



Les lymphocytes T CD4 régulateurs dans le cancer du sein, recrutement, enrichissement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et impact de l'axe de co-stimulation ICOS/ICOSL

Julien Faget

► To cite this version:

Julien Faget. Les lymphocytes T CD4 régulateurs dans le cancer du sein, recrutement, enrichissement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et impact de l'axe de co-stimulation ICOS/ICOSL. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10310. tel-00981636

HAL Id: tel-00981636

<https://theses.hal.science/tel-00981636>

Submitted on 22 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 310-2012

Année 2012

Thèse

Présentée

Devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale : Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

(Arrêté du 7 Août 2006)

Présenté et soutenue publiquement le 19 Décembre 2012

par

Julien Faget

**Les lymphocytes T CD4 régulateurs dans le cancer du sein,
recrutement, enrichissement par les cellules dendritiques
plasmacytoïdes et impact de l'axe de co-stimulation
ICOS/ICOSL**

Directeur de thèse : Christine Ménétrier-Caux

Jury :

Pr Christine Delprat *Président du jury*

Pr Joost Van Meerwijk *Rapporteur*

Dr Gilles Dadaglio *Rapporteur*

Dr Eric Tartour *Examineur*

Dr Bertrand Dubois *Examineur*

Dr Christine Ménétrier-Caux *Directeur de thèse*

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire
Vice-président du Conseil Scientifique
Secrétaire Général

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET
M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –
Charles Mérieux
UFR d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Administrateur provisoire : M. le Professeur
G. KIRKORIAN
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Directeur : Mme la Professeure C.
VINCIGUERRA.
Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
Département Biologie
Département Chimie Biochimie
Département GEP
Département Informatique
Département Mathématiques
Département Mécanique
Département Physique
Département Sciences de la Terre
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives
Observatoire de Lyon
Polytech Lyon
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Institut Universitaire de Formation des Maîtres
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Directeur : M. N. SIAUVE
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : Mme S. FLECK
Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI
Directeur : M. P. FOURNIER
Directeur : M. G. PIGNAULT
Directeur : M. C. VITON
Directeur : M. R. BERNARD
Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-
DESCHAMPS

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Professeur Joost Van Meerwijk et le Docteur Gilles Dadaglio qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail. L'ensemble de vos observations m'a permis d'améliorer substantiellement la qualité de ce manuscrit. Les efforts que vous m'avez demandés de réaliser m'ont donné la possibilité d'accroître mes connaissances ainsi que la clarté de ce document. Je remercie également, Christine Delprat, Bertrand Dubois et Eric Tartour d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, c'est un grand honneur pour moi d'être jugé par vous. J'adresse également un grand merci à Bertrand Dubois et à Benoît Salomon pour leur participation à mon comité de thèse, vos observations ont été pour moi une première confrontation de mon travail avec des scientifiques étrangers à mon Equipe et m'ont permis d'optimiser l'orientation de mon projet durant ces 3 années de thèse.

Christine, il est extrêmement difficile pour moi de trouver les mots pour te remercier comme il se devrait. La qualité du projet de recherche que tu as défini avec Michael avant mon arrivée en master 2, le temps que tu m'as accordé tout au long de ces quatre années, la liberté dont j'ai pu profiter lors de la conception de mes démarches expérimentales, les efforts que tu as toujours réalisés pour comprendre mon point de vue et me donner la chance d'apprendre de mes erreurs, ainsi que la tâche ingrate et récurrente qui consistait à bien vouloir corriger mes fautes d'orthographe ont été la clef des quelques réussites sur lesquelles je m'appuis pour prétendre devenir docteur. Si j'ai atteint chacun des objectifs que je m'étais fixé pour cette thèse, c'est à toi que je le dois. En effet, tu as accepté de me laisser faire de l'enseignement, tu m'as donné la possibilité de former Nicolas durant son master 2 et tu m'as même laissé m'essayer à l'expérimentation animale. C'est un bonheur sans commune mesure de finir cette thèse en sachant que le projet que nous avons développé continuera de donner ses fruits dans les mains de Nicolas et de Renaud. Evidemment, cela ce n'est que grâce à toi qui as su me porter, m'aiguiller pour m'amener à produire un travail d'une qualité suffisante. Nous n'avons pas toujours partagé les mêmes opinions, à vrai dire, je crois que nous sommes tous deux particulièrement têtus. Grâce à cela, mes échanges avec toi m'ont toujours fait réfléchir, ils m'ont appris beaucoup sur un plan scientifique et humain. Dans une carrière de chercheur, on ne peut avoir qu'un directeur de thèse (normalement) et je suis plus que convaincu que tu as été la meilleure personne pour me donner une chance de franchir la marche qui sépare le zoulou du collaborateur, le naïf de l'expérimenté et enfin l'étudiant du scientifique. Je sais aujourd'hui et je saurais toujours t'en être redevable. Merci

Comme les deux font la paire, c'est aussi grâce à toi Christophe que je peux aujourd'hui présenter cette thèse. Je me suis toujours senti petit face au papa des DC dérivées de progéniteurs CD34⁺. A mon sens l'ensemble de l'Equipe mais plus particulièrement les étudiants ont une chance inouïe de pouvoir profiter de ta vision, de ton savoir et surtout de ton raisonnement scientifique à l'occasion des multiples réunions que tu programmes pour nous. Outre l'aspect scientifique, c'est évidemment dans la vie de l'Equipe que ta vision et ton engagement transparaissent, le cadre dans lequel j'ai réalisé cette thèse a été parfait pour moi et je pense en avoir tiré de nombreux enseignements. Merci

La GRANDE Equipe Caux présente une richesse incontestable qui pourrait être divisée en sous groupes. Pour ma part, ce n'est qu'en navigant entre vous en vous embêtant les uns après les autres, que j'ai pu rassasier mon envie de tout voir, de tout comprendre (même si je reste un ignorant très fort pour dire des choses stupides).

Mme Isabelle Durand, tu as été mes yeux durant cette thèse. Quand on sait à quel point je suis myope, c'est bien grâce à tout ce que tu m'as appris et à tes cytomètres que j'ai été capable de produire des données, de tester de nouvelles techniques et de découvrir le monde du multi paramétrique et du tri cellulaire. Merci à Estelle, on peut dire que si Isabelle a été mes yeux tu as été mes lobes temporaux me fournissant la mémoire et les connaissances nécessaires pour définir mes stratégies de marquage. Merci

Le groupe pDC, Vanja, Inti, Nelly, Sarah, Sandra, Céline et bien sûr Mme Nathalie vous m'avez laissé jouer avec vos petites cellules fétiches, et vous avez même accepté que nous partagions vos amygdales. Quelle chance pour moi !!! Merci beaucoup, sans vous, mon travail n'aurait probablement pas pu trouver une telle valorisation et n'aurait pas eu lieu dans une ambiance aussi motivante.

Vive les souris !!! Merci beaucoup à Nadège, Isabelle L.M. et à M. Amélien le rescapé (quel bonheur que tu sois bien ici avec nous), Dominique et bien sûr merci beaucoup à Mme Isabelle Puisieux et ces quelques milliers de copines toujours prêtes à rendre service, quitte à donner de leur personne. J'ai appris beaucoup à vos côtés et je pense avoir été contaminé par le virus de l'expérimentation animale.

Merci aux rois de la Cross, FLo, Vincent, et Jenny j'ai toujours été très intrigué par les cellules rares et un peu tordues que vous étudiez. Merci particulièrement à Vincent qui porte désormais à bout de bras l'aspect phénotype immunitaire des tumeurs.

Merci à Nicolas et à Renaud d'avoir accepté de me supporter et de donner à notre travail une dimension qui dépasse largement le thésard que je suis. J'ai appris beaucoup de vous deux et j'aimerais avoir le temps d'en apprendre encore plus.

Merci à toi Colette qui m'a donné des clefs essentielles à la réussite de mes expériences, qui partage si volontiers ces connaissances évitant de longs moments de solitude derrière Pubmed et qui propageant au jour le jour, même par temps d'orage, une bonne humeur et une gentillesse pure nous rappelle à tous que le beau temps finit toujours par revenir.

Merci aux sirènes de l'aquarium, Cathy, Anne Claire, Adeline ; Merci à M. Laurent, à Armelle, Rodrigo, Carmella, Vanessa, Anthony. Une certaine alchimie donne à l'ensemble de notre groupe un fonctionnement, un rythme, une pulsation, un cœur qui vont beaucoup me manquer par la suite.

Enfin, merci à toi Marjorie qui m'a toujours soutenu durant cette thèse même lorsque je ne parvenais pas à quitter le laboratoire, même lorsque mes neurones étaient restés dans le PSM, même lorsque les cliniciens avaient eu la bonne idée de me donner un prélèvement le vendredi soir. Merci à toi qui m'as donné la force de me lever lorsque l'énergie n'était pas au rendez-vous, merci à toi qui m'as donné la confiance en moi dont j'ai dû m'alimenter toutes ces années pour persévérer. Cette thèse j'espère nous donnera la possibilité d'avancer encore et encore, main dans la main vers une situation plus confortable.

Merci à toi Maman et merci à toi Papa, vous qui avez su porter votre enfant dyslexique vers un accomplissement personnel auquel lui-même ne pouvait s'attendre. Vous m'avez donné de la confiance, de la persévérance et de la curiosité. Ce sont ces valeurs qui m'ont porté jusqu'ici. Merci à Tom et à Kevin qui ont posé sur moi le regard de Janus m'offrant les points de repère dont j'ai besoin.

Une thèse ne se fait pas tout seul

Merci à tous

Abréviations

Ado : adénosine

Ac : anticorps

Ag : Antigène

BCR : récepteur de la cellule B

CDP : progéniteur

CLP : progéniteur lymphoïde commun

COX-2 : cyclooxygenase 2

CMH : Complexe majeur
d'histocompatibilité.

CMP : progéniteur myéloïde commun

CPAg : Cellule présentatrice d'Ag

CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4

DC: cellule dendritique

DP: double positive

ER: récepteur aux œstrogènes

GARP: glycoprotein A repetitions
predominant

GITR: Glucocorticoid-induced TNF receptor

ICOS : Inducible costimulator

iDC : DC immature

IDO : indoleamine-2,3-dioxygenase

IFN : interferon

Ig : immunoglobuline

IHC : immuno-histochimie

IL : interleukine

ILT: interleukin-like transcript

ISG: interferon stimulated gene

LAP: Latency-associated peptide

mDC: DC myéloïde

MoDC: DC dérivée de monocytes

NK: cellules natural killer

NKT: cellules T natural killer

PD-1: programmed-death one

pDC: DC plasmacytoïde

PD-L1: programmed-death ligand one

PD-L2: programmed-death ligand two

PgR: récepteur de la progestérone

PRR: récepteur de reconnaissance des
patterns de pathogène

SG: survie globale

SP : simple positive

SSR: survie sans rechute

TA-: associé aux tumeurs

TAM: Macrophage associés aux tumeurs

TCR: récepteur de la cellule T

TLR: Toll-like receptor

Treg: lymphocyte T régulateur

Résumé

Le cancer du sein représente un problème majeur de santé publique. Les efforts déployés pour définir de nouvelles stratégies thérapeutiques ont mis en lumière les mécanismes développés par la tumeur pour inhiber l'instauration d'une réponse immune adaptative efficace. La tumeur favorise la mise en place d'une immunosubversion, caractérisée par la forte infiltration par les Treg (T CD4 FoxP3⁺). Les Treg jouent un rôle central dans les mécanismes de contrôle de réactions pro-inflammatoires et protègent contre le développement de pathologies auto-immunes. Notre équipe a montré que les Treg CCR4⁺ du sang sont spécifiquement recrutés dans la tumeur de sein *via* la chimiokine CCL22, ils expriment fortement le récepteur de co-stimulation ICOS, prolifèrent *in situ*, exercent un important pouvoir suppresseur et leur présence est associée à un impact péjoratif sur la survie des patientes. D'autre part, plusieurs publications récentes démontrent un rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans l'induction de Treg chez l'homme et la souris. Or tout comme pour les Treg, la présence de pDC dans la masse tumorale est associée à un mauvais pronostic pour la survie des patientes dans le cancer du Sein.

Durant ma thèse, nous avons obtenue des données, démontrant la sécrétion de CCL22 par les cellules tumorales suite à l'activation des NK et des macrophages. De plus, des facteurs solubles sécrétés dans l'environnement tumoral inhibent la fonction clef des pDC *i.e* leur sécrétion d'IFN- α . Cette déficience pour la production d'IFN- α favorise fortement leur capacité à induire l'expansion de Treg FoxP3⁺ et de T CD4 producteurs d'IL-10. L'utilisation de l'Ac bloquant anti-ICOS a démontré le rôle essentiel d'ICOS dans la prolifération des Treg et l'induction de T CD4 sécréteurs d'IL-10 par les pDC dans les tumeurs. En accord avec le rôle délétère des T CD4 ICOS⁺, la présence de cellules ICOS⁺ est associée à une réduction de la survie des patientes. Au final, les modèles *in vitro* que nous avons développé nous ont permis de proposer l'Ac anti-ICOS en tant que candidat médicament pour reverser l'immunosuppression dans le cancer du sein

Les travaux présentés dans ce manuscrit apportent de nouvelles données s'intégrant dans la recherche en immunothérapie anti-tumorale. Le blocage du recrutement des Treg *via* des inhibiteurs de CCR4, la réactivation des pDC par l'utilisation de ligands de TLR, la caractérisation des facteurs solubles responsables de l'altération des pDC dans les tumeurs ou le ciblage de l'interaction ICOS/ICOS-L, sont autant de stratégies thérapeutiques potentielles pour reverser cette immunosuppression. Aujourd'hui, notre équipe évalue la pertinence de ces stratégies par l'utilisation d'un modèle précliniques de tumeur mammaire reproduisant la pathologie humaine.

Sommaire

Avant-propos	5
1 Le cancer du sein : une maladie à forte incidence	6
1.1 Epidémiologie et classification du cancer du sein	6
1.1.1 Epidémiologie	6
1.1.2 Classification anatomo-pathologique.....	7
1.2 Prise en charge thérapeutique du cancer du sein.....	10
1.3 Le cancer face au système immunitaire	13
1.3.1 Concept d'immuno-surveillance : Le système immunitaire détecte les cellules transformées	14
1.3.2 Concept d'échappement à l'immuno-surveillance et principes d'immunothérapie	16
2 Origine et diversité des cellules T immuno-suppressives : Les Treg « gardiens du soi »	21
2.1 Caractéristiques des cellules T CD4 immuno-suppressives.....	21
2.1.1 Découverte des cellules Treg FoxP3 ⁺	22
2.1.2 Diversité des sous-populations de cellules T CD4 immuno-suppressives autres que les Treg classiques (FoxP3 ⁺ CD25 ^{hi} , CD127 ^{low})	30
2.1.3 Les autres cellules T immuno-suppressives.....	32
2.2 Mécanismes de suppression associés aux Treg	33
2.2.1 Le recrutement des Treg est une condition à leur fonction suppressive	33
2.2.2 Mécanismes de suppression par facteurs solubles	34
2.2.3 Mécanismes contacts dépendants	37
3 L'environnement et les CPAg dans la biologie des cellules T immuno-suppressives.....	42
3.1 Facteurs importants dans l'émergence et la fonctionnalité des Treg.....	42
3.1.1 Facteurs environnementaux favorisant l'amplification des Treg.....	42
3.1.2 Facteurs régulant les fonctions des Treg.....	43
3.1.3 Engagement du TCR et impact des ligands de co-stimulation :	44
3.2 Les DC : découverte, diversité et ontogénie	46

3.2.1	Les DC myéloïdes : principales caractéristiques et origine	47
3.2.2	Les DC plasmacytoïdes : principales caractéristiques et origine	49
3.3	Certaines sous-populations de CPAg ont un rôle dans la tolérance	50
3.3.1	Les mDC dans la tolérance	51
3.3.2	Les pDC dans la tolérance	51
3.3.3	Les macrophages dans la tolérance	52
4	Caractéristiques et fonctionnalité des Treg dans les tumeurs : La tumeur, un berceau pour les Treg ?	55
4.1	Les Treg sont fonctionnels dans les tumeurs.....	55
4.1.1	Infiltration, valeur pronostique et fonctionnalité des TA-Treg.....	55
4.1.2	Evidences de l'activité suppressive des Treg dans les tumeurs.....	57
4.2	Facteurs favorables et Origine des Treg dans les tumeurs	59
4.2.1	Recrutement des Treg dans les tumeurs	60
4.2.2	Facteurs de l'environnement tumoral associés à un enrichissement en Treg	61
4.2.3	Les CPAg et la réponse tolérogène dans les tumeurs.....	62
4.3	Principales stratégies pour éradiquer l'immuno-subversion associée au développement tumoral.....	64
4.3.1	Bloquer les récepteurs impliqués dans l'immuno-suppression.....	64
4.3.2	Accroître la résistance des cellules effectrices vis-à-vis des Treg.....	65
4.3.3	Eradiquer les Treg, leur prolifération ou leur recrutement	66
5	Intérêts scientifiques et projet de thèse.....	68
5.1	Le recrutement de Treg : Quel est la source de CCL22 dans les tumeurs ?.....	70
5.2	Quel est l'impact de l'altération des TA-pDC sur les TA-Treg ?	70
5.3	Quel est le rôle d'ICOS dans l'enrichissement et l'état d'activation fort de TA-Treg ? .	71
6	Résultats.....	73
6.1	La détection par les cellules NK et les macrophages des cellules transformées favorise leur production de CCL22 et le recrutement des Treg.	75

6.2	La sécrétion d'IFN- α par les pDC est altérée dans la masse tumorale, favorisant l'enrichissement en Treg et en cellules productrices d'IL-10 parmi les lymphocytes T CD4+ de tumeur.....	95
6.3	Importance de l'axe de co-stimulation ICOS/ICOS-L dans l'expansion des Treg et la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T induite par les pDC de tumeur de sein	119
7	Discussion	143
7.1	Coopération entre NK, macrophages et cellules tumorales dans la production de CCL22 et le recrutement précoce des Treg	145
7.2	Relation entre pDC altérées et cellules T CD4 immunosuppressives dans les tumeurs	148
7.2.1	Mécanismes de recrutement des pDC dans la masse tumorale	148
7.2.2	Les pDC sont altérées et ne produisent pas d'IFN- α dans les tumeurs de sein....	149
7.2.3	Les pDC altérées activent préférentiellement les T CD4 mémoires immuno-supresseurs.....	150
7.3	ICOS joue un rôle central dans la réponse immuno-suppressive intra-tumorale induite par les pDC.....	152
7.3.1	L'interaction ICOS/ICOS-L participe à l'induction de cellules T immuno-suppressives par les TA-pDC.....	153
7.3.2	ICOS induit exclusivement des cellules T CD4 immuno-suppressives dans les tumeurs primaires de sein.....	154
8	Perspectives sur l'étude des Treg intra-tumoraux	157
8.1	Mieux déterminer la nature des Treg dans le cancer du sein	157
8.2	L'axe CD39/CD73 un mécanisme par collaboration entre Treg et T effecteurs chez l'homme ?	159
8.3	Stratégies thérapeutiques:	161
8.3.1	Bloquer CCR4.....	161
8.3.2	Restaurer et/ou induire la sécrétion d'IFN- α par les pDC dans les tumeurs de sein	163
8.3.3	Le ciblage d'ICOS en immunothérapie	164
8.3.4	Validation de la neutralisation d'ICOS en modèle pré-clinique	166

8.3.5	Utilisation combinée d’une thérapie ciblée pour activer les pDC et d’un anti-ICOS comme stratégie pour traiter les tumeurs de sein	169
9	Conclusion générale.....	170
10	Annexes.....	172
10.1	Annexe 1	173
10.2	Annexe 2	189
11	Bibliographie	213

Avant-propos

Le cancer du sein est une maladie néoplasique d'origine essentiellement épithéliale et constitue la principale cause de mortalité par cancer chez la femme. L'avancement des connaissances en immunologie permet aujourd'hui d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques basées sur la modulation de la réponse immune anti tumorale.

Le système immunitaire est capable de produire des réponses spécifiques dirigées contre des antigènes (Ag) étrangers. Les effecteurs cellulaires de l'immunité innée tels que les cellules natural killer (NK) et les cellules présentatrices d'Ag (CPAg) répondent aux signaux activateurs portés par les pathogènes, lors d'une infection virale, ou libérés suite à des dommages tissulaires. Les CPAg telles que les macrophages et les cellules dendritiques (DC) induisent également l'immunité adaptative en activant les lymphocytes B et les lymphocytes T CD4 et CD8. Ces cellules portent la spécificité de la réponse immune à l'encontre d'un Ag donné grâce à la grande diversité de leur récepteur antigénique (TCR et BCR respectivement pour les lymphocytes T et B). Ainsi les lymphocytes T/B permettent une action spécifique et constituent également la mémoire immunitaire, offrant une protection plus efficace lors d'une seconde rencontre avec le même pathogène. Parmi les cellules T CD4, une population de cellules T immuno-suppressive, les Lymphocytes T régulateurs (Treg) a fait l'objet de très nombreuses investigations car ils sont essentiels dans la tolérance vis-à-vis des Ag du « soi » évitant le développement de maladies auto-immunes.

En introduction, nous verrons que i) le cancer du sein est une pathologie ayant une forte incidence sur le système immunitaire des patientes ii) conjointement à l'évolution de la pathologie, le système immunitaire des patientes détecte les cellules transformées mais présente des altérations importantes traduisant la subversion de la réponse immune anti-tumorale. L'étude des nombreux modèles animaux a permis de suggérer que rétablir l'immunité anti-tumorale permettrait d'améliorer le pronostic des patientes, donnant naissance à la notion d'immunothérapie anticancéreuse. L'impact sur le pronostic vital des patientes, et le pouvoir immuno-suppresseur des Treg dans les tumeurs de sein, suggèrent qu'éradiquer les Treg pourrait permettre de restaurer une immunité anti-tumorale.

Le projet développé durant ma thèse sera exposé à la fin de l'introduction. Il porte sur l'étude des mécanismes du recrutement des Treg, et de leur relation avec une sous-population de CPAg : les DC plasmacytoïdes (pDC) dans la masse tumorale.

1 Le cancer du sein : une maladie à forte incidence

Le cancer est à l'origine de 13% de la mortalité mondiale avec 7,6 millions de décès en 2008 selon l'OMS. On observe une grande disparité de la prévalence des décès par cancer dans le monde, les pays à revenu faible totalisant 70% des cas. Selon les projections, le nombre de décès annuel associés au cancer devrait augmenter pour atteindre 12 millions de cas en 2030. Les analyses sur la période 2004-2008 montrent que le cancer représente la première cause de mortalité prématurée en France. En 2011, le nombre de nouveaux cas de cancer diagnostiqués en France métropolitaine est estimé à 365.500 pour l'ensemble de la population, avec respectivement 207.000 hommes et 158.500 femmes diagnostiqués. Les données d'épidémiologie du cancer sont issues du fichier national dans lequel sont déclarées obligatoirement les causes médicales de décès. Il est géré par le Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès de l'Inserm (CépiDc-Inserm).

1.1 Epidémiologie et classification du cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme à l'échelle mondiale avec une prévalence dans le monde, pour 100 000 femmes de 99,7 cas (soit 0.99‰) et un taux de mortalité de 16 cas (soit 0.16‰) par an.

1.1.1 Epidémiologie

En France, durant l'année 2011, on estime à 53.000 le nombre de nouveaux cas de cancers du sein et 11.500 décès. L'âge moyen au diagnostic était de 61 ans et l'âge médian des décès était de 71 ans sur la période 2004-2008 avec une survie relative de 99,7% à 1 an et de 85% 5 ans après le diagnostic.

On constate que le nombre de nouveaux cas annuels augmente constamment en France mais on observe une diminution de la mortalité au cours de la dernière décennie, en particulier chez les patientes jeunes ou d'âge moyen. Les deux principaux facteurs permettant d'expliquer ces tendances inverses seraient l'amélioration du diagnostic précoce et une prise en charge plus efficace qui repose sur la classification des différents sous-types tumoraux, permettant de définir les thérapeutiques les plus adaptées pour chaque type de cancer du sein.

Les facteurs de risque non génétiques identifiés dans le cancer du sein sont : des premières menstruations précoces et/ou une ménopause tardive, l'absence de grossesse ou une première

grossesse tardive (après 28 ans), l'utilisation de traitement hormonal de substitution après la ménopause et l'obésité (Danaei et al., 2005; Lacey, Jr. et al., 2009).

Les facteurs de risque d'origine génétique à forte pénétrance tels que les mutations des locus BRCA1, BRCA2 et les mutations de p53 permettent d'expliquer les syndromes familiaux associés au cancer du sein. Cependant, les syndromes familiaux sont très minoritaires (10% des cas) par rapport au nombre de cas de cancer du sein se développant chez des patientes ne présentant pas facteurs de risque génétique héréditaires connus.

1.1.2 Classification anatomo-pathologique

Le terme « tumeur » désigne l'ensemble des néoplasies conduisant à une augmentation du volume d'un tissu. Parmi les tumeurs on distingue les lésions bénignes qui présentent une croissance lente, sont bien délimitées, contiennent une faible densité cellulaire et ne présentent pas de modifications cellulaires importantes. Par opposition la présence d'une tumeur maligne et désignée sous le terme de « cancer », elle est caractérisée par une forte activité mitotiques, des contours mal définis et une forte densité cellulaire. Les cellules cancéreuses présentent de nombreuses altérations à l'échelle moléculaire et perdent leur caractéristiques de cellules différenciées, permettant de les distinguer du tissu d'ont-elles sont originaires. Les tumeurs malignes peuvent présenter une forte agressivité définie par le pouvoir métastatique de la lésion. La classification anatomo-pathologique repose sur les caractéristiques histologiques de la lésion néoplasique ainsi que sur les modifications moléculaires qu'elle présente. Cette étape est indispensable à la prise en charge des patientes et permet d'orienter le traitement.

1.1.2.1 Brève description anatomique du sein

Le sein est composé d'une glande mammaire, elle-même constituée de 15 à 20 compartiments séparés par du tissu graisseux et du tissu de soutien. Chacun des compartiments est structuré en lobules (tissu conjonctif intra-lobulaire, 10 à 100 acini associés aux canaux intra-lobulaires), qui débouchent sur les canaux galactophores se terminant par les sinus galactophores. Initié dès les premières semaines de la vie fœtale, le développement anatomique de la glande mammaire suit les étapes hormonales de la vie de la femme : puberté, grossesse, allaitement, sevrage, ménopause. Le tissu glandulaire et les lobules se développent et se différencient sous l'action des œstrogènes et de la progestérone. Le parenchyme de soutien se développe au fur et à mesure des cycles menstruels et subit une congestion d'origine hormonale, en fin de cycle.

Les fonctions sécrétrices du sein sont acquises uniquement au cours de la grossesse et durant la lactation. A la ménopause, l'évolution du statut hormonal de la femme est associée à une

réduction de la glande mammaire. La relation des cellules épithéliales mammaires avec le système hormonal permet une évolution de la glande mammaire tout au long de la vie, qui peut être associée à la susceptibilité de cet organe à donner naissance à des lésions cancéreuses.

Le tissu mammaire comporte également un réseau sanguin et lymphatique, les ganglions lymphatiques drainant le sein sont situés au niveau de l'aisselle (creux axillaire) au-dessus de la clavicule, sous la clavicule, à l'intérieur du thorax et autour du sternum.

1.1.2.2 Notion de classification histologique des cancers du sein

Le cancer du sein est à 99% d'origine épithéliale donnant ainsi naissance à des carcinomes. Par opposition, les sarcomes du sein originaires du tissu conjonctif ne représentent que 1% des cas. La classification des carcinomes a été établie par l'OMS en 1981 puis révisée en 2003. Les tumeurs sont classées en tenant compte de la diversité des cellules transformées qui les constituent. L'examen anatomopathologique permet l'identification du type de lésion majoritaire (50 à 90% de la masse tumorale) et des types associés pouvant ne représenter que 10% des cellules transformées, sur la base des caractéristiques morphologiques et moléculaires. Les lésions néoplasiques qui apparaissent au niveau des canaux galactophores ou des lobules sont désignés respectivement sous les termes de carcinomes canaux (2/3 des cas) ou lobulaires (1/3 des cas). Les carcinomes non infiltrants ou *in situ* n'ont pas envahi le tissu conjonctif et sont associés à un bon pronostic par comparaison avec les carcinomes infiltrants pour lesquels on observe une perforation de la lame basale de l'épithélium de la glande mammaire, associée à la présence de cellules tumorales dans le tissu conjonctif sous-jacent. 20 à 30% des patientes atteintes de carcinome lobulaire *in situ* voient leur pathologie évoluer en cancer infiltrant. De même l'apparition d'un carcinome canalaire *in situ* est associée à un risque multiplié par 8 ou 10 de développer un cancer infiltrant par comparaison avec le reste de la population. Il est donc nécessaire de classer les carcinomes du sein non infiltrants pour déterminer le risque que la maladie évolue vers un carcinome infiltrant, définissant ainsi la prise en charge thérapeutique (Quinn et al., 1997).

De façon plus générale, les tumeurs de sein sont aussi classées suivant le degré de différenciation des cellules transformées par la classification de Scarff-Bloom-Richardson (SBR). Elle tient compte de l'aspect glandulaire différencié (la présence de tubes), de l'anisocaryose (diversité de la taille des noyaux dans les cellules de la lésion) et du nombre de cellules en mitose, l'ensemble définissant un grade SBR de la tumeur coté de 1 à 3.

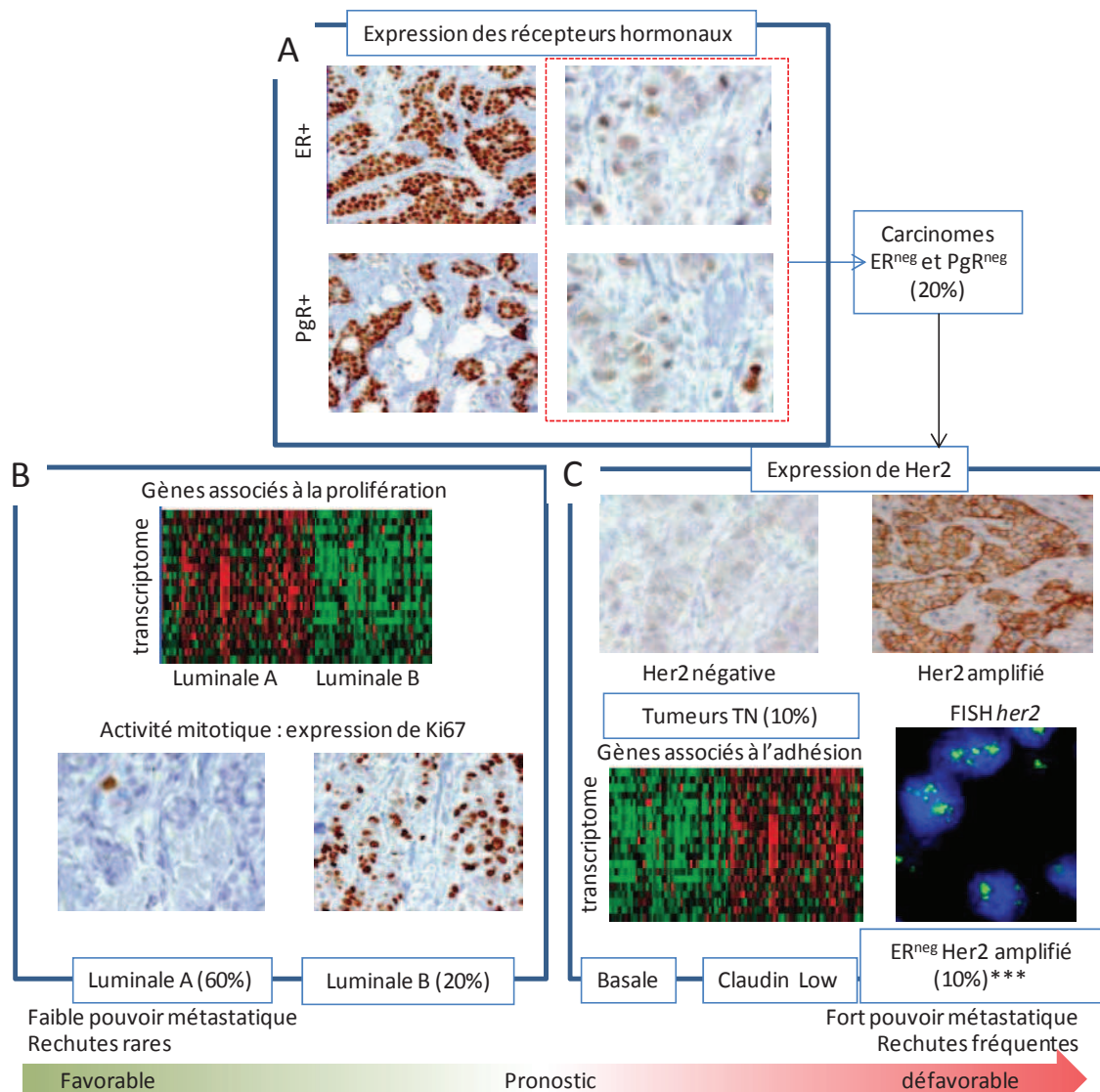


Figure 1 : Les carcinomes du sein les plus fréquents et lien avec le pronostic sur la base des examens histologiques en anatomopathologie et de la biologie moléculaire.

A) Analyse de l'expression des récepteurs hormonaux ER et PgR par marquage IHC, 20% des cancers du sein opérés ont perdu l'expression de ER et PgR. B) L'analyse du transcriptome des cellules tumorales permet d'identifier les tumeurs lumineuses A et B qui expriment généralement ER et/ou PR. Les tumeurs lumineuses B expriment fortement les gènes liés à la prolifération cellulaire, et l'expression de Ki67 est plus forte dans les tumeurs lumineuses B que dans les tumeurs lumineuses A par IHC. L'analyse du transcriptome n'étant pas utilisée en routine, l'identification des tumeurs lumineuses n'est pas réalisée en clinique. C) L'absence d'expression de ER et PgR et l'absence d'expression de Her2 définit les tumeurs triples négatives (TN) au sein desquelles on identifie les tumeurs Claudine Low qui contrairement aux tumeurs basales, montrent une diminution de l'expression des molécules d'adhésion (claudines, cytokératines et connexines) par analyse transcriptomique. Parmi les cellules tumorales n'exprimant pas ER et/ou PgR, certaines montrent une expression forte de Her2 par IHC définissant les tumeurs Her2 amplifiées. Dans le cas d'un résultat douteux, le nombre de copies du gène *her2* est analysé par hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH) en routine. Trois types de carcinomes sont identifiés en clinique: Luminale, TN et Her2 amplifié.

ER: récepteur aux Œstrogènes; PgR: Récepteur de la Progestérone; *Ki67*: marqueur de prolifération présent dans les cellules en phase S, G1, G2 et M et absent en phase G0 du cycle cellulaire. Her2: Récepteur des facteurs de croissance épidermique; TN: tumeurs triples négatives (ER^{neg}, PR^{neg}, Her2^{Neg}). *** la classification en fonction du pronostic ne tient pas compte ici de l'impact du Trastuzumab (thérapeutique ciblée pour les tumeurs Her2 amplifiées) qui augmente la survie des patientes Her2 amplifiées.

Enfin, la classification TNM tient compte de la taille de la tumeur, de l'envahissement des ganglions lymphatiques par les cellules tumorales ainsi que de la présence de métastases.

L'ensemble de ces classifications donne des informations sur le pronostic des patientes, permettant de définir la prise en charge en termes de chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Toutefois une des principales difficultés dans la mise en place de ces analyses anatomopathologiques réside dans la standardisation des méthodes d'analyse lors de la détermination du grade histologique des tumeurs (Douglas-Jones et al., 2000).

1.1.2.3 Classification moléculaire des cancers du sein

La classification moléculaire des cancers du sein permet d'affiner le pronostic en donnant, pour chaque patiente, un facteur prédictif de la réponse à une chimiothérapie donnée, en déterminant la pertinence d'un traitement néo-adjuvant ou enfin en proposant des thérapies ciblées. Cette classification vise à accroître l'efficacité du traitement pour chaque patiente et à réduire les effets secondaires (Hayes, 2005; Lonning et al., 2007; Mauriac et al., 2005). Les travaux de Perou et coll basés sur l'analyse des patrons d'expression de 1753 gènes (Perou et al., 2000), complétés en 2007 par Andre et coll ont permis d'identifier quatre sous-types moléculaires de cancer du sein (Luminal A, Luminal B, Her2 amplifié et Basal), reposant entre autres sur l'expression des récepteurs aux œstrogènes et des cytokératines (Andre et al., 2007). Plus récemment, les tumeurs de sein dites « Claudin Low » définissent un cinquième groupe caractérisé par la faible expression des molécules intervenant dans les jonctions serrées et d'autres molécules d'adhésion telles que les Claudines 3, 4, 7, l'Occludine, et la E-cadhérine (Herschkowitz et al., 2007) et sont associées à une plus forte résistance aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie que les tumeurs de type basal (Weigelt et al., 2010). Dans la continuité de ces travaux de nombreux efforts sont réalisés pour affiner les prises de décision guidées par la classification (Kerlikowske, 2010; Nagao et al., 2012). (Figure 1)

1.2 Prise en charge thérapeutique du cancer du sein

Les chimiothérapies classiquement utilisées sont : i) Les agents intercalants de l'ADN ii) Les anti-métabolites, iii) Les agents alkylants, iv) Les anti-microtubules (Tableau 1).

Dans le cas où les cellules tumorales expriment les récepteurs hormonaux (ER ou PgR) un traitement par hormonothérapie est prescrit.

Dans le cas où les cellules tumorales expriment l'oncogène HER2/Neu, un traitement ciblant la molécule HER2/Neu (Anticorps, trastuzumab) ou inhibant son activité tyrosine kinase (TKI, Lapatinib) est prescrit. (Tableau 1)

Tableau 1: principales molécules utilisées en chimiothérapie et hormonothérapie du cancer du sein

Mode d'action	Classe	Molécules
Agents intercalants de l'ADN	Antracyclines Anthracènes diones	Adriamycine (doxorubicine) Epirubicine Pirarubicine Mitoxantrone
Anti-métabolites	Antifoliques Antipyrimidiques	Méthotrexate 5-Fluorouracile Gemcitabine Capécitabine
Alkylants	Oxaphosphorines Dérivés du platine	Endoxan (Cyclophosphamide) Mitomycine C Cisplatine Carboplatine
Anti-microtubulaires	Taxanes	Docétaxel / Paclitaxel
	Vinca alkaloides	Vincristine
Thérapie ciblée anti HER2	Anticorps anti HER2	Trastuzumab
	Inhibiteur tyrosine kinase	Lapatinib
Hormonothérapie	Anti-Aromatases	Aromasine, Arimidex, Femara
	Antagoniste des récepteurs aux Œstrogènes	Tamoxifène

La résection de la tumeur par chirurgie peut être plus ou moins conservatrice en fonction du diagnostic. La prise de décision est réalisée sur la base des résultats d'imagerie (mammographies/IRM/scanners), des biopsies et tient compte du type histologique de la tumeur et des antécédents de la patiente. Dans le cas des carcinomes *in situ*, une chirurgie conservatrice peut être réalisée et est accompagnée par le prélèvement d'un ganglion drainant (ganglion sentinelle) qui sera utilisé pour confirmer qu'il n'y a pas d'envahissement ganglionnaire par des métastases. La patiente sera alors traitée par radiothérapie. Dans la majorité des cas de cancers du sein invasifs, une ablation des ganglions axillaires associée à la mastectomie est préconisée. Dans certains cas, une chimiothérapie néo-adjuvante (avant ablation) permet de réduire le volume tumoral et ainsi de pratiquer une chirurgie conservatrice. Suite à la chirurgie, un traitement par chimiothérapie adjuvante et/ou hormonothérapie est fréquemment proposé généralement accompagnée par une radiothérapie.

La prise de décision suite au diagnostic est une étape clef dans la prise en charge des patientes. Grace à l'évolution des techniques de dépistage, de diagnostic et au développement de thérapeutiques ciblées tel que le Trastuzumab, qui ont permis d'améliorer considérablement la prise en charge des patientes ces 20 dernières années, le taux de survie est aujourd'hui de 77%, 10 ans après le diagnostic. (Figure 2)

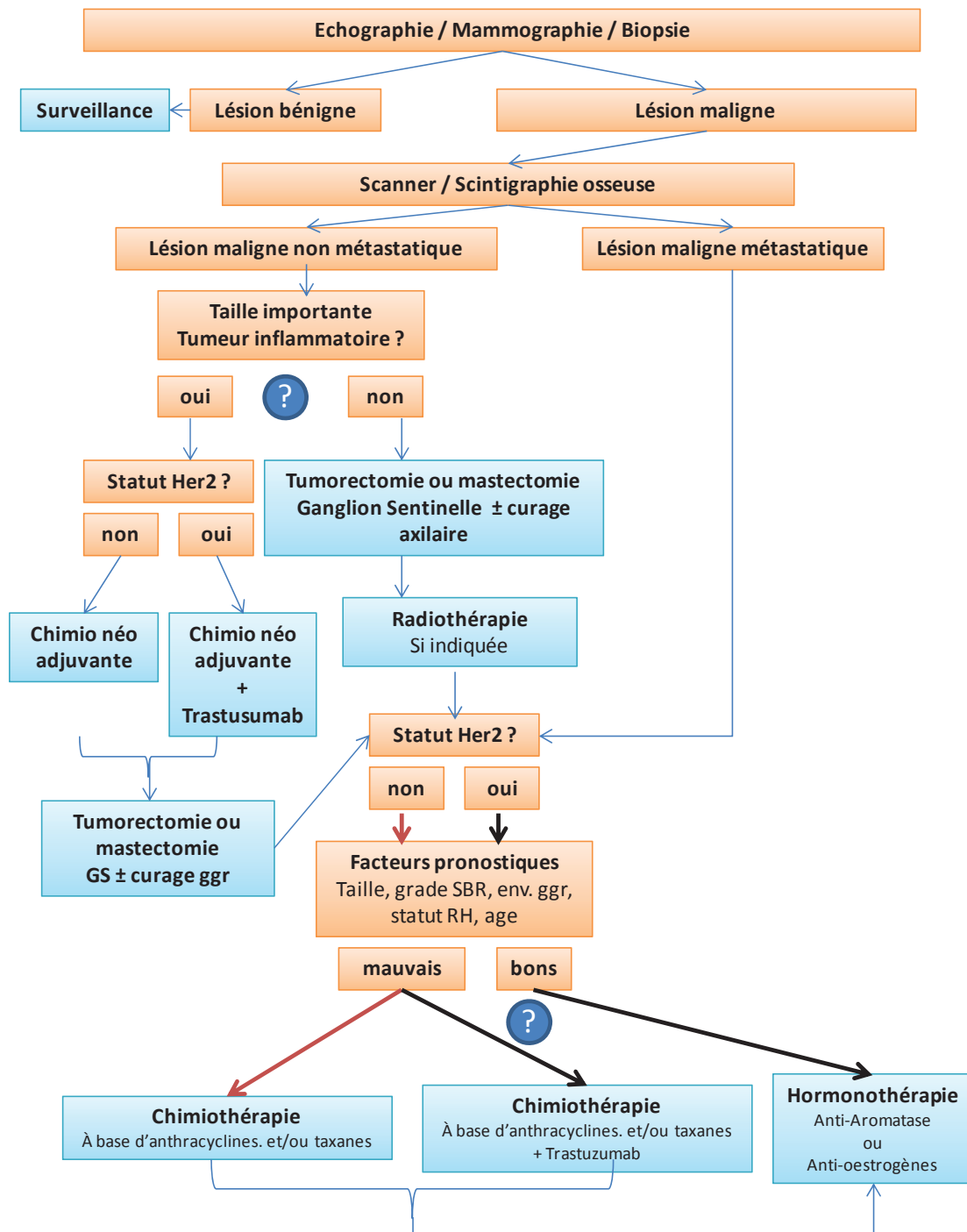
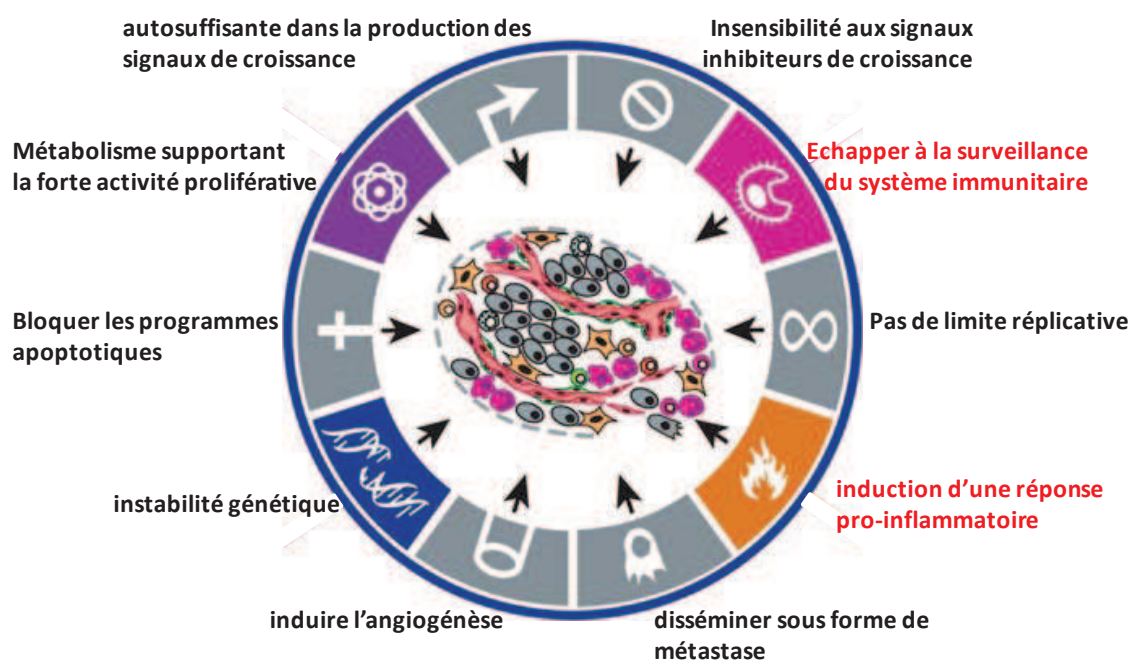


Figure 2: Importance du diagnostic dans la prise en charge

Le processus de prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein intègre les paramètres de la patiente (âge, statut hormonal, antécédents...) et les paramètres histologiques de la lésion (expression des récepteurs hormonaux, amplification de Her2, prolifération des cellules transformées), permettant de proposer une thérapie adaptée. Les effets secondaires des chimiothérapies sont importants, éviter l'utilisation de ces drogues dans les cas où la chirurgie et la radiothérapie seraient suffisantes pourrait améliorer la prise en charge de la patiente. ? Le développement de nouveaux outils de diagnostic offrant une meilleure évaluation du pronostic pourrait permettre de mieux sélectionner les patientes n'ayant pas besoin de chimiothérapie.

1.3 Le cancer face au système immunitaire

En 2000 Hanahan et Weinberg ont publié une revue décrivant six compétences que les cellules tumorales doivent acquérir au cours de la transformation pour donner naissance à un cancer. Dans ce modèle, la cellule tumorale doit i) être auto-suffisante dans la production des signaux de croissance dont elle a besoin ii) être insensible aux signaux inhibiteurs de croissance, iii) échapper aux programmes apoptotiques, iv) ne pas avoir de limite répliative, v) pouvoir induire l'angiogénèse, et vi) disséminer sous forme de métastase. (Figure 3)



Adapté d'après Hanahan et Weinberg, **Hallmarks of Cancer: The Next Generation Cell 2011**

Figure 3: Les caractéristiques acquises par les cellules transformées indispensables au développement du cancer

Les cellules tumorales accumulent des altérations moléculaires au cours de la transformation. Le développement de la pathologie est associé à l'acquisition de nouvelles fonctions leur conférant : une autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance, un métabolisme leur permettant de supporter une forte activité mitotique, une absence de limite répliative, la sécrétion de facteurs favorisant l'angiogénèse et la capacité de quitter le site d'initiation de la tumeur conduisant à la formation de métastases à distance.

L'évolution du cancer est aussi liée à une perte des fonctions cellulaires conduisant à :

Une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, une instabilité génétique et l'altération des programmes apoptotiques.

L'induction d'une réponse inflammatoire peut être associée à une augmentation de l'agressivité de la lésion ainsi qu'à une plus forte angiogénèse et la plasticité des cellules tumorales sous la pression du système immunitaire conduit également à l'émergence de clones tumoraux échappant à la destruction par les cellules immunes (Imuno-Editing des tumeurs).

L'ensemble de ces caractéristiques distingue les cellules tumorales des cellules saines et participe à l'agressivité et à l'évolution de la pathologie. Ces compétences acquises par les cellules transformées sont des événements clés dans l'apparition du cancer, le développement de drogues permettant d'interférer avec ces mécanismes et agissant en synergie permet un ciblage préférentiel des cellules tumorales.

Cette revue a récemment été révisée par ces mêmes auteurs en ajoutant 4 nouvelles caractéristiques qui incluent i) l'exploitation de voies métaboliques permettant de supporter la forte activité proliférative des cellules transformées, ii) l'instabilité génétique des clones tumoraux, iii) l'induction d'une réponse pro-inflammatoire au cours du développement tumoral et iv) la capacité des cellules tumorales à échapper à la surveillance du système immunitaire (Figure 3).

1.3.1 Concept d'immuno-surveillance : Le système immunitaire détecte les cellules transformées

L'immunogénicité des tumeurs spontanées a été longuement discutée au cours des années 1970 - 1990. En effet, les cellules transformées dérivent des cellules normales du patient. Ainsi les clones tumoraux pourraient ne pas présenter suffisamment de différences avec les cellules normales du « soi » pour être reconnus et ciblés par le système immunitaire

1.3.1.1 L'immuno-surveillance et pouvoir immunogène des tumeurs

L'importance du système immunitaire face au développement tumoral dans un modèle murin syngénique a été illustrée pour la première fois par Foley en 1953 (FOLEY, 1953). Dans ce modèle, des sarcomes et carcinomes induits chez la souris par des carcinogènes chimiques ont été transplantées dans des souris receveuses de souche parentale (tumeurs syngéniques). Après résection de la tumeur, une deuxième greffe de la même tumeur chez ces animaux est systématiquement rejetée traduisant une réponse immunitaire anti-tumorale et suggérant l'existence d'une réaction de type vaccinale, développée suite à la première transplantation.

Chez la souris, l'importance de la réponse immunitaire adaptative dans le contrôle de la croissance tumorale a été clairement démontrée par le groupe de Robert D. Schreiber, montrant que les tumeurs induites chimiquement se développent plus vite dans les souris immuno-déficientes (Shankaran et al., 2001) et que les cellules T CD4, CD8 et l'interféron-gamma (IFN- γ) retardent l'apparition de tumeurs murines induites chimiquement et conduisent à une réduction de l'immunogénicité de ces tumeurs (Koebel et al., 2007).

Chez l'homme, le concept d'immuno-surveillance a été abordé par Doll et coll. en 1970 rapportant l'augmentation de la fréquence d'apparition de certains cancers chez les personnes atteintes de syndromes d'immuno-déficiences (ataxie-télangectasique, Wiskott-Aldrich et Chediak-Higashi) (Doll and Kinlen, 1970), et dans le cas du VIH (Clifford et al., 2005). Ces données concordent avec le fait que des patients ayant subi des transplantations et traités par immuno-suppresseurs pour éviter le rejet de greffe présentent une incidence accrue du nombre de cancers.

En 1979 Sanner et coll. ont observé l'existence d'une réponse immune anti-tumorale dans le sang de patientes atteintes de cancers du sein localisé et métastatique, révélée par l'activation des cellules immunitaires en présence d'extraits protéiques de carcinome mammaire suite à l'apparition de lésions bénignes, ce qui renforce le concept d'immuno-surveillance du cancer du sein (Sanner et al., 1979).

L'existence d'une cytotoxicité à médiation cellulaire ainsi que d'une apoptose de cellules tumorales mammaires autologues ou allogéniques induite par le complément, traduisent la présence d'anticorps (Ac) dirigés contre des Ag tumoraux dans le sang de patientes atteintes de cancer du sein (Della et al., 1973). La première identification d'un Ag tumoral ciblé par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (van der Bruggen et al., 1991) a conduit à l'identification d'Ag tumoraux issus des mutations somatiques dans les tumeurs de sein et d'autres cancers, pouvant être pris en charge comme des Ag étrangers par le système immunitaire (Kan et al., 2010; Purev et al., 2004; Sjoblom et al., 2006). La détermination de leur pouvoir immunogène fait l'objet de nombreux travaux (Cheever et al., 2009; Ercan et al., 2012; Gilboa, 1999; Kan et al., 2010). Ces données montrent que les mutations de NY-ESO-1, RAS, p53 et HER2/Neu, très fréquentes dans le cancer du sein sont clairement reconnues par le système immunitaire. La réponse T CD8 spécifique d'Ag tumoraux a été associée à un bon pronostic dans différents types de cancers dont les carcinomes du sein, (Mahmoud et al., 2012; Beckhove et al., 2004) et fait appel à l'activation des cellules T CD4 effectrices (Gnjatic et al., 2006).

1.3.1.2 Les effecteurs du système immunitaire s'infiltrant et réagissent dans la masse tumorale

Les tumeurs de sein sont infiltrées de manière quasiment systématique par des leucocytes (CD45) incluant des cellules de l'immunité innée telles que des NK, des CPAg (CD1a) et des cellules exprimant les complexes majeurs d'histocompatibilité de (CMH) de type I et II ainsi que par les cellules de la réponse adaptative (lymphocytes T CD4 et CD8) (Georgiannos et al., 2003). En 1999 Leek et coll. ont montré que l'infiltration de la masse tumorale par des macrophages était associée à une nécrose importante des cellules tumorales mais aussi à une vascularisation plus importante de la tumeur ainsi qu'à une réduction de la survie sans rechute (SSR) et de la survie globale (SG) des patientes atteintes de cancer du sein (Leek et al., 1999). L'analyse de l'expression de CD3, CD8, CD45RO (cellules T mémoires) CD68 (macrophages) et CD20 (cellules B) par immuno-histochimie (IHC) sur coupe de tumeurs de sein a montré une corrélation statistique entre la présence de macrophages (CD68⁺) et la densité en vaisseaux sanguins dans la masse tumorale (Lee et al., 1997). Dans le cancer du sein, l'infiltration par les DC augmente avec

le grade SBR de la tumeur (Treilleux et al., 2004). Les CPAg intra-tumorales présentent un état de maturation variable selon leur localisation dans la masse tumorale sur la base de l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD83 et du CMH-II (Lespagnard et al., 1999; Coventry and Morton, 2003; Bell et al., 1999). La quantité de cellules immunes, la proportion entre cellules T CD4 et T CD8 et leur état d'activation, mesuré de façon indirecte par l'expression de CD25, la chaîne α du récepteur à l'interleukine -2 (IL-2), varie en fonction de l'invasion ou non des ganglions drainants par des cellules tumorales (Georgiannos et al., 2003), de l'expression des récepteurs ER et PgR et des Ag tumoraux (p53 muté, Her2/NEU et MUC1) (McDermott et al., 2002). Ces résultats suggèrent très fortement qu'une réponse immune a lieu au sein de la masse tumorale (Lespagnard et al., 1999; Coventry and Morton, 2003; Bell et al., 1999), ce qui concorde avec le concept d'immuno-surveillance dans le cas du cancer du sein. L'importance de molécules activatrices des cellules innées du système immunitaire a été mise en avant au cours des dernières années, dans le cas du cancer du sein. L'expression de HMGB1, RAGE, β -défensines (Gambichler et al., 2006), NKG2D-L (de Kruijf et al., 2012), HSP (heat shock proteins) (Calderwood, 2012) ou d'alarmines tel que l'ATP (Aymeric et al., 2010) dans les tumeurs de sein est associée à l'activation des cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules NK et DC) dans la masse tumorale (Sims et al., 2010). Cette activation de la réponse innée peut alors conduire au déclenchement d'une réponse adaptative spécifique des Ag tumoraux *via* les cellules B et les T CD4 et CD8. Cependant, la présence de cellules immunes activées dans la masse tumorale n'est pas toujours associée à un bon pronostic pour les patientes, suggérant qu'en dépit de la présence d'Ag tumoraux et de l'activation du système immunitaire, des mécanismes d'échappement se mettent en place limitant l'efficacité de l'immuno-surveillance.

