelling dead cells. For suppression assay, PBMC were labelled with anti-CD3 (BD Biosciences, SK7 clone), anti-CD4 (BD Biosciences, RPA-T4 clone) and anti-CD25 (BD Biosciences, M-A251clone) mAbs and DAPI. Lymphocytes were selected according to their morphology in FSC-A and SSC-A, doublets cells were excluded and DAPI⁺ cells were removed. DAPI⁻CD3⁺CD4⁻, DAPI⁻CD3⁺CD4⁻CD45RC^{low/-} T cells, and DAPI⁻CD3⁺CD4⁺CD25⁻ T cells were sorted with FACS ARIA II cell sorter (BD Biosciences). In some cases, four subsets in CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs were labelled and sorted according to the expression of TNFR2^{+/-} (Miltenyi Biotec, REA520) and CD29^{low/high} (Miltenyi Biotec, REA1060). Purity was greater than 95%.

Fluorescence was measured with CANTO II cytometer (BD Biosciences) cells were sorted with ARIA (BD Biosciences) Data were analyzed with FLOWJO software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

Single cell RNA-sequencing of blood CD8⁺ T cells

Freshly sorted CD8⁺ T lymphocytes of four healthy volunteers were labelled with anti-human Hashtag antibodies TotalSeq-C (Biolegend, San Diego, CA) and were pooled together. Cell viability was > 90 %. Then, cells were labelled with 30 CITE-seq antibodies including antibody against CD45RC (ABIS clone), CD120b (3G7A02 clone), HLADR (L243 clone), CD39 (A1 clone), CD357 (108-17 clone), CD279 (EH12.2H7 clone), CD152 (BNI3 clone), TIGIT (A15153G clone), CD223 (C9B7W clone), CD70 (113-16 clone), CD137 (4B4-1 clone), CD226 (11A8 clone), CD25 (BC96 clone), CD71 (CY1G4 clone), CD134 (Ber-ACT35 (ACT35) clone), CD11c (S-HCL-3 clone), CD16 (3G8 clone), CD56 (5.1H11 clone), CD28 (CD28.2 clone), CD45RA (HI100 clone), CD45RO (UCHL1 clone), CD103 (Ber-ACT8

clone), CD178 (NOK-1 clone), CD29 (TS2/16 clone), CD122 (TU27 clone), CD127 (A019D5 clone), CD126 (UV4 clone), CD130 (2E1B02 clone), CD21 (Bu32 clone) and CD197 (G043H7 clone). Immediately, 80 000 cells were loaded into the Chromium Next GEM Chip K in 4 different wells (10X genomics, San Francisco, CA) and run on the Chromium controller (10X genomics, San Francisco, CA). Then, libraries were prepared according to the Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent Kits v2 protocol (10X genomics, San Francisco, CA). Three libraries were then prepared: one for mRNA (RNA), one for hashtags antibodies (HTO) and one for CITE-seq antibodies (ADT) and sequenced with NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA).

Single cell RNA-sequencing data analysis

1/ primary analysis. FASTQ files, first generated from BaseCalling (BCL) files with Cell Ranger package (6.1.2), were demultiplexed and aligned to human reference genome (hg38). CITE-seq-Count function (1.3.4) was used to count antibody hashtag sequences.

2/ secondary analysis. Count matrixes were analyzed with Seurat R package (4.1.1). Cells with more than 10% of mitochondrial genes were excluded. Gene expression was log normalized and scaled. HTO expression was normalized and demultiplexed. Doublet cells and negative cells for HTO were removed. Downstream analysis was performed on 15718 single cells: 7535 fresh CD8⁺ T lymphocytes. On average 1454 genes were expressed per cell in fresh CD8⁺ T cells. A nonlinear dimensionality reduction Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) and a clustering were performed to visualize distinct cell clusters. Differentially expressed genes were calculated using “wilcox” method to characterize marker genes of each cell cluster implemented in the Seurat package’s “FindAllMarkers” or “FindMarkers” functions.

3/ TCR repertoire analysis. This dataset contained matched TCR for each single cell. For TCR analysis, scRepertoire package was used (1.7.2). The length of the amino acid sequence of the CDR3 regions of TRA and TRB chains was measured. TRAV and TRBV chains were analyzed in each cell cluster.

Suppressive assays

Suppressive assays were performed to measure suppressive functions of CD8⁺ Tregs cell subsets according to TNFR2 and CD29 expression. Sorted CD8⁺ Tregs subsets were plated in RPMI 1640 medium supplemented with glutaMAX, 1% NEAA, 1% sodium pyruvate, 1% Heps 1% Pénicilin/Streptomycin, 5% AB serum with autologous CD4⁺CD25⁻ effectors T cells

labelled with CFSE and irradiated allogenic Antigenic Presentating Cells (APC). After 5 days of co-culture at 37°C, 5% CO₂, CFSE was measured on CD3⁺CD4⁺DAPI⁻ T cells with BD facs CANTO (BD Biosciences).

Suppressive assays were also performed to measure the impact of blocking anti-TNFR2 monoclonal antibody (358408, Biolegend) or its isotype control (400544, Biolegend) on the proliferation of CD4⁺CD25⁻ effector T cells with or without the presence of CD8⁺CD45RC^{low/-} TNFR2⁺ Tregs or total CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs.

Statistics

Mann Withney test, non-parametric, p value two tailed was performed to compare CD8⁺ Tregs subsets suppressive functions at ratio Teffs:Tregs 1:1. Two-way row-matched ANOVA was performed to compare suppressive function of CD8⁺CD45RC^{low/-} TNFR2⁺ T cells with blocking antibody anti-TNFR2 or isotype control in a range of cell ratio.

Acknowledgments.

We thank Sonia Salle for blood sampling. This work was partially funded by the Labex IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01. This work was supported by an Etoiles Montantes from Pays de la Loire to C.G. This work was also realized in the context of the support provided by the Fondation Progreffe. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 825392 "RESHAPE".

References

1. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25). 15.
2. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liehhaber SA. Suppressor T cells. *J Immunol.* 1972;108(3):586–590.
3. Powrie F, Mason D. OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset. *J Exp Med.* 1990;172(6):1701–1708.
4. Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I, et al. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood.* 2004;104(10):3294–3301.
5. Bézie S, Meistermann D, Boucault L, et al. Ex Vivo Expanded Human Non-Cytotoxic CD8⁺CD45RClow/– Tregs Efficiently Delay Skin Graft Rejection and GVHD in Humanized Mice. *Front. Immunol.* 2018;8:2014.
6. Bézie S, Charreau B, Vimond N, et al. Human CD8⁺ Tregs expressing a MHC-specific CAR display enhanced suppression of human skin rejection and GVHD in NSG mice. *Blood Advances.* 2019;3(22):3522–3538.
7. Bézie S, Freuchet A, Sérazin C, et al. IL-34 Actions on FOXP3⁺ Tregs and CD14⁺ Monocytes Control Human Graft Rejection. *Front. Immunol.* 2020;11:1496.
8. Flippe L, Bézie S, Anegon I, Guillonneau C. Future prospects for CD8⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Immunological Reviews.* 2019;
9. Guillonneau C, Hill M, Hubert F-X, et al. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8⁺CD45RClow T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Clinical Investigation.* 2007;117(4):1096–1106.
10. Li XL, Ménoret S, Bezie S, et al. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J. Immunol.* 2010;185(2):823–833.
11. Picarda E, Bézie S, Venturi V, et al. MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J. Clin. Invest.* 2014;124:2497–512.
12. Picarda E, Bézie S, Usero L, et al. Cross-Reactive Donor-Specific CD8⁺ Tregs Efficiently Prevent Transplant Rejection. *Cell Reports.* 2019;29(13):4245-4255.e6.

13. Amini L, Greig J, Schmueck-Henneresse M, et al. Super-Treg: Toward a New Era of Adoptive Treg Therapy Enabled by Genetic Modifications. *Front Immunol.* 2020;11:611638.
14. Tilloy F, Treiner E, Park SH, et al. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med.* 1999;189(12):1907–1921.
15. Shi J, Zhou J, Zhang X, et al. Single-Cell Transcriptomic Profiling of MAIT Cells in Patients With COVID-19. *Front Immunol.* 2021;12:700152.
16. Martin E, Treiner E, Duban L, et al. Stepwise Development of MAIT Cells in Mouse and Human. *PLoS Biol.* 2009;7(3):e1000054.
17. Bézie S, Picarda E, Tesson L, et al. Fibrinogen-Like Protein 2/Fibroleukin Induces Long-Term Allograft Survival in a Rat Model through Regulatory B Cells. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0119686.
18. Xing S, Li F, Zeng Z, et al. Tcf1 and Lef1 transcription factors establish CD8⁺ T cell identity through intrinsic HDAC activity. *Nat Immunol.* 2016;17(6):695–703.
19. Kim H-J, Barnitz RA, Kreslavsky T, et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science.* 2015;350(6258):334–339.
20. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol.* 2009;10(6):595–602.
21. Miyara M, Chader D, Sage E, et al. Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3^{high} regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112(23):7225–7230.
22. Li J, Zaslavsky M, Su Y, et al. KIR⁺ CD8⁺ T cells suppress pathogenic T cells and are active in autoimmune diseases and COVID-19. *Science.* 2022;376(6590):eabi9591.
23. Zaragoza B, Chen X, Oppenheim JJ, et al. Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. *Nat Med.* 2016;22(1):16–17.
24. Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, et al. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell.* 1990;61(2):361–370.
25. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, et al. Regulatory cell therapy in kidney

transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *The Lancet*. 2020;395(10237):1627–1639.

26. Picarda E, Bézie S, Boucault L, et al. Transient antibody targeting of CD45RC induces transplant tolerance and potent antigen-specific regulatory T cells. *JCI Insight*. 2017;2(3):.

27. Besnard M, Sérazin C, Ossart J, et al. Anti-CD45RC antibody immunotherapy prevents and treats experimental autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. 2022;132(7):e156507.

28. Mitchell J, Kelly J, Kvedaraite E, et al. Foxp3+ Tregs from Langerhans cell histiocytosis lesions co-express CD56 and have a definitively regulatory capacity. *Clinical Immunology*. 2020;215:108418.

29. Hu D, Weiner HL, Ritz J. Identification of Cytolytic CD161–CD56+ Regulatory CD8 T Cells in Human Peripheral Blood. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59545.

30. Pesenacker AM, Bending D, Ursu S, et al. CD161 defines the subset of FoxP3+ T cells capable of producing proinflammatory cytokines. *Blood*. 2013;121(14):2647–2658.

31. Chen P, Deng W, Li D, et al. Circulating Mucosal-Associated Invariant T Cells in a Large Cohort of Healthy Chinese Individuals From Newborn to Elderly. *Front. Immunol*. 2019;10:260.

32. Horwitz DA, Pan S, Ou J-N, et al. Therapeutic polyclonal human CD8+ CD25+ Fox3+ TNFR2+ PD-L1+ regulatory cells induced ex-vivo. *Clin. Immunol*. 2013;149(3):450–463.

33. Ronin E, Pouchy C, Khosravi M, et al. Tissue-restricted control of established central nervous system autoimmunity by TNF receptor 2–expressing Treg cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021;118(13):e2014043118.

34. Lubrano di Ricco M, Ronin E, Collares D, et al. Tumor necrosis factor receptor family costimulation increases regulatory T-cell activation and function via NF- κ B. *Eur. J. Immunol*. 2020;50(7):972–985.

35. Fan X, Moltedo B, Mendoza A, et al. CD49b defines functionally mature Treg cells that survey skin and vascular tissues. *Journal of Experimental Medicine*. 2018;215(11):2796–2814.

36. Fischer R, Kontermann RE, Pfizenmaier K. Selective Targeting of TNF Receptors as a Novel Therapeutic Approach. *Front. Cell Dev. Biol*. 2020;8:401.

37. Frontiers | CD28⁻ and CD28^{low}CD8⁺ Regulatory T Cells: Of Mice and Men | Immunology.
38. Giganti G, Atif M, Mohseni Y, et al. Treg cell therapy: How cell heterogeneity can make the difference. *Eur. J. Immunol.* 2021;51(1):39–55.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Single cell RNA-seq coupled to CITE-seq mapping of CD8⁺ T cells.

(A) Schematic representation of 5' single cell RNA-sequencing workflow (created with Biorender). (B) Identification of CD8⁺ T cell subpopulations with the definition of twelve cell clusters on the Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) based on genes expression. Naive (N), central memory (CM), effector memory (EM) type 1 (EM1), type 2 (EM2), type 3 (EM3) and pE2 (TEMRA) CD8⁺ T cells have been identified. Each dot corresponds to a single cell. (C) Heatmap of selected genes for defining cell clusters identity. Columns correspond to single cells grouped by cell clusters and rows correspond to genes. Expression values were scaled per gene. Blue color represents lower expressed genes and red color represents higher expressed genes. (D) **Upper:** Feature plots showing gene expression of genes related to T cells subsets and MAIT cells. Gene expressions are scaled from grey to blue. **Lower:** Feature plots showing protein expressions of CITE-seq antibodies. Protein expression are scaled from grey to green. Each dot corresponds to a single cell. (E) Distribution of clonotype across cell clusters. In red are the clonotypes found in from 10 to 100% cells in the cell cluster, in light blue from 1% to 10% cells of the cell cluster and in dark blue from 0 to 1% cells of the cell cluster.

Figure 2: Identification and characterization of CD8⁺ regulatory cell clusters.

(A) Definition of 10 cell clusters in fresh CD8⁺ T cells after exclusion of MAIT cells on the Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) based on gene expression. Each dot corresponds to a single cell and each color to one cell cluster. (B) Heatmap of the top 20 differentially expressed genes (min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0.2) per cell cluster. Expression values were scaled per gene. Blue color represents genes with lower expression and red color represents genes with higher expression. The total number of genes characterized in each cell cluster is provided on the right, colors correspond to cell cluster. (C) Volcano plot highlighting significant differences (min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0.2) in gene expression between T CD8⁺CD45RC^{high} (cluster 5, 0 and 7) vs T CD8⁺CD45RC^{low/-} (clusters 3, 8, 4, 6, 1, 2, 9). Right part indicates higher expression in T CD8⁺CD45RC^{low/-}, left part indicates higher expression in T CD8⁺CD45RC^{high}. The thresholds have been set to p value adjusted <0.05 and fold change >1.5. Red dot corresponds to genes that have exceeded both thresholds and blue dot corresponds to genes with a significant p-value adjusted. Labels were added to *TNFRSF1B* and the top most differentially expressed genes. (D) Heatmap of differentially expressed genes (min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0.2) related to Tregs between cell clusters. Columns

correspond to cell clusters and rows correspond to genes. Expression values were averaged by cell cluster and scaled per gene. Blue color represents less expressed genes and red color represents more expressed genes. **(E)** Feature plots showing expression of genes. Gene expressions are scaled from grey to blue. **(F)** Heatmap of genes encoding for cytokines receptor that are differentially expressed between cell clusters (min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0.2). Columns correspond to cell clusters and rows correspond to genes. Expression values were averaged per cell cluster and scaled per gene. Blue color represents less expressed genes and red color represents more expressed genes. **(G)** Heatmap of genes encoding for cytokines that are differentially expressed between cell clusters (min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0.2). Columns correspond to cell clusters and rows correspond to genes. Expression values were averaged per cell cluster and scaled per gene. Blue color represents less expressed genes and red color represents more expressed genes. **(H)** Heatmap showing the differentially expressed genes between cell clusters encoding for transcription factors min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0.2). Columns correspond to cell clusters and rows correspond to genes. Expression values were averaged per cell cluster and scaled per gene. Blue color represents less expressed genes and red color represents more expressed genes. **(I)** Feature plots highlighting gene expression of transcription factors on CD8⁺ T cells without MAIT. Gene expressions are scaled from grey to blue. Each dot corresponds to a single cell.

Figure 3: Single cell alpha and beta chain TCR profiling of CD8⁺ T cells clusters

(A) Chord plots showing TCR clonotypes sharing between cell clusters for each healthy volunteer (HV). Numbers from 0 to 9 and colors indicate the cell cluster defined in Figure 2A. Number of clonotypes among total cell clusters are indicated. **(B)** Visualizations of the relative usage of variable domain of **(Left)** TRA or **(Right)** TRB chains in each cell cluster. **(C)** Length distribution of the CDR3 sequences in amino acids per cell cluster (aa). Upper part: for TRA chains. Lower part: for TRB chains.

Figure 4: Identification of markers specific of CD8 T regulatory cells clusters

(A) Definition of 7 cell clusters in fresh non MAIT CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells on the Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) based on gene expression. Each dot corresponds to a single cell. Cell cluster numbers and colors are conserved from Figure 2A. **(B-E)** Volcano plot showing differentially expressed genes between cell cluster 1 and 2 vs all other cell clusters **(B)**, between cell cluster 8 vs all other cell clusters **(C)**, between cell cluster 9 vs all other cell clusters **(D)**, between cell cluster 1 vs cell cluster 2 **(E)**. The thresholds have been

set to p value adjusted <0.05 and fold change >1.5 . Red dot corresponds to genes that have exceeded both threshold, and blue dot correspond to genes that have a significant p-value adjusted but not fold change. *TNFRSF1B* and *ITGB1* genes and the top most differentially expressed genes were labelled.

Figure 5: Isolation of CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells on TNFR2⁺CD29^{low} expression resulted in higher suppressive function in functional assays

(A) Gene and protein expression of *TNFRSF1B*/CD120b and *ITGB1*/CD29 on UMAP projection of non MAIT CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells. Gene expressions are scaled from grey to blue for genes or from grey to green for proteins. Each dot corresponds to a single cell. (B) **Left panel:** Gating strategy to identify CD45RC^{low/-} and ^{high} cells among CD8⁺ T cells and subsets within CD8⁺CD45RC^{low/-} or ^{high} T cells according to TNFR2 and CD29 expression by flow cytometry. **Right panel:** Frequency of the four subsets identified by TNFR2 and CD29 expression in CD8⁺CD45RC^{low/-} and ^{high} T cells. Statistical differences between groups were calculated using Mann-Whitney two-tailed test. *p value >0.05 . (C) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of TNFR2 and CD29 expression in CD8⁺CD45RC^{low/-} FOXP3⁺ or FOXP3⁻ T cell subsets normalized to isotype control. (D) Suppressive assay workflow. (E) Bar blot representing the percentage of proliferation of responder T cells in presence of subset of CD8⁺ Tregs at ratio Teffs:Tregs 1:1 normalized to the percentage of proliferation in absence of Tregs, n=6 individual experiments. Statistical differences between groups were calculated using Mann-Whitney two-tailed test. *p value > 0.05 . (F) Data of suppressive function of CD8⁺CD45RC^{low/-} or CD8⁺ CD45RC^{low/-} TNFR2⁺ T cells in presence of 10 μ g/mL blocking anti-TNFR2 antibody or isotype control were presented. The percentage of proliferation of T effs cells in presence of subset of CD8⁺ T cells normalized to the proliferation of Teffs in absence of Tregs in a range of Teffs:Tregs ratios is shown. Statistical differences between groups were calculated using Anova test. *p value > 0.05 .

Supplementary Figure 1: Isolation of CD8⁺ T cells

(A) Cell sorting strategy of CD8⁺ T cells. CD8⁺ T cells were defined by gating on lymphocytes morphology, FSC and SSC singlets, living cells, CD3⁺CD4⁻. (B) Feature plots showing gene expression of *CD8A*, *CD8B* and *CD4*. Gene expressions are scaled from grey to blue. Each dot corresponds to a single cell. (C) Feature plots showing protein expression of CD16 and CD56. Gene expressions are scaled from grey to green. Each dot corresponds to a single cell.

Supplementary Figure 2: Single cell dataset

(A) Table of the number of single cells per healthy volunteer (HV). (B) Violin plot representing the number of genes detected in each single cell, the number of RNA molecules sequenced in each single cell and the percentage of mitochondrial genes in each single cell for the all 4 HV. (C) UMAP showing the affiliation of the cells to each of the healthy volunteers. (D) Clustree: each level of the tree corresponds to a resolution of clustering starting from 0 to 1. Each node corresponds to a cell cluster. The legend of the graph displays 4 scales: (1) count: the arrow color shows the number of cells that change from a cell cluster to another, (2) in prop: the level of transparency of arrows shows the proportion of cells from one group that end up in another group. (3) size: the node size is proportional to the number of cells, (4) the resolution. (E) TCR sequences of TRAV1-2 and TRAJ33. Cells expressing these chains of the TCR are in red, cells in light grey expressing other chains and for cells in dark grey no TCR chain were detected.

Supplementary Figure 3: Additional specific genes expression within the single cell dataset

(A) **Left:** definition of the 10 cell clusters of non MAIT CD8⁺ T cells on the Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) based on gene expression. Each dot corresponds to a single cell. Each color corresponds to a cell cluster. **Right:** heatmap of selected genes for defining clusters identity. Columns correspond to cell clusters and rows correspond to genes. Expression values were scaled per gene. Blue color represents low expressed genes and red color represents highly expressed genes. (B) UMAP showing the affiliation of the non MAIT CD8⁺ T cells to each of the healthy volunteers. (C) Feature plot showing gene expression of *FOXP3* in non MAIT CD8⁺ T cells. Gene expression is scaled from grey to blue. Each dot corresponds to a single cell. (D) Heatmap of genes encoding for membrane, transcription factor or cytokines associated with Tregs. Columns correspond to cell clusters and rows correspond to genes. Expression values were scaled per gene. Blue color represents less expressed genes and red color represents more expressed genes. (E) Heatmap of genes encoding for genes related to exhaustion, activation or senescence. Columns correspond to cell clusters and rows correspond to genes. Expression values were scaled per gene. Blue color represents less expressed genes and red color represents more expressed genes. (F) Chord plot showing TCR clonotypes sharing between cell clusters including the 4 healthy donors. Each color corresponds to a cell cluster. Numbers from 0 to 9 and colors indicate the cell cluster defined in Fig 2A.

Supplementary figure 4: Distribution among HV and KIR expression

(A) UMAP showing the affiliation of the non MAIT CD8⁺CD45RC^{low/-} T cells to each of the healthy volunteers. **(B)** Feature plot showing gene expression of *KIR2DL3* in non MAIT CD8⁺T cells. Gene expression is scaled from grey to blue. Each dot corresponds to a single cell.

Figure 1. Sérazin et al.

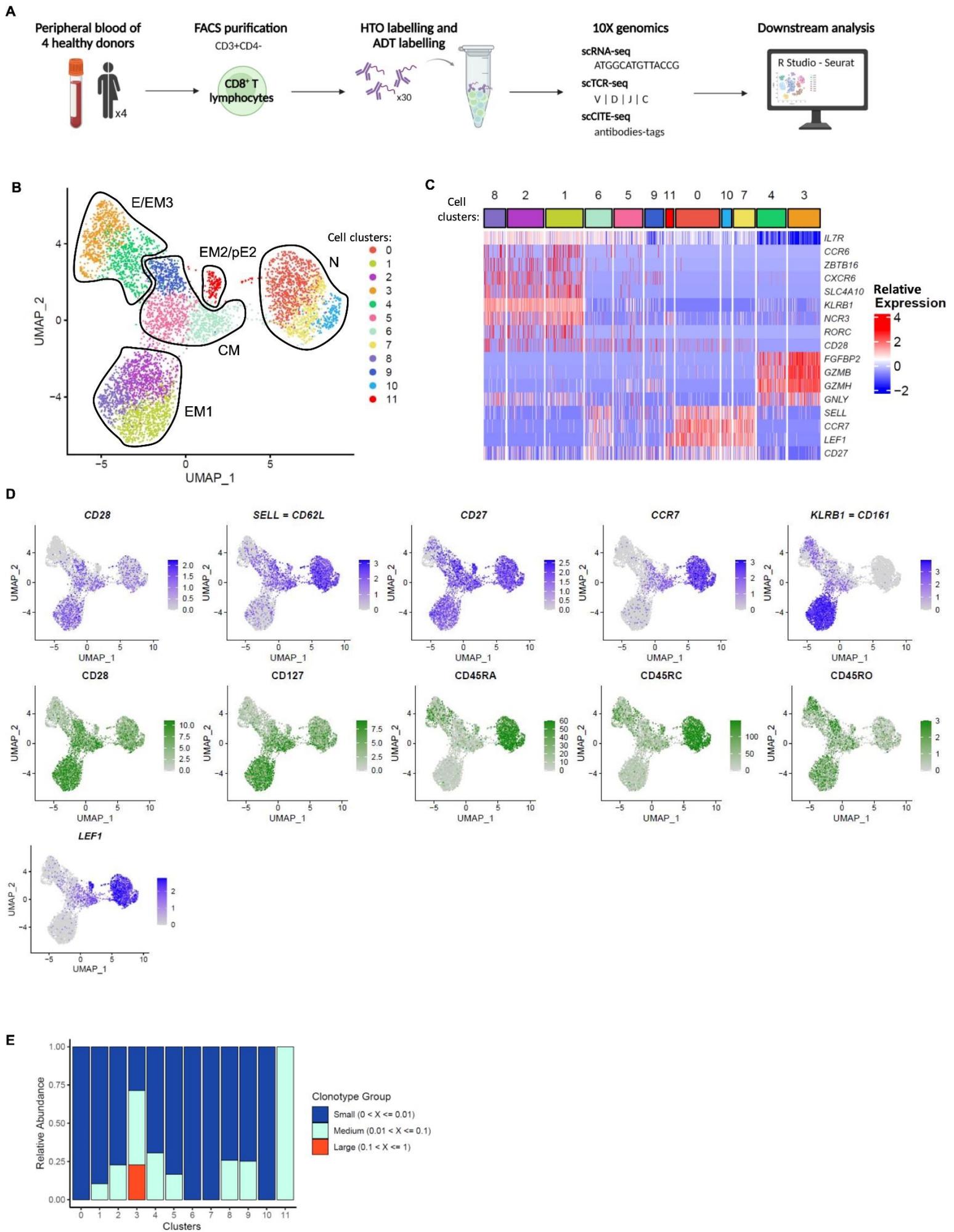


Figure 2. Sérazin et al.

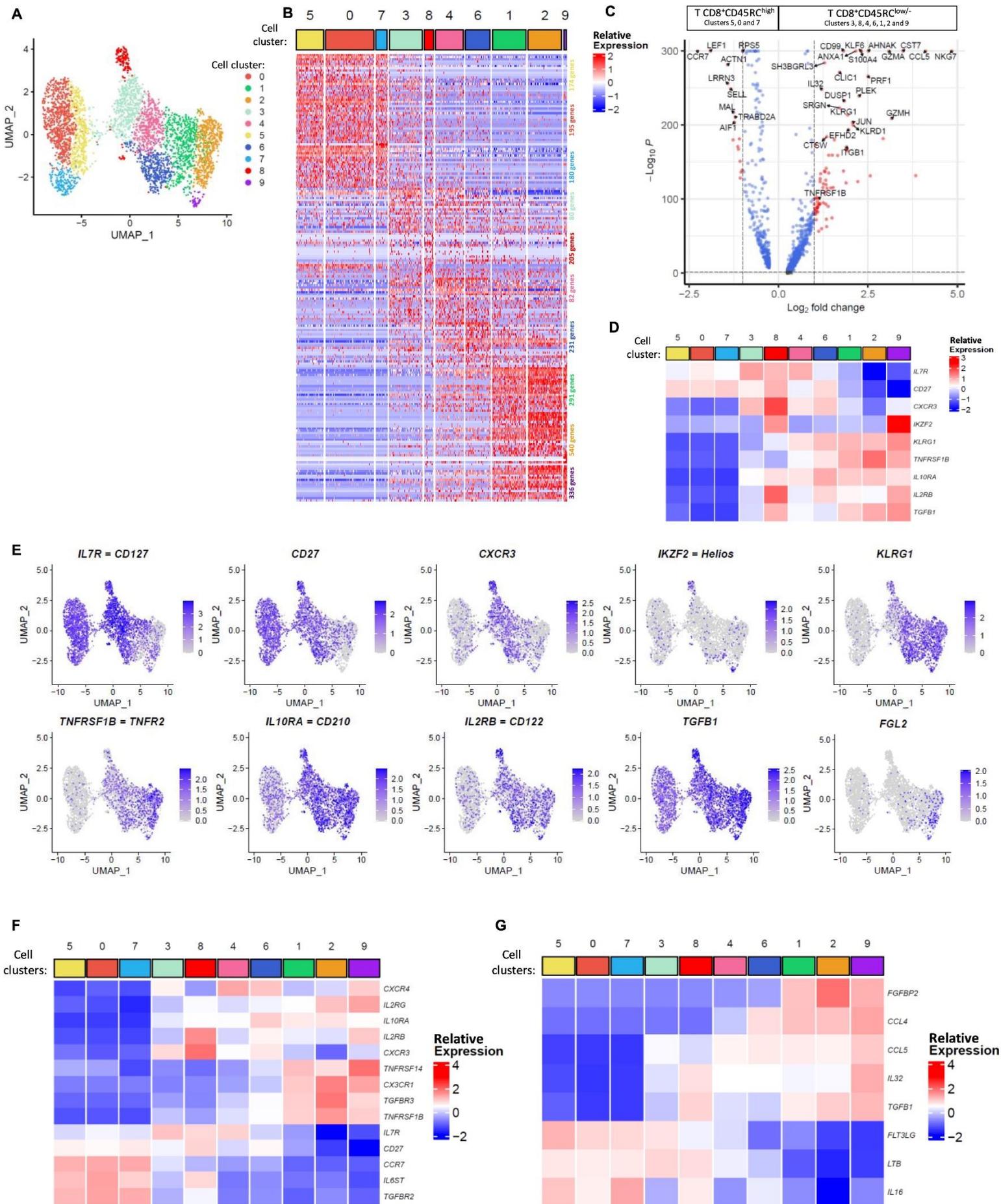


Figure 3. Sérazin et al.