1.3.2 Concept d'échappement à l'immuno-surveillance et principes d'immunothérapie

Les évidences montrant que les lésions néoplasiques, sont détectées par le système immunitaire sont aujourd'hui bien établies, suggérant que le développement tumoral est associé à des mécanismes d'échappement au contrôle du système immunitaire. Ceci ouvre la porte vers de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à restaurer ou accroître la réponse immune anti-tumorale : l'immunothérapie.

1.3.2.1 Concept d« immuno-editing » dans l'échappement tumoral au système immunitaire

L'ensemble des données obtenues dans les modèles animaux a permis l'émergence du concept d'« immuno-editing » des tumeurs au cours duquel les cellules transformées sont sélectionnées

sous la pression du système immunitaire pour devenir immuno-résistantes (Schreiber et al., 2011; Dunn et al., 2004).

L'immuno-editing des tumeurs se traduit en trois phases :

- l'éradication des cellules tumorales par le système immunitaire
- la stabilisation de la lésion tumorale sous la pression immune
- l'échappement au contrôle du système immunitaire associé à l'aggravation de la pathologie

Les souris immuno-déficientes traitées par un carcinogène chimique développent plus de tumeurs et les tumeurs qui se développent dans les animaux ayant un système immunitaire fonctionnel sont plus faiblement immunogéniques (Dunn et al., 2002) Ceci révèle que le système immunitaire a pour rôle de réduire l'apparition et le développement de lésions néoplasiques induites par un carcinogène. De plus, l'induction *via* un carcinogène chimique (3'-méthyl-cholanthrène) de sarcomes faiblement prolifératifs montre que le système immunitaire de l'hôte limite la croissance tumorale donnant lieu à un état d'équilibre durant lequel, sous le contrôle des NK, des T CD4 et CD8, ainsi que des cytokines IFN- γ et IL-12 (Koebel et al., 2007), les cellules transformées existent mais prolifèrent peu démontrant le rôle primordial de la réponse adaptative pour contrôler le développement tumoral. Ces résultats suggèrent donc fortement que les cellules tumorales expriment des Ag reconnus par les cellules de l'immunité adaptative, permettant le contrôle du développement tumoral.

Les souris transgéniques portant la forme activée de la protéine RASG12D Flox-STOP-Flox et l'insertion de deux sites flox de part et d'autre du gène p53 développent, suite à l'infection des cellules pulmonaires par un lentivirus codant pour la cre recombinase, des cancers du poumon très similaires à la pathologie humaine. L'ajout de la séquence codant pour l'épitope SIYRYYGL du peptide OVA dans le lentivirus induit l'expression de cet Ag dans les cellules tumorales. Ceci conduit à un retard dans le développement tumoral comparé à des tumeurs n'exprimant pas l'épitope SIYRYYGL. D'autre part, l'expression de cet épitope favorise l'émergence de cellules T CD8 spécifiques qui sont incapables d'inhiber totalement l'apparition de tumeurs (perte de sécrétion de TNF- α par les T CD8 au cours de la progression) suggérant que ces cellules sont altérées conjointement au développement tumoral. De façon intéressante, le transfert adoptif de ces tumeurs dans des souris saines conduit à une perte de l'épitope SIYRYYGL dans les cellules tumorales. Ceci montre que l'expression de l'Ag par les tumeurs transplantées est associée au

développement d'une réponse T CD8 fonctionnelle dans les souris receveuses, la simple perte de l'Ag permettant la croissance tumorale (DuPage et al., 2011).

Deux mécanismes conduisant à l'échappement tumoral co-existent : i) la perte ou la modification des Ag tumoraux ou de leur présentation, permettant aux cellules transformées de ne plus être ciblées par la réponse adaptative (Khong et al., 2004) et ii) l'induction par les cellules tumorales, dans le micro-environnement tumoral, d'une réponse immune de type tolérogène décrite dès 1976 dans des modèles murins (Fujimoto et al., 1976b; Fujimoto et al., 1976a), aujourd'hui présentée sous le terme d'immuno-subversion tumorale. L'immuno-subversion implique des sous-populations cellulaires et des facteurs solubles responsables de la tolérance immune (Meloni et al., 2006).

1.3.2.2 Altération du système immunitaire en périphérie

Le développement de lésions néoplasiques peut être associé à une diminution du nombre de lymphocytes dans le sang des patientes (Harris et al., 1975; Babusikova et al., 1976). Blake-Mortimer et coll. ont montré en 2004 que le nombre de cellules T CD8 présentes dans le sang est associé à un bon pronostic pour les patientes atteintes de cancer du sein de haut grade dans la classification TNM (Blake-Mortimer et al., 2004). Dans différentes pathologies tumorales solides dont le cancer du sein métastatique, la lymphopénie (réduction du nombre de lymphocytes circulants dans le sang) apparaît comme un facteur indépendant de mauvais pronostic (qui reste significatif en analyse multivariée après intégration dans le modèle de l'ensemble des facteurs pronostics clinico-biologiques significatifs) (Ray-Coquard et al., 2009). Plus récemment notre équipe a montré, dans le cancer du sein métastatique, que la prise en compte de la réduction de diversité des recombinaisons V(D)J définissant l'étendue du répertoire T (divpénie), associée à la lymphopénie, permet de discriminer plus finement un groupe de patientes lympho-divpéniques qui ne répond pas aux traitements de chimiothérapie et décèdent très rapidement. Il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patientes (Manuel et al., 2012). D'autre part la présence de cellules myéloïdes possédant une activité immuno-suppressive sur les T CD4 in vitro a été observée dans le sang de patientes atteintes de cancer du sein (Diaz-Montero et al., 2009). Ces cellules sont identifiées chez l'homme sous le terme de cellules suppressives dérivées de monocyte/neutrophiles (MDSC pour Myeloid Derived Suppressive Cells) et expriment un phénotype de progéniteurs myéloïdes CD14^{neg}CD33⁺HLA-DR^{neg} (Diaz-Montero et al., 2009).

1.3.2.3 Les enjeux de l'immunothérapie dans le cancer

Les stratégies d'immunothérapie du cancer se sont développées sur la base de ces observations en visant deux objectifs : i) augmenter/induire l'activation des cellules immunes vis à vis des Ag tumoraux et ii) contrer l'immuno-subversion induite par la tumeur et son micro-environnement.

De nombreux efforts ont donc été réalisés dans le développement de drogues permettant de modifier les propriétés des DC, de stratégies vaccinales contre les Ag tumoraux ainsi que dans l'utilisation d'Ac ciblant spécifiquement les cellules ou les molécules impliquées dans l'inhibition de la réponse immune. Une immunothérapie efficace devrait permettre l'éradication de la tumeur mais aussi l'induction d'une protection à long terme des patientes contre les rechutes et la dissémination métastatique des tumeurs de sein (Rosenberg, 2001; Dougan and Dranoff, 2009).

Parmi les stratégies développées aujourd'hui pour augmenter l'action anti-tumorale des cellules immunes on retrouve : i) l'utilisation de chimiothérapie induisant une mort immunogène des cellules transformées telles que de faibles doses de cyclophosphamide (Schiavoni et al., 2011; Sistigu et al., 2011), ii) Le développement d'Ac ciblant les cellules tumorales et ayant des propriétés immuno-stimulatrices tel que le trastuzumab (Nutti et al., 2011) iii) L'utilisation de cytokines permettant la stimulation des cellules immunes, comme le traitement par IFN- α +IL-2 (Tonini et al., 1998) ou IL-12 (Bekaii-Saab et al., 2009) iv) l'administration de ligands des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) exprimés par les CPAg tels que le CpG-ODN, un ligand du Toll-Like-Receptor (TLR9) (Xiong et al., 2008).

De nombreux efforts ont été réalisés dans le développement de stratégies vaccinales contre les peptides tumoraux. L'injection d'Ag tumoraux autologues en présence de différents adjuvants ou de molécules chimériques d'Ag tumoraux couplées à des drogues activatrices de l'immunité telles que NVA-Bn-HER-2 sont un champ d'investigation important (Mandl et al., 2012). De même, l'utilisation de DC autologues chargées *in vitro* avec des peptides tumoraux est en cours d'évaluation dans des protocoles cliniques depuis plusieurs années (Baek et al., 2011).

Parmi les stratégies développées pour éradiquer l'immuno-subversion associée au développement tumoral on peut noter : i) le blocage des récepteurs et ligands impliqués dans l'immuno-suppression tel que CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) (Weber et al., 2012) ou PD-1 et PD-L1 (Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012), ii) l'induction de la résistance des cellules immunes effectrices vis-à-vis des Treg ou iii) l'éradication spécifique des Treg associés aux tumeurs (TA-Treg). Chez l'homme, dans le cas du mélanome, l'utilisation de l'Ac anti CTLA-4 a été la première démonstration, que modifier la réponse immune peut permettre d'augmenter

la survie des patients cancéreux, validant en situation clinique que l'immunothérapie peut être bénéfique dans le traitement du cancer. Ces stratégies visant à lever l'immuno-suppression seront évoquées plus en détail en partie 4.3 et dans la discussion.

Conclusion partie I : Le cancer du sein représente un problème majeur de santé publique car c'est une pathologie très répandue dans la population mondiale qui constitue la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Le cancer du sein est aussi une maladie impactant le système immunitaire, qui détecte et réagit face au développement tumoral. L'immuno-subversion associée au développement du cancer du sein permet de dégager de nouvelles variables pronostiques et ouvre la possibilité d'agir sur le système immunitaire pour augmenter la réponse anti-tumorale chez les patientes. Comprendre les mécanismes d'induction de la tolérance immunitaire est indispensable pour identifier de nouvelles approches d'immunothérapie.

2 Origine et diversité des cellules T immuno-suppressives : Les Treg « gardiens du soi »

Parmi les cellules T CD4 effectrices, on distingue aujourd'hui 6 type de polarisation auxiliaires/effecteurs (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh) et trois types de cellules polarisées immuno-suppressives (Treg, Tr1 et Th3). De plus, Il existe plusieurs sous-populations de cellules T (CD3⁺) suppressives ne provenant pas de la polarisation de lymphocytes T CD4 (T CD8 et NKT). La diversité des cellules T effectrices permet d'adapter la réponse immunitaire en fonction de la nature du pathogène/signal de danger détecté. Ainsi la réponse T effectrice va impliquer de façon différentielle les sous-populations de cellules T effectrices lors d'une réponse anti-virale, contre un parasite extracellulaire ou vis-à-vis des cellules cancéreuses. L'amplification et l'inhibition des différentes sous-populations de cellules T effectrices les unes par rapport aux autres permettent une plasticité et une régulation très fine de la réponse immune. Les cellules T immuno-suppressives présentent, elles aussi, une diversité garantissant un contrôle de la réponse immune dans divers contextes inflammatoires ou homéostatiques/physiologiques tels que le contrôle de la flore bactérienne intestinale, la grossesse, l'abolition des réponses auto-immunes et la tolérance orale. Pour caractériser de nouvelles cibles permettant d'accroître la réponse immune anti-tumorale, nous devons être capables d'identifier les sous-populations de cellules T pouvant être impliquées dans la tolérance vis-à-vis des Ag tumoraux.

2.1 Caractéristiques des cellules T CD4 immuno-suppressives

Le concept de cellules immuno-suppressives d'origine thymique remonte à 1970 où Gershon et Condo (Gershon and Kondo, 1970) ont observé, lors de l'immunisation de souris contre des globules rouges de mouton, l'induction d'une réponse immuno-suppressive médiée par les cellules provenant du thymus. La présence de cellules d'origine thymique lors de la première immunisation, conduit à une réduction de la réponse humorale lors d'une seconde injection de globules rouges de mouton. Ce résultat démontre que les thymocytes participent à la fois à l'amplification de la réponse humorale et à son contrôle par des mécanismes de suppression non définis. Pendant les 25 années suivantes, l'existence de cellules T immuno-suppressives a été démontrée dans différents modèles (Powell et al., 1982; Morrissey et al., 1993; Powrie et al., 1993; Chen et al., 1994; Taguchi and Nishizuka, 1981) mais ce n'est qu'en 1995 que Sakaguchi et coll. ont identifié les Treg en tant que sous-population particulière de T CD4 exprimant CD25

(Sakaguchi et al., 1995). Les Treg représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4 chez la souris et 1 à 5 % chez l'homme (Suri-Payer et al., 1998). Dès les premiers jours de la vie extra-utérine, les Treg se développent et protègent l'individu contre les pathologies auto-immunes induites par des lymphocytes T auto-réactifs périphériques ayant résisté à la sélection négative dans le thymus à la fin de l'ontogénèse des lymphocytes T CD4 et CD8 (Sakaguchi et al., 2001; Baecher-Allan et al., 2001). Les Treg peuvent être amplifiés *in vitro* après purification par l'association du signal CD3 (signal du TCR), d'un signal de co-stimulation (CD28) et de fortes doses d'IL-2, tout en conservant leurs capacités suppressives sur la prolifération des autres cellules T CD4 mémoires ou naïves du sang périphérique chez l'homme (Levings et al., 2001b). Moduler les proportions et les fonctions des Treg CD25⁺ devient alors une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement des pathologies auto-immunes (Shevach, 2000) ou les protocoles de transplantation pour empêcher le rejet de greffe (Joffre et al., 2008).

2.1.1 Découverte des cellules Treg FoxP3⁺

Aujourd'hui, l'expression du facteur de transcription FoxP3 (winged helix/forkhead box protein 3) est le meilleur marqueur pour identifier les Treg chez l'homme et la souris. Des mutations du gène *foxp3* situé sur le chromosome X ont été décrites en 2001 par Bennet et coll. pour leur implication dans le syndrome familial IPEX (Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome) (Bennett et al., 2001). L'IPEX, est le corollaire humain du syndrome scurfy chez la souris. En 2001, Brunkow et coll. ont démontré que les souris scurfy portent une mutation dans l'exon 8 du gène FoxP3 et que la transfection du gène FoxP3 sauvage dans les embryons de souris scurfy permet de supprimer la pathologie. Ils ont également observé que le nombre de cellules T ainsi que le rapport T CD8/T CD4 sont très fortement réduits dans les animaux surexprimant FoxP3 (Brunkow et al., 2001). En 2003, Fontenot et coll. ont démontré que le syndrome scurfy est associé à une perte des Treg CD25⁺ et que l'injection de Treg CD25⁺ chez ces animaux permet de soigner la maladie (Fontenot et al., 2003). D'autre part, l'expression ectopique de FoxP3 dans les cellules T CD4 normales conduit à l'acquisition de fonctions régulatrices (Hori et al., 2003). Cependant, comme pour beaucoup d'autres marqueurs cellulaires exprimés par les Treg, une expression faible de FoxP3 peut être observée sur des cellules T CD4 effectrices suite à leur activation (Walker et al., 2003). (Tableau 2)

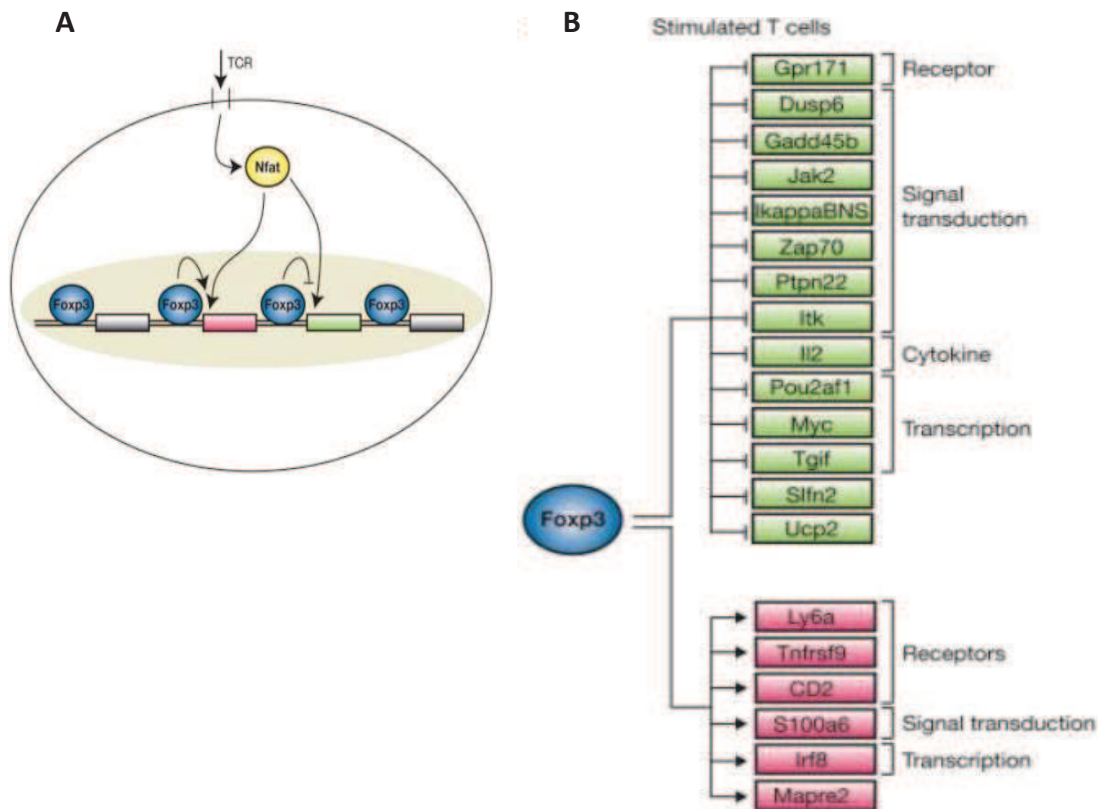
Des données récentes précisent que l'expression de FoxP3 est majoritairement cytoplasmique dans les cellules effectrices alors qu'elle est principalement nucléaire dans les Treg. Ces différences de localisation entre cellules T effectrices et Treg reposent sur l'existence, chez l'homme, de 3 isoformes de FoxP3 sélectivement exprimées dans les sous-populations T CD4

(Magg et al., 2012). Les trois variants : FoxP3 non épissé, FoxP3 Δ 2 et FoxP3 Δ 2 Δ 7 sont exprimés par les Treg (CD127^{Low/neg}CD25⁺). Suite à la co-stimulation de CD3 et de CD28, les Treg surexpriment FoxP3 Δ 2 dix fois plus fortement que les T CD4 CD25^{neg} dans les mêmes conditions (Kaur et al., 2010). L'exon 2 encode pour un domaine qui permet l'interaction avec le facteur de transcription ROR- γ T ce qui inhibe la sécrétion d'IL-17 (Ichiyama et al., 2008). L'exon 7 constitue une partie du domaine Leucine Zipper permettant l'interaction avec l'ADN, des mutations de cette séquence ont été identifiées dans l'IPEX (Ziegler, 2007). L'isoforme Δ 2 Δ 7 n'entraîne pas l'acquisition de la fonction suppressive lorsqu'elle est surexprimée dans des T CD4 CD25^{neg} par transfection. De plus, elle est capable de supprimer l'expression de CD25 et CTLA-4 induite par les formes FoxP3 non épissées et FoxP3 Δ 2. Cela suggère que l'isoforme Δ 2 Δ 7 pourrait avoir un impact dominant négatif sur les autres isoformes (Mailer et al., 2009). Dans les travaux que nous avons réalisés, nous avons identifié les Treg parmi les cellules T CD4, sur la base de leur expression de FoxP3, et/ou de leur forte expression de CD25, associée à une très faible expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127).

2.1.1.1 Gènes cibles de FoxP3

La protéine FoxP3 a été identifiée, chez la souris scurfy, en tant que facteur de transcription inhibant les gènes impliqués dans l'activation des cellules T par compétition avec le facteur de transcription NFAT induit après engagement du TCR (Schubert et al., 2001; Gavin et al., 2006) (Figure 4). Des publications plus récentes montrent que FoxP3 interagit avec les facteurs de transcription AML1 (acute myeloid leukaemia 1)/Runx1 (Runt-related transcription factor 1) et NFAT (Wu et al., 2006) ce qui bloque la transcription de leurs gènes cibles, tels que IL-2, IL-4, IL-17, IL-21, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CD127 et la cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B qui dégrade l'AMPc intracellulaire (favorisant l'accumulation d'AMPc dans le cytoplasme) (Figure 4). En parallèle, FoxP3 induit l'expression membranaire de molécules telles que CD25, CTLA-4 et GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor) (Gavin et al., 2006; Coffier and Burgering, 2004; Ono et al., 2007). Une approche par « ChIP-on-chip » (chromosome immuno-précipitation suivie d'une analyse par puce à ADN) a permis l'identification des cibles directes de FoxP3 par fixation sur l'ADN. Par ailleurs, l'analyse transcriptionnelle d'hybridomes T murins exprimant ou non Foxp3 a montré que les gènes cibles de FoxP3 sont pour la plupart associés à la signalisation du TCR (Marson et al., 2007). FoxP3 est exprimé très précocement et de façon continue dans les Treg. Il bloque la transcription de PTPN22 codant une phosphatase (Lyp) qui régule négativement la signalisation du TCR par la déphosphorylation de ZAP70, et de Lck (Marson 2007 et Vang T. 2005 Nat gen), ceci donnant aux Treg un seuil d'activation du TCR plus sensible

que les autres cellules T (Figure 4). Ainsi, à l'état basal (non activé), l'expression de FoxP3 ne change que très faiblement les profils d'expression génique alors qu'après activation, il module l'expression de 1% des gènes (entre 700 et 1100 messagers) dans les cellules T murines (Marson et al., 2007).



Adapté d'après Marson et coll, **Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T cell stimulation** Nature 2007

Figure 4: FoxP3 module les gènes important dans la réponse des cellules T CD4 après engagement du TCR

FoxP3 interagit directement avec NFA-T, un facteur de transcription intervenant en aval de la signalisation du TCR modifiant de façon importante la réponse des cellules T lors de l'activation. L'interaction entre FoxP3 et NFA-T conduit à une forte modification du programme de transcription en aval de l'activation du TCR. Ceci est associé à l'inhibition de gènes eux aussi importants dans la transduction et la régulation du signal tels que *ptpn22*, *jak2* et *zap70*. FoxP3 inhibe également l'expression de cytokines induites suite à l'engagement du TCR i.e. IL-2. D'autre part, FoxP3 induit l'expression de certains gènes dont *irf8*. L'expression de FoxP3 par la cellule T module fortement sa réponse lors de l'activation par l'engagement du TCR.

L'expression ectopique de FoxP3 dans des cellules T CD4 est également associée à des modifications du profil d'expression des miRNA et l'élimination de DICER (ARNase III impliquée dans la fonctionnalité des miRNA) spécifiquement dans les cellules T CD4 conduit à une forte réduction des Treg et à un syndrome auto-immun (Cobb et al., 2006) montrant l'importance des miRNA dans la biologie de ces cellules. Seul 2/3 des modifications transcriptionnelles identifiées dans les Treg purifiés sont retrouvées dans les cellules T CD4 non Treg transfectées par FoxP3

(Hill et al., 2007). Cette donnée suggère que d'autres facteurs régulant la transcription sont impliqués dans les fonctions Treg. Ainsi en 2010 Ouyang et coll. ont montré que les facteurs de transcription FOXO1 et FOXO2 exprimés par les cellules T sont importants dans l'homéostasie des Treg. Ils participent à l'induction, par fixation sur son promoteur, du gène *foxp3* lui-même (Ouyang and Li, 2011). Les Treg issus de souris FOXO1/3 muté expriment de plus faibles niveaux de FoxP3, produisent après réactivation *in vitro* de l'IFN- γ et de l'IL-17 et sont incapables de réverser les syndromes auto-immuns des souris scurfy dans un modèle de chimère de moelle osseuse (Ouyang and Li, 2011).

2.1.1.2 Génération thymique des Treg

Les premières caractérisations des Treg ont clairement montré leur développement dans le thymus. Les travaux réalisés par le groupe de N. Le Douarin en 1987 portant sur le développement de l'embryon de poulet ont montré que la greffe de cellules épithéliales thymiques dans des embryons allogéniques permet de tolérer la greffe parallèle du bourgeon donnant naissance à l'aile lorsqu'il provient du même donneur (Ohki et al., 1987). Cette observation démontra formellement que les cellules thymiques sont capables d'induire la tolérance des auto-Ag ou des Ag allogéniques une fois transplanté dans un animal receveur. Plus tard, Asano et coll. en 1999 ont montré que l'absence de Treg (T CD4 CD25⁺) dans les souris ayant subi une thymectomie néo-natale, conduit à l'apparition de maladies auto-immunes, qui peuvent être inhibée par injection de cellules CD25⁺ provenant d'animaux adultes non thymectomisés (Asano et al., 1996), démontrant l'origine thymique des Treg CD25⁺ chez la jeune souris. Puis, Fontenot et coll. ont observé que l'expression de FoxP3 est induite sur une sous-population de cellules T dans la zone médullaire thymique (Fontenot et al., 2005). En somme, Les Treg CD25⁺FoxP3⁺ provenant de souris adultes sont capables de se substituer aux Treg d'origine thymique et de transmettre la tolérance dans les animaux thymectomisés, en supprimant l'apparition de maladies auto-immunes, dès lors que l'ensemble des auto-Ag exprimés par le receveur sont également présent chez le donneur.

Dans le thymus, les cellules épithéliales corticales (c-TEC) sont impliquées dans la sélection positive des cellules T au stade double positif (DP: CD8⁺CD4⁺) *via* la présentation d'auto-Ag sur leurs CMH de classe II (Laufer et al., 1996). Les cellules T CD4 simple positives (SP) subissent ensuite la sélection négative qui conduit à la déplétion et/ou à l'anergie des cellules auto-réactives. Cette étape de sélection négative permet donc d'induire la tolérance par déplétion des cellules T auto-réactives et fait appel aux CPAg thymique d'origine hématopoïétique et aux TEC médullaires (m-TEC). Des expériences de souris chimériques ont permis de montrer que

l'expression du CMH-de classe II sur les CPAg thymiques est indispensable pour une déplétion correcte des cellules T auto-réactives (van Meerwijk et al., 1997). Ce mécanisme de déplétion des cellules T auto-réactives dans le thymus par les CPAg est également réalisé en partie par les mTEC qui induisent l'anergie des cellules T auto-réactives et explique pourquoi les souris thymectomisées développent des maladies auto-immunes par absence d'élimination des clones T auto-réactifs. Cependant, le mécanisme de déplétion des T auto-réactifs n'explique pas la transmissibilité de la tolérance comme le montre le blocage du développement de maladies auto-immunes par la transplantation de splénocytes ou le transfert de Treg dans les souris thymectomisées.

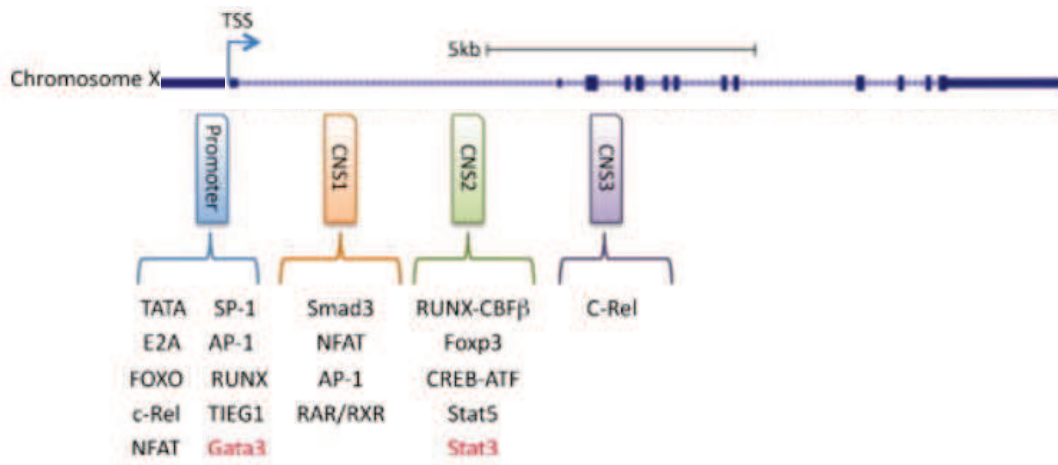
Ces données suggèrent que l'expression d'auto-Ag dans le thymus permet l'induction de Treg spécifiques supprimant les maladies auto-immunes. L'analyse de la diversité des TCR de la sous-population FoxP3⁺ dans le thymus a montré que les Treg possèdent un répertoire diversifié mais qui ne se superpose pas totalement avec celui des autres cellules T CD4, suggérant un biais dans les étapes de sélection. Les observations de Hsieh et coll. démontrent que les Treg (FoxP3⁺) dans le thymus présentent un répertoire fortement similaire à celui des Treg du sang contrairement aux autres cellules T CD4 dont le répertoire TCR est plus vaste dans le thymus que dans le sang. De plus, le répertoire des Treg est similaire à celui des cellules T activées auto-réactives dans les souris délétés pour le gène FoxP3 (Hsieh et al., 2006). En accord avec une plus forte affinité du répertoire TCR des Treg pour les Auto-Ag, Moran et coll. ont montré en 2011 que l'intensité de transduction du signal TCR est plus élevée dans les Treg que dans les autres cellules T thymiques (Moran et al., 2011). Le mécanisme de génération des Treg implique alors les étapes de sélection positive et négative des cellules T, les Treg répondraient différemment à ce processus par rapport aux cellules T non Treg. L'expression d'un ligand de TCR connue (fusion du CMH-II/peptide connu), spécifiquement dans les c-TEC, conduit à l'émergence de Treg spécifiques de ce ligand de TCR alors que les cellules T non Treg sont déléetées. Cette donnée montre la capacité des c-TEC à présenter des Ag permettant la génération de Treg auto-réactifs qui ne seront pas perdus durant l'étape de sélection négative (Ribot et al., 2007). Cependant, l'utilisation de modèles chimériques permettant une expression des CMH-II spécifiquement dans les CPAg thymique d'origine hématopoïétique a permis de montrer que les Treg conservent leur répertoire auto-réactif même s'ils subissent une sélection négative *via* les CPAg thymiques identique à celle des autres cellules T CD4 (Romagnoli et al., 2005b). Les Treg présentant une affinité plus élevée que les autres cellules T pour les auto-Ag ne sont pas déléetées par les mTEC ce qui pourrait expliquer pourquoi leur répertoire est plus affiné pour les auto-Ag (Romagnoli et al., 2005a). L'environnement permettant l'induction de Treg et impliquant l'expression d'auto-

Ag par les c-TEC et la relation entre les Treg et les mTEC suppose l'existence de niche favorisant l'induction des Treg. L'expression des ligands de CD28 et de CD152/PDL-1 (programmed death ligand -1) par les CPAg et les m-TEC ainsi que la présence des cytokines IL-2, IL-15 et TGF- β dans la zone médullaire du thymus conditionnent l'émergence de cellules exprimant FoxP3 (Burchill et al., 2007; Grewal and Flavell, 1998; Lio and Hsieh, 2008; Liu et al., 2008; Spence and Green, 2008) bien que la source des cytokines ne soit pas encore identifiée. La relation entre les Treg et la niche permettant leur induction dans le thymus ne sera pas présentée dans ce document (Romagnoli et al., 2012). Les Treg sont identifiables dès l'étape de sélection négative. En effet, des cellules T au stade DP exprimant FoxP3 et exerçant un pouvoir suppresseur sur les autres populations de cellules T ont été identifiées chez l'homme (Nunes-Cabaco et al., 2011). Au final, pour chaque cellule T CD4 auto-réactive pouvant émerger malgré la sélection négative, il existerait au moins un Treg spécifique permettant de bloquer l'induction de pathologies auto-immunes (Hsieh et al., 2012; Jordan et al., 2001).

2.1.1.3 Les Treg FoxP3⁺ d'origine non thymique

L'expression de FoxP3 n'est pas restreinte aux Treg originaires du thymus. Le TGF- β , l'IL-2 mais aussi l'IL-10 (Perez et al., 2008) peuvent participer à l'émergence de cellules CD4⁺CD25⁺ exprimant FoxP3 et présentant une activité suppressive *in vitro* et *in vivo* en périphérie, à partir de cellules T CD4 naïves. On distingue ainsi les Treg induits (iTreg) des Treg naturels d'origine thymique (nTreg) (Chen et al., 2003; Fu et al., 2004; Knoechel et al., 2005; Levings et al., 2001a) parmi l'ensemble des cellules T CD4 exprimant fortement FoxP3. Un des principaux sites d'induction des iTreg est l'intestin (Mucida et al., 2005), l'administration d'ovalbumine (OVA) par voie orale mais aussi la flore bactérienne et les Ag présents dans la nourriture favorisant l'apparition d'iTreg spécifiques. De même, Curotto de Lafaille et coll. ont mis en évidence l'induction d'iTreg dans des modèles d'inflammation chronique (Curotto de Lafaille et al., 2008). Contrairement aux nTreg, les iTreg sont issus de cellules T CD4 naïves et peuvent présenter un chevauchement complet de leur répertoire TCR avec les autres T CD4 (Sun et al., 2007). L'état de méthylation du gène *foxp3* est une différence essentielle entre nTreg et iTreg. Une région nommée TSDR (Treg cell-specific demethylated region) est totalement déméthylée dans les nTreg alors qu'elle ne l'est que partiellement dans les iTreg. Dans les nTreg, la zone non codante CNS-2 du gène *foxp3* proche du promoteur est déméthylée, permettant le maintien de son expression par les facteurs de transcription AP-1, NFAT et Foxp3 lui-même. Contrairement aux nTreg, les iTreg induits à partir de cellules T naïves en présence de TGF- β présentent une méthylation de la région CNS-2, l'expression de FoxP3 est donc sous la dépendance de SMAD3

qui interagit avec la région CNS-1, soulignant le rôle important du TGF- β dans l'induction de ces iTreg (Figure 5).



Adapté d'après Maruyama et coll. **The molecular mechanisms of *Foxp3* gene regulation** *Semin. Immunol* 2011

Figure 5: Principaux sites de méthylation régulant l'expression de FoxP3 dans les Treg dans la région TSS (transcriptional start site) et le promoteur du gène *foxp3*

La modification épigénétique de la région TSDR (Treg cell-specific demethylated region) du gène *foxp3* module la stabilité de son expression dans les cellules T en conditionnant l'accessibilité des sites d'interaction avec les facteurs de transcription inducteurs et inhibiteurs de l'expression de FoxP3 suite à l'engagement du TCR. Les nTreg présentent une déméthylation importante de la région CNS-2 contrairement aux iTreg induits par le TGF- β , cette déméthylation de la région CNS-2 permet la stabilisation de l'expression de FoxP3 spécifiquement dans les nTreg.

CNS: séquences non codantes en aval du promoteur du gène *foxp3*. La liste des facteurs de transcription interagissant avec les séquences CNS et le promoteur est indiquée. Les facteurs de transcription en noir sont inducteurs alors que ceux en rouge sont inhibiteurs.

La déméthylation de l'ADN est une modification épi-génétique héritable de la cellule mère à la cellule fille. Cette différence entre nTreg et iTreg est à mettre en perspective avec la notion de plasticité des Treg. Ainsi les nTreg maintiennent leur fonction suppressive au cours des générations alors que les iTreg voient leur pouvoir supprimeur disparaître s'ils sont cultivés en absence de TGF- β (Floess et al., 2007; Miyao et al., 2012; Zheng et al., 2010). Cette instabilité des iTreg limite leur utilisation pour contrôler les réactions à l'encontre des Ag de l'hôte, lors de transfert de moelle allogénique chez la souris (rejet de l'hôte par le greffon suite au transfert de moelle (GvHD)) (Beres et al., 2011). Durant ces dernières années de nombreux efforts ont donc été réalisés pour identifier des marqueurs sélectivement exprimés par les iTreg et les nTreg permettant de les différencier. En 2010 Thornton et coll. ont montré que le facteur de transcription Helios (famille Ikaros) est exprimé par des cellules T au stade DP dans 100% des précurseurs de nTreg Foxp3⁺ dans le thymus. De plus, 70% des cellules FoxP3⁺ expriment Helios dans les ganglions lymphatiques alors qu'il est absent dans les iTreg humains induits *in vitro* par

le TGF- β et *in vivo* lors d'expériences de tolérisation par voie orale chez la souris (Thornton et al., 2010).

Tableau 2: Principaux marqueurs exprimés par les Treg

Molécule	caractéristiques	expression	Ref
FoxP3	Facteur de transcription	Exprimé par les nTreg, iTreg mais aussi par certaines cellules T CD8 suppressives	Fontenot 2003
Helios	Facteur de transcription	Exprimé essentiellement par les nTreg et une fraction des iTreg	Thorton 2010
CD25	Chaîne α du récepteur à l'IL-2	Exprimé par les nTreg, les iTreg, les cellules T activées et les monocytes	Sakaguchi 1995
ICOS	Récepteur de co-stimulation famille de CD28 Ligand ICOS-L	Exprimé par les nTreg à l'état basal et les cellules T activées	Ito 2008
CTLA-4	Récepteur de co-stimulation famille de CD28 Ligand CD80/CD86		Chen 1998
PD-1	Récepteur de co-stimulation famille de CD28 Ligand PD-L1 et PD-L2		Raimondi 2004
4.1BB	Récepteur de co-stimulation famille des TNF récepteurs Ligand 4.1BB-L		Mc Hugh 2002
GITR	Récepteur de co-stimulation famille des TNF récepteurs Ligand GITR-L		Mc Hugh 2002
OX40	Récepteur de co-stimulation famille des TNF récepteurs Ligand OX40-L		Mc Hugh 2002
CD39	Ecto-nucléotidase triphosphate diphosphohydrolase 1 : dégrade l'ATP et l'ADP extracellulaire en AMP	Exprimé par les Treg, une sous-population de cellules T CD4 et CD8 activée et les CPAg	Mandapathil 2009
CD103	Intégrine α E	Exprimé par les Treg, une fraction des cellules T CD4 activées et une sous-population de CPAg	Lehmann 2002
GARP	Glucoprotéine-A répétitions predominant protéin: fixation du TGF- β intervient dans la conversion de pro-TGF- β en TGF- β actif	Exprimé en membrane par les Treg	Tran 2009
BDCA-4 Neuropiline	Co-récepteur membranaire intervenant dans la signalisation du VEGF et de la sémaphorine-3	Exprimé essentiellement par les nTreg	Hill 2007

Ces résultats très encourageants ont récemment été contredits par Gottschalk et coll. qui ont observé que les iTreg induits *in vivo* peuvent aussi exprimer Helios invalidant son utilisation pour identifier les nTreg (Gottschalk et al., 2012). La même année Zabransky et coll. ont montré que l'expression d'Helios par les Treg corrèle avec la surexpression de CD103 (intégrine αE) et de GITR associée à un pouvoir suppresseur exacerbé (Zabransky et al., 2012). Une comparaison du profil transcriptomique entre nTreg et cellules T CD4 transfectées avec le gène *foxp3* suggère une expression spécifique de la Neuropiline 1 (BDCA-4) par les nTreg (Hill et al., 2007). D'autre part, BDCA-4 est constitutivement exprimée par les nTreg alors que son expression est perdue sur les cellules T CD4 naïves suite à l'engagement du TCR (Bruder et al., 2004). Les Treg présents dans l'intestin ainsi que les iTreg qui se développent parmi les cellules T CD4 naïves transférées dans un hôte autologue n'expriment pas BDCA-4. Ces observations suggèrent que BDCA-4 pourrait n'être exprimé que par les nTreg parmi les cellules FoxP3⁺. Cependant, l'expression de BDCA-4 peut être induite sur des Treg BDCA-4^{neg} lors de leur activation en présence de TGF- β démontrant que dans certains contextes BDCA-4 pourrait être induit sur les iTreg (Papatriantafyllou, 2012). L'ensemble de ces données ne permettent donc pas de conclure formellement sur l'existence de marqueurs permettant de différencier les iTreg des nTreg mais fait émerger une nouvelle sous-population de cellules Treg Helios⁺CD103⁺ à fort pouvoir suppresseur (Tableau 2).

2.1.2 Diversité des sous-populations de cellules T CD4 immuno-suppressives autres que les Treg classiques (FoxP3⁺CD25^{hi},CD127^{low})

Les Treg CD4⁺FoxP3⁺ sont présents naturellement dans le sang circulant, les organes lymphoïdes et de nombreux tissus, où ils inhibent le développement des réactions auto-immunes. Durant la réponse adaptative, les mécanismes de polarisation et d'activation des lymphocytes T peuvent conduire à l'émergence d'autres cellules T immuno-suppressives participant au contrôle des réponses pro-inflammatoires mais n'exprimant pas FoxP3.

2.1.2.1 Les lymphocytes Tr1

Les cellules Tr1 sont caractérisées par une forte sécrétion d'IL-10. Initialement identifiées chez la souris (Groux et al., 1997), elles sont capables d'inhiber la réponse T Ag spécifique. En plus de fortes quantités d'IL-10, elles produisent de l'IL-5 et de faibles quantités d'IFN- γ , de TGF- β et d'IL-2 mais pas d'IL-4. La sécrétion d'IL-10 est le principal médiateur du pouvoir suppresseur des Tr1 sur les autres populations T et provoque leur propre anergie. Ces cellules sont induites lors de l'activation de T CD4 naïves en présence d'IL-10 (Groux, 2003). L'IL-27 sécrétée par les DC a été récemment impliquée dans leur induction, *via* l'inhibition des gènes associés au phénotype

Th17 (Pot et al., 2011). Cette action d'IL-27 est augmentée en présence d'IL-21 et est dépendante de l'expression de la molécule ICOS (inducible co-stimulatory molecule) (Pot et al., 2009). D'autre part, l'engagement de GITR, CTLA-4 ou PD-1 peut favoriser leur induction (Fujio et al., 2010).

2.1.2.2 Les lymphocytes Th3

Les lymphocytes Th3 sont des cellules T CD4 immuno-suppressives induites dans l'intestin, en présence de TGF- β et suite à l'engagement de leur TCR, à partir de T CD4 naïfs. Ces cellules sont caractérisées par une forte production de TGF- β et sont impliquées dans la tolérance orale par l'induction d'iTreg lors de l'activation de cellules T CD4 naïves par leur Ag cible en absence d'inflammation. Les Th3 produisent de faibles quantités d'IL-10 et d'IL-4 mais ne produisent ni IL-2 ni IFN- γ et de fait, sont capables de supprimer les réponses Th1 et Th2 (Chen et al., 1994; Faria and Weiner, 2005; Fukaura et al., 1996; Weiner et al., 2011). Carrier et coll. ont montré que les cellules Th3 seraient impliquées dans la génération de iTreg *via* leur importante sécrétion de TGF- β (Carrier et al., 2007a; Carrier et al., 2007b).

2.1.2.3 Les lymphocytes Th17 immuno-suppresseurs

Les cellules Th17 sont caractérisées pour leur expression de ROR- γ T, RORc, CCR6 et IL-17. Les cellules Th17 induites *in vitro* en présence d'IL-1 β , IL-6 et IL-23 ainsi que les cellules productrices d'IL-17 dans le sang de donneurs sains contiennent une sous-population capable de supprimer la sécrétion d'IFN- γ , la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules T CD8 (Beriou et al., 2009; Zhao et al., 2012). Chez l'homme, les Treg FoxP3⁺ sont composés de deux sous-populations sur la base de l'expression ou non du CMH de classe II HLA-DR. Une fraction des Treg HLA-DR^{neg} expriment IL-17, RORc et CCR6 mais ne produisent pas d'IFN- γ . Ces cellules exercent un pouvoir suppresseur important sur les autres cellules T lorsqu'elles sont activées par un engagement du TCR avec un Ag de faible affinité (Beriou et al., 2009). Cependant l'expression de CCR6, leur sécrétion d'IL-17, l'expression de RORc et la co-expression de FoxP3 leur confère un phénotype de cellules Th17 suppressives (Beriou et al., 2010). D'autre part, il a été montré que lors de co-culture de cellules T CD4 CD25^{neg} avec des CPAg, une population de cellules FoxP3⁺ IL-17⁺ présentant un pouvoir suppresseur était induite. Ces cellules co-expriment FoxP3, IL-17, ROR γ -T, Runx-1 et Runx3 et leur induction est potentialisée en présence d'IL-1 β . Les cellules FoxP3⁺ IL-17⁺ pourraient alors provenir d'une population de iTreg exprimant un phénotype Th17, dès lors il ne s'agirait pas de cellules Th17 à proprement parler mais plutôt d'une plasticité des iTreg (Li et al., 2012b).

Chez la souris, une publication récente (Chalmin et al., 2012) démontre que les cellules Th17 suppressives peuvent être caractérisées par la co-expression de CD39 et CD73 qui leur permet tout comme les Treg, de générer de l'Adénosine (Ado) immuno-suppressive à partir d'ATP, induisant l'anergie des autres cellules T CD4 (voire la partie 2.3).

2.1.3 Les autres cellules T immuno-suppressives

L'exposition chronique de cellules T CD8 à leur Ag spécifique conduit à l'émergence de cellules en différenciation tardive faiblement prolifératives ayant perdu l'expression de CD28. Parmi ces cellules on observe une sous-population exprimant FoxP3 qui présente une réduction de capacité à produire Granzyme B, des cytokines (IL-2, IL-10, IFN- γ) et exprime fortement les gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl2 (Koch et al., 2008; Vlad et al., 2010). Ces cellules peuvent être induites par des CPAg chez la souris (Gilliet and Liu, 2002). Il existe une seconde sous-population de cellules T CD8⁺CD28⁻ immuno-suppressives qui n'exprime pas FoxP3 mais qui est caractérisée par une forte sécrétion d'IL-10. A l'instar des cellules Tr1, ces cellules sont induites en présence d'IL-10 et d'IL-2 et expriment GITR et CD103 (Fenoglio et al., 2008; Filaci et al., 2007). Enfin, une sous-population de cellules CD8⁺CD28⁻CD57⁺ a été décrite chez des patients porteurs du VIH ou ayant reçu une transplantation de moelle osseuse (Frassanito et al., 1995; Strioga et al., 2011; Wang et al., 1995).

Dans le sang et les ganglions, 1 à 4 % des CD3⁺ sont doubles négatifs (CD4⁻CD8⁻) et expriment un TCR α/β . Ces cellules sécrètent de fortes quantités d'IFN- γ , pas ou très peu d'IL-2 et des quantités marginales d'IL-5, IL-4 et IL-10 (Fischer et al., 2005). Elles montrent, chez l'homme et la souris, un important pouvoir supresseur sur les populations T CD4 et T CD8 ainsi que sur les CPAg. Chez l'homme, le mécanisme de suppression de ces cellules n'est pas encore clairement identifié et pourrait passer par une compétition entre cellules doubles négatives et effecteurs T lors de la présentation antigénique par les CPAg (Juvet and Zhang, 2012).

Les lymphocytes T γ/δ représentent une sous-population de cellules T exprimant les gènes codant pour les chaînes γ et δ du TCR. Ces cellules sont présentes dans le derme, l'épithélium intestinal, le foie, la rate, le thymus et le sang (Bonneville et al., 2010; Hayes, 2005). Un nombre croissant d'études chez la souris a montré que ces cellules, bien que généralement associées à l'immunité, peuvent présenter des fonctions immuno-régulatrices par i) la lyse des macrophages activés (Dalton et al., 2004), ii) la sécrétion de TGF- β et d'IL-10 (Ashour and Niederkorn, 2006; Bhagat et al., 2008; Kapp et al., 2004) ou iii) l'induction d'apoptose des cellules T CD4 et CD8 activées (Bhagat et al., 2008; Vincent et al., 1996).

Enfin, les cellules NKT co-expriment un TCR et des marqueurs de NK, ils représentent 40% des cellules CD3⁺ dans la moelle osseuse et sont divisés en 2 sous-populations. La sous-population iNKT (invariant NKT) possédant un répertoire TCR très restreint qui reconnaît les phospholipides présenté par le CD1d et une sous-population de type 2 qui exprime un répertoire TCR normal. Ces cellules peuvent produire des réponses de type Th1 et Th2 mais sont également impliquées dans des mécanismes de suppression *via* la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4 et participent à l'activation des Treg (Sonoda et al., 1999).

2.2 Mécanismes de suppression associés aux Treg

La localisation des Treg à proximité de leurs cellules cibles, sur le site d'inflammation et dans les zones d'activation/polarisation de la réponse immunitaire adaptative est une condition indispensable à leur pouvoir suppresseur. En effet, les Treg agissent sur les autres cellules T, les cellules NK et les CPAg par des mécanismes impliquant conjointement le contact cellulaire, des facteurs solubles et des modifications du micro-environnement.

2.2.1 Le recrutement des Treg est une condition à leur fonction suppressive

De façon générale, les Treg peuvent exprimer des molécules d'adhésion telles que les intégrines $\alpha 4\beta 7$, $\alpha E\beta 7$ (Stassen et al., 2004), les L, P et E sélectines (Zhang et al., 2009) ainsi que des récepteurs de chimiokines (CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR3, CXCR4 et CXCR5) (Hoerning et al., 2012; Zhang et al., 2009; Zou et al., 2004) leur permettant d'être recrutés au site d'inflammation et dans les ganglions. Chez l'adulte, 80% des nTreg expriment fortement CCR4, récepteur des chimiokines MDC/CCL22 et TARC/CCL17 (Grindebacke et al., 2009). Donc, CCL22 joue un rôle particulier sur les nTreg car, les iTreg tout comme les T effecteurs, sont induits à partir de T CD4 naïfs qui migrent dans les ganglions en réponse à CCR7 avant d'être polarisés en iTreg FoxP3⁺ CCR4⁺. Ainsi les nTreg sont la principale sous-population de T CD4 recrutés dans la peau inflammée sans avoir préalablement été polarisés dans un organe lymphoïde secondaire.

La transfection d'un vecteur viral de CCL22, dans ces cellules β du pancréas, chez la souris NOD (non-obese diabetic mice) conduit au recrutement des Treg et permet de bloquer l'apparition du diabète auto-immun chez ces animaux (Grindebacke et al., 2009; Montane et al., 2011). Dans un modèle murin de colite inflammatoire, l'importance du recrutement des Treg par CCL22 dans les ganglions mésentériques a été montrée par transfert adoptif de Treg invalidés pour le gène CCR4, conduisant à une perte de l'effet bénéfique des Treg dans la pathologie (Yuan et al., 2007). Le développement d'un antagoniste de CCR4 a permis de montrer que l'inhibition du

recrutement des Treg et des Th2 en réponse à CCL22/CCL17 augmente la réponse vaccinale *in vitro* et *in vivo* (Bayry et al., 2008; Davies et al., 2009).

Cependant, le trafic des Treg vers les ganglions est aussi primordial car une délétion du récepteur CCR7 conduit à une forte réduction de leur activité suppressive *in vivo* (Ding et al., 2012). L'absence d'expression de CCR7 n'inhibe pas le recrutement des Treg dans les tissus lors de greffe de peau chez la souris, mais réduit fortement leur capacité à prévenir le rejet de greffe. Paradoxalement, la délétion de CCR4 dans les Treg est associée à une réduction de leur recrutement dans le greffon et conduit à une très forte réduction de leur nombre dans les ganglions drainant qui est associée à une perte de leur effet protecteur pour la greffe. Ainsi les Treg migrent successivement du sang vers le greffon puis vers le ganglion drainant (Zhang et al., 2009). Ces données montrent que le recrutement des Treg dans les ganglions est aussi important que leur recrutement sur le site d'inflammation pour protéger les souris contre le rejet de greffe.

2.2.2 Mécanismes de suppression par facteurs solubles

Les Treg interagissent avec leur environnement par des médiateurs solubles *via* la séquestration, la sécrétion et la dégradation de cytokines ou métabolites importants dans la réponse immune (Figure 6).

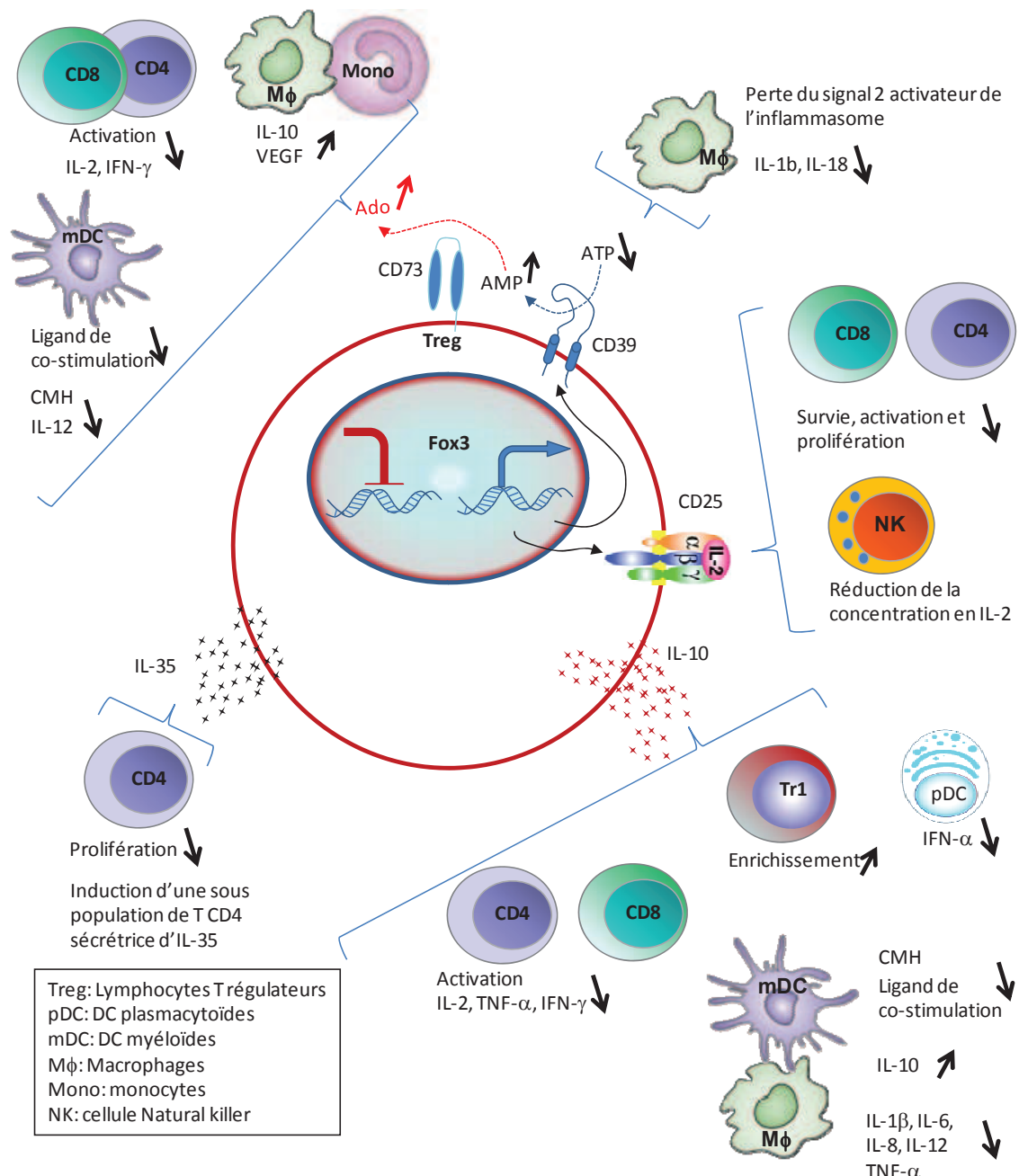
2.2.2.1 Séquestration de l'IL-2

Le premier mécanisme de suppression associé au Treg est leur forte avidité pour l'IL-2 due à leur surexpression de CD25, conduisant à une diminution des taux de cette cytokine dans le micro-environnement (Pandiyan et al., 2007). L'IL-2 étant très importante pour la prolifération et l'activation des cellules T CD4 et CD8 ainsi que l'activation des NK, ce mécanisme peut avoir un impact sur les réponses innées et adaptatives.

2.2.2.2 Sécrétion d'IL-35

Les travaux de Collison et coll. en 2007 ont montré la sécrétion d'IL-35 par les Treg chez la souris. Cette cytokine, de la famille de l'IL-12, est un hétéro-dimère composé du fragment Ebi3 (structurellement très proche de IL-12p40) et d'IL-12p35. Le transfert adoptif de Treg délétés pour les gènes *ebi3* ou *il-12/p35* ne permet pas de supprimer la prolifération de cellules T dans un modèle d'IBD (inflammatory Bowel disease) montrant que cette cytokine joue un rôle important dans le pouvoir supprimeur des Treg sur les autres cellules T (Collison et al., 2007). Des travaux récents montrent que si les Treg humains ne produisent pas d'IL-35 de façon

constitutive (Bardel et al., 2008), sa sécrétion peut être induite après activation, ce qui provoque alors la sécrétion d'IL-35 par des cellules T CD4 naïves chez l'homme et chez la souris, conduisant à l'apparition d'une nouvelle sous-population de cellules T immuno-suppressives n'exprimant pas FoxP3 mais productrice d'IL-35 (Collison et al., 2010).