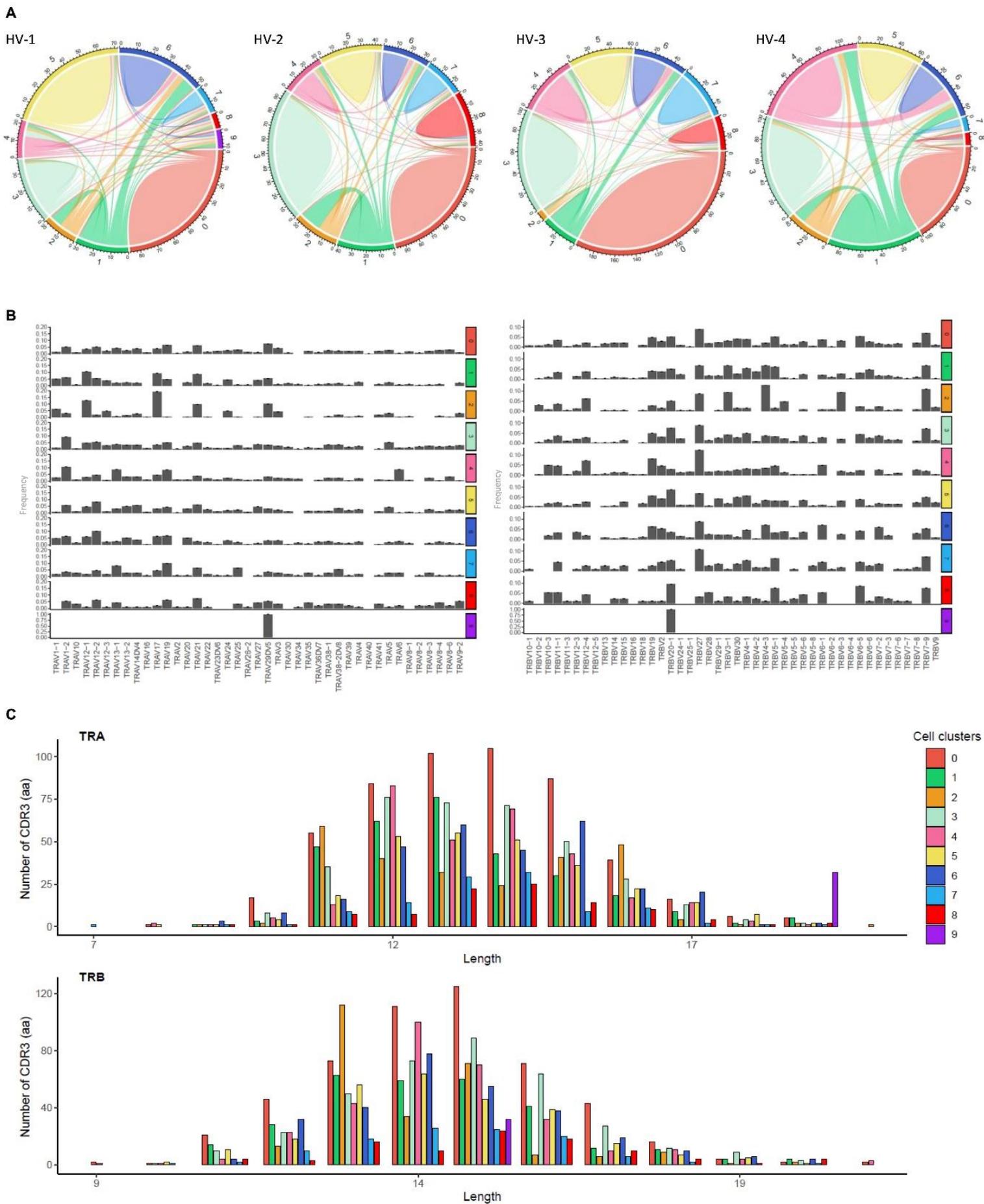


Figure 4. Sérazin et al.

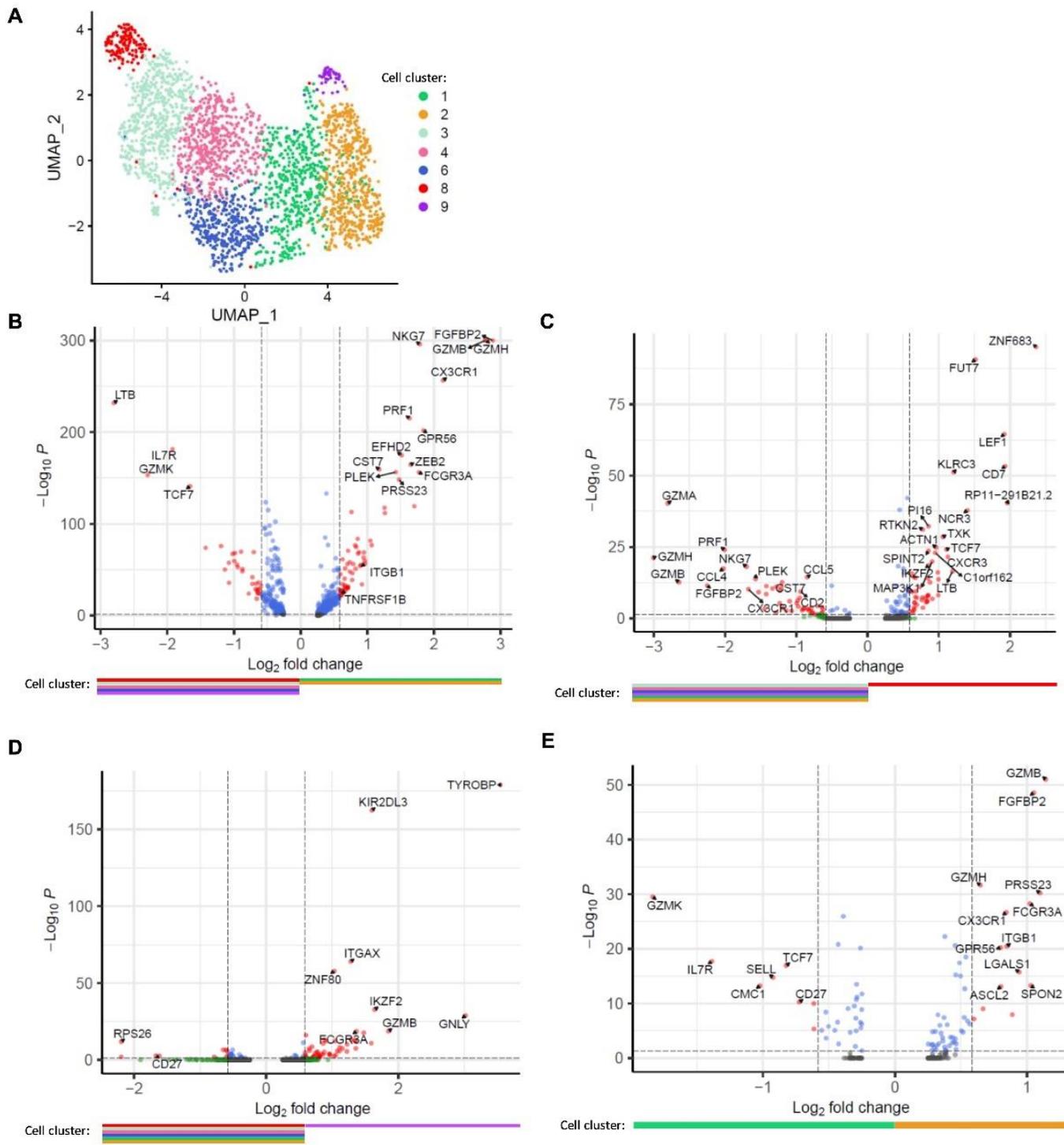
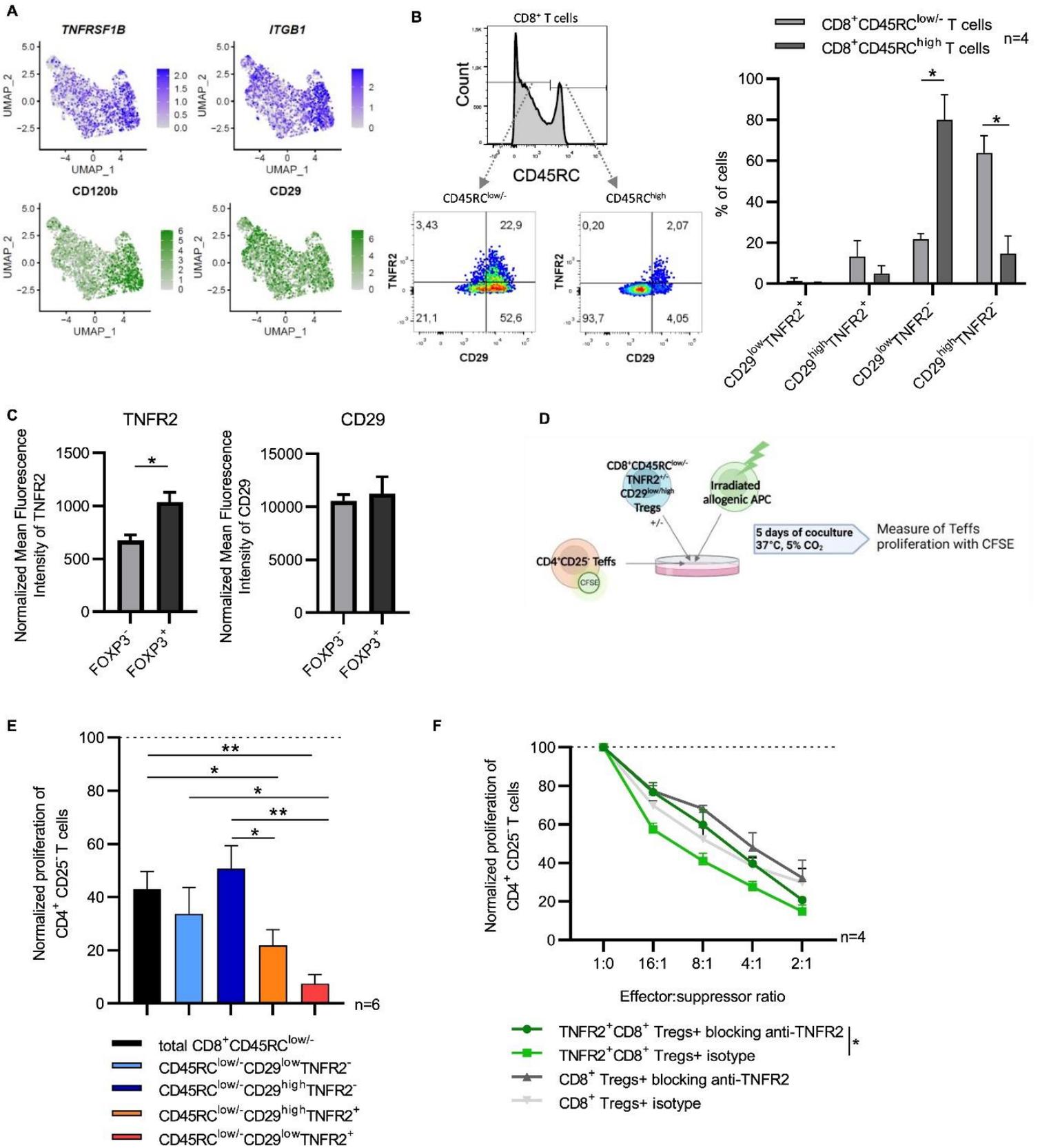
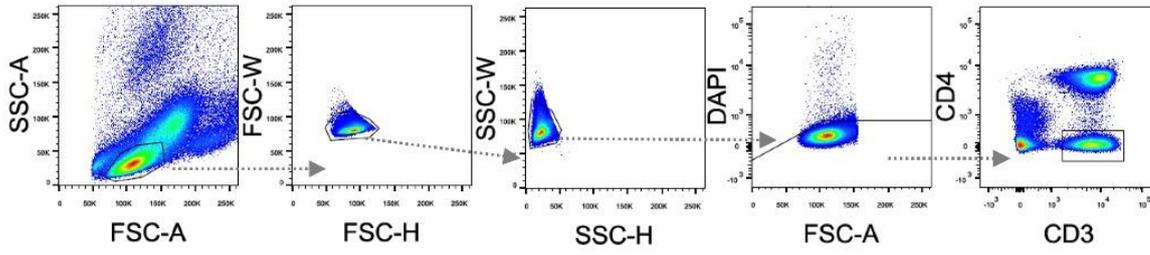


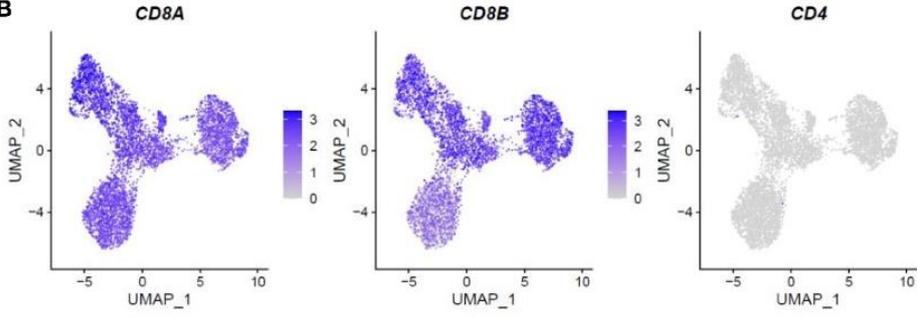
Figure 5. Sérazin et al.



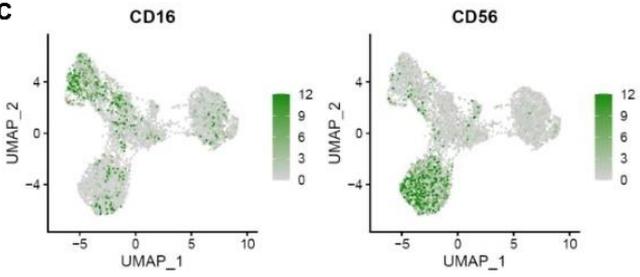
A



B



C

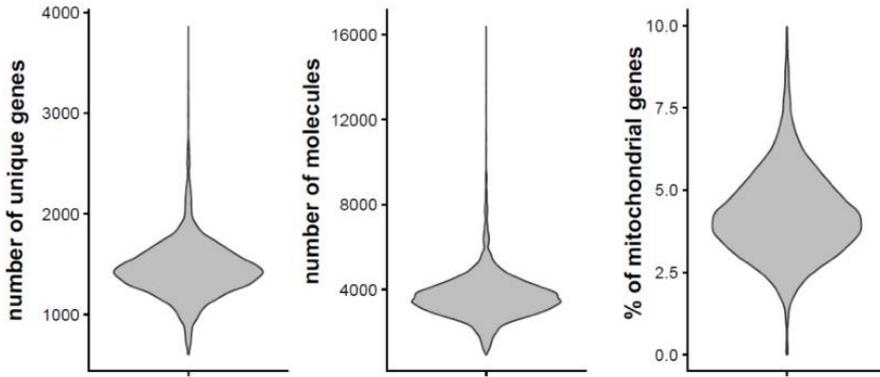


Supplementary Figure 2. Sérazin et al.

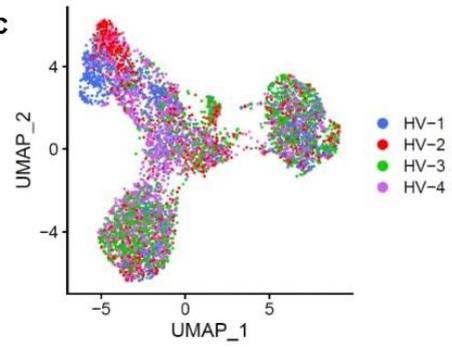
A

HV-1	HV-2	HV-3	HV-4	Total single cell
1908	1465	2000	2144	7517

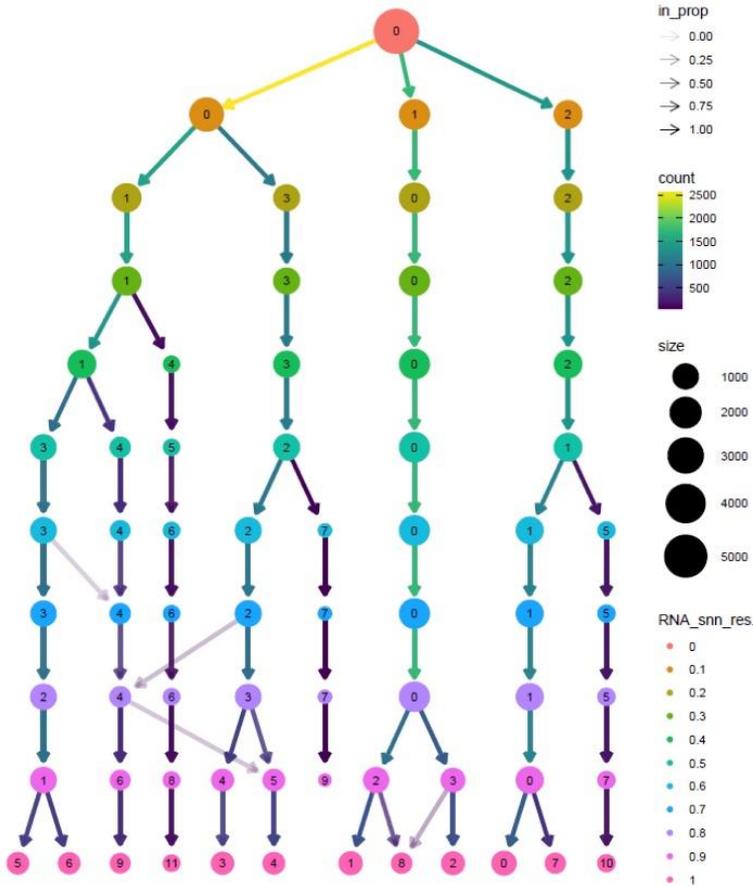
B



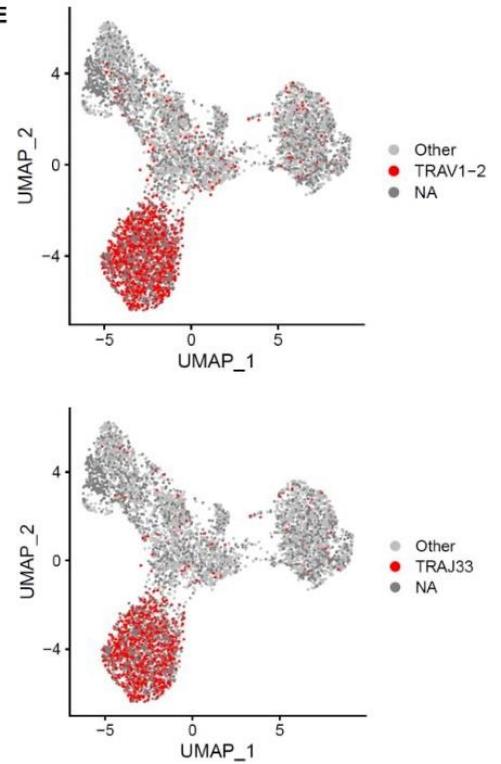
C



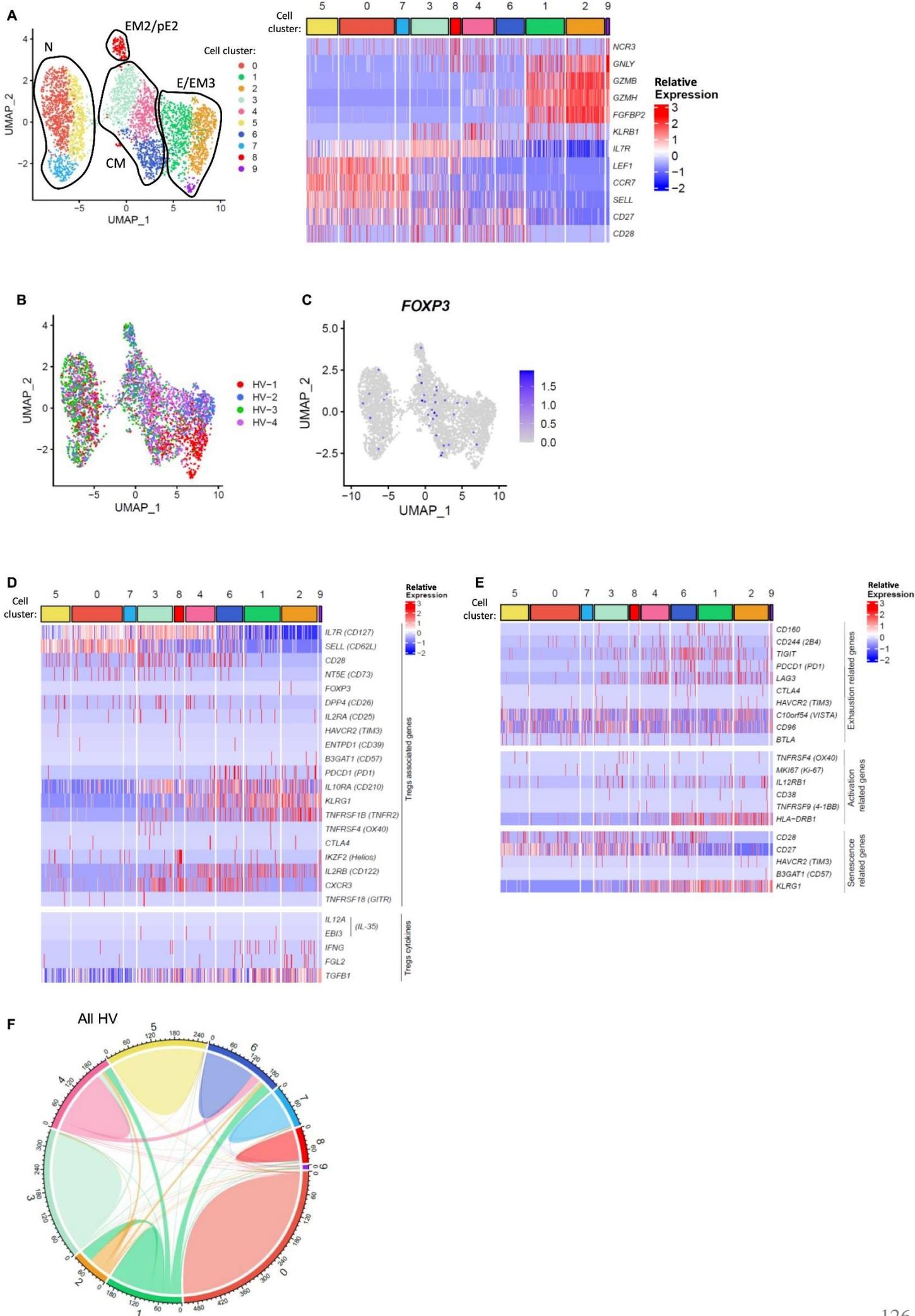
D

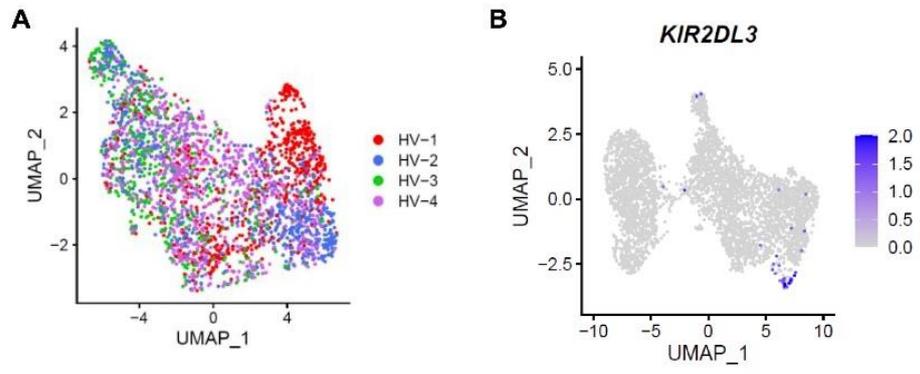


E



Supplementary Figure 3. Sérazin et al.





C. Résultats complémentaires :

En parallèle de l'article principal présenté précédemment, j'ai souhaité également fournir des résultats complémentaires, répartis en 5 parties différentes. Tout d'abord, je présente des résultats générés lors de l'analyse du 1^{er} jeu de scRNA-seq. J'aborde ensuite la faible activité suppressive des cellules MAITs ; puis je présente des résultats du CD-screen. J'expose des marqueurs spécifiques des cellules T CD8⁺CD45RC^{high}, et finalement, une dernière partie compare les T CD8⁺CD45RC^{low/-} avant et après amplification.

a. Résultats du 1^{er} jeu de scRNA-seq :

J'ai passé le début de ma thèse à analyser ces données. Bien qu'elles ne soient pas publiées, car le 2^{ème} scRNA-seq est plus pertinent, il me semblait important de mentionner ces résultats. En effet, ces analyses m'ont permis de me former à l'analyse single cell, ce qui m'a permis d'être plus rapide pour l'analyse du 2nd jeu. De plus, cela m'a permis de mettre en évidence les cellules MAITs au sein des T CD8⁺CD45RC^{low/-} et d'identifier pour la première fois CD29 et TNFR2 comme marqueurs de Tregs CD8⁺, j'ai donc pu mettre en place les tests suppressifs dès cette 1^{ère} analyse. Finalement, ces résultats sont concordants et confortent les données du 2^{ème} scRNA-seq.

Ce jeu de données est bien moins complet que le second. En effet, moins de gènes sont détectés (3 fois moins) et seulement 3 individus sont intégrés. De plus, il s'agit d'une version antérieure de 10X genomics, ainsi, les TCR ne sont pas séquencés et il n'y a pas d'anticorps de CITE-seq à la surface des cellules. Une des différences majeures avec l'autre jeu de données de scRNA-seq concerne les cellules séquencées. Dans celui-ci, seules les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} totales de l'état basal sont incluses.

Au cours de cette première analyse, j'ai d'abord étudié l'hétérogénéité présente au sein des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} totales. J'ai identifié 5 clusters distincts de cellules basés sur l'expression des gènes différentiellement exprimés. (Figure 26A). L'expression des gènes associés aux cellules MAITs/NKT, des gènes associés aux lymphocytes T ainsi qu'aux marqueurs d'activation ont été utilisés pour identifier les clusters (Figure 26B). Les cellules du cluster 2 montrent une spécificité pour un profil de MAIT/NKT avec l'expression de *KLRB1* (CD161), *CXCR6*, *CCR6* et *IL1R1*. Le plus petit cluster, le 5, est défini par peu de gènes spécifiques et montre un profil transcriptomique proche des cellules du cluster 2. Pour définir les autres clusters, j'ai étudié l'expression des gènes correspondant à des états de différenciation

des cellules T ainsi qu'à des marqueurs d'activation. Les cellules du cluster 3 expriment un plus fort niveau de *CD28*, *CCR7* et *SELL* (CD62L) par rapport aux autres clusters, et n'ont pas d'expression de marqueurs d'activation. Ces cellules du cluster 3 semblent correspondre aux lymphocytes T CD8⁺ naïfs. Les cellules du cluster 4 expriment un plus fort niveau de *CD27* et *CD28* mais un plus faible niveau de *CCR7* par rapport au cluster 3, pouvant correspondre aux cellules centrales mémoires. Les cellules du cluster 1, expriment plus de gènes liés à l'activation comme *CD95*, *CD38*, *HLA-DRB1* et moins de *CD27*, *CD28* et *CCR7*, suggérant que ces cellules correspondent à des cellules activées avec un phénotype mémoire.

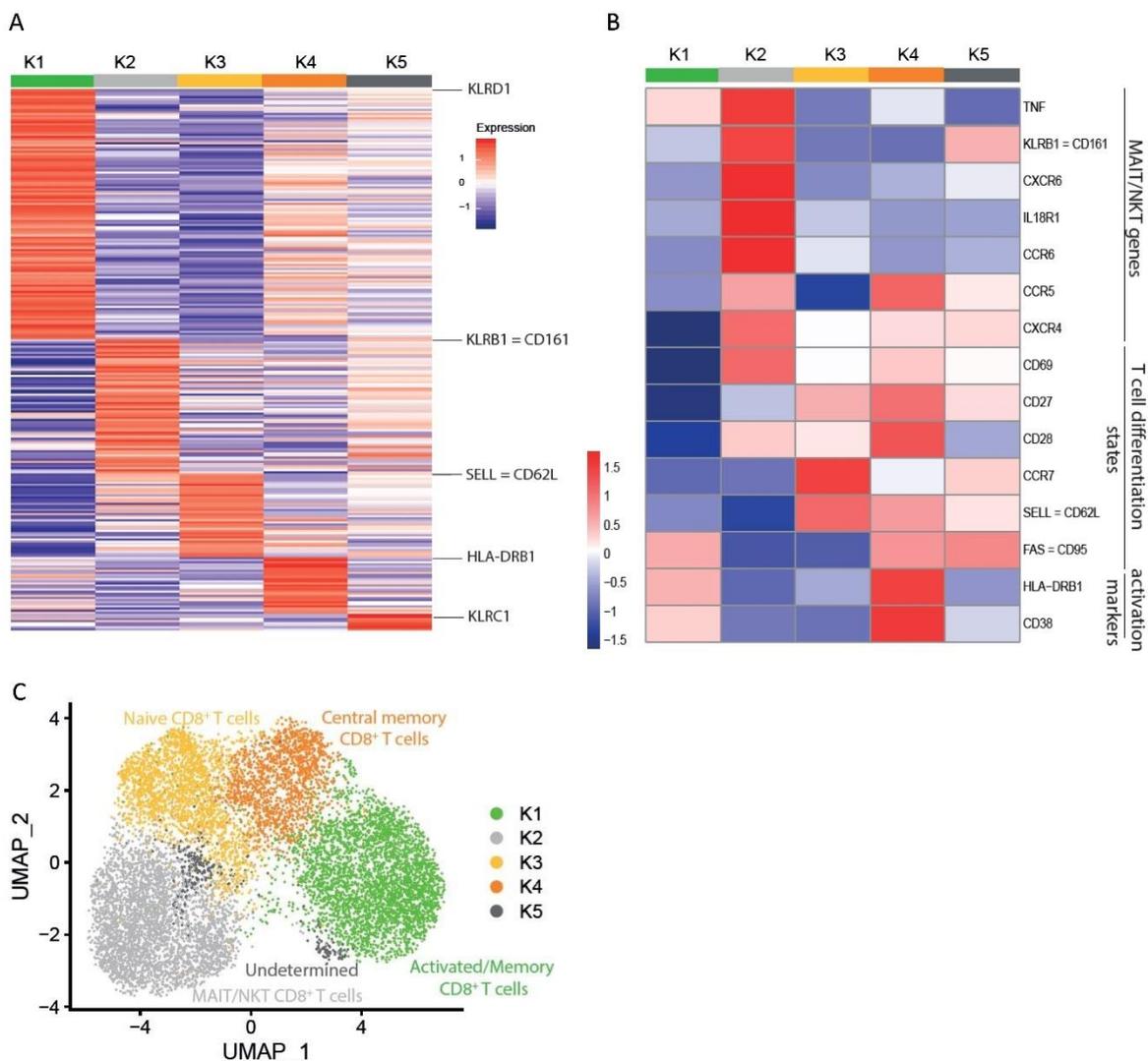


Figure 26 : L'hétérogénéité transcriptomique dans les cellules T CD8⁺ CD45RC^{low/-} fraîchement isolées du sang peut être réduite en excluant la sous-population MAIT/NKT

(A) Heatmap présentant les gènes différentiellement exprimés entre les 5 clusters identifiés par un clustering non supervisé sur les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}. L'expression est moyennée par cluster de cellules et relativisée par gène (B) Heatmap montrant l'expression des gènes associés aux cellules MAIT/NKT et aux stades de différenciation et d'activation des lymphocytes T CD8⁺. L'expression est moyennée par cluster de cellules et relativisée par gène (C) Identification des 5 clusters dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-} sur la projection de type UMAP.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent clairement qu'il existe une hétérogénéité au niveau transcriptomique au sein des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} à l'état basal, qui comprennent 5 grands clusters avec des statuts distincts de maturation et de fonction (Figure 26C). Les cellules T CD8⁺ identifiées dans les clusters 2 et 5 ont été exclues de l'analyse transcriptomique en aval et devraient être exclues en utilisant le marqueur CD161 pour des études fonctionnelles.

La visualisation montre un continuum avec les cellules du cluster 4 à l'interface entre les cellules des clusters 1 et 3 (Figure 27A). Pour affiner les cellules ayant les propriétés régulatrices les plus élevées parmi ces 3 clusters, j'ai étudié l'expression de gènes connus pour être associées aux propriétés régulatrices des Tregs CD4⁺ ou CD8⁺. Tout d'abord, le TGF-β codé par le gène *TGFBI*, qui s'est avéré être directement responsable de la suppression médiée par les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}, est exprimé par la plupart des cellules de chaque cluster, attestant du potentiel de régulation de toutes les cellules restantes mais ne montrant aucune discrimination concernant l'identification des cellules les plus suppressives (Figure 27B). En revanche, les gènes *CD28* et *IL7R* (=CD127) associés aux cellules T conventionnelles, sont principalement exprimés par les cellules des clusters 3 et 4 (Figure 27C-D). De plus, les gènes *IFNG* et *PDCDI* (=PD1) associés à la fonction des Tregs, sont plus exprimés par les cellules des clusters 1 et 4 que celles du cluster 3, et les gènes *FGL2* et *TNFRSF1B* (TNFR2) sont plus exprimés par les cellules du cluster 1. Dans l'ensemble, parmi l'hétérogénéité restante des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} (non MAIT), les cellules du cluster 1, qui sont principalement des cellules CD28⁻, IL7R⁻, IFNG⁺, PDCDI⁺, FGL2⁺ et TNFRSF1B⁺, pourraient correspondre aux Tregs CD8⁺ les plus puissantes par rapport aux cellules des 2 autres clusters.

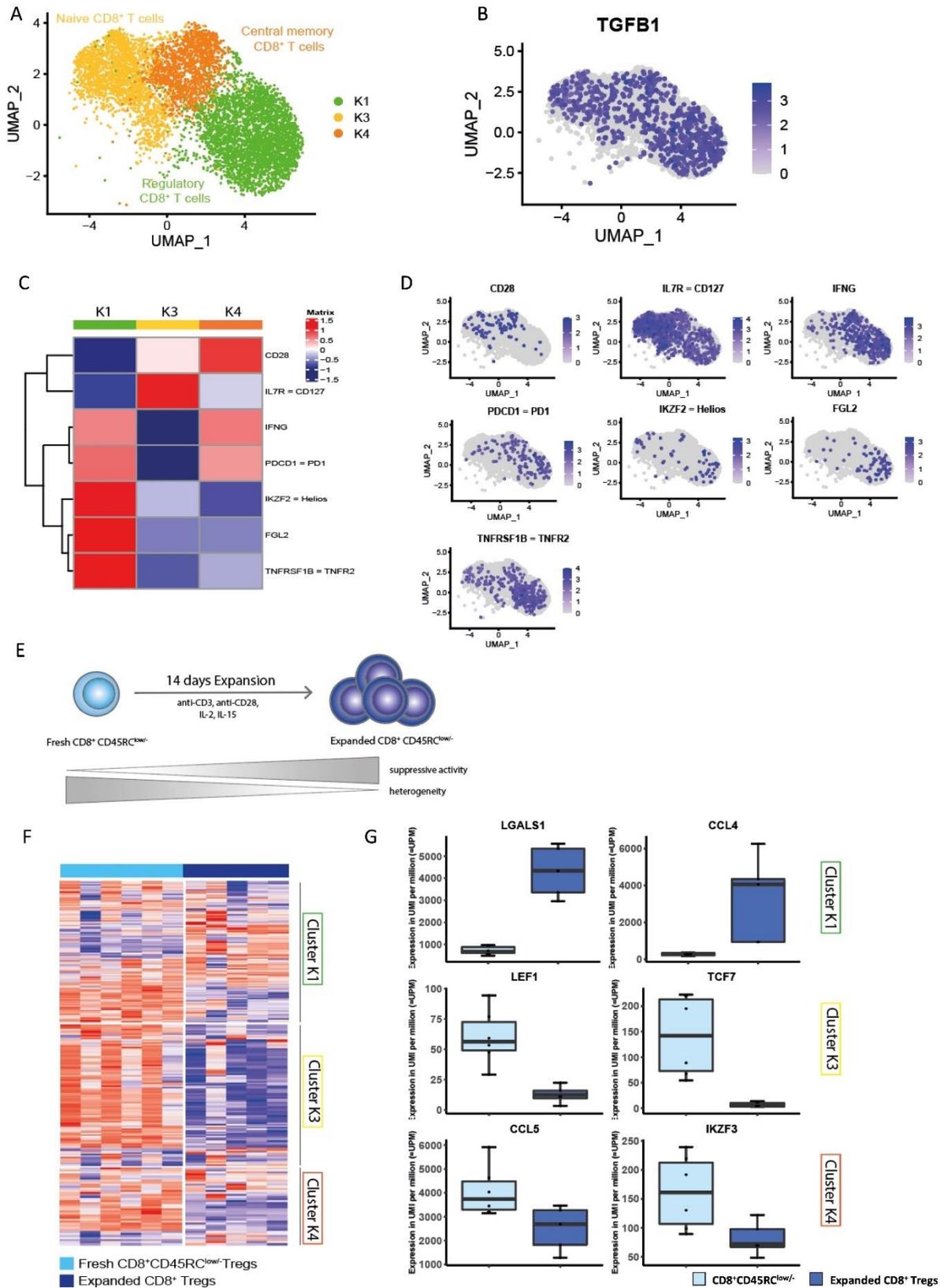


Figure 27 : L'identité des Tregs les plus puissants au sein des T CD8⁺ CD45RC^{low} CD161⁻ a été affinée et correspond au profil des cellules du cluster 1.

(A) Umap des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} après exclusion des cellules MAIT/NKT. (B) Expression relative du gène *TGFB1* dans les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} non MAIT. (C) Heatmap présentant l'expression des gènes décrits dans la littérature comme étant associés aux Tregs dans les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} non MAIT. L'expression est moyennée par cluster de cellule et relativisée par gène (D) Expression des gènes de la figure C projetée sur la UMAP. (E) Synthèse graphique du protocole d'amplification des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} selon une échelle du gris (expression faible) au bleu (expression plus forte). (F) Heatmap montrant l'expression des gènes les plus différenciellement exprimés associés aux clusters 1, 3 et 4 dans les données de 3'DGE-seq des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} avant et après amplification. L'expression est moyennée par individu et relativisé par gène. (G) Graphes montrant l'expression absolue de 2 des gènes plus exprimés dans les clusters 1, 3 et 4 dans les données de 3'DGE-seq des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} avant et après amplification.

Étant donné que les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} acquièrent une fonction suppressive plus forte avec l'amplification (Figure 27E et (Bézie et al., 2018b)), nous avons réalisé un 3'DGE-RNA-seq sur les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} avant et après amplification et j'ai cherché quelles cellules de l'état basal ont un profil le plus semblable aux Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés. L'analyse supervisée par l'expression génique spécifique des clusters 1, 3 et 4 dans les populations de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} avant et après amplification, a montré une diminution de divers gènes associés aux clusters 3 et 4 avec l'amplification (Figure 27F). Notamment, *LEF1* et *TCF7* qui sont associés aux cellules du cluster 3 et sont moins exprimés dans les cellules amplifiées que dans les cellules de l'état basal (Figure 27G). De même, l'expression de la plupart des gènes associés au cluster 4, comme *CCL5* et *IKZF3*, a diminué lors de l'amplification. En revanche, on observe une évolution hétérogène des gènes caractéristiques des cellules du cluster 1, avec certains gènes plus exprimés avec l'amplification tels que *LGALS1* et *GNLY*. En conclusion, les cellules du cluster 1, qui ont un profil d'expression génique plus proche des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés, que les cellules des clusters 3 et 4, pourraient être les Tregs CD8⁺ les plus puissantes.

Pour évaluer la fonction suppressive des cellules du cluster 1, j'ai étudié les gènes codants pour des protéines membranaires afin d'isoler ces cellules. J'ai sélectionné les dix gènes codant pour des protéines membranaires les plus exprimés par les cellules du cluster 1 par rapport aux autres clusters : *ITGAM* (CD11b), *FCGR3A* (CD16a), *FASLG* (CD178/CD95L), *IGF2R* (CD222), *ITGB1* (CD29), *ITGB2* (CD18), *KLRD1* (CD94), *LAIR2* (CD306), *TNFRSF1B* (TNFR2) et *ITGAL* (CD11a) (Figure 28A-B). Parmi eux, j'en ai retenu 2 : *TNFRSF1B* et *ITGB1*. Pour *TNFRSF1B*, son expression augmente avec l'amplification des Tregs. De plus, son expression est plus élevée dans les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} par rapport aux cellules T CD8⁺CD45RC^{high}, ce qui conforte son intérêt (Figure 28C). En revanche, pour

ITGB1, son expression est plus importante dans les cellules du cluster 1, mais ce gène reste largement exprimé par toutes les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}. De plus son expression génique corrèle négativement avec la capacité suppressive des cellules amplifiées (Figure 28C), suggérant plutôt que ce marqueur puisse être un marqueur d'exclusion.

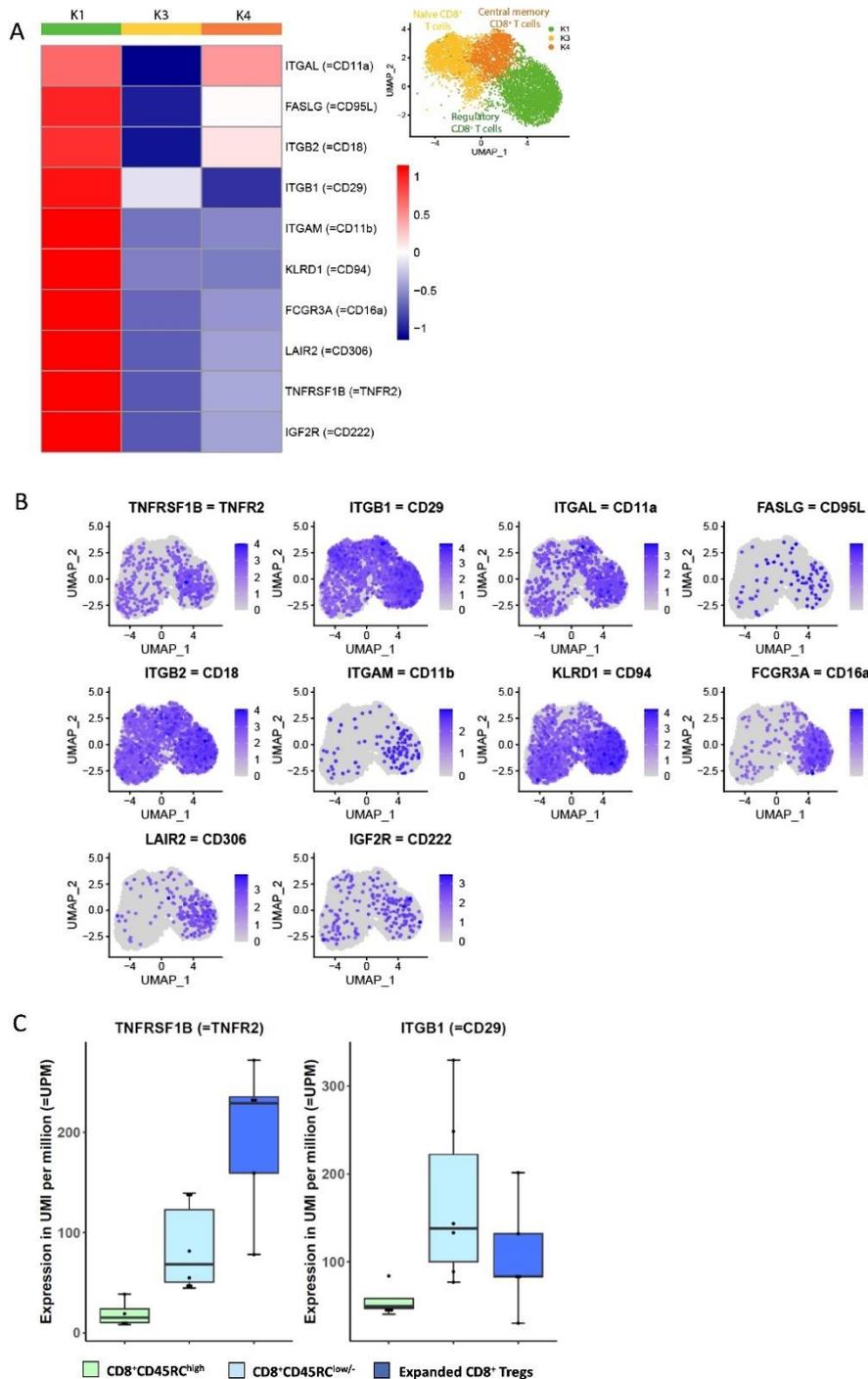


Figure 28 : L'analyse transcriptomique a mis en évidence l'expression des marqueurs membranaires TNFR2⁺ CD29⁻ comme étant une stratégie prometteuse pour isoler le sous-ensemble cellulaire le plus suppressif.

(A) Heatmap des 10 gènes sélectionnés, associés au cluster 1 et codant pour des protéines membranaires. L'expression est moyennée par cluster de cellules et relativisée par gène. (B) Expression de ces gènes (A) projetée sur la UMAP du gris (faible expression) au bleu (forte expression). (C) Expression absolue des gènes *TNFRSF1B* et *ITGB1* dans les données de 3'DGE-seq dans les populations cellulaires T CD8⁺CD45RC^{high}, T CD8⁺CD45RC^{low/-} à l'état basal et après amplification.

Pour conclure sur ces résultats du 1^{er} jeu de données de scRNA-seq, nous retrouvons, globalement, les mêmes résultats que dans le 2^{ème} jeu de single cell RNA-seq. On retrouve un cluster de cellules MAITs ainsi que des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} naïves, centrales mémoires et activées. Les cellules MAITs et les cellules du cluster 1 exprimant *TNFRSF1B* (TNFR2) sont à l'opposé dans la projection UMAP, ce qui est semblable au 2^{ème} scRNA-seq, suggérant qu'elles soient transcriptomiquement éloignées. Les gènes *TNFRSF1B* et *ITGB1* ont été associés aux cellules du cluster 1, suggérant que ce cluster de cellules correspond aux cellules des cluster 1 et 2 du 2^{ème} jeu de scRNA-seq.

Cependant, dans ce jeu de données, je n'ai pas été en mesure d'identifier des cellules distinctes exprimant les gènes *IKZF2* (Helios) ni *KIRD2DL3*. Il est possible que la qualité du jeu de données soit responsable de cette non-identification.

b. Faible activité suppressive des cellules MAITs :

Les cellules MAIT, principalement caractérisées par l'expression des protéines CD56 ou CD161 en plus du CD3, ont été identifiées dans nos 2 jeux de données de scRNA-seq. J'ai regardé la co-expression des protéines CCR6 (associée aux cellules MAITs) et CD161 dans les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} et T CD8⁺CD45RC^{high} par cytométrie en flux (Figure 29A). On observe qu'il n'y a pas de cellules MAITs dans la fraction de cellules T CD8⁺CD45RC^{high}. En revanche, dans la fraction de cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}, on retrouve un groupe de cellules exprimant la protéine CCR6 ainsi que fortement la protéine CD161 (CD161^{high}). En revanche, on note que le reste des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}, n'exprime pas, ou faiblement la protéine CD161. Dans notre équipe, nous avons testé l'activité suppressive de ces sous-populations, c'est-à-dire, des T CD8⁺CD45RC^{high}, T CD8⁺CD45RC^{low/-} totaux, T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{high}, T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{low} et des T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161⁻ (Figure 29B). Les T CD8⁺CD45RC^{high} et T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{high} ont le même niveau d'activité suppressive, alors que les T CD8⁺CD45RC^{low/-} totaux, les T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{low} et T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161⁻ ont une activité suppressive similaire, qui est plus importante que les T CD8⁺CD45RC^{high} et T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{high}.

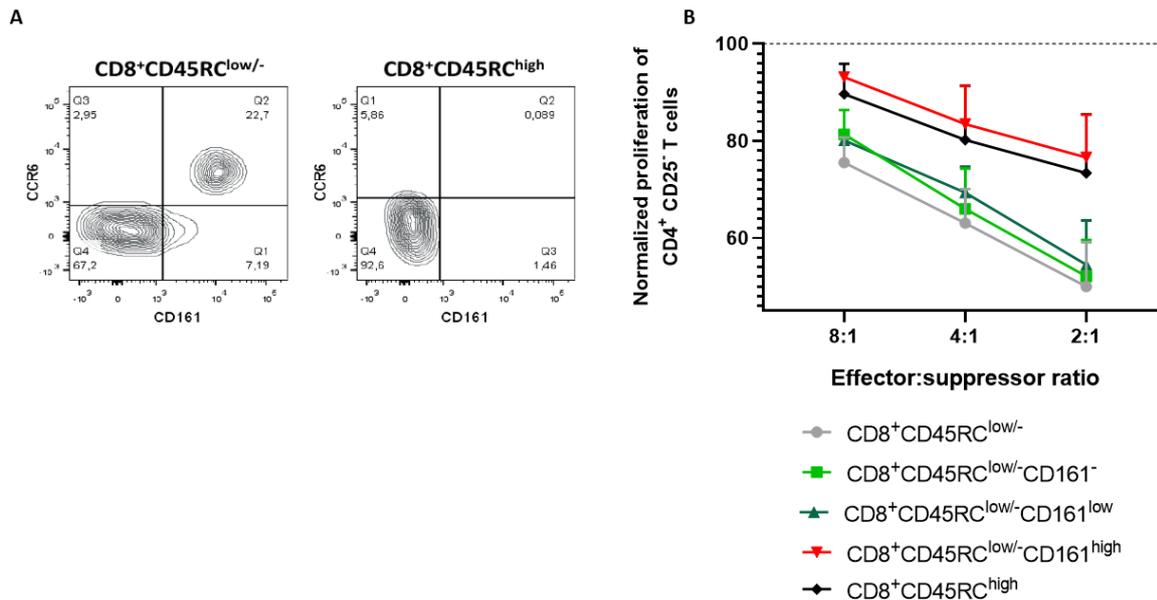


Figure 29 : Activité suppressive des cellules MAIT

(A) Expression protéique de CCR6 et CD161 dans les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} et T CD8⁺CD45RC^{high} par cytométrie en flux. Graphe de densité représentatif de 4 individus. (B) Tests suppressifs des sous-types de lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} selon l'expression de la protéine CD161 ainsi que des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high}. La prolifération en présence de Tregs a été normalisée à la prolifération en absence de Tregs. N=4-5.

Pour conclure sur ces résultats, j'ai identifié les cellules MAITs au sein des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} comme étant CCR6⁺CD161^{high}. Ces cellules ne sont pas présentes dans les T CD8⁺CD45RC^{high}. Les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{low/-} CCR6⁻ ont une activité suppressive. Nous avons également montré que ces cellules MAITs (CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{high}) ont peu d'activité suppressive (activité similaire aux T CD8⁺CD45RC^{high}). En plus de ce moindre effet suppressif, les cellules MAITs étant décrites comme étant des cellules cytotoxiques, elles sont désormais exclues en partie de l'amplification des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} en même temps que les cellules NKT par l'exclusion des cellules CD56⁺ à l'état basal.

c. Résultats du CD-screen

Le CD-screen, criblage des protéines CD, a été réalisé dans le but de caractériser le phénotype des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} et également de sélectionner des marqueurs membranaires intéressants à étudier dans le 2^{ème} jeu de scRNA-seq, avec l'ajout d'anticorps de CITE-seq. 361 marqueurs membranaires ont été analysés dans les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD56⁻, T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD56⁺, T CD8⁺CD45RC^{high}, T CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, T

CD4⁺CD25⁻CD127⁺, ainsi que les T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD56⁻ amplifiés pendant 21 jours. Dans cette thèse, j'ai décidé de ne focaliser mon étude que sur les cellules T CD8⁺CD45RC^{high}, T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD56⁻ (nommés T CD8⁺CD45RC^{low/-} dans les figures suivantes) et les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}CD56⁻ amplifiés. Pour caractériser le phénotype de ces cellules, j'ai réalisé une heatmap montrant le pourcentage d'expression de chaque marqueur dans ces 3 populations cellulaires (Figure 30).

J'ai ensuite sélectionné les marqueurs intéressants permettant de distinguer une hétérogénéité au sein des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} et T CD8⁺CD45RC^{high} de l'état basal. On retrouve notamment comme potentiels marqueurs d'exclusion des Tregs CD8⁺, les marqueurs CD126, CD130, CD21, CD221, CD35, TMEM8A et CD73 (Figure 31), qui sont exprimés plus fortement dans les cellules T CD8⁺CD45RC^{high} que dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-} et très peu dans les Tregs CD8⁺ amplifiés.

Je me suis ensuite intéressée aux variations d'expression des protéines avant et après amplification des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}. Je ne présente ici que les marqueurs dont l'expression augmente avec l'amplification. J'ai d'abord sélectionné les marqueurs exprimés par 5% à 90% des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD56⁻. J'ai comparé cette liste de marqueurs avec ceux des marqueurs exprimés par plus de 90% des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}CD56⁻ amplifiés. Finalement, 27 marqueurs correspondent à cette comparaison et leurs expressions sont présentées dans la figure 32. Ces 27 marqueurs présentent un fort potentiel de marqueurs des Tregs CD8⁺. Une étude plus poussée de ces marqueurs avec tri des sous-populations et tests suppressifs, n'a à ce jour, pas été réalisée, mais permettrait de distinguer les marqueurs liés à l'activation des vrais potentiels marqueurs de Tregs.

Pour conclure sur les résultats apportés par le CD-screen, ici, seule une partie de ces résultats est présentée. Pour l'identification de marqueurs des Tregs CD8⁺ à l'état basal, j'ai choisi de sélectionner des marqueurs exprimés par les Tregs CD8⁺ amplifiés, mais j'aurais pu refaire une analyse sans prendre en compte ce paramètre. Dans cette analyse, les cellules de seulement 4 individus ont été analysées à l'état basal et 2 individus pour les Tregs CD8⁺ amplifiés. De plus, les cellules analysées ont préalablement été congelées, ce qui pourrait affecter le niveau d'expression protéique vis-à-vis de cellules non congelées. Finalement, l'analyse de ces données, grâce aux analyses bio-informatiques, a nécessité de placer les fenêtres selon les isotypes contrôles. Cependant nous n'avons pas un visuel sur l'expression protéique comme nous avons l'habitude de le voir. Ces résultats sont donc à confirmer.

d. Marqueurs spécifiques des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} :

Dans l'article principal je n'ai pas orienté les recherches sur les différences entre les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} (n'incluant pas les MAITs) et les cellules T CD8⁺CD45RC^{high} (Figure 33A). Cependant, ces analyses sont intéressantes notamment pour identifier d'autres marqueurs ayant le même profil que la protéine CD45RC (Figure 33B). En effet, les marqueurs associés aux cellules T CD8⁺CD45RC^{high}, corrélant négativement avec l'activité suppressive des Tregs CD8⁺ sont également pertinents à étudier. L'identification de tels marqueurs permettrait de cibler les lymphocytes T conventionnels avec un anticorps déplétant, comme c'est le cas avec l'anticorps anti-CD45RC (Besnard et al. 2022; Picarda et al. 2017).

Parmi tous les gènes différentiellement exprimés entre les cellules T CD8⁺CD45RC^{high} et T CD8⁺CD45RC^{low/-} (Figure 2C de l'article principal), j'ai sélectionné ceux qui permettent de clairement isoler les cellules T CD8⁺CD45RC^{high} des T CD8⁺CD45RC^{low/-} (Figure 33C). Parmi ces gènes, j'ai notamment identifié les gènes *IL6R* et *IL6ST*, dont leurs expressions sont présentées en figure 33D, et démontrent une expression différentielle pour les cellules T CD8⁺CD45RC^{high}, bien qu'on retrouve des cellules exprimant ces gènes dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-}. Ces 2 gènes codent respectivement pour les protéines CD126 et CD130. Au niveau protéique, nous retrouvons des cellules CD126⁺ (environ 20%) dans les T CD8⁺CD45RC^{high}, mais nous retrouvons également une sous-population de cellules CD126⁺ dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-}. Le CD126 constitue la sous-unité alpha du récepteur à l'interleukine-6 (IL-6). Le CD130 lui, est une molécule partagée par de nombreux récepteurs de cytokines dont notamment l'IL-6, l'IL-11 ou encore l'IL-27. Cette sous-unité jouant un rôle crucial dans la transduction du signal. Ces deux molécules vont s'assembler pour former le récepteur à l'IL-6, considérée comme une cytokine pro-inflammatoire. Cependant, elle peut également jouer un rôle régulateur sur les cellules immunitaires (Jablonska 2002). La fixation de l'IL-6 à son complexe va provoquer la dimérisation de la sous-unité CD130, déclenchant l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'activation et la régulation immunitaire (Bailin Liang et al. 2006). L'objectif a été de tester si le marqueur CD126 peut être considéré comme un marqueur d'exclusion pour l'isolation des Tregs CD8⁺. Des tests suppressifs ont été réalisés en présence de cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD126⁺ ou des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD126⁻ (Figure 33E), et ont montré que les cellules CD126⁺ ont une activité suppressive moindre par rapport aux cellules CD126⁻ dans la fraction de T CD8⁺CD45RC^{low/-}.