Le récepteur de IL-35 est composé des chaînes IL-12Rβ2 et gp130. Il existe sous deux formes sur les cellules T CD4, une forme hétéro-dimérique impliquant les deux chaînes ou une forme homo-

dimérique de chaque chaîne. De façon intéressante, seule l'expression de la forme homo-dimérique à la surface des cellules T CD4 induit leur inhibition fonctionnelle en présence d'IL-35, alors que l'expression de la forme hétéro-dimérique est associée à leur propre capacité à produire de l'IL-35 (Collison et al., 2012).

2.2.2.3 Sécrétion d'IL-10

Les Treg peuvent sécréter de fortes concentrations d'IL-10 (Gavin et al., 2007), la sécrétion d'IL-10 par les Treg est dépendante de l'activation de STAT5 induite par l'IL-2 (Tsuji-Takayama et al., 2008). L'IL-10 est une cytokine fortement immuno-suppressive, qui chez l'homme inhibe la prolifération et la sécrétion d'IL-2, de GM-CSF (Granulocyte-Monocyte colony stimulating factor), de TNF- α et d'IFN- γ par les cellules T lors de culture avec des DC (Caux et al., 1994). De plus, l'IL-10 agit sur les CPag (monocytes, DC) en réduisant leur capacité à initier une réponse T adaptative *via* l'inhibition de l'expression des molécules de CMH-II (Boks et al., 2012) et de leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 et TNF- α) ce qui conduit à la polarisation des cellules T vers une réponse immuno-suppressive (Hedrich and Bream, 2010). Toutefois, la sécrétion d'IL-10 par les Treg n'est pas directement liée à l'expression de FoxP3, et elle peut être produite par de nombreux autres types cellulaires (DC, monocytes, Lymphocytes B, cellules T non Treg). La sécrétion d'IL-10 par les T CD4 favorise l'émergence d'autres cellules T CD4 elles-mêmes productrices d'IL-10 permettant de réduire la colite inflammatoire chez la souris (Groux et al., 1997; Hofmann et al., 2012; Sabat et al., 2010).

2.2.2.4 Dégradation de l'ATP extracellulaire et synthèse d'Adénosine

CD39 (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) est exprimée par une sous-population de Treg chez l'homme et la souris. Cette enzyme dégrade l'ATP et l'ADP extracellulaires en AMP ce qui constitue un facteur de survie important pour ces cellules qui sont fortement sensibles à l'apoptose induite par l'ATP extracellulaire *via* le récepteur P2X7 (Borsellino et al., 2007). Chez la souris, les Treg co-expriment CD39 et CD73 (ecto-5'-nucleotidase) favorisant la dégradation de l'ATP et de l'ADP extracellulaire en AMP par CD39 puis CD73 génère de l'Adénosine (Ado) en dégradant l'AMP (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). *Via* son récepteur A2a couplé à une protéine Gs exprimé par les cellules T, l'Ado extracellulaire générée par la co-expression de CD39 et CD73 sur les Treg active l'Adenylate Cyclase et induit une augmentation de la concentration d'AMPc dans les cellules ce qui inhibe la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ ainsi que la prolifération des cellules T CD4 et CD8 (Linden, 2011). De plus, Ado induit la sécrétion d'IL-10 et de VEGF par les monocytes/macrophages *via* le récepteur

A2b (Takahashi et al., 2007) et inhibe la sécrétion d'IL-12 et d'IL-6 ainsi que l'expression du CMH-II et des ligands de co-stimulation CD80/CD86 *via* les récepteurs A2a et A2b par les CPAg (Wilson et al., 2009), favorisant ainsi l'induction d'une réponse T de type tolérogène. Des données récentes chez l'homme suggèrent que les Treg humains eux aussi co expriment CD39 et CD73 (Mandapathil et al., 2010) (Figure 6).

2.2.3 Mécanismes contacts dépendants

Les mécanismes de suppression des Treg par contact cellulaire sont orientés de façon très spécifique à l'encontre de cellules cibles ce qui conduit à l'inhibition, l'anergie ou la mort de ces dernières (Figure 7).

2.2.3.1 CTLA-4

En 1995 Krummel et coll. ont montré que CTLA-4 exprimé par les cellules T avait un effet inverse à celui de CD28 en réduisant la prolifération des cellules T CD4 murines *in vitro* (Krummel and Allison, 1995). Dès 1996 le blocage de CTLA-4 a été proposé comme une stratégie permettant d'accroître la réponse immune anti-tumorale dans le cadre d'expériences *in vivo* chez la souris (Leach et al., 1996). L'engagement, à la surface des CPAg, des ligands de co-stimulation (CD80 et CD86) par CTLA-4 conduit à la perte de leur expression, réduisant les capacités immuno-stimulatrices de ces cellules. Ainsi les souris déficientes pour CTLA-4 développent des maladies auto-immunes et ce phénomène est réversé par la déplétion des T CD4 mais aussi par l'injection de la chimère CTLA-4-Ig (Tivol et al., 1997). Néanmoins, si CTLA-4 n'est pas sélectivement exprimé par les Treg, contrairement aux autres cellules T qui expriment cette molécule après activation du TCR, les nTreg l'expriment en absence de signaux d'activation. Une délétion de CTLA-4 spécifiquement sur les Treg conduit à un syndrome lympho-prolifératif léthal chez la souris (Wing et al., 2008). Cependant, la fonction suppressive de CTLA-4 n'est pas exclusivement imputable aux Treg car le transfert de cellules T CD4 non Treg de phénotype sauvage dans des souris CTLA-4 ko permet d'inhiber le syndrome auto-immun révélant un mécanisme de trans-régulation par les T CD4 non Treg. Ces études montrent que le pouvoir supprimeur de CTLA-4 est essentiellement associé à l'inhibition de l'interaction entre CD28 et CD80/86 (Walker and Sansom, 2011). En somme, l'essentiel de la fonction suppressive de CTLA-4 est extrinsèque dans le sens où il agit sur les cellules cibles (les CPAg) et non directement sur les cellules qui l'expriment (les Treg et les autres T CD4). Cependant, une fonction intrinsèque de CTLA-4 est encore débattue dans la littérature car il induirait une plus forte sécrétion de TGF- β par les Treg. D'autre part, l'engagement de CD80/CD86 par CTLA-4 serait associé à une plus forte production

de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les DC plasmacytoïdes (pDC), favorisant une polarisation immuno-suppressive des cellules T (partie 3.1.1.1) (Walker and Sansom, 2011).

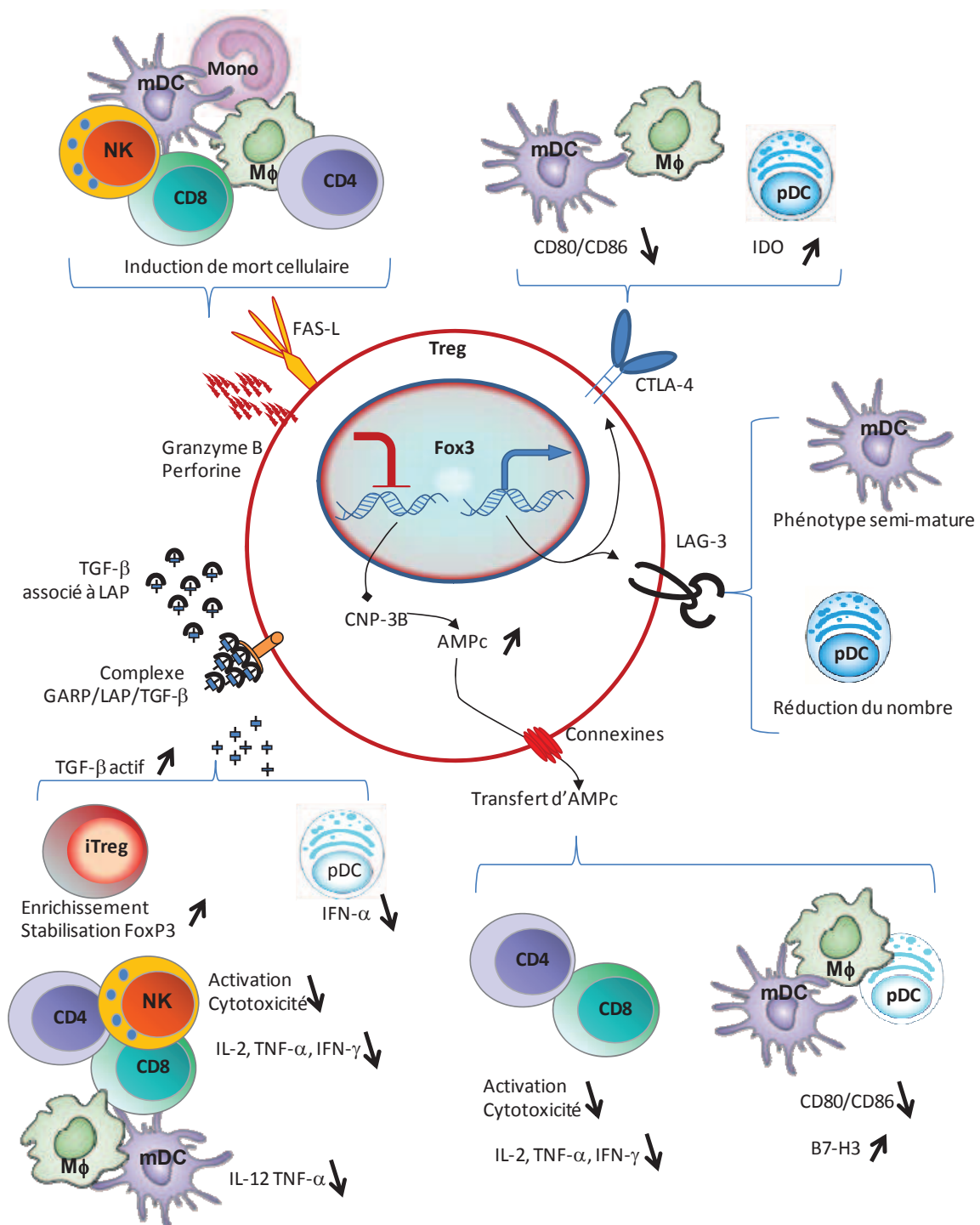


Figure 7: Principaux mécanismes de suppression par contact cellulaire associés aux Treg.

La localisation des Treg à proximité de leur cellules cibles permet l'induction d'apoptose des cellules T effectrices, des NK et des CPAg par des mécanismes impliquant l'expression de Granzyme et Perforine ou la voie FAS/FAS-L. Les Treg sont aussi capables de moduler les fonction des CPAg *via* leur expression de CTLA-4, LAG-3 et le transfert d'AMPc. Le transfert d'AMPc conduit également à une anergie des cellules T effectrices. L'expression de GARP permet la capture de la forme pro-active du TGF- β (pro TGF- β : TGF- β +LAP) conduisant à la formation d'un réservoir sur la membrane des Treg. Le complexe GARP/LAP/TGF- β constitue une plateforme permettant la conversion du pro-TGF- β , par les intégrines α v β 6 et α v β 8, en TGF- β bio-actif ayant un effet immunosuppresseur sur les cellules T, les NK et les CPAg.

2.2.3.2 Rôle du TGF- β

Le TGF- β est produit sous une forme immature (Pro-TGF- β). Le pro-TGF- β est composé du domaine bioactif du TGF- β associé à un domaine protéique nommé LAP (latency-associated peptide) qui empêche son accessibilité. Le pro-TGF- β est présent sous forme soluble dans le sérum ou séquestré dans la matrice extracellulaire par les protéines LTBPR (latent TGF- β -binding proteins). Très récemment, l'expression de la protéine GARP (glycoprotein A repetitions predominant) a été identifiée sur les Treg et les plaquettes (Tran et al., 2009). Cette protéine interagit avec LAP, l'ensemble formant un réservoir et une plateforme permettant l'accessibilité du pro-TGF- β aux intégrines $\alpha v \beta 6$ et $\alpha v \beta 8$, qui permet la libération de la forme active du TGF- β via l'élimination de LAP (Annes et al., 2004). Ainsi les Treg LAP⁺ représentent une sous-population pouvant jouer un rôle immuno-suppresseur via le TGF- β (Chen et al., 2008). L'expression du TGF- β et de GARP par les Treg leur permet d'inhiber les cellules T effectrices, d'orienter les DC vers l'induction de réponses inhibitrices et de favoriser l'expression de FoxP3 par les cellules T naïves. Cependant, de récentes observations suggèrent que, chez la souris, les Treg peuvent aussi participer à l'induction de cellules de type Th17 par un mécanisme dépendant de TGF- (Song et al., 2012). Le TGF- β présente une très forte activité immuno-suppressive sur les cellules NK (Ghiringhelli et al., 2005), inhibe les cellules T CD8 cytotoxiques chez la souris (Chen et al., 2005) et Th1 chez l'homme et la souris (DiPaolo et al., 2005; Shen et al., 2011). De plus, il a clairement été démontré chez la souris que l'expression du TGF- β par les Treg participe à l'induction de FoxP3 dans les cellules T naïves (Zheng et al., 2010).

2.2.3.3 LAG-3

LAG-3 (lymphocyte activation gene 3, CD223) est un membre de la superfamille des immunoglobulines incluant CD4. LAG-3 interagit avec le CMH de classe II avec une affinité supérieure à celle du CD4. L'expression de LAG-3 n'est pas restreinte aux Treg. Il est induit sur l'ensemble des cellules T CD4 après activation, sur les lymphocytes B, les NK ainsi que sur les pDC (Sierro et al., 2011). L'engagement de LAG-3 inhibe le flux calcique en aval du TCR réduisant la prolifération et la sécrétion de cytokines (Hannier et al., 1998). A l'instar de CTLA-4 l'impact immuno-suppresseur de LAG-3 n'est pas totalement imputable aux Treg. Cependant, LAG-3 est impliqué dans l'induction d'un phénotype semi-mature des DC en co-culture avec des Treg (Bayry et al., 2007). De plus, Workman et coll. en 2009 ont démontré, chez la souris, que l'expression de LAG-3 sur les pDC régule négativement leur homéostasie et leur activation démontrant que l'impact immuno-suppresseur de LAG-3 dépasse les fonctions biologiques des Treg (Workman et al., 2009).

2.2.3.4 Transfert d'AMPc

Nous avons vu que l'expression de FoxP3 dans les Treg conduit à une inhibition de la transduction du gène codant pour la cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B une enzyme qui permet la dégradation de l'AMPc intracellulaire (Gavin et al., 2007), ceci provoque son accumulation dans le cytoplasme des Treg. Or l'AMPc intracellulaire est un puissant inhibiteur de la synthèse de cytokines (en particulier IL-2) et de la prolifération cellulaire (Bodor et al., 2001) *via* le répresseur de transcription ICER (inducible cAMP early repressor). Bopp et coll. ont mis en évidence l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc dans les T CD4 non Treg lors de tests de suppression *in vitro* (co-culture de T CD4 avec des Treg). Cette accumulation d'AMPc est dépendante des jonctions gap comme le montre l'addition d'inhibiteurs de type connexine (analogue GAP27) (Bopp et al., 2010). Ce mécanisme est d'autant plus important qu'il est également observé lors d'interactions entre Treg et DC et conduit à une réduction de l'expression des molécules de co-stimulation CD80/86 et une augmentation de la molécule de co-stimulation négative B7-H3 (Fassbender et al., 2010). Ainsi le transfert d'AMPc des Treg vers leurs cellules cibles impacte fortement la réponse adaptative en inhibant les cellules T mais aussi le potentiel activateur des DC. L'inhibition de l'adénylate cyclase, l'enzyme qui convertit l'AMP en AMPc conduit à une perte du pouvoir suppresseur des Treg et de leur état anergique (Fassbender et al., 2010; Klein and Jovanovic, 2012).

2.2.3.5 Suppression par cytotoxicité

Les Treg humains expriment Granzyme A, Granzyme B et perforine après activation (Cao et al., 2007; Grossman et al., 2004). Ces deux molécules jouent un rôle clef dans la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8 (Krahenbuhl et al., 1988). Cependant l'expression de Granzyme A/B par les Treg activés leur permet de lyser les cellules T CD4 et CD8 ainsi que les monocytes (CD14⁺) (Grossman et al., 2004). L'utilisation de souris KO pour le gène codant la Granzyme B a montré, lors de tests de suppression *in vitro*, que cette molécule participe au pouvoir suppresseur des Treg, en induisant la mort des cellules T effectrices (Gondek et al., 2005). En 2006 Qin et coll. ont démontré, *in vivo* chez la souris, que ce mécanisme serait important dans le contrôle de l'immunité par un clone de Treg (Qin et al., 2006). Plus récemment, des modèles chimériques de souris ont permis de mettre en évidence que l'expression de Granzyme B dans les Treg est nécessaire pour contrôler l'induction d'une inflammation pulmonaire lors d'infection par RSV (respiratory syncytial virus) (Loebbermann et al., 2012).

Conclusion partie II : Les nTreg sont les « gardiens du soi » car ils présentent un répertoire TCR orienté vers les Ag autologues et expriment Foxp3, ce qui leur confère un pouvoir suppresseur à l'état basal (sans activation) dû à leur expression constitutive de molécules impliquées dans l'immuno-suppression telles que CTLA-4. Leur activation par les CPAg augmente considérablement leur pouvoir suppresseur *via* l'induction de molécules tel que LAG-3, perforine, granzyme A/B et la sécrétion de cytokines inhibitrices (TGF- β , IL-10, IL-35). L'action suppressive des Treg passe par l'inhibition des autres cellules T CD4 et CD8 mais également des cellules de l'immunité innée (CPAg et cellules NK). Les nTreg sont indispensables pour la prévention des maladies auto-immunes et leur pouvoir suppresseur joue également un rôle dans le contrôle des réactions pro-inflammatoires déjà engagées. Les fonctions suppressives des Treg passent par des modifications (apoptose, anergie, inhibition des ligands de co-stimulation, production de cytokines inhibitrices et séquestration de l'IL-2) modifiant les propriétés et la survie de leurs cellules cibles. Les nTreg sont recrutés du sang vers les sites d'inflammation *via*, entre autres, l'expression de CCR4, ils reconnaissent des peptides autologues mais également des Ag étrangers et contrôlent ainsi l'activation des autres cellules T et des CPAg. L'action des nTreg sur les CPAg modifie la polarisation des autres cellules T et peut favoriser la polarisation des T naïfs vers une réponse tolérogène *via* l'induction d'iTreg, de Tr1 et de T CD8 suppresseurs, possédant un répertoire TCR qui n'est pas orienté vers les auto-Ag, susceptible de se superposer totalement avec celui des cellules T effectrices.

3 L'environnement et les CPAg dans la biologie des cellules T immuno-suppressives

L'environnement, la nature des signaux activateurs ainsi que les caractéristiques propres à chaque sous-population de CPAg ont un impact majeur sur le développement de la réponse immuno-suppressive.

3.1 Facteurs importants dans l'émergence et la fonctionnalité des Treg

Des facteurs solubles ainsi que les ligands de co-stimulation sont importants dans l'augmentation ou la réduction de la prolifération, de la survie et du pouvoir suppresseur des iTreg et des nTreg.

3.1.1 Facteurs environnementaux favorisant l'amplification des Treg

Les modèles murins KO pour les gènes de l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-2R- β (CD122) ont permis de démontrer la fonction redondante mais indispensable de l'IL-2 et l'IL-15 pour l'induction de nTreg *via* la signalisation de CD122 qui aboutit à l'activation de STAT-5 possédant 11 sites de fixation sur le promoteur de FoxP3 (Burchill et al., 2007). Le TGF- β , n'est pas indispensable dans les mécanismes d'induction des nTreg. Cependant, la déméthylation dans les iTreg, de la zone non codante (CNS-1) de *foxp3* proche du promoteur permet son expression sous la dépendance de SMAD3, soulignant le rôle important du TGF- β dans l'induction de ces iTreg. En effet, contrairement aux nTreg, les iTreg présentent une méthylation de la zone CNS-2 empêchant la stabilisation de l'expression de FoxP3 dans ces cellules (Janson et al., 2008; Maruyama et al., 2011). De plus, la translocation du facteur de transcription SMAD3 dans le noyau, qui inhibe la transcription de la chaîne α du récepteur à l'IL-6 (CD126), la synthèse d'IL-2 et permet de stabiliser l'expression de FoxP3 dans les iTreg par déméthylation de la zone CNS-3 *via* la signalisation de TGF- β RII (Zhou et al., 2008; Regateiro et al., 2011). A l'instar du TGF- β , l'Acide rétinoïque (AR) produit par la retinal dehydrogenase (pouvant être exprimée par les DC intestinales) est associé à l'induction d'iTreg, *via* la translocation de SMAD3 (Xiao et al., 2008). Chez la souris, il a été montré que la sécrétion de TNF- α par les cellules T effectrices favorise les fonctions suppressives et la prolifération des Treg (Grinberg-Bleyer et al., 2010).

La prostaglandine E-2 (PGE-2), produite par conversion de l'acide arachidonique par COX-2, est associée à une augmentation de la proportion de cellules FoxP3⁺ lors de l'activation de cellules naïves (enrichissement en iTreg). L'un des mécanismes d'action de PGE-2 passe par

l'accumulation d'AMPc dans les cellules T. (Kalinski, 2012; Bergmann et al., 2007; Muthuswamy et al., 2008). Cependant cet enrichissement en Treg ne résulte pas nécessairement d'une plus forte différenciation des cellules T CD4 naïves en iTreg mais pourrait également résulter d'un effet inhibiteur de PGE-2 sur l'activation et l'amplification des cellules T CD4 non Treg (Tableau 3A).

Tableau 3: Les principaux facteurs modulant la prolifération, la survie et les fonctions des Treg

A: Effet positif pour les Treg

Nom	Impact biologique	source
IL-2, IL-15	Prolifération et survie	Essentiellement les autres cellules T
TGF- β	Survie Stabilisation de FoxP3 Accroissement des fonctions suppressives	Cellules T, Macrophages, mDC, cellules de l'environnement
RA (Acide rétinoïque)	Induit l'activation de SMAD3 mimant partiellement le TGF- β	Produit <i>via</i> la retinal dehydrogenase exprimée par les DC interstitielles
TNF- α	Survie Accroissement des fonctions suppressives	Cellules T, Macrophages, mDC, cellules de l'environnement
Déplétion en tryptophane (voir rôle similaire de l'Arginase)	Accroissement de la proportion de Treg parmi les cellules T	<i>Via</i> l'expression d'IDO par les pDC et les macrophages et conduisant à la production de kynurénine
PGE-2 (prostaglandine E-2)	Favorise l'induction de iTreg lors de l'activation de cellules T naïves par des DC	Produit de la dégradation de l'Acide arachidonique <i>via</i> COX-2 pouvant être exprimée par les macrophages et les cellules de l'environnement

B: Effet délétère pour les Treg

Nom	Impact biologique	source
IL-6	Favorise l'expression de T-bet	Produit par les Macrophages et les mDC
IFN- γ	Activation de STAT-1 Favorise la réponse inflammatoire	Produit principalement par les cellules Th1 et les NK
IL-27	Inhibe l'expression de FoxP3 <i>via</i> STAT-3 Peut participer à l'induction de cellules Tr1	Produit par les mDC
IL-12 et IL-1 β	Inhibition de la prolifération et des fonctions suppressives	Produit par les Macrophages et les mDC
Engagement de TLR-8	Inhibition de la prolifération et des fonctions suppressives	Signal de danger

3.1.2 Facteurs régulant les fonctions des Treg

L'IL-6, couplée au signal TCR, conduit à une perte d'expression de FoxP3 et favorise une orientation vers un phénotype Th17 (Yang et al., 2008). De même l'IL-27 inhibe l'expression de FoxP3 chez la souris sous la dépendance de STAT-3 (Huber et al., 2008). L'IL-27 peut cependant être associée à la polarisation de type Tr1. L'IL-12 et l'IL-1 β inhibent également la prolifération et les fonctions suppressives des Treg (Bertin-Maghit et al., 2011; Tian et al., 2011). L'IFN- γ , *via* l'activation de STAT-1, conduit à une inhibition de l'expression de FoxP3 dans les iTreg (Chang et al., 2009).

Les Treg expriment plus fortement les TLR-4, 5, 7 et 8 que les autres cellules T CD4. L'engagement de TLR-2 par son ligand PAM-3-Cys dans les Treg murins conduit à une augmentation de leur prolifération associée à une perte de leur pouvoir suppresseur. L'engagement de TLR-8 sur les Treg humains inhibe nettement leur activité suppressive sans impacter leur prolifération. L'impact de l'engagement de TLR-4 par le LPS sur les Treg est encore sujet à controverse (Caramalho et al., 2003; van Maren et al., 2008). Cependant, l'activation des Treg en présence d'HSP-60, un ligand naturel de TLR-2, favorise leur activité suppressive et la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β (Sutmoller et al., 2006). L'engagement de TLR-5 par addition de flagelline conduit à une augmentation de leur pouvoir suppresseur (Crellin et al., 2005) (Tableau 3 B).

3.1.3 Engagement du TCR et impact des ligands de co-stimulation :

Chez la souris dans les modèles de tolérance orale, l'engagement fort du TCR participe à l'induction de tolérance par inhibition des T spécifiques et induction de Treg. L'administration orale d'Ac anti-CD3 agoniste et de pro-insuline recombinante chez la souris, provoque l'accumulation de Treg dans l'intestin, permettant une réduction du développement du diabète auto-immun (Bresson et al., 2006). Le co-engagement du TCR et de CD28 active la phosphatidylinositol 3-kinase (Pi3K) qui induit la voie Akt-mTOR (cible de la rapamycine). Or la voie mTOR/AKT inhibe l'expression de FoxP3 dans les cellules T. L'activation des cellules T par des DC chargées avec une faible quantité d'Ag ou l'activation d'un clone de cellules T possédant un TCR connu a permis de montrer qu'une faible stimulation du TCR permet d'induire une forte proportion de Treg car la voie mTOR est alors faiblement activée. Inversement, l'utilisation d'Ag de forte avidité pour le TCR ou le chargement de DC avec de fortes quantités d'Ag conduit à l'amplification de cellules de type Th1 suite à l'activation soutenue de la voie mTOR (Turner et al., 2009). D'autre part, l'engagement du récepteur de la sphingosine-1-phosphate (S1P-1) conduit également à l'activation de la voie mTOR qui inhibe alors l'expression de FoxP3 par les cellules T et induit des cellules Th1 (Liu et al., 2010). Ainsi l'intensité de la stimulation du TCR

conduisant à une activation plus ou moins forte de la voie mTOR/Akt conditionne l'expression de FoxP3 dans les cellules T.

Tableau 4: Les principaux axes de co-stimulation modulant la prolifération, la survie et les fonctions des Treg

Récepteur exprimé par les Treg	Ligand	Impact biologique	source
CD28	CD80 CD86	Activation et prolifération des Treg, fixation de C-ReI sur le promoteur de <i>foxP3</i> Active la voie mTOR/AKT conduisant à l'inhibition de FoxP3	Toutes les CPAg
CTLA-4	CD80 CD86	Augmentation de la sécrétion du TGF- β par les Treg	Toutes les CPAg
ICOS	ICOS-L	Induction de cellules Tr1 et prolifération des Treg Induction des cellules Th17 et Th2	Essentiellement les pDC et les lymphocytes B
GITR	GITR-L	Induit la prolifération des Treg Réduit la sensibilité des cellules T à la suppression par les Treg	Toutes les CPAg
4.1BB	4.1BB-L	Participe à l'activation des cellules T	Toutes les CPAg
Ox40	Ox40-L	Participe à l'enrichissement en Treg dans la colite chez la souris Réduit la sensibilité des cellules T à la suppression par les Treg	Toutes les CPAg
PD-1	PDL-1 et PDL-2	Activité immunosuppressive sur les cellules T favorable à un enrichissement en Treg	CPAg cellules épithéliales et fibroblastes
(ILT2 ?)	B7-H3	Activité immuno-stimulatrice sur les cellules T par induction de la sécrétion d'IFN- γ	Les mDC et les Macrophages et cellules épithéliales
inconnu	B7-H4	Activité immunosuppressive sur les cellules T	Macrophages, cellules épithéliales et mDC

L'engagement des récepteurs de co-stimulation, CD28, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD27, 4.1BB, GITR, Ox40, PD-1 par leur ligands respectifs sur les Treg permet de moduler leur prolifération, sécrétion, pouvoir supprimeur et survie. Cependant l'influence de ces signaux sur la biologie des cellules T est étroitement liée à l'environnement en cytokines et peut induire des effets opposés en fonction du contexte (Busse et al., 2012a; Griseri et al., 2010; Ito et al., 2008; Shevach and Stephens, 2006), et de la cellule (CPAg, cellules stromal) qui présente ces ligands. (Tableau 4). CD28 et ICOS possèdent des fonctions complémentaires et partiellement redondantes (Mesturini et al., 2006). Chez la souris, la déplétion de CD28 ou d'ICOS conduit à une très forte réduction du nombre de cellules T mémoires dans le sang et les organes lymphoïdes (Mahajan et

al., 2007). Les principales différences entre ICOS et CD28 seront évoquées plus en détail dans la discussion (parties 7.3.2 et 8.2.3). (Tableau 4)

Ox40, est un ligand activateur des cellules T et son engagement augmente l'activation de l'ensemble des cellules dont les Treg dans le modèle de colite inflammatoire chez la souris (Griseri et al., 2010). L'activation des Treg par Ox40 permet d'inhiber, dans les réponses allergiques, la dégranulation des mastocytes chez la souris (Gri et al., 2008). Cependant, l'engagement d'Ox40 favorise aussi l'activation des autres cellules T et peut les rendre résistantes à la suppression par les Treg (Vu et al., 2007).

GITR (Liao et al., 2010) et 4.1BB (Elpek et al., 2007) sont également des ligands activateurs des cellules T et peuvent participer à l'activation des Treg. PD-1 est un récepteur inhibiteur délivrant un signal négatif aux cellules T. l'engagement de PD-1 sur les Treg induit une inhibition de la phosphorylation de STAT-5 aboutissant à une perte des Treg *ex vivo* chez l'homme (Franceschini et al., 2009).

En somme, les ligands de co-stimulation et l'engagement du TCR ont un impact direct sur l'induction, l'activation et l'amplification des Treg. L'impact de chacun de ces récepteurs sur les cellules T est étroitement lié à l'environnement dans lequel elles se trouvent.

3.2 Les DC : découverte, diversité et ontogénie

En 1868, Paul Langerhans a observé dans la peau, une population cellulaire présentant une morphologie particulière, identifiée comme des cellules nerveuses. Les travaux de Birbeck et coll. dans la peau cent ans plus tard (1960-61) puis ceux de Ralph Steinman et Zanvil Cohn en 1973 dans la rate de souris ont permis l'identification des premières DC (Steinman and Cohn, 1973). En 1974, la même équipe a montré que ces cellules sont d'origine hématopoïétique et c'est en 1979, que les premières purifications de DC ont permis leur caractérisation phénotypique et fonctionnelle.

Les DC sont localisées dans le sang ou dans les tissus où elles jouent un rôle de sentinelle en capturant les éléments de leur environnement. La détection de pathogènes, conduit à leur activation, à la sécrétion de cytokines, à leur maturation et à leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter les Ag à leur surface sous forme de peptides associés aux molécules du CMH de classe I et de classe II tout en exprimant les ligands de co-stimulation. Ceci confère aux DC la capacité d'activer et de polariser les lymphocytes T naïfs et ainsi d'initier la réponse immune adaptative.

Dans les tissus, les macrophages (CD68⁺), les cellules de Langerhans (CD1a⁺ CD207/langérine⁺) et les DC interstitielles (DC SIGN/CD209⁺) représentent l'essentiel des CPAg. Dans le sang et les organes lymphoïdes, on distingue 2 principales populations de DC: les mDC et les pDC. Les lymphocytes B font aussi partie des CPAg car ils ont la capacité d'exprimer des molécules de co-stimulation, de sécréter des cytokines et de présenter les Ag. Les DC peuvent exprimer les ligands de co-stimulation et sécrètent des cytokines en plus de présenter les Ag sur les CMH-I et II. Lorsqu'elles reçoivent un signal de danger par l'engagement d'un PRR, les DC subissent une maturation, perdent leur capacité à internaliser de nouveaux Ag et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires.

Les sous-populations de DC présentent un spectre de détection de signaux de danger dépendant de leur expression de PRR incluant les TLR, lectines de type C, les RLR (RIG like receptor) et les NLR (NOD like receptor). (Tableau 5)

Chez l'homme, un nombre croissant de publications suggère que des progéniteurs myéloïdes mais également lymphoïdes sont capables de générer les précurseurs des DC (Watowich and Liu, 2010).

Des syndromes d'immuno-déficience conduisant à des altérations dans la génération des DC ont été identifiés chez l'homme. Une mutation dans le gène GATA-2 est associée à une perte des pDC, des mDC (BDCA-1/CD1c⁺ et BDCA-3/CD141⁺) qui est accompagnée d'une forte réduction des cellules NK, monocytes et lymphocytes B dans le sang des patients (Bigley et al., 2011; Vinh et al., 2010). De même, un syndrome associé à une mutation dans le gène IRF-8 (K108E) provoque une perte de toutes les sous-populations de DC et une réduction du nombre de monocytes qui peut être associée à une hyper-prolifération des précurseurs myéloïdes. Ces patients montrent une plus grande susceptibilité aux infections mais également une forte réduction du nombre de Treg circulants et peuvent développer des lésions auto-immunes (Vinh et al., 2010; Darrasse-Jeze et al., 2009; Birnberg et al., 2008), suggérant que les DC sont impliquées dans l'homéostasie des Treg (Vinh et al., 2010; Collin et al., 2011).

3.2.1 Les DC myéloïdes : principales caractéristiques et origine

Chez l'homme, les mDC représentent la majorité des DC du sang, elles expriment CD11c, CD4 et le CMH-II mais n'expriment pas les marqueurs de lignage (Lin^{neg} : négative pour CD3, CD14, CD19, CD56). Les mDC sont constituées de deux sous-populations : Les mDC BDCA-1⁺ (95-97%) et les mDC BDCA-3⁺ (3-5%) (Vinh et al., 2010; MacDonald et al., 2002). Les mDC BDCA-1⁺ sont les plus étudiées et possèdent les plus fortes capacités activatrices vis-à-vis des lymphocytes T.

Tableau 5: Principales caractéristiques phénotypiques des sous-populations de CPAg chez l'homme

	mDC	pDC	mono	Mφ	fonction
CD11c	+	-	+	+	Intégrine αX : interaction avec le complément et phagocytose
CD14	-	-	+	+/-	Co-récepteur des ligands de TLR-4
CD16	-	-	+/-	+/-	Fc γ RIIIa: récepteur des immunoglobulines γ
CD68	+/-	-	-	+	Glycoprotéine essentiellement endosomale, famille des scavenger récepteurs, impliquée dans la phagocytose et l'activation cellulaire
CD163	+/-	-	+/-	+/-	Scavenger récepteur cystein-rich permettant l'endocytose de l'hémoglobine
CD123	-/+	+++	-	-	Chaîne α du récepteur à l'IL-3
BDCA-1/CD1c	+	-	-	-	Homologue du CMH-I permet la présentation des Ag lipidiques et glyco-lipidiques aux cellules T
BDCA-2	-	+	-	-	Lectine de type C (adhésion cellulaire)
BDCA-3	+/-	-	-	-	Récepteur de la thrombine (régule la thrombose par interaction avec la protéine C du complément)
BDCA-4	-	+	-	-	Neuropiline I, interagit avec le récepteur du VEGF et participe à la migration cellulaire
TLR1	+	+	+	+	Glicosylphosphamides (parasites) Triacyl lipopeptides (bactéries) Zymosan (levures)
TLR2	+	-	+	+	Diacyl lipopeptides (bactéries) Zymosan (levures)
TLR3	+	-	-	+	ARN double brin (virus)
TLR4	+	-	+	+	LPS (bactéries)
TLR5	+	-	+	+	Flagelline (bactéries)
TLR6	+	+	-	+	Peptidoglycanes (bactéries)
TLR7	+	+	-	+	ARN simple brin (bactéries)
TLR8	+	-	+	+	ARN simple brin (bactéries)
TLR9	-	+	-	-	ADN CpG (bactéries et virus)
ILT-3, ILT-4	+	-			Récepteur inhibiteur
ILT-7		+	-	-	Récepteur inhibiteur

En revanche, les mDC BDCA-3⁺ seraient l'équivalent des DC CD8 α de la souris qui semblent spécialisées dans la cross-présentation des Ag. Ces cellules sont donc capables de présenter des Ag provenant de l'environnement *via* le CMH-I à la place du CMH-II, ce qui permet d'induire une réponse T CD8 (restreinte au CMH-I) spécifique d'Ag exogènes présents dans l'environnement (Vinh et al., 2010; Bachem et al., 2010; Bachem et al., 2012). Cette capacité de cross-présentation est très importante car seuls les peptides exprimés par la cellule, tel que les Ag du soi ou les Ag viraux sont normalement présentés sur les CMH-I. Les Ag tumoraux sont présents dans l'environnement mais ne sont pas exprimés par les DC, la cross-présentation est donc le seul mécanisme permettant l'activation de clones T CD8 spécifiques d'Ag tumoraux.

Les mDC BDCA-1⁺ expriment à leur surface les TLR 1, 2 et 6 qui détectent une grande variété de pathogènes bactériens et les levures conduisant à leur activation et à la sécrétion d'IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, MIP-1 α , de TNF- α et d'IFN- β généralement associés aux réponses de type Th1, Th17 et T CD8 cytotoxique (Tableau 5). Ces cellules expriment également de très faibles niveaux de TLR-4 reconnaissant le LPS qui conduit à la sécrétion d'IL-12 et de TLR-5 qui détecte la flagelline bactérienne sans induire de sécrétion de cytokine. Elles expriment aussi TLR-3, et TLR-8 qui permettent la détection des ARN viraux et des ADN bactériens. L'étude des DC chez l'homme a connu de grandes avancées suite au développement des stratégies de différenciation des DC à partir des progéniteurs CD34⁺ en présence de GM-CSF (granulocyte / macrophage colony-stimulating factor) et de TNF- α (CD34⁺DC) (Caux et al., 1992) ou de monocytes du sang (MoDC) (GM-CSF et IL-4) (Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

Les MoDC générées *in vitro* sont très proches des mDC BDCA-1⁺ du sang mais expriment plus fortement TLR-4 et peuvent produire de fortes quantités d'IL-1 β contrairement aux mDC purifiées leur donnant des propriétés de DC inflammatoires. De plus, elles montrent une capacité allo-stimulatrice (réaction entre des lymphocytes et des DC allogéniques) vis à vis des cellules T supérieures à celles de DC du sang, ce qui est consistant avec leur plus forte expression du CMH-II et des ligands de co-stimulation (Schreibelt et al., 2010). (Tableau 5)

3.2.2 Les DC plasmacytoïdes : principales caractéristiques et origine

Chez l'homme, les pDC n'expriment pas les marqueurs de lignage (Lin^{neg}) et expriment très fortement la chaîne α du récepteur de l'IL-3 (CD123), le CD4, la lectine BDCA-2, la neuropiline-1 (BDCA-4), ILT-7 (et BST/CD317 chez la souris). Ces cellules possèdent une morphologie proche de celle des lymphocytes B en particulier leur réticulum endoplasmique granuleux très important qui justifie leur qualificatif de « plasmacytoïde » (Horny et al., 1987). Les premières études

fonctionnelles ont montré la compétence de ces cellules à i) induire la prolifération de cellules T naïves (Grouard et al., 1997) et ii) produire de très fortes quantités d'IFN de type 1 (α - β - ω - τ) dans les premières heures suivant leur activation par un virus (Siegal et al., 1999; Cella et al., 1999) suite l'engagement du TLR-7 ou TLR-9.

L'ontologie de ces cellules reste aujourd'hui sujette à de fortes controverses (Reizis, 2010). En effet, les pDC peuvent être obtenues par différenciation du progéniteur CDP (common DC precursor) d'origine myéloïde tout comme les mDC (Naik et al., 2007), mais elles peuvent aussi être obtenues par différenciation du progéniteur CLP (common lymphoid progenitor) *in vitro* et *in vivo* (Shigematsu et al., 2004). Le facteur de transcription E2-2, qui appartient à la famille des E protéines (E2 α , HEB et E2-2) qui ont pour inhibiteur commun la molécule Id2 et interviennent dans la différenciation des cellules T et B, joue un rôle prépondérant dans la génération des pDC (Zweier et al., 2007), rapprochant la pDC d'une origine lymphoïde. Fonctionnellement, les pDC ont un impact très important sur la réponse immune innée anti-virale *via* la sécrétion d'IFN- α qui induit l'expression des gènes de réponse à l'IFN (ISG : IFN stimulated gene) dans les cellules épithéliales limitant l'amplification virale dans les cellules infectées (Garcia-Sastre, 2006). L'IFN- α provoque également une augmentation de l'expression du CMH de classe I à la surface des cellules épithéliales, permettant d'optimiser la présentation des Ag viraux aux cellules T CD8 (Garofalo et al., 1996) et augmente fortement la cross-présentation par les DC CD8 α^+ chez la souris permettant l'induction d'une réponse T CD8 cytotoxique (Oh et al., 2011). L'IFN de type 1 est aussi impliqué dans la réponse adaptative, en i) induisant la réponse humorale *via* la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'Ig (Ding et al., 2009) ,ii) potentialisant les réponses T de type Th1 et CD8 et iii) réduisant les proportions de Treg (Golding et al., 2010). En contrepartie, les pDC, *via* leur forte sécrétion d'IFN de type 1, participent au développement de désordres auto-immuns tels que le lupus (Blomberg et al., 2003) et de pathologies inflammatoires comme le Psoriasis (Nestle et al., 2005).

Les pDC expriment sélectivement ILT-7, dont l'engagement par son ligand BST-2 (exprimé par les cellules épithéliales et mésenchymateuses en présence d'IFN de type I et II) conduit à une inhibition des productions d'IFN- α/β , de TNF- α et d'IL-6, ce qui supprime l'induction de réponse pro-inflammatoire par ces cellules (Cao and Bover, 2010).

3.3 Certaines sous-populations de CPAg ont un rôle dans la tolérance

Chacune des populations de CPAg peut intervenir dans l'homéostasie et la fonction des Treg. De plus, l'environnement modifie leur fonctionnalité (sécrétion de cytokines, expression des ligands

de co-stimulation) ce qui peut être impliqué dans l'induction de réponses tolérogènes impliquant les autres cellules T.

3.3.1 Les mDC dans la tolérance

Les MoDC générées à partir de monocytes (en présence de GM-CSF+IL-4) présentent à l'état immature (MoDC immatures) de faibles niveaux de CD80 et CD83. Elles sont capables d'induire des T CD4 exprimant les marqueurs ICOS et CD25 et produisant de fortes quantités d'IL-10 (type Tr1) à partir de cellules T naïves. De façon très intéressante, les cellules Tr1 induites par les MoDC immatures sont capables de supprimer les sécrétions de cytokines et la prolifération des cellules Th1 lors de culture de cellules T naïves en présence de MoDC activées. Ce mécanisme de suppression est dépendant en partie du contact cellulaire et est fortement réduit par l'addition d'IL-2 (Jonuleit et al., 2000). De plus, le prétraitement des Mo-DC par l'IL-10 conduit à une plus faible expression du CMH de classe II et des ligands de co-stimulation par ces cellules, ce qui leur donne des propriétés tolérogènes conduisant à l'anergie des cellules T CD4 et CD8 de façon Ag spécifique (Steinbrink et al., 1997; Steinbrink et al., 1999). Le pouvoir tolérogène des mDC traitées par IL-10 a été validé *in vivo* chez des souris vaccinées contre la protéine OVA (Muller et al., 2002). Chez l'homme, l'injection de mDC circulantes immatures chargées avec les Ag MP (influenza) et KLH (keyhole limpet hemocyanin) induit le même phénomène, caractérisé par une réduction de l'activité cytotoxique des cellules T CD8 et la production d'IL-10 par les cellules T CD4 spécifiques de ces Ag (Dhodapkar et al., 2001; Dhodapkar and Steinman, 2002). D'autre part, chez la souris, l'injection répétée de mDC ayant subi une maturation en présence de TNF- α conduit à une tolérance Ag-spécifique (Menges et al., 2002; Enk, 2005). Enfin l'IL-10 et l'IL-6 induisent l'expression de B7-H4 (Yi and Chen, 2009), un ligand de co-stimulation inhibant l'activation des cellules T *via* un récepteur encore inconnu sur les mDC et les macrophages.

3.3.2 Les pDC dans la tolérance

Les pDC du thymus activées par l'engagement de CD40 en présence d'IL-3 induisent préférentiellement l'expansion des Treg à partir de cellules autologues au stade DP (CD4⁺CD8⁺) (Martin-Gayo et al., 2010). De plus, ces pDC expriment le récepteur de la lymphopoïétine stromale (TSLP-R), qui favorise, à partir de cellules T CD4 naïves thymiques, l'induction d'iTreg producteurs de fortes quantités d'IL-10 (Hanabuchi et al., 2010). Ces données suggèrent que les pDC tiennent une place importante dans l'induction des nTreg. Les pDC sont sensibles à la molécule de danger HMGB1 relarguée par les cellules en nécrose, qui signale *via* TLR9, et supprimerait la réponse des pDC aux autres ligands de TLR9 (CpG) en inhibant la sécrétion d'IFN- α . Ce mécanisme suggère que les pDC pourraient aussi jouer un rôle dans la prévention des

réponses auto-immunes lors de la nécrose cellulaire (Popovic et al., 2006). Les pDC sont aussi impliquées dans la tolérance orale, comme le montre l'absence d'induction de tolérance vis-à-vis d'Ag administrés dans l'alimentation après déplétion des pDC (Goubier et al., 2008). L'expression de CCR9 par une sous-population de pDC permet leur recrutement dans les muqueuses, le transfert adoptif de pDC CCR9⁺ chargées avec un peptide d'OVA n'induit ni la prolifération ni l'activation des cellules T spécifiques *in vivo* chez la souris, suggérant qu'elles jouent un rôle immuno-suppresseur conduisant à l'anergie des cellules T spécifiques. En effet, le transfert, dans des souris irradiées, de pDC CCR9⁺ conjointement avec des cellules T CD4 CD25^{neg}, inhibe l'induction d'une réaction allogénique des cellules T CD4 à l'encontre de l'hôte qui est médiée par l'induction de Treg par ces pDC (Hadeiba et al., 2008) montrant ainsi que les pDC CCR9⁺ peuvent protéger contre le développement d'une GvHD par l'induction de iTreg lors du transfert de cellules T CD4 CD25^{neg}.

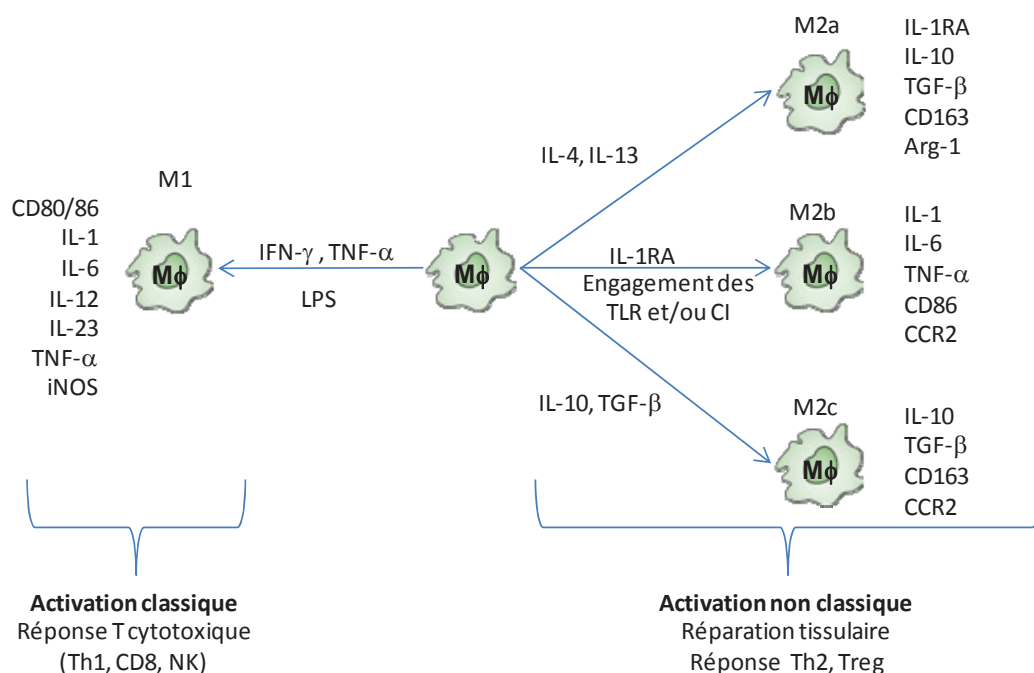
Les pDC peuvent exprimer IDO en réponse à IFN- γ , sous le contrôle du facteur de transcription IRF-1 ou suite à l'engagement des TLR, de GITR-L (ligand spécifique de GITR) (Fallarino et al., 2004; Grohmann et al., 2007) ou du récepteur CD200R engagé par CD200 (Minas and Liversidge, 2006). Le rôle d'IDO dans la tolérance induite par les pDC a été largement décrit dans le contexte de l'infection par le VIH (Manches et al., 2008; Boasso and Shearer, 2007; Mellor et al., 2003).

Les pDC constituent la seule sous-population de DC qui surexprime très fortement ICOS-L (ligand spécifique d'ICOS) en présence d'IL-3 ou après activation suite à l'engagement de CD40 ou d'un TLR (Ito et al., 2007; Janke et al., 2006; Burmeister et al., 2008). ICOS-L exprimé par les pDC peut être impliqué dans le développement et la prolifération des Treg et l'induction de cellules Tr1 lors de la polarisation de cellules T CD4 naïves (Ito et al., 2007; Ito et al., 2008). *In vivo* le blocage d'ICOS-L ou la délétion du gène *icos* est associée à une forte inflammation dans les modèles d'asthme chez la souris (Busse et al., 2012b). Cela suggère que les pDC sont importantes dans l'induction de cellules Tr1 via leur forte expression d'ICOS-L, ce qui n'est pas retrouvé sur les sous-populations de mDC chez l'homme.

3.3.3 Les macrophages dans la tolérance

L'activation des macrophages est intimement liée à l'environnement dans lequel ils se situent. Ces cellules jouent un rôle primordial dans l'induction de la tolérance, en particulier dans le foie (cellules de Kupffer). En 1998, Fadok et coll. ont montré que la phagocytose, par les macrophages, de cellules apoptotiques non opsonisées conduit à de fortes sécrétions de TGF- β et de PGE-2, ce qui les rend par la suite insensibles à l'activation *via* le LPS (Fadok et al., 1998).

De plus, l'engagement des FcγR (récepteurs des IgG) supprime leur réponse pro-inflammatoire par inhibition de la sécrétion d'IL-12 et l'induction de très forts niveaux d'IL-10 en présence de faibles doses de LPS (Gerber and Mosser, 2001; Drechsler et al., 2006). D'autres signaux tels que les prostaglandines (Strassmann et al., 1994), l'IL-10 (Martinez et al., 2009) et Ado (Hasko and Pacher, 2008) peuvent aussi induire des macrophages immuno-suppresseurs. L'ensemble des macrophages suppresseurs est regroupé sous l'appellation de macrophages de type M2a et M2c, qui peuvent être identifiés sur la base de l'expression de CD163 un marqueur définissant une sous-population parmi les cellules CD68⁺CD11b⁺ chez l'homme comme chez la souris (Hao et al., 2012; Komohara et al., 2006) (Figure 8).



Adapté de Hao et coll, **Macrophages in Tumor Microenvironment and the Progression of Tumors** Clin Dev Immunol. 2012

Figure 8: Plasticité des macrophages en fonction des conditions d'activation

Les macrophages présentent une grande plasticité fonctionnelle conditionnée par la nature du signal de danger qu'ils détectent et l'environnement en cytokines. Les macrophages de type M1 se différencient lors d'une activation classique i.e. en présence d'IFN-γ et de TNF-α suite à l'activation du TLR-4 et sont pro-inflammatoires. Ils expriment les molécules de co-stimulation CD80/CD86, et participent à la réponse T CD8 (cytotoxique) à la polarisation Th1 et à l'activation des cellules NK par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-1. Les macrophages de type M2 obtenus par activation non classique sont subdivisés en trois sous catégories. Les macrophages M2a sont induits en présence d'IL-4 et d'IL-3 sans signal d'activation et ont une activité immunosuppressive. Les macrophages de type M2b sont induits en présence d'un signal activateur de type TLR-L, ligand des récepteurs scavengers ou complexes immuns (CI). Ces cellules expriment CD86 et sont capables d'induire des réponse de type Th2. Les macrophages de M2c sont spécialisés dans le remodelage tissulaire, ils exercent une activité immunosuppressive et sont induits en présence des cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGF-β). CD163 et IL-10 sont sélectivement exprimés par les macrophages immunosuppresseurs M2a et M2c.

Les macrophages se différencient en cellules immuno-suppressives sous l'influence des cytokines IL-4 et IL-13 (M2a) ou IL-10 et TGF- β (macrophages M2c). Ils sécrètent de fortes quantités d'IL-10 et de TGF- β , diminuent l'expression de iNOS au profit de l'Arginase 1 (Arg1) qui entre en compétition avec iNOS en dégradant l'Arginine conduisant à production d'Ornithine. Ces cellules sont aussi caractérisées pour une perte d'expression des ligands de co-stimulation CD80/CD86 et l'expression de IL-1RA, une molécule sécrétée qui en séquestrant l'IL-1 inhibe l'interaction avec son récepteur (Hao et al., 2012). De plus, *via* la sécrétion de chimiokines les macrophages de type M2a (CCL-24, CCL17 et CCL22) participent au recrutement des Treg et des Th2, et les macrophages de type M2c (CXCL13, CCL16 et CCL18) recrutent des cellules T naïves, favorables à l'induction d'une réponse immuno-suppressive au regard de leur faible potentiel pro-inflammatoire (Mantovani et al., 2004) (Figure 8).

En somme les macrophages sont impliqués dans les mécanismes de suppression de la réponse immunitaire, cependant leur implication directe dans la tolérance vis-à-vis des Ag n'est pas clairement établie. Leur action serait plutôt liée à l'immuno-suppression et non à la tolérance médiée par les Treg ou les autres cellules T immuno-suppressives.

Conclusion partie III : Les Treg agissent de façon concertée avec les CPAg qui participent à la régulation de leur homéostasie, *via* leur développement et leur expansion dans le thymus et leur maintien ou leur induction en périphérie. Les CPAg présentent une grande plasticité fonctionnelle, l'environnement en cytokines immuno-suppressives (IL-10, TGF- β), ainsi que la présence de molécules immuno-modulatrices (PGE-2, Ado) modifient leurs propriétés stimulatrices *via* la réduction de l'expression des molécules de co-stimulation, la diminution de leur capacité à présenter les Ag (réduction d'expression des CMH de classe I et II), l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IFN- α) et l'expression de cytokines immuno-suppressives. On parle alors de CPAg tolérogènes impliquées dans l'inhibition des réponses pro-inflammatoires *via* l'amplification des nTreg, l'induction des iTreg ou la polarisation de type Tr1. Le développement de DC immuno-suppressives *in vivo* représente de nombreux espoirs dans la lutte contre le rejet de greffe (Ezzelarab and Thomson, 2011) et les maladies auto-immunes (Weiner et al., 2011). La relation entre CPAg et nTreg tient un rôle central dans la réponse immune car les nTreg peuvent également agir directement sur les CPAg *via* les molécules inhibitrices (Granzyme, FAS-L, CTLA-4, LAG-3). Ceci leur permet de réguler de façon importante les réponses immunitaires en modulant les fonctions des CPAg conditionnant ainsi la polarisation des autres cellules T.

4 Caractéristiques et fonctionnalité des Treg dans les tumeurs : La tumeur, un berceau pour les Treg ?

Dans le cas du cancer du sein, la présence de cellules de type pro-inflammatoire (Th1, et CD8) dans la masse tumorale est associée à un bon pronostic (Ladoire et al., 2011; Liu et al., 2012; Mahmoud et al., 2011). Chez la souris l'induction d'une réponse T CD4 et CD8 spécifique des Ag tumoraux par des stratégies vaccinales (Wang et al., 2012; Orlandi et al., 2007) peut conduire à l'éradication de tumeurs transplantées. L'ensemble des observations réalisées chez l'homme a permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle central des Treg dans l'immuno-suppression de la réponse immune anti-tumorale (Zou, 2006) donnant naissance à de nouveaux concepts d'immunothérapie du cancer par éradication des Treg (annexe 1 : (Menetrier-Caux et al., 2012) et (Curiel, 2008)).

4.1 Les Treg sont fonctionnels dans les tumeurs

Les efforts importants réalisés au cours des 15 dernières années pour comprendre la biologie des cellules T face au cancer ont abouti à la mise en lumière du rôle délétère des Treg intra-tumoraux (TA-Treg) dans de nombreux types de tumeurs dont le cancer du sein.

4.1.1 Infiltration, valeur pronostique et fonctionnalité des TA-Treg

L'impact biologique des TA-Treg peut varier en fonction du type de lésion néoplasique et de sa localisation. Dans le texte qui suit, hormis pour quelques exemples notables, nous nous sommes focalisés sur les carcinomes.

4.1.1.1 Les Treg dans la masse tumorale

En 2009 notre équipe a montré que la présence d'un taux élevé de TA-Treg, identifiés sur la base de l'expression de FoxP3 dans les tumeurs primaires de sein, est un facteur indépendant de mauvais pronostic lorsqu'ils sont présents dans les agrégats lymphoïdes (agrégats formés par les leucocytes autour de la masse tumorale) (Gobert et al., 2009) en accord avec les observations de Bates et coll. (Bates et al., 2006). Kim et coll. ont montré, sur coupes de tumeurs, qu'un ratio Treg/CD4 élevé est associé à une plus forte récurrence des métastases ganglionnaires, l'expression de P53, Ki67 et le statut ER⁺ des cellules tumorales (Kim et al., 2012). La comparaison entre le nombre de Treg et de T CD8 dans les agrégats lymphoïdes intra-tumoraux et le tissu adjacent des tumeurs de sein infiltrantes montre que les quantités de Treg et de T CD8 sont augmentées dans le tissu adjacent. Une augmentation préférentielle des Treg par rapport

aux T CD8 (rapport TCD8/Treg diminué) peut révéler une orientation tolérogène de la réponse T. En ce sens seule la réduction du rapport T CD8/Treg est associée à un mauvais pronostic dans le tissu adjacent la tumeur. Le nombre de Treg dans les agrégats lymphoïdes intra-tumoraux et le rapport CD8/Treg dans le tissu adjacent sont significativement différents entre les sous types moléculaires (Luminal A, B, luminal Her2, HER2 amplifié et basal) (Liu et al., 2011a) démontrant la finesse des valeurs pronostiques fournies par ces paramètres (scores) immunitaires dans le cancer du sein. La comparaison entre les carcinomes du sein médullaires, lobulaires, ductaux et mucineux de grade III montre que les carcinomes mucineux présentent une plus forte infiltration par des cellules FoxP3⁺ (Anz et al., 2011). Ce résultat est paradoxal car les carcinomes mucineux sont de bon pronostic. Cependant, les carcinomes ductaux de plus mauvais pronostic présentent un rapport T CD8/Treg plus faible dans les agrégats lymphoïdes intra-tumoraux. Cela montre que tenir compte uniquement de la quantité de Treg dans les carcinomes du sein ne suffit pas toujours à obtenir une bonne valeur pronostique, mais qu'il est important de tenir compte de la proportion qu'ils représentent parmi les cellules T infiltrantes (TA-T) (Anz et al., 2011).

La présence de Treg FoxP3⁺ dans les carcinomes du poumon non à petites cellules (Petersen et al., 2006), les carcinomes hépatocellulaires (Gao et al., 2007), les carcinomes de l'endomètre (Yamagami et al., 2011), les carcinomes de l'ovaire (Curiel et al., 2004; Wolf et al., 2005; Sato et al., 2005), le cancer du pancréas (Hiraoka et al., 2006) et les mélanomes (Mougiakakos et al., 2010) est associée à un mauvais pronostic. Cependant l'impact négatif de l'infiltration des carcinomes par les Treg n'est pas toujours vrai, puisque les Treg n'ont pas d'impact sur le pronostic dans le carcinome anal (Grabenbauer et al., 2006) et sont de bon pronostic dans le cancer du côlon (Nagorsen et al., 2007; Correale et al., 2010; Sinicrope et al., 2009) et le carcinome squameux de l'œsophage (Yoshioka et al., 2008).

4.1.1.2 Les Treg dans les ganglions et le sang

Une réduction du nombre de cellules T et du nombre de DC dans les ganglions est associée à la présence de métastases ganglionnaires (Laguens et al., 2002; Poindexter et al., 2004; Kohrt et al., 2005). En accord avec cette observation, la présence de cellules FoxP3⁺ dans les ganglions permet de discriminer un groupe de patientes ayant un risque accru d'envahissement ganglionnaire (Matsuura et al., 2009; Krausz et al., 2012). La détection des micro-métastases par PCR (révélation du transcrite de la mammaglin) a permis de montrer que les ganglions présentant des micro-métastases ont des niveaux d'expression des transcrits de *t-bet* (Th1) et *foxp3* plus importants que les ganglions sains. Parallèlement, la quantité du messager de *gata-3* (Th2)

augmente, le transcrit de *foxp3* reste élevé et celui de *t-bet* diminue dans les ganglions envahis diagnostiqués en microscopie. Ceci révèle que la présence de micro-métastases est associée à une réponse de type Th1 concomitante avec une forte transcription du gène *foxp-3* alors que les ganglions massivement envahis sont orientés vers une réponse de type Th2 (Matsuura et al., 2009), suggérant que l'accumulation de cellules tumorales dans les ganglions est consécutive à une inhibition de la réponse Th1 alors que la proportion de Treg reste importante.

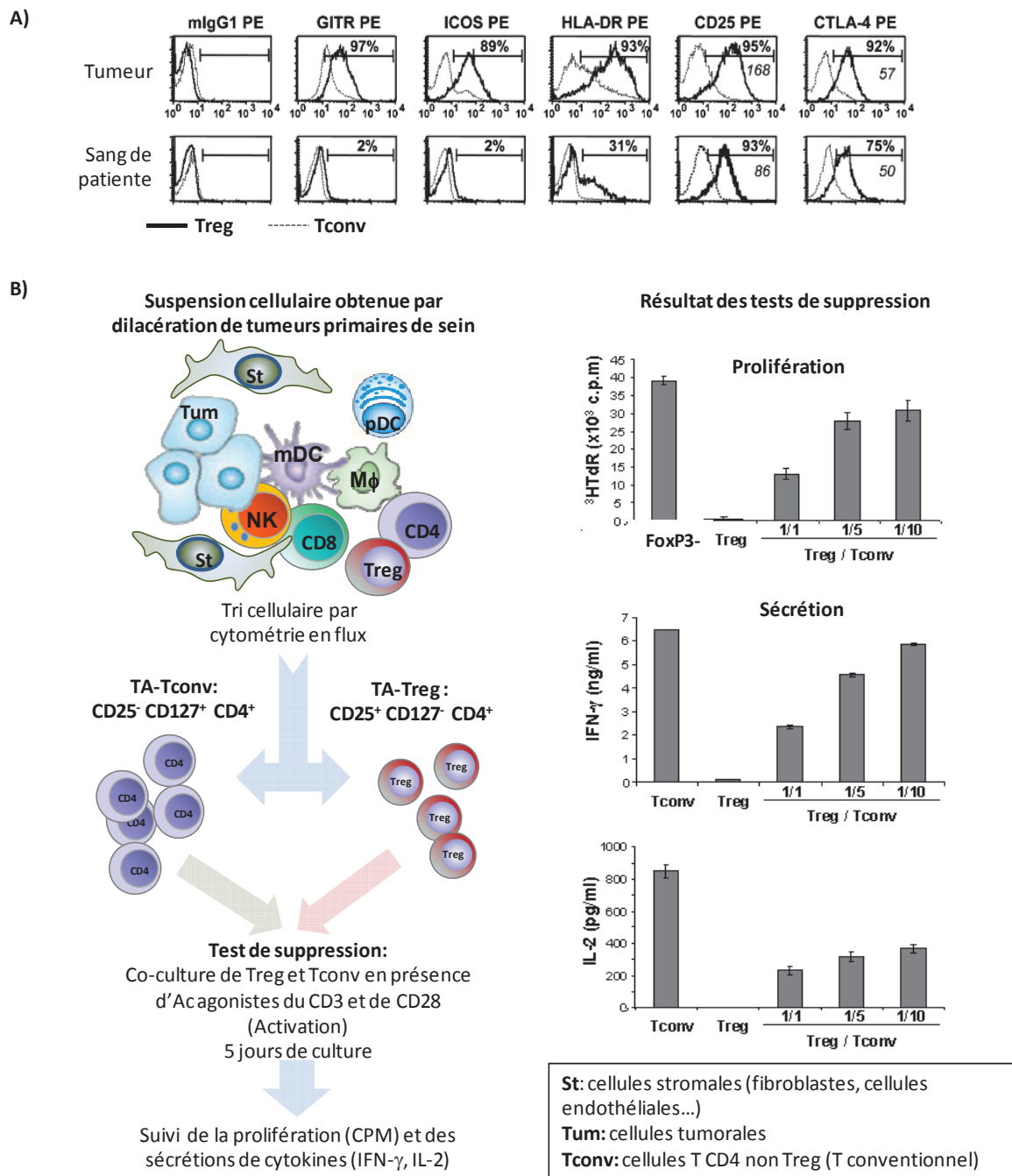
Dans le cancer du col de l'utérus, bien que le nombre de Treg soit augmenté dans les tumeurs, on n'observe pas de différence entre cancers métastatiques et non métastatiques. Par contre, la présence de Treg est significativement augmentée dans les ganglions (Matsuura et al., 2006). De même, la quantité de Treg FoxP3⁺ est augmentée dans les ganglions drainant la tumeur de patients atteints de cancers gastriques métastatiques (Lee et al., 2011) ou de cancer de la thyroïde (French et al., 2012).

Enfin, les proportions des Treg sont augmentées dans le sang des patientes atteintes de cancer du sein de haut grade (Audia et al., 2007) en parallèle avec une réduction globale du nombre de cellules T. Cette observation est également vraie dans le cancer du poumon métastatique (Erfani et al., 2012), le cancer « tête et du cou » (Schaefer et al., 2005), du pancréas (Yamamoto et al., 2012), et de la prostate (Akin et al., 2011).

4.1.2 Evidences de l'activité suppressive des Treg dans les tumeurs

En 2009, notre équipe a montré que les TA-Treg purifiés de tumeurs primaires de sein présentent un fort pouvoir suppresseur *in vitro*, qu'ils prolifèrent (expression de Ki67) et expriment les marqueurs d'activation CTLA-4, GITR et ICOS *in situ* de façon beaucoup plus importante que les autres populations T (Gobert et al., 2009) (Figure 9A et 9B). Cette dichotomie entre le fort niveau d'activation des Treg par rapport aux autres TA-T suggère qu'ils exercent leur fonction immuno-suppressive *in situ*.

Dans des modèles murins syngéniques de tumeurs mammaires sur-exprimant l'oncogène Her2/neu, l'utilisation d'Ac anti-CD25 ou d'une molécule chimérique d'IL-2 associée à la toxine diphtérique pour dépléter les Treg avant l'injection de la lignée tumorale réduit très fortement la croissance tumorale. Ceci est associé à l'induction d'une réponse immune anti-tumorale révélée par l'augmentation de cellules Th1, Th17 et de T CD8 spécifiques de HER2/Neu ainsi qu'une augmentation des Ac anti-HER2/Neu dans les sérums des souris traitées (Knutson et al., 2006; Ramos et al., 2012; Weiss et al., 2012; James et al., 2010). L'expression de Granzyme et Perforine par les TA-Treg a été décrite chez l'homme (Li et al., 2011).



Adapté de Gobert et coll, **Regulatory T Cells Recruited through CCL22/CCR4 Are Selectively Activated in Lymphoid Infiltrates Surrounding Primary Breast Tumors and Lead to an Adverse Clinical Outcome**
Cancer Res March 1, 2009 69: 2000-9

Figure 9: Les TA-Treg sont fortement activés et présentent un fort pouvoir suppresseur.

A) les TA-Treg expriment fortement GITR, ICOS, HLA-DR et CTLA-4 si on compare avec les TA-Tconv ou les Treg et Tconv provenant du sang périphérique des patientes suggérant une activation forte des TA-Treg dans la tumeur. B) Les TA-Treg (CD25^{hi}, CD127^{low}) purifiés par cytométrie en flux ont un fort pouvoir suppresseur sur les TA-Tconv en inhibant leur prolifération (incorporation de thymidine tritiée) et la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2.

La fréquence de TA-Treg Granzyme B⁺ est inversement proportionnelle à la fréquence des cellules Th1 et T CD8 exprimant Granzyme B et Perforine (Li et al., 2011). L'importance de Granzyme B et de la Perforine dans le pouvoir suppresseur des TA-Treg a été confirmée dans des

modèles de souris porteuses de tumeur dans lesquelles les gènes de granzyme B ou perforine ont été délétés spécifiquement dans les Treg réduisant fortement la croissance tumorale en association avec une meilleure survie des TA-CD8 et des TA-NK (Cao et al., 2007). Toujours chez la souris, Boissonnas et coll. ont montré que l'activité suppressive des TA-Treg résulterait également de leur capacité à lyser les DC (Boissonnas et al., 2010).

Les TA-Treg sont aussi caractérisés par une forte expression de CD39 chez les patients atteints de carcinomes squameux (Mandapathil et al., 2012; Schuler et al., 2012) ou d'effusions pleurales de cancer du poumon (Ye et al., 2011) suggérant que la dégradation de l'ATP extracellulaire puis la génération d'Ado pourrait être impliquées dans le pouvoir supprimeur des TA-Treg chez l'homme. Cependant, à ce jour, aucune analyse réalisée chez l'homme ne révèle la production d'Ado par les TA-Treg (Mandapathil et al., 2012). Chez la souris, la délétion du gène codant pour CD73 sélectivement dans les Treg, abolit la croissance tumorale dans un modèle de souris chimérique porteuses de tumeurs transplantées (Stagg et al., 2011) ce qui démontre formellement le rôle de la génération d'Ado *via* CD39 et CD73 par les TA-Treg dans l'immunosuppression et la croissance tumorale par inhibition des TA-CD8 (Stagg et al., 2011).

Dans le sang et les tumeurs de patients atteints de cancer du colon ou de mélanome, une sous-population de Treg exprimant LAG-3 est observée. Les Treg LAG-3⁺ du sang ou provenant des ganglions drainants les tumeurs des patients sécrètent de fortes quantités d'IL-10 et de TGF- β et suppriment fortement les autres cellules T *in vitro* (Camisaschi et al., 2010). D'autre part, dans les carcinomes squameux, les TA-Treg CD39⁺ co-expriment LAP et GARP (Schuler et al., 2012) suggérant l'implication de TGF- β dans leur pouvoir supprimeur (Mandapathil et al., 2012).

L'expression d'ICOS par les TA-Treg, a été décrite dans les tumeurs de sein (Gobert et al., 2009) (Figure 8A), les carcinomes hépatiques (Shen et al., 2010), le cancer de la prostate (Miller et al., 2006) et le mélanome (Strauss et al., 2008). De façon intéressante, la sous-population de TA-Treg ICOS⁺ co-exprime FoxP3, GITR, CTLA-4, IL-10, TGF- β , FAS, FAS-L, Granzyme A et Granzyme B par cytométrie en flux (Gobert et al., 2009; Strauss et al., 2008).

4.2 Facteurs favorables et Origine des Treg dans les tumeurs

La fonction suppressive des Treg est dépendante de leur localisation qui est conditionnée par l'expression de molécules d'adhésion et de récepteurs aux chimiokines. D'autre part, l'état d'activation des TA-Treg et leur proportion élevée dans les tumeurs suggèrent la présence de CPAg et de cytokines favorisant leur fonctionnalité, survie et prolifération.

4.2.1 Recrutement des Treg dans les tumeurs

Notre équipe a montré que les tumeurs primaires de sein humaines produisent de fortes concentrations de CCL22 qui est l'un des ligands de CCR4 exprimé par les Treg dans le sang. La présence de CCL22 dans la masse tumorale favorise le recrutement des Treg circulants du sang directement vers la tumeur de sein (Gobert et al., 2009; Menetrier-Caux et al., 2009) (Figure 10). De plus, l'implication de l'axe de chimio-attraction CCR4/CCL22 a également été rapportée chez l'homme dans le cancer de l'ovaire (Curiel et al., 2004), le carcinome de l'œsophage (Maruyama et al., 2010) et le cancer gastrique (Mizukami et al., 2008). Des données, rapportées par Mailloux et Young (Mailloux and Young, 2009) démontrent que dans un modèle tumoral murin de cancer du poumon métastatique, la sécrétion de CCL22, principalement par les cellules NK infiltrantes, favorise le recrutement des Treg dans la masse tumorale. Dans un modèle murin, l'injection d'un inhibiteur de CCR4 augmente la réponse T CD8 spécifique lors d'une vaccination contre des Ag du soi. Lorsque CCR4 est inhibé durant la vaccination, l'injection de lignées de thymome (EL4, EG7) surexprimant l'Ag du soi utilisé lors de la vaccination est associée à une réponse T CD8 qui réduit la croissance tumorale (Pere et al., 2011). Ces deux observations démontrent l'importance de l'axe CCR4/CCL22 dans l'immunosuppression associée au développement tumoral.

Dans les carcinomes squameux chez l'homme, les Treg expriment CCR6 et migrent en réponse à son ligand CCL20, fortement produit dans la masse tumorale (Chen et al., 2011). Ces observations ont été confirmées chez la souris montrant que les macrophages intra-tumoraux sécrètent CCL20, et participent ainsi au recrutement des Treg dans les tumeurs, la déplétion des cellules CD11b⁺ conduisant à la réduction de l'infiltration en Treg et à une inhibition partielle de la croissance tumorale (Liu et al., 2011b).

Dans les carcinomes ovariens, en plus de leur expression de CCR4 la majorité des TA-Treg exprime CXCR3 (Redjimi et al., 2012). L'expression de CXCR3 est induite par le facteur de transcription T-bet (Th1) et permet la migration des cellules Th1 et T CD8 dans les sites d'inflammation, où ses ligands (CXCL9, 10 et 11) sont induits en réponse à l'IFN- γ et l'IFN- α (Groom and Luster, 2011). Les TA-Treg CXCR3⁺ qui co-expriment T-bet et FoxP3 montrent un fort pouvoir suppresseur sur les cellules T et ne produisent pas d'IFN- γ . L'expression de CXCR3 par les TA-Treg est donc impliquée dans leur co-localisation avec les cellules T effectrices de type Th1 et T CD8 activés, et cela pourrait permettre aux TA-Treg d'agir spécifiquement sur ces cellules dans les tumeurs.

En somme, les Treg sont recrutés dans les tumeurs *via* différents axes de chimiotactisme. De façon très intéressante, l'axe CCR4/CCL22 suggère un recrutement principalement des Treg. Le recrutement *via* CXCR3 et CCR6 qui s'adresse aux Treg mais aussi aux cellules T polarisées, serait plus tardif au cours de la réponse immune et certainement moins sélectif des Treg.

4.2.2 Facteurs de l'environnement tumoral associés à un enrichissement en Treg

L'environnement intra-tumoral des tumeurs de sein est riche en TGF- β et en IL-10. Une analyse par IHC a montré que la présence de ces deux cytokines est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, qu'elles soient produites par les cellules tumorales (TGF- β) ou par les cellules immunes infiltrantes dans les agrégats lymphoïdes (IL-10) (Richardsen et al., 2012).

La présence de microvésicules (exosomes) produites par les cellules tumorales induisant la prolifération des Treg a été rapportée chez l'homme dans le cas du cancer de l'ovaire (Szajnik et al., 2010) *via* un mécanisme impliquant les voies de signalisation de l'IL-10 et du TGF- β . D'autre part, La présence de microvésicules influant sur la réponse immune anti-tumorale a également été rapportée dans les cancers « tête et cou », du pancréas (Clayton et al., 2008) et de la prostate (Castellana et al., 2009).

IDO est retrouvée dans différentes pathologies tumorales, et son expression est associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer du sein, de l'ovaire, de l'endomètre, du colon et les carcinomes rénaux (Sucher et al., 2010). De plus, l'expression simultanée d'IDO et de FoxP3 dans les ganglions drainant les tumeurs de sein est associée à un envahissement métastatique (Mansfield et al., 2009).

Les patientes atteintes de cancer du sein montrent une concentration sérique élevées de PGE-2. De même COX-2, l'enzyme qui induit la production de PGE-2, est exprimée par les cellules tumorales dans 40% des carcinomes du sein (Howe, 2007; Richardsen et al., 2012). Tout comme pour l'infiltration en Treg il existe une corrélation inverse entre le niveau d'expression de COX-2 et le pronostic vital des patientes (Saukkonen et al., 2001). Dans le cancer du poumon PGE-2 induit l'expression de FoxP3 et augmente leur activité suppressive (Sharma et al., 2005).

Des observations dans le mélanome (Martin-Orozco et al., 2010) et le glioblastome (Schreiner et al., 2003) rapportent l'expression par les cellules tumorales de la molécule ICOS-L. Cette expression d'ICOS-L dans les cellules de mélanome participerait à l'activation des Treg et à l'induction de leur pouvoir supprimeur, se traduisant par une forte prolifération et la sécrétion d'IL-10 (Martin-Orozco et al., 2010).

4.2.3 Les CPAg et la réponse toléroène dans les tumeurs

Les cellules tumorales et l'environnement stromal peuvent moduler l'activation et la fonction des CPAg pour favoriser l'induction de CPAg toléroènes.

4.2.3.1 *Les Macrophages associées aux tumeurs (TAM)*

La présence de TAM dans la masse tumorale est détectable dès les premiers stades de la tumorigénèse et se poursuit tout au long de l'évolution de la pathologie (Murdoch et al., 2004). Le recrutement des monocytes est favorisé par l'hypoxie qui induit l'expression de chimiokines telles que le CCL2, 3, 4, 5 et 8 par les cellules tumorales ou le stroma et la sécrétion de colony-stimulating-factor (CSF-1/M-CSF). Les TAM, en sécrétant de fortes concentrations VEGF, platelet derived growth factor (PDGF) et TGF- β (Siveen and Kuttan, 2009), vont favoriser l'angiogénèse. Le niveau d'expression de ces molécules corrèle avec le taux d'infiltration par les TAM dans les tumeurs humaines (Murdoch et al., 2004). Le nombre de TAM (analysé sur la base de l'expression de CD163 et/ou CD68) infiltrant la masse tumorale est associé à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Leek et al., 1999; Medrek et al., 2012; Tsutsui et al., 2005), le carcinome rénal (Komohara et al., 2011), le mélanome (Bronkhorst et al., 2011), le cancer « tête et cou » (Fujii et al., 2012) et le cancer du pancréas (Kurahara et al., 2012; Ohno et al., 2003). De plus l'infiltration des tumeurs de sein par les TAM est corrélée à une augmentation du risque de métastases (Leek et al., 1999; Leek et al., 1996; Wyckoff et al., 2004) en partie *via* la production des métalloprotéinases de la matrice (MMP) 2 et 9 (Hagemann et al., 2004). La présence de TAM dans le cancer du poumon non à petites cellules permet de prédire la réponse au traitement par un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant EGF-R (Chung et al., 2012). Dans de nombreux types tumoraux, les TAM expriment un phénotype proche de M2 (a et c). En plus du VEGF, ils sécrètent TGF- β , IL-10, IL-8, CCL22, expriment COX-2 (Sica et al., 2000; Ben-Baruch, 2006) et sont inhibées pour leur production d'IL-12 et l'expression d'iNOS (Mitsushashi et al., 2004; Satoh et al., 2003; Lewis and Pollard, 2006). Dans le cas du cancer ovarien et du col de l'utérus, les TAM expriment, sous l'influence de l'IL-6 et de l'IL-10, la molécule de co-stimulation négative B7-H4 (Kryczek et al., 2007; Yigit et al., 2010; Galazka et al., 2012) qui corrèle positivement, chez l'homme et la souris, avec le niveau d'infiltration des Treg (Kryczek et al., 2007; Kryczek et al., 2006). Les modèles murins, ont clairement établi que l'infiltration de la masse tumorale par les TAM corrèle avec une croissance tumorale plus rapide, une angiogénèse et une dissémination métastatique accrue (Lin et al., 2002; Aharinejad et al., 2004; Wyckoff et al., 2007).

4.2.3.2 Les TA-mDC

Dans le cas du cancer du sein, l'environnement tumoral n'altère pas *in vitro* la différenciation des progéniteurs CD34⁺ du sang en DC (Thomachot et al., 2004) mais favorise le blocage de leur maturation qui est associée à une faible capacité de présentation des Ag. De façon intéressante, une augmentation des mDC immatures (iDC) exprimant faiblement les CMH de classe II et les ligands de co-stimulation a été observée chez les patients porteurs de différentes tumeurs dont le cancer du sein (Bell et al., 1999; Lizee et al., 2006; Almand and Carbone, 2001; Kusmartsev and Gabrilovich, 2006). Dans le cancer du sein, les TA-mDC, lorsqu'elles sont localisées dans les agrégats lymphoïdes, ont un phénotype mature (expression de CD83) alors qu'elles présentent un phénotype immature lorsqu'elles sont au contact des cellules tumorales (Bell et al., 1999). La purification des TA-mDC a permis de montrer que ces cellules sont incapables d'induire une réponse T effectrice mais privilégient plutôt une réponse T immuno-suppressive (Bell et al., 1999; Aspord et al., 2007; Norian et al., 2009). Chez la souris, ces TA-mDC montrent une surexpression d'IDO, d'IL-10 et de TGF- β et une réduction de sécrétion d'IL-12, TNF- α et IL-6 (Stoitzner et al., 2008). Dans un modèle murin de tumeur mammaire, l'enrichissement en TA-Treg parmi les TA-T CD4 est dépendant de leur prolifération *in situ* et non uniquement de leur recrutement dans la masse tumorale. De plus, la prolifération des TA-Treg nécessite dans ce modèle la présence de DC ou de macrophages producteurs de TGF- β (Xu et al., 2011). Par contre, dans le cancer de la langue, la présence de TA-mDC matures CD1a⁺ en péri-tumoral est associée à un bon pronostic (Goldman et al., 1998) suggérant qu'en fonction de leur localisation mais aussi de l'environnement en cytokines, les TA-mDC peuvent participer à la mise en place d'une réponse immune anti-tumorale.

4.2.3.3 Les TA-pDC

Les pDC seraient recrutées dans les tumeurs *via* CXCR4 exprimée par les pDC et son ligand CXCL12 sécrété par le stroma dans le cas du cancer de l'ovaire (Zou et al., 2001). En 2004, notre équipe a montré par IHC l'impact pronostic très défavorable de la présence de pDC dans la masse tumorale (TA-pDC) sur la base de l'expression de CD123 pour la SSR et la SG, (Treilleux et al., 2004). Hartmann et coll. (Hartmann et al., 2003) puis Bekeredjian-ding et coll. (Bekeredjian-Ding et al., 2009) ont montré après purification des TA-pDC à partir de tumeurs de cancer « tête et cou » une forte altération de leur capacité à sécréter de l'IFN- α en réponse aux ligands de TLR-7 et -9 favorisant une réponse T CD8 de type immuno-suppressive. Cette altération des TA-pDC implique la présence de PGE-2 et de TGF- β dans l'environnement tumoral. L'altération des TA-pDC est associée à une diminution de l'expression de CCR7 par rapport à CXCR4 qui selon les

auteurs réduirait la migration de TA-pDC vers les ganglions conduisant à leur accumulation dans la tumeur *via* CXCL12 (Bekeredjian-Ding et al., 2009). De plus, les pDC purifiées d'ascites de tumeurs ovariennes humaines induisent la prolifération *ex vivo* de cellules T CD8 régulatrices sécrétrices d'IL-10 qui expriment CCR7. A l'opposé, les mDC purifiées de ces ascites induisent l'expansion de T CD8 cytotoxiques (Wei et al., 2005).

Dans un modèle murin de mélanome (modèle B16), les pDC provenant des ganglions drainant la tumeur expriment IDO. Cette sous-population de pDC provoque l'accumulation de Treg à fort pouvoir immuno-suppresseur parmi les T CD4 *in vitro* et *in vivo*. Un des mécanismes de suppression associé à ces Treg amplifiés par les pDC IDO⁺ passerait par l'induction de l'expression des ligands de co-stimulation inhibiteurs PD-L1/2 sur les DC (Sharma et al., 2007).

4.3 Principales stratégies pour éradiquer l'immuno-subversion associée au développement tumoral

La perspective de supprimer le pouvoir supprimeur des Treg pour induire une réponse anti-tumorale fait l'objet d'une recherche très soutenue et a déjà donné naissance à plusieurs essais cliniques chez l'homme (Pardoll, 2012).

4.3.1 Bloquer les récepteurs impliqués dans l'immuno-suppression

L'utilisation d'un Ac bloquant dirigé contre CTLA-4 est le premier médicament ciblant spécifiquement l'immuno-suppression qui connaît une grande réussite aujourd'hui. L'Ac anti-CTLA-4 (Ipilimumab) a obtenu en 2010 par la FDA (Food and Drug Administration) son autorisation de mise sur le marché, au regard de son impact favorable dans le traitement du mélanome métastatique, car il permet une augmentation de la survie médiane des patients de 6 à 10.1 mois (Hodi et al., 2010). Le blocage de CTLA-4 augmente la sécrétion d'IFN- γ mais également d'IL-10, l'activation et la proportion de cellules FoxP3⁺ parmi les T CD4 et CD8 et il n'inhibe pas spécifiquement les Treg (Khan et al., 2010). En clinique, ce traitement est associé à des effets secondaires très importants avec l'apparition de réactions auto-immunes telles que des colites inflammatoires, des hépatites et des endocrinopathies chez les patients répondeurs qui dans la majorité des cas disparaissent lors de l'arrêt du traitement (Verschraegen, 2012).

Des données très récentes, utilisant des Ac bloquants anti PD-1 suscitent de grands espoirs. PD-1 est exprimé par les différentes sous-populations de T CD4 et CD8 suite à leur activation, ses ligands PD-L1 et PD-L2 sont présents sur les cellules tumorales et sur les CPAg dans les agrégats lymphoïdes de différents types de carcinomes (Sharma et al., 2007). L'expression de PD-1 ou de

PD-L1 est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer de la thyroïde (French et al., 2012), le carcinome du rein, de l'intestin (Thompson et al., 2006), du sein (Ghebeh et al., 2006) et de l'œsophage (Ohigashi et al., 2005). PD-1 présente des homologies avec CTLA-4, l'engagement de PD-1 induit un signal inhibiteur distinct *via* la phosphatase SHP2 qui régule les kinases impliquées dans l'activation des cellules T et peut conduire à leur apoptose. Des Ac bloquants contre PD-L1 et PD-L2 sont aussi développés en clinique. Les essais cliniques de phase I sur des patients atteints de cancer métastatiques avancés du colon, du rein, de l'intestin, du pancréas, et du sein de grade 3 ou 4 montrent une réponse objective dans 6 à 17% des cas et une stabilisation de la pathologie à 24 semaines dans 12 à 41% des patients (Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012) démontrant que cibler les molécules impliquées dans l'immunosuppression pourrait avoir un impact majeur dans la mise en place d'une réponse anti-tumorale durable.

4.3.2 Accroître la résistance des cellules effectrices vis-à-vis des Treg

Les Ac agonistes anti-GITR ont montré de bons résultats dans les modèles murins en délivrant un signal positif aux cellules T intra-tumorales. Ainsi, le traitement des souris par un Ac agoniste anti-GITR permet le rejet du mélanome B16 (Cohen et al., 2006). L'engagement de GITR permet aux cellules T effectrices intra-tumorales de résister à la suppression médiée par les Treg chez des souris porteuses de tumeur CT26 (carcinome du colon) ou CMS5 (fibrosarcome) en induisant une surexpression de CD25 sur les cellules T (Mitsui et al., 2010). Cependant, des résultats plus contradictoires ont été rapportés quant à la fonctionnalité et la prolifération des Treg suite à l'engagement de GITR et on ne peut donc pas conclure que l'activité anti-tumorale de l'Ac agoniste de GITR passe par une action directe sur les Treg (Liao et al., 2010; Howie et al., 2009). L'utilisation d'Ac anti-Ox40 agoniste permet également de délivrer un signal positif aux cellules T effectrices en augmentant les sécrétions de type Th1 et Th2 et en induisant l'accumulation dans le sang et les ganglions de cellules T Ag spécifiques *via* l'augmentation de leur survie (Salek-Ardakani and Croft, 2006). De bons résultats ont été obtenus lors du traitement de souris porteuses de tumeurs en réduisant la croissance tumorale (Kjaergaard et al., 2000; Pan et al., 2002; Weinberg et al., 2000). Toutefois, chez la souris, l'engagement d'Ox40 peut aussi délivrer un signal positif aux Treg en favorisant leur prolifération et augmentant le pourcentage de cellules FoxP3⁺ (Xiao et al., 2012). Enfin un rôle important d'Ox40 a été décrit dans la protection contre la colite chez la souris (Griseri et al., 2010) en induisant la prolifération des Treg dans les lésions.

En somme l'utilisation des Ac agonistes de GITR et Ox40 permet d'accroître l'activité anti-tumorale des cellules T. Une partie de l'activité anti-tumorale de ces Ac passe par la sur-activation des cellules T effectrices leur conférant une résistance vis-à-vis du pouvoir suppresseur des Treg, mais l'impact de ces traitement sur les TA-Treg n'est pas encore bien caractérisé, il est possible qu'une éradication concomitante des Treg puisse accroître l'efficacité de ces Ac agoniste.

4.3.3 Eradiquer les Treg, leur prolifération ou leur recrutement

Certaines drogues de chimiothérapies telles que le cyclophosphamide ou le paclitaxel utilisées en clinique humaine permettent de réduire le nombre de Treg et est associé à une augmentation des réponses T effectrices (Chen et al., 2010; Ghiringhelli et al., 2007).

Le ciblage des Treg chez la souris par l'utilisation d'Ac anti-CD25 permet d'empêcher la prise tumorale. Cependant, chez l'homme, l'utilisation d'Ac anti-CD25 ou d'IL-2 couplée à la toxine diphtérique (Denileukin diftitox) n'a pas donné de résultats probants et provoque de nombreux effets secondaires (Chen et al., 2010; de Vries et al., 2011; Rech and Vonderheide, 2009). Les raisons de cet échec thérapeutique proviennent probablement d'un problème de spécificité du ciblage de CD25 chez l'homme car d'une part CD25 est exprimé par l'ensemble des sous-populations T après activation et d'autre part, la signalisation de l'IL-2 est importante pour les cellules de l'immunité innée telles que les NK et les monocytes.

Enfin, les Treg expriment le récepteur VEGFR2 (VEGF receptor 2). L'inhibition de ce récepteur par des inhibiteurs de tyrosines kinases (Sorafenib et le Sunitinib), lors du traitement de patients atteint de carcinome du rein métastatique, a conduit à une diminution du nombre de Treg dans le sang et la tumeur (Busse et al., 2011; Desar et al., 2011) associée à une augmentation de la survie des patients (Adotevi et al., 2010; Finke et al., 2008). Cependant, cet effet n'est probablement pas direct car, *in vitro*, l'inhibition de VEGFR2 a un impact sur les cellules myéloïdes suppressives mais ne modifie pas les propriétés des Treg (Adotevi et al., 2010; Ko et al., 2009).

Conclusion partie IV : L'environnement tumoral pourrait être perçu comme un berceau pour les Treg. Leur recrutement *via* différents axes de chimiotactisme, la présence de cytokines favorables à leur maintien, leur prolifération, leur induction et leurs fonctions suppressives participerait à la fonctionnalité des TA-Treg. La présence dans l'environnement de CPAg fonctionnellement altérées peut également être un facteur important dans l'amplification et

l'activation de ces TA-Treg. La présence de TA-Treg est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de carcinomes et les observations réalisées dans le sang et les ganglions des patients montrent que l'homéostasie des Treg est modifiée à l'échelle systémique suivant le développement tumoral. En somme, chez l'homme un robuste faisceau de preuves permet de conclure que les TA-Treg exercent leur pouvoir immuno-suppresseur *in situ* dans les tumeurs de sein et jouent un rôle primordial dans les mécanismes d'immuno-subversion conduisant à la tolérance des cellules transformées. Les données obtenues chez la souris montrent que l'éradication des Treg permet d'induire le rejet de tumeurs ou d'inhiber le développement de tumeurs implantées. Cependant, même si des progrès spectaculaires ont été réalisés ces dernières années dans le développement de molécules permettant l'inhibition des mécanismes d'immuno-subversion tumorale, il n'existe à ce jour aucune thérapie ciblant spécifiquement les Treg chez l'homme (pour revue Annexe 1 : (Menetrier-Caux et al., 2012)).

5 Intérêts scientifiques et projet de thèse

Le cancer du sein est une maladie qui impacte le système immunitaire, les cellules immunes s'infiltrant dans la masse tumorale, et le système immunitaire présente des altérations conjointement au développement tumoral. Les cellules tumorales peuvent présenter un pouvoir immunogène très faible du fait qu'elles dérivent de cellules du soi. Cependant les cellules transformées peuvent être détectées par le système immunitaire entre autres dans le cas de carcinome mammaire infiltrant. La capacité des tumeurs à échapper à la surveillance du système immunitaire est une condition nécessaire à leur croissance, pouvant conduire au développement de la pathologie. L'échappement tumoral face au système immunitaire peut passer par des mécanismes d'immuno-subversion qui aboutissent à la tolérisation des Ag tumoraux par le système immunitaire.

Les nTreg sont les « gardiens du soi » car ils présentent un répertoire TCR orienté vers les Ag du soi et expriment constitutivement Foxp3, ce qui leur confère un pouvoir suppresseur important que ce soit à l'état basal (sans activation) mais surtout après activation. Les nTreg sont indispensables dans la prévention de l'initiation de maladies auto-immunes et leur pouvoir suppresseur participe au contrôle des réactions pro-inflammatoires déjà engagées.

La présence de TA-Treg est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de carcinomes, dont les cancers du sein et de l'ovaire. Les observations dans le sang et les ganglions des patients montrent une modification systémique de l'homéostasie des Treg au cours du développement tumoral.

En somme, nous avons vu que chez l'homme comme chez la souris un robuste faisceau de preuves permet de conclure que les TA-Treg exercent leur pouvoir immuno-suppresseur *in situ* dans les tumeurs de sein et jouent un rôle primordial dans les mécanismes d'immuno-subversion conduisant à la tolérance des cellules transformées.

Les données obtenues chez la souris montrent que l'éradication des Treg permet le rejet et/ou l'inhibition du développement de tumeurs implantées. Cependant malgré les progrès spectaculaires de ces dernières années dans le développement de stratégies thérapeutiques permettant l'inhibition des mécanismes d'immuno-subversion tumorale (anti CTLA-4, anti-GITR, anti-PDL-1 ou anti-PD-1), aucune thérapie ciblant spécifiquement les Treg n'existe à ce jour chez l'homme. Les mécanismes de recrutement des TA-Treg dans les tumeurs, mais aussi les facteurs

induisant leur activation, leur prolifération et leur fonction suppressive constituent des cibles thérapeutiques potentielles qui pourraient permettre l'éradication des TA-Treg. (Figure 10)

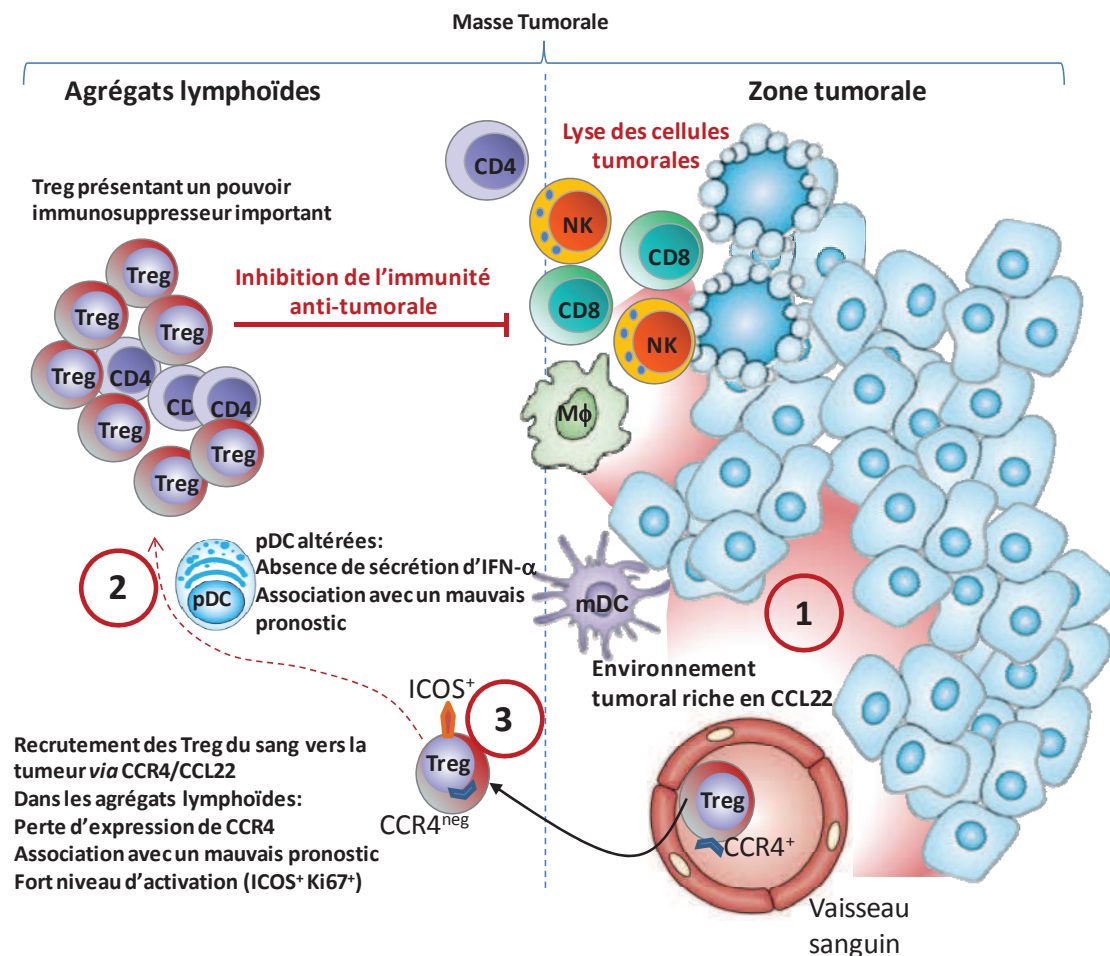


Figure 10: Projet de thèse: quelle est l'origine de la sécrétion de CCL22 dans les tumeurs et existe-t-il une relation entre l'état activé des TA-Treg *in situ* et la présence de TA-pDC altérées?

Les Treg CCR4⁺ sont recrutés du sang vers la tumeur en suivant le gradient de CCL22 présent dans la masse tumorale. Une fois dans la tumeur les TA-Treg ont perdu l'expression de CCR4, présentent un fort état d'activation (ICOS⁺), prolifèrent *in situ* (Ki67⁺), ont un fort pouvoir suppresseur *in vitro* et sont associés à un mauvais pronostic lorsqu'ils sont détectés dans les agrégats lymphoïdes. Les TA-pDC sont-elles aussi associées à un mauvais pronostic sur la survie des patientes et ont perdu la capacité de produire de fortes quantités d'IFN-α en réponse à l'engagement des TLR-7 et 9.

- ① Quelle est la source de CCL22 dans les tumeurs, par quel mécanisme cette sécrétion est-elle induite?
- ② Existe-t-il un lien fonctionnel entre la présence de pDC altérées et l'état d'activation fort des Treg dans la tumeur?
- ③ Quel est le rôle de l'expression d'ICOS sur les TA-Treg, le blocage d'ICOS pourrait-il permettre de cibler spécifiquement ces cellules?

5.1 Le recrutement de Treg : Quel est la source de CCL22 dans les tumeurs ?

Les données produites par Michael Gobert montrent que i) les Treg migrent en réponse à CCL22 produit dans les cultures de dilacérats de tumeurs (Gobert et al., 2009; Menetrier-Caux et al., 2009), ii) la présence de CCL22 dans la masse tumorale est corrélée avec l'infiltration des Treg dans les zone lymphoïdes intra-tumorales et iii) que les TA-Treg n'expriment pas CCR4 dans les tumeurs suite à son engagement par CCL22. Nous avons vu que les nTreg expriment CCR4 dans le sang et sont recrutés vers le site d'inflammation *via*, entre autres, l'expression de CCR4, où ils reconnaissent des peptides autologues mais également des Ag étrangers et contrôlent ainsi l'activation des autres cellules T et des CPAg. Les modèles murins ont démontré que l'expression de CCR4 participe à l'action suppressive des Treg dans différents contextes (rejet de greffe et vaccination). D'autre part, le rôle de l'axe de chimiotactisme CCR4/CCL22 dans le recrutement intra-tumoral des Treg a également été rapportée dans le cancer de l'ovaire, le carcinome de l'œsophage et le carcinome hépatique, ainsi que dans des modèle murins de tumeurs transplantées.

Nous nous sommes donc intéressés à l'identification des mécanismes impliqués dans la sécrétion de CCL22 dans la masse tumorale. Nos objectifs étaient alors de caractériser les cellules responsables de la sécrétion de CCL22 et les mécanismes pouvant induire cette sécrétion dans la masse tumorale.

5.2 Quel est l'impact de l'altération des TA-pDC sur les TA-Treg ?

Les TA-Treg prolifèrent (expression de Ki67) et expriment les marqueurs d'activation HLA-DR, CTLA-4, GITR et ICOS *in situ* suggérant la présence des signaux de co-stimulation, des complexes CMH-II peptide et l'environnement en cytokines permettant leur activation et leur prolifération dans les tumeurs primaires de sein. L'environnement tumoral pourrait être perçu comme un berceau pour les Treg. Leur recrutement *via* différents axes de chimiotactisme, la présence de cytokines favorables à leur maintien, leur prolifération, leur induction et leurs fonctions suppressives seraient impliqués dans l'impact défavorable des TA-Treg.

L'activation des Treg par les CPAg peut augmenter considérablement leur pouvoir supprimeur *via* l'induction de molécules tel que LAG-3, Perforine, Granzyme A/B et la sécrétion de cytokines inhibitrices. Les CPAg présentent une grande plasticité fonctionnelle, l'environnement en cytokines immuno-suppressives (IL-10, TGF- β), ainsi que la présence de molécules immuno-

modulatrices (PGE-2, ADo) modifient leurs propriétés stimulatrices *via* la réduction de l'expression des molécules de co-stimulation, la diminution de leur capacité à présenter les Ag (réduction d'expression des CMH de classe I et II), l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IFN- α) et l'expression de cytokines immuno-suppressives. Les CPAg tolérogènes présentes dans les muqueuses tel que les pDC CCR9⁺ ou induites *in vitro* (MoDC pré-activées en présence d'IL-10) sont impliquées dans l'inhibition des réponses pro-inflammatoires *via* l'amplification des nTreg, l'induction des iTreg ou la polarisation des T CD4 de type Tr1. Or, la présence de TA-pDC est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Treilleux et al., 2004). A mon arrivée au laboratoire, le groupe de Nathalie Bendriss-Vermare, (Vanja Sisirak et Sana-Inthidar Labidi-Galy) menaient une étude portant sur la fonctionnalité des pDC dans l'environnement tumoral dans les cancers du sein et de l'ovaire. L'analyse de prélèvements tumoraux leur a permis de montrer le phénotype semi-mature des TA-pDC et la forte altération de leur capacité à produire de l'IFN- α en réponse à une stimulation par des ligands de TLR-7 et 9 *ex vivo*.

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons souhaité déterminer l'impact de l'altération fonctionnelle des TA-pDC sur leur capacité à favoriser la prolifération et l'enrichissement des Treg mais aussi la polarisation ou l'activation des autres cellules T CD4 naïves ou mémoires.

5.3 Quel est le rôle d'ICOS dans l'enrichissement et l'état d'activation fort de TA-Treg ?

L'expression d'ICOS par les TA-Treg, a été décrite dans les tumeurs de sein (Gobert et al., 2009) (Figure 9A), les carcinomes hépatiques (Shen et al., 2010), le cancer de la prostate (Miller et al., 2006) et le mélanome (Strauss et al., 2008). De façon intéressante, la sous-population de TA-Treg ICOS⁺ co-exprime FoxP3, GITR, CTLA-4, IL-10, TGF- β , FAS, FAS-L, Granzyme A et Granzyme B par cytométrie en flux (Gobert et al., 2009; Strauss et al., 2008). Les pDC constituent la seule sous-population de DC qui surexprime très fortement ICOS-L après activation après engagement de CD40 ou d'un TLR (Ito et al., 2007; Janke et al., 2006; Burmeister et al., 2008). ICOS-L exprimé par les pDC a été impliqué dans le développement et la prolifération des Treg et l'induction de cellules Tr1 lors de la polarisation de cellules T CD4 naïves (Ito et al., 2007; Ito et al., 2008).

Notre objectif a été de déterminer le rôle d'ICOS/ICOS-L dans l'amplification des TA-Treg par les TA-pDC.

Mon projet de thèse a donc comporté trois objectifs axés sur i) l'analyse des mécanismes impliqués dans la sécrétion de CCL22 dans l'environnement tumoral favorisant le recrutement

des Treg, ii) le rôle des TA-pDC fonctionnellement altérées pour leur production d'IFN- α dans la prolifération des Treg et enfin iii) le rôle d'ICOS dans ce mécanisme d'amplification des TA-Treg par les TA-pDC dans l'environnement tumoral du cancer du sein.

L'ensemble des données obtenues nous permettent de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'accumulation des TA-Treg et à leur activation *in situ*, dans la perspective d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettraient une éradication spécifique des TA-Treg et de leur impact défavorable dans l'évolution du cancer du sein.

6 Résultats

6.1 La détection par les cellules NK et les macrophages des cellules transformées favorise leur production de CCL22 et le recrutement des Treg.

Article n°1 : Faget J et al. Cancer Res 2011 71(19):6143-6152.

Pour mieux comprendre les mécanismes de recrutement des Treg, nous avons caractérisé la source de CCL22 dans la masse tumorale, par IHC sur coupes de tumeurs et tissus péri-tumoraux provenant de mastectomies. Nous avons montré que, dans les tissus péri-tumoraux dans lesquels les structures mammaires (canaux galactophores, lobules) sont conservées, la chimiokine CCL22 est faiblement détectée mais sa sécrétion est polarisée au pôle apical des cellules épithéliales des acini alors que dans la tumeur elle est exprimée de façon homogène et intense dans les cellules tumorales, suggérant fortement la sécrétion de CCL22 par les cellules épithéliales tumorales elles-mêmes. Ces données sont confirmées par les études *in vitro* montrant la capacité des lignées de cellules tumorales de sein à sécréter CCL22 après activation par IFN- γ , en accord avec les données publiées sur les cellules épithéliales de colon (Berin et al., 2001). Cette production de CCL22 par les cellules tumorales est fortement augmentée lors de co-cultures avec des cellules mononucléées du sang périphérique (CMN) de donneurs sains. Ces résultats suggèrent un rôle important des leucocytes dans la production de CCL22 par les cellules tumorales et la déplétion des leucocytes (CD45⁺) dans les suspensions de tumeurs primaires de sein réduit fortement la production de CCL22 après 48h de culture, confirmant cette hypothèse. Des expériences *in vitro* utilisant des déplétions sélectives des sous-populations de CMN, l'utilisation de cytokines recombinantes ou l'utilisation d'Ac neutralisants les cytokines nous ont permis de montrer le rôle majeur des monocytes *via* leur sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β en présence d'IFN- γ exogène dans l'induction de la sécrétion de CCL22 par les cellules tumorales. Enfin, nous avons montré que l'ajout de NK activés (stimulés par IL-2) permet de remplacer l'IFN- γ exogène dans des co-cultures [cellules tumorales - monocytes]. L'ensemble de nos données suggère un modèle selon lequel la détection des cellules transformées par les NK conduit à leur production d'IFN- γ participant à l'activation des macrophages qui sécrètent alors de l'IL- β et du TNF- α , agissant en synergie pour induire la sécrétion de CCL22 par les cellules épithéliales transformées, permettant le recrutement des Treg. La présence de macrophages (CD68⁺CD163⁺) et de NK (Nkp46⁺) détectée par IHC et cytométrie dans les tumeurs primaires de sein et le fait que des macrophages et des cellules NK purifiées de tumeurs induisent la sécrétion de CCL22 par les cellules tumorales primaires renforce ce modèle.

Early Detection of Tumor Cells by Innate Immune Cells Leads to T_{reg} Recruitment through CCL22 Production by Tumor Cells

Julien Faget^{1,2,3}, Cathy Biota^{1,2,3}, Thomas Bachelot^{1,2,3}, Michael Gobert^{1,2,3}, Isabelle Treilleux^{1,2,3}, Nadège Goutagny^{1,2,3}, Isabelle Durand^{1,3}, Sophie Léon-Goddard^{1,2,3}, Jean Yves Blay^{1,2,3}, Christophe Caux^{1,2,3}, and Christine Ménétrier-Caux^{1,2,3}

Abstract

In breast carcinomas, patient survival seems to be negatively affected by the recruitment of regulatory T cells (T_{reg}) within lymphoid aggregates by CCL22. However, the mechanisms underpinning this process, which may be of broader significance in solid tumors, have yet to be described. In this study, we determined how CCL22 production is controlled in tumor cells. In human breast carcinoma cell lines, CCL22 was secreted at low basal levels that were strongly increased in response to inflammatory signals [TNF- α , IFN- γ , and interleukin (IL)-1 β], contrasting with CCL17. Primary breast tumors and CD45⁺ infiltrating immune cells appeared to cooperate in driving CCL22 secretion, as shown clearly in cocultures of breast tumor cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or their supernatants. We determined that monocyte-derived IL-1 β and TNF- α are key players as monocyte depletion or neutralization of these cytokines attenuated secretion of CCL22. However, when purified monocytes were used, exogenous human IFN- γ was also required to generate this response suggesting a role for IFN- γ -producing cells within PBMCs. In this setting, we found that human IFN- γ could be replaced by the addition of (i) IL-2 or K562-activated natural killer (NK) cells or (ii) resting NK cells in the presence of anti-MHC class I antibody. Taken together, our results show a dialogue between NK and tumor cells leading to IFN- γ secretion, which in turn associates with monocyte-derived IL-1 β and TNF- α to drive production of CCL22 by tumor cells and subsequent recruitment of T_{reg}. As one validation of this conclusion in primary breast tumors, we showed that NK cells and macrophages tend to colocalize within tumors. In summary, our findings suggest that at early times during tumorigenesis, the detection of tumor cells by innate effectors (monocytes and NK cells) imposes a selection for CCL22 secretion that recruits T_{reg} to evade this early antitumor immune response. *Cancer Res*; 71(19); 6143–52. ©2011 AACR.

Introduction

Cancer immunosubversion is a process by which tumor cells escape destruction by the immune system through a variety of mechanisms including the production of immunosuppressive cytokines and the alteration of dendritic cell (DC) functions (1, 2).

Several studies have shown that immune cells are present and functional in solid tumors and may promote both hu-

moral and cellular antitumor immune responses. As an example, high levels of CD8⁺ T cells within the tumors have been associated with a better clinical prognosis in colorectal cancer (3). However, in most of the cases these T cells are unable to counteract tumor progression. In cancer patients, increased levels of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells (T_{reg}), a lymphocyte subset with immunosuppressive properties, are described in the peripheral blood, the primary tumor microenvironment, and in the draining lymph nodes, supporting a role for T_{reg} in cancer-induced immunosuppression. However, their effect on tumor progression varies according to the tumor type in humans. T_{reg} have a negative impact on survival in lung, pancreatic, gastric, liver, or ovarian carcinoma patients (4–7), whereas they may exert a beneficial role in B-cell lymphoma, head and neck, or colon carcinoma (8, 9) or have no impact in colon, prostate, renal, or anal squamous cell carcinoma (10, 11; for review, see ref. 12).

We recently obtained evidence, in breast carcinoma, that selectively activated T_{reg} accumulation within lymphoid aggregates, but not in the tumor bed, has a negative impact on patients' survival (13). Elucidating the mechanisms involved

Authors' Affiliations: ¹Centre Léon Bérard; ²Université Lyon 1; and ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Christine Ménétrier-Caux, Centre Léon Bérard, CRCL INSERM U1052/CNRS 5286, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08, France. Phone: 33-4-78-78-27-50; Fax: 33-4-78-78-27-20; E-mail: caux@lyon.fnclcc.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0573

©2011 American Association for Cancer Research.

in T_{reg} trafficking and accumulation in the breast tumor environment is thereby critical for innovative therapeutic development to fight tumor-induced immunosuppression.

Experiments in mice using T_{reg} from $CCR4^{-/-}$ or conditional $CCR4$ knockout in $FOXP3^{+}$ T_{reg} compartment have recently identified the critical role of $CCR4$ in T_{reg} trafficking in secondary lymphoid organs or tissues (14, 15). Curiel and colleagues strongly suggested a role for $CCR4/CCL22$ axis in T_{reg} recruitment in ovarian ascitis (4).