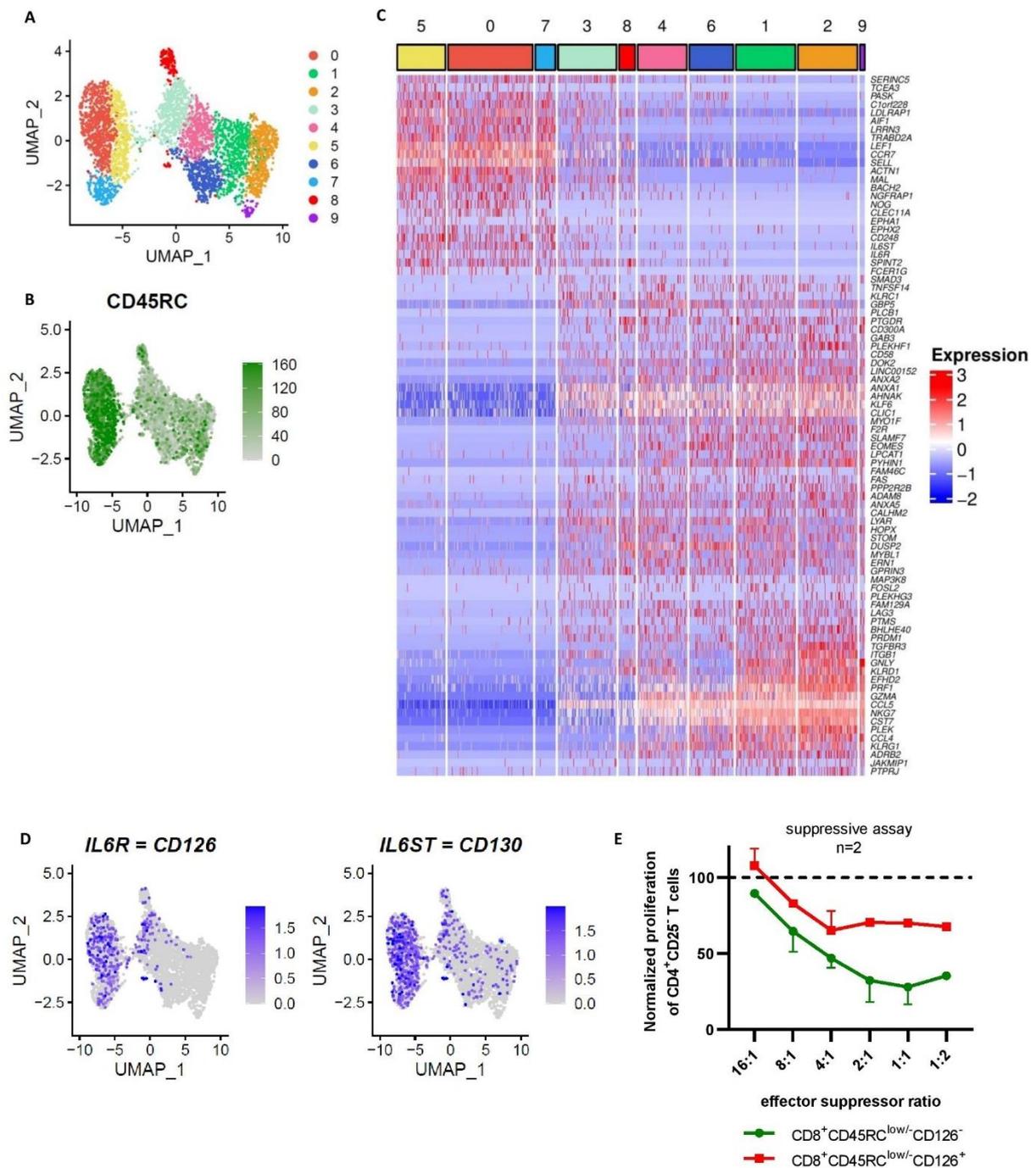


Figure 33 : Analyse de CD126 et CD130 comme potentiel marqueurs d'exclusion des Tregs CD8⁺

(A) Projection des cellules T CD8⁺ totales (sans les MAIT) sur la UMAP. Les couleurs correspondent aux clusters. Chaque point est une cellule. (B) Expression protéique de CD45RC, selon une échelle de couleur du gros (plus faible expression) au vert (plus forte expression). Chaque point est une cellule. (C) Heatmap montrant parmi les gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} et T CD8⁺CD45RC^{low/-} (sans les MAIT), ceux étant exprimés dans une des sous-populations cellulaire mais pas l'autre. L'expression par cellule est relativisée par gène du bleu au rouge. (D) Expression des gènes *IL6R* et *IL6ST* codant respectivement pour les protéines CD126 et CD130 dans les lymphocytes T CD8⁺ totaux (sans les MAIT), selon une échelle de couleur du gris (plus faible expression) au bleu (plus forte expression). (E) Tests suppressifs des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD126⁺ (en rouge) et des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD126⁻ (en vert). Le taux de prolifération en présence de suppresseurs a été normalisée à la prolifération en absence de suppresseurs. n=2.

e. Compréhension de l'amplification des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} :

L'article principal de ma thèse porte sur les Tregs CD8⁺ présents à l'état basal dans le sang périphérique. J'ai cependant également étudié les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés. L'amplification de ces cellules décrite en figure 22, permet la génération de Tregs CD8⁺ qui vont être utilisés pour le premier essai clinique de Tregs CD8⁺ chez l'Homme.

Pour cette amplification, sont requises les cytokines IL-2 et IL-15, de la rapamycine, ainsi qu'une stimulation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Afin d'étudier quelles cellules parmi les T CD8⁺CD45RC^{low/-} sont réceptives à ces conditions de culture, j'ai analysé l'expression des gènes codants pour les récepteurs de ces molécules : le CD3, le CD28, les récepteurs de l'IL-2 et IL-15 (*CD25*, *CD122* et *CD132*), ainsi que mTOR le récepteur de la rapamycine (Figure 34). Pour les gènes *CD3E* (CD3), *IL2RA* (CD25), *IL2RB* (CD122), *IL2RG* (CD132) et *MTOR* (récepteur de la rapamycine), ils sont retrouvés exprimés dans l'ensemble des clusters des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} identifiés dans le 2^{ème} scRNA-seq. Seul le gène *CD28* est exprimé différemment au sein des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} et identifie 2 groupes distincts.

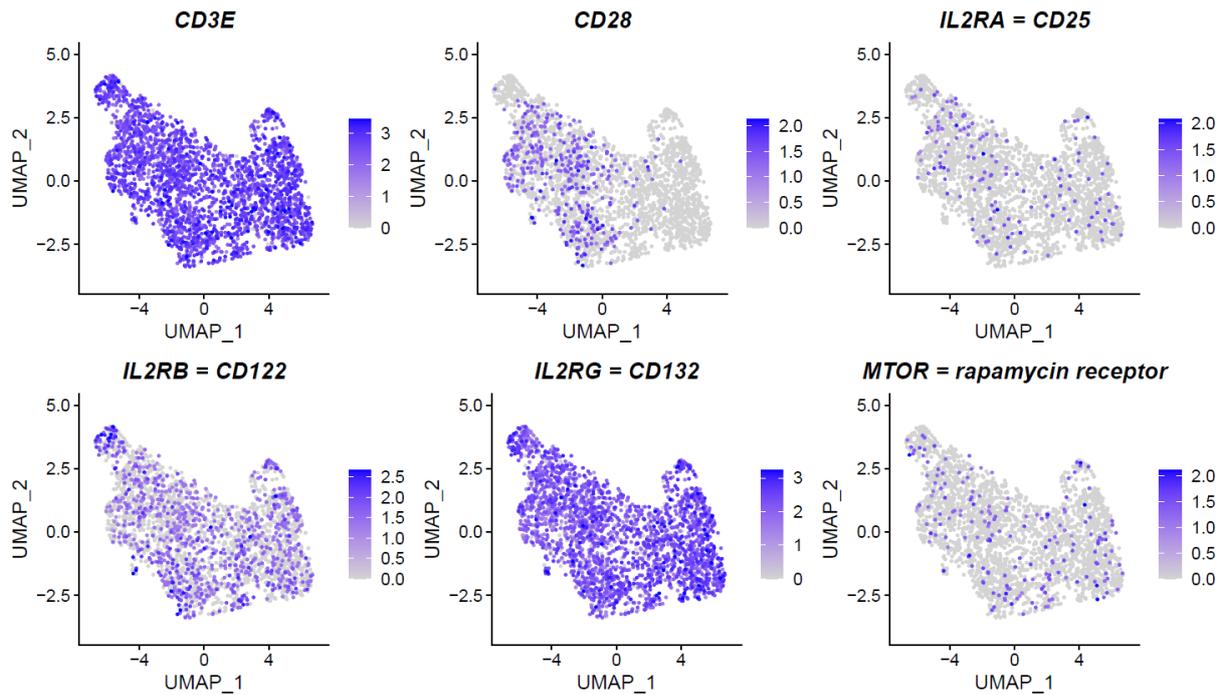


Figure 34 : Expression des gènes codant pour les récepteurs des molécules nécessaires pour l'amplification des Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ selon le protocole clinique. L'expression de chaque gène a été échelonné du gris au bleu et chaque point représente une cellule

Ayant inclus les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ amplifiés dans le 2^{ème} scRNA-seq, j'ai commencé à analyser ces données, mais ce n'est que préliminaire. D'autres analyses seront effectuées très prochainement. Pour le moment, j'ai pu analyser les clonotypes TCR des cellules afin de regarder d'où viennent ces Tregs. Pour cette analyse, je n'ai pris en compte que les cellules T $CD8^+CD45RC^{low/-}$ (sans les MAITs) de l'état basal et les Tregs $CD8^+CD45RC^{low/-}$ amplifiés de ces mêmes individus. La projection de ces cellules est présentée dans la figure 35A, avec à gauche toutes les cellules de l'état basal (clusters 0 à 5), et à droite tous les Tregs amplifiés (cluster 6), et figure 35B pour la répartition des 4 individus. J'ai volontairement choisi de ne faire apparaître des clusters que dans les T $CD8^+CD45RC^{low/-}$ de l'état basal pour faciliter la compréhension. Nous ne sommes pas capables de retrouver les mêmes clusters de cellules vis-à-vis du 2^{ème} single cell RNA-seq, notamment car l'ajout des Tregs $CD8^+$ amplifiés change les gènes impliqués dans les axes de la UMAP. En revanche, en regardant l'expression de la protéine TNFR2 (Figure 35C), on observe un gradient d'expression croissante de cette protéine du cluster 4 (vert) vers le cluster 1 (orange). Ensuite, le partage des clonotypes des TCRs entre les clusters de cellules est projeté (Figure 35D) et montre qu'on retrouve des cellules amplifiées provenant de tous les clusters des cellules T $CD8^+CD45RC^{low/-}$ de l'état basal. Cependant, la

fréquence des clonotypes partagés avec le cluster 6 (Tregs CD8⁺ amplifiés) montre qu'on retrouve plus de clones provenant des clusters exprimant TNFR2 (Figure 35E). Finalement, l'expression du gène *FOXP3* est hétérogène au sein des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés (Figure 35F), pourtant 100% des cellules après amplification expriment la protéine FOXP3.

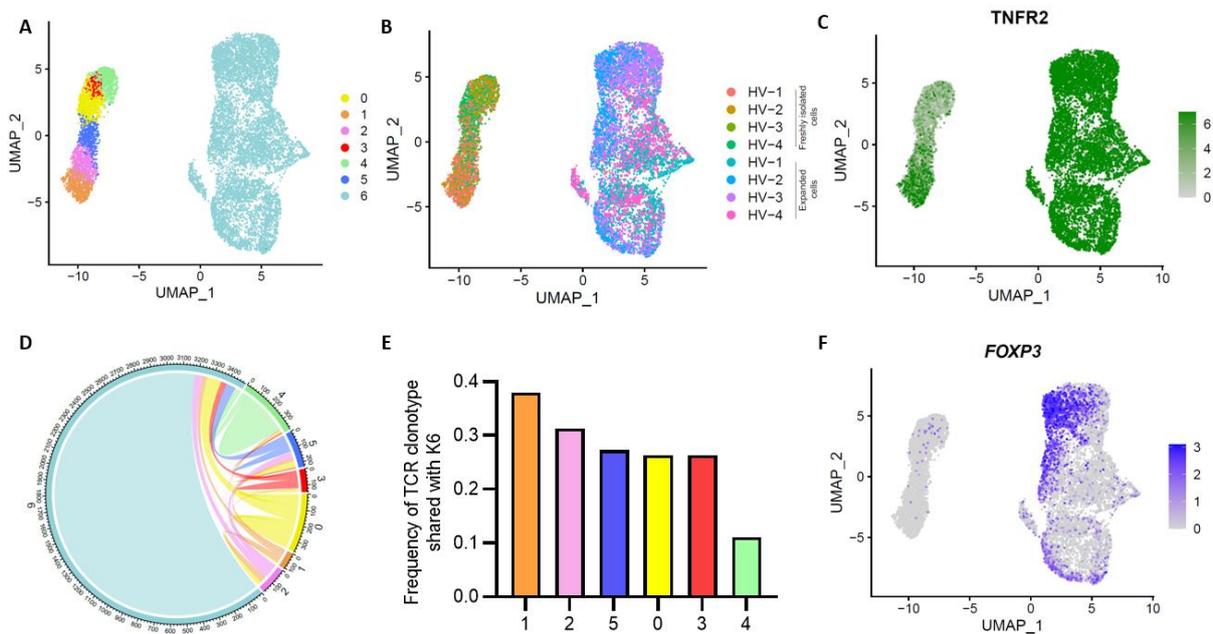


Figure 35 : Origine des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés

(A) Projection des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-} avant et après amplification. (B) Affiliation des cellules pour chaque individu. (C) Expression protéique de TNFR2. (D) Graphe montrant le partage de clonotype entre les clusters de cellules de la figure A. (E) Fréquence de partage des clonotypes d'un cluster défini de T CD8⁺CD45RC^{low/-} avant amplification avec le cluster 6 correspondant aux Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés. (F) Expression du gène *FOXP3*.

Pour conclure, l'ensemble des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} à l'état basal, semblent pouvoir répondre aux conditions de culture de l'amplification des Tregs CD8⁺, excepté pour la stimulation avec des anticorps anti-CD28. En effet, une sous-population de T CD8⁺CD45RC^{low/-} n'exprime pas CD28, suggérant que ces cellules ne peuvent pas directement répondre à une activation via la molécule CD28. Avec l'analyse transcriptomique des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés, nous avons pu montrer que ces cellules sont complètement différentes d'avant amplification. De plus, l'analyse des TCRs a montré qu'après amplification on retrouve des clones appartenant à tous les clusters de cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} avant amplification, suggérant ainsi que les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD28⁻ sont capables d'être sélectionnées par les conditions d'amplification. Finalement, l'expression génique différentielle de *FOXP3* interroge sur la nature suppressive similaire entre ces 2 groupes de cellules.

D'autres analyses complémentaires sont à apporter pour ce projet, notamment explorer si les clones provenant des clusters de cellules avant amplification expliquent des différences après amplification ou non. Ces analyses seront faites très prochainement.

IV - Discussion

IV. Discussion

Aujourd'hui les traitements immunosuppresseurs permettent de limiter les symptômes des patients atteints de MAIs et d'éviter le rejet pour les patients transplantés. Bien qu'efficaces, ils induisent des effets indésirables graves tels que l'augmentation du risque d'infection et de cancers. De plus, ils ne permettent que de traiter les symptômes mais ne sont pas capables d'induire la tolérance. L'induction de la tolérance étant l'objectif à atteindre, « le graal », de nouvelles thérapies sont en cours de développement afin d'induire cette tolérance. Les Tregs sont à la fois impliqués dans les MAIs ainsi que dans les transplantations, ils sont prometteurs en thérapie cellulaire ou en thérapie d'anticorps monoclonaux, par exemple avec une activation des Tregs CD4⁺ à l'aide d'un anticorps anti-TNFR2 (Figure 13) (Eggenhuizen, Ng, et Ooi 2020).

Les Tregs CD4⁺ sont bien décrits, alors que les Tregs CD8⁺ le sont beaucoup moins. De plus, ces derniers constituent une population cellulaire très hétérogène avec plusieurs marqueurs décrits mais non consensuels. L'objectif de ma thèse a été d'étudier l'hétérogénéité des lymphocytes T CD8⁺ et plus particulièrement des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}, pour affiner l'identité des Tregs CD8⁺ ainsi que pour comprendre leurs mécanismes d'action et les moduler. Un des objectifs a été l'identification de nouveaux marqueurs, notamment membranaires, pour être capable d'isoler ces Tregs CD8⁺, avec comme finalité de cibler ces marqueurs membranaires pour les activer ou les inhiber, mais également d'identifier des marqueurs impliqués dans leurs mécanismes d'action.

J'ai dans un premier temps généré un premier jeu de données de scRNA-seq à partir de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} fraîchement isolés du sang de 3 volontaires sains. Cependant, la faible profondeur de séquençage et le manque des cellules T CD8⁺CD45RC^{high} pour comparer les niveaux d'expression m'ont posé des difficultés pour confirmer l'expression des marqueurs identifiés. Ces résultats ne sont pas publiés mais grâce à ces analyses, j'ai identifié un cluster de cellules MAITs dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-}. De plus, j'ai pu identifier pour la première fois les gènes *TNFRSF1B* (TNFR2) et *ITGB1* (CD29) comme intéressants pour étudier l'hétérogénéité des Tregs CD8⁺, et grâce à ces résultats j'ai pu réaliser les tests suppressifs en triant les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} selon l'expression des marqueurs TNFR2 et CD29.

Dans le cadre du consortium européen ReSHAPE (<https://www.reshape-h2020.eu/>), une expérience de CD screen m'a permis de dresser le profil d'expression protéique notamment des T CD8⁺CD45RC^{high} et T CD8⁺CD45RC^{low/-} à l'état basal et des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}

amplifiées pour 361 marqueurs membranaires. Cette expérience m'a également permis de sélectionner des anticorps de CITE-seq ciblant certains de ces marqueurs intéressants à inclure dans la 2^{ème} expérience de scRNA-seq. J'ai réalisé toute l'analyse bio-informatique de ces données de CD-screen. Ces données ne font pas l'objet d'une publication scientifique.

J'ai développé une application Rshiny permettant de visualiser l'expression de chaque protéine et ce pour chaque sous-type cellulaire étudié. Cela me permet, ainsi qu'à toute l'équipe travaillant sur les Tregs CD8⁺, d'avoir accès à ces données rapidement. J'ai également développé d'autres applications du même type pour toutes les données de 3'DGE-seq que j'ai analysé permettant ainsi pour chaque gène de voir son expression (en UPM) dans les échantillons étudiés, ainsi que pour les jeux de données de scRNA-seq (Figure 36).

3'DGE-seq analysis

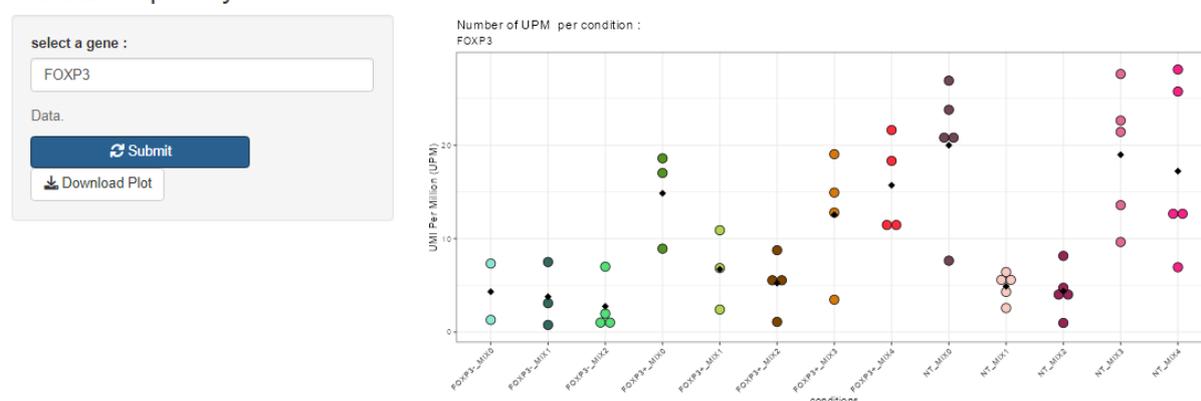


Figure 36 : Interface de l'application R-shiny

J'ai ensuite réalisé un 2^{ème} jeu de données de scRNA-seq plus complet que le 1^{er}. En effet, il est plus complet pour plusieurs raisons : 1) j'ai inclus des lymphocytes T CD8⁺ totaux 2) j'ai également inclus les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés des mêmes individus 3) j'ai ajouté 30 anticorps de CITE-seq pour avoir l'information protéique de ces 30 marqueurs 4) la profondeur de séquençage a été plus importante que le 1^{er} scRNA-seq, ce qui a permis la détection de plus de gènes, et 5) nous avons obtenu les séquences des TCR portés par chacune des cellules.

Ce 2^{ème} jeu de données de scRNA-seq m'a permis de caractériser l'hétérogénéité cellulaire au sein des T CD8⁺ totaux avec la mise en évidence de 2 grands clusters qui peuvent être expliqués selon l'expression de CD45RC. J'ai ensuite étudié l'hétérogénéité dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-}. Cela a notamment conduit à la caractérisation d'une sous-population de cellules MAIT. Étonnamment j'ai retrouvé beaucoup de cellules MAIT (~20%). L'âge moyen

des individus inclus dans ce jeu de données est de 27 ans (+/- 2 ans), ce qui correspond à l'âge où le taux maximum de MAIT est atteint, soit environ 10% des lymphocytes T CD8⁺ (Walker, Tharmalingam, et Klenerman 2014). Dans le 1^{er} scRNA-seq, je retrouvais également une forte proportion de cellules MAIT au niveau transcriptomique, et la moyenne d'âge des individus était de 32 ans.

Dans mon article scientifique le choix a été fait de ne pas entrer en détails dans l'étude du transcriptome des cellules MAIT, bien qu'il aurait pu être intéressant de le faire. Une étude des cellules MAIT en scRNA-seq chez l'Homme, a montré que les meilleurs marqueurs de MAIT au niveau transcriptomique sont *SLC4A10*, *KLRB1*, *ME1*, *TMIGD2*, *IL23R*, *NCR3*, *LST1*, *COLQ*, *RORC*, *ZBTB16*, *TLE1* (Yao, Shooshtari, et Haeryfar 2020). Parmi ces 10 gènes, 8 d'entre eux sont spécifiquement exprimés dans le cluster des cellules MAIT du 2^{ème} scRNA-seq, excepté *TMIGD2* qui est retrouvé exprimé à la fois dans les cellules MAIT et dans les cellules T CD8⁺CD45RC^{high}, et *NCR3*, qui en plus d'être exprimé dans les MAIT est exprimé dans les cellules des clusters 8 et 9 de l'article principal, c'est-à-dire le cluster exprimant fortement *IKZF2* (8) ainsi que le cluster correspondant aux cellules T CD8⁺KIR⁺ (9).

La question de l'impact de l'âge se pose également pour le reste de mes analyses. Notre équipe a montré que l'âge n'a pas d'impact pour l'expression de la protéine CD45RC (Bézie et al. 2018), mais nous n'avons pas étudié cet impact pour d'autres marqueurs, tels que TNFR2 ou CD29. Cependant, il a été montré que le niveau de CD29 diminue avec l'âge (Todo-Bom et al. 2012), on pourrait donc s'attendre à une diminution de la proportion de cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{low} avec l'âge des individus. Pour le 2^{ème} jeu de scRNA-seq nous avons fait le choix d'homogénéiser l'âge au maximum afin de ne pas être impacté, s'il y a des différences liées à l'âge.

De plus, dans ce 2^{ème} jeu de données de scRNA-seq, plusieurs clusters sont apparus discriminés par l'expression des gènes *TNFRSF1B* et *ITGB1* qui codent respectivement pour les protéines CD120b/TNFR2 et CD29, comme observé dans le jeu précédent. Ces 2 protéines permettent l'identification de 4 sous-populations au sein des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}, parmi lesquels le sous-type CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{low} correspond aux cellules les plus suppressives. Jusqu'à aujourd'hui il s'agit de nos 2 meilleurs marqueurs pour isoler les cellules possédant les plus fortes capacités suppressives au stade de cellules fraîches, non stimulées, contrairement à GITR qui lui n'est pertinent que lorsque que les cellules ont été préalablement stimulées (Bézie et al. 2018). Bien que ce sous-type T CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{low} ne

représente qu'une faible proportion de cellules, il reste très intéressant, notamment car nous nous attendons à une faible proportion de Tregs CD8⁺ parmi les T CD8⁺ totaux. Cependant, il est plus difficile de considérer cette fraction de cellules pour une utilisation en thérapie cellulaire du fait de la faible proportion au départ, bien que si la fonction suppressive est supérieure nous aurions besoin d'injecter moins de cellules pour le même effet. On pourrait dans ce cas s'affranchir de l'expression de CD29 et de ne garder que les cellules CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺ pour la thérapie cellulaire. En revanche, l'identification des marqueurs TNFR2 et CD29 reste intéressante notamment pour l'étude des mécanismes d'action des Tregs CD8⁺. De plus, nous envisageons d'étudier leur capacité à être de bons biomarqueurs en transplantation notamment à la fois pour le pronostic et le diagnostic. Est-ce que la proportion de cellules TNFR2⁺ et/ou CD29^{low} avant transplantation permet de faire un pronostic sur le devenir de la greffe ? Ou est-ce qu'ils pourraient être de bons biomarqueurs après transplantation pour le suivi du greffon, par exemple pour le diagnostic précoce d'un rejet de greffe ?

Dans le 2^{ème} jeu de scRNA-seq, d'autres clusters de cellules ont également été identifiés comme pouvant être associées aux Tregs CD8⁺ ou bien pouvant en contenir, notamment 2 clusters de cellules exprimant le facteur de transcription *IKZF2* (Helios). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, je n'ai pas eu le temps de tester leur activité suppressive. Je vais donc continuer à étudier les cellules de ce cluster, avec pour premier but, l'identification de marqueurs membranaires corrélant avec ce cluster comme *CD7*, *CXCR3* et *KLRC3*, afin d'être capable d'isoler ces cellules des autres T CD8⁺CD45RC^{low/-}, puis de tester leur activité suppressive *in vitro*. Cependant, parmi ces 2 clusters, j'ai identifié un cluster de cellules n'appartenant qu'à un seul individu avec un clonotype unique (CAASPNLEYSGGGADGLTF_CSARDLRDRDEKLFF). Grâce aux anticorps de CITE-seq, nous savons que ces cellules expriment la protéine CD11c. De plus elles expriment spécifiquement les gènes *KIR2DL3*, *IKZF2* (Hélios) et *ITGAX* (CD11c). Avant exclusion des cellules CD16⁺CD56⁺, ces cellules étaient très proches de ce cluster *KIR2DL3*⁺. Plusieurs hypothèses sont émises. Il se peut que ces cellules correspondent à des NKT du fait de la co-expression des molécules CD56 et CD16 (Balato, Unutmaz, et Gaspari 2009; Poli et al. 2009). De plus, l'expression de CD11c est associée aux lymphocytes T non conventionnels activés avec un potentiel migratoire important (Qualai et al. 2016). Mais il est également possible que ces cellules puissent correspondre aux Tregs CD8⁺KIR⁺. En effet, la population cellulaire décrite comme étant des Tregs CD8⁺KIR⁺ exprime *KIR2DL3* ainsi que *IKZF2* et sa proportion

est plus importante chez les individus atteints de MAIs ou chez des patients dont la sévérité du Covid-19 est forte (J. Li et al. 2022). Ces Tregs CD8⁺KIR⁺ ont une activité suppressive dépendante de la cytotoxicité. A noter également que seul cet individu a été testé positif au Covid-19 au cours des 6 mois avant le prélèvement, alors que pour les 3 autres, aucun n'avait été testé positif au Covid-19 jusqu'ici. Je n'ai pas identifié de cellules exprimant les KIRs dans le 1^{er} jeu de scRNA-seq, cependant, ces données ont été générées avant l'apparition du Covid-19.

Parmi tous les types de Tregs CD8⁺ décrits jusqu'ici (cf chapitre 2), nous ne savons pas s'ils se chevauchent ou s'ils correspondent à des sous-types de Tregs CD8⁺ distincts. J'ai mis en évidence des cellules ayant un phénotype qui semble correspondre aux Tregs CD8⁺KIR⁺, mais seulement chez un seul individu, avec les gènes *KIR2DL3* et *ITGAX* (CD11c). L'expression du gène *FOXP3* ne nous a pas permis d'identifier de sous-populations au sein des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low/-}, tout comme les gènes *IL2RB* (CD122), *ITGAE* (CD103), *LAG3* et *CTLA4*. En revanche, j'ai mis en évidence 2 gènes intéressants : *PDCD1* (PD1) et *CD28*. Le gène *PDCD1* (PD1) identifie 2 clusters au sein des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}, mais n'est pas exprimé dans les cellules T CD8⁺CD45RC^{high}. De plus j'ai donc montré pour la première fois que les Tregs CD8⁺CD28^{low/-} sont compris dans la fraction des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}, et dans un 2^{ème} temps qu'ils semblent corrélérer avec la fraction des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺. L'avantage d'avoir identifié le marqueur TNFR2 dans les Tregs CD8⁺CD28^{low/-} permet d'envisager l'activation de ces Tregs via TNFR2, chose qui n'était pas possible jusque-là. Pour conclure sur la diversité des phénotypes de Tregs CD8⁺, l'objectif premier étant de conclure sur un phénotype consensus des Tregs CD8⁺ n'a pas été atteint. En effet, je ne pense pas que cela soit possible car il semble y avoir plusieurs types de Tregs CD8⁺ avec des phénotypes différents. Ainsi, dans nos données nous pourrions trouver des Tregs CD8⁺ dans différents clusters de l'analyse de scRNA-seq. Ce point est abordé dans la partie plasticité des Tregs CD8⁺ dans cette même discussion.

Au cours de ce projet, les tests suppressifs que j'ai réalisés ont consisté à la mise en co-culture de cellules T CD4⁺ conventionnelles avec des CPAs pour induire leur prolifération. Ce test est adapté dans le cadre de transplantation mais il serait intéressant de réaliser d'autres types de tests suppressifs sans utiliser des CPAs mais plutôt des billes coatées avec un anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ou des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 purifiés, qui pourraient plutôt mimer un contexte de MAI. Nous pourrions valider la fonction suppressive des sous-populations de

Tregs CD8⁺ identifiées en réalisant des tests *in vivo* comme cela a déjà été fait par notre équipe chez des souris NSG avec des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} totaux (Bézie et al. 2018).

Tous ces résultats présentés dans l'article scientifique principal présentent un intérêt pour la communauté scientifique, car à ma connaissance, il s'agit du premier jeu de données de scRNA-seq portant sur l'ensemble des lymphocytes T CD8⁺ totaux avec pour objectif la caractérisation de l'hétérogénéité des Tregs CD8⁺ du sang périphérique chez les donneurs sains.

Confirmation de l'utilisation de la protéine CD45RC pour identifier les Tregs CD8⁺ :

L'analyse transcriptomique à l'échelle de la cellule unique a confirmé l'utilisation de la molécule CD45RC pour identifier 2 sous-populations de T CD8⁺ bien distinctes : les cellules T CD8⁺CD45RC^{high} et les T CD8⁺CD45RC^{low/-}. Les T CD8⁺CD45RC^{high} ont un profil de cellules T CD8⁺ naïves alors que les T CD8⁺CD45RC^{low/-} ont un profil de cellules T CD8⁺ mémoires. Leurs transcriptomes sont très différents avec des gènes tels que *MAL*, *LRRN3*, *CCR7* et *LEF1* pour les T CD8⁺CD45RC^{high} et les gènes *CD99*, *KLRG1*, *PLEK*, *KLRD1*, *IL10RA*, *IL2RB*, *ITGB1*, *TNFRSF1B*, *CCL5*, *CST7*, *GZMA* et *TGFB1* pour les T CD8⁺CD45RC^{low/-}.

Bien que l'identification de marqueurs corrélant positivement avec les Tregs soit clé, l'identification de marqueurs corrélant négativement avec ces cellules est également pertinent. En effet, la protéine CD45RC est un de ces marqueurs et nous permet de bien les identifier. De plus, cibler cette protéine avec un anticorps anti-CD45RC nous a permis de cibler les cellules T conventionnelles pour favoriser la balance Tregs:Tconvs en faveur des Tregs. Parmi tous les gènes différentiellement exprimés entre ces les T CD8⁺CD45RC^{high} et T CD8⁺CD45RC^{low/-}, j'ai identifié notamment les gènes *IL6ST* et *IL6R* qui codent respectivement pour les protéines CD130 et CD126. Les T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD126⁺ semblent être moins suppressives que les T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD126⁻. Pour valider cette hypothèse, je dois confirmer ces résultats préliminaires. Si cela se confirme, nous pourrions exclure les cellules CD126⁺ parmi les T CD8⁺CD45RC^{low/-} pour affiner le profil des Tregs CD8⁺. Dans la littérature, le marqueur CD126 a déjà été étudié chez les cellules T régulatrices CD4⁺FOXP3⁺. Il a été mis en évidence que les cellules Tregs CD4⁺FOXP3⁺CD126^{low/-} correspondent à une population plus stable et possédant une plus grande fonction suppressive que les cellules Tregs CD4⁺FOXP3⁺CD126^{hi} dans des conditions normales et inflammatoires (Y. Chen et al. 2020). Il serait également intéressant de regarder si on retrouve des résultats similaires avec la protéine CD130.

Est-ce que TNFR2 a un rôle fonctionnel dans les Tregs CD8⁺ ?

Les tests suppressifs des Tregs CD8⁺TNFR2⁺ en présence d'anticorps bloquants anti-TNFR2 ont montré une légère restauration de la prolifération des cellules T CD4⁺ conventionnelles. Cependant, cela ne restaure pas toute la prolifération, ce qui suggère que TNFR2 joue un rôle fonctionnel mais qu'il y a également d'autres mécanismes d'action impliqués. Pour les cellules des clusters exprimant TNFR2 on retrouve les gènes de cytotoxicité associés tels que granzyme (*GZMB*, *GZMH*) et perforine (*PRF1*). Notre équipe a montré que l'ensemble des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} ne présente pas d'activité cytotoxique mais il est possible qu'une sous-population des T CD8⁺CD45RC^{low/-} ait une activité suppressive cytotoxique. Les mécanismes de suppression des Tregs CD8⁺TNFR2⁺ sont donc à étudier, mais au vu du leur transcriptome un effet suppressif lié aux granzymes et perforine est suggéré.

De plus, j'ai associé le marqueur TNFR2 aux cellules T CD8⁺ ayant les capacités suppressives les plus importantes, cependant, il n'est pas à exclure que l'anticorps utilisé pour le tri des T CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2 ait pu avoir un impact sur l'effet de suppression. Pour minimiser ce risque, j'ai choisi avec précaution un anticorps non décrit pour avoir un effet agoniste. Mais, quand bien même le marquage de TNFR2 influencerait sur l'activité suppressive des cellules, cela suggérerait son implication dans la fonction suppressive de ces cellules.

Pendant mon doctorat, j'ai réalisé de nombreuses libraires de 3'DGE-seq. Cependant cette technique ne permet pas d'étudier en détail des populations trop hétérogènes et n'est donc pas la plus adaptée pour étudier les T CD8⁺CD45RC^{low/-} totales. Maintenant que je suis capable d'identifier différentes sous-populations au sein des T CD8⁺CD45RC^{low/-}, je pourrai réaliser des expériences de 3'DGE-seq pour comparer les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺ vs CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁻ voir même des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{low} vs des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{high}, afin de confirmer les résultats trouvés dans le scRNA-seq, ainsi que d'étudier plus en détail le profil transcriptomique de ces différents sous-types cellulaires.

Les expériences qu'il me reste à faire, consistent à activer les Tregs CD8⁺ avec un agoniste de TNFR2. J'ai déjà commencé ces expériences d'activation avec l'agoniste de l'équipe de Harald Wajant (Chopra et al. 2016), mais par manque de temps je n'ai pas été en mesure de conclure. J'ai planifié la réalisation de tests suppressifs avec des Tregs CD8⁺TNFR2⁺ à l'état basal en présence ou en absence de cet agoniste. J'ai également prévu de le faire avec des Tregs

CD8⁺TNFR2⁺ ou Tregs CD8⁺ totaux stimulés, c'est-à-dire une stimulation des cellules en présence des anticorps anti-CD3, anti-CD28 et de l'IL-2 pendant environ 12h, puis de les activer avec l'agoniste TNFR2 avant de réaliser les tests suppressifs. Ces résultats permettraient de conforter ou non l'implication de TNFR2 dans la fonction suppressive des Tregs CD8⁺. Si ces tests confortent son rôle, je pourrais analyser le transcriptome des Tregs CD8⁺ avec ou sans activation par l'agoniste TNFR2 pour étudier les différences transcriptomiques induites.

Pour finir, comme énoncé précédemment dans cette discussion, le marqueur TNFR2 pourrait également être intéressant à étudier dans nos cohortes de patients transplantés rénaux, pour voir si ce marqueur a un potentiel prédictif quant au devenir du greffon.

Quelle est l'origine des Tregs CD8⁺ ?

Les Tregs CD4⁺ circulants peuvent avoir une origine thymique ou bien une origine périphérique avec la conversion de lymphocytes T conventionnels en Tregs (Jørgensen, Persson, et Hviid 2019; Safinia et al. 2015). Il n'y a, à ce jour aucune certitude quant à l'existence de Tregs CD8⁺ d'origine thymique. Cependant, cela n'est pas à exclure. Dans cette thèse, je n'ai pas été en mesure de mettre en évidence des Tregs CD8⁺ naïfs parmi les T CD8⁺CD45RC^{high}. En effet, le groupe de cellules T CD8⁺CD45RC^{high} est assez homogène, excepté un groupe de cellules exprimant le gène *CD79A*, qui lui est plutôt associé aux lymphocytes B (Chu et Arber 2001). Il faudrait donc étudier plus en détail la sous-population de cellules T CD8⁺CD45RC^{high}. Bien que la moyenne d'âge des individus inclus dans le 2^{ème} scRNA-seq est de 27 ans (+/- 2), il est possible que nous soyons déjà à un âge trop élevé pour identifier ces Tregs CD8⁺ naïfs. Je pense qu'il est difficile d'identifier ces cellules dans notre jeu de données de scRNA-seq du fait du faible nombre attendus de cellules. Pour les identifier, il faudrait enrichir au préalable les cellules CD8⁺ naïves totales, augmentant ainsi la proportion des potentielles Tregs CD8⁺ naïves. Il serait intéressant également d'étudier les Tregs CD8⁺ directement dans le thymus de donneurs sains pour voir s'il existe des Tregs CD8⁺ d'origine thymique. Nous avons accès à des thymus provenant de patients d'âges différents ainsi que des cellules thymiques fraîches ou congelées. Finalement une analyse des TCRs serait intéressante pour trancher sur ce point.

L'implication de FOXP3 reste toujours non validée pour la fonction des Tregs CD8⁺. Nous n'avons pas été en mesure de conclure sur l'expression génique de *FOXP3* dans les données de scRNA-seq car le gène est détecté dans trop peu de cellules (35 cellules) et ne

corrèle pas avec un cluster donné. On le retrouve exprimé dans 8 cellules T CD8⁺CD45RC^{high} et dans 27 cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}. Cependant, cela ne permet pas d'exclure sur son implication, car les cellules à l'état basal n'expriment que très peu la protéine FOXP3. J'ai cependant mis en évidence une corrélation entre l'expression protéique de FOXP3 et TNFR2 dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-} à l'état basal, sans stimulation. L'étude de la méthylation de la région déméthylée spécifique des Tregs (TSDR) de *FOXP3* des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} totaux a été faite (Bézie et al. 2018). Il a été montré que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} ont une meilleure déméthylation de cette région par rapport aux T CD8⁺CD45RC^{high} totaux, mais une moins bonne déméthylation par rapport aux Tregs CD4⁺. Il serait pertinent de réaliser à nouveau cette expérience en subdivisant les T CD8⁺CD45RC^{low/-} selon l'expression de TNFR2 et/ou de CD29. En effet, en réduisant l'hétérogénéité des T CD8⁺CD45RC^{low/-} on pourrait s'attendre à un meilleur taux de déméthylation de cette région dans les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺ pour tendre à se rapprocher du même taux que des Tregs CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}.

Je dois étudier le profil des gènes différentiellement exprimés entre les Tregs CD8⁺FOXP3⁺(GFP⁺) vs CD8⁺FOXP3⁻(GFP⁻) issus des rats eGFP-FOXP3 (Ménoret et al. 2021), dans nos jeux de données des Tregs CD8⁺ chez l'Homme. Notamment dans les données du 2^{ème} scRNA-seq, pour voir si l'expression de certains de ces gènes corrèle avec les cellules exprimant TNFR2 ou bien avec d'autres clusters de cellules. Il n'est pas exclu que FOXP3 ne soit pas un facteur de transcription clé pour les Tregs CD8⁺. S'il n'est pas clé, il est nécessaire d'en identifier de nouveaux pour comprendre leurs mécanismes d'action et leurs origines.

Un des objectifs de ma thèse a été d'identifier des facteurs de transcription clés des Tregs CD8⁺. En effet, l'identification du facteur de transcription FOXP3 en 2003, associé aux Tregs CD4⁺ a permis à ces cellules d'être très étudiées (Fontenot, Gavin, et Rudensky 2003). Il est à la fois nécessaire d'identifier ceux des Tregs CD8⁺ pour comprendre leurs mécanismes d'action ainsi que pour leur permettre d'être bien accepté par la communauté scientifique. Nos 2 études de scRNA-seq ont permis d'émettre des hypothèses quant à de potentiels facteurs de transcription impliqués dans les Tregs CD8⁺ tel que *TBX21* ou *IKZF2*. Cependant, il serait intéressant de réaliser une expérience de scATAC-seq, qui permet de caractériser les régions accessibles de la chromatine. Au laboratoire nous avons le matériel nécessaire ainsi que les compétences bio-informatiques pour l'analyse. Il est donc envisagé de réaliser cette expérience à partir de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}.

Impact des résultats pour l'amplification des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} :

Un cluster de cellules distinct des autres correspondant aux cellules MAITs a été identifié dans le 1^{er} jeu de données puis validé dans le 2^{ème}. Les cellules MAITs sont contenues dans la fraction des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} totales à l'état basal (Benallegue, 2022, accepté pour publication dans NNN), et des tests suppressifs ont montré que les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{high} (MAIT) ont beaucoup moins d'activité pour supprimer la prolifération des cellules T CD4⁺ conventionnelles par rapport aux cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD161^{low/-} qui elles ont des fonctions suppressives. Bien que ce marqueur, CD56, soit bien décrit et admis pour les MAITs, j'ai trouvé que pour un des 4 individus du 2^{ème} scRNA-seq des cellules expriment la protéine CD56 à leur surface bien qu'elles ne soient pas associées à ce cluster de cellules MAITs, mais plutôt associées au cluster exprimant le gène *KIR2DL3*. Il a été montré que le CD56 est up-régulé par les lymphocytes T CD8⁺ activés (Kelly-Rogers et al. 2006), suggérant ainsi que ces Tregs CD8⁺KIR⁺ sont exclus de l'amplification des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} de l'essai clinique du fait de leur expression de CD56.

Dans le 2^{ème} jeu de données de scRNA-seq, j'ai inclus des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiées pendant 21 jours de manière similaire au protocole de l'essai clinique à venir. Nous savons qu'il s'agit d'une population cellulaire bien plus homogène qu'avant amplification, notamment grâce aux résultats du CD-screen qui confirme cette homogénéité ainsi que l'étude de marqueurs clés tels que FOXP3. Plusieurs questions restent aujourd'hui sans réponses et seront rapidement adressées dans ce projet. A quel point les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés sont-elles hétérogènes ? Trouve-t-on des marqueurs membranaires délimitant cette hétérogénéité ? Les résultats préliminaires montrent qu'il y a une hétérogénéité transcriptomique au sein des Tregs CD8⁺ amplifiés. Reste à savoir si cette hétérogénéité est liée aux différents individus ou s'il y a un impact de l'hétérogénéité de la population T CD8⁺CD45RC^{low/-} à l'état basal. J'ai commencé à étudier si au sein des clusters de cellules retrouvés dans les Tregs CD8⁺ amplifiés on retrouve des clones TCR qui sont présents dans l'ensemble des clusters des T CD8⁺CD45RC^{low/-} de l'état basal ou s'il y a une sélection d'un cluster préférentiellement. Finalement, après amplification, toutes les cellules expriment FOXP3 (Bézie et al. 2018), cependant on retrouve des cellules FOXP3^{high} et des FOXP3^{int}. L'expression du gène *FOXP3* dans les cellules amplifiées du jeu de scRNA-seq semble être différenciellement exprimée entre les clusters représentés par ces cellules. J'émet l'hypothèse que les cellules amplifiées pour lesquelles on détecte une expression du gène *FOXP3*

correspondent aux Tregs CD8⁺ amplifiés FOXP3^{high}. Je vais continuer ces analyses notamment pour identifier des gènes spécifiques du cluster où *FOXP3* est fortement exprimé dans le but d'en identifier certains codants pour des protéines membranaires. En effet, si on trouve un marqueur membranaire corrélant avec la forte expression de FOXP3 dans les cellules amplifiées, nous pourrions les trier et comparer leur activité suppressive par rapport aux autres cellules amplifiées.

Un autre point important est de déterminer, parmi les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} totales fraîchement isolées du sang périphérique, quelles sont celles qui sont sélectionnées au cours de l'amplification ? Est-ce que toutes les cellules de chaque cluster identifié à l'état frais sont capables d'être sélectionnées par l'amplification ? Ou est-ce seulement une sous-population qui va être sélectionnée ? Et si oui, laquelle ?

Les conditions de culture de l'amplification des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} sont les suivantes : une stimulation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ainsi que l'ajout des cytokines IL-2 et IL-15 et de rapamycine dans le milieu de culture. J'ai donc étudié les gènes codants pour les récepteurs de ces molécules. Seule une partie des T CD8⁺CD45RC^{low/-} n'expriment pas le gène codant pour la molécule CD28. De plus, ces cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}CD28^{low/-} semblent corrélent positivement avec l'expression protéique de TNFR2, donc correspondant à celles ayant un potentiel régulateur le plus fort. Nous avons retrouvé des clones de TCR appartenant à ces cellules CD8⁺CD45RC^{low/-}CD28^{low/-} dans les Tregs après amplification, suggérant que ces cellules ont pu être sélectionnées par les conditions de culture. Nous émettons l'hypothèse qu'au cours des premiers jours de culture, avec la stimulation anti-CD3, les autres récepteurs peuvent être up-régulés, et ainsi les cellules peuvent être stimulées dans un second temps avec l'anticorps anti-CD28. Ces résultats sont à confirmer.

Après 21 jours de culture, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} sont transcriptomiquement très éloignées des cellules de l'état basal, notamment grâce à un fort impact des gènes liés à l'activation, ce qui rend leur comparaison délicate (Bézie et al. 2018). Pour s'affranchir au maximum de l'expression des gènes liés à l'activation, ainsi que pour étudier la sélection des cellules au cours de l'amplification, il serait intéressant d'effectuer une nouvelle expérience de scRNA-seq en incluant des cellules T CD8⁺ fraîches, des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiés ainsi qu'aux différents temps de l'amplification. Je proposerai une analyse des cellules pendant les 7 premiers jours de l'amplification, car c'est au cours de cette période que le profil transcriptomique semble varier le plus fortement, notamment avec 100% des cellules TNFR2⁺

dès le jour 7 de l'amplification. Ce type d'expérience me permettrait de faire des analyses dites de « pseudo-temps ». Jusqu'ici, nos analyses de scRNA-seq ne prennent pas en compte la composante temporelle avec la possibilité d'analyser plusieurs stades d'évolution des cellules. Ce type d'analyse serait donc pertinent pour l'étude des Tregs CD8⁺ au cours de l'amplification.

Finalement, nous avons prévu, dans le cadre de l'essai clinique the Eight-Treg, de monitorer les Tregs CD8⁺ présents dans le sang des patients avant et après transplantation pour étudier les différences liées à l'injection de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} amplifiées autologues.

La plasticité des Tregs :

L'expression de la protéine TNFR2 est associée aux clusters de cellules présentant un profil de type « effecteur » avec l'expression des gènes codant pour des granzymes (*GZMB*, *GZMH*) ou bien avec les gènes tels que *SELL* (CD62L) ou *CCR7* qui ne sont pas exprimés dans ces cellules. Les cellules ayant les propriétés régulatrices les plus fortes que nous ayons identifiées jusqu'ici, sont les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{low} et dans une moindre mesure les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{high}. Cela suggère que ces 2 sous-populations de Tregs ont un profil transcriptomique de cellules effectrices, bien qu'ayant des propriétés régulatrices. Comment l'expliquer ? Comme dans la proposition de classification des Tregs CD4⁺ par Sjaastad (Sjaastad et al. 2021), il serait possible que nous retrouvions des Tregs CD8⁺ associés aux sous-types de lymphocytes T CD8⁺, et donc avoir des Tregs CD8⁺ Tc1-like, des Tregs CD8⁺ Tc2-like ou bien des Tregs CD8⁺ Tc17-like. Je n'ai pas été capable d'étiqueter tous les clusters selon la classification Tc1, Tc2 et Tc17. *TBX21* (T-bet) associé aux Tc1 n'est pas exprimé dans les T CD8⁺CD45RC^{high} et est préférentiellement exprimé dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺. L'expression du gène *GATA3*, qui lui est associé aux Tc2, n'est pas restreinte à un cluster de cellules en particulier. En revanche les gènes *RORC* (ROR γ t) et *RORA* (ROR α) qui eux sont associés aux Tc17, sont retrouvés spécifiquement exprimés dans les cellules MAIT. Nous n'avons pas été en mesure, pour le moment, de montrer si au sein des clusters de type « effecteur », toutes les cellules ont la même fonction. C'est-à-dire, est-ce que toutes les CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺(CD29^{low}) sont des Tregs CD8⁺, ou seulement une partie ? Si tel est le cas, comment les distinguer des autres cellules ? Il est fort probable que toutes ne soient pas des cellules régulatrices. Cependant aujourd'hui nous n'avons pas été capables d'isoler clairement les Tregs des cellules T conventionnelles.

Ces hypothèses de plusieurs sous-types de Tregs CD8⁺, confortent l'intérêt de garder toutes les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} présentes à l'état basal pour l'amplification des Tregs CD8⁺ dans le premier essai clinique chez le patient transplanté. En effet, si comme pour les Tregs CD4⁺, on retrouve plusieurs sous-types de Tregs CD8⁺ transcriptomiquement et/ou phénotypiquement proches des populations classiques de lymphocytes T CD8⁺, l'isolement d'un seul sous-type de Tregs CD8⁺ n'est peut-être pas optimal.

Dans les conditions de culture du protocole d'amplification favorisant les Tregs CD8⁺, à la fin nous obtenons seulement des Tregs CD8⁺, donc l'inclusion de toutes les cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-}, bien que toutes ne soient pas des Tregs CD8⁺ à l'état basal, permettrait d'augmenter les chances d'avoir un pool de Tregs CD8⁺, possiblement plus performant à la fin. Au cours de l'amplification, est-ce que seules les Tregs CD8⁺ de l'état basal sont sélectionnés, survivent et prolifèrent ? Ou est-ce que les cellules T conventionnelles contenues dans les T CD8⁺CD45RC^{low/-} peuvent être converties en Tregs ? Aujourd'hui nous ne savons pas si ces cellules T conventionnelles peuvent être converties en Tregs ? Et si oui, est-ce que toutes les cellules T conventionnelles en sont capables ou bien seulement une partie ? Ou au contraire, est-ce qu'un Tregs pourrait être converti en cellule T conventionnelle ?

Nous avons des résultats préliminaires indiquant que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} dans un milieu d'amplification « régulateur », conduisent à la génération de Tregs CD8⁺. Ces résultats, bien qu'ils doivent être confirmés, révèlent bien la notion de plasticité des T CD8⁺. Si la plasticité des T CD8⁺ est importante, l'étude des Tregs CD8⁺ à l'état basal n'est peut-être pas la solution optimale pour identifier les facteurs de transcription clés ou bien les mécanismes menants à la génération de Tregs CD8⁺ fonctionnels ainsi qu'à la compréhension de leurs mécanismes de suppression.

Finalement, cette notion de plasticité soulève un point intéressant dans le traitement des cancers avec des lymphocytes T portant des CARs. En effet, aujourd'hui des thérapies en oncologie utilisent des lymphocytes T CD8⁺ CAR, sans distinction de sous-types de CD8⁺ (Raskov et al, 2021). Le rôle des Tregs CD8⁺ dans cette fraction de lymphocytes T CD8⁺ CAR n'est pas étudié, or cela serait pertinent. On pourrait envisager l'utilisation seulement d'un sous-type de T CD8⁺, notamment les T CD8⁺CD45RC^{high}, comportant peu ou pas de Tregs CD8⁺.

Intérêt de l'étude des Tregs CD8⁺ dans le contexte de MAIs ou de patients transplantés :

L'étude des Tregs CD8⁺ (dans notre équipe) se limite aujourd'hui aux individus sains. Il serait donc intéressant d'étudier les T CD8⁺ totaux (incluant ainsi les T CD8⁺CD45RC^{high} et T CD8⁺CD45RC^{low/-}) du sang de patients atteints de MAIs puis de pouvoir les comparer aux T CD8⁺ de patients sains, en focalisant principalement sur les Tregs CD8⁺. L'étude des Tregs CD8⁺ chez des patients transplantés a également de l'intérêt notamment pour voir leur évolution au cours du temps. Ce genre d'étude pourrait permettre d'associer une quantité ou un phénotype de Tregs CD8⁺ plutôt associés au rejet ou au contraire à la tolérance. On pourrait également envisager d'étudier l'impact des traitements des MAIs ou en transplantation sur les Tregs CD8⁺, leur fonction est-elle impactée ? leur transcriptome ou protéome est-il différent de celui d'un patient qui serait non traité ?

En plus de l'étude des Tregs CD8⁺ retrouvés dans le sang périphérique, il serait pertinent d'étudier ceux retrouvés dans les tissus et notamment dans les organes lymphoïdes secondaires. Je vais réaliser une étude portant sur les Tregs CD4⁺ et CD8⁺ présents dans la rate et dans les ganglions lymphatiques de donneurs sains décédés. En plus des organes lymphoïdes primaires, et secondaires, et le sang, on retrouve des Tregs dans la peau, les muqueuses ou bien les muscles, il serait donc également intéressant de les étudier. Toutes ces différentes études pourraient aider à la compréhension globale des Tregs CD8⁺ ainsi qu'à essayer de décortiquer leurs origines et mécanismes d'action. La limite principale de cette étude très globale serait d'avoir tous ces organes et tissus matchés par individus.

Pour finir, l'utilisation de Tregs pour induire la tolérance et remplacer les traitements immunosuppresseurs n'est pas encore assez aboutie pour une utilisation à grande échelle que ce soit au niveau de la thérapie cellulaire ou bien d'utilisation d'activateurs de Tregs ou d'inhibiteur de cellules conventionnelles non plus. Les résultats de l'essai clinique the One Study utilisant des cellules régulatrices chez des patients transplantés ont montré l'effet bénéfique des cellules régulatrices en combinaison avec les traitements immunosuppresseurs (Sawitzki et al. 2020). En effet, l'injection de ces cellules régulatrices a permis de diminuer les doses et ainsi de diminuer les effets indésirables tels que les infections. C'est pourquoi, je pense qu'aujourd'hui il est important de continuer l'étude des Tregs, mais non pas pour remplacer les traitements immunosuppresseurs, mais dans le but de diminuer leurs doses et ainsi augmenter la qualité de vie des patients.

Ainsi, l'ensemble des résultats que j'ai obtenu au cours de mon doctorat ont permis d'améliorer nos connaissances globales sur l'hétérogénéité des Tregs CD8⁺ et ont également permis l'identification des marqueurs TNFR2 et CD29 afin d'isoler les Tregs CD8⁺ les plus suppressifs. De plus, ces travaux ont permis d'émettre de nouvelles hypothèses quant à de d'autres potentiels marqueurs des Tregs CD8⁺. Ces travaux visent, à terme, d'établir de nouvelles thérapies, ou bien d'être utilisés comme marqueurs de diagnostic ou de pronostic, en transplantation notamment.

V - Annexes

V. Annexes

En parallèle de ce projet principal de thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à de nombreux projets scientifiques. Il me semblait important de mentionner ici ma contribution à tous ces projets externes à mon projet de thèse car cela m'a apporté des compétences : priorisation des projets, participation à la réflexion scientifique menant à la rédaction d'articles scientifiques, adaptation à chaque nouveau projet. Je n'ai participé qu'à des projets en lien avec les Tregs afin que cela puisse m'être bénéfique pour ma thèse.

Ma double compétence biologie/bio-informatique, m'a permis de contribuer à différents projets de notre équipe notamment grâce à la génération de bibliothèques de 3'DGE-seq, ainsi que leurs analyses. Ainsi, j'ai participé à la rédaction de 4 articles publiés, ainsi que 3 publications en cours de soumission. Pour chaque article (publié ou non), j'ai inséré l'abstract et j'ai noté ma contribution personnelle.

- **Publication n°1** : CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells characterization in the rat using a unique transgenic Foxp3-EGFP model.
- **Publication n°2** : Anti-CD45RC antibody immunotherapy prevents and treats experimental autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome
- **Publication n°3**: Stable renal function in transplanted patients correlates to a phenotypic signature based on CD45RC T cell subsets
- **Publication n°4** : IL-34 deficiency impairs FOXP3⁺ Treg function in a model of autoimmune colitis and decreases immune tolerance homeostasis
- **Publication n°5** : IL-34 actions on FOXP3⁺ Tregs and CD14⁺ monocytes control human graft rejection
- **Publication n°6** : Rapid and reproducible differentiation of hematopoietic and T cell progenitors from pluripotent stem cells
- **Publication n°7** : Generation of CD34⁺CD43⁺ hematopoietic progenitors to induce thymocytes from human pluripotent stem cells

J'ai également joint un résumé de mon CV scientifique ou figure la liste des conférences auxquelles j'ai pu participer que ce soit avec une communication orale ou la présentation de posters scientifiques.

Publication n°1: CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells characterization in the rat using a unique transgenic Foxp3-EGFP model.

Séverine Ménoret, Laurent Tesson, Séverine Remy, Victor Gourain, **Céline Sérazin**, Claire Usal, Aude Guiffes, Vanessa Chenouard, Laure-Hélène Ouisse, Malika Gantier, Jean-Marie Heslan, Cynthia Fourgeux, Jeremie Poschmann, Carole Guillonneau and Ignacio Anegon

Soumis dans BiorXiv en 2021,

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.09.471889v1.full.pdf>

Abstract: *Background: CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells (Treg) in diverse species include different subsets from different origins. In all species, CD8⁺ Treg have been poorly characterized. CD4⁺ and CD8⁺ Treg in rats have only partially been characterized and there is no rat model in which FOXP3⁺ Treg are genetically tagged. Results: We generated a rat transgenic line using the CRISPR/Cas9 system in which EGFP was inserted in frame on the 3' end of the Foxp3 gene using a 2A self-cleaving peptide. EGFP was exclusively expressed by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in similar proportion as observed with anti-FOXP3 antibodies. CD4⁺EGFP⁺ Treg were 5-10 times more frequent than CD8⁺EGFP⁺ Treg. CD4⁺ and CD8⁺ EGFP⁺ Treg expressed both the CD25^{high}CD127^{low}CD45RC^{low/-} markers. The suppressive activity of CD4⁺ and CD8⁺ Treg was largely confined to EGFP⁺ cells. RNAseq analyses showed similarities but also differences among CD4⁺ and CD8⁺ EGFP⁺ cells and provided the first description of the natural FOXP3⁺ CD8⁺ Treg transcriptome. In vitro culture of CD4⁺ and CD8⁺ EGFP⁺ cells with TGFbeta and IL-2 resulted in the induction of EGFP⁺ Treg. Preferential expansion of CD4⁺ and CD8⁺ EGFP⁺ Treg could be detected upon in vivo administration of a low dose of IL-2. Conclusions: This new and unique Foxp3-EGFP rat line constitutes a useful model to identify and isolate viable natural and induced CD4⁺ and CD8⁺ Treg. Additionally, it allows to identify new molecules expressed in CD8⁺ Treg that may allow to better define their phenotype and function not only in rats but also in other species.*

Contribution personnelle : Pour ce projet, j'ai réalisé la librairie 3'DGE-seq des échantillons de Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ issus du modèle de rats eGFP-FOXP3, puis j'ai analysé les données de cette première librairie. Une seconde expérience de meilleure qualité ayant été réalisée, mes premières analyses n'ont pas été incluses dans ce papier. Cependant, j'ai participé à la réflexion scientifique de l'élaboration de ce papier en ce qui concerne cette analyse transcriptomique.