We recently showed the selective loss of membrane $CCR4$ on tumor-associated T_{reg} (TA- T_{reg}) consecutive to an active recruitment through a CC chemokine ($CCL22$), and that breast tumors lacking $CCL22$ are not colonized by T_{reg} independently of their $CCL17$ expression status (13), strongly suggesting the importance of $CCL22$ in TA- T_{reg} recruitment within breast tumors.

$CCL22$, produced by myeloid DCs (mDC), B cells, macrophages, keratinocytes, or epithelial cells (6, 16, 17) and $CCL17$ closely related to $CCL22$, produced by monocyte-derived DC (18) and keratinocytes (19), are 2 ligands for $CCR4$ (6, 20) preferentially expressed on Th2 lymphocytes (21) and T_{reg} (for review, see ref. 12). In peripheral blood mononuclear cells (PBMC), $CCL22$ is upregulated by interleukin (IL)-4, whereas it is downregulated by IFN- γ treatment (22). In contrast, IFN- γ favored $CCL22$ secretion by keratinocytes (16, 23) and intestinal epithelial cells (24).

In this study, we showed that breast tumor cell recognition by NK cells leads to their activation and IFN- γ secretion, which in turn triggers $CCL22$ production by tumor cells through cooperation with monocyte-derived IL-1 β and TNF- α .

Materials and Methods

Breast tumor cell lines culture

All tumor cell lines used in this study originated from American Type Culture Collection except CLB-SAV generated in the laboratory. Cell lines were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) completed with 10% FBS (Lonza), 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen; complete medium) at 37°C in a 5% CO_2 incubator.

Primary breast tumors

Breast tumor tissues collected at the Centre Léon Bérard after patient informed consent were mechanically dilacerated to obtain "mechanic tumor disaggregation supernatants" and then subjected to enzymatic digestion as previously described (13).

Flow cytometry analyses (ADP Cyan; Beckman Coulter) were conducted to assess the percentage of NK cells ($CD3^{-}NKp46^{+}$) and macrophages ($CD4^{+}CD68^{+}CD163^{+}$; all from Becton Dickinson except for $CD163$ from eBiosciences and $CD68$ from Dako Cytomation) within primary tumor cell suspension after gating on $CD45^{+}$ cells, and data were analyzed with FlowJo Analysis Software (Tree Star).

Immune cells ($CD45^{+}$) or NK cells ($CD3^{-}CD56^{+}$) and macrophages ($CD4^{low}CD163^{+}$) were purified on single-cell

suspension from breast primary tumor or ascitis, respectively, by cell sorting (FACS Aria; Becton Dickinson).

Breast tumor supernatants

Single-cell suspensions from primary or metastatic (ascitis, pleural effusion) breast tumors were incubated at a final concentration of 15×10^6 cells/mL in complete medium in petri dishes. Cultured tumor cell supernatants were collected after 48 hours, filtrated on 0.22 μ m, and frozen.

Immunohistochemistry

Expression of $CCL22$ on paraffin-embedded sections of breast tumor or peritumoral tissue was analyzed with a goat anti- $CCL22$ antibody (Ab; Santa Cruz) as previously described (13). Routinely used $CD163$ (mIgG1; Menarini Diagnostics) staining was carried out according to the manufacturer. $NKp46^{+}$ was detected as previously described (25) cells with a goat immunoglobulin G Ab (R&D Systems). Hematoxylin-counterstained sections were dehydrated and mounted. For negative control slides, primary antibodies were replaced by a nonimmune serum.

Cytokines and antibodies

Recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF; specific activity: 2×10^6 U/mg, used at 100 ng/mL) and rhIL-4 (specific activity: 10^6 U/mg, used at 50 ng/mL) were from Schering Plough Research Institute. rhTNF- α (specific activity: 5×10^6 U/mg) at 10 ng/mL was provided by Cetus Corporation. rhIL-1 β (10^9 IU/mg), rhIFN- γ (2×10^7 IU/mg), and IL-1RA were from Peprotech. rh $CCL22$, rh $CCL17$, rhCXCL12, and monoclonal Ab (mAb) against CXCL12 and $CCL22$ as well as isotype controls used for neutralization experiments were from R&D Systems.

Purification of cell subsets from peripheral blood

Total PBMCs were isolated from heparinized blood obtained from healthy volunteers by Ficoll Hypaque density gradient centrifugation (Dominique Dutscher). Purified mDCs and monocyte fractions were obtained using positive selection kits, whereas untouched NK cells were purified using negative selection kit (Miltenyi Biotec) and purity was confirmed by flow cytometry. For depletion experiments, different cell subsets [myeloid cells, (mDC), plasmacytoid DCs (pDC), monocytes, NK cells, and T cells] were specifically depleted from PBMCs using positive selection kits with magnetic beads. The absence of remaining positive cells in the depleted fraction was confirmed by flow cytometry.

Culture conditions

Tumor cell lines were cultured at 2×10^5 cells/mL in complete medium in 48-well plates (Becton Dickinson) and incubated for 24 or 48 hours in medium condition or in the presence of rhIFN- γ (0.1–100 ng/mL depending on the studies). Coculture experiments were carried out by incubating 10^5 tumor cells with 10^6 PBMC for 24 or 48 hours in the presence of 100 ng/mL rhGM-CSF with or without rhIFN- γ . To characterize the cell subset responsible for $CCL22$ secretion, PBMC

cell supernatants (PBMC-SN) and tumor cell supernatants (TUM-SN) were generated by 24-hour incubation of either 10^6 PBMC or 10^5 tumor cells in 48-well plates (500 μ L).

Cytokine detection

CCL22, CCL17 and IL-1 β , and TNF- α levels were quantified in cell supernatants using ELISA from R&D Systems and Bender MedSystems, respectively.

Migration in response to CCL22

CCR4 expression on the CCRF-CEM cell line was confirmed by flow cytometry (Supplementary Fig. S1). Migration assays were conducted using Transwell (6.5-mm diameter; CoStar) with 5×10^5 cells/well. After 2 hours of preincubation at 37°C, CCRF-CEM cells were placed in 3- μ m pore size inserts (100 μ L) and tested for their ability to migrate in response to rhCCL22 (1–50 ng/mL) or culture supernatants (50%) added in the lower well. After 1 hour and 30 minutes of incubation at 37°C, cells were collected in cold PBS-EDTA and resuspended after centrifugation in 100 μ L. The number of migrated cells was analyzed by flow cytometry. In blockade experiments, anti-CXCL12 or -CCL22 mAb or their isotype controls were

incubated for 30 minutes with culture supernatants before CCRF-CEM cells were added in the insert.

Results

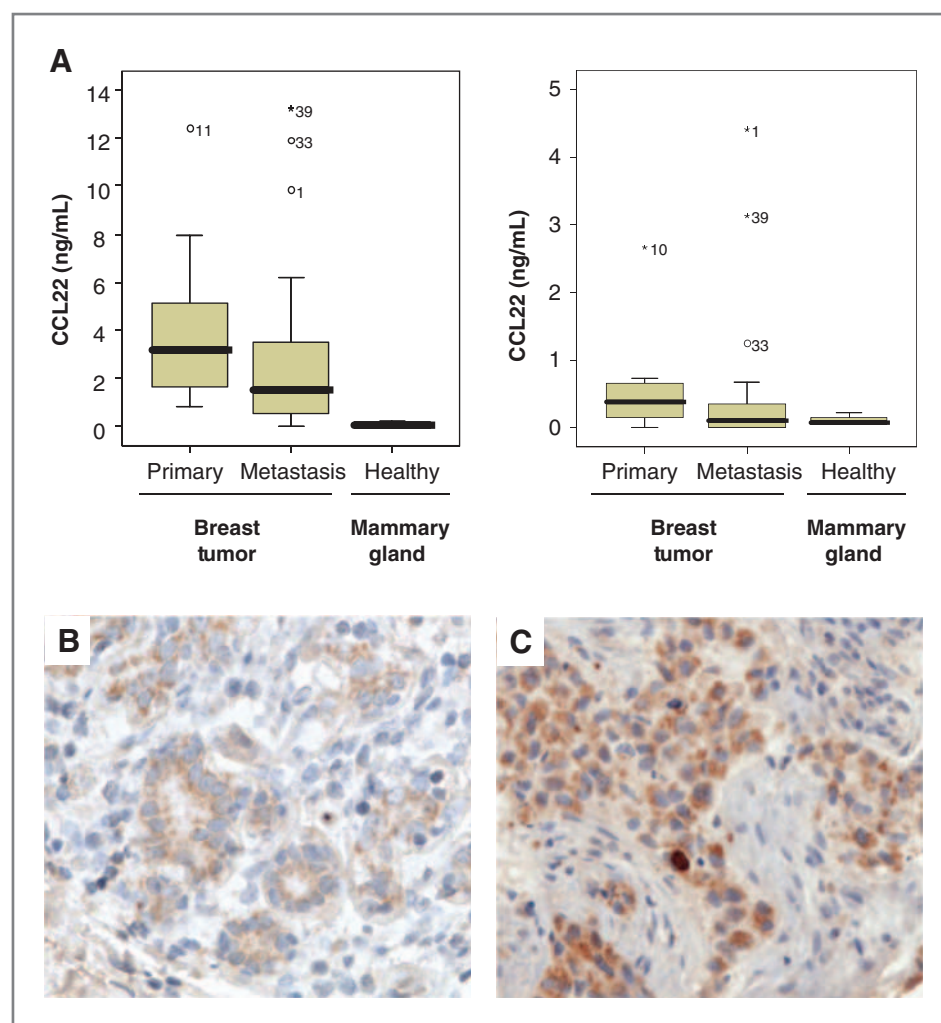
High levels of CCL22 but not CCL17 are detectable in primary breast tumors

Analyses of breast TUM-SN showed the production of high levels of CCL22 in TUM-SN from primary tumors (Fig. 1A) that decreased in metastatic ones. CCL22 was also detectable in supernatants of mechanical tumor disaggregation from 27 primary tumors (mean = 1.02 ng/mL; range, 0.13–6.9 ng/mL). Low levels of CCL17 were detected in these TUM-SN. Moreover, supernatant from nontumor tissues (healthy breast tissue and fibro-adenoma) did not produce significant levels of CCL22 or CCL17.

We have previously shown that expression of CCL22, but not that of CCL17 by tumor cells in breast tumors, correlates with TA- T_{reg} infiltration (13).

In contrast to primary breast tumors where a strong CCL22 expression was observed by immunohistochemistry (IHC);

Figure 1. CCL22 and CCL17 are differently produced within primary breast tumors and breast TUM-SN. A, quantification of CCL22 and CCL17 levels within healthy or tumor breast tissue supernatants by ELISA; primary breast tumors (C) as well as peritumoral area (B) frozen sections were stained with CCL22 Ab in green ($\times 10$).



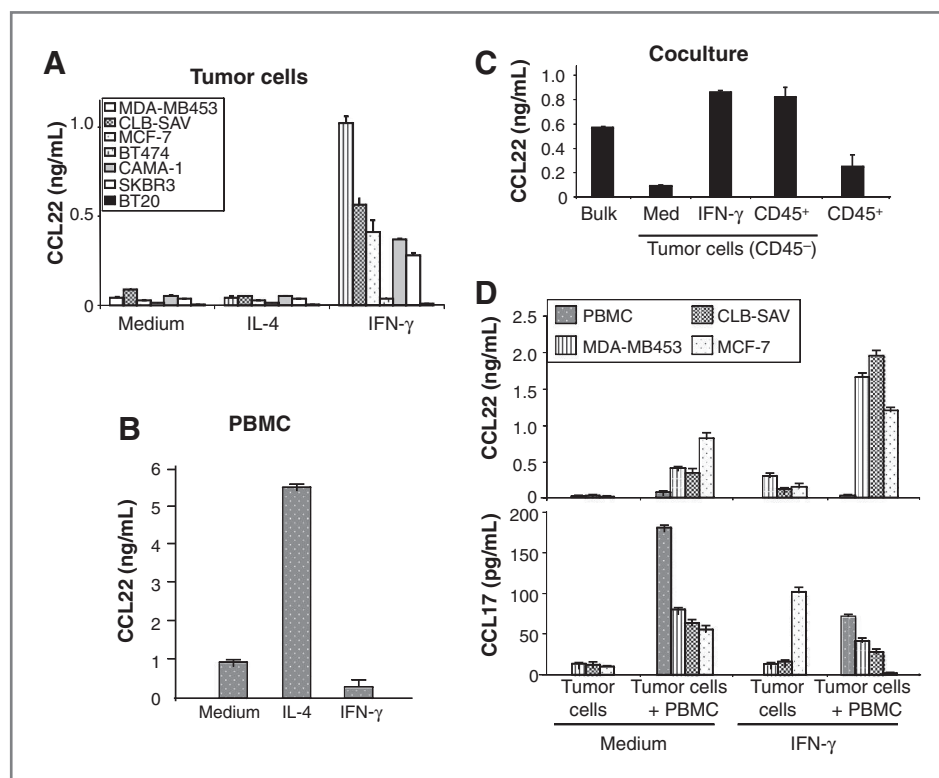


Figure 2. CCL22 secretion by breast epithelial cell lines after activation. Breast epithelial cell lines (10^5) as shown in A or healthy PBMCs (10^6) as shown in B secreted CCL22 after 24-hour culture in response to rhIL-4 (50 ng/mL) or rhIFN- γ (100 ng/mL). C, quantification of CCL22 secreted by primary tumor disaggregation ($8 \times 10^4/200 \mu\text{L}$) and cell-sorted tumor cells (CD45 $^-$; $8 \times 10^4/200 \mu\text{L}$) with either recombinant cytokines (IFN- γ) or CD45 $^+$ immune cells ($3 \times 10^4/200 \mu\text{L}$). D, analysis of CCL22 and CCL17 production, by breast epithelial cell lines alone or in coculture with PBMCs with or without rhIFN- γ (100 ng/mL).

Fig. 1C; ref. 13), CCL22 displayed a weak apical expression in peritumoral area by luminal breast epithelial cells within lobular acini (Fig. 1B).

Breast tumor cell lines produce functional CCL22 in response to Th1/innate immunity but not Th2 signals

Contrasting with primary tumors, spontaneous CCL22 secretion by breast tumor cell lines *in vitro* was low to undetectable (Fig. 2A), suggesting mechanisms of regulation and a role of the microenvironment in CCL22 expression by tumor cells. Indeed, addition of rhIFN- γ , a CCL22 inducer on keratinocytes (16, 23) and intestinal epithelial cells (24), induced strong CCL22 secretion on 5 of 7 tested cell lines (0.28–1.1 ng/mL for IFN- γ ; Fig. 2A). In contrast, in PBMCs, CCL22 production was downregulated by rhIFN- γ but upregulated by rhIL-4 (Fig. 2B).

When bulk primary breast tumor disaggregation was used, the secretion of CCL22 was lost upon depletion of CD45 $^+$ immune cells. This CCL22 production by CD45-negative primary tumor was restored (9-fold increase) either by addition of associated CD45 $^+$ infiltrate (3×10^4 CD45 $^+$ for 8×10^4 tumor cells) or rhIFN- γ (Fig. 2C), strongly suggesting the cooperation between tumor cells and immune cells for specific CCL22 secretion.

This observation was confirmed using breast tumor cell lines. The addition of allogeneic PBMCs to breast tumor cell lines strongly enhanced the production of CCL22 but not of CCL17. We observed a 12.8-, 18-, and 121-fold increase for CLB-SAV, MDA-MB453, and MCF-7 cell lines, respectively, in coculture condition when compared with tumor cells alone.

This secretion was further enhanced by rhIFN- γ addition (17- and 5.5-fold increase in CCL22 production for CLB-SAV and MDA-MB453 or MCF-7, respectively; Fig. 2D).

To test the functionality of the CCL22 secreted in PBMC/tumor cell coculture supernatants, we used the CCRF-CEM T-cell line that expresses CCR4 and migrates in response to rhCCL22 in a dose-dependent manner (Supplementary Fig. S1A and B). The coculture supernatant favored the CCRF-CEM cell migration in a Transwell Assay (5-fold increase over background level) that was specifically blocked by preincubation of these supernatants with an anti-CCL22 neutralizing mAb but not with an anti-CXCL12 able to attract CXCR4 $^+$ CCRF-CEM (Supplementary Fig. S1C).

Soluble factors produced by activated PBMCs induce CCL22 secretion by tumor cells

Whereas PBMCs alone are devoid of IFN- γ secretion (Supplementary Fig. S3, bottom), coculture with tumor cells increased this production favoring CCL22. Furthermore, as previously mentioned, addition of rhIFN- γ strongly enhanced CCL22 production in PBMC/tumor cell coculture while decreasing that of PBMCs (Fig. 2D). We therefore wished to decipher the relative role of PBMCs and tumor cells in CCL22 secretion in the PBMC/tumor cell coculture in the presence of rhIFN- γ . We compared the impact of rhIFN- γ -activated PBMC-SN on CCL22 production by tumor cell lines with that of rhIFN- γ -activated TUM-SN on PBMCs. As shown in Fig. 3, CCL22 levels secreted by rhIFN- γ -treated tumor cells were strongly enhanced in the presence of rhIFN- γ -PBMC-SN (2.75-, 19.36-, and 16.46-fold, respectively, for MDA-MB453, MCF-7,

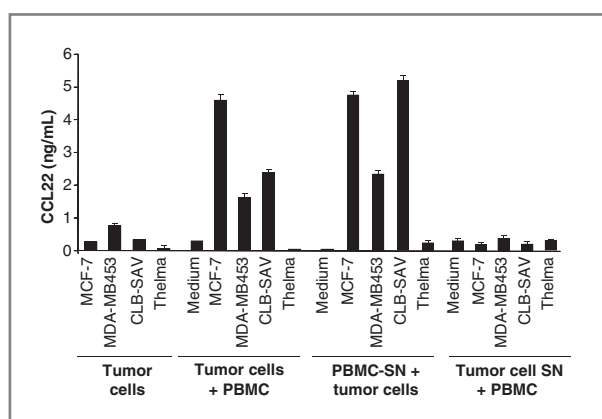


Figure 3. Soluble factors secreted by PBMCs favor the production of CCL22 by breast tumor cells. A 48-hour culture period of 10^5 breast tumor cells [with rhIFN- γ (100 ng/mL)] alone or in coculture with PBMCs (10^6) or 24-hour PBMC-SN obtained in rhIFN- γ (100 ng/mL) medium induced the secretion of CCL22, whereas culture of PBMCs with 24-hour breast TUM-SN did not induce CCL22 secretion.

and CLB-SAV, respectively). In contrast, rhIFN- γ -TUM-SN addition did not affect the low CCL22 levels detected in rhIFN- γ -treated PBMC cultures. Together, those data strongly suggest that rhIFN- γ -treated PBMCs produce soluble factors capable of inducing CCL22 production by tumor cells.

Interestingly, the effects observed were specific for CCL22 as CXCL8 that was produced by rhIFN- γ -activated PBMCs was downregulated in the presence of tumor cells and not induced when tumor cells were cultured with PBMC-SN (data not shown).

Monocytes and IFN- γ are both required for the secretion of CCL22 by tumor cells

To determine the major cell fraction within PBMC responsible for the effects observed on tumor cells, specific depletions of myeloid cells (CD33 $^+$), monocytes (CD14 $^+$), mDC (BDCA1 $^+$ BDCA3 $^+$), pDC (BDCA2 $^+$), NK cells (CD56 $^+$), or T cells (CD3 $^+$) were carried out using magnetic beads. Each depleted fraction was added on tumor cell lines in the presence of rhIFN- γ to assess the CCL22 production. As shown in Fig. 4A, whereas addition of PBMCs induced a strong CCL22 production (2.95 ± 0.1 ng/mL), we observed a drop in this secretion when monocyte (CD14 $^-$) or myeloid cell (CD33 $^-$)-depleted fractions were used (86% and 75% inhibition, respectively). In contrast, the depletion of NK cells or T cells did not decrease the CCL22 secretion. The increase observed with T-cell depletion likely results from increased monocyte percentage in the culture. The depletion of mDCs reduced the basal level of CCL22 produced by PBMCs alone as shown in Supplementary Fig. S2 (26) but did not affect the CCL22 production by tumor cells. These results suggest that monocytes are the main actors in CCL22 production by tumor cells within the coculture.

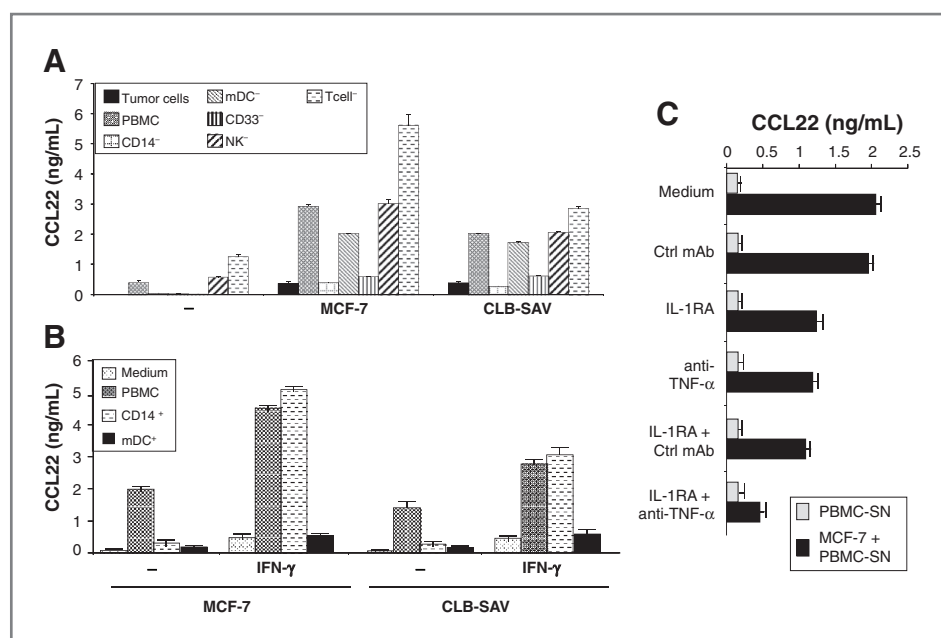


Figure 4. Within PBMCs, monocytes are essential to favor CCL22 production by breast tumor cells but required the presence of rhIFN- γ , and CCL22 production in culture of tumor cells with PBMC-SN is dependent on IL-1 β and TNF- α . A, 10^5 tumor cells (MCF-7 and CLB-SAV) were cultured in the presence of rhIFN- γ for 48 hours with medium or 10^6 PBMCs or fractions depleted in myeloid cells (CD33 $^-$; 10^6), in CD14 (CD14 $^-$; 9×10^5), in mDC (mDC $^-$; 10^6), in NK cells (NK $^-$; 9×10^5), or in T cells (Tcells $^-$; 5×10^5) for analysis of CCL22 production. B, CCL22 production after culture of 10^5 breast tumor cells (CLB-SAV and MCF-7) with purified monocytes (CD14 $^+$; 10^5) or mDC (mDC $^+$; 10^5) for 48 hours in medium or in the presence of rhIFN- γ (100 ng/mL). C, 24-hour rhIFN- γ preactivated MCF-7 tumor cells were incubated for 2 hours with IL-1RA or not. In parallel, SN of a 24-hour PBMC culture in the presence of 100 ng/mL rhIFN- γ (PBMC-SN) was preincubated with 10 μ g/mL control (Ctrl) mAb or anti-TNF- α mAb and then added on tumor cells for 24 hours. CCL22 production was quantified at the end of the culture.

To confirm their role, purified monocytes were added to tumor cells in the presence or not in the presence of rhIFN- γ (Fig. 4B). Whereas purified monocytes were not able to mimic PBMC action on tumor cells, further addition of rhIFN- γ -induced CCL22 levels comparable with those obtained with PBMC. This effect was specific to monocytes as mDC, even in presence of IFN- γ , did not reconstitute PBMC effect. Of most importance, these results suggest that monocytes act in cooperation with other cell subsets (i.e., NK cells, NKT cells, or T cells) capable of IFN- γ secretion to increase CCL22 secretion by tumor cells.

Involvement of rhIL-1 β and TNF- α in inducing CCL22 secretion by tumor cells

As shown above (Fig. 4A), depletion of monocytes strongly reduced the ability of tumor cells to produce CCL22 in coculture. Monocytes are strong producers of IL-1 β and TNF- α , previously described to cooperate with IFN- γ in CCL22 production on epithelial cells or keratinocytes (24, 27, 28). As shown in Supplementary Fig. S3, whereas PBMC produced low IL-1 β and TNF- α levels (6.5 ± 0.2 and 99 ± 1 pg/mL, respectively), the addition of rhIFN- γ increased their secretion (IL-1 β , 133 ± 12 pg/mL; and TNF- α , 879 ± 53 pg/mL). These 2 cytokines are also detected in tumor cell line/PBMC coculture in the presence of rhIFN- γ . Moreover, the loss of CCL22 production in monocyte-depleted fraction was associated with the absence of IL-1 β and TNF- α secretion in the coculture (data not shown).

Whereas CCL22 production by MDA-MB453 cells was mostly dependent on IFN- γ (Supplementary Fig. S4A and C), the culture of MCF-7 (Supplementary Fig. S4B and D) or CLB-SAV (data not shown) with a cross range of recombinant cytokines showed an important impact of low doses of IL-1 β (100 pg/mL) or TNF- α (10 ng/mL) on CCL22 production with an additive effect of IFN- γ (Supplementary Fig. S4B and D).

To confirm a role for these 2 cytokines within rhIFN- γ -PBMC-SN, in CCL22 secretion by tumor cells, we tested the impact of IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) or an anti-TNF- α blocking Ab, previously validated (Supplementary Fig. S5A), on tumor cell line cultures. As shown in Fig. 4C, treatment with either IL-1RA or anti-TNF- α mAb was able to block 40% of CCL22 secretion induced by rhIFN- γ -PBMC-SN. The simultaneous blockade of IL-1 β and TNF- α decreased CCL22 secretion up to 80%, showing the role of IL-1 β and TNF- α contained in rhIFN- γ -PBMC-SN on CCL22 secretion by tumor cells.

NK cells and monocytes cooperate to induce CCL22 production by tumor cells

To better understand the mechanisms involved in IFN- γ secretion within PBMC/tumor cell coculture (Supplementary Fig. S3) that act in synergy with IL-1 β and TNF- α , we hypothesized that NK cells could be activated and secrete IFN- γ after interaction with tumor cells.

To mimic NK activation, NK cells were pretreated with IL-2 for 16 hours. We tested their impact on CCL22 production by tumor cells in the presence of purified monocytes or mDC-depleted PBMC fraction. Whereas activated NK cells, mDC-

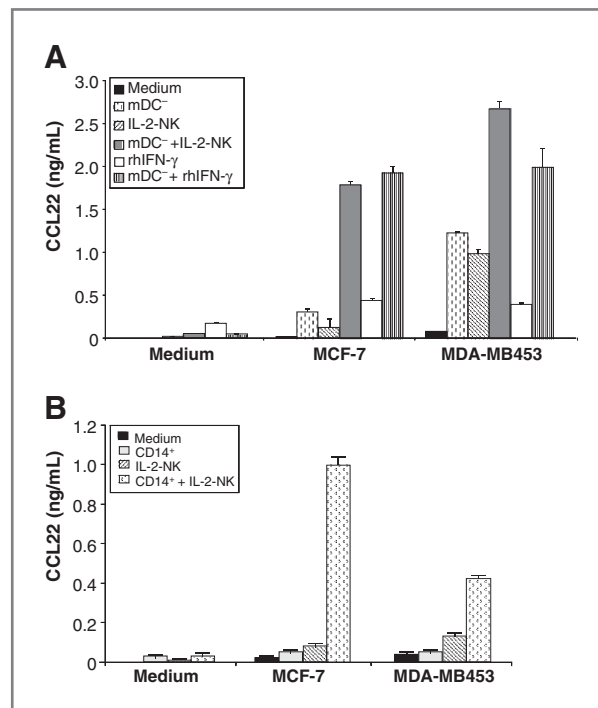


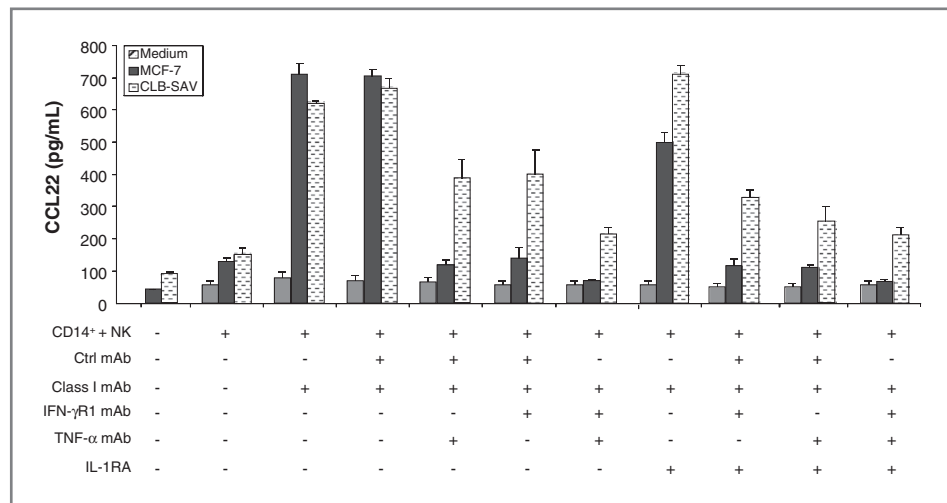
Figure 5. Cooperation of monocytes and activated NK cells to promote CCL22 secretion by tumor cells. A, mDC-depleted fraction (mDC^- ; 10^6), IL-2-activated NK cells (IL-2-NK; 10^5), or their combination were added on 24-hour medium-pretreated breast tumor cells (MCF-7, MDA-MB453; 10^5), and CCL22 secretion was analyzed after a 48-hour culture period. The control was carried out by addition of mDC-depleted fraction (10^6) on rhIFN- γ -pretreated tumor cells. B, purified monocytes ($CD14^+$; 10^5), IL-2-activated NK cells (IL-2-NK; 10^5), or their combination were added on 24-hour medium pretreated breast tumor cells (MCF-7, MDA-MB453; 10^5), and CCL22 secretion was analyzed after 48 hours of culture.

depleted fraction, or purified monocytes each alone (Fig. 5A and B) did not trigger CCL22 production by tumor cells, a combination of activated NK cells with either mDC-depleted fraction (Fig. 5A) or purified monocytes (Fig. 5B) induced CCL22 levels comparable with those obtained in the presence of PBMCs or exogenous rhIFN- γ (Fig. 5A). This suggests that IFN- γ released by activated NK cells cooperates with monocytes to promote CCL22 release by tumor cells.

Interaction of K562 tumor cell line with NK cells also favors their activation (29). The addition of K562 (1:1 K562:NK ratio) to resting NK cells in the presence of purified monocytes and tumor cells increased CCL22 secretion by tumor cells that was dependent on IFN- γ as anti-IFN- γ R1 blocking mAb reversed this effect (Supplementary Fig. S6).

Because tumor cell lines upregulate MHC class I in response to IFN- γ or TNF- α (Supplementary Fig. S7), we neutralized MHC class I expression on tumor cells as an alternative approach to revert blockade of NK activation through MHC class I/killer inhibitory receptor (KIR) interactions. The preincubation of tumor cells with blocking anti-MHC class I mAb (W6/32) before the addition of resting NK cells and monocytes significantly increased the CCL22 production. This increase was strictly dependent on the presence of NK cells and

Figure 6. Blockade of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ reverse tumor cell CCL22 secretion induced after culture with purified monocytes and NK cells in the presence of anti-MHC class I blocking Ab. Twenty-four hour medium-cultured breast tumor cells (MCF-7 and MDA-MB453; 10^5) were treated with anti-class I mAb, Ctrl mAb, anti-IFN- γ mAb (10 μ g/mL), IL-1RA (100 ng/mL), and their combination for 2 hours before the addition of purified monocytes (10 5) and NK cells (5×10^5) with or without anti-TNF- α mAb (10 μ g/mL). CCL22 secretion was analyzed after a 48-hour culture period.



monocytes (Fig. 6). In these experimental conditions, addition of IL-1RA, anti-IFN- γ R1, and anti-TNF- α mAb used alone have all shown a moderate to strong effect depending on the cell line, but when combined they completely blocked anti-MHC class I impact, showing the involvement of IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β (Fig. 6).

NK cells and macrophages colocalize with tumor cells *in situ*

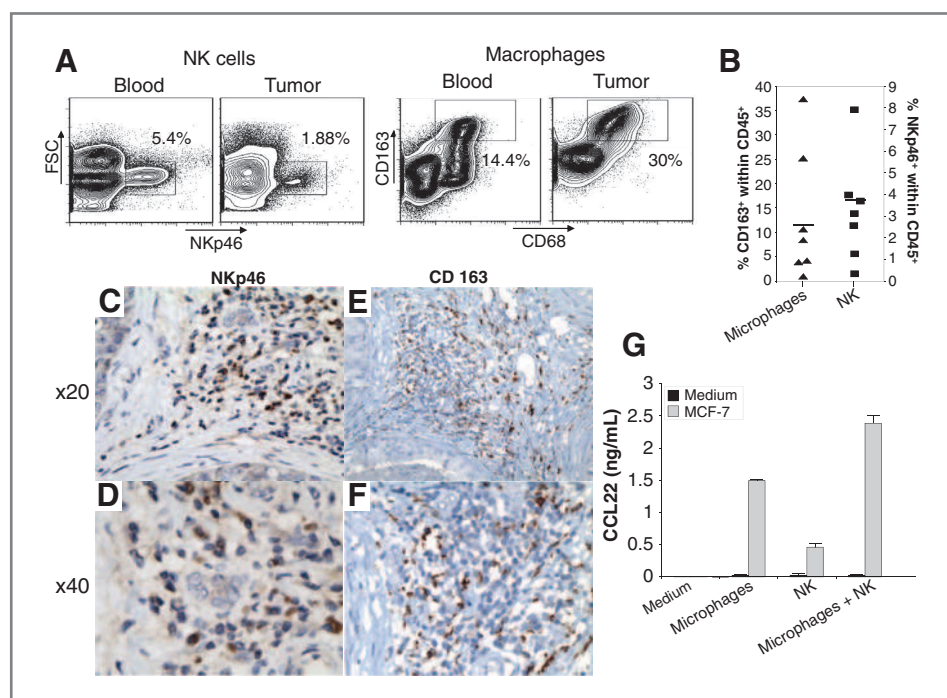
As showed in Fig. 7A and B, NK cells (CD3 $^+$ NKp46 $^+$) as well as macrophages (CD163 $^+$ CD68 $^+$) were detected within the primary tumor cell suspensions by flow cytometry [mean = 3.72% (0.15%–8.2%) for NKp46 $^+$ and mean = 11.7% (0.58%–37.1%) for CD163 $^+$]. As shown by IHC on paraffin-embedded

tumor sections, NK cells (NKp46 $^+$; Fig. 7C and D) as well as macrophages (CD163 $^+$; Fig. 7E and F) are localized in the vicinity of tumor cells. Moreover, purified *in situ* activated ascite-derived macrophages are able to cooperate with NK cells to favor a strong CCL22 production by breast tumor cell line (Fig. 7G). Together, these data suggest the potential recognition of tumor cells by NK cells favoring in combination with macrophages, the initiation of CCL22 secretion by these tumor cells.

Discussion

In this study, we showed that recognition of transformed mammary epithelial cells favors NK cell activation and

Figure 7. NK cells and macrophages are detectable within breast tumors and are functional. A, NK cell (CD3 $^+$ NKp46 $^+$) and macrophage (CD68 $^+$ CD163 $^+$) detection after gating on CD45 $^+$ cells within primary breast tumor enzymatic disaggregation or in associated peripheral blood. B, summary data of NK and macrophage percentages in 7 tumor dilacerations by flow cytometry (C–F) localization of NK (NKp46; C and D) and macrophages (CD163; E and F) by IHC on paraffin-embedded primary breast tumor tissue sections [magnification: $\times 20$ (C and E) or $\times 40$ (D and F)]. G, CCL22 production after culture of 10^5 breast tumor cells (MCF-7) with breast ascite purified macrophages (10^5) and NK cells (5×10^5) or their combination for 48 hours.



subsequent IFN- γ secretion associated with the release of monocyte-derived IL-1 β and TNF- α that triggers CCL22 production by tumor cells. This tumor cell-associated CCL22 secretion favors blood CCR4⁺ T_{reg} recruitment leading to the development of a tolerogenic environment conducive to the tumor immunosubversion and development.

We previously reported a strong correlation between CCL22 expression by tumor cells and the presence of T_{reg} within breast tumor environment. Breast tumors lacking CCL22 are not colonized by T_{reg} independently of their CCL17 expression status (13). Moreover, T_{reg} recruitment in tumor environment induces a loss of CCR4 expression, a phenomenon observed when T_{reg} are cultured *in vitro* with CCL22 but not with CCL17 (30). Similar observations were made for CCR7 expression that was downregulated on T cells after interaction with CCL19 but not with CCL21 (31, 32). In agreement with our observation, CCR4 and CCL22 requirement for T_{reg} recruitment was also reported in the mouse model of inflammatory bowel disease, in which the inability of CCR4^{-/-} T_{reg} to migrate within the colon tissue leads to disease exacerbation (15).

Our IHC analyses show, in peritumoral breast tissue samples, polarized apical CCL22 secretion by healthy luminal epithelial cells within lobular acini as described for other chemokines (CXCL8, GRO β , GRO γ , GRO α , ENA78, MIG, IP10, and RANTES) detected in the milk or the colostrum (33, 34). Moreover, nonhematopoietic cells such as keratinocytes and epithelial cells can secrete CCL22 (16, 24, 35). Polarized CCL22 secretion toward the lumen has also been described in colon epithelium (24). Moreover, the cyclic hormonal modulation may also affect T_{reg} recruitment within the mammary gland via CCL22 secretion by epithelial cells. Indeed, treatment of women with progesterone favors in the endometrium a high CCL22 production by stromal cells and glandular epithelial cells at the end of the hormonal cycle (35). Taken together, these results suggest that CCL22 secretion within the breast tissue may be part of the mammary gland physiology controlling the local inflammation associated with tissue remodeling either at the end of the menstrual cycle or during breastfeeding.

In accordance with structural disorganization characteristic of primary breast tumor tissue, we observed that CCL22 secretion is no more polarized favoring its diffusion within the tumor environment that may favor recruitment of macrophages, NK cells, Th2 cells (6), and T_{reg} (for review, see ref. 12) expressing CCR4. Moreover CCL22 production is strongly enhanced when compared with healthy tissue. This is consistent with the levels of CCL22 found either in primary breast tumor mechanical disaggregation SNs (median = 1.16 ng/mL; range, 0.23–8.8 ng/mL) or in 48-hour culture primary breast TUM-SN with more than 40-fold increase in CCL22 levels (median = 2.91 ng/mL; range, 0.53–12.4 ng/mL) in comparison with nontumor SN (median = 0.07 ng/mL; range, 0.03–0.23 ng/mL; $P = 0.004$). It is also important to notice that CCL22 content is 10-fold higher than that of CCL17 (median = 0.3 ng/mL; range, 0–4.4 ng/mL). Importantly, we show using either primary breast tumor or tumor cell lines the cooperation between tumor cells and immune infiltrate to induce

high quantities of CCL22, whereas CCL17 secretion remains barely detectable. Interestingly, although healthy bronchial epithelial cells secrete CCL17 (36), their tumor counterpart in lung carcinoma pleural effusion produces CCL22 (37). Taken together, these results suggest the capacity of the tumor environment to modulate the chemokine arsenal of epithelial cells to favor the migration of specific cell subsets. CCL17, via the recruitment of Th2 CCR4⁺ cells, will favor a Th2 response as described in atopic dermatitis (38), whereas CCL22 is more specialized in the recruitment of T_{reg} as observed in tumors (for review, see ref. 12).

IL-4 and IL-13, critically involved in the development of cutaneous pathologies like atopic dermatitis, have been largely shown to induce CCL22 secretion by cells of myeloid origin (monocytes and mDCs; refs. 22, 39) and to favor CCL17 production by fibroblasts (40). In contrast, we showed in this study that IL-4 reduces the CCL22 production in breast tumor epithelial cell lines as previously described for immortalized keratinocytes (16, 23), colon epithelial cells (24), and glioma cell lines (41).

In this study, we deciphered the mechanisms involved in the increased secretion of CCL22 within the tumor environment. We showed the existence of a dialogue between tumor cells and circulating immune cells leading to CCL22 production by tumor cells and to T_{reg} recruitment. We reported that breast tumor cell lines produced CCL22 in response to rhIFN- γ , as previously described for keratinocytes (16, 23). This secretion is strongly enhanced in coculture with PBMCs but is lost after myeloid cell (CD33⁺) or monocyte (CD14⁺) depletion showing the major role of monocytes in this CCL22 secretion although they do not secrete CCL22 by themselves.

NK cells constitute a unique component of the innate immune system able, without specific sensitization, to recognize autologous cells undergoing various form of stress, such as malignant transformation (42). Target recognition occurs via the integration of negative and positive signals mediated by inhibitory (KIR) or activating (KAR) receptors expressed at the surface of NK cells. Breast tumor cells expressing ULBP or MICA/MICB markers that bind NKG2D on NK cells will stimulate their IFN- γ secretion (Supplementary Fig. S5; refs. 43, 44). However, expression of MHC class I (Supplementary Fig. S7), a KIR ligand, by breast tumor cells reduced this IFN- γ secretion. In coculture of breast tumor cell lines with purified monocytes, rhIFN- γ could be omitted upon addition of NK cells in conditions leading to their activation, that is, in the presence of IL-2, K562 NK target cell line, or anti-MHC class I Ab. All these culture conditions lead to IFN- γ secretion required for CCL22 production as shown by the use of blocking anti-IFN- γ R Ab.

In this cell line, MICA (NKG2D-L) expression in breast tumors has been associated with a poor prognosis (43). This could result either from the production of soluble MICA that blocks the killing function of NK cells or the impact of IFN- γ secretion by NK cells on T_{reg} recruitment through CCL22 secretion by tumor cells. In the Lewis Lung carcinoma mouse model, depletion of NK cells blocked CCL22 production in the tumor environment; however, NK cells were proposed as the major source of CCL22 (45). In contrast, we never detected, in

our experimental set-up, CCL22 secretion by resting as well as activated NK cells.

The replacement of purified monocytes/macrophages by the combination of rhIL-1 β and rhTNF- α in the culture of breast tumor cells with rhIFN- γ or NK cells strongly enhanced the CCL22 production. This observation is in agreement with previous publications on keratinocytes and colon epithelial cell lines (16, 24), whereas blockade of IL-1 β and TNF- α abrogate this secretion in [PBMC/tumor cell] coculture. Interestingly, IFN- γ increased IL-1R1 and TNF receptor on tumor cell lines (data not shown), as previously described (46), suggesting a potential amplification loop of CCL22 production. Taken together, these results suggest the importance of inflammation in the high CCL22 levels in the breast tumor environment that will favor T_{reg} recruitment leading to reduced specific antitumor immune response. This is in agreement with studies in colon tissue reporting the involvement of intestinal flora-mediated chronic inflammation in the increased recruitment of T_{reg} (for review, see ref. 47). This suggests that inflammation in the mammary gland may participate in the tumor development. In favor of this, TNF- α secretion by leukocytes infiltrating tumors strongly contributes to mammary carcinogenesis in murine mammary models (48). Importantly, the *in situ* analyses on primary breast tumors allow us to show the presence of NK cells and macrophages in the vicinity of tumor cells.

T_{reg} have been described to reduce NK cell cytotoxicity (for review, see ref. 49) suggesting that CCL22 production by tumor

cells inducing T_{reg} recruitment represents one of the mechanisms elaborated by tumors to avoid its destruction through NK cell cytotoxicity.

Taken together, our results allow us to propose a model in which mammary epithelial cell transformation processes favored activation of NK cells present in the breast tissue by reducing KIR and inducing KAR ligand expression and their subsequent IFN- γ secretion, leading to the production of TNF- α and IL-1 β by resident monocytes/macrophages. Acting together, these 3 cytokines will favor CCL22 overproduction by tumor cells, allowing the recruitment of CCR4⁺ blood T_{reg} that favor the development of a tolerogenic environment.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Grant Support

J. Faget and M. Gobert are grant holders of the Ligue Nationale contre le Cancer. This work was financially supported in part by grants from "le comité départemental du Rhône de Ligue Contre le Cancer," the ARC Association (ARC-5074), the Breast Cancer Research Foundation and Institut National du Cancer grant INCA ACI-63-04, ACI 2007-2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received February 21, 2011; revised July 1, 2011; accepted July 25, 2011; published OnlineFirst August 18, 2011.

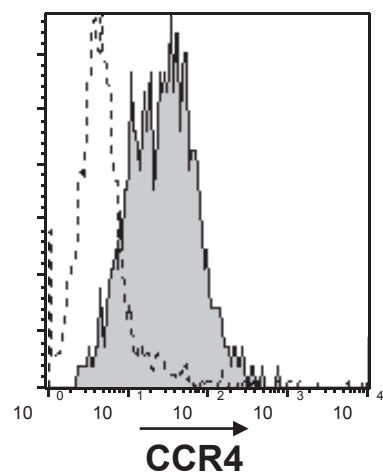
References

- Thomachot MC, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Biota C, Treilleux I, Goddard S, et al. Breast carcinoma cells promote the differentiation of CD34⁺ progenitors towards 2 different subpopulations of dendritic cells with CD1a(high)CD86(-)Langerin- and CD1a(+)/CD86(+) Langerin+ phenotypes. *Int J Cancer* 2004;110:710-20.
- Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:7466-74.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-4.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942-9.
- Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007;25:2586-93.
- Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, et al. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 1997;185:1595-604.
- Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. Localisation pattern of Foxp3⁺ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer* 2008;98:148-53.
- Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay NH, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4⁺ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2006;12:465-72.
- Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dimhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3⁺ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008;93:193-200.
- Fox SB, Launchbury R, Bates GJ, Han C, Shaïda N, Malone PR, et al. The number of regulatory T cells in prostate cancer is associated with the androgen receptor and hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α but not HIF-1 α . *Prostate* 2006;67:623-9.
- Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G. Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:3355-60.
- Menetrier-Caux C, Gobert M, Caux C. Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res* 2009;69:7895-8.
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000-9.
- Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowicz M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* 2007;204:1335-47.
- Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, Bhan AK, et al. CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 2007;204:1327-34.
- Fujii-Maeda S, Kajiwara K, Ikizawa K, Shinazawa M, Yu B, Koga T, et al. Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J Invest Dermatol* 2004;122:20-8.
- Hino R, Kobayashi M, Mori T, Orimo H, Shimauchi T, Kabashima K, et al. Inhibition of T helper 2 chemokine production by narrowband

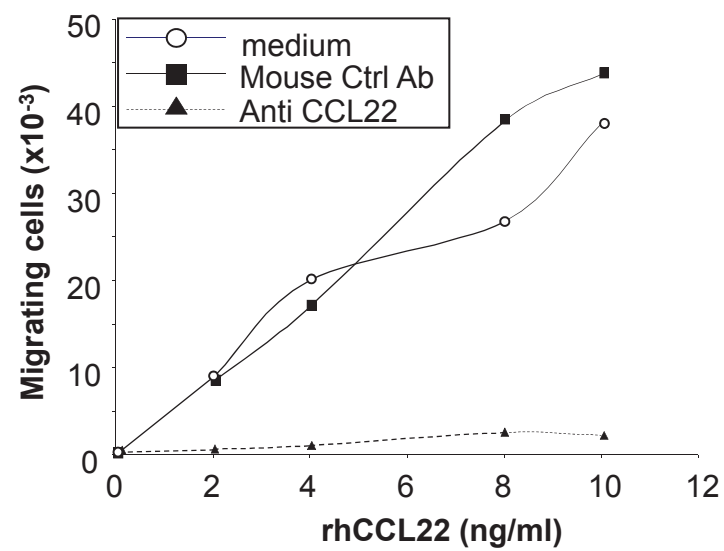
- ultraviolet B in cultured keratinocytes. *Br J Dermatol* 2007;156:830–7.
18. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18:593–620.
 19. Vestergaard C, Kirstein N, Gesser B, Mortensen JT, Matsushima K, Larsen CG. IL-10 augments the IFN-gamma and TNF-alpha induced TARC production in HaCaT cells: a possible mechanism in the inflammatory reaction of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2001;26:46–54.
 20. Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, et al. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 1998;273:1764–8.
 21. Lloyd CM, Delaney T, Nguyen T, Tian J, Martinez A, Coyle AJ, et al. CC chemokine receptor (CCR)3/eotaxin is followed by CCR4/monocyte-derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge *in vivo*. *J Exp Med* 2000;191:265–74.
 22. Andrew DP, Chang MS, McNinch J, Wathen ST, Rihaneck M, Tseng J, et al. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 1998;161:5027–38.
 23. Xiao T, Kagami S, Saeki H, Sugaya M, Kakinuma T, Fujita H, et al. Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF-alpha and IFN-gamma enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *J Dermatol Sci* 2003;31:111–7.
 24. Berin MC, Dwinell MB, Eckmann L, Kagnoff MF. Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1217–26.
 25. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Menard C, Roux S, Lyonnet L, et al. Alternatively spliced NKP30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 2011;17:700–7.
 26. Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, et al. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Immunol* 2001;31:812–22.
 27. Rodenburg RJ, Brinkhuis RF, Peek R, Westphal JR, Van Den Hoogen FH, van Venrooij WJ, et al. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC) mRNA in macrophages is enhanced by interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 1998;63:606–11.
 28. Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Li JH, Song SB, Jin D, et al. The adenylyl cyclase-cAMP system suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production through p38 MAPK and NF-kappaB in HaCaT keratinocytes. *Mol Immunol* 2009;46:1925–34.
 29. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010;115:2167–76.
 30. Mariani M, Lang R, Binda E, Panina-Bordignon P, D'Ambrosio D. Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells. *Eur J Immunol* 2004;34:231–40.
 31. Britschgi MR, Link A, Lissandrin TK, Luther SA. Dynamic modulation of CCR7 expression and function on naive T lymphocytes *in vivo*. *J Immunol* 2008;181:7681–8.
 32. Otero C, Groettrup M, Legler DF. Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation. *J Immunol* 2006;177:2314–23.
 33. Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. ELR+ CXC chemokines in human milk. *Cytokine* 2003;24:91–102.
 34. Takahata Y, Takada H, Nomura A, Nakayama H, Ohshima K, Hara T. Detection of interferon-gamma-inducible chemokines in human milk. *Acta Paediatr* 2003;92:659–65.
 35. Jones RL, Morison NB, Hannan NJ, Critchley HO, Salamonsen LA. Chemokine expression is dysregulated in the endometrium of women using progestin-only contraceptives and correlates to elevated recruitment of distinct leukocyte populations. *Hum Reprod* 2005;20:2724–35.
 36. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, et al. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 2000;165:2205–13.
 37. Qin XJ, Shi HZ, Deng JM, Liang QL, Jiang J, Ye ZJ. CCL22 recruits CD4-positive CD25-positive regulatory T cells into malignant pleural effusion. *Clin Cancer Res* 2009;15:2231–7.
 38. Gros E, Bussmann C, Bieber T, Forster I, Novak N. Expression of chemokines and chemokine receptors in lesional and nonlesional upper skin of patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:753–60.
 39. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187:129–34.
 40. Fukuda K, Fujitsu Y, Seki K, Kumagai N, Nishida T. Differential expression of thymus- and activation-regulated chemokine (CCL17) and macrophage-derived chemokine (CCL22) by human fibroblasts from cornea, skin, and lung. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:520–6.
 41. Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:123–31.
 42. Luci C, Tomasello E. Natural killer cells: detectors of stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2335–40.
 43. Madjd Z, Spendlove I, Moss R, Bevin S, Pinder SE, Watson NF, et al. Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. *Cancer Immun* 2007;7:17.
 44. Park SW, Bae JH, Kim SD, Son YO, Kim JY, Park HJ, et al. Comparison of level of NKG2D ligands between normal and tumor tissue using multiplex RT-PCR. *Cancer Invest* 2007;25:299–307.
 45. Mailloux AW, Young MR. NK-dependent increases in CCL22 secretion selectively recruits regulatory T cells to the tumor microenvironment. *J Immunol* 2009;182:2753–65.
 46. Chomarat P, Risoan MC, Blanchereau J, Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med* 1993;177:523–7.
 47. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:313–38.
 48. Sangaletti S, Tripodo C, Ratti C, Piconese S, Porcasi R, Salcedo R, et al. Oncogene-driven intrinsic inflammation induces leukocyte production of tumor necrosis factor that critically contributes to mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 2010;70:7764–75.
 49. Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andres E, Hentges F, et al. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2007;81:144–53.

Figure S1

A



B



C

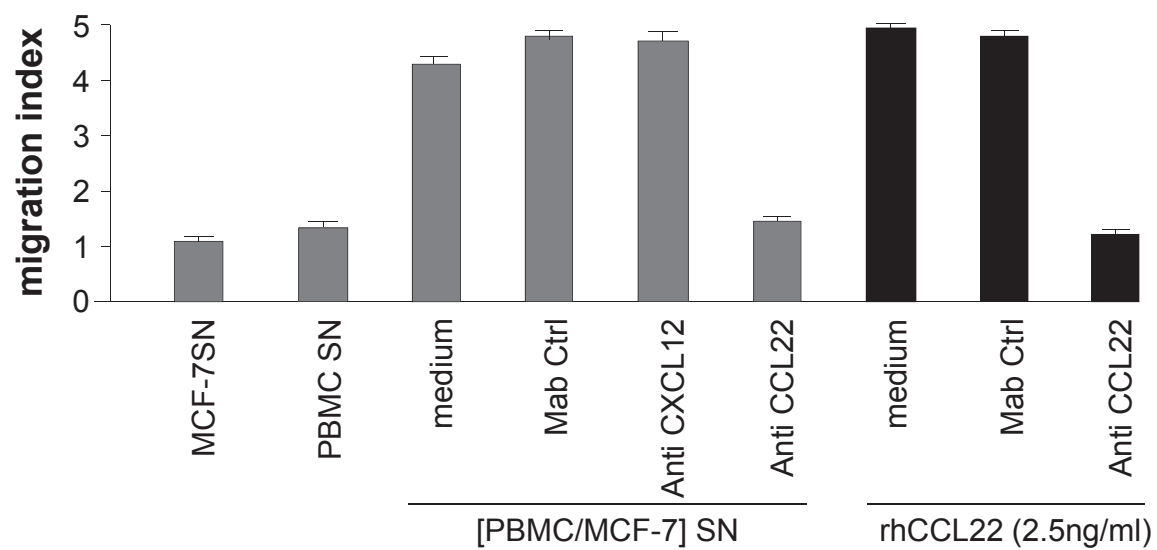


Figure S2

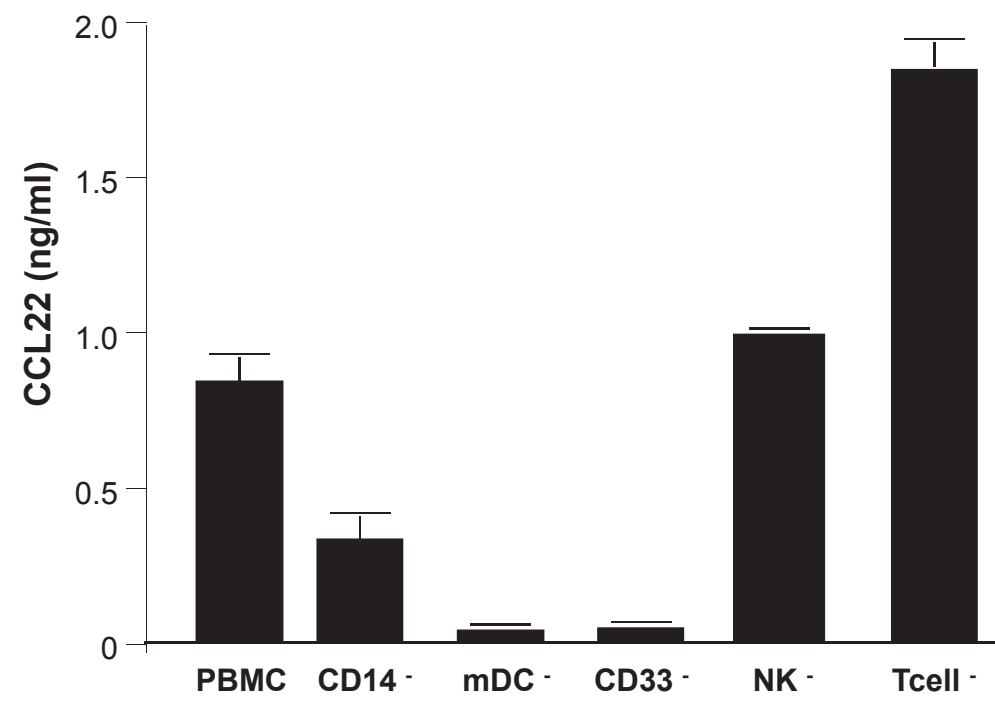


Figure S3

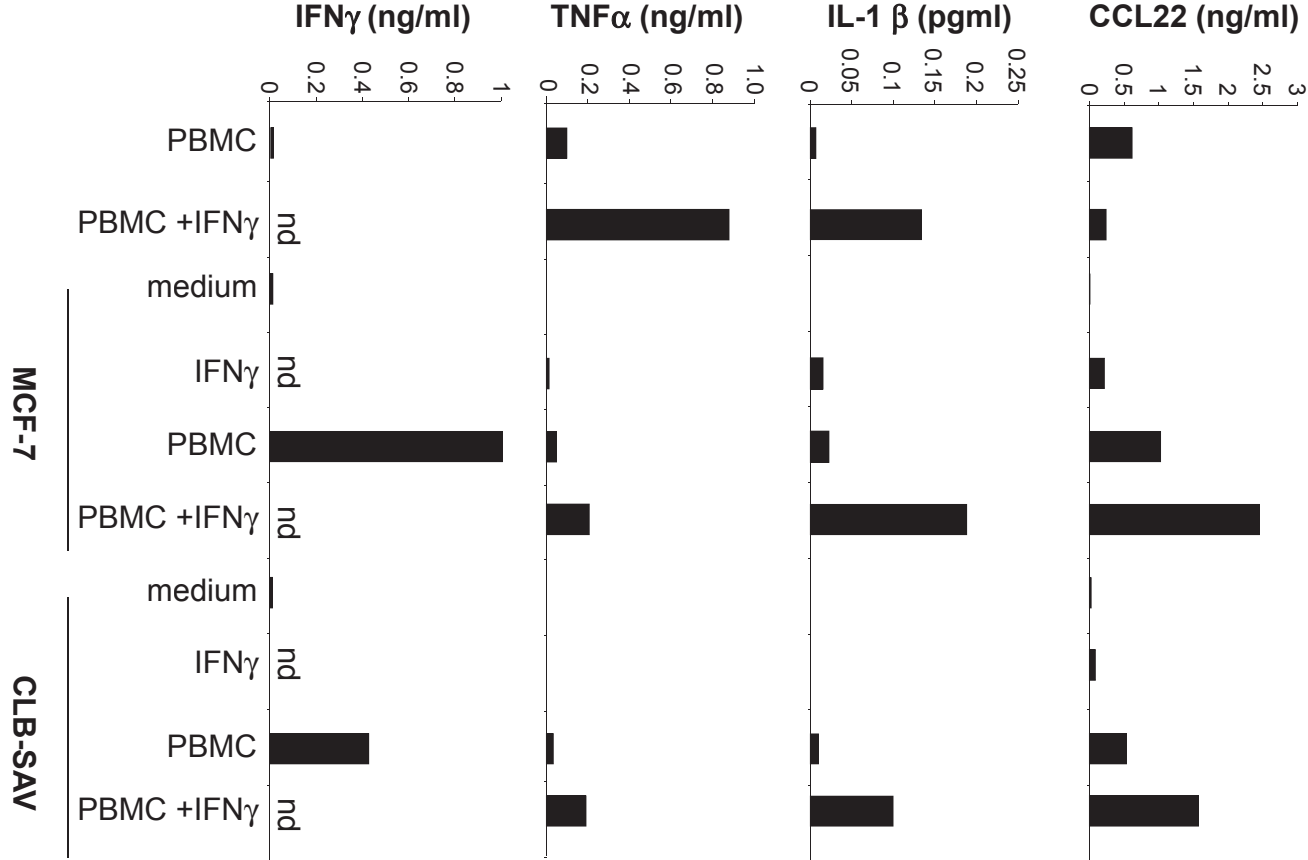


Figure S4

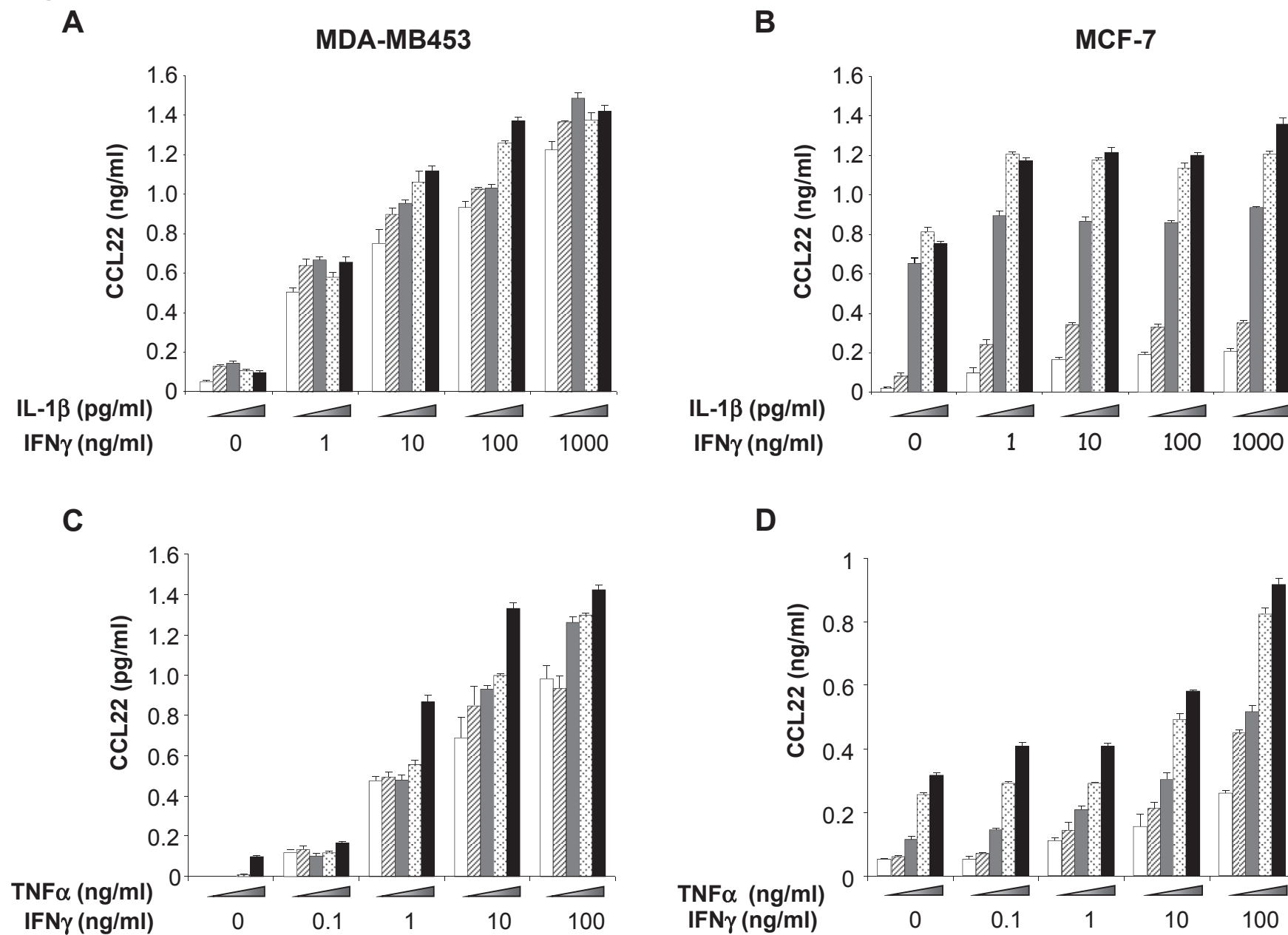
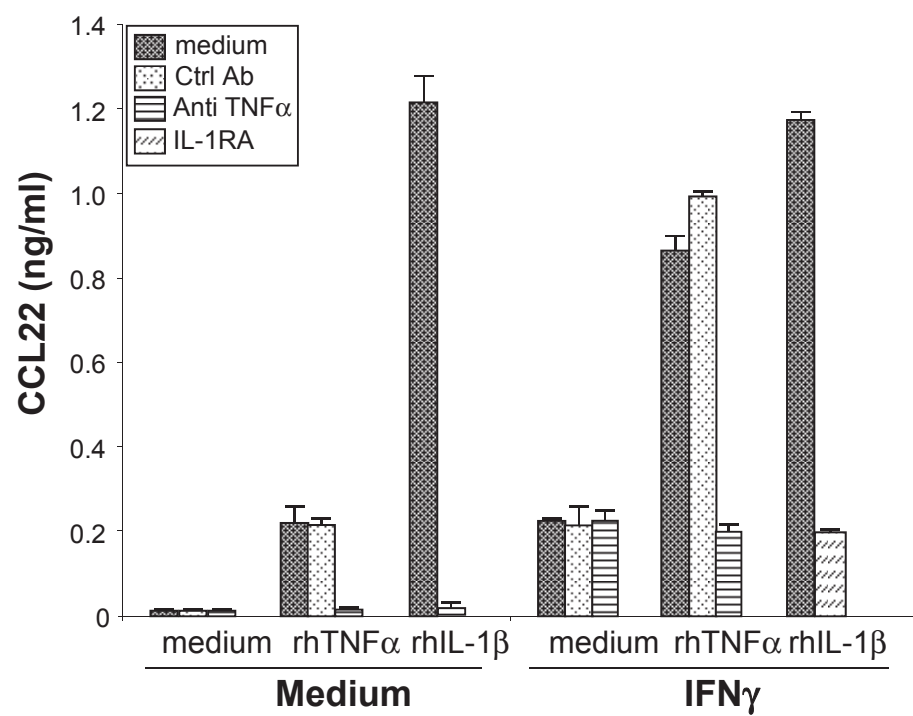


Figure S5

A



B

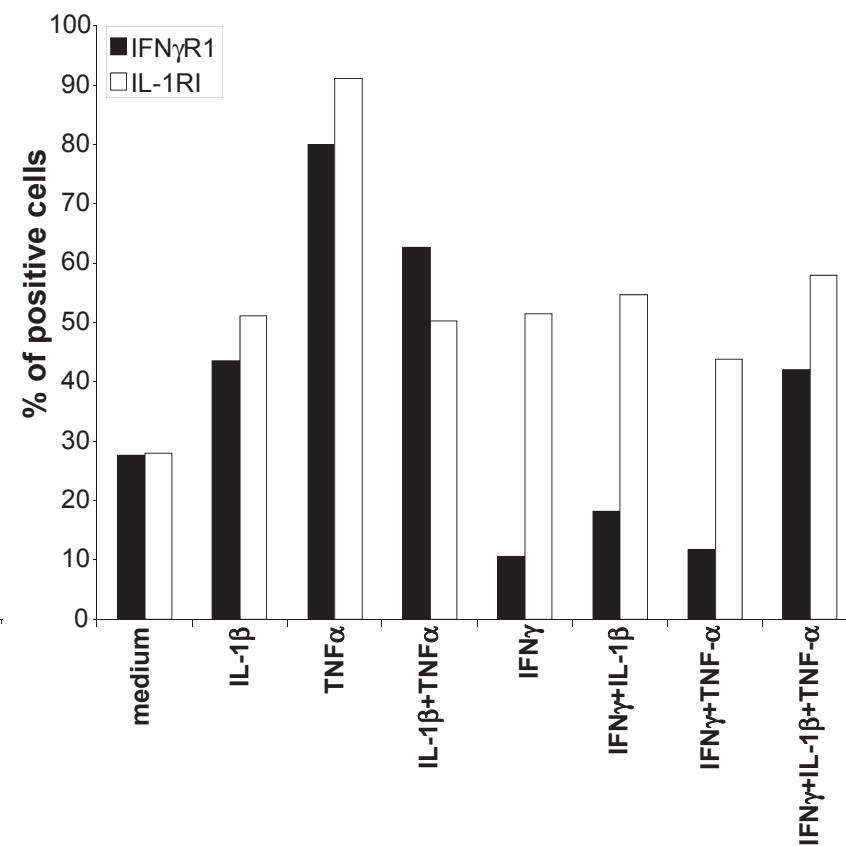


Figure S6

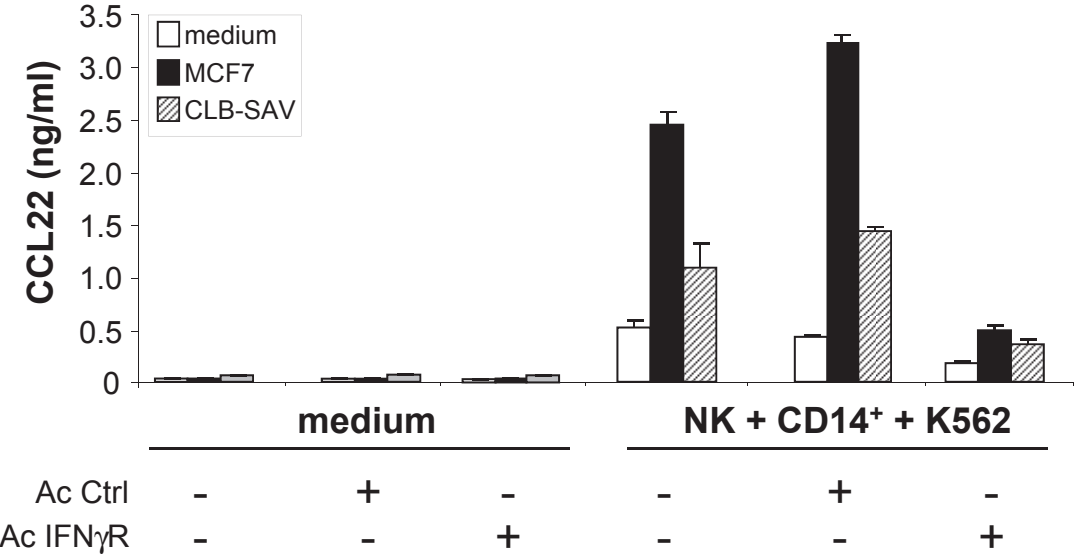
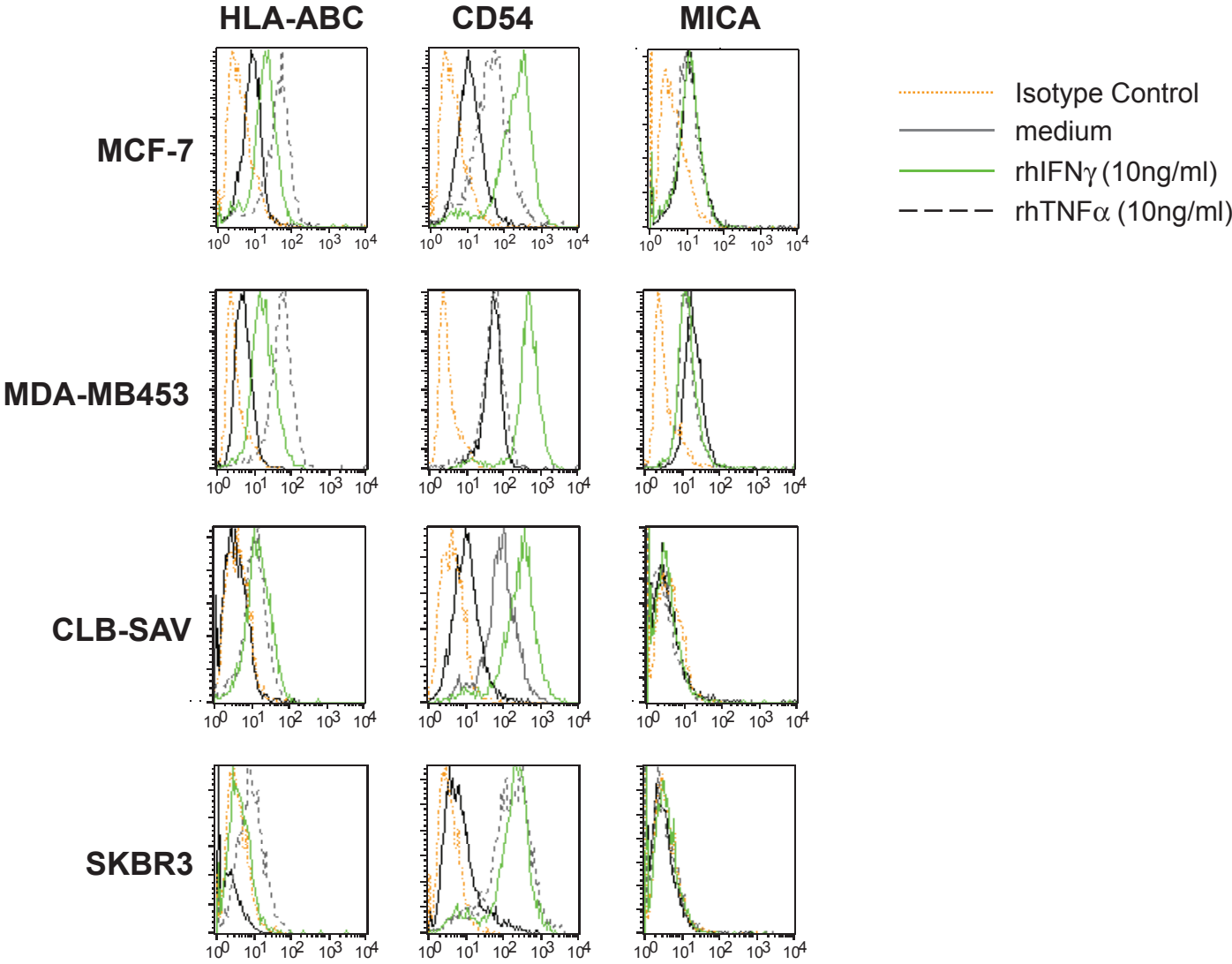


Figure S7



Legends to supplementary Figures

Figure S1: Validation of CCRF-CEM as a good model to analyze CCL22 functionality

(A) CCR4 expression on CCRF-CEM cell line, (B) migration of CCRF-CEM cells in response to a dose response of rhCCL22 (2 to 10ng/ml) in a transwell system in the presence or the absence of anti CCL22 antibody, (C) CCRF-CEM cells migration in response to rhCCL22 (2.5ng/ml) or 48h culture supernatants (SN) from of MCF-7, PBMC or [MCF-7/PBMC]. This migration was done in presence or absence of anti CCL22, ctrl Ab or anti CXCL12 Ab (10µg/ml).

Figure S2: Within PBMC, mDC are responsible for CCL22 production that is strongly reduced in the presence of rhIFNγ

10⁶ PBMC or fractions depleted in myeloid cells (CD33⁻) (10⁶), in CD14 (CD14⁻) (9x10⁵), in mDC (mDC⁻) (10⁶), in NK cells (NK⁻) (9x10⁵) or in T cells (Tcells⁻) (5x10⁵) were cultured in presence of rhIFNγ (100 ng/ml) during 48h for CCL22 production analysis by ELISA.

Figure S3: IL-1β, TNFα and IFNγ are secreted within co-culture [PBMC-tumor cells] supernatants

10⁶ PBMC were cultured alone or in presence of 10⁵ tumor cells (MCF-7 or CLB-SAV) with or without rhIFNγ (100ng/ml). CCL22, TNFα, IL-1β and IFNγ concentration were then quantified by ELISA after 48h of culture.

Figure S4: Impact of a cross-range of cytokines (IL-1β/IFNγ, or TNFα/IFNγ) on the production of CCL22 by tumor cells

CCL22 production after 48h culture of tumor cells (10⁵) (A,C : MDA-MB453, B,D : MCF-7) in the presence of cytokines IL-1β (0.01 to 1ng/ml) or TNFα (0.1 to 100ng/ml) and IFNγ (0,1 to 100ng/ml with TNFα or 1 to 1000ng/ml with IL-1β) in cross range.

Figure S5: Impact of cytokines on the expression of cytokines receptors and validation of cytokines inhibitors

(A) Validation of the inhibitory effect of anti TNFα (10µg/ml) and IL-1RA (100ng/ml) to block respectively the CCL22 secretion induced by rhIL-1β (100pg/ml) and rhTNFα (10ng/ml). (B) Expression of IFNγR1 (CD119) and IL-1R1 (CD121) was analysed by flow cytometry on MCF-7 cells after 24h culture in the presence of rhIFNγ (10ng/ml), rhIL-1β (100pg/ml) or TNFα (10ng/ml) or their combination

Figure S6: CCL22 production induced by the combination of monocytes and K562-activated NK cells is IFNγ dependent

Purified monocytes (10⁵), NK cells+K562 cells (1:1) (10⁵ each) or their combination were added on 24h medium pretreated breast tumor cells (MCF-7, MDA-MB453) (10⁵) in the presence of Ctrl Ab or anti IFNγR blocking Ab (10µg/ml) and CCL22 secretion was analysed after 48h culture period.

Figure S7: Expression of HLA-Class I, CD54 and MICA on tumor cells after activation with IFNγ or TNFα

Breast tumor cell lines (MCF-7, MDA-MB453, CLB-SAV and SKBR3) (10⁵) were cultured for 24h in medium, rhIFNγ (100ng/ml) or rhTNFα (10ng/ml). Membrane expression of MHC Class I, CD54 and MICA was analysed by flow cytometry after staining with commercial antibodies PE labelled. Results were presented as overlaid histograms (----- Ctrl Ab, — . medium culture, — rhIFNγ culture, - - rhTNFα culture).

6.2 La sécrétion d'IFN- α par les pDC est altérée dans la masse tumorale, favorisant l'enrichissement en Treg et en cellules productrices d'IL-10 parmi les lymphocytes T CD4⁺ de tumeur

Sisirak V*, Faget J* *et al* Cancer Res 2012, 72(20):5188-5197. * first co-authors

Les TA-pDC sont bloquées à un stade immature et leur capacité à sécréter de l'IFN- α est inhibée dans le cancer du poumon (Perrot et al., 2007), le cancer « tête et cou » (Hartmann et al., 2003) et le cancer de l'ovaire (Zou et al., 2001). Les travaux antérieurs de l'équipe (Treilleux et al., 2004) ont montré que l'infiltration des tumeurs du sein par les pDC est un facteur de mauvais pronostic, tout comme la présence d'un nombre important de Treg (Gobert et al., 2009). La capacité des pDC à induire *in vivo* et *in vitro* la prolifération des Treg ayant été rapportée par plusieurs équipes (Hadeiba et al., 2008; Martin-Gayo et al., 2010), nous avons émis l'hypothèse que les TA-pDC intra-tumorales pouvaient être impliquées dans la prolifération des TA-Treg infiltrant les tumeurs primaires de sein.

Dans cet article, l'analyse phénotypique et fonctionnelle des pDC issues de tumeurs primaires de sein met en évidence des cellules dans un état semi-mature et fortement altérées pour leur capacité à produire de l'IFN- α en réponse à l'engagement des ligands de TLR (TLR-7 et 9). Que ce soit en IHC sur TMA ou sur tissus frais en cytométrie de flux, nous observons une corrélation positive forte entre la présence de pDC et de Treg dans les tumeurs primaires de sein. Nous montrons *in vitro*, que comparé aux autres sous-populations de DC (mDC et MoDC), les pDC de donneurs sains présentent une capacité accrue à favoriser la prolifération des Treg allogéniques purifiés. L'utilisation du modèle de pDC de donneurs sains pré-incubées avec les surnageants de tumeur mimant les TA-pDC nous a permis de montrer que l'altération fonctionnelle (perte de production d'IFN- α) des pDC favorise l'émergence de cellules FoxP3⁺ parmi les T CD4 mémoires lors d'une culture allogénique. L'addition d'IFN- α exogène lors de réactions allogéniques entre TA-pDC et T CD4 de donneurs sains inhibe fortement l'émergence de cellules T CD4 exprimant Foxp3 et la sécrétion d'IL-10 tout en augmentant la sécrétion d'IFN- γ . L'ensemble de ces données suggère donc très fortement que l'altération des TA-pDC favorise l'induction d'une réponse toléro-gène *via* l'expansion des Treg et l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 par les cellules T CD4 mémoires. Restaurer la production d'IFN- α par les TA-pDC pourrait permettre de diminuer la réponse immunosuppressive (Treg et production d'IL-10) et favoriser la production d'IFN γ par les cellules T.

Impaired IFN- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Favors Regulatory T-cell Expansion That May Contribute to Breast Cancer Progression

Vanja Sisirak^{1,2,3,4,5}, Julien Faget^{1,2,3,4,5}, Michael Gobert^{1,2,3,4,5}, Nadège Goutagny^{1,2,3,4,5}, Nelly Vey^{1,2,3,4,5}, Isabelle Treilleux⁶, Sarah Renaudineau^{1,2,3,4,5}, Gaëlle Poyet^{1,2,3,4,5}, Sana Intidhar Labidi-Galy^{1,2,3,4,5,6}, Sophie Goddard-Leon⁶, Isabelle Durand^{1,2,3,4,5,6}, Isabelle Le Mercier^{1,2,3,4,5}, Agathe Bajard⁶, Thomas Bachelot^{1,2,3,4,5,6}, Alain Puisieux^{1,2,3,4,5,6,7}, Isabelle Puisieux^{1,2,3,4,5,6}, Jean-Yves Blay^{1,2,3,4,5,6}, Christine Ménétrier-Caux^{1,2,3,4,5,6}, Christophe Caux^{1,2,3,4,5,6}, and Nathalie Bendriss-Vermare^{1,2,3,4,5}

Abstract

Infiltration and dysfunction of immune cells have been documented in many types of cancers. We previously reported that plasmacytoid dendritic cells (pDC) within primary breast tumors correlate with an unfavorable prognosis for patients. The role of pDC in cancer remains unclear but they have been shown to mediate immune tolerance in other pathophysiologic contexts. We postulated that pDC may interfere with antitumor immune response and favor tolerance in breast cancer. The present study was designed to decipher the mechanistic basis for the deleterious impact of pDC on the clinical outcome. Using fresh human breast tumor biopsies ($N = 60$ patients), we observed through multiparametric flow cytometry increased tumor-associated (TA) pDC (TApDC) rates in aggressive breast tumors, i.e., those with high mitotic index and the so-called triple-negative breast tumors (TNBT). Furthermore, TApDC expressed a partially activated phenotype and produced very low amounts of IFN- α following toll-like receptor activation *in vitro* compared with patients' blood pDC. Within breast tumors, TApDC colocalized and strongly correlated with TA regulatory T cells (TATreg), especially in TNBT. Of most importance, the selective suppression of IFN- α production endowed TApDC with the unique capacity to sustain FoxP3⁺ Treg expansion, a capacity that was reverted by the addition of exogenous IFN- α . These findings indicate that IFN- α -deficient TApDC accumulating in aggressive tumors are involved in the expansion of TATreg *in vivo*, contributing to tumor immune tolerance and poor clinical outcome. Thus, targeting pDC to restore their IFN- α production may represent an attractive therapeutic strategy to overcome immune tolerance in breast cancer. *Cancer Res*; 72(20); 5188–97. ©2012 AACR.

Introduction

Functional alteration of tumor-associated dendritic cells (TADC) that play a critical role in antitumor immunity, as well as mobilization of immunosuppressive regulatory T cells (Treg) that shut down immune responses, have been associated with tumor tolerance (1). Most cancers, including breast

tumors, are highly infiltrated by immune cells. Tumor-resident DC are conditioned by the tumor microenvironment to favor tolerogenic responses that could contribute to disease progression (2). Indeed, we previously showed that plasmacytoid DC (pDC) and Treg infiltrating breast tumors correlate with an adverse clinical outcome (3, 4), suggesting that both pDC and Treg are involved in breast cancer progression.

pDC are well known for their role in antiviral immunosurveillance through their massive production of type I IFN- $\alpha/\beta/\omega$ in response to DNA or RNA viruses, recognized by toll-like receptors (TLR) 9 and 7, respectively (see ref. 5 for review). Beside their direct antiviral properties, type I IFNs produced by pDC activate natural killer (NK) cells, macrophages, and CD11c⁺ myeloid DC (mDC) to elicit antimicrobial/viral/tumor immune responses (5). Moreover, differentiated mature pDC are capable of efficient antigen (cross)-presentation (6, 7) directing T-cell responses with considerable flexibility (5). Of importance, recent works have also established a critical role of pDC in noninfectious autoimmune/inflammatory pathologies (lupus, psoriasis) because of uncontrolled production of IFN- α following their chronic activation by self-nucleic acids (8, 9).

Authors' Affiliations: ¹Université de Lyon; ²Université Lyon 1, ISPB; ³INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon; ⁴CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon; ⁵LabEx DEV-weCAN; ⁶Centre Léon Bérard, Lyon, France; and ⁷Institut Universitaire de France, Paris, France

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

V. Sisirak and J. Faget contributed equally to this work.

Corresponding Author: Nathalie Bendriss-Vermare, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08, France. Phone: 33-4-7878-2750; Fax: 33-4-7878-2720; E-mail: nathalie.bendriss-vermare@lyon.unicancer.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3468

©2012 American Association for Cancer Research.

In addition to immune activation, increasing evidence suggests that pDC also play regulatory functions. Under certain circumstances, the tolerogenic role of pDC as inducers of Treg in the periphery has been clearly illustrated *in vivo* (see ref. 10 for review) as well as their capacity to induce the differentiation (11–13) and expansion (14, 15) of Treg *in vitro*.

pDC are also involved in antitumor immunity, as underlined by their recent identification in several human and murine solid cancers (4, 16–19). Only sparse information are available on TApDC functions showing (i) poor stimulation of CD4 and CD8 T cells (18, 19), (ii) induction of anergic and/or suppressive CD4 and CD8 T cells (19, 20), (iii) promotion of multiple myeloma cell growth, survival, and drug resistance (21), but also (iv) involvement in therapeutic response to TLR7 ligands (22, 23). In breast cancer, we previously reported an accumulation of suppressive and activated Treg that proliferate *in situ* and that are associated with a poor prognosis (3), indicating that TATreg can expand in the tumor microenvironment.

To understand the negative impact of TApDC on breast tumor patients' outcome and its possible link with TATreg, we investigated herein, their functional competence within breast tumors. We show that TApDC are impaired for their IFN- α production and consequently promote immune tolerance through TATreg expansion and differentiation of interleukin 10 (IL-10)-secreting T cells, leading to tumor progression and poor clinical outcome in breast cancer. Thus, restoring the production of IFN- α by pDC within breast tumors emerges as an appealing therapeutic strategy to trigger antitumor immunity.

Materials and Methods

Patients, human tissue samples, and blood

Fresh tumor and blood samples (collected on CTAD anti-coagulant) from 60 patients diagnosed with primary breast carcinoma were obtained before any treatment from the Centre Léon Bérard (CLB) tissue bank after patient informed consent. The study was reviewed and approved by the Institutional Review Board of CLB. Discarded human tonsil material was obtained anonymously according to the institutional regulations in compliance with French law. Healthy human blood was obtained anonymously from the Etablissement Français du Sang (Lyon, France). Written informed consent was obtained from all study participants in accordance with the Declaration of Helsinki. The breast cancer patients' characteristics are detailed in Supplementary Table S1. All clinical and biologic data related to breast cancer patients were collected prospectively and included in a regularly updated institutional database at CLB.

Isolation of pDC, naïve and memory CD4⁺ T cells, and *in vitro* generation of monocyte-derived DC

Breast tumor samples, tonsils, and blood were processed as previously described (3). pDC and naïve or memory CD4⁺ T cells were obtained from tissues after magnetic enrichment or fluorescence-activated cell sorting (FACS)-sorting. Monocyte-derived DC (MoDC) were obtained from blood-purified monocytes. Detailed methods are provided in Supplementary Methods.

Stimulation of pDC

TApDC were cultured at 5×10^5 cells/mL in 96-well flat-bottomed plates in complete medium for 24 hours in the presence of IL-3 (20 ng/mL), inactivated flu virus (100 HAU/mL), CpG-A (5 μ g/mL), CpG-B (5 μ g/mL), and R848 (1 μ g/mL). Healthy pDC were cultured in presence of IL-3 with or without breast TUMSN (25%) for 16 hours before TLR activation. Cells and supernatants were harvested after 24 hours and 40 hours for TApDC and healthy pDC culture, respectively, to analyze cell surface expression of activation markers and cell viability (by propidium iodide exclusion) by flow cytometry and cytokine/chemokine production by ELISA.

DC T-cell cocultures

Allogeneic naïve CD4⁺ T cells, Treg, and conventional memory CD4⁺ T cells were cultured in complete medium with or without (i) IL-2 (100 IU/mL) and (ii) purified TApDC, healthy pDC, mDC, and MoDC pretreated for 24 hours with IL-3, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; 10 ng/mL), CpG-B, R848, or flu or purified healthy pDC that were preincubated for 40 hours in IL-3 with (TUMSN-pDC) or without breast tumor supernatants, and TLR-L. T lymphocytes were added on preactivated DC subsets (ratio 1:5) and cocultured for 4 days in triplicate in 96-well round-bottomed plates. Proliferation was assessed by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen) dilution in experiments analyzing FoxP3 expression after gating on CD3⁺ cells or by DNA synthesis analyzed by ³H-TdR uptake (Betaplate scintillation counter, Perkin Elmer). Viable cells were selected by 4', 6-diamidino-2-phenylindole exclusion or Live/Dead reagent (Invitrogen) in case of cell permeabilization. Cytokines secretion was measured by ELISA in the supernatants. At day 4, for naïve T cells and TUMSN-pDC coculture, T cells were harvested, washed, and restimulated at 10^5 cells/well in triplicate for 16 hours with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/mL) and ionomycin (2 μ g/mL; Sigma-Aldrich), while for other T/pDC cocultures, supernatants of coculture were harvested and frozen without any further stimulation of T cells.

Immunohistochemical analysis on tumor tissue

Stainings using CD3 (4) and FoxP3 (3) antibodies were carried out on tissue microarray paraffin sections from 151 patients with invasive nonmetastatic breast cancer using a BenchMark Series automated slide stainer (Ventana) as previously described. After heat-induced Ag retrieval in tris-based buffer pH 8, BDCA2 staining was carried out using mouse anti-BDCA2 (clone 104C12, Dendritics) at 5 μ g/mL incubated at 37°C for 30 minutes, revealed with biotinylated secondary antibody bound to streptavidin peroxidase conjugate (Ultra-View kit and Amplification kit, Ventana), and revealed with 3,3'-diaminobenzidine (Dako) as substrate. Sections were counterstained with hematoxylin. The density of BDCA2⁺ cells was assessed semiquantitatively allowing the stratification of the tumors as positive or negative for BDCA2. FOXP3⁺ cells were enumerated using the ARIOL system (Applied Imaging). To compare the role of high number of FOXP3⁺ cells, we chose as cutoff the highest quartile (≥ 26.7 in non-TNBT and ≥ 61.8 in TNBT).

Statistical analyses

Comparison of independent samples was done by the student *t* test or nonparametric Wilcoxon tests when appropriate. Comparison of percentages was done by χ^2 test. Correlation analysis of the data was conducted using the Fischer exact test, Spearman test, or the Pearson test when appropriate. Data for cytokine production and T-cell proliferation are expressed as mean $\pm$ SD. Percentages of inhibition of IFN- α production by pDC were compared using a nonparametric Friedman test for paired samples. Differences were considered significant for *P* values less than 0.05 and are indicated as * for *P* < 0.05, ** for *P* < 0.01, and *** for *P* < 0.001.

Results

High TApDC infiltration is associated with aggressive breast tumors

We previously reported that infiltration of primary breast tumors by pDC identified as CD123⁺ cells by immunohistochemistry (IHC) correlates with poor prognosis, with a median follow-up of 5 years (4). We updated our clinical database with a median follow-up of 12 years and we observed that the presence of CD123⁺ pDC still represents a major independent adverse prognostic factor for both overall survival (OS; *P* = 0.002) and relapse-free survival (RFS; *P* < 10⁻³; Supplementary Fig. S1). In a prospective study including 79 newly diagnosed breast tumors patients and using flow cytometry, pDC and mDC were identified in primary breast tumor specimens as lineage⁻CD4⁺CD11c⁻CD123⁺BDCA2⁺ and lineage⁻CD4⁺CD11c⁻BDCA1⁺ cells, respectively (Supplementary Fig. S2A). Comparative analyses showed that the mean percentage of DC among total cells in primary tumors was 0.15 $\pm$ 0.18% for pDC versus 0.04 $\pm$ 0.05% for mDC (*P* < 10⁻³; Fig. 1A, left panel). We also observed significant lower pDC and to a lesser extent mDC frequencies in patients' blood (mean pDC: 0.25 $\pm$ 0.22%, *n* = 48), when compared with healthy donors' blood (mean pDC: 0.37 $\pm$ 0.19%, *n* = 48; *P* = 0.006; Fig. 1A, right panel). These observations suggest preferential pDC recruitment within the tumor mass. Because the median follow-up of our prospective cohort was 43 months, there were not enough events to analyze RFS and OS. However, we observed significant increased TApDC in aggressive tumors with high mitotic index (MI) that mirrors the rate at which tumor cells divide (0.22 $\pm$ 0.22 compared with 0.10 $\pm$ 0.11, *P* = 0.03) and triple negative breast tumors (TNBT; hormone-receptors and HER2-neu negative) (0.29 $\pm$ 0.28 compared with 0.12 $\pm$ 0.12, *P* = 0.05) compared with low MI and non-TN tumors, respectively (Fig. 1B). The presence of high numbers of TApDC was correlated only with those parameters that are characteristic of tumor aggressiveness (Supplementary Table S1 and Fig. 1C). These observations were confirmed by IHC analysis as we observed that TApDC infiltration was massive in 50% of TNBT (*n* = 25 tumors), compared with only 19% other tumors (*n* = 162 tumors; *P* = 0.05). Importantly, such correlations were not observed for TAmDC (Supplementary Table S1). Thus, using 2 different methods (flow cytometry and IHC) to identify pDC in 2 independent cohorts, we showed that high numbers of TApDC correlated with tumor aggressiveness,

strengthening our previous report on the deleterious impact of TApDC on breast tumors patients outcome (4).

Breast TApDC display a partially activated phenotype and are impaired for IFN- α production in response to TLR ligands

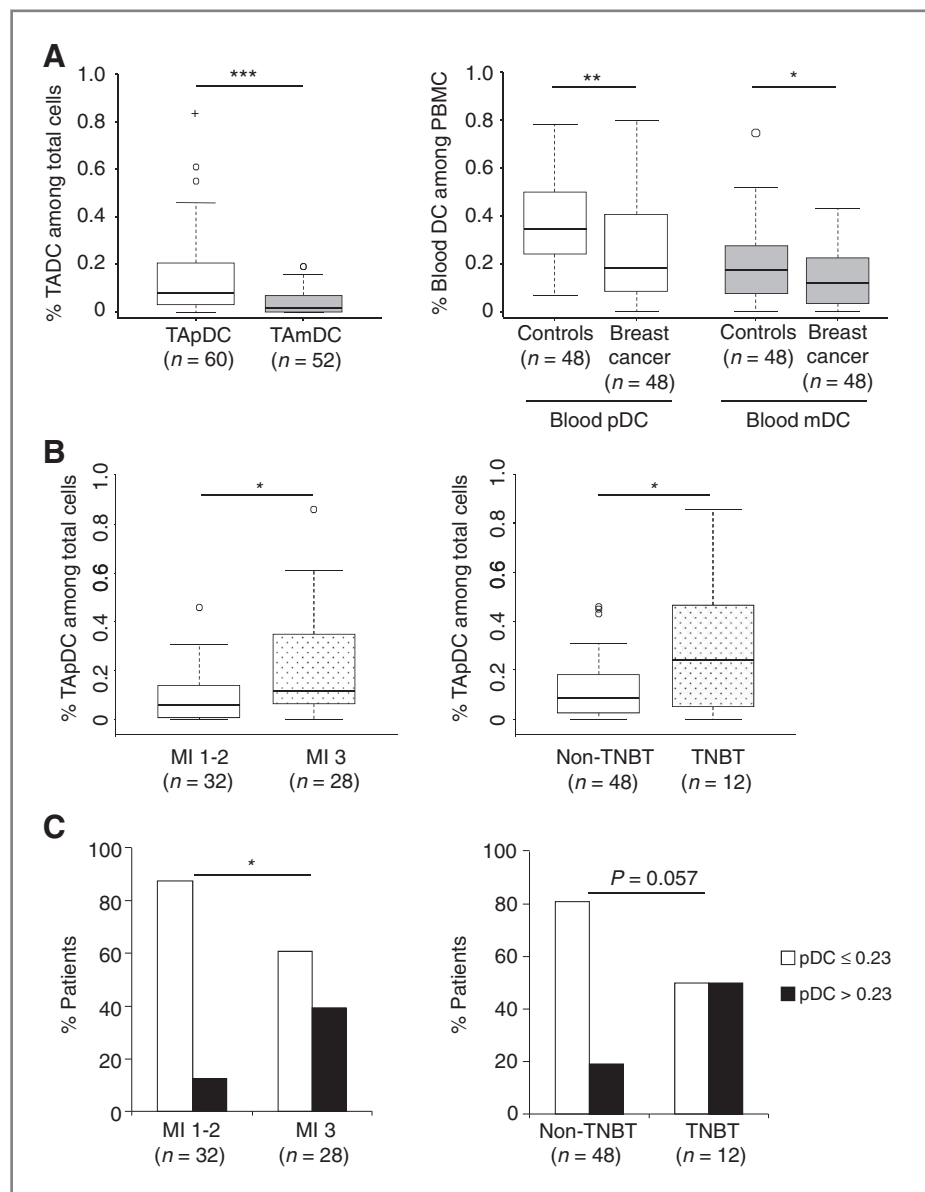
In contrast to tonsil pDC or paired blood pDC, TApDC (gated on CD4⁺CD123⁺ cells; Supplementary Fig. S2B) specifically exhibit a partially activated phenotype with moderate but significantly higher levels of activation markers such as CD40, CD83, CD86, and HLA-DR and reduced BDCA2 expression (Fig. 2A and B), a characteristic resting pDC marker. Thus, the breast tumors environment favors TApDC activation.

pDC are the most potent type I IFNs producing cells in response to TLR7 or 9 ligands (5). IFN- α production by purified TApDC (>98%) was strongly reduced in response to both TLR7 (flu; 76.3% of inhibition, *P* < 0.01) and TLR9 (CpG-A) ligands (89% of inhibition) compared with healthy tonsil used as a control tissue (Fig. 3A, left panel). In contrast, patients' blood pDC produced similar levels of IFN- α than pDC from healthy donor blood in response to TLR activation (Fig. 3B). These results indicate that the capacity of pDC to produce IFN- α is selectively altered at the tumor site. Moreover, this inhibition was specific for IFN- α , because the production of other immune mediators such as IP-10/CXCL10 remained unaffected after TApDC activation (Fig. 3A, right panel). The weak IFN- α response of TApDC suggested that breast tumor cells or other cells present in tumor tissue actively suppress the ability of pDC to produce IFN- α . To study this effect in more detail, healthy pDC were exposed to supernatants derived from cell cultures of single-cell suspensions of primary breast tumors (TUMSN) and 6 different breast cancer cell lines (BCCSN) before TLR stimulation. Most TUMSN (*n* = 25/33; Fig. 3C left panel, *n* = 10 TUMSN shown), but not the BCCSN (Supplementary Fig. S3A), significantly inhibited pDC IFN- α production in response to flu (TLR7-L) and CpG-A (TLR9-L; mean% of inhibition: 60.6 $\pm$ 14%, *P* < 0.05 and 75 $\pm$ 18.6%, *P* < 0.05, respectively), in a dose-dependent manner (Supplementary Fig. S3B). Importantly, IP-10/CXCL10 production remained unaffected (Fig. 3C, right panel). Altogether our observations show that pDC are exposed to soluble factors in breast tumors environment that inhibits their IFN- α production.

Breast tumors' environment conditions pDC to induce selective Treg expansion

BDCA2⁺ TApDC mainly colocalized with CD3⁺ lymphoid aggregates in breast tumors (Fig. 4 and Supplementary Fig. S4A) compared with epithelial cytokeratin⁺ areas (42% vs. 14% of tumors analyzed, *n* = 20; Supplementary Fig. S4B) leading us to investigate TApDC capacity to activate T cells *in vitro*. First, we showed that CD40, CD80, and CD86 expression increased following TLR stimulation in TApDC at levels comparable to tonsil pDC (Fig. 4B and Supplementary Fig. S5). Consistent with the acquisition of a mature phenotype, TLR-stimulated TApDC trigger potent naïve CD4⁺ T-cell proliferation (Fig. 4C) and differentiation into Tr1-like cells producing high levels of IL-10 and IFN- γ (Fig. 4D), as observed for tonsil pDC (Fig. 4C and D). Furthermore, we observed that similarly to TApDC,

Figure 1. pDC infiltrate highly aggressive tumors. **A**, box plot set of the frequencies of lineage-negative CD4⁺ CD11c⁺ pDC and CD4⁺ CD11c⁺ mDC (see Supplementary Fig. S2A for DC identification) among total cells of primary tumors ($n = 60$ or $n = 52$) are indicated (left). The frequencies of pDC and mDC within peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of breast cancer patients ($n = 48$) and healthy donors ($n = 48$) are indicated (right). ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; paired Student t test. Box plot set of pDC levels (**B**) determined as in **A**, and percentages of breast cancer patients with low- or high-pDC numbers (**C**; the highest quartile $>0.23\%$ was used as cutoff value) among patients with breast tumors with a MI 1–2 versus 3 and with TNBT versus non-TNBT. MI was established by counting mitoses in 10 high-power ($\times 400$) fields (HPF) per tumor section and then averaging the number by HPF (1.96 mm^2). Mitotic cell counts between 1 and 9, between 10 and 19, and more than 20 were defined as MI 1, MI 2, and MI 3, respectively. *, $P < 0.05$; nonparametric Wilcoxon test in **B** and Fisher exact test in **C**.



higher numbers of FoxP3⁺ TATreg infiltrate TNBT than non-TNBT (3rd quartile = 61.8 compared with 26.6 FoxP3⁺ cells, respectively). Importantly, we observed a significant positive correlation between TApDC and TATreg frequencies in TNBT ($r^2 = 0.749$, $P = 0.002$, $n = 14$), and to a lower extent in non-TNBT ($r^2 = 0.413$, $P = 0.004$, $n = 48$; Fig. 5A). Such correlations (i) were not as significant for TAmDC ($r^2 = 0.672$, $P = 0.05$ in TNBT and $r^2 = 0.291$, $P = 0.08$ in non-TNBT; not shown) and (ii) were confirmed by IHC analysis as we observed that 50% of TNBT and 42% of non-TNBT containing TApDC also contained high numbers of FoxP3⁺ TATreg in lymphoid areas ($P = 0.02$) although tumors lacking pDC were poorly or not infiltrated by TATreg (17.7% and 0% for non-TNBT and TNBT, respectively; Fig. 5B). Thus, because (i) TApDC infiltrates are associated with TATreg infiltrates, (ii) TApDC and TATreg are in close contact within lymphoid infiltrates (Fig. 4A and Faget, manuscript in preparation), and (iii) both cell subsets are

associated with poor prognosis in breast tumors (3, 4), we consequently investigated whether TApDC showing reduced capacity to secrete type I IFN may favor TATreg accumulation. Importantly, we observed that in absence of exogenous IL-2, R848-activated pDC have the highest capacity to promote the proliferation of purified allogeneic Treg while all DC subsets (pDC, mDC, and MoDC) induced similar proliferation of purified memory conventional T cells (Fig. 5C). Interestingly, TUMSN-pretreated pDC, in IL-3 alone or in TLR-7L (flu or R848), potentially increased by 2.8- to 4.6-fold the percentage of FoxP3^{high} T cells ($9.3 \pm 1.1\%$, $8.6 \pm 0.5\%$, and $7.3 \pm 0.5\%$, respectively) among CD4⁺CD45RO⁺ T cells compared with absence of TUMSN (2% for IL-3 and $2.6 \pm 0.5\%$ for both TLR-L; Fig. 5D). Furthermore, IL-3-treated TApDC and TUMSN-conditioned healthy donor pDC were more potent than IL-3-treated healthy donor pDC to favor Treg expansion among CD4⁺CD45RO⁺ T cells (9% vs. 1.5% of CD3⁺ T

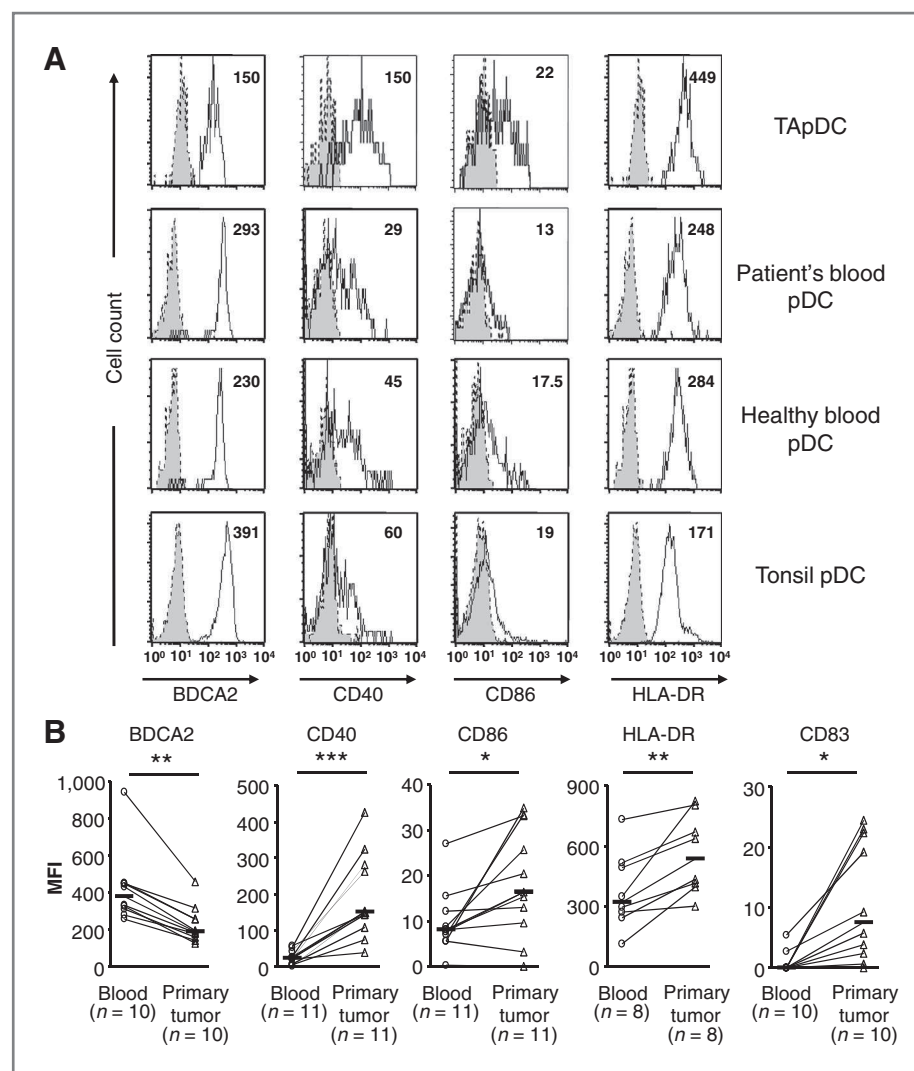


Figure 2. TApDC isolated from human primary breast tumors display a partially activated phenotype. A, pDC from primary breast tumors, patient or healthy blood, and tonsils were compared for BDCA2, CD40, CD83, and CD86 expression after gating on CD4⁺ CD123⁺ cells [corresponding to >98% BDCA2⁺ pDCs (Supplementary Fig. S2B)] without any purification steps. Dotted line represents specific isotype controls. Mean fluorescence intensity (MFI) values of total cells are indicated in each histogram. Results are representative of 5 independent experiments. B, phenotype of pDC from primary tumor and paired blood was compared for different breast cancer patients. Each symbol represents a single sample ($n > 8$ patients) and mean values are represented by horizontal lines in each series. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; nonparametric Wilcoxon test.

cells; Fig. 6A). However, TUMSN-conditioned healthy pDC did not induce the differentiation of FoxP3⁺ Treg from naïve CD4⁺ T cells (Supplementary Fig. S6). Thus, TApDC mainly favored Treg expansion rather than differentiation. Collectively, these observations show that breast tumors environment amplified pDC unique capacity to stimulate Treg expansion.

Exogenous IFN- α reverts immunosuppressive T-cell responses induced by TApDC and breast tumor environment

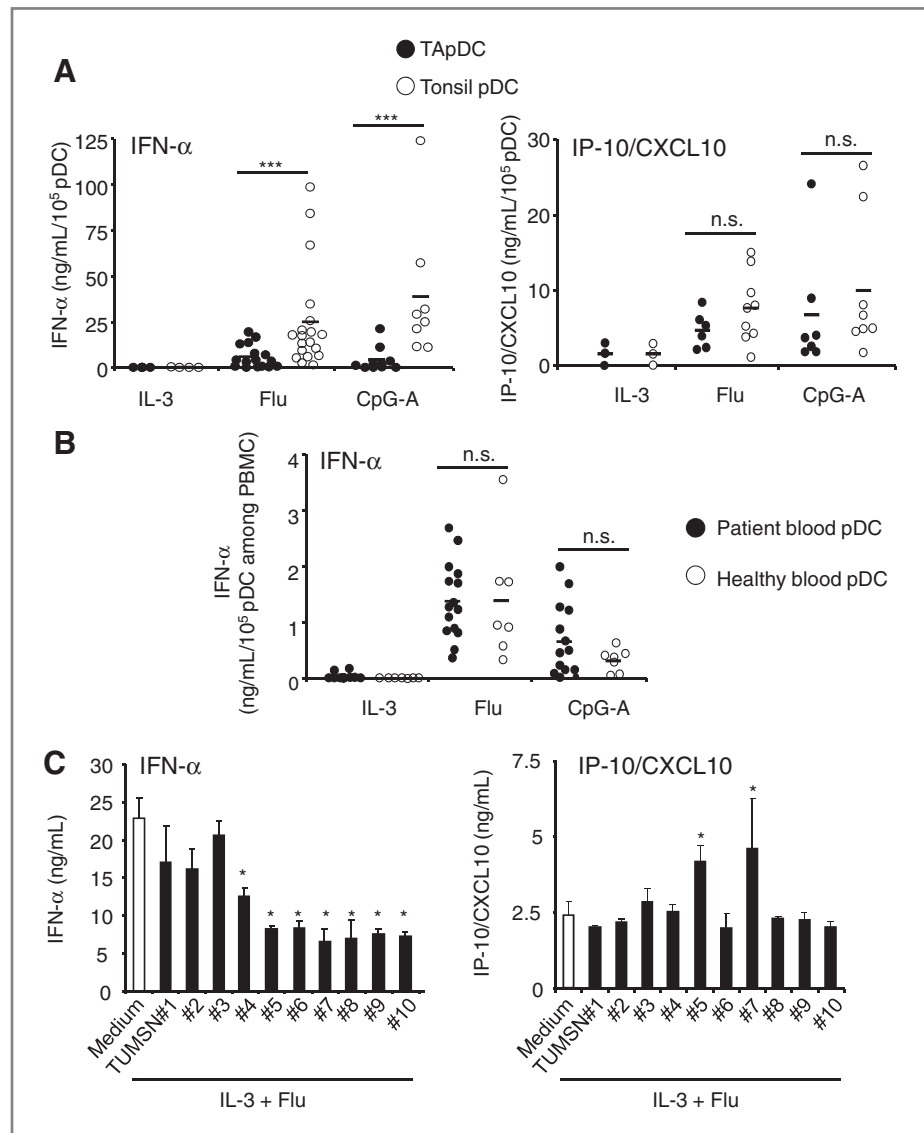
We hypothesized that the defect in IFN- α production by TApDC could favor Treg amplification. Addition of 1,000 IU/mL exogenous IFN- α (Fig. 6A) strongly reduced by 78% Treg amplification from CD4⁺ CD45RO⁺ T cells induced by IL-3-treated TApDC. Similar results were obtained using healthy pDC cultured in IL-3 or IL-3 + TUMSN with respectively 1.5% and 7.7% of FoxP3^{high} T cells without IFN- α versus 0.9% and 4.8% in the presence of IFN- α (Fig. 6A). Furthermore, IFN- α inhibited IL-10 and enhanced IFN- γ secretion by total CD4⁺ T cells induced by IL-3-treated TApDC suggesting a switch in T-cell response toward Th1 polarization (Fig. 6B).

Collectively, these data indicate that TApDC capacity to promote immunosuppressive T-cell responses through FoxP3^{high} Treg expansion and IL-10-secreting T cells is strongly amplified in tumors as a result of their impaired IFN- α production.