Publication n°2: Anti-CD45RC antibody immunotherapy prevents and treats experimental autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome

Marine Besnard, Céline Sérazin, Jason Ossart, Anne Moreau, Nadège Vimond, Léa Flippe, Hanna Sein, Grace, A. Smith, Stefania Pittaluga, Elise M.N. Ferré, Claire Usal, Ignacio Anegon, Annamari Ranki, Michail S. Lionakis, Pärt Peterson, and Carole Guillonneau

The Journal of Clinical Investigation, 2022 April, DOI: 10.1172

Abstract : Targeted monoclonal antibody (mAb) therapies show great promise for the treatment of transplant rejection and autoimmune diseases by inducing more specific immunomodulatory effects than broadly immunosuppressive drugs routinely used. We recently described the therapeutic advantage of targeting CD45RC, expressed at high levels by conventional T (Tconv) cells (CD45RC^{hi}), their precursors, and terminally differentiated T (TEMRA) cells, but not by regulatory T cells (Tregs; CD45RC^{lo/-}). We demonstrated efficacy of anti-CD45RC mAb treatment in transplantation, but its potential has not been examined in autoimmune diseases. Autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy (APECED) is a rare genetic syndrome caused by loss-of-function mutations of autoimmune regulator (AIRE), a key central tolerance mediator, leading to abnormal autoreactive T cell responses and autoantibody production. Herein, we show that, in a rat model of APECED syndrome, anti-CD45RC mAb was effective for both prevention and treatment of autoimmune manifestations and inhibited autoantibody development. Anti-CD45RC mAb intervention depleted CD45RC^{hi} T cells, inhibited CD45RC^{hi} B cells, and restored the Treg/Tconv cell ratio and the altered Treg transcriptomic profile. In APECED patients, CD45RC was significantly increased in peripheral blood T cells, and lesioned organs from APECED patients were infiltrated by CD45RC^{hi} cells. Our observations highlight the potential role for CD45RC^{hi} cells in the pathogenesis of experimental and human APECED syndrome and the potential of anti-CD45RC antibody treatment.

Contribution personnelle : Concernant cette publication où je suis citée en tant que 2^{ème} auteur, j'ai réalisé les libraires de 3'DGE-seq des échantillons des Tregs CD4⁺ et CD8⁺ issus de rats AIRE^{-/-} et de rats wild type (WT). J'ai ensuite réalisé l'analyse primaire et secondaire des données combinées, notamment avec l'analyse des gènes différentiellement exprimés entre les rats traités et les rats non traités avec l'anticorps anti-CD45RC, ainsi que les voies de signalisation impliquées. Mes analyses ont contribué à la génération des figures 5B, 5C et 5D.

Publication n°3: Stable renal function in transplanted patients correlates to a phenotypic signature based on CD45RC T cell subsets

Séverine Bézie, Céline Sérazin, Elodie Autrusseau, Nadège Vimond, Magali Giral, Ignacio Anegon, Carole Guillonneau

Soumis dans Clinical and Experimental Immunology en Aout 2022

Abstract : *Biomarkers that could predict the evolution of the graft in transplanted patient and that could allow the clinician to adapt the care of the patients would be an invaluable tool. Unfortunately, to date, despite tremendous efforts, effective biomarkers are still yet to be identified. CD45RC, one of the splicing variants of the CD45 molecule, a tyrosine phosphatase that is critical in negatively or positively regulating the TCR signalling, is one marker already described highly expressed by CD8⁺ T cells before transplantation in patients with an increased risk of acute rejection. However, single biomarkers have limited predictive reliability. In this study, we performed a deep immunophenotyping of T cells using a panel of markers on a cohort of 93 kidney transplant patients either with stable graft function or having experienced acute transplant rejection, before and one year after transplantation or at the time of rejection. We identified combinations of markers and cell subsets associated with activation/inflammation (HLA-DR⁺, PD-1⁺) or Tregs/tolerance (IFN γ ⁺, GITR⁺, CD28⁻) as significant biomarkers of transplant outcome, and showed the importance of cell segregation based on the CD45RC marker to identify the signature of a stable graft function. Thus, our study could provide reliable biomarkers in transplantation to predict and/or monitor easily graft-directed immune responses and adapt IS treatments to mitigate adverse effects.*

Contribution personnelle : J'ai commencé ce projet en septembre 2019 avec l'aide de la Clinique des données, une plateforme mise en place par le CHU de Nantes pour accompagner l'analyse de données, notamment pour approfondir mes compétences avec le logiciel R/Rstudio. J'ai réalisé l'analyse des données de cytométrie en flux classique sur des cellules de patients transplantés rénaux, avec 3 panels d'anticorps définis avec R/Rstudio. Ces expériences de cytométrie ont été réalisées en amont de mon arrivée et avaient déjà été analysées par notre équipe de manière plus classique avec FlowJo. L'objectif était de mettre en évidence une signature protéique prédictive pour les patients rejetant leur transplant rénal et également une signature protéique de pronostic au cours du suivi des patients post transplantation. Pour cela, j'ai mis en place des modèles prédictifs en présélectionnant les marqueurs les plus intéressants.

Dans le papier ces résultats sont présentés sous la forme de courbe ROC. Finalement, ce papier a été soumis récemment dans *Clinical and Experimental Immunology*.

Publication n°4: IL-34 deficiency impairs FOXP3⁺ Treg function in a model of autoimmune colitis and decreases immune tolerance homeostasis

Antoine Freuchet, Apolline Salama, Séverine Bézie, Laurent Tesson, Séverine Rémy, Romain Humeau, Hadrien Rège, [Céline Sérazin](#), Léa Flippe, Pärt Peterson, Nadège Vimond, Claire Usal, Séverine Ménoret, Jean-Marie Heslan, Franck Duteille, Frédéric Blanchard, Magali Giral, Marco Colonna, Ignacio Anegon and Carole Guillonneau

Clinical and Translational Medicine, 2022 July, DOI: 10.1002

Abstract : *Background: Immune homeostasis requires fully functional Tregs with a stable phenotype to control autoimmunity. Although IL-34 is a cytokine first described as mainly involved in monocyte cell survival and differentiation, we recently described its expression by CD8⁺ Tregs in a rat model of transplantation tolerance and by activated FOXP3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs in human healthy individuals. However, its role in autoimmunity and potential in human diseases remains to be determined. Methods: We generated Il34^{-/-} rats and using both Il34^{-/-} rats and mice, we investigated their phenotype under inflammatory conditions. Using Il34^{-/-} rats, we further analysed the impact of the absence of expression of IL-34 for CD4⁺ Tregs suppressive function. We investigated the potential of IL-34 in human disease to prevent xenogeneic GVHD and human skin allograft rejection in immune humanized immunodeficient NSG mice. Finally, taking advantage of a biocollection, we investigated the correlation between presence of IL-34 in the serum and kidney transplant rejection. Results: Here we report that the absence of expression of IL-34 in Il34^{-/-} rats and mice leads to an unstable immune phenotype, with production of multiple autoantibodies, exacerbated under inflammatory conditions with increased susceptibility to DSS- and TNBS-colitis in Il34^{-/-} animals. Moreover, we revealed the striking inability of Il34^{-/-} CD4⁺ Tregs to protect Il2rg^{-/-} rats from a wasting disease induced by transfer of pathogenic cells, in contrast to Il34^{+/+} CD4⁺ Tregs. We also showed that IL-34 treatment delayed EAE in mice as well as GVHD and human skin allograft rejection in immune humanized immunodeficient NSG mice. Finally, we show that presence of IL-34 in the serum is associated with a longer rejection-free period in kidney transplanted patients. Conclusion: Altogether, our data emphasize on the crucial necessity of IL-34 for immune homeostasis and for CD4⁺ Tregs suppressive function. Our data also shows the therapeutic potential of IL-34 in human transplantation and auto-immunity.*

Contribution personnelle : Pour cet article récemment publié dans Clinical and Translational Medicine, j'ai réalisé une analyse des voies de signalisations impliquées dans les Tregs issus des rats IL-34^{-/-} à partir des données de 3'DGE-seq, puis généré les figures correspondantes. Mon analyse n'a pas permis de montrer de différences significative (données non montrées).

**Publication n°5: IL-34 actions on FOXP3⁺ Tregs and CD14⁺ monocytes
control human graft rejection**

Séverine Bézie, Antoine Freuchet, **Céline Sérazin**, Apolline Salama, Nadège Vimond, Ignacio Anegon, Carole Guillonneau

Frontiers in Immunology, 2020 August - DOI : 10.3389

Abstract: *Cytokines are major players regulating immune responses toward inflammatory and tolerogenic results. In organ and bone marrow transplantation, new reagents are needed to inhibit tissue destructive mechanisms and eventually induce immune tolerance without overall immunosuppression. IL-34 is a cytokine with no significant homology with any other cytokine but that acts preferentially through CSF-1R, as CSF-1 does, and through PTP ζ and CD138. Although IL-34 and CSF-1 share actions, a detailed analysis of their effects on immune cells needs further research. We previously showed that both CD4⁺ and CD8⁺ FOXP3⁺ Tregs suppress effector T cells through the production of IL-34, but not CSF-1, and that this action was mediated through antigen-presenting cells. We showed here by single-cell RNAseq and cytofluorimetry that different subsets of human monocytes expressed different levels of CSF-1R, CD138, and PTP ζ and that both CD4⁺ and CD8⁺ FOXP3⁺ Tregs expressed higher levels of CSF-1R than conventional T cells. The effects of IL-34 differed in the survival of these different subpopulations of monocytes and RNAseq analysis showed several genes differentially expressed between IL-34, CSF-1, M0, M1, and also M2 macrophages. Acute graft-vs.-host disease (aGVHD) in immunodeficient NSG mice injected with human PBMCs was decreased when treated with IL-34 in combination with an anti-CD45RC mAb that depleted conventional T cells. When IL-34-differentiated monocytes were used to expand Tregs in vitro, both CD4⁺ and CD8⁺ FOXP3⁺ Tregs were highly enriched and this effect was superior to the one obtained with CSF-1. Human CD8⁺ Tregs expanded in vitro with IL-34-differentiated allogeneic monocytes suppressed human immune responses in an NSG mouse aGVHD model humanized with hPBMCs. Overall, we showed that IL-34 induced the differentiation of human monocytes with a particular transcriptional profile and these cells favored the development of potent suppressor FOXP3⁺ Tregs.*

Contribution personnelle : J'ai participé à l'élaboration de ce papier à 2 niveaux différents. Premièrement, j'ai réalisé une analyse de scRNA-seq à partir d'un jeu de données public de PBMC humains. Cette analyse a permis la génération des figures 1A et 1B permettant de visualiser le niveau d'expression génique du CSF1R dans les monocytes CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ et CD14⁻CD16⁺. Dans un second temps, j'ai généré la librairie 3'DGE-seq des échantillons des différents types de monocytes de l'étude. Finalement j'ai réalisé l'analyse transcriptomique primaire et secondaire de ces échantillons ce qui a permis de faire les figures

3D, 3 E et 3F, montrant les gènes différentiellement exprimés entre les macrophages différenciés avec l'IL-34 et les macrophages différenciés avec le CSF-1.

Publication n°6: Rapid and reproducible differentiation of hematopoietic and T cell progenitors from pluripotent stem cells

Léa Flippe, Anne Gaignerie, **Céline Sérazin**, Olivier Baron, Xavier Saulquin, Maria Themeli, Carole Guillonneau, Laurent David

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020 October , DOI: 10.3389

Abstract : *Cell therapy using T cells has revolutionized medical care in recent years but limitations are associated with the difficulty of genome editing of the cells, the production of a sufficient number of cells and standardization of the product. Human pluripotent stem cells (hPSCs) can self-renew and differentiate into T cells to provide a standardized homogenous product of defined origin in indefinite quantity, therefore they are of great potential to alleviate limitations of therapeutic T cell production. The differentiation of hPSCs takes place in two steps: first the induction of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), then the induction of lymphopoiesis by Notch signaling. However, the differentiation of T cells from hPSCs can be difficult and lack reproducibility. One parameter that needs to be better assessed is the potential of DLL1 vs. DLL4 ligands of the Notch pathway to induce T cells. In addition, culture of hPSCs is labor-intensive and not compatible with GMP production, especially when they are cultured on feeder cells. Thus, the definition of a robust GMP-compatible differentiation protocol from hPSCs cultured in feeder-free conditions would increase the accessibility to off-the-shelf hematopoietic and T cell progenitors derived from hPSCs. In this article, we describe an efficient, rapid and reproducible protocol for the generation of hematopoietic and T cell progenitors in two steps: (1) generation of HSPCs from embryoid bodies (EB) in serum free medium and GMP-compatible feeder-free systems, (2) directed differentiation of hPSC-derived HSPCs into T-cell progenitors in the presence of bone marrow stromal cells expressing Notch-ligands OP9-DLL1 vs. OP9-DLL4.*

Contribution personnelle : Mon implication dans ce projet remonte à mon stage de master 1 où j'ai pu participer à ce projet de différenciation de cellules souches pluripotentes induites en progéniteurs de lymphocytes T. Pour cette publication, j'ai analysé des données de 3'DGE-seq pour lesquelles la librairie avait déjà été préparée et séquencée. Mes analyses ont permis de générer la figure supplementary n°2 où l'on peut retrouver le nombre d'UPM (UMI Par Million) en échelle log10 de plusieurs gènes à différents temps de la différenciation.

Publication n°7: Generation of CD34⁺CD43⁺ hematopoietic progenitors to induce thymocytes from human pluripotent stem cells

Léa Flippe, Anne Gaignerie, [Céline Sérazin](#), Olivier Baron, Xavier Saulquin, Ignacio Anegón, Laurent David
and Carole Guillonnet

Soumis en septembre 2022 dans BMC Biology

Abstract: *Immunotherapy using primary T cells has revolutionized medical care in some pathologies in recent years but limitations associated to challenging cell genome edition, insufficient cell number production, the use of only autologous cells and lack of product standardization have limited its uses in the clinic. The alternative use of T cells generated in vitro from human pluripotent stem cells (hPSCs) offers great advantages by providing a self-renewing source of T cells that can be readily genetically modified and facilitate the use of standardized universal off-the-shelf allogeneic cell products and rapid clinic access. However, despite their potential, the feasibility and functionality of T-cells differentiated from hPSCs needs better comprehension before moving to the clinic. In this study, we generated human induced pluripotent stem cells from T-cells (T-iPSCs) allowing preservation of already recombined TCR, with the same properties as human embryonic stem cells (hESCs). Based on these cells, we differentiated with high efficiency hematopoietic progenitor stem cells (HPSCs), capable of self-renewal and differentiation into any cell blood type, and then DN3a thymic progenitors from several T-iPSC lines. To better comprehend differentiation, we analyzed the transcriptomic profiles of the different cell types and demonstrated that HPSCs differentiated from hiPSCs had a very similar profile to cord blood hematopoietic stem cells (HSCs). Furthermore, differentiated T-cell progenitors had a similar profile to thymocytes at the DN3a stage of thymic lymphopoiesis. Therefore, with this approach, we were able to regenerate precursors of therapeutic human T cells to potentially treat a wide number of diseases.*

Contribution personnelle : Dans ce projet j'ai réalisé les librairies de 3'DGE-seq pour tous les échantillons, environ 200, puis j'ai également réalisé toute l'analyse transcriptomique, ce qui a permis de comparer les profils transcriptomiques au cours des jours de la différenciation. Cela a conduit à la génération de plusieurs figures du papier. Ce papier a été soumis en septembre 2022 dans BMC Biology.

Curriculum Vitae - Céline Sérazin

celine.serazin@univ-nantes.fr

Center for Research in Transplantation and Translational Immunology (CR2TI), UMR1064

CHU Nantes –Hotel Dieu

30 Bd Jean Monnet - 44093 Nantes, FRANCE

EDUCATION AND TRAINING

2019 – 2022: PhD Student in Biological Sciences – *University of Nantes (France)*

Doctoral thesis: « **Raffinement de l'identité des lymphocytes T régulateurs CD8⁺ chez l'Homme grâce à l'utilisation des technologies multi-omiques** »

Supervisor: Dr Carole Guillonnet – leading researcher in Genetic and Cellular Engineering in Immunology and Regenerative Medicine, CR2TI

Co-supervisor: Dr Séverine Bézie, CR2TI

- My research focus on exploration of human CD8⁺ Tregs heterogeneity at transcriptomic and proteomic levels using RNA-seq, single cell RNA-seq and CD-screening molecules methods.
- A particular focus of my research is about discovering new membrane markers to build a consensus phenotype for human CD8⁺ Tregs and to isolate the strongest CD8⁺ Tregs by first hypothesis on membrane markers by bio-informatics methods and then testing them by performing sorting experiments and suppressive tests.
- Working in close collaboration with ReSHAPE Consortium.

2017 - 2019: **Master's degree in biology** – *University of Nantes (France)*
Speciality: Genetic Genomic and Biology of Systems (GGBS)
Double competence in bioinformatics and laboratory experiments

2014 - 2017: **Licence of Biology** in English – *University of Nantes (France)*

ACADEMIC WORK AND INTERSHIPS

2021-2022: Supervisor of a Master 2 intern student (GGBS)

2018-2019: Internship – *CR2TI Nantes (France)*
Supervisor: Dr Carole Guillonnet (PhD)
«Exploration of the heterogeneity inside human CD8⁺ regulatory T cells»

2017: Internship – *CR2TI Nantes (France)*
Supervisor: Dr Laurent David (PhD)
«Generation of CD34⁺ cells from pluripotent stem cells, and characterization of those cells»

SKILLS

Wet lab skills :

- Cell culture (Embryonic or not)
- Multicolor flow cytometry and spectral cytometry
- Cell sorting
- RNA extraction
- Library preparation for bulk and single cell RNA sequencing
- In vitro cell suppressive assays

Bioinformatics skills :

- Transcriptomic analysis :
 - Bulk RNA-sequencing analysis
 - Single cell RNA-sequencing analysis
- Language: R and python (basics)
- Development of R Shiny app

It skills :

- Microsoft office
- Adobe Illustrator
- Biological software: Graph Pad Prism, FlowJo

PUBLICATIONS

- « IL-34 Actions on FOXP3⁺ Tregs and CD14⁺ Monocytes Control Human Graft Rejection » - Bézie S, Frechet A, **Sérazin C**, Salama A, Vimond N, Anegon I, Guillonneau C, *Frontiers in Immunology*, August 2020.
- « Rapid and Reproducible Differentiation of Hematopoietic and T Cell Progenitors From Pluripotent Stem Cells » - Flippe L, Gaignerie A, **Sérazin C**, Baron O, Saulquin X, Themeli M, Guillonneau C, David L, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, October 2020.
- « Anti-CD45RC antibody immunotherapy prevents and treats experimental autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome » - M Besnard, **C Sérazin**, J Ossart, A Moreau, N Vimond, L Flippe, H Sein, GA. Smith, S Pittaluga, Elise M.N. Ferré, C Usal, I Anegon, A Ranki, M S. Lionakis, P Peterson, C Guillonneau, *The journal of clinical investigation*, April 2022.
- « IL-34 deficiency impairs FOXP3⁺ Treg function in a model of autoimmune colitis and decreases immune tolerance homeostasis » - A Frechet, A Salama, S Bézie, L Tesson, S Rémy, R Humeau, H Règue, **C Sérazin**, L Flippe, P Peterson, N Vimond, C Usal, S Ménoret, JM Heslan, F Duteille, F Blanchard, M Giral, M Colonna, I Anegon, C Guillonneau, *Clinical and Translational Medicine*, July 2022.

CONFERENCE PRESENTATIONS

Oral communications :

- 2019 – French Society of Immunology – *Nantes (France)*
- 2020 – Master Class Symposium Single cell – *Nantes (France)*
- 2020 – The Transplantation Society (TTS) International Virtual Congress
- 2022 – Labex Igo – *Nantes (France)*
- 2022 – The Transplantation Society (TTS) International congress – *Buenos Aires (Argentina)*

Poster communications :

- 2019 – JOBIM – *Nantes (France)*
- 2019 – French Society of Immunology – *Nantes (France)*
- 2020 – FOCIS – Virtual Congress
- 2021 – FOCIS – Virtual Congress
- 2021 – NAT IGO – Virtual Congress – *Nantes (France)*
- 2022 – FOCIS – *San Francisco (USA)*

SCIENCE COMMUNICATION ACTIVITIES

- Contest « Ma thèse en 180 secondes » – *Nantes (France)* – 3rd place
- « Getting ready with RStudio for begginers » - Association Nan'thèse – *Nantes (France)*

Conclusion personnelle :

Au cours de ces 3 années de doctorat, précédées de 3 années de stages (Licence 3, Master 1 et Master 2) dans ce même laboratoire, j'ai pu participer à d'autres projets en rapport avec les Tregs CD8⁺/CD4⁺ ou bien à des projets différents notamment en lien avec les cellules souches. J'ai notamment contribué à différentes analyses transcriptomiques. Cela a conduit à la rédaction de 7 publications scientifiques dont 4 sont publiées et 3 soumises et sont présentées dans les annexes de ce manuscrit.

Ces 3 années de doctorat ont été extrêmement enrichissantes d'un point de vue professionnel mais également personnel. Je mesure la chance que j'ai eu, que ce soit au niveau des membres de l'équipe, de mes encadrantes, du sujet de thèse très stimulant, des techniques et expériences réalisées ainsi que ma participation à plusieurs congrès scientifiques pour présenter mes travaux de recherche notamment à FOCIS (San Francisco, 2022) et à la TTS (Buenos Aires, 2022). Cette thèse m'a permis de me conforter dans mon choix de carrière scientifique mais également de me confronter à plusieurs réalités dans le domaine de recherche, comme l'encadrement de stagiaire parfois difficile, le nombre d'heures passées à faire des expériences pour finalement ne pas être en mesure de les inclure dans des publications scientifiques, ou bien réécrire tout mon article principal de cette thèse car le nouveau jeu de données de scRNA-seq est plus pertinent et plus intéressant pour la communauté scientifique. Bien que ce fut assez éprouvant (surtout la 3^{ème} année), je suis très satisfaite de mes 3 années de doctorat. Par la suite, je vais rester travailler dans cette même équipe en tant que post-doc pour finir ce projet ainsi que pour continuer à avancer sur les recherches liées au projet européen ReSHAPE liées à l'essai clinique Eight-Reg.

J'ai eu la chance de ne pas être trop impactée par la crise Covid-19 dans mes recherches et expériences car j'ai profité de ce temps hors de la paillasse pour faire de la bio-informatique avec notamment l'analyse du premier jeu de scRNA-seq lors du premier confinement, des analyses transcriptomiques d'un article scientifique lors du 2^{ème} confinement, ainsi que de l'analyse du CD-screen.

Pour finir, je souhaiterais conclure cette thèse en affirmant l'importance de la bio-informatique aujourd'hui en recherche. Selon moi, il est désormais indispensable pour être un bon chercheur en biologie d'avoir des compétences, même basiques, en bio-informatiques ainsi que de très bonnes connaissances sur nouvelles technologies de pointe. J'ai été sollicité à de nombreuses reprises pour analyser des données de transcriptomiques. Pour moi, cela fut

bénéfique, mais je pense que pour les porteurs de projet cela a pu être parfois difficile de ne pas maîtriser ce nouveau type d'expériences et d'analyse. Quand bien même il n'est pas nécessaire de savoir réaliser toutes sortes d'analyses bio-informatique, il est, selon moi, primordial d'avoir de bonnes bases pour comprendre comment cela fonctionne pour désigner au mieux les expériences et comprendre les résultats générés.

VI - Références bibliographiques

VI. Références bibliographiques

- Adan, Aysun, Günel Alizada, Yağmur Kiraz, Yusuf Baran, et Ayten Nalbant. 2017. « Flow Cytometry: Basic Principles and Applications ». *Critical Reviews in Biotechnology* 37 (2): 163-76. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.
- Agle, Kimberle, Benjamin G. Vincent, Clint Piper, Ludovic Belle, Vivian Zhou, Warren Shlomchik, Jonathan S. Serody, et William R. Drobyski. 2018. « Bim Regulates the Survival and Suppressive Capability of CD8+ FOXP3+ Regulatory T Cells during Murine GVHD ». *Blood* 132 (4): 435-47. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-807156>.
- Ahonen, P., S. Myllärniemi, I. Sipilä, et J. Perheentupa. 1990. « Clinical Variation of Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APECED) in a Series of 68 Patients ». *The New England Journal of Medicine* 322 (26): 1829-36. <https://doi.org/10.1056/NEJM199006283222601>.
- Alam, Mohammad S., Courtney C. Kurtz, Robert M. Rowlett, Brian K. Reuter, Elizabeth Wiznerowicz, Soumita Das, Joel Linden, Sheila E. Crowe, et Peter B. Ernst. 2009. « CD73 Is Expressed by Human Regulatory T Helper Cells and Suppresses Proinflammatory Cytokine Production and Helicobacter felis-Induced Gastritis in Mice ». *The Journal of infectious diseases* 199 (4): 494-504. <https://doi.org/10.1086/596205>.
- Amini, Leila, Jenny Greig, Michael Schmueck-Henneresse, Hans-Dieter Volk, Séverine Bézie, Petra Reinke, Carole Guillonnet, Dimitrios L. Wagner, et Ignacio Anegón. 2021. « Super-Treg: Toward a New Era of Adoptive Treg Therapy Enabled by Genetic Modifications ». *Frontiers in Immunology* 11 (février): 611638. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611638>.
- Apostolou, Irina, et Harald von Boehmer. 2004. « In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells ». *Journal of Experimental Medicine* 199 (10): 1401-8. <https://doi.org/10.1084/jem.20040249>.
- Arjomandnejad, Motahareh, Acadia L. Kopec, et Allison M. Keeler. 2022. « CAR-T Regulatory (CAR-Treg) Cells: Engineering and Applications ». *Biomedicines* 10 (2): 287. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020287>.
- Bai, Jingchao, Bowen Ding, et Hui Li. 2022. « Targeting TNFR2 in Cancer: All Roads Lead to Rome ». *Frontiers in Immunology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.844931>.
- Balato, Anna, Derya Unutmaz, et Anthony A. Gaspari. 2009. « Natural Killer T Cells: An Unconventional T-Cell Subset with Diverse Effector and Regulatory Functions ». *The Journal of Investigative Dermatology* 129 (7): 1628-42. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.30>.
- Barnett, A. H., C. Eff, R. D. Leslie, et D. A. Pyke. 1981. « Diabetes in Identical Twins. A Study of 200 Pairs ». *Diabetologia* 20 (2): 87-93. <https://doi.org/10.1007/BF00262007>.
- Barton, A., S. John, W. E. Ollier, A. Silman, et J. Worthington. 2001. « Association between Rheumatoid Arthritis and Polymorphism of Tumor Necrosis Factor Receptor II, but Not Tumor Necrosis Factor Receptor I, in Caucasians ». *Arthritis and Rheumatism* 44 (1): 61-65. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200101\)44:1<61::AID-ANR9>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200101)44:1<61::AID-ANR9>3.0.CO;2-Q).
- Bellocchi, Chiara, et Elizabeth R. Volkman. 2018. « Update on the Gastrointestinal Microbiome in Systemic Sclerosis ». *Current Rheumatology Reports* 20 (8): 49. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0758-9>.
- 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>.
- Berg, D. J., R. Kühn, K. Rajewsky, W. Müller, S. Menon, N. Davidson, G. Grünig, et D. Rennick. 1995. « Interleukin-10 Is a Central Regulator of the Response to LPS in Murine Models of Endotoxic Shock and the Shwartzman Reaction but Not Endotoxin Tolerance ». *The Journal of Clinical Investigation* 96 (5): 2339-47. <https://doi.org/10.1172/JCI118290>.
- Besnard, Marine, Céline Sérazin, Jason Ossart, Anne Moreau, Nadège Vimond, Léa Flippe, Hanna Sein, et al. 2022. « Anti-CD45RC Antibody Immunotherapy Prevents and Treats Experimental Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy Syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 132 (7): e156507. <https://doi.org/10.1172/JCI156507>.
- Bettelli, Estelle, Maryam Dastrange, et Mohamed Oukka. 2005. « Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (14): 5138-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501675102>.
- Bézie, Séverine, Ignacio Anegón, et Carole Guillonéau. 2018. « Advances on CD8+ Treg Cells and Their Potential in Transplantation ». *Transplantation* 102 (9): 1467-78. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002258>.
- Bézie, Séverine, Béatrice Charreau, Nadège Vimond, Juliette Lasselín, Nathalie Gérard, Véronique Nerrière-Daguin, Frédérique Bellier-Waast, Franck Duteille, Ignacio Anegón, et Carole Guillonéau. 2019a. « Human CD8+ Tregs Expressing a MHC-Specific CAR Display Enhanced Suppression of Human Skin Rejection and GVHD in NSG Mice ». *Blood Advances* 3 (22): 3522-38. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000411>.
- . 2019b. « Human CD8+ Tregs Expressing a MHC-Specific CAR Display Enhanced Suppression of Human Skin Rejection and GVHD in NSG Mice ». *Blood Advances* 3 (22): 3522-38. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000411>.
- Bézie, Séverine, Antoine Freuchet, Céline Sérazin, Apolline Salama, Nadège Vimond, Ignacio Anegón, et Carole Guillonéau. 2020. « IL-34 Actions on FOXP3+ Tregs and CD14+ Monocytes Control Human Graft Rejection ». *Frontiers in Immunology* 11: 1496. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01496>.
- Bézie, Séverine, Dimitri Meistermann, Laetitia Boucault, Stéphanie Kilens, Johanna Zoppi, Elodie Autrusseau, Audrey Donnart, et al. 2018. « Ex Vivo Expanded Human Non-Cytotoxic CD8+CD45RClow/- Tregs Efficiently Delay Skin Graft Rejection and GVHD in Humanized Mice ». *Frontiers in Immunology* 8 (janvier): 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.02014>.
- Bézie, Séverine, Séverine Ménoret, Laurent Tesson, Xian-Liang Li, Claire Usal, Ignacio Anegón, et Lise Caron. 2011. « Immunosuppressive role of fibrinogen-like protein 2 (FGL2) in CD8+regulatory T cells-mediated long-term graft survival ». *Journal of Translational Medicine* 9 (2): O5. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-S2-O5>.
- Bézie, Séverine, Elodie Picarda, Jason Ossart, Laurent Tesson, Claire Usal, Karine Renaudin, Ignacio Anegón, et Carole Guillonéau. 2015. « IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (10): 3952-64. <https://doi.org/10.1172/JCI81227>.
- Biswas, Moanaro, Sandeep R. P. Kumar, Cox Terhorst, et Roland W. Herzog. 2018. « Gene Therapy With Regulatory T Cells: A Beneficial Alliance ». *Frontiers in Immunology* 9: 554. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00554>.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, et al. 1997. « A Metalloproteinase Disintegrin That Releases Tumour-Necrosis

- Factor-Alpha from Cells ». *Nature* 385 (6618): 729-33. <https://doi.org/10.1038/385729a0>.
- Boasso, Adriano, Jean-Philippe Herbeuval, Andrew W. Hardy, Christiana Winkler, et Gene M. Shearer. 2005. « Regulation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tryptophanyl-TRNA-Synthetase by CTLA-4-Fc in Human CD4+ T Cells ». *Blood* 105 (4): 1574-81. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2089>.
- 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>.
- Boor, Patrick P. C., Herold J. Metselaar, Sarina de Jonge, Shanta Mancham, Luc J. W. van der Laan, et Jaap Kwekkeboom. 2011. « Human Plasmacytoid Dendritic Cells Induce CD8+ LAG-3+ Foxp3+ CTLA-4+ Regulatory T Cells That Suppress Allo-Reactive Memory T Cells ». *European Journal of Immunology* 41 (6): 1663-74. <https://doi.org/10.1002/eji.201041229>.
- Booth, Nicola J., Arthur J. McQuaid, Toni Sobande, Steve Kissane, Elaine Agius, Sarah E. Jackson, Mike Salmon, et al. 2010. « Different Proliferative Potential and Migratory Characteristics of Human CD4+ Regulatory T Cells That Express Either CD45RA or CD45RO ». *The Journal of Immunology* 184 (8): 4317-26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903781>.
- Bottini, Nunzio, Lucia Musumeci, Andres Alonso, Souad Rahmouni, Konstantina Nika, Masoud Rostamkhani, James MacMurray, et al. 2004. « A Functional Variant of Lymphoid Tyrosine Phosphatase Is Associated with Type I Diabetes ». *Nature Genetics* 36 (4): 337-38. <https://doi.org/10.1038/ng1323>.
- Bottini, Nunzio, et Erik J. Peterson. 2014. « Tyrosine Phosphatase PTPN22: Multifunctional Regulator of Immune Signaling, Development, and Disease ». *Annual Review of Immunology* 32 (1): 83-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120249>.
- Boucault, Laetitia, Maria-Dolores Lopez Robles, Allan Thiolat, Séverine Bézie, Michael Schmueck-Henneresse, Cécile Braudeau, Nadège Vimond, et al. 2020. « Transient Antibody Targeting of CD45RC Inhibits the Development of Graft-versus-Host Disease ». *Blood Advances* 4 (11): 2501-15. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001688>.
- Brentjens, Renier J., Jean-Baptiste Latouche, Elmer Santos, Francesc Marti, Michael C. Gong, Clay Lyddane, Philip D. King, et al. 2003. « Eradication of Systemic B-Cell Tumors by Genetically Targeted Human T Lymphocytes Co-Stimulated by CD80 and Interleukin-15 ». *Nature Medicine* 9 (3): 279-86. <https://doi.org/10.1038/nm827>.
- Brooks, Wesley H., et Yves Renaudineau. 2015. « Epigenetics and autoimmune diseases: the X chromosome-nucleolus nexus ». *Frontiers in Genetics* 6 (février): 22. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00022>.
- Burchill, Matthew A., Jianying Yang, Kieng B. Vang, et Michael A. Farrar. 2007. « Interleukin-2 Receptor Signaling in Regulatory T Cell Development and Homeostasis ». *Immunology Letters* 114 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.08.005>.
- 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>.