Discussion

The negative prognostic value of pDC and Treg infiltration in human breast tumors (3, 4) prompted us to examine the contribution of pDC and their interaction with Treg in breast cancer immune evasion mechanisms. We show herein that TApDC are preferentially infiltrating aggressive breast tumors. Moreover, TApDC are highly repressed for their IFN- α production after TLR stimulation. Such IFN- α -deficient TApDC strongly correlate with TATreg infiltrate in TNBT, promote TATreg expansion, and prime IL-10-secreting CD4⁺ T cells. Finally, these tolerogenic properties of TApDC are reverted by exogenous IFN- α . Altogether, our observations show that TApDC altered for their IFN- α production contributes to establish immune tolerance through Treg expansion leading to tumor progression and poor clinical outcome in breast cancer.

Figure 3. Specific inhibition of IFN- α production by TApDC in response to TLR activation is mediated by soluble factors from breast tumor environment. Purified pDC from breast tumors and healthy tonsil (A) and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from breast cancer patients and healthy donors (B) were cultured with IL-3, flu, and CpG-A for 24 hours. IFN- α and IP-10/CXCL10 production was quantified by ELISA. Results were standardized to ng/mL for 1×10^5 pDC for each sample. Each symbol represents a single sample and mean values are represented by horizontal lines. ***, $P < 0.001$; nonparametric Wilcoxon test. C, healthy pDC were pretreated with IL-3 $\pm$ TUMSN (25%) derived from 10 patients for 16 hours before flu activation for another 24 hours. IFN- α and IP-10/CXCL10 production was measured by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SD by subtracting the quantity of each cytokine detected in TUMSN alone with no pDC. Data are representative of more than 4 independent experiments, representing more than 30 TUMSN from individual patients. *, $P < 0.05$; nonparametric Wilcoxon test. n.s., not significant.



pDC are well recognized for their role in antiviral immunosurveillance driven by type I IFNs production (5). In addition, excessive production of IFN- α by pDC that are chronically activated by [LL37/self-nucleic acids] complexes participated to the development/maintenance of noninfectious autoimmune/inflammatory pathologies (8, 9). In contrast, in breast tumors we observe that TApDC are strongly inhibited for their IFN- α production upon stimulation with exogenous TLR-L *in vitro*, in agreement with a previous study in head and neck cancer (16) and our recent work in ovarian carcinoma (24). As (i) tumors have been shown to express LL37 (25) and (ii) endogenous danger signals such as self-nucleic acids (26) are released from dying tumor cells, it is tempting to speculate that, upon (LL37/self-nucleic acids) complexes recognition TApDC might contribute to tumor immunosurveillance through type I IFNs production. This is consistent with the partially activated phenotype of breast TApDC. Thus, the tumor has evolved mechanisms to inhibit type I IFNs secretion

by TApDC to prevent an effective antitumor response and favor tumor progression. This hypothesis is currently under investigation but it is supported by recent works showing that (i) type I IFN is selectively required by DC for immune rejection of tumors (27, 28) and (ii) the type I IFN signature is predictive of responses to anthracyclines in breast cancer patients (29).

Consistent with TApDC defect in IFN- α production, we show that soluble factors derived from breast tumors environment block type I IFNs production by healthy activated pDC *in vitro*. We recently showed in ovarian cancer that TGF- β and TNF- α from breast tumors environment cooperate to inhibit IFN- α secretion by TApDC (24). Our ongoing study is pointing to similar mechanisms in breast tumors (Sisirak, submitted) but also to cell-associated molecules such as BST-2 that (i) is expressed by BCC lines and (ii) inhibits TLR-triggered IFN- α secretion by healthy pDC (30). It is likely that the main source of inhibitory factors in the breast tumors environment are the immune cells and/or stromal cells

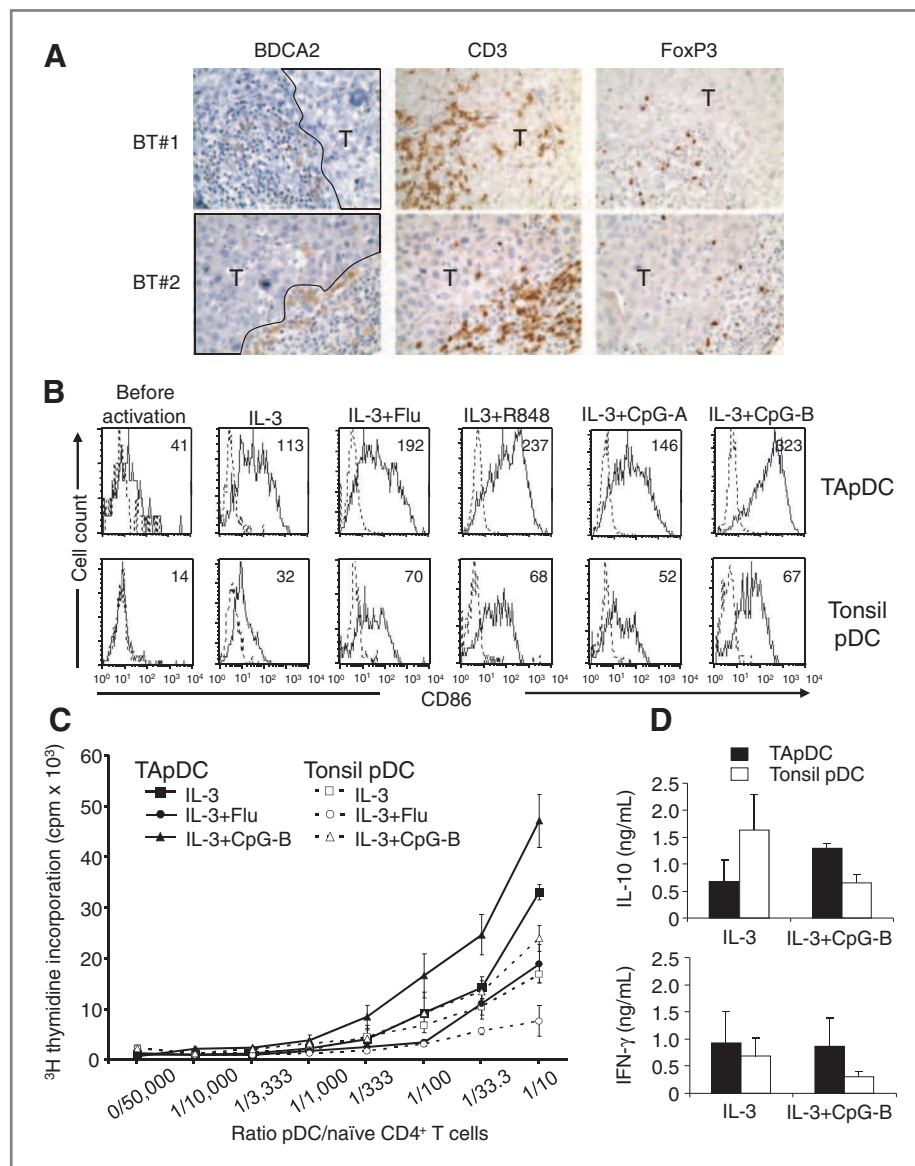


Figure 4. TLR-activated TApDC acquire a fully mature phenotype and induce naïve CD4^+ T-cell proliferation and differentiation of IL-10-secreting T cells. **A**, IHC analysis on paraffin-embedded breast tumor sections was conducted using anti-BDCA2, anti-CD3, or anti-FoxP3 (brown; $\times 40$). T, tumor mass. **B**, activation phenotype of 40-hour differentially stimulated TApDC and tonsil pDC was monitored by analyzing CD86 expression by flow cytometry. Data are representative of 5 independent experiments and MFI values of total cells are indicated in each histogram. **C**, purified tonsil pDC and TApDC were cultured with IL-3, flu, or CpG-B for 24 hours and then incubated at graded doses with allogeneic naïve CD4^+ T cells for 5 days as specified in Supplementary Materials and Methods. T-cell proliferation was determined by ^3H thymidine incorporation. Data are expressed as mean $\pm$ SD and are representative of 3 independent experiments. **D**, purified tonsil pDC and TApDC were cultured with IL-3 or CpG-B for 24 hours and then incubated with allogeneic naïve CD4^+ T cells for 5 days as specified in Supplementary Materials and Methods. T-cell cytokine production was determined in coculture supernatant by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SD and representative of 2 independent experiments.

(fibroblasts and mesenchymal stem cells) because BCC lines supernatants did not block pDCs' innate functions.

The absence of inhibition of pDC maturation and production of IP-10/CXCL10 formally excludes a general downregulation of TLR expression by the breast tumors environment in contrast to what has been observed in head and neck cancer (16). Our ongoing studies are identifying the molecular mechanisms involved in TApDC dysfunction (Sisirak, submitted).

Although TApDCs' innate functions are strongly impaired by breast tumors, they exhibit similarly to ovarian cancers (24) exacerbated ability to induce allogeneic naïve CD4^+ T-cell proliferation and differentiation into IL-10-producing cells, that were shown to be suppressive cells *in vitro* (11). Taken together with the study showing that pDC induce IL-10-producing CD8^+ Treg in ovarian cancer (20), these findings suggest that pDC will favor an immunosuppressive IL-10-rich

environment. Our FACS and IHC analysis show strong correlation between TATreg and TApDC infiltrate as well as their *in situ* colocalization in breast tissues. In line with these observations, we observe that breast TApDC are specialized in promoting the expansion of preexisting natural Foxp3^+ Treg *in vitro*, in agreement with other studies showing that pDC induce Treg proliferation (14, 15, 31–34). We also report herein, that soluble factors from the breast tumors environment condition pDC to become tolerogenic through their ability to promote Treg expansion. A tolerogenic role for pDC was also recently reported *in vivo* in different mouse models (see ref. 10 for review), by either promoting Treg or Tr1 cells or directly suppressing effector T-cell responses. Although in other contexts, pDC-driven Treg generation from naïve T cells has been reported both *in vitro* (12, 13, 35–38) and *in vivo* (39, 40), breast tumors environment-conditioned pDC do not induce Foxp3^+ Treg differentiation from naïve CD4^+ T cells (Supplementary

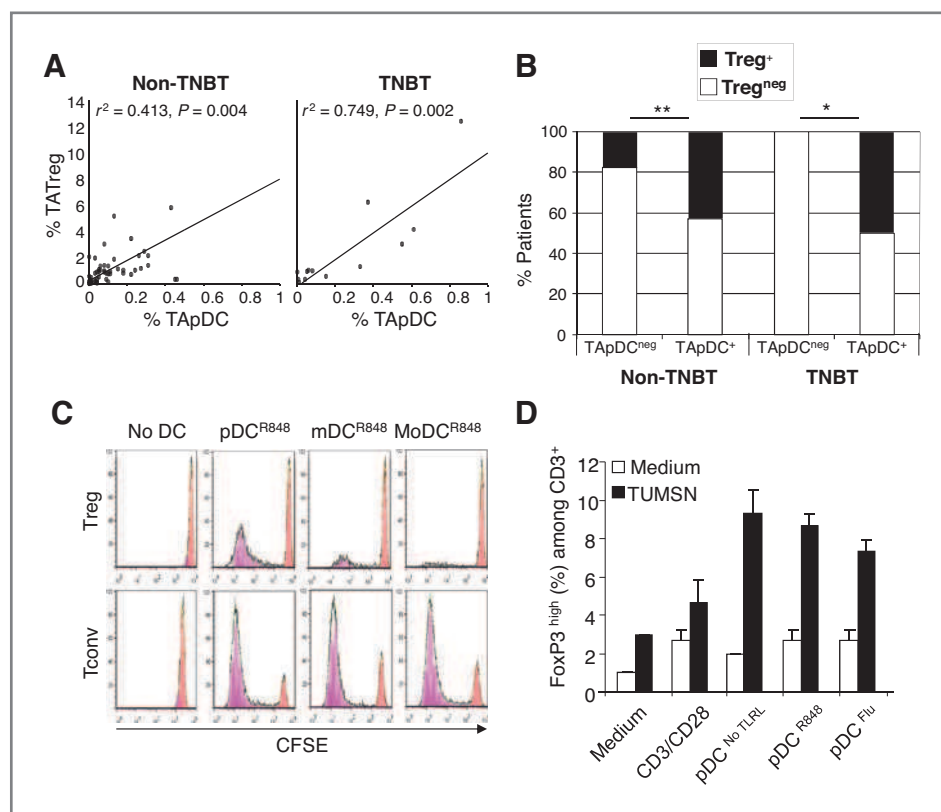


Figure 5. IFN- α -deficient TapDC increase Treg expansion. **A**, Spearman rank correlations between the proportions of CD4⁺BDCA2⁺CD123⁺ pDC and CD4⁺CD45RO⁺CD25^{high} Treg as determined by flow cytometry in non-TNBT ($n = 48$) and TNBT ($n = 12$). **B**, percentages of breast cancer patients with low or high numbers of TATreg [the highest quartile ≥ 26.7 and 61.8 FoxP3⁺ cells for non-TNBT and TNBT, respectively, was used as cutoff value as defined in a retrospective study by IHC (3)] among patients with or without TapDC in non-TNBT ($n = 133$) versus TNBT ($n = 18$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; Fischer exact test. **C**, pDC, mDC, and MoDC were preactivated for 24 hours with IL-3 or GM-CSF and R848, washed, and cocultured for 5 days with CFSE-labeled conventional memory CD4⁺CD25^{Low/Neg}CD127^{+/+} T cells (Tconv) or CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/-} Treg in the absence of IL-2. At day 5, CFSE dilution was analyzed on CD3⁺ T cells. Percentages of CFSE-diluted cells are indicated. **D**, healthy pDC were pretreated for 16 hours with IL-3 with or without 25% TUMSN before activation or not with R848 or flu for 24 hours. Memory CD4⁺ T cells were then added with IL-2 (100 IU/mL) at 25% v/v for 5 days. Anti-CD3/anti-CD28 expandbeads were used as control. FoxP3 expression was analyzed on CD3⁺ viable cells.

Fig. S6). These results provide evidence that TapDC may contribute to tumor progression through Treg expansion. This unique capacity of TapDC is because of ICOS/ICOS-L interaction between TapDC and TATreg, respectively (Faget; submitted for publication).

Of most importance, the inhibition of type I IFNs production by TapDC is required for this tolerogenic TapDC function because exogenous IFN- α (i) blocks TapDC-mediated Treg expansion and (ii) potentiates IFN- γ and inhibits IL-10 production by memory CD4⁺ T cells highlighting a shift toward Th1 phenotype instead of tolerogenic memory CD4⁺ T-cell activation. Our findings are supported by recent publications showing that through a direct effect on Ag-presenting cells and by affecting Treg proliferation and differentiation, IFN- α sustains and drives CD4⁺ effector functions (41, 42). Thus, *in vivo* local interactions between IFN- α -deficient TapDC and TAT cell (ref. 3 and Faget; submitted for publication) lead to TATreg and Tr1 expansion, favoring an immunosuppressive environment that may contribute to tumor immune escape and progression.

Overall, our data provide direct evidence that TapDC have an important immunopathologic role through Treg expansion

in human breast cancer that likely explain their deleterious impact on the clinical outcome. The positive correlation between TapDC and TATreg content and tumor aggressiveness as observed in TNBT strengthens our previous observations showing that infiltration of primary breast tumors by pDC correlates with poor prognosis (4). It also corroborates our recent findings in ovarian cancer and from others in melanoma showing that TapDC accumulation correlates with early relapse (24, 43). TNBT represent about 15% of all breast cancers but they have the severest prognosis. It represents an important clinical challenge and little is known about their biology (44). Mechanisms beyond this predominant TapDC infiltration in TNBT is an important question that is currently under investigation. Of note, because of the low incidence of TNBT, we could not analyze the impact of TN status on the functional alteration of *ex vivo* purified TapDC nor the impact of pDC on the clinical outcome of TNBT.

In conclusion, we identify in human breast cancer a TapDC defect in IFN- α production leading to TATreg expansion and contributing to breast tumor progression. These findings uncover the mechanisms that mediate the deleterious impact of pDC infiltration in breast tumors and would provide new

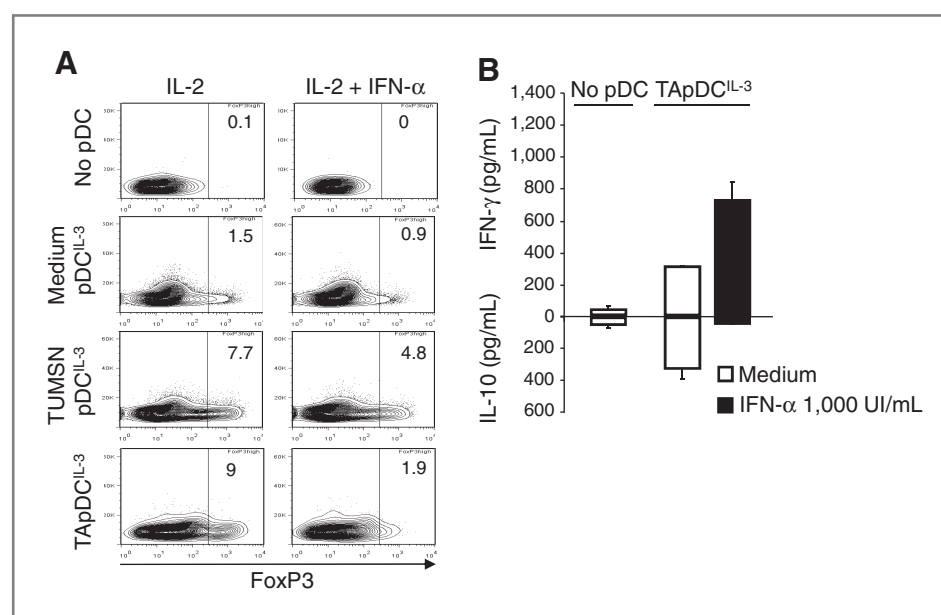


Figure 6. Exogenous IFN-α reverts tolerogenic properties of TApDC. A, healthy pDC or TApDC were pretreated with IL-3 ± 25% TUMSN for 24 hours and then cocultured with memory CD4⁺ T cells in the presence of IL-2 (100 IU/mL) ± IFN-α (1,000 IU/mL) for 5 days. FoxP3 expression was analyzed on CD3⁺ viable cells. B, 24-hour IL-3- or IL-3+R848-activated TApDC were cocultured with healthy CD4⁺ T cells during 5 days in presence of IL-2 (100 IU/mL) ± IFN-α (1,000 IU/mL). IL-10 and IFN-γ secretion was measured by ELISA. Data are representative of 3 independent experiments.

therapeutic approaches targeting pDC, as in skin cancers (22, 23, 45, 46). We recently obtained evidences in a mouse mammary tumors model that reactivation of TApDC leads to tumor regression and antitumor immune responses (Le Mercier and colleagues, manuscript in preparation). Thus, restoring TApDC innate function might represent an attractive therapeutic strategy for localized breast tumors.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: V. Sisirak, J. Faget, J.-Y. Blay, C. Menetrier-Caux, C. Caux, N. Bendriss-Vermare

Development of methodology: V. Sisirak

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): V. Sisirak, J. Faget, M. Gobert, N. Goutagny, N. Vey, I. Treilleux, G. Poyet, S.I. Labidi-Galy, S. Goddard-Leon, T. Bachelot, I. Puisieux
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): V. Sisirak, J. Faget, N. Goutagny, S.I. Labidi-Galy, A. Bajard, J.-Y. Blay, C. Caux, N. Bendriss-Vermare

Writing, review, and/or revision of the manuscript: V. Sisirak, T. Bachelot, J.-Y. Blay, C. Caux, N. Bendriss-Vermare

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): V. Sisirak, S. Renaudineau, A. Puisieux, J.-Y. Blay, N. Bendriss-Vermare

Study supervision: J.-Y. Blay, C. Caux, N. Bendriss-Vermare

Performing technical experiments: M. Gobert

Contributed new reagents or analytic tools: I. Durand

Provided helpful discussions: I. Le Mercier

Acknowledgments

The authors are grateful to the breast cancer patients who consented to participate in this study and to the medical staff and the Centre de Ressources Biologiques from the CLB who provided us with breast tumor specimens. We thank doctors and colleagues from clinics and hospitals who provide us with blood and tonsils samples. We thank X.-N. N'Guyen and C. Rigal for early technical contribution and A. Besse for help with statistical analyses.

Grant Support

This work was funded by institutional grants from Breast Cancer Research Foundation, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Comité départemental de Saône-et-Loire et du Rhône de la Ligue nationale contre le cancer, Lyon Biopole DEMINAP and PLATINE projects, and Institut National du Cancer grant ACI-63-04, ACI 2007-2009, and Met-escape 2007. V. Sisirak is a recipient of a grant from the Région Rhône-Alpes and from ARC. J. Faget and M. Gobert are recipients of a grant from the Ligue Nationale contre le cancer.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received October 21, 2011; revised June 20, 2012; accepted July 12, 2012; published OnlineFirst July 25, 2012.

References

1. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006;6:715-27.
2. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239-52.
3. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000-9.
4. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:7466-74.
5. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 2011;29:163-83.
6. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008;29:352-61.
7. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2007;27:481-92.
8. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human

- dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 2009;206:1983–94.
9. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with anti-microbial peptide. *Nature* 2007;449:564–9.
 10. Matta BM, Castellana A, Thomson AW. Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur J Immunol* 2010;40:2667–76.
 11. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 2007;204:105–15.
 12. Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 2010;115:5366–75.
 13. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;173:4433–42.
 14. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3(+) regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008;28:870–80.
 15. Ouabed A, Hubert FX, Chabannes D, Gautreau L, Heslan M, Josien R. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J Immunol* 2008;180:5862–70.
 16. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003;63:6478–87.
 17. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001;7:1339–46.
 18. Perrot I, Blanchard D, Freymond N, Isaac S, Guibert B, Pacheco Y, et al. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol* 2007;178:2763–9.
 19. Watkins SK, Zhu Z, Riboldi E, Shafer-Weaver KA, Stagliano KE, Sklavos MM, et al. FOXP3 programs tumor-associated DCs to become tolerogenic in human and murine prostate cancer. *J Clin Invest* 2011;121:1361–72.
 20. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:5020–6.
 21. Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, Carrasco R, Bandi M, Hideshima T, et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* 2009;16:309–23.
 22. Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2007;204:1441–51.
 23. Urošević M, Dummer R, Conrad C, Beyeler M, Laine E, Burg G, et al. Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1143–53.
 24. Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, Gobert M, Treilleux I, Bajard A, et al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2011;71:5423–34.
 25. Heilborn JD, Nilsson MF, Jimenez CI, Sandstedt B, Borregaard N, Tham E, et al. Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *Int J Cancer* 2005;114:713–9.
 26. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516–21.
 27. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, et al. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2011;208:2005–16.
 28. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, et al. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 2011;208:1989–2003.
 29. Quidville V, Conforti R, Zoubir M, André F, Mathieu MC, Delaloge S, et al. Lymphocyte infiltration and interferon response to predict efficacy of anthracyclines. *Annals Oncol* 2009;20:56.
 30. Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Bao M, et al. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med* 2009;206:1603–14.
 31. Irla M, Kupfer N, Suter T, Lissilaa R, Benkhoucha M, Skupsky J, et al. MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 2010;207:1891–905.
 32. Janke M, Witsch EJ, Mages HW, Hutloff A, Kroczeck RA. Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 2006;118:353–60.
 33. Kang HK, Liu M, Datta SK. Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells. *J Immunol* 2007;178:7849–58.
 34. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007;117:2570–82.
 35. Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 2008;181:5396–404.
 36. Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, et al. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 2010;184:2999–3007.
 37. Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, et al. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2008;118:3431–9.
 38. Martin P, Del Hoyo GM, Anjuere F, Arias CF, Vargas HH, Fernandez L, et al. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8 α ⁺ B220⁺ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 2002;100:383–90.
 39. Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 2008;9:1253–60.
 40. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006;7:652–62.
 41. Pace L, Vitale S, Dettori B, Palombi C, La Sorsa V, Belardelli F, et al. APC activation by IFN- α decreases regulatory T cell and enhances Th cell functions. *J Immunol* 2010;184:5969–79.
 42. Golding A, Rosen A, Petri M, Akhter E, Andrade F. Interferon- α regulates the dynamic balance between human activated regulatory and effector T cells: implications for antiviral and autoimmune responses. *Immunology* 2010;131:107–17.
 43. Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ, Donskov F, Hoyer M, Sjoegren P, et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 2012;118:2476–85.
 44. Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist* 2011;16(Suppl 1):1–11.
 45. Liu C, Lou Y, Lizée G, Qin H, Liu S, Rabinovich B, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1165–75.
 46. Nierkens S, Van den Broek MH, Garcia Z, Togher S, Wagenaars J, Wassink M, et al. Immune adjuvant efficacy of CpG oligonucleotide in cancer treatment is founded specifically upon TLR9 function in plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Res* 2011;71:6428–37.

Supplemental Information

SI Materials and Methods

Reagents and antibodies (Abs). IL-3 (Peprotech), GM-CSF (Schering-Plough), IL-2 (Chiron); formaldehyde-inactivated influenza (flu) virus (A/Wisconsin/67/05) (generous gift from Aventis Pasteur), CpG-A/ODN 2336 and CpG-B/ODN10104 (Coley Pharma), and R848 (InvivoGen).

Abs for flow cytometry. Directly conjugated mAbs were purchased from Becton Dickinson (BD) Biosciences: CD16, CD20, CD56, HLA-DR (all coupled to FITC), CD11c, CD123, anti-CD86 (all coupled to PE) ; from Dako : CD19 FITC; from Beckman Coulter: CD3 and CD14 FITC, CD40 and CD83 PE, CD4 PE-Cy5 ; from Miltenyi: CD123 and BDCA2 FITC, and BDCA4 PE ; from eBiosciences: FoxP3 PE.

Abs for IHC. BDCA-2 (mouse IgG1, clone 104C12; Dendritics, France), CD3 (mouse IgG2a, clone HIT3a, BD Biosciences) on frozen tissues, CD3 (polyclonal rabbit IgG, Dako) on paraffin-embedded tissues, FoxP3 (mouse IgG1, clone 236AE/7, AbCam), and cytokeratin (mouse IgG1, clone AE1/AE3; Dako).

Isolation of pDC, naive and memory CD4⁺ T cells and *in vitro* generation of MoDC

BT samples, tonsils, and blood were processed as previously described (3). pDC were purified from lineage(Lin)-negative enriched MNC using CD304/BDCA-4 microbeads kit or a negative selection kit (Miltenyi Biotec) or FACS[®]-sorting (FACSVantage SETM DiVa flow cytometer, BD Biosciences) as Lin⁻CD4⁺CD11c⁻ cells. Purity was routinely >98%. mDC were purified from tonsil MNC by FACS[®]-sorting as Lin⁻CD4⁺CD11c⁺ cells. MoDC were obtained from blood-purified monocytes after 7 days differentiation in GM-CSF (100 ng/ml) and IL-4 (50 UI/ml) (Schering-Plough, Kenilworth USA). Naïve or memory CD4⁺ T cells (>95%

purity) were obtained from tissues after magnetic depletion using anti-CD8, -CD11b -CD14, -CD19, -CD16, -CD45RO, -CD56, and -glycophorin A/CD235a mAbs followed by anti-IgG beads (Invitrogen) and including either anti-CD45RO or -CD45RA mAb respectively, as previously described (3). $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ Treg and $CD4^+CD25^-CD127^{low/+}$ conventional $CD4^+$ T cells were FACS[®]-sorted from purified memory $CD4^+$ T cells. The purity was routinely > 95%.

Preparation of breast tumor-derived supernatants (TUMSN)

Single-cell suspensions from primary BT were incubated at a final concentration of 1.5×10^6 cells/ml in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS (Lonza), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-Glutamine (all from Invitrogen)). Culture supernatants were collected after 48h, filtrated on 0.22 µm, and frozen.

Detection of cytokines

The ELISA for human IFN- α , IL-10, IFN- γ (all from Bender MedSystems) and IP-10/CXCL10 (BD Biosciences) were used according to manufacturer's instructions.

Tumor tissue IHC

Frozen breast tumor sections (5 µm) were rehydrated in PBS 5 min and then fixed in acetone for 20 min at 4°C. Sections were first blocked for peroxidase activity with peroxidase blocking reagent (Dako) for 10 min. The non-specific sites were then blocked with Ab diluent (Dako) for 15 min. BT sections were then subjected to sequential double IHC analysis with mAbs against BDCA-2 (10 µg/ml), CD3 (6.5 µg/ml), and cytokeratin (dilution 1:50 in buffer) using ImmPRESS anti-mouse Ig peroxidase kit (Abcys), as described (3). The sections were developed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako) and Histogreen as substrates (Abcys).

All the incubations were carried out in a humid chamber at room temperature. The slides were rinsed with PBS in between incubation. Slides were mounted in Eukitt® mounting medium (O. Kindler GmbH, Freiburg). Expression was analyzed with a Leica DM3000 microscope (Leica) with 40x/0.75 HCX PL Fluotar and 20x/0.50 HC PL Fluotar objectives (Leica). Images were captured with a Basler A102Fc digital camera (Basler Vision Technologies) and acquired with TRIBVN ICS software (TRIBVN, Chatillon).

SI Figure Legends

Supplementary Figure S1. Overall survival and relapse-free survival of patients according to the presence of CD123⁺ pDC in primary breast carcinoma. Tumors were stratified as positive or negative for CD123. Survival curves were plotted with the Kaplan Meier method, and we used the log-rank test to compare survival. Multivariate analysis of prognostic factors for overall survival and relapse-free survival was done with the Cox model. All statistical analyses were done with the procedures of the SPSS 10.02 package.

Supplementary Figure S2. Identification of pDC and mDC in blood and tissues. (A) Single-cell suspensions of freshly resected tumors and blood of patients with primary breast cancer was prepared. pDC and mDC were identified within Lineage (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)-negative cells as CD4⁺ CD11c⁻ and CD4⁺ CD11c⁺ cells respectively. Numbers indicate the frequency of pDC and mDC (percentage) among total cells of the tumor single-cell suspension or PBMC. The identity of pDC and mDC was confirmed by analyzing BDCA2 and BDCA1 expression on Lin⁻ CD4⁺ CD11c⁻ and CD11c⁺ cells respectively. These results are representative of all primary BT (n=55) and blood (n=48 for control subjects and

n=50 for cancer patients) tested. (B) For subsequent phenotypic analysis, pDC from patients' primary tumors and blood as well as from healthy individuals' tonsil and blood were identified within total cells as CD4⁺ and CD123⁺ cells which correspond to >98% BDCA2⁺ pDC. Datas are representative of five independent experiments.

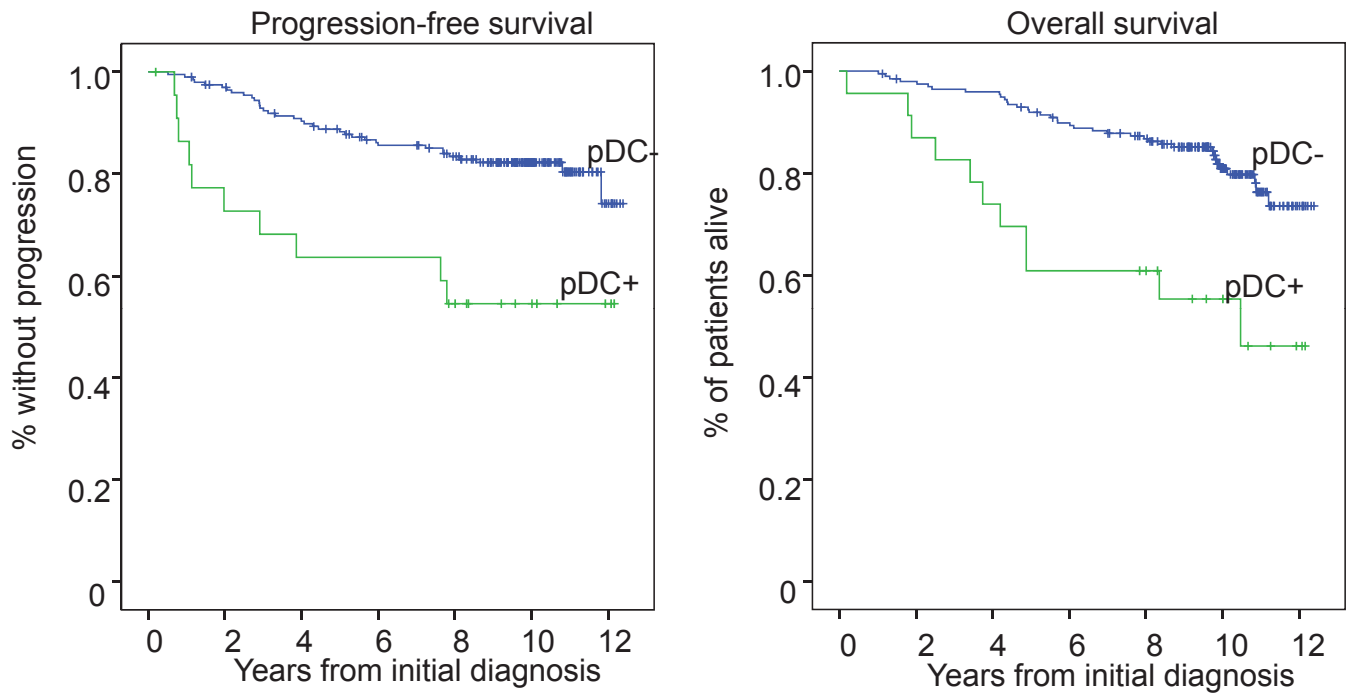
Supplementary Figure S3. Breast TUMSN, but not BCCSN, inhibit IFN- α production by CpGA- or Flu-activated pDC in a dose-dependent manner. (A) Supernatants of different breast cancer cell (BCC) lines (BT-20, CAMA-1, MCF-7, CLB-SAV, SKBR-3, T47D, HCC1806) (all from ATCC except CLB-SAV that was generated in house) (BCCSN) were collected after 48 h culture in complete medium at a final concentration of 1.5×10^6 cell/ml in petri dishes, filtrated on 0.22 μ m, and frozen. Healthy pDC were cultured with IL-3 either alone or in combination with 25% of these BCCSN for 16 h before flu was added for another 24 h. IFN- α production was measured by specific ELISA. Datas are expressed as mean $\pm$ SD and are representative of two independent experiments. (B) Healthy pDC were cultured with IL-3 either alone or in combination with various concentrations of TUMSN (n = 18 different donors) for 16 h before flu or CpG-A were added for another 24 h. IFN- α production was measured by specific ELISA. Datas are expressed as mean and are representative of four independent experiments.

Supplementary Figure S4. IHC analysis on frozen BT sections was performed using anti-BDCA2 (brown) together with anti-CD3 (green, a) or anti- cytokeratine (green, b) antibodies (x10). Magnification in the insert box is x40, horizontal bars correspond to 50 μ m and stainings are representative of three independent tumors.

Supplementary Figure S5. FACS analysis of CD40, CD80, and CD86 on TApDC following 40 h-culture in IL-3 alone or in combination with flu, R848, CpG-A, and CpG-B. Results are expressed as mean MFI $\pm$ sd of duplicate wells and are representative of five independent experiments.

Supplementary Figure S6. Purified healthy pDC were cultured with IL-3 either alone or in combination with 25% of TUMSN for 40 h and then incubated for 5 days with allogeneic naive CD4⁺ T cells. Differentiation of naive CD4⁺ T cell into Treg cells was then measured by a FoxP3 staining by flow cytometry. Results are represented as dot plot after gating on alive CD4⁺ T cells and representative of three independent experiments.

Supplementary Figure S1



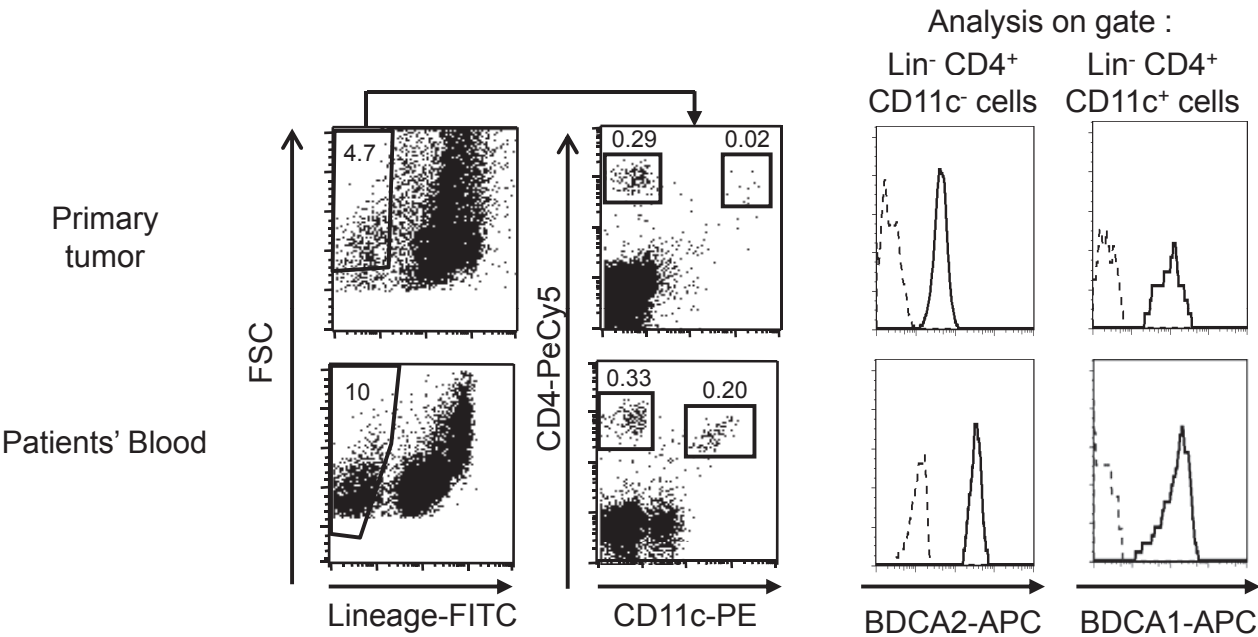
Multivariate analysis of prognostic factors for survival

Parameter	B	E.S.	p	Relative Risk
Overall survival				
pDC (CD123 IHC)	1.091	0.360	0.002	2.978
Axillary LN	0.107	0.023	0.000	1.113
Age	0.032	0.013	0.012	1.033
SBR	0.480	0.233	0.039	1.616
PgR+	-0.526	0.307	0.087	0.591
Progression free survival				
pDC (CD123 IHC)	1.412	0.371	0.000	4.104
ER	-0.806	0.315	0.010	0.447
pT	0.687	0.276	0.013	1.987
Axillary LN	0.069	0.028	0.015	1.071

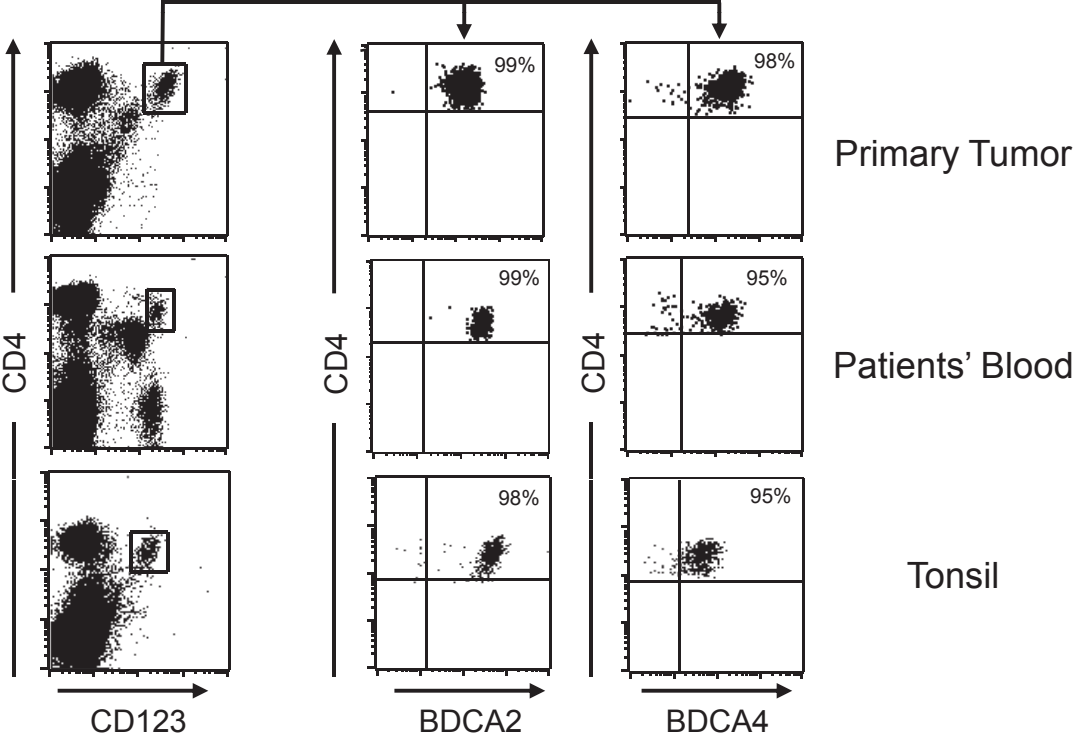
The following parameters were included in the model: pT, number of involved axillary nodes, Progesterone receptors (PgR), oestrogen receptors (ER), Age, SBR, Presence of pDC in primary tumor samples using IHC (CD123+, yes vs no)

Supplementary Figure S2

A

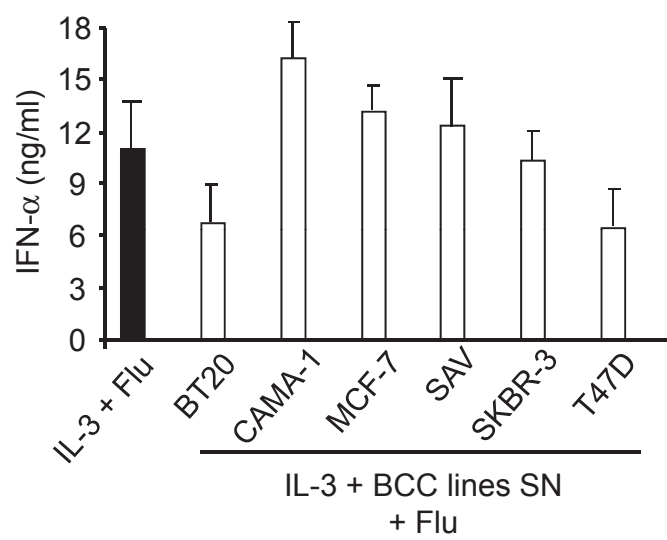


B

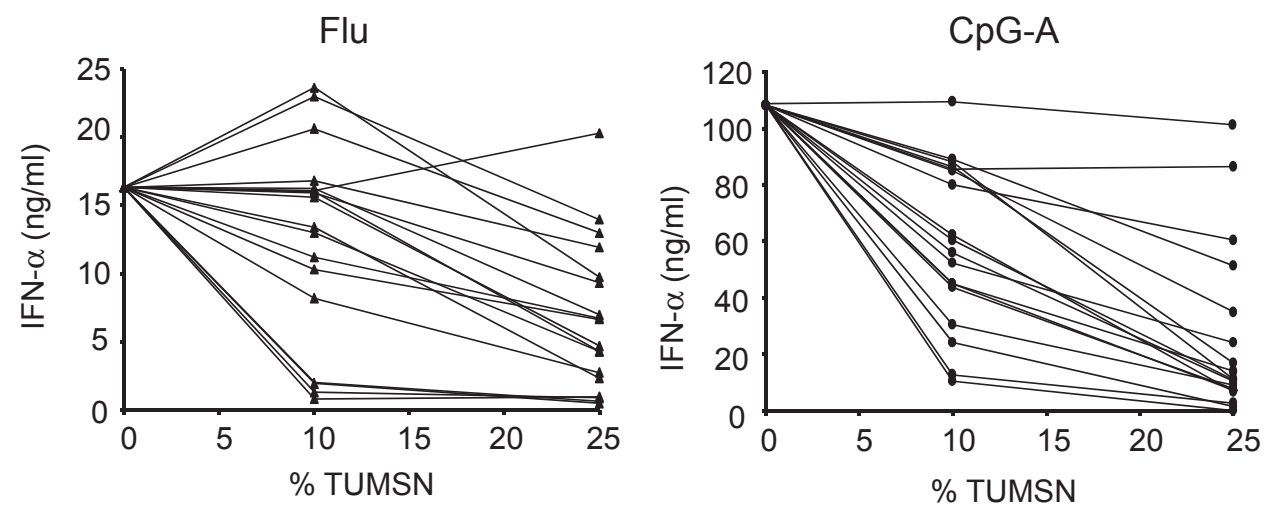


Supplementary Figure S3

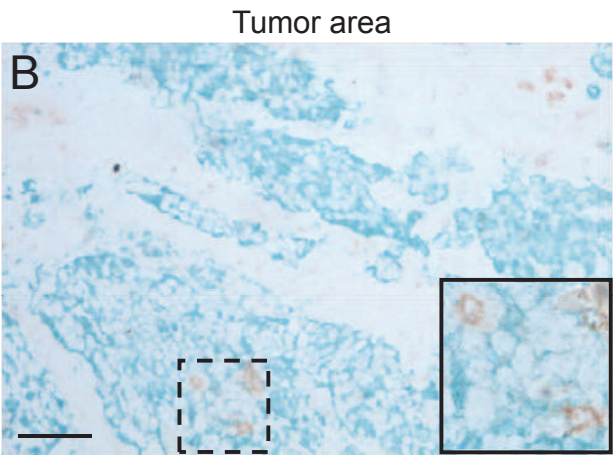
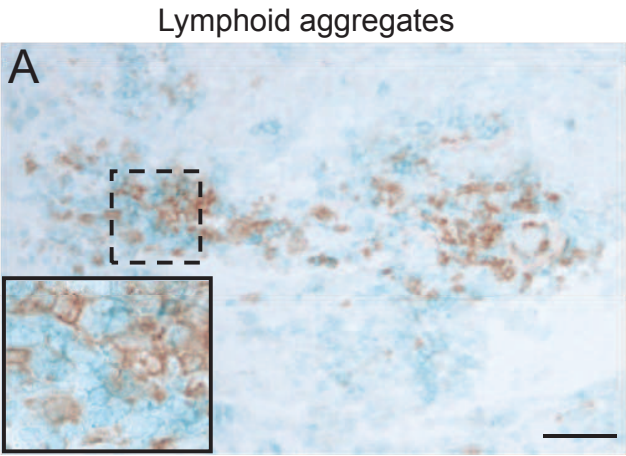
A



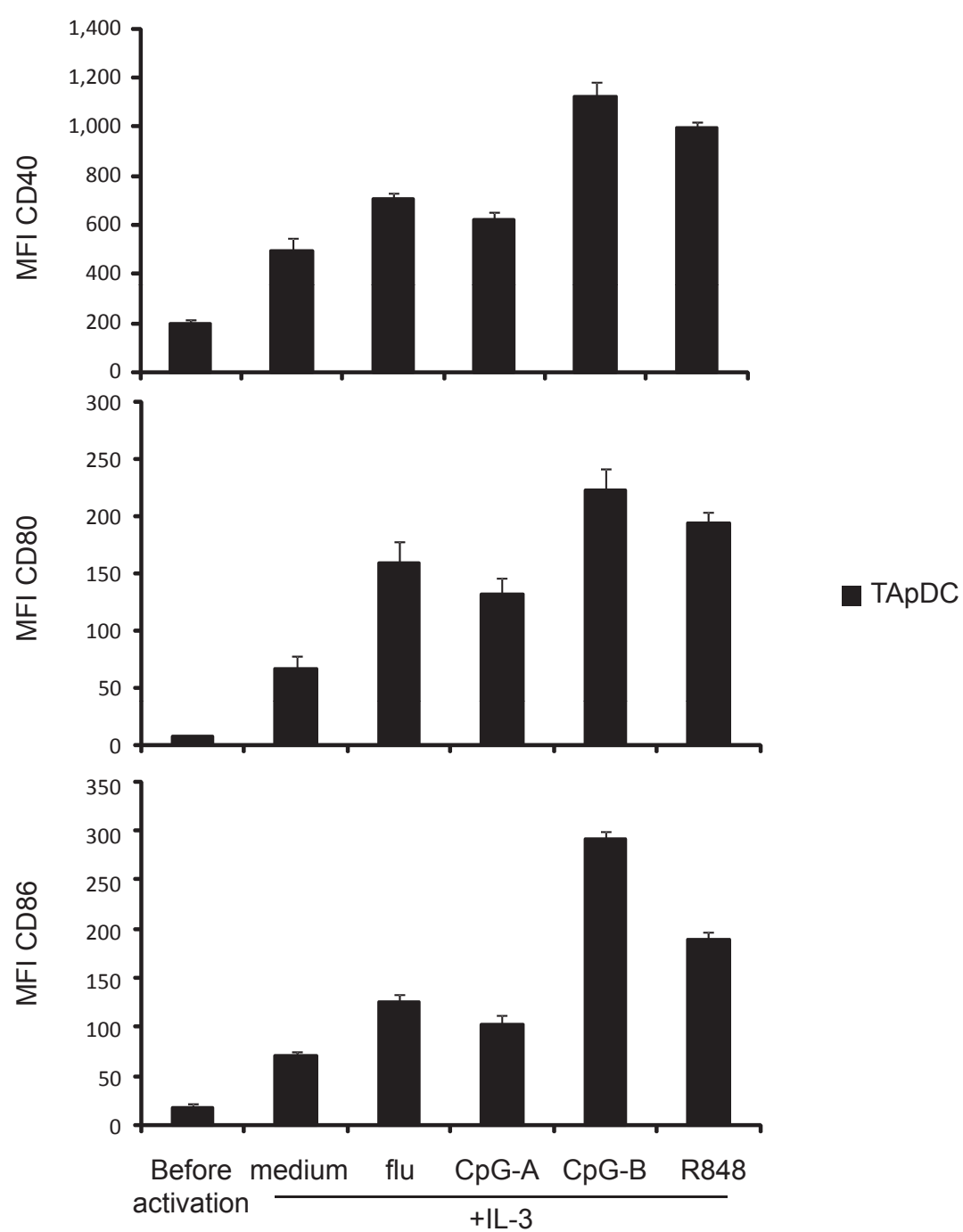
B



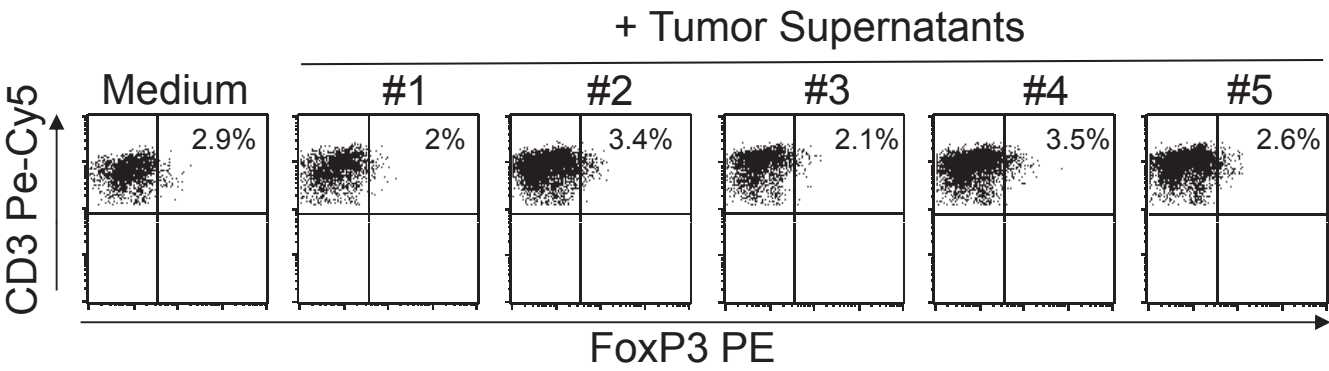
Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S5



Supplementary Figure S6



Supplementary Table S1. Correlations between tumor characteristics and TA(p/m)DC

Number of patients (n=60)			TApDC (%)		p=	TAmDC		p=
			<=0.23% (n=45)	>0.23% (n=15)		<=0.07% (n=40)	>0.07% (n=12)	
		n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Age	<=59	33 (55.0)	23 (51.1)	10 (66.7)	0.375	22 (55.0)	7 (58.3)	1.000
	>59	27 (45.0)	22 (48.9)	5 (33.3)		18 (45.0)	5 (41.7)	
Tumor size	T1-2	37 (61.7)	26 (57.8)	11 (73.3)	0.366	27 (67.5)	5 (41.7)	0.175
	T3-4	23 (38.3)	19 (42.2)	4 (26.7)		13 (32.5)	7 (58.3)	
Lymph node involvement	0	19 (31.7)	13 (28.9)	6 (40.0)	0.525	13 (32.5)	2 (16.7)	0.470
	>0	41 (68.3)	32 (71.1)	9 (60.0)		27 (67.5)	10 (83.3)	
ER	0	17 (28.3)	11 (24.4)	6 (40.0)	0.324	8 (20.0)	5 (41.7)	0.147
	+	43 (71.7)	34 (75.6)	9 (60.0)		32 (80.0)	7 (58.3)	
PR	0	22 (36.7)	16 (35.6)	6 (40.0)	0.766	13 (32.5)	5 (41.7)	0.731
	+	38 (63.3)	29 (64.4)	9 (60.0)		27 (67.5)	7 (58.3)	
SBR grading	1-2	20 (33.3)	17 (37.8)	3 (20.0)	0.343	13 (32.5)	6 (50.0)	0.317
	3	40 (66.7)	28 (62.2)	12 (80.0)		27 (67.5)	6 (50.0)	
Mitotic index	1 or 2	32 (53.3)	28 (62.2)	4 (26.7)	0.034	23 (57.5)	5 (41.7)	0.510
	3	28 (46.7)	17 (37.8)	11 (73.3)		17 (42.5)	7 (58.3)	
HER2/neu	unknown	3	3	0	0.709	1	2	0.364
	0-2+	46 (80.7)	33 (78.6)	13 (86.7)		33 (84.6)	7 (70.0)	
	3+	11 (19.3)	9 (21.4)	2 (13.3)		6 (15.4)	3 (30.0)	
Triple negative	unknown	1	1	0	0.057	0	1	0.385
	0	47 (79.7)	38 (86.4)	9 (60.0)		34 (85.0)	8 (72.7)	
	+	12 (20.3)	6 (13.6)	6 (40.0)		6 (15.0)	3 (27.3)	

NOTE. *P* of a Fisher's exact test analysis of the correlation between clinical and biological parameters and TApDC or TAmDC infiltration.

For technical reasons, only 52 patients were analyzed for TAmDC infiltrate.

6.3 Importance de l'axe de co-stimulation ICOS/ICOS-L dans l'expansion des Treg et la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T induite par les pDC de tumeur de sein

Article n°3 Faget J. *et al* Cancer Res 2012, 72 (23):6130-41

Les observations initiales de l'équipe (Gobert et al., 2009) montrent une forte expression d'ICOS et de Ki67 par les TA-Treg comparé aux Treg du sang, et aux autres cellules T CD4 ou CD8 de la tumeur ou du sang. D'après la littérature, en présence de pDC, ICOS peut participer à la prolifération des Treg (Ito et al., 2008) et à la polarisation des cellules T CD4 naïves vers un profil sécrétoire de type « Tr1-like » ($IL-10^+IFN\gamma^+$) (Ito et al., 2007). Dans cet article nous avons voulu analyser l'impact de l'axe de co-stimulation ICOS/ICOS-L dans la prolifération des TA-Treg. Les TA-Treg issus de tumeurs ne prolifèrent pas *in vitro* suite à l'engagement du TCR et de CD28 en présence d'IL-2 exogène, contrairement aux autres cellules TA-TCD4 de la tumeur et aux Treg purifiés de sang de donneurs sains. La proximité entre TA-Treg et TA-pDC dans la tumeur et les résultats des expériences *in vitro*, montrant que les pDC contrairement aux signaux anti-CD3/anti-CD28 favorisent une forte prolifération des cellules FoxP3⁺ suggèrent l'importance du dialogue pDC-Treg dans la prolifération des TA-Treg (Article n°2). En dépit de leur phénotype semi-mature, les pDC de tumeur, n'expriment pas ICOS-L alors que les données de la littérature soulignent que les pDC sont les seules, parmi les sous-populations de DC du sang, à sur-exprimer fortement ICOS-L après activation (Janke et al., 2006). Ces données inattendues nous ont conduits à émettre l'hypothèse que l'engagement d'ICOS-L par ICOS induisait la modulation de son expression sur les TA-pDC. L'utilisation d'un Ac neutralisant anti-ICOS *in vitro*, dans des co-cultures de pDC avec des T ICOS⁺, ou directement dans des cultures de dilacérât de tumeurs primaires de sein, permet de restaurer l'expression d'ICOS-L sur les pDC. L'addition de l'Ac anti-ICOS dans des co-cultures de pDC activées avec des T CD4 allogéniques de donneurs sains ou de tumeurs démontre que l'axe de co-stimulation ICOS/ICOS-L est indispensable pour induire la prolifération des Treg mais n'affecte pas la prolifération des autres cellules T CD4 par les pDC. Enfin, le blocage d'ICOS réduit fortement la sécrétion d'IL-10 mais ne module que faiblement la sécrétion d'IFN- γ montrant l'importance de l'axe de co-stimulation ICOS/ICOS-L dans l'induction d'une réponse T immunosuppressive par les pDC. Des analyses d'IHC sur une cohorte rétrospective de 120 tumeurs primaires de sein nous ont permis de montrer qu'un nombre important de cellules ICOS⁺ dans les tumeurs est associé à un mauvais pronostic pour la SSR et la SG en analyse univariée confirmant l'impact négatif d'ICOS dans ces tumeurs.