- Caridade, Marta, Luis Graca, et Ruy Ribeiro. 2013. « Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models ». *Frontiers in Immunology* 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00378>.
- 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 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (1): 179-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.179>.
- Chatzikyriakidou, A., I. Georgiou, P. V. Voulgari, et A. A. Drosos. 2009. « The Role of Tumor Necrosis Factor (TNF)-Alpha and TNF Receptor Polymorphisms in Susceptibility to Ankylosing Spondylitis ». *Clinical and Experimental Rheumatology* 27 (4): 645-48.
- Chen, Karin, Wilfred Wu, Divij Mathew, Yuhua Zhang, Sarah K. Browne, Lindsey B. Rosen, Meghann P. McManus, et al. 2014. « Autoimmunity due to RAG Deficiency and Estimated Disease Incidence in RAG1/2 Mutations ». *The Journal of allergy and clinical immunology* 133 (3): 880-2.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.038>.
- Chen, Meiyue, Guangjie Chen, Shaohua Deng, Xin Liu, George J. Hutton, et Jian Hong. 2012. « IFN- β Induces the Proliferation of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells through Upregulation of GITRL on Dendritic Cells in the Treatment of Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 242 (1-2): 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.10.014>.
- Chen, WanJun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, et Sharon M. Wahl. 2003. « Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3 ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (12): 1875-86. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>.
- Chen, Xin, Monika Bäümel, Daniela N. Männel, O. M. Zack Howard, et Joost J. Oppenheim. 2007. « Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells ». *The Journal of Immunology* 179 (1): 154-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.154>.
- Chen, Xin, Jeffrey J. Subleski, Ryoko Hamano, O. M. Zack Howard, Robert H. Wiltrot, et Joost J. Oppenheim. 2010. « Co-Expression of TNFR2 and CD25 Identifies More of the Functional CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells in Human Peripheral Blood ». *European Journal of Immunology* 40 (4): 1099-1106. <https://doi.org/10.1002/eji.200940022>.
- Chen, Xin, Xueqing Wu, Qiong Zhou, O.M. Zack Howard, Mihai G. Netea, et Joost J. Oppenheim. 2013. « TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+FoxP3+ 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, Ye, Zhenjian Xu, Rongzhen Liang, Julie Wang, Anping Xu, Ning Na, Bin Li, et al. 2020. « CD4+CD126low/- Foxp3+ Cell Population Represents a Superior Subset of Regulatory T Cells in Treating Autoimmune Diseases ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (11): 2406-16. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.07.020>.
- Chen, Zhubo, Yanmei Han, Yan Gu, Yanfang Liu, Zhengping Jiang, Minghui Zhang, et Xuetao Cao. 2013. « CD11c(High)CD8+ Regulatory T Cell Feedback Inhibits CD4 T Cell Immune Response via Fas Ligand-Fas Pathway ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (12): 6145-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300060>.
- Chopra, Martin, Marlene Biehl, Tim Steinfatt, Andreas Brandl, Juliane Kums, Jorge Amich, Martin Vaeth, et al. 2016. « Exogenous TNFR2 Activation Protects from Acute GvHD via Host T Reg Cell Expansion ». *The Journal of Experimental Medicine* 213 (9): 1881-1900. <https://doi.org/10.1084/jem.20151563>.

- Chow, C. W., et R. J. Davis. 2000. « Integration of Calcium and Cyclic AMP Signaling Pathways by 14-3-3 ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (2): 702-12. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.2.702-712.2000>.
- Chu, P. G., et D. A. Arber. 2001. « CD79: A Review ». *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM* 9 (2): 97-106. <https://doi.org/10.1097/00129039-200106000-00001>.
- Churlaud, Guillaume, Fabien Pitoiset, Fadi Jebbawi, Roberta Lorenzon, Bertrand Bellier, Michelle Rosenzweig, et David Klatzmann. 2015. « Human and Mouse CD8+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy ». *Frontiers in Immunology* 6 (avril). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00171>.
- Clemente, Jose C, Julia Manasson, et Jose U Scher. 2018. « The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease ». *The BMJ* 360 (janvier): j5145. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5145>.
- Cobbold, Stephen P., Raquel Castejon, Elizabeth Adams, Diana Zelenika, Luis Graca, Susan Humm, et Herman Waldmann. 2004. « Induction of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Periphery of T Cell Receptor Transgenic Mice Tolerized to Transplants ». *The Journal of Immunology* 172 (10): 6003-10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6003>.
- Collison, Lauren W., Creg J. Workman, Timothy T. Kuo, Kelli Boyd, Yao Wang, Kate M. Vignali, Richard Cross, David Sehly, 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>.
- Cooper, Glinda S., Milele L. K. Bynum, et Emily C. Somers. 2009. « Recent Insights in the Epidemiology of Autoimmune Diseases: Improved Prevalence Estimates and Understanding of Clustering of Diseases ». *Journal of Autoimmunity* 33 (3-4): 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.09.008>.
- Crunkhorn, Sarah. 2021. « Switching CAR-T Cells on and Off ». *Nature Reviews Drug Discovery* 20 (2): 100-100. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00007-9>.
- Dai, Hehua, Ni Wan, Shuzi Zhang, Yolonda Moore, Fusheng Wan, et Zhenhua Dai. 2010. « Cutting Edge: Programmed Death-1 Defines CD8+CD122+ T Cells as Regulatory versus Memory T Cells ». *The Journal of Immunology* 185 (2): 803-7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000661>.
- 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>.
- Deniz, Gunnur, Gaye Erten, Umut Can Küçüksezer, Dilara Kocacik, Christian Karagiannidis, Esin Aktas, Cezmi A. Akdis, et Mubeccel Akdis. 2008. « Regulatory NK Cells Suppress Antigen-Specific T Cell Responses ». *The Journal of Immunology* 180 (2): 850-57. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.850>.
- Di Giovangiulio, Martina, Angelamaria Rizzo, Eleonora Franzè, Flavio Caprioli, Federica Facciotti, Sara Onali, Agnese Favale, et al. 2019. « Tbet Expression in Regulatory T Cells Is Required to Initiate Th1-Mediated Colitis ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02158>.
- Eggenhuizen, Peter J., Boaz H. Ng, et Joshua D. Ooi. 2020. « Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (19): 7015. <https://doi.org/10.3390/ijms21197015>.
- Elias, Shlomo, et Alexander Y. Rudensky. 2019. « Therapeutic use of regulatory T cells for graft-versus-host disease ». *British journal of haematology* 187 (1): 25-38. <https://doi.org/10.1111/bjh.16157>.

- Eshhar, Z., T. Waks, G. Gross, et D. G. Schindler. 1993. « Specific Activation and Targeting of Cytotoxic Lymphocytes through Chimeric Single Chains Consisting of Antibody-Binding Domains and the Gamma or Zeta Subunits of the Immunoglobulin and T-Cell Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (2): 720-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.720>.
- Filaci, Gilberto, Daniela Fenoglio, Marco Fravega, Gianluca Ansaldo, Giacomo Borgonovo, Paolo Traverso, Barbara Villaggio, et al. 2007. « CD8+ CD28- T Regulatory Lymphocytes Inhibiting T Cell Proliferative and Cytotoxic Functions Infiltrate Human Cancers ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (7): 4323-34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4323>.
- Fleming, Bryan D., et David M. Mosser. 2011. « Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy ». *European journal of immunology* 41 (9): 2498-2502. <https://doi.org/10.1002/eji.201141717>.
- Flippe, Léa, Séverine Bézie, Ignacio Anegón, et Carole Guillonnet. s. d. « Future Prospects for CD8+ Regulatory T Cells in Immune Tolerance », 16.
- Flippe, Léa, Anne Gaignerie, Céline Sérazin, Olivier Baron, Xavier Saulquin, Maria Themeli, Carole Guillonnet, et Laurent David. 2020. « Rapid and Reproducible Differentiation of Hematopoietic and T Cell Progenitors From Pluripotent Stem Cells ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 577464. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.577464>.
- 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, Luke M. Williams, James L. Dooley, Andrew G. Farr, et Alexander Y. Rudensky. 2005. « Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3 ». *Immunity* 22 (3): 329-41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.016>.
- Freuchet, Antoine, Apolline Salama, Séverine Bézie, Laurent Tesson, Séverine Rémy, Romain Humeau, Hadrien Règue, et al. 2022. « IL-34 Deficiency Impairs FOXP3+ Treg Function in a Model of Autoimmune Colitis and Decreases Immune Tolerance Homeostasis ». *Clinical and Translational Medicine* 12 (8): e988. <https://doi.org/10.1002/ctm2.988>.
- García-González, Paulina, Gabriela Ubilla-Olguín, Diego Catalán, Katina Schinnerling, et Juan Carlos Aguillón. 2016. « Tolerogenic Dendritic Cells for Reprogramming of Lymphocyte Responses in Autoimmune Diseases ». *Autoimmunity Reviews* 15 (11): 1071-80. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.07.032>.
- Garnier, Anne-Sophie, Martin Planchais, Jérémie Riou, Clément Jacquemin, Laurence Ordonez, Jean-Paul Saint-André, Anne Croue, et al. 2019. « Pre-Transplant CD45RC Expression on Blood T Cells Differentiates Patients with Cancer and Rejection after Kidney Transplantation ». *PloS One* 14 (3): e0214321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214321>.
- Gershon, R. K., P. Cohen, R. Hencin, et S. A. Liebhaber. 1972. « Suppressor T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 108 (3): 586-90.
- Gershon, R. K., et K. Kondo. 1970. « Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes ». *Immunology* 18 (5): 723-37.
- Gille, Ilse, Frans H. J. Claas, Geert W. Haasnoot, Mirjam H. M. Heemskerk, et Sebastiaan Heidt. 2022. « Chimeric Antigen Receptor (CAR) Regulatory T-Cells in Solid Organ Transplantation ». *Frontiers in Immunology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.874157>.
- 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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.1783>.
- Graßhoff, Hanna, Sara Comdühr, Luisa R. Monne, Antje Müller, Peter Lamprecht, Gabriela Riemekasten, et Jens Y. Humrich. 2021. « Low-Dose IL-2 Therapy in Autoimmune and Rheumatic Diseases ». *Frontiers in Immunology* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.648408>.
- Graydon, Colin G., Shifa Mohideen, et Keith R. Fowke. 2021. « LAG3's Enigmatic Mechanism of Action ». *Frontiers in Immunology* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.615317>.
- Gregori, Silvia, Giada Amodio, Federica Quattrone, et Paola Panina-Bordignon. 2015. « HLA-G Orchestrates the Early Interaction of Human Trophoblasts with the Maternal Niche ». *Frontiers in Immunology* 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00128>.
- Gregori, Silvia, et Maria Grazia Roncarolo. 2018. « Engineered T Regulatory Type 1 Cells for Clinical Application ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00233>.
- Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Löhden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, et al. 1995. « The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor Is the Prime Activating Ligand of the 80 KDa Tumor Necrosis Factor Receptor ». *Cell* 83 (5): 793-802. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90192-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90192-2).
- Grell, Matthias, Eleni Douni, Harald Wajant, Matthias Löhden, Matthias Clauss, Beate Maxeiner, Spiros Georgopoulos, et al. 1995. « The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor Is the Prime Activating Ligand of the 80 KDa Tumor Necrosis Factor Receptor ». *Cell* 83 (5): 793-802. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90192-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90192-2).
- Grossman, William J., James W. Verbsky, Winfried Barchet, Marco Colonna, John P. Atkinson, et Timothy J. Ley. 2004. « Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death ». *Immunity* 21 (4): 589-601. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.09.002>.
- Groux, Hervé, Anne O'Garra, Mike Bigler, Matthieu Rouleau, Svetlana Antonenko, Jan E. de Vries, et Maria Grazia Roncarolo. 1997. « A CD4+T-Cell Subset Inhibits Antigen-Specific T-Cell Responses and Prevents Colitis ». *Nature* 389 (6652): 737-42. <https://doi.org/10.1038/39614>.
- Gu, Jian, Xuhao Ni, Xiongxiang Pan, Hao Lu, Yunjie Lu, Jie Zhao, Song Guo Zheng, Keli L. Hippen, Xuehao Wang, et Ling Lu. 2017. « Human CD39hi Regulatory T Cells Present Stronger Stability and Function under Inflammatory Conditions ». *Cellular & Molecular Immunology* 14 (6): 521-28. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.30>.
- Guillonnet, Carole, Marcelo Hill, François-Xavier Hubert, Elise Chiffolleau, Caroline Hervé, Xian-Liang Li, Michèle Heslan, et al. 2007. « CD40Ig Treatment Results in Allograft Acceptance Mediated by CD8CD45RC T Cells, IFN-Gamma, and Indoleamine 2,3-Dioxygenase ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (4): 1096-1106. <https://doi.org/10.1172/JCI28801>.
- Guillot, Cécile, Carole Guillonnet, Patrick Mathieu, Christian A. Gerdes, Séverine Ménoret, Cécile Braudeau, Laurent Tesson, et al. 2002. « Prolonged Blockade of CD40-CD40 Ligand Interactions by Gene Transfer of CD40Ig Results in Long-Term Heart Allograft Survival and Donor-Specific Hyporesponsiveness, but Does Not Prevent Chronic Rejection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (4): 1600-1609. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1600>.

- Hori, Shohei, Takashi Nomura, et Shimon Sakaguchi. 2003. « Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3 ». *Science* 299 (5609): 1057-61. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>.
- Hu, Dan, Koichi Ikizawa, Linrong Lu, Marie E. Sanchirico, Mari L. Shinohara, et Harvey Cantor. 2004. « Analysis of Regulatory CD8 T Cells in Qa-1-Deficient Mice ». *Nature Immunology* 5 (5): 516-23. <https://doi.org/10.1038/ni1063>.
- Huang, Ning, Hongbin Chi, et Jie Qiao. 2020. « Role of Regulatory T Cells in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Healthy Pregnancies and Reproductive Diseases ». *Frontiers in Immunology* 11 (juin): 1023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01023>.
- Huff, Wei X., Jae Hyun Kwon, Mario Henriquez, Kaleigh Fetcko, et Mahua Dey. 2019. « The Evolving Role of CD8+CD28- Immunosenescent T Cells in Cancer Immunology ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11): E2810. <https://doi.org/10.3390/ijms20112810>.
- Huter, Eva N., George A. Punkosdy, Deborah D. Glass, Lily I. Cheng, Jerrold M. Ward, et Ethan M. Shevach. 2008. « TGF-Beta-Induced Foxp3+ Regulatory T Cells Rescue Scurfy Mice ». *European Journal of Immunology* 38 (7): 1814-21. <https://doi.org/10.1002/eji.200838346>.
- Ishikawa, Y., K. Kashiwase, T. Akaza, Y. Morishima, H. Inoko, T. Sasazuki, Y. Kodera, et T. Juji. 2002. « Polymorphisms in TNFA and TNFR2 Affect Outcome of Unrelated Bone Marrow Transplantation ». *Bone Marrow Transplantation* 29 (7): 569-75. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703409>.
- J, Crespo, Sun H, Welling Th, Tian Z, et Zou W. 2013. « T Cell Anergy, Exhaustion, Senescence, and Stemness in the Tumor Microenvironment ». *Current Opinion in Immunology* 25 (2). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.12.003>.
- Jablonska, E. 2002. « Effect of Soluble Interleukin-6 Receptor Alpha and Interleukin-6 Secreted by Polymorphonuclear Leukocytes on Tumor Necrosis Factor-Alpha Expression and Its Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells ». *Mediators of Inflammation* 11 (5): 325-28. <https://doi.org/10.1080/09629350210000015746>.
- Jiang, Hong, et Leonard Chess. 2008. « Qa-1/HLA-E-Restricted Regulatory CD8+ T Cells and Self-Nonself Discrimination: An Essay on Peripheral T-Cell Regulation ». *Human Immunology* 69 (11): 721-27. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.08.279>.
- Jørgensen, Nanna, Gry Persson, et Thomas Hviid. 2019. « The Tolerogenic Function of Regulatory T Cells in Pregnancy and Cancer ». *Frontiers in Immunology* 10 (mai): 911. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00911>.
- Josefowicz, Steven Z., Li-Fan Lu, et Alexander Y. Rudensky. 2012. « Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function ». *Annual Review of Immunology* 30: 531-64. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>.
- Kelly-Rogers, Jane, Laura Madrigal-Estebas, Tony O'Connor, et Derek G. Doherty. 2006. « Activation-Induced Expression of CD56 by T Cells Is Associated with a Reprogramming of Cytolytic Activity and Cytokine Secretion Profile in Vitro ». *Human Immunology* 67 (11): 863-73. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.08.292>.
- Khalil, Ahmad M. 2020. « The genome editing revolution: review ». *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology* 18 (octobre): 68. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>.
- Khan, M. Firoze, et Hui Wang. 2020. « Environmental Exposures and Autoimmune Diseases: Contribution of Gut Microbiome ». *Frontiers in Immunology* 10 (janvier): 3094. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03094>.
- Kim, Hye-Jung, R. Anthony Barnitz, Taras Kreslavsky, Flavian D. Brown, Howell Moffett, Madeleine E. Lemieux, Yasemin Kaygusuz, et al. 2015. « Stable Inhibitory Activity of

- Regulatory T Cells Requires the Transcription Factor Helios ». *Science (New York, N.Y.)* 350 (6258): 334-39. <https://doi.org/10.1126/science.aad0616>.
- Kim, Hye-Jung, et Harvey Cantor. 2011. « Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8+ regulatory T cells ». *Seminars in immunology* 23 (6): 446-52. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.06.001>.
- Kim, Hye-Jung, Bert Verbinnen, Xiaolei Tang, Linrong Lu, et Harvey Cantor. 2010. « Inhibition of Follicular T-Helper Cells by CD8(+) Regulatory T Cells Is Essential for Self Tolerance ». *Nature* 467 (7313): 328-32. <https://doi.org/10.1038/nature09370>.
- Kiniwa, Yukiko, Yoshihiro Miyahara, Helen Y. Wang, Weiyi Peng, Guangyong Peng, Thomas M. Wheeler, Timothy C. Thompson, Lloyd J. Old, et Rong-Fu Wang. 2007. « CD8+ Foxp3+ Regulatory T Cells Mediate Immunosuppression in Prostate Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (23): 6947-58. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0842>.
- Kirby, Trevor O., et Javier Ochoa-Repáraz. 2018. « The Gut Microbiome in Multiple Sclerosis: A Potential Therapeutic Avenue ». *Medical Sciences* 6 (3): 69. <https://doi.org/10.3390/medsci6030069>.
- Klein, Ludger, Bruno Kyewski, Paul M. Allen, et Kristin A. Hogquist. 2014. « Positive and Negative Selection of the T Cell Repertoire: What Thymocytes See (and Don't See) ». *Nature Reviews Immunology* 14 (6): 377-91. <https://doi.org/10.1038/nri3667>.
- Krangel, Michael S. 2009. « Mechanics of T cell receptor gene rearrangement ». *Current opinion in immunology* 21 (2): 133-39. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.03.009>.
- Kretschmer, Karsten, Irina Apostolou, Daniel Hawiger, Khashayarsha Khazaie, Michel C. Nussenzweig, et Harald von Boehmer. 2005. « Inducing and Expanding Regulatory T Cell Populations by Foreign Antigen ». *Nature Immunology* 6 (12): 1219-27. <https://doi.org/10.1038/ni1265>.
- Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert, et S. D. Lu. 1988. « A Novel Form of TNF/Cachectin Is a Cell Surface Cytotoxic Transmembrane Protein: Ramifications for the Complex Physiology of TNF ». *Cell* 53 (1): 45-53. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90486-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90486-2).
- Kühn, R., J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, et W. Müller. 1993. « Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis ». *Cell* 75 (2): 263-74. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80068-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80068-p).
- Kulkarni, A. B., C. G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K. C. Flanders, A. B. Roberts, M. B. Sporn, J. M. Ward, et S. Karlsson. 1993. « Transforming Growth Factor Beta 1 Null Mutation in Mice Causes Excessive Inflammatory Response and Early Death ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (2): 770-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.770>.
- Lafaille, Maria A. Curotto de, Andreia C. Lino, Nino Kutchukhidze, et Juan J. Lafaille. 2004. « CD25- T Cells Generate CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion ». *The Journal of Immunology* 173 (12): 7259-68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7259>.
- Lemerle, Marie, Anne-Sophie Garnier, Martin Planchais, Benoit Brilland, Jean-François Subra, Odile Blanchet, Simon Blanchard, Anne Croue, Agnès Dubeau, et Jean-François Augusto. 2019. « CD45RC Expression of Circulating CD8+ T Cells Predicts Acute Allograft Rejection: A Cohort Study of 128 Kidney Transplant Patients ». *Journal of Clinical Medicine* 8 (8): E1147. <https://doi.org/10.3390/jcm8081147>.
- Levine, Andrew G., Alejandra Mendoza, Saskia Hemmers, Bruno Molledo, Rachel E. Niec, Michail Schizas, Beatrice E. Hoyos, et al. 2017. « Stability and Function of Regulatory T Cells Expressing the Transcription Factor T-Bet ». *Nature* 546 (7658): 421-25. <https://doi.org/10.1038/nature22360>.

- Li, Hongyi, Yang Yang, Weiqi Hong, Mengyuan Huang, Min Wu, et Xia Zhao. 2020. « Applications of Genome Editing Technology in the Targeted Therapy of Human Diseases: Mechanisms, Advances and Prospects ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 1-23. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>.
- Li, Jing, Maxim Zaslavsky, Yapeng Su, Jing Guo, Michael J. Sikora, Vincent van Unen, Asbjørn Christophersen, et al. 2022. « KIR+CD8+ T Cells Suppress Pathogenic T Cells and Are Active in Autoimmune Diseases and COVID-19 ». *Science (New York, N.Y.)* 376 (6590): eabi9591. <https://doi.org/10.1126/science.abi9591>.
- Li, X. L., S. Menoret, S. Bezie, L. Caron, D. Chabannes, M. Hill, F. Halary, et al. 2010. « Mechanism and Localization of CD8 Regulatory T Cells in a Heart Transplant Model of Tolerance ». *The Journal of Immunology* 185 (2): 823-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000120>.
- Liang, Bailin, Debra B Gardner, Don E Griswold, Peter J Bugelski, et Xiao Yu R Song. 2006. « Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus ». *Immunology* 119 (3): 296-305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02433.x>.
- Liang, Bitao, Craig Workman, Janine Lee, Claude Chew, Benjamin M. Dale, Lucrezia Colonna, Marcella Flores, et al. 2008. « Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (9): 5916-26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5916>.
- 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. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.92>.
- Liu, Huazhen, Yeshu Wang, Qiaohuang Zeng, Yu-Qun Zeng, Chun-Ling Liang, Feifei Qiu, Hong Nie, et Zhenhua Dai. 2017. « Suppression of allograft rejection by CD8+CD122+PD-1+ Tregs is dictated by their Fas ligand-initiated killing of effector T cells versus Fas-mediated own apoptosis ». *Oncotarget* 8 (15): 24187-95. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15551>.
- 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 ». *Journal of Experimental Medicine* 203 (7): 1701-11. <https://doi.org/10.1084/jem.20060772>.
- Luo, Xin M., Michael R. Edwards, Qinghui Mu, Yang Yu, Miranda D. Vieson, Christopher M. Reilly, S. Ansar Ahmed, et Adegbeniga A. Bankole. 2018. « Gut Microbiota in Human Systemic Lupus Erythematosus and a Mouse Model of Lupus ». *Applied and Environmental Microbiology* 84 (4): e02288-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02288-17>.
- Maeda, Yuichi, Takashi Kurakawa, Eiji Umemoto, Daisuke Motooka, Yoshinaga Ito, Kazuyoshi Gotoh, Keiji Hirota, et al. 2016. « Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68 (11): 2646-61. <https://doi.org/10.1002/art.39783>.
- Maher, John, Renier J. Brentjens, Gertrude Gunset, Isabelle Rivière, et Michel Sadelain. 2002. « Human T-Lymphocyte Cytotoxicity and Proliferation Directed by a Single Chimeric TCR ζ /CD28 Receptor ». *Nature Biotechnology* 20 (1): 70-75. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-70>.
- Mahic, Milada, Karen Henjum, Sheraz Yaqub, Bjørn Atle Bjørnbeth, Knut Martin Torgersen, Kjetil Taskén, et Einar Martin Aandahl. 2008. « Generation of Highly Suppressive Adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells by Continuous Antigen

- Stimulation ». *European Journal of Immunology* 38 (3): 640-46. <https://doi.org/10.1002/eji.200737529>.
- Mahmud, Shawn A., Luke S. Manlove, Heather M. Schmitz, Yan Xing, Yanyan Wang, David L. Owen, Jason M. Schenkel, et al. 2014. « Tumor necrosis factor receptor superfamily costimulation couples T cell receptor signal strength to thymic regulatory T cell differentiation ». *Nature immunology* 15 (5): 473-81. <https://doi.org/10.1038/ni.2849>.
- Marek-Trzonkowska, Natalia, Małgorzata Myśliwiec, Anita Dobyszuk, Marcelina Grabowska, Ilona Derkowska, Jolanta Juścińska, Radosław Owczuk, et al. 2014. « Therapy of Type 1 Diabetes with CD4(+)CD25(High)CD127-Regulatory T Cells Prolongs Survival of Pancreatic Islets - Results of One Year Follow-Up ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 153 (1): 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.03.016>.
- Marek-Trzonkowska, Natalia, Malgorzata Mysliwiec, Anita Dobyszuk, Marcelina Grabowska, Ilona Techmanska, Jolanta Juscinska, Magdalena A. Wujtewicz, et al. 2012. « Administration of CD4+CD25highCD127- Regulatory T Cells Preserves β -Cell Function in Type 1 Diabetes in Children ». *Diabetes Care* 35 (9): 1817-20. <https://doi.org/10.2337/dc12-0038>.
- Marson, Alexander, William J. Housley, et David A. Hafler. 2015. « Genetic Basis of Autoimmunity ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (6): 2234-41. <https://doi.org/10.1172/JCI78086>.
- 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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3025>.
- Ménoret, Séverine, Laurent Tesson, Séverine Remy, Victor Gourain, Céline Sérazin, Claire Usal, Aude Guiffes, et al. 2021. « CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells Characterization in the Rat Using a Unique Transgenic Foxp3-EGFP Model ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.09.471889>.
- Miliotou, Androulla N., et Lefkothea C. Papadopoulou. 2018. « CAR T-Cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy ». *Current Pharmaceutical Biotechnology* 19 (1): 5-18. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180418095526>.
- Milpied, Pierre, Amédée Renand, Julie Bruneau, Daniella A. Mendes-da-Cruz, Sébastien Jacquelin, Vahid Asnafi, Marie-Thérèse Rubio, Elizabeth MacIntyre, Yves Lepelletier, et Olivier Hermine. 2009. « Neuropilin-1 Is Not a Marker of Human Foxp3+ Treg ». *European Journal of Immunology* 39 (6): 1466-71. <https://doi.org/10.1002/eji.200839040>.
- Miragaia, Ricardo J., Tomás Gomes, Agnieszka Chomka, Laura Jardine, Angela Riedel, Ahmed N. Hegazy, Natasha Whibley, et al. 2019. « Single-Cell Transcriptomics of Regulatory T Cells Reveals Trajectories of Tissue Adaptation ». *Immunity* 50 (2): 493-504.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.001>.
- Mizoguchi, Atsushi, Emiko Mizoguchi, Hidetoshi Takedatsu, Richard S. Blumberg, et Atul K. Bhan. 2002. « Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation ». *Immunity* 16 (2): 219-30. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00274-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00274-1).
- Mori, L, S Iselin, G De Libero, et W Lesslauer. s. d. « Attenuation of Collagen-Induced Arthritis in 55-KDa TNF Receptor Type 1 (TNFR1)-IgG1-Treated and TNFR1-Deficient Mice. » *The Journal of Immunology*, 6.
- Musicki, Korana, Helen Briscoe, Stephen Tran, Warwick J. Britton, et Bernadette M. Saunders. 2006. « Differential Requirements for Soluble and Transmembrane Tumor Necrosis Factor in The Immunological Control of Primary and Secondary *Listeria*

- Monocytogenes* Infection ». *Infection and Immunity* 74 (6): 3180-89. <https://doi.org/10.1128/IAI.02004-05>.
- Ordenez, Laurence, Isabelle Bernard, Marianne Chabod, Jean-François Augusto, Valerie Lauwers-Cances, Christelle Cristini, Maria-Cristina Cuturi, Jean-François Subra, et Abdelhadi Saoudi. 2013. « A Higher Risk of Acute Rejection of Human Kidney Allografts Can Be Predicted from the Level of CD45RC Expressed by the Recipients' CD8 T Cells ». *PLOS ONE* 8 (7): e69791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069791>.
- Parodi, Alessia, Florinda Battaglia, Francesca Kalli, Francesca Ferrera, Giuseppina Conteduca, Samuele Tardito, Silvia Stringara, et al. 2013. « CD39 Is Highly Involved in Mediating the Suppression Activity of Tumor-Infiltrating CD8+ T Regulatory Lymphocytes ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62 (5): 851-62. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1392-z>.
- Peng, Liu-Sheng, Yuan Zhuang, Yun Shi, Yong-Liang Zhao, Ting-Ting Wang, Na Chen, Ping Cheng, et al. 2012. « Increased Tumor-Infiltrating CD8(+)Foxp3(+) T Lymphocytes Are Associated with Tumor Progression in Human Gastric Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 61 (11): 2183-92. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1277-6>.
- Perry, Justin S. A., Chan-Wang J. Lio, Andrew L. Kau, Katherine Nutsch, Zhuo Yang, Jeffrey I. Gordon, Kenneth M. Murphy, et Chyi-Song Hsieh. 2014. « Distinct Contributions of Aire and Antigen-Presenting-Cell Subsets to the Generation of Self-Tolerance in the Thymus ». *Immunity* 41 (3): 414-26. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.007>.
- Picarda, Elodie, Séverine Bézie, Laetitia Boucault, Elodie Autrusseau, Stéphanie Kilens, Dimitri Meistermann, Bernard Martinet, et al. 2017. « Transient Antibody Targeting of CD45RC Induces Transplant Tolerance and Potent Antigen-Specific Regulatory T Cells ». *JCI Insight* 2 (3). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90088>.
- Picarda, Elodie, Séverine Bézie, Vanessa Venturi, Klara Echasserieau, Emmanuel Mérieau, Aurélie Delhumeau, Karine Renaudin, et al. 2014. « MHC-Derived Allopeptide Activates TCR-Biased CD8+ Tregs and Suppresses Organ Rejection ». *Journal of Clinical Investigation* 124 (6): 2497-2512. <https://doi.org/10.1172/JCI71533>.
- Pierik, M., S. Vermeire, K. V. Steen, S. Joossens, G. Claessens, R. Vlietinck, et P. Rutgeerts. 2004. « Tumour Necrosis Factor-Alpha Receptor 1 and 2 Polymorphisms in Inflammatory Bowel Disease and Their Association with Response to Infliximab ». *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 20 (3): 303-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.01946.x>.
- Piguot, P F, G E Grau, C Vesin, H Loetscher, R Gentz, et W Lesslauer. s. d. « Evolution of Collagen Arthritis in Mice Is Arrested by Treatment with Anti-Tumour Necrosis Factor (TNF) Antibody or a Recombinant Soluble TNF Receptor », 5.
- Poli, Aurélie, Tatiana Michel, Maud Thérésine, Emmanuel Andrès, François Hentges, et Jacques Zimmer. 2009. « CD56bright Natural Killer (NK) Cells: An Important NK Cell Subset ». *Immunology* 126 (4): 458-65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x>.
- Pot, Caroline, Lionel Apetoh, et Vijay K. Kuchroo. 2011. « Type 1 Regulatory T Cells (Tr1) in Autoimmunity ». *Seminars in Immunology* 23 (3): 202-8. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.07.005>.
- Powrie, F., et D. Mason. 1990. « OX-22high CD4+ T Cells Induce Wasting Disease with Multiple Organ Pathology: Prevention by the OX-22low Subset ». *The Journal of Experimental Medicine* 172 (6): 1701-8. <https://doi.org/10.1084/jem.172.6.1701>.
- Probst-Kepper, M, R Geffers, A Kröger, N Viegas, C Erck, H-J Hecht, H Lünsdorf, et al. 2009. « GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells ». *Journal of*

- Cellular and Molecular Medicine* 13 (9b): 3343-57. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00782.x>.
- Qualai, Jamal, Lin-Xi Li, Jon Cantero, Antoni Tarrats, Marco Antonio Fernández, Lauro Sumoy, Annie Rodolosse, Stephen J. McSorley, et Meritxell Genescà. 2016. « Expression of CD11c Is Associated with Unconventional Activated T Cell Subsets with High Migratory Potential ». *PloS One* 11 (4): e0154253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154253>.
- Radner, Helga, et Daniel Aletaha. 2015. « Anti-TNF in Rheumatoid Arthritis: An Overview ». *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)* 165 (1-2): 3-9. <https://doi.org/10.1007/s10354-015-0344-y>.
- Read, Simon, Rebecca Greenwald, Ana Izcue, Nicholas Robinson, Didier Mandelbrot, Loise Francisco, Arlene H. Sharpe, et Fiona Powrie. 2006. « Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ Regulatory T Cells Abrogates Their Function In Vivo ». *The Journal of Immunology* 177 (7): 4376-83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4376>.
- Rifa'i, Muhaimin, Yoshiyuki Kawamoto, Izumi Nakashima, et Haruhiko Suzuki. 2004. « Essential Roles of CD8+CD122+ Regulatory T Cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis ». *The Journal of Experimental Medicine* 200 (9): 1123-34. <https://doi.org/10.1084/jem.20040395>.
- Rivas, Magali Noval, et Talal A. Chatila. 2016. « Regulatory T Cells in Allergic Diseases ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (3): 639-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.003>.
- Rojas, Manuel, Yhojan Rodríguez, Yeny Acosta-Ampudia, Diana M. Monsalve, Chengsong Zhu, Quan-Zhen Li, Carolina Ramírez-Santana, et Juan-Manuel Anaya. 2022. « Autoimmunity Is a Hallmark of Post-COVID Syndrome ». *Journal of Translational Medicine* 20 (1): 129. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03328-4>.
- Roon, J. A. G. van, S. A. Y. Hartgring, K. M. G. van der Wurff-Jacobs, J. W. J. Bijlsma, et F. P. J. G. Lafeber. 2010. « Numbers of CD25+Foxp3+ T Cells That Lack the IL-7 Receptor Are Increased Intra-Articularly and Have Impaired Suppressive Function in RA Patients ». *Rheumatology* 49 (11): 2084-89. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq237>.
- Rosenblum, Michael D., Kelly A. Remedios, et Abul K. Abbas. 2015. « Mechanisms of Human Autoimmunity ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (6): 2228-33. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>.
- Rosenzwajg, Michelle, Roberta Lorenzon, Patrice Cacoub, Hang Phuong Pham, Fabien Pitoiset, Karim El Soufi, Claire Ribet, et al. 2019. « Immunological and Clinical Effects of Low-Dose Interleukin-2 across 11 Autoimmune Diseases in a Single, Open Clinical Trial ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 78 (2): 209-17. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214229>.
- Safinia, Niloufar, Cristiano Scotta, Trishan Vaikunthanathan, Robert I. Lechler, et Giovanna Lombardi. 2015. « Regulatory T Cells: Serious Contenders in the Promise for Immunological Tolerance in Transplantation ». *Frontiers in Immunology* 6 (août): 438. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00438>.
- 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. » *The Journal of Immunology* 155 (3): 1151-64.
- Saligrama, Naresha, Fan Zhao, Michael J. Sikora, William S. Serratelli, Ricardo A. Fernandes, David M. Louis, Winnie Yao, et al. 2019. « Opposing T Cell Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Nature* 572 (7770): 481-87. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1467-x>.

- Sartor, R. Balfour. 2006. « Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis ». *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology* 3 (7): 390-407. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0528>.
- Sashio, Hiroko, Kazuo Tamura, Reiko Ito, Yoshihiro Yamamoto, Hiroko Bamba, Tadashi Kosaka, Shin Fukui, et al. 2002. « Polymorphisms of the TNF Gene and the TNF Receptor Superfamily Member 1B Gene Are Associated with Susceptibility to Ulcerative Colitis and Crohn's Disease, Respectively ». *Immunogenetics* 53 (12): 1020-27. <https://doi.org/10.1007/s00251-001-0423-7>.
- Sawitzki, Birgit, Paul N. Harden, Petra Reinke, Aurélie Moreau, James A. Hutchinson, David S. Game, Qizhi Tang, et al. 2020. « Regulatory Cell Therapy in Kidney Transplantation (The ONE Study): A Harmonised Design and Analysis of Seven Non-Randomised, Single-Arm, Phase 1/2A Trials ». *Lancet (London, England)* 395 (10237): 1627-39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30167-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30167-7).
- Schubert, M. -L., M. Schmitt, L. Wang, C. A. Ramos, K. Jordan, C. Müller-Tidow, et P. Dreger. 2021. « Side-Effect Management of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy ». *Annals of Oncology* 32 (1): 34-48. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.10.478>.
- Schwarz, K., G. H. Gauss, L. Ludwig, U. Pannicke, Z. Li, D. Lindner, W. Friedrich, et al. 1996. « RAG Mutations in Human B Cell-Negative SCID ». *Science (New York, N.Y.)* 274 (5284): 97-99. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.97>.
- Sheng, Huiming, Idania Marrero, Igor Maricic, Shaohsuan S. Fanchiang, Sai Zhang, Derek B. Sant'Angelo, et Vipin Kumar. 2019. « Distinct PLZF+CD8 $\alpha\alpha$ + Unconventional T Cells Enriched in Liver Use a Cytotoxic Mechanism to Limit Autoimmunity ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 203 (8): 2150-62. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900832>.
- Shimokawa, Chikako, Tamotsu Kato, Tadashi Takeuchi, Noriyasu Ohshima, Takao Furuki, Yoshiaki Ohtsu, Kazutomo Suzue, et al. 2020. « CD8+ Regulatory T Cells Are Critical in Prevention of Autoimmune-Mediated Diabetes ». *Nature Communications* 11 (1): 1922. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15857-x>.
- Sidaway, Peter. 2017. « Neuropilin-1 Is Required for Treg Stability ». *Nature Reviews Clinical Oncology* 14 (8): 458-458. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.90>.
- Sjaastad, Louisa E., David L. Owen, Sean I. Tracy, et Michael A. Farrar. 2021. « Phenotypic and Functional Diversity in Regulatory T Cells ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.715901>.
- Smyth, Deborah, Jason D. Cooper, Joanne E. Collins, Joanne M. Heward, Jayne A. Franklyn, Joanna M. M. Howson, Adrian Vella, et al. 2004. « Replication of an Association between the Lymphoid Tyrosine Phosphatase Locus (LYP/PTPN22) with Type 1 Diabetes, and Evidence for Its Role as a General Autoimmunity Locus ». *Diabetes* 53 (11): 3020-23. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.11.3020>.
- Spira, Alexander I., Aung Naing, Hani M. Babiker, Mitesh J. Borad, Elena Garralda, Konstantinos Leventakos, Peter John Oppelt, et al. 2022. « Phase I study of HFB200301, a first-in-class TNFR2 agonist monoclonal antibody in patients with solid tumors selected via Drug Intelligent Science (DIS). » *Journal of Clinical Oncology* 40 (16_suppl): TPS2670-TPS2670. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.TPS2670.
- Spitzer, Matthew H., et Garry P. Nolan. 2016. « Mass Cytometry: Single Cells, Many Features ». *Cell* 165 (4): 780-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019>.
- Strauss, Laura, Christoph Bergmann, Miroslaw Szczepanski, William Gooding, Jonas T. Johnson, et Theresa L. Whiteside. 2007. « A Unique Subset of CD4+CD25highFoxp3+ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-Beta1 Mediates

- Suppression in the Tumor Microenvironment ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (15 Pt 1): 4345-54. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0472>.
- Strioga, Marius, Vita Pasukoniene, et Dainius Characiejus. 2011. « CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T Cells and Their Role in Health and Disease ». *Immunology* 134 (1): 17-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x>.
- Szabo, Susanne J., Sean T. Kim, Gina L. Costa, Xiankui Zhang, C. Garrison Fathman, et Laurie H. Glimcher. 2000. « A Novel Transcription Factor, T-Bet, Directs Th1 Lineage Commitment ». *Cell* 100 (6): 655-69. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3).
- Tahvildari, Maryam, et Reza Dana. 2019. « Low-Dose IL-2 Therapy in Transplantation, Autoimmunity, and Inflammatory Diseases ». *The Journal of Immunology* 203 (11): 2749-55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900733>.
- Takaba, Hiroyuki, Yasuyuki Morishita, Yoshihiko Tomofuji, Lynett Danks, Takeshi Nitta, Noriko Komatsu, Tatsuhiko Kodama, et Hiroshi Takayanagi. 2015. « Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance ». *Cell* 163 (4): 975-87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.013>.
- Tang, Fuchou, Catalin Barbacioru, Yangzhou Wang, Ellen Nordman, Clarence Lee, Nanlan Xu, Xiaohui Wang, et al. 2009. « MRNA-Seq Whole-Transcriptome Analysis of a Single Cell ». *Nature Methods* 6 (5): 377-82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>.
- Tang, P., null Hung M-C, et J. Klostergaard. 1996. « Human Pro-Tumor Necrosis Factor Is a Homotrimer ». *Biochemistry* 35 (25): 8216-25. <https://doi.org/10.1021/bi952182t>.
- Thiruppathi, Muthusamy, Julie Rowin, Qin Li Jiang, Jian Rong Sheng, Bellur S. Prabhakar, et Matthew N. Meriglioli. 2012. « Functional Defect in Regulatory T Cells in Myasthenia Gravis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1274 (décembre): 68-76. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06840.x>.
- Thornton, Angela M., Patricia E. Korty, 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>.
- Todd, John A., Marina Evangelou, Antony J. Cutler, Marcin L. Pekalski, Neil M. Walker, Helen E. Stevens, Linsey Porter, et al. 2016. « Regulatory T Cell Responses in Participants with Type 1 Diabetes after a Single Dose of Interleukin-2: A Non-Randomised, Open Label, Adaptive Dose-Finding Trial ». Édité par Tom W.J. Huizinga. *PLOS Medicine* 13 (10): e1002139. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002139>.
- Todo-Bom, A., A. Mota-Pinto, V. Alves, et M. Santos-Rosa. 2012. « Aging and Asthma - Changes in CD45RA, CD29 and CD95 T Cells Subsets ». *Allergologia Et Immunopathologia* 40 (1): 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2011.01.002>.
- Torres, David, Laure Janot, Valerie F.J. Quesniaux, Sergei I. Grivennikov, Isabelle Maillet, Jonathon D. Sedgwick, Bernhard Ryffel, et Francois Erard. 2005. « Membrane Tumor Necrosis Factor Confers Partial Protection to Listeria Infection ». *The American Journal of Pathology* 167 (6): 1677-87. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61250-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61250-3).
- Torrey, Heather, Willem M. Kühtreiber, Yoshiaki Okubo, Lisa Tran, Katherine Case, Hui Zheng, Eva Vanamee, et Denise L. Faustman. 2020. « A Novel TNFR2 Agonist Antibody Expands Highly Potent Regulatory T Cells ». *Science Signaling* 13 (661): eaba9600. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aba9600>.
- Tran, Dat Q., John Andersson, Rui Wang, Heather Ramsey, Derya Unutmaz, et Ethan M. Shevach. 2009. « GARP (LRRC32) Is Essential for the Surface Expression of Latent TGF-Beta on Platelets and Activated FOXP3+ Regulatory T Cells ». *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (32): 13445-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901944106>.
- Tsaknaridis, Laura, Leslie Spencer, Nicole Culbertson, Kevin Hicks, Dorian LaTocha, Yuan K. Chou, Ruth H. Whitham, et al. 2003. « Functional Assay for Human CD4+CD25+ Treg Cells Reveals an Age-Dependent Loss of Suppressive Activity ». *Journal of Neuroscience Research* 74 (2): 296-308. <https://doi.org/10.1002/jnr.10766>.
- Tsukishiro, Takashi, Albert D. Donnenberg, et Theresa L. Whiteside. 2003. « Rapid Turnover of the CD8(+)CD28(-) T-Cell Subset of Effector Cells in the Circulation of Patients with Head and Neck Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 52 (10): 599-607. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0395-6>.
- Uss, Elena, Ajda T. Rowshani, Berend Hooibrink, Neubury M. Lardy, René A. W. van Lier, et Ineke J. M. ten Berge. 2006. « CD103 Is a Marker for Alloantigen-Induced Regulatory CD8+ T Cells ». *The Journal of Immunology* 177 (5): 2775-83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.2775>.
- Vanamee, Éva S., et Denise L. Faustman. 2018. « Structural Principles of Tumor Necrosis Factor Superfamily Signaling ». *Science Signaling* 11 (511): eaao4910. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao4910>.
- Vasanthi, Pallinti, Ganesan Nalini, et G. Rajasekhar. 2007. « Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Rheumatoid Arthritis: A Review ». *APLAR Journal of Rheumatology* 10 (4): 270-74. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8077.2007.00305.x>.
- 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>.
- Wajant, H, K Pfizenmaier, et P Scheurich. 2003. « Tumor Necrosis Factor Signaling ». *Cell Death & Differentiation* 10 (1): 45-65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>.
- Walker, L J, H Tharmalingam, et P Klenerman. 2014. « The Rise and Fall of MAIT Cells with Age ». *Scandinavian Journal of Immunology* 80 (6): 462-63. <https://doi.org/10.1111/sji.12237>.
- Wang, Lifeng, Fu-Sheng Wang, et M. Eric Gershwin. 2015. « Human Autoimmune Diseases: A Comprehensive Update ». *Journal of Internal Medicine* 278 (4): 369-95. <https://doi.org/10.1111/joim.12395>.
- Warunek, Jordan, Richard M. Jin, Sarah J. Blair, Matthew Garis, Brandon Marzullo, et Elizabeth A. Wohlfert. 2021. « Tbet Expression by Regulatory T Cells Is Needed to Protect against Th1-Mediated Immunopathology during Toxoplasma Infection in Mice ». *ImmunoHorizons* 5 (12): 931-43. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2100080>.
- Wei, Shuang, Iona Kryczek, Linhua Zou, Ben Daniel, Pui Cheng, Peter Mottram, Tyler Curiel, Andrzej Lange, et Weiping Zou. 2005. « Plasmacytoid Dendritic Cells Induce CD8+ Regulatory T Cells In Human Ovarian Carcinoma ». *Cancer research* 65 (juillet): 5020-26. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4043>.
- Weiss, Jonathan M., Angelina M. Bilate, Michael Gobert, Yi Ding, Maria A. Curotto de Lafaille, Christopher N. Parkhurst, Huizhong Xiong, et al. 2012. « Neuropilin 1 Is Expressed on Thymus-Derived Natural Regulatory T Cells, but Not Mucosa-Generated Induced Foxp3+ T Reg Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 209 (10): 1723-42, S1. <https://doi.org/10.1084/jem.20120914>.
- Wellcome Trust Case Control Consortium. 2007. « Genome-Wide Association Study of 14,000 Cases of Seven Common Diseases and 3,000 Shared Controls ». *Nature* 447 (7145): 661-78. <https://doi.org/10.1038/nature05911>.

- Wieczorek, Marek, Esam T. Abualrous, Jana Sticht, Miguel Álvaro-Benito, Sebastian Stolzenberg, Frank Noé, et Christian Freund. 2017. « Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00292>.
- Xing, Yan, et Kristin A. Hogquist. 2012. « T-Cell Tolerance: Central and Peripheral ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (6): a006957. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006957>.
- 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>.
- Xystrakis, Emmanuel, Anne S. Dejean, Isabelle Bernard, Philippe Druet, Roland Liblau, Daniel Gonzalez-Dunia, et Abdelhadi Saoudi. 2004. « Identification of a Novel Natural Regulatory CD8 T-Cell Subset and Analysis of Its Mechanism of Regulation ». *Blood* 104 (10): 3294-3301. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1214>.
- Yang, Sujuan, Julie Wang, David Douglass Brand, et Song Guo Zheng. 2018. « Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications ». *Frontiers in Immunology* 9 (avril): 784. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00784>.
- Yao, Tony, Parisa Shooshtari, et S. M. Mansour Haeryfar. 2020. « Leveraging Public Single-Cell and Bulk Transcriptomic Datasets to Delineate MAIT Cell Roles and Phenotypic Characteristics in Human Malignancies ». *Frontiers in Immunology* 11 (juillet): 1691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01691>.
- Ye, Lin-Lin, Xiao-Shan Wei, Min Zhang, Yi-Ran Niu, et Qiong Zhou. 2018. « The Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in CD8+ Regulatory T Cells and CD8+ Effector T Cells ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00583>.
- Zemmour, David, Rapolas Zilionis, Evgeny Kiner, Allon M. Klein, Diane Mathis, et Christophe Benoist. 2018. « Single-Cell Gene Expression Reveals a Landscape of Regulatory T Cell Phenotypes Shaped by the TCR ». *Nature Immunology* 19 (3): 291-301. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0051-0>.
- Zenewicz, Lauren A., Clara Abraham, Richard A. Flavell, et Judy H. Cho. 2010. « Unraveling the Genetics of Autoimmunity ». *Cell* 140 (6): 791-97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.003>.
- Zhang, Qunfang, Weihui Lu, Chun-Ling Liang, Yuchao Chen, Huazhen Liu, Feifei Qiu, et Zhenhua Dai. 2018. « Chimeric Antigen Receptor (CAR) Treg: A Promising Approach to Inducing Immunological Tolerance ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02359>.
- Zola, H., L. Flego, et H. Weedon. 1993. « Expression of Membrane Receptor for Tumour Necrosis Factor on Human Blood Lymphocytes ». *Immunology and Cell Biology* 71 (Pt 4) (août): 281-88. <https://doi.org/10.1038/icb.1993.33>.

Abstract:

CD8⁺ regulatory T cells (Tregs) were the first suppressive cells reported in 1970, but they were put aside for years due to a lack of markers to properly define them. Our team demonstrated that CD8⁺ Tregs identified by low and/or negative expression of CD45RC, one the isoforms of the CD45 molecule, show potent suppressive activity *in vitro* and *in vivo*, while cells expressing high levels of CD45RC do not. Herein, we addressed the heterogeneity within CD8⁺ T lymphocytes, particularly in CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs and identified new markers. These analyses enabled the characterization of the transcriptomic heterogeneity at a single cell level from non-stimulated total CD8⁺ T cells and allowed definition of regulatory CD8⁺CD45RC^{low/-} Treg subsets. Functional analysis using cell sorting and suppressive assays highlighted the suppressive potential of the CD8⁺CD45RC^{low/-}TNFR2⁺CD29^{low} Tregs subset. To date, to our knowledge, this is the largest characterization study of human CD8⁺ Tregs, this huge data resource will help in the current revival of CD8⁺ Tregs in research, will improve our understanding of T cell heterogeneity and will help translate CD8⁺ Tregs to the clinic.

Résumé :

Les cellules T régulatrices CD8⁺ (Tregs) ont été les premières cellules suppressives signalées en 1970, mais elles ont été mises de côté pendant des années en raison du manque de marqueurs permettant de les définir correctement. Notre équipe a démontré que les Tregs CD8⁺ identifiés par une expression faible et/ou négative de CD45RC, une des isoformes de la molécule CD45, montrent une puissante activité suppressive *in vitro* et *in vivo*, alors que les cellules exprimant des niveaux élevés de CD45RC ne le font pas. Dans cet article, nous nous sommes penchés sur l'hétérogénéité au sein des lymphocytes T CD8⁺, en particulier dans les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} et avons identifié de nouveaux marqueurs. Ces analyses ont permis de caractériser l'hétérogénéité transcriptomique au niveau d'une seule cellule à partir de cellules T CD8⁺ totales non stimulées et de définir des sous-ensembles de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} régulateurs. Une analyse fonctionnelle utilisant le tri cellulaire et des tests de suppression a mis en évidence le potentiel suppressif du sous-ensemble de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} TNFR2⁺CD29^{low}. À ce jour, à notre connaissance, il s'agit de la plus grande étude de caractérisation des Tregs CD8⁺ humains, cette énorme ressource de données aidera à la relance actuelle des Tregs CD8⁺ dans la recherche, améliorera notre compréhension de l'hétérogénéité des cellules T et aidera à conduire les Tregs CD8⁺ en clinique.

Titre : Raffinement de l'identité des lymphocytes T régulateurs CD8⁺ chez l'Homme grâce à l'utilisation des technologies multi-omiques

Mots clés : Immunologie, single cell RNA-seq, Lymphocytes T régulateurs CD8⁺

Resumé : Les cellules T régulatrices CD8⁺ (Tregs) ont été les premières cellules suppressives signalées en 1970, mais elles ont été mises de côté pendant des années en raison du manque de marqueurs permettant de les définir correctement. Notre équipe a démontré que les Tregs CD8⁺ identifiés par une expression faible et/ou négative de CD45RC, une des isoformes de la molécule CD45, montrent une puissante activité suppressive *in vitro* et *in vivo*, alors que les cellules exprimant des niveaux élevés de CD45RC ne le font pas. Dans cet article, nous nous sommes penchés sur l'hétérogénéité au sein des lymphocytes T CD8⁺, en particulier dans les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} et avons identifié de nouveaux marqueurs.

Ces analyses ont permis de caractériser l'hétérogénéité transcriptomique au niveau d'une seule cellule à partir de cellules T CD8⁺ totales non stimulées et de définir des sous-ensembles de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} régulateurs. Une analyse fonctionnelle utilisant le tri cellulaire et des tests de suppression a mis en évidence le potentiel suppressif du sous-ensemble de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} TNFR2⁺CD29^{low}. À ce jour, à notre connaissance, il s'agit de la plus grande étude de caractérisation des Tregs CD8⁺ humains, cette énorme ressource de données aidera à la relance actuelle des Tregs CD8⁺ dans la recherche, améliorera notre compréhension de l'hétérogénéité des cellules T et aidera à conduire les Tregs CD8⁺ en clinique.

Title: Refinement of CD8⁺ Tregs identity in human with multi-omics technologies

Keywords: Immunology, single cell RNA-seq, CD8⁺ regulatory T cells

Abstract: CD8⁺ regulatory T cells (Tregs) were the first suppressive cells reported in 1970, but they were put aside for years due to a lack of markers to properly define them. Our team demonstrated that CD8⁺ Tregs identified by low and/or negative expression of CD45RC, one the isoforms of the CD45 molecule, show potent suppressive activity *in vitro* and *in vivo*, while cells expressing high levels of CD45RC do not. Herein, we addressed the heterogeneity within CD8⁺ T lymphocytes, particularly in CD8⁺CD45RC^{low/-} Tregs and identified new markers. These analyses enabled the characterization of the transcriptomic heterogeneity at a single cell level from non-

stimulated total CD8⁺ T cells and allowed definition of regulatory CD8⁺CD45RC^{low/-} Treg subsets. Functional analysis using cell sorting and suppressive assays highlighted the suppressive potential of the CD8⁺CD45RC^{low/-} TNFR2⁺CD29^{low} Tregs subset. To date, to our knowledge, this is the largest characterization study of human CD8⁺ Tregs, this huge data resource will help in the current revival of CD8⁺ Tregs in research, will improve our understanding of T cell heterogeneity and will help translate CD8⁺ Tregs to the clinic.