ICOS-Ligand Expression on Plasmacytoid Dendritic Cells Supports Breast Cancer Progression by Promoting the Accumulation of Immunosuppressive CD4⁺ T Cells

Julien Faget^{1,2}, Nathalie Bendriss-Vermare^{1,2}, Michael Gobert^{1,2,3}, Isabelle Durand^{1,2}, Daniel Olive⁷, Cathy Biota^{1,3}, Thomas Bachelot⁵, Isabelle Treilleux^{4,5}, Sophie Goddard-Leon⁴, Emilie Lavergne⁶, Sylvie Chabaud⁶, Jean Yves Blay^{1,2,3,5}, Christophe Caux^{1,2,3}, and Christine Ménétrier-Caux^{1,2,3}

Abstract

Human breast tumors are infiltrated by memory CD4⁺ T cells along with increased numbers of regulatory T cells (Treg) and plasmacytoid dendritic cells (pDC) that facilitate immune escape and correlate with poor prognosis. Here, we report that inducible costimulatory molecule (ICOS), a T cell costimulatory molecule of the CTLA4/PD1/CD28 family, is expressed mostly by tumor-associated Treg in primary breast tumors. A large proportion of these ICOS⁺ Treg were Ki67⁺ and this evident proliferative expansion was found to rely on interactions with tumor-associated pDC. Indeed, tumor-associated Treg highly expanded in presence of pDC but failed to proliferate under CD3/CD28 signal. *In vitro* experiments revealed that the addition of a neutralizing anti-ICOS antibody blocked pDC-induced Treg expansion and interleukin-10 secretion by memory CD4⁺ T cells, establishing a pivotal role for ICOS in this process. Supporting these findings, the presence of ICOS⁺ cells in clinical specimens of breast cancer correlated with a poor prognosis. Together, our results highlight an important relationship between Treg and pDC in breast tumors, and show that ICOS/ICOS-L interaction is a central event in immunosuppression of tumor-associated memory CD4⁺ T cells. These findings strongly rationalize antibody-mediated ICOS blockade as a powerful clinical strategy to correct immune escape and promote therapeutic responses in breast cancer. *Cancer Res*; 72(23); 6130–41. ©2012 AACR.

Introduction

In several cancers, tumor growth and dissemination are associated with perversion of the immune system (1). We and others have shown that primary breast tumor-associated T cells (TA-T), are highly enriched in CD25^{hi}CD127^{low} FoxP3^{hi}CD4⁺ regulatory T cells (Treg; ref. 2) and that high infiltration of TA-Treg in breast tumor, and more particularly within lymphoid aggregates surrounding tumor correlates with poor prognosis (2). In the past decade, several studies highlighted the negative impact of TA-Treg on Th1 and cytotoxic T lymphocytes mediated antitumor immunity (3). Therapeutic targeting of Treg is clearly beneficial in mice as shown in multiple models based on anti-CD25 depletion (for review

refs. 3, 4) or FoxP3 deletion (3, 5). A similar approach developed in human using interleukin (IL)-2-toxin (Denileukin diftitox; ref. 6) showed low efficacy possibly because of its limited specificity and the existence of toxicity. In the objective to increase T cell antitumor immunity, early clinical trial with the anti-CTLA4 mAb, recently approved in the treatment of melanoma, and anti-PD-1/PD-L1 showed remarkable long-lasting clinical benefit (7, 8). However, contribution of Treg neutralization in the clinical efficacy of anti-CTLA4 mAb remains uncertain (9, 10). Thus, there is an urgent need of alternative therapeutic strategies to selectively neutralize TA-Treg. A first step along this objective is the understanding of the immunosuppressive networks operating in the breast tumor microenvironment. We therefore undertook to characterize the mechanisms controlling TA-Treg enrichment within breast tumor.

We recently published that human TA-Treg recruitment in breast tumor from blood occurred through CCR4/CCL22 axis (2, 11). Breast tumor TA-Treg are strongly activated, proliferate, and express high levels of the inducible costimulatory (ICOS) molecule (2), suggesting the local recognition of a tumor-associated antigen, likely through presentation by a dendritic cell (DC) population. The presence of TA-plasmacytoid DC (pDC) within tumors has been correlated with poor prognosis in breast tumor (12), ovarian carcinoma (13), and melanoma (14). Interestingly, pDC have been reported to strongly favor Treg proliferation in human (15) and rodent

Authors' Affiliations: ¹Team 11, Cancer Research Center of Lyon, INSERM; ²Université Lyon, ISPB; ³Centre Léon Bérard; ⁴Centre Léon Bérard, BioPathology Department; ⁵Centre Léon Bérard, Medical Oncology Department; ⁶Centre Léon Bérard, Biostatistic Department, Lyon, France; and ⁷Inserm U891 Institut Paoli Calmettes Marseille, France

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Christine Ménétrier-Caux, Centre Léon Bérard, CRCL INSERM U1052/CNRS 5286, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08, France. Phone: 33-4-7878-2750; Fax: 33-4-7878-2720; E-mail: christine.caux@lyon.unicancer.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2409

©2012 American Association for Cancer Research.

models (16). Furthermore, TA-pDC are impaired in their major function of high IFN α secretion levels in response to TLR7/9-L in ovarian (13) and breast cancer (17), and we recently showed that such functional defect strongly favors TA-pDC ability to induce TA-Treg proliferation and increases T-CD4⁺ IL-10 secretion (17), leading to the establishment of an immunosuppressive Tr1-like response.

Identified in 1999 (18), ICOS, a T cell costimulatory molecule of the CTLA4/PD1/CD28 family, plays a nonoverlapping function with CD28 (19) on CD4⁺ T cells. In particular, ICOS is critical in the regulation of humoral response (20) through its role on T follicular helper cell activation as illustrated in ICOS KO mice (21) and deficient patients (22). ICOS expression has also been linked with Treg maintenance in mice (23) and mucosal tolerance (24). In human ICOS plays a predominant role in pDC/T-cell interaction (25) and participates in naive CD4⁺ T cell polarization into IL-10-secreting Tr1-like cells (26). ICOS was also associated with Treg homeostasis in nonobese diabetic (NOD) mice (27) and with increased Treg proliferative capacity and immunosuppressive functions (28). All these observations led us to decipher the contribution of ICOS in the establishment of tolerance through TA-Treg amplification in breast tumor mediated by TA-pDC.

Using a new blocking mAb against ICOS (clone 314.8), we showed that ICOS blockade inhibited pDC-induced TA-Treg proliferation and reduced IL-10 secretion by memory TA-TCD4⁺ without interfering with mDC-induced TA-TCD4⁺ activation. Finally, we showed that the presence of ICOS⁺ cells within primary breast tumor correlated with poor patients' survival. Thus, supported by the clinical efficacy of anti-CTLA4 and anti-PD-1/PD-L1 (7, 8, 29), a neutralizing anti-ICOS mAb would represent a potent therapeutic drug to neutralize Treg in breast cancers.

Materials and Methods

Tumor single cell suspensions, CD4⁺ T cells and pDC isolation

Primary breast tumor samples and blood in anticoagulant (CTAD)-coated tubes were obtained from non-pretreated patients diagnosed for primary breast carcinoma provided by the Centre Léon Bérard (CLB) tissue bank after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was reviewed and approved by the Institutional Review Board of CLB. Human tonsils were obtained anonymously according to the institutional regulations and healthy donor (HD) human blood was purchased anonymously from the EFS.

Isolation of T cells and DC from tumor and healthy donor tissues

Tumor and tonsil single cell suspensions were generated as previously described (2). Healthy donor or patients' blood mononuclear cells were obtained by Ficoll density gradient. Viable HD-pDC (Lin⁻CD4⁺CD11c⁻) and HD-mDC (Lin⁻CD4⁺CD11c⁺) were fluorescence-activated cell sorting (FACS) sorted from tonsil samples as described previously (13).

TA-TCD4⁺ were positively isolated based on their CD4 expression (Life Technologies). HD-TCD4⁺ were obtained as untouched memory CD4⁺ T cells by depletion. Treg and Tconv

(defined as non-Treg memory T-CD4⁺) from blood and primary breast tumor were obtained using the CD25⁺ isolation kit (Life Technologies) or by FACS-sorting on the basis of a DAPI, CD4, CD25, CD127 stainings on memory HD-TCD4⁺.

Allogeneic DC/T-cell cocultures and anti-CD3/anti-CD28-coated beads T cells activation

pDC and mDC were preactivated for 24 hours in presence of IL-3 (20 ng/mL; Peprotech) $\pm$ granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; 10 ng/mL; Schering Plough) with R848 (5 μ g/mL; Invivogen) in RPMI medium supplemented with antibiotics, L-glutamin (Life Technologies), and 10% fetal calf serum (PAA). Activated DC were washed before coculture with T cells.

Cocultures were conducted at a DC:T cells ratio (1:5) for 5 days with or without exogenous rhIL-2 (Pro-Immune) in presence of IL-3 (20 ng/mL) $\pm$ GM-CSF (10 ng/mL) in RPMI containing 5% AB human pooled serum (EFS). In some experiments, TCD4⁺ were labeled with carboxyfluorescein diacetate succinidyl ester (CFSE; 1 μ mol/L) or CellTrace violet (10 μ mol/L; Life Technologies) before coculture. In blocking experiment mAbs anti-ICOS (clone 314.8), anti-CD28 (clone CD28.2), or isotype control were used at a concentration of 10 μ g/mL.

Patient cohort

For the retrospective immunohistochemistry (IHC) study, tumors from 120 patients with invasive nonmetastatic breast tumors whose clinical and biologic data were available from the regularly updated CLB database were analyzed. Patients' characteristics are presented in Supplementary Table S1 (column 1). The median follow-up was 11 years [95% confidence interval (CI) 10.6–11.1]. Majority of the patients (96%) were treated with postoperative radiotherapy. Note that 80% patients received adjuvant hormonotherapy [tamoxifen, (91.7%), antiaromatase (2.1%) or combination (6.3%)]. Adjuvant chemotherapy, consisting in anthracyclins (69.4%), anthracyclin+Taxan (26.4%), or other treatments (4.2%), was administered to 59.2% patients (71/120).

IHC

Frozen breast tumor sections (5 μ m) were subjected to sequential double IHC analyses with mAbs against BDCA-2 (10 μ g/mL), FoxP3 (10 μ g/mL), and cytokeratin (1/50) using ImmPRESS Anti-Mouse Ig peroxidase kit (Abcys), as previously described (2).

After antigenic retrieval by CC1 buffer pH8 (Ventana), breast tumor paraffin-embedded tissue microarray (TMA) were incubated for 30 minutes with Anti-ICOS mAb (1:50, Spring Biosciences), then revealed using Ultra View Kit and Hematoxylin-counterstained (Ventana). Each breast tumor sample was analyzed independently by 2 pathologists according to the guidelines for HER2/neu amplification, ER/PgR positivity, Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade, and TNM grade. ICOS⁺ cells were enumerated on 6 different spots on each tumor sample to obtain ICOS⁺ cell count (average). Cohort was equally separated in 2 groups according to the median of their ICOS⁺ cells number [ICOS^{low/neg} (<1.7 cells/spot) and ICOS⁺

(≥ 1.7 cells/spot)] to have sufficient number of patients in each group for statistical analyses.

Flow cytometry and cytokine quantification

All flow cytometry acquisitions were done using Cyan ADP cytometer (Beckman Coulter) and Summit 4.3 Software and analyses were conducted on FlowJo 7 Software. FACS-cell sorting had been conducted with the Aria III cell-sorter (Becton Dickinson) and DIVA Software. See Supplementary Table S2 for antibody list.

Cytokines (IL-10, IFN γ , and IL-2) secretions were quantified in supernatants by specific ELISA according to manufacturers' instructions (Bender MedSystems).

Statistical analysis

All statistical analyses were done using the Statistical SAS V9.2 package (Cay) 12.0 software. Correlations between clinico-biologic data and ICOS $^{+}$ cell content in the lymphoid infiltrates were determined using a χ^2 test or a Fisher exact test. Survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method and compared using the Log-rank test.

Results

CD4 $^{+}$ FoxP3 hi TA-Treg is the major T-cell subset in breast tumor expressing ICOS and proliferating *in situ*

Within breast tumor, a large majority of TA-Treg (defined as CD25 hi CD127 $^{-}$) expressed high ICOS levels (69.9%) compared with TA-Tconv (23.4%) or TA-TCDS $^{+}$ (2%; Fig. 1A). As TA-TCDS $^{+}$ are of memory phenotype (2), all the present study has been conducted on CD45RO $^{+}$ T cells (TCDS $^{+}$) isolated from breast tumor or healthy donors. Only weak or no ICOS expression was observed on healthy donor and patients' blood Treg (21.3% and 16.6%, respectively), Tconv (3.9% and 1.5%, respectively), or T-CD8 $^{+}$ (0.3% and no expression, respectively; Fig. 1A), suggesting that high expression of ICOS on TA-Treg is dependent on tumor environment. Statistical analysis on 11 breast tumor samples showed a higher percentage of ICOS $^{+}$ cells and a higher mean fluorescence intensity (MFI) of ICOS expression on TA-Treg compared with TA-Tconv (%: $P < 0.001$ and MFI: $P < 0.01$). The percentage of ICOS $^{+}$ cells was lower in TA-TCDS $^{+}$ than in TA-Tconv ($P < 0.05$; Fig. 1B). To evaluate a potential association of ICOS with TA-Treg proliferation, we analyzed the coexpression of ICOS and Ki67 on TA-Tconv and TA-Treg but also on patients' and healthy donor blood. Within TA-TCDS $^{+}$ containing 11.1% of FoxP3 hi TA-Treg, 27.6% TA-Treg expressed Ki67 and 80% of them were ICOS $^{+}$ (22.1% of ICOS $^{+}$ Ki67 $^{+}$ cells) whereas only 6.8% TA-Tconv were found Ki67 $^{+}$ containing 57% of ICOS $^{+}$ cells (3.9% of ICOS $^{+}$ Ki67 $^{+}$ cells; Fig. 1C). Only 5.7% Ki67 $^{+}$ cells that weakly or did not express ICOS and FoxP3 were detected in TCDS $^{+}$ compartment (Supplementary Fig. S1A). Interestingly, the percentage of Ki67 $^{+}$ cells was higher ($P < 0.001$) among FoxP3 hi TA-Treg than other TA-TCDS $^{+}$ or TA-TCDS $^{+}$ on 11 different breast tumor samples (Fig. 1D). Thus, ICOS is selectively expressed on FoxP3 hi Treg in tumor and is associated with their proliferation. The very low expression of Ki67 observed on TA-Tconv suggests that most of them are in an anergic state consistent with their low expression of

activation marker and probably linked to *in situ* Treg-mediated immunosuppression.

TA-pDC interacting with TA-Treg *in situ* in breast tumor induce a strong TA-Treg enrichment among TA-TCDS $^{+}$ *ex vivo*

To decipher the mechanisms controlling the strong proliferation of TA-Treg *in vivo*, we first compared the proliferative capacity of purified Treg and Tconv from healthy donor blood and breast tumor patients in response to costimulation using anti-CD3/anti-CD28-coated beads in the presence of high doses of rhIL-2 (Fig. 2A). Contrasting to the *in vivo* observations, TA-Tconv proliferated as well as healthy donor blood Tconv or Treg, whereas isolated TA-Treg did not proliferate, suggesting that other signals from the breast tumor microenvironment are involved in TA-Treg *in vivo* proliferation.

Through IHC stainings conducted on breast tumor frozen sections, we observed FoxP3 $^{+}$ TA-Treg localized in close contact with BDCA2 $^{+}$ TA-pDC within lymphoid aggregates but not in cytokeratin $^{+}$ tumor area (Fig. 2B), in agreement with our previous work demonstrating only scarce Treg within tumor area (2). We thus investigated the impact of pDC on TA-Treg proliferation among isolated TA-TCDS $^{+}$, in absence of exogenous cytokines as TA-Tconv can secrete IL-2 favoring TA-Treg proliferation. Whereas anti-CD3/anti-CD28 stimulation was unable to favor TA-Treg maintenance and proliferation (only 1% FoxP3 hi cells after CD3/CD28 activation although starting TA-TCDS $^{+}$ population contained 7.5% FoxP3 hi cells; Fig. 2C), 10% FoxP3 hi TA-Treg were detected among TA-TCDS $^{+}$ cultured with allogeneic TLR7-L-activated pDC. These results showed that activated pDC favored TA-Treg enrichment and maintenance among TA-TCDS $^{+}$. Importantly, CFSE staining of TA-TCDS $^{+}$ showed a higher proliferation of FoxP3 hi and FoxP3 int cells in pDC/TA-TCDS $^{+}$ coculture than under anti-CD3/anti-CD28 stimulation (Fig. 2C). In contrast, a reduced TA-Tconv proliferation was observed with pDC compared with anti-CD3/anti-CD28 stimulation.

FoxP3 hi Treg amplified in HD-pDC/HD-TCDS $^{+}$ coculture do not produce cytokines as shown by IFN γ , and IL-10 staining on PMA/ionomycin reactivated HD-TCDS $^{+}$ after 5 days of coculture (Supplementary Fig. S2A). Furthermore, 10 days culture of FACS-sorted HD-Treg with pDC gave increase to immunosuppressive cells reducing by 40% proliferation of allogeneic HD-TCDS $^{+}$ at the ratio 1:1 (Supplementary Fig. S2B) and a strongly reduced IL-2 concentration in culture supernatants, directly dependent on the Treg proportion (Supplementary Fig. S2C). Altogether, these results are consistent with the ability of pDC to sustain Treg immunosuppressive functions.

Collectively these data showed that in contrast to CD3/CD28 costimulation, TLR7-L-activated HD-pDC induced and maintained TA-Treg enrichment among TA-TCDS $^{+}$. Such enrichment resulted at least in part from a higher proliferation of FoxP3 hi TA-Treg, rising the hypothesis that another costimulatory signal different from CD28 required for TA-Treg expansion is delivered during pDC/TA-TCDS $^{+}$ interaction.

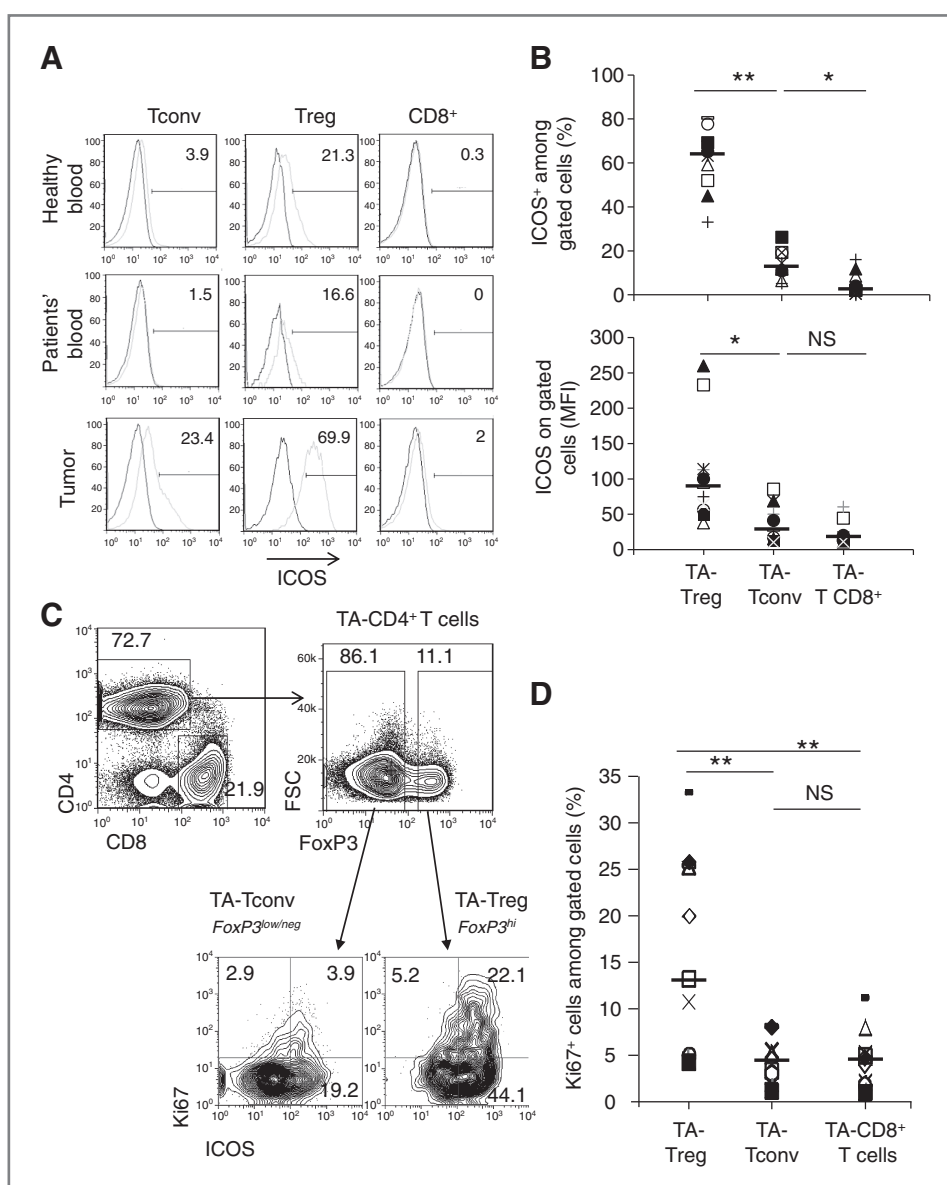


Figure 1. TA-Treg but neither TA-Tconv nor Treg and Tconv from blood strongly coexpress ICOS and Ki67. **A**, ICOS expression was analyzed on viable Treg (CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25^{hi}CD127^{low}), Tconv (CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25^{low/neg}), and TCD8⁺ (CD3⁺CD4⁻CD8⁺) in healthy donor blood, patients' blood, and breast tumor single cells suspensions, 1 representative experiment out of 5. **B**, dot plots represent percentage of ICOS⁺ cells among TA-Treg, TA-Tconv, or TA-TCD8⁺ (top) and ICOS MFI of the total population (bottom). **C**, Ki67 and ICOS expression were analyzed together by multicolor flow cytometry on breast tumor single cell suspensions. T-cell subpopulations were identified as in **B**. **B** and **D**, each symbol represents an independent donor (—, median). Statistical analysis was conducted using a Mann-Whitney U test. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

TA-pDC and TA-Treg are found in close vicinity in tumor mass consistent with ICOS/ICOS-L interaction

Activated pDC are known to express high ICOS-L levels (25, 26) and we previously described a partly activated status of TA-pDC within breast tumor environment (17). Consistently, TA-pDC expressed higher CD80 and CD40 levels than blood pDC and a similar upregulation was observed on TA-mDC. Contrasting to such activated phenotype, ICOS-L was undetectable on freshly isolated TA-pDC whereas healthy donor or patients' blood pDC expressed ICOS-L upon isolation and upregulated levels upon activation (Fig. 3A and Supplementary Fig. S3A).

ICOS-L may be downregulated on TA-pDC membrane after engagement with ICOS highly expressed by TA-Treg. In line with this, ICOS-L expression on TLR7-L activated HD-pDC was prevented in the presence of high numbers of allogeneic-activated blood HD-TCD4⁺ and this blockade was reverted in presence of a neutralizing anti-ICOS mAb (Fig. 3B). To confirm the relevance in breast tumor, ICOS-L expression was analyzed, on TA-pDC and TA-mDC, after 48 hours culture of whole tumor cell suspension in IL-3 favoring TA-pDC survival and the impact of blocking ICOS was assessed. Interestingly, TA-pDC highly expressed CD86 in all culture conditions

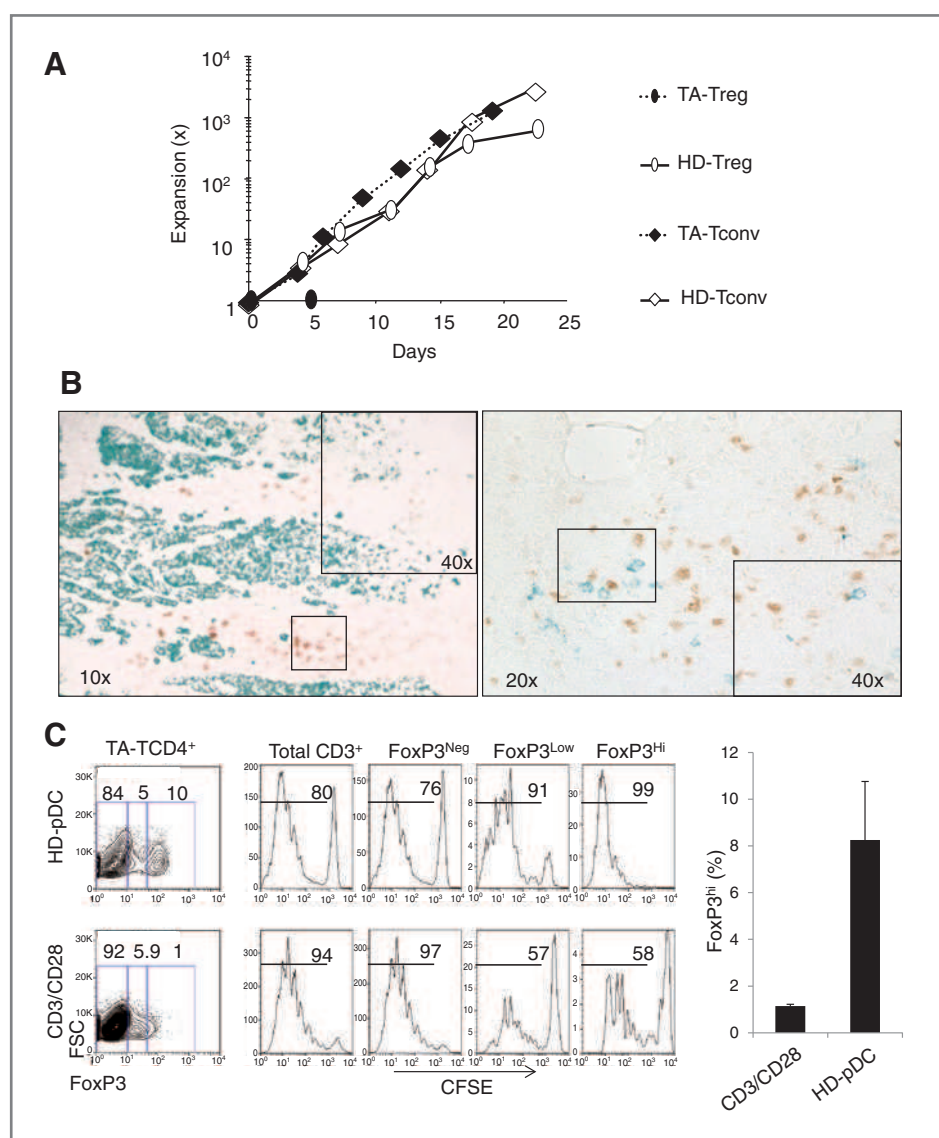


Figure 2. TA-Treg are amplified in response to pDC but not under CD3/CD28 activation *ex vivo*. **A**, FACS sorted CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ Treg and CD4⁺CD25⁻CD127⁺ Tconv from healthy donor blood or breast tumor samples were cultured with anti-CD3/anti-CD28-coated beads in presence of rhIL-2 (500 IU/mL). Numbers and viability of cells were quantified every 3 days. Results are representative of 3 independent healthy donor blood and breast tumor samples. **B**, TA-pDC stained in brown (anti-BDCA2 mAb) are localized in lymphoid infiltrate in breast tumor and not in tumor mass (anticytokeratin mAb) revealed in green (left). BDCA2⁺ cells (green) are in close contact with FoxP3⁺ Treg (brown) in breast tumor (right). IHC stainings were done on breast tumor frozen sections and observed with a 10- or 20-fold magnification (and $\times 40$ fold in insets). **C**, purified and CFSE-labeled TA-TCD4⁺ encompassing 7.5% of FoxP3^{hi} TA-Treg after purification were cocultured 5 days with R848-preactivated HD-pDC or anti-CD3/anti-CD28-coated beads without exogenous rhIL-2. FoxP3 detection and CFSE dilution were assessed on CD3⁺ viable cells by flow cytometry. Results are representative of 3 patient samples.

(Supplementary Fig. S3B) but ICOS-L was detectable at high level on TA-pDC only after culture with neutralizing anti-ICOS mAb and not with anti-CD28 mAb (Fig. 3C). As reported previously (26), high expression of ICOS-L was restricted to HD-pDC as ICOS-L was only marginally detected on mDC from healthy donor blood or breast tumor (Fig. 3A), even in the presence of TLR7-L (Supplementary Fig. S3A) or anti-ICOS mAb (Fig. 3C) although they strongly expressed CD86 (Supplementary Fig. S3B).

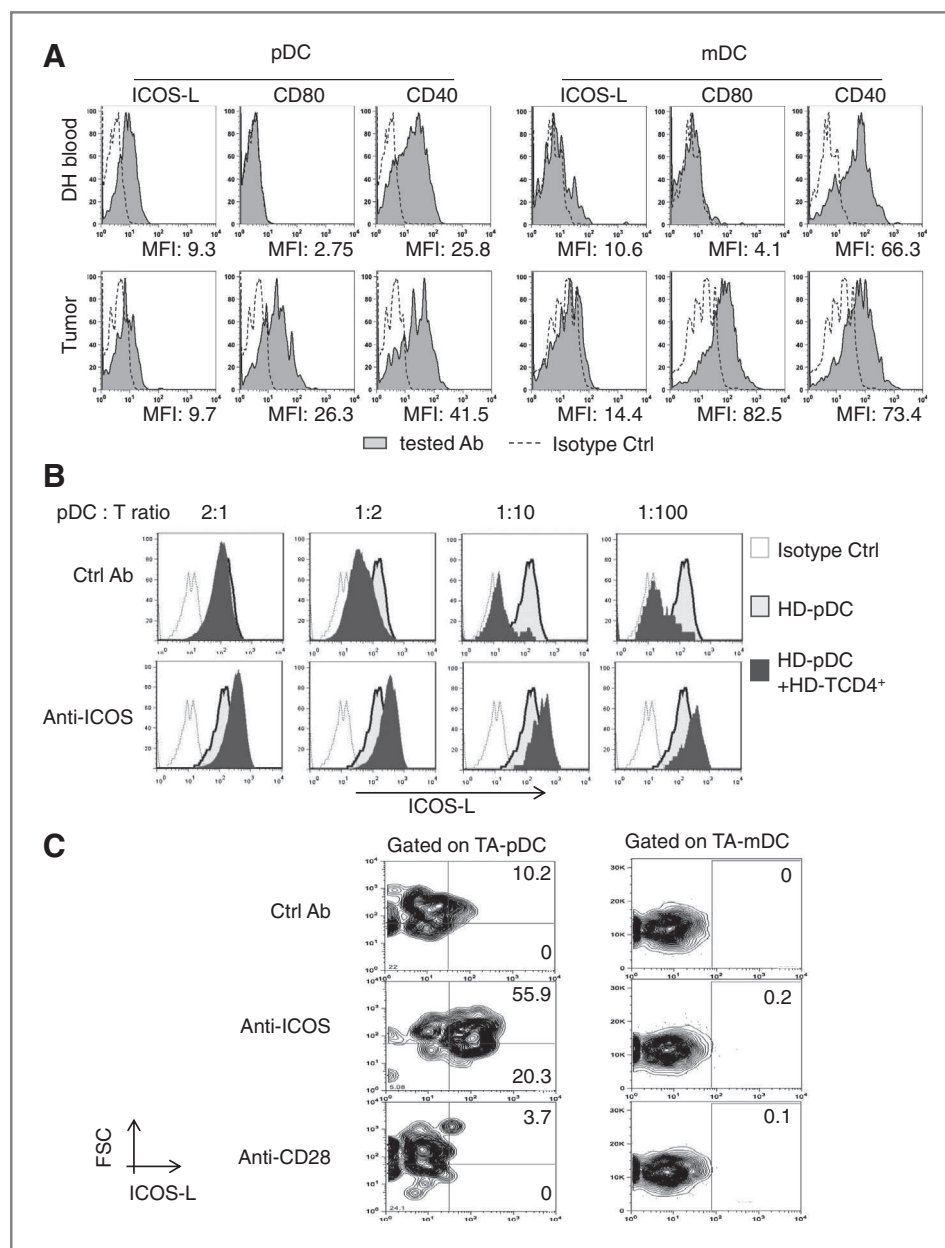
Collectively, these observations strongly suggest that ICOS/ICOS-L is involved in TA-Treg and TA-pDC interaction in breast tumor leading to the downregulation of ICOS-L expression on TA-pDC.

pDC are strong inducers of Treg enrichment among CD4⁺ T cells through ICOS/ICOS-L costimulation

We analyzed the impact of ICOS blockade in HD-TCD4⁺ allogeneic reactions either with HD-pDC or HD-mDC. HD-Treg

enrichment occurred with IL3+TLR7-L-preactivated HD-pDC ($13.8 \pm 2.4\%$ of FoxP3^{hi} HD-TCD4⁺, compared with $4.5 \pm 0.25\%$ at day 5 with HD-mDC; Fig. 4A and B). In HD-TCD4⁺/HD-pDC cocultures in absence of exogenous rhIL-2, ICOS inhibition reduced by 42% FoxP3^{hi} Treg proliferation induced by HD-pDC (division index = 2.29 ± 0.21 and 1.33 ± 0.24 , respectively, in presence of control and anti-ICOS mAb) and did not impact HD-Tconv proliferation. HD-Treg and HD-Tconv proliferation induced by mDC was also not affected by anti-ICOS mAb (Supplementary Fig. S4A and S4B). To assess the impact of ICOS/ICOS-L neutralization on isolated Treg proliferation, CFSE labeled HD-Treg or HD-Tconv purified from blood were cultured with TLR7-L+IL-3-preactivated HD-pDC purified from tonsil with exogenous rhIL-2 and neutralizing anti-ICOS mAb. HD-pDC induced proliferation of allogeneic FoxP3^{hi} cells (23.3% of diluted CFSE FoxP3^{hi} cells in presence of control mAb) that is almost completely blocked by anti-ICOS mAb (2.8%). In contrast, the anti-ICOS mAb decreased only

Figure 3. ICOS-L engagement by ICOS during TA-pDC and TA-Treg interaction leads to ICOS-L downregulation on pDC membrane. **A**, breast tumor single cell suspension or PBMC from healthy donor blood were stained with Lin, CD4, CD11c, and CD123 mAbs to identify TA-pDC ($\text{Lin}^- \text{CD4}^+ \text{CD11c}^- \text{CD123}^{\text{hi}}$) and TA-mDC ($\text{Lin}^- \text{CD4}^+ \text{CD11c}^{\text{hi}} \text{CD123}^{\text{neg}}$). ICOS-L, CD40, HLA-DR, or appropriate controls were used to assess expression of activation markers. Results are representative of 4 independent healthy donor blood and tumor samples. **B**, freshly isolated and R848+IL-3-preactivated HD-pDC were cultured for 48 hours with allogeneic HD-TCD4⁺ from blood at different pDC: T cells ratio in the presence of control or anti-ICOS mAb (314.8) and analyzed for their expression of ICOS-L by flow cytometry. **C**, After 48-hour culture period of breast tumor single cell suspensions in presence of IL-3 (20 ng/mL) and anti-ICOS 314.8, anti-hCD28 (CD28.2) mAb, or isotype control, cells were then stained for ICOS-L to assess expression on $\text{Lin}^- \text{CD4}^+ \text{CD11c}^{\text{neg}} \text{CD123}^{\text{hi}}$ BDCA2⁺ TA-pDC or $\text{Lin}^- \text{CD4}^+ \text{CD11c}^{\text{hi}} \text{CD123}^{\text{neg}}$ TA-mDC. Ctrl, control.



moderately the proportion of proliferating HD-Tconv (78.1% and 52.2% in control and anti-ICOS mAb, respectively; Fig. 4C). Interestingly, ICOS neutralization in HD-Treg/HD-pDC coculture decreased the proportion of FoxP3^{hi} Treg from $19 \pm 2.4\%$ to $3.3 \pm 1\%$ (6-fold, Fig. 4D) although the proliferation of HD-Tconv was only moderately affected.

The efficacy of anti-ICOS mAb to reduce Treg proportion was evaluated on TA-TCD4⁺, even in the presence of exogenous rhIL-2. In accordance with results on HD-TCD4⁺, the FoxP3^{hi} subpopulation induced by HD-pDC decreased in the presence of anti-ICOS mAb ($13.5 \pm 2\%$ vs. $4 \pm 1\%$ in control and anti-ICOS mAb, respectively; Fig. 5A and B). In reverse experiments, purified IL-3+TLR7-L preactivated TA-pDC favored a strong Treg enrichment among HD-TCD4⁺ (containing ini-

tially 1.7% of FoxP3^{hi} Treg) at day 5 (7.1- and 6.4-fold increase with IL-3 and IL-3+TLR7-L-preactivated TA-pDC, respectively). As expected, such Treg enrichment was strongly reduced by ICOS neutralization (57%–83% reduction in FoxP3^{hi} cells compared with control condition; Fig. 5C and D). Taken together, these results showed the critical role of ICOS/ICOS-L interaction in TA-pDC-mediated TA-Treg amplification in breast tumor.

ICOS neutralization inhibits pDC-induced IL-10 secretion by T-CD4⁺

We evaluated IL-10 and IFN γ production by HD-Tconv and HD-Treg cocultured with preactivated pDC. In HD-pDC/HD-Tconv coculture with exogenous rhIL-2, ICOS blockade

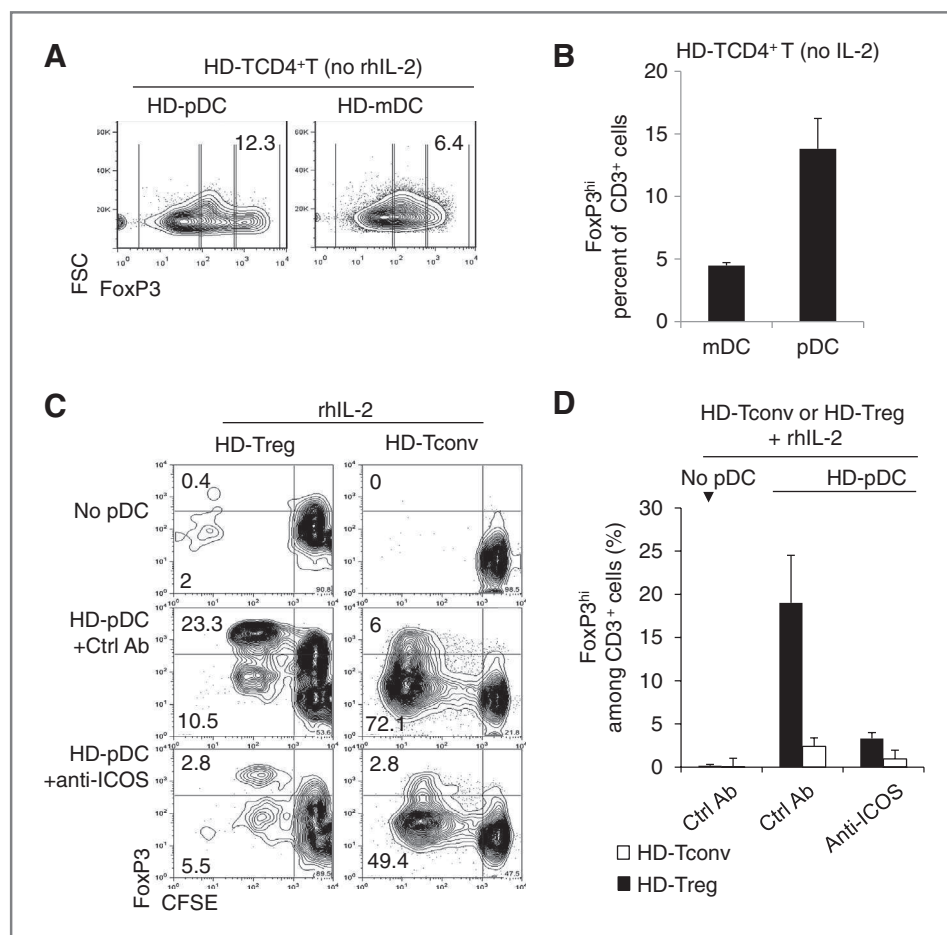


Figure 4. HD-pDC induce a strong Treg enrichment among HD-TCD4⁺ compared with mDC under the dependence of ICOS signaling. **A** and **B**, overnight activated (IL-3+GM-CSF+R848) FACS-sorted tonsil HD-pDC and HD-mDC were cocultured for 5 days with purified healthy donor CD4⁺CD45RO⁺ T cells (HD-TCD4⁺; containing 1.3% of FoxP3⁺ Treg at day 0). **C** and **D**, CFSE-labeled CD25^{hi} HD-Treg and CD25^{neg} HD-Tconv from blood were cocultured with R848+IL-3-preactivated HD-pDC in presence of rhIL-2 (100 IU/mL) with anti-ICOS or control mAbs. At day 5, CFSE dilution and FoxP3 expression were analyzed by flow cytometry after gating on CD3⁺ viable cells. **B** and **D**, histograms represent the frequency of FoxP3^{hi} Treg among viable HD-TCD3⁺ of 1 representative experiment from 4 blood samples.

strongly inhibited IL-10 (by 94%) and in a smaller proportion, IFN γ secretion (by 33%; Fig. 6A) whereas no IL-10 and IFN γ were detectable in cocultures with HD-Treg (Fig. 6A). ICOS blockade strongly reduced IL-10 production in TA-TCD4⁺/HD-pDC (90% inhibition; Fig. 6B, left panel) as well as in HD-TCD4⁺/TA-pDC (83%–72% inhibition) cocultures (Fig. 6B, right panel). IFN γ secretion was also significantly, but to a lesser extent, inhibited upon ICOS neutralization in all culture conditions (59%–63%). Consistent with the strong IL-10 secretion induced by pDC, we detected high IL-10 levels in 48-hour-culture supernatants of breast tumor single cell suspensions (Supplementary Fig. S5) in 7/13 tumors tested [median = 646.8 pg/mL, range (3.2–6915) pg/mL] while IL-2, IL-17, and IFN γ were never observed.

Finally, we investigated the impact of ICOS blockade on mDC, pDC, or mDC+pDC/T cell cocultures. In presence of exogenous rhIL-2 HD-TCD4⁺ cocultured with HD-pDC produced more IL-10 but less IFN γ than with HD-mDC (respectively, 596 $\pm$ 103 pg/mL and 181 $\pm$ 28 pg/mL for IL-10 and 279 $\pm$ 52 pg/mL and 641 $\pm$ 9 pg/mL for IFN γ ; Fig. 6C). Culture of HD-TCD4⁺ with mixed DC subsets resulted in lower IL-10 (232 $\pm$ 9 pg/mL) but higher IFN γ secretion (574 $\pm$ 80 pg/mL) compared with [pDC+TCD4⁺] cocultures. ICOS neutralization strongly reduced IL-10 levels (82% for pDC, 50% for mDC,

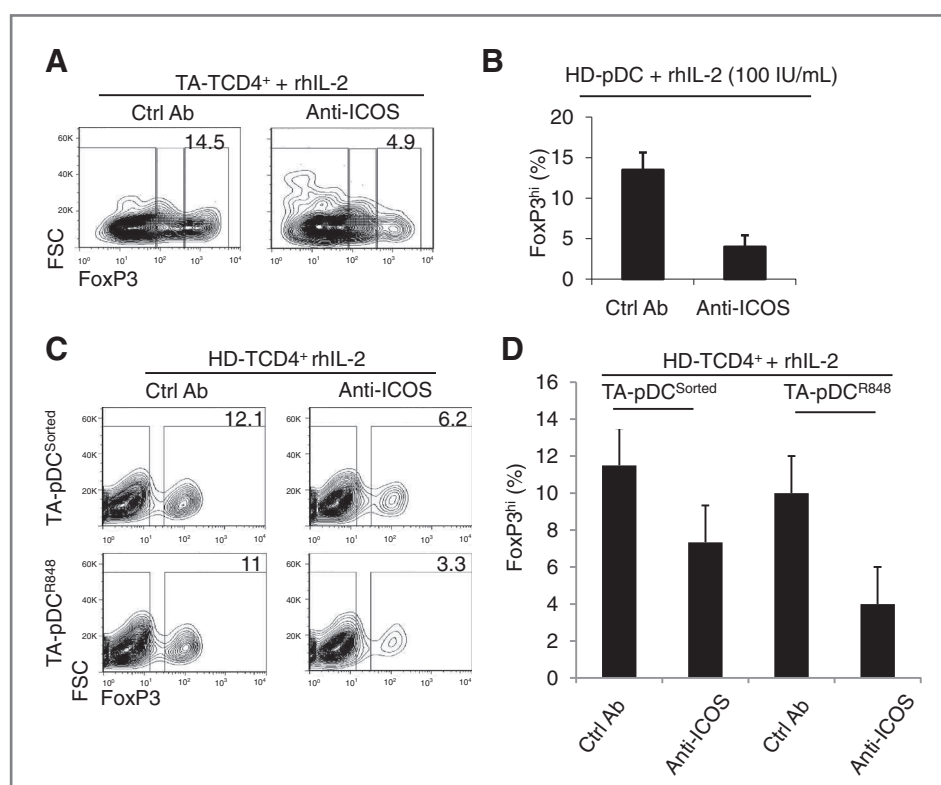
and 62% for pDC+mDC) without significantly interfering with IFN γ secretion (+28% for pDC, –19% for mDC, and –24% for pDC+mDC) contrasting with observations done with cells from breast tumor origin (Fig. 6C). In absence of exogenous rhIL-2, except the lower levels of IL-10 and IFN γ , similar effects of ICOS neutralization were observed. Furthermore, ICOS blockade increased IL-2 concentration in coculture with HD-pDC (P = 0.035, Fig. 6D).

Overall these results showed that ICOS blockade leads to a strong inhibition of pDC-induced IL-10 secretion by HD-TCD4⁺ that is accompanied by increased levels of IL-2, without significantly affecting IFN γ production, in particular, in response to mDC.

Detection of ICOS⁺ cells within primary breast tumor correlates with poor prognosis

IHC analyses were conducted with anti-ICOS mAb on paraffin-embedded tumor section using TMA cores specific for tumor area or lymphoid infiltrates. High numbers (the median defined as cutoff = 1.7 cells/spot) of ICOS⁺ cells were detectable within lymphoid aggregates but not within tumor bed (Fig. 7A–C). The presence of ICOS⁺ cells within lymphoid infiltrates ($\geq$ median ICOS⁺ cells/spot) was significantly correlated with high SBR grade (P = 0.001), luminal A/B molecular subtypes

Figure 5. ICOS is predominant in Treg enrichment during pDC/CD4⁺ T-cell coculture with cells from breast tumor origin. A and B, R848+IL-3-preactivated HD-pDC were cocultured with purified TA-TCD4⁺ cells (encompassing initially 11% FoxP3^{hi} TA-Treg). C and D, healthy donor CD4⁺CD45RO⁺ T cells (HD-TCD4⁺) containing 1.7% FoxP3^{hi} Treg after isolation were cocultured with IL-3±R848 preactivated TA-pDC. In A and B, cocultures were conducted during 5 days in presence of rhIL-2 (100 IU/mL) and anti-ICOS or control mAbs. FoxP3 expression was analyzed by flow cytometry on viable CD3⁺ cells. B and D, histograms represent 1 out of 3 experiments for B and 2 experiments for D carried out in triplicate, error bars represent standard deviation.



($P < 0.001$), absence of ER expression ($P = 0.025$) and Her2/neu overexpression ($P = 0.017$) by tumor cells, triple negative status ($P = 0.02$), and lymphatic embolus ($P < 0.001$; Supplementary Table S1). Importantly, in univariate analysis the presence of ICOS⁺ cells in lymphoid-enriched areas was associated with an increased risk of relapse (progression-free survival, Log-rank P value = 0.0285; Fig. 7D) and death (overall survival, Log-rank P value = 0.0465; Fig. 7E). However, when introduced in a multivariate analysis together with other significant clinical and biologic parameters, high ICOS expression was no more significant.

Discussion

In addition to our previous reports demonstrating that TA-Treg frequency within tumor lymphoid infiltrates correlates with poor prognosis in primary breast tumor (2, 30), we identify herein ICOS engagement as a major pathway contributing to their local accumulation through direct interaction with TA-pDC.

We confirm that TA-Treg within primary breast tumor express high ICOS and Ki67 levels in a specific manner compared with other TA-TCD3⁺ subsets or blood Treg. Interestingly, TA-Tconv and TA-TCD8⁺ contain a low minority of Ki67⁺ cells consistent with observations that Treg suppress Th1 and CD8⁺ T-cell cytotoxic activity in the context of human tumors, such as colon carcinoma (31), melanoma (9), and ovarian carcinoma (32). Early clinical trial with mAbs neutralizing CTLA4 or PD-1/PDL1 inhibitory receptors are showing promising clinical activity in melanoma, renal, and lung carcinoma (20%–30% of objective responses; refs. 7–9, 33).

Herein we report the major role of ICOS, a member of the CTLA4/PD1/CD28 family, in TA-Treg proliferation and accumulation in breast tumor. First, we accumulate evidences that strongly support the hypothesis of ICOS⁺ TA-Treg and TA-pDC interaction *in situ* interaction by IHC on primary breast tumor frozen sections and ICOS/ICOS-L engagement in breast tumor as illustrated by reversion of ICOS-L downregulation on TA-pDC upon *ex vivo* culture of whole tumor cell suspension in presence of blocking anti-ICOS mAb. Second, we also show that activated-pDC expressing ICOS-L, but not mDC or CD3/CD28 costimulation, favor allogeneic FoxP3^{hi} TA-Treg enrichment among TA-TCD4⁺ that is abolished by ICOS blockade in agreement with data recently published in ovarian carcinoma (34). In agreement with this, thymic ICOS⁺ Treg need ICOS/ICOS-L costimulation to proliferate (15). Nevertheless, others molecules present in tumor environment such as IDO, OX40-L (35), TNF α (36), or TGF β (37) could also participate to TA-Treg enrichment within breast tumor.

TA-pDC-induced FoxP3^{hi} Treg amplification explains the positive correlation observed between TA-pDC and TA-Treg in breast tumor (Supplementary Fig. S6A) as well as their negative impact on patients' survival in breast tumor (Supplementary Fig. S6B; ref. 17) and ovarian carcinoma (13, 38). Furthermore, in contrast to recent works in melanoma (39) and glioblastoma (40), ICOS⁺ TA-Treg expansion in breast tumor is not mediated through direct interaction with tumor cells as (i) ICOS-L is not expressed either on primary breast tumor cells or on breast tumor cell lines (not shown) and (ii) Ki67⁺ proliferating Treg are only detected within lymphoid aggregates and not within tumor nests (2).

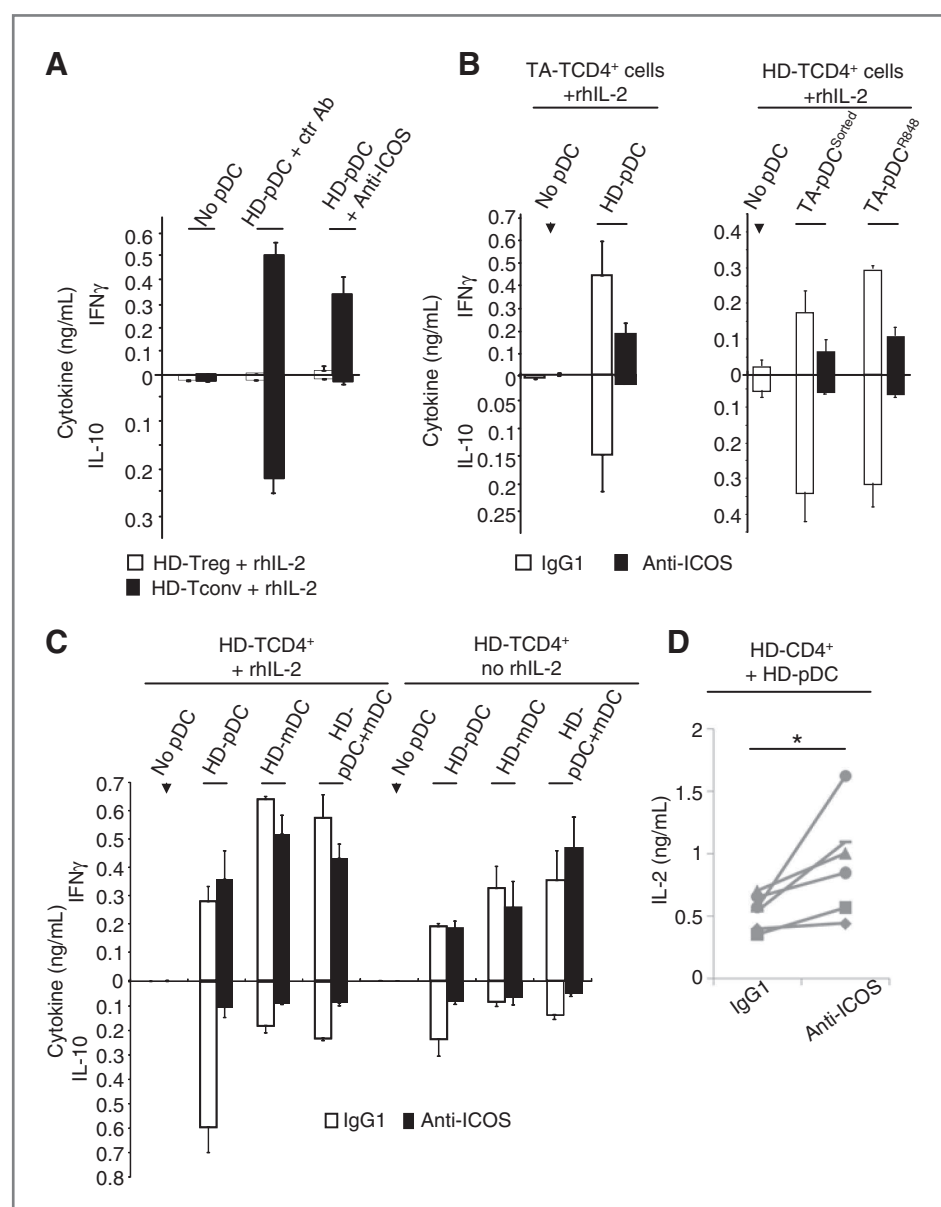


Figure 6. pDC but not mDC enhance IL-10 secretion and IL-2 consumption by memory TCD4 $^{+}$ although ICOS engagement. **A**, IL-10 and IFN γ were quantified by ELISA in 5 days coculture supernatants of IL-3+R848-preactivated HD-pDC with FACS-sorted memory HD-Treg or HD-Tconv in presence of IL-2 (100 IU/mL), anti-ICOS, or control mAbs; 1 representative out of 3 independent experiments. **B**, IL-10 and IFN γ were measured by ELISA in 5 days coculture supernatants of purified TA-TCD4 $^{+}$ cells with IL-3+R848-preactivated HD-pDC ($n = 3$; left) or purified HD-TCD4 $^{+}$ with IL-3+R848-preactivated TA-pDC in presence of rhIL-2 (100 IU/mL) and anti-ICOS or control mAbs ($n = 2$; right). **C**, HD-pDC and HD-mDC were preactivated as in Fig. 4A and cocultured with HD-TCD4 $^{+}$. When pDC and mDC were mixed at a ratio 1:1, the same number of total DC was cocultured with T cells in presence of anti-ICOS or control mAbs, $\pm$ rhIL-2 (100 IU/mL). After 5 days, supernatants were harvested and were quantified for IL-10 and IFN γ by ELISA ($n = 4$ independent experiments). **D**, IL-2 secretion was measured by ELISA in supernatant of HD-TCD4 $^{+}$ /HD-pDC cocultures and anti-ICOS or control mAbs. Histograms represent the results of 6 independent experiments. IgG, immunoglobulin G.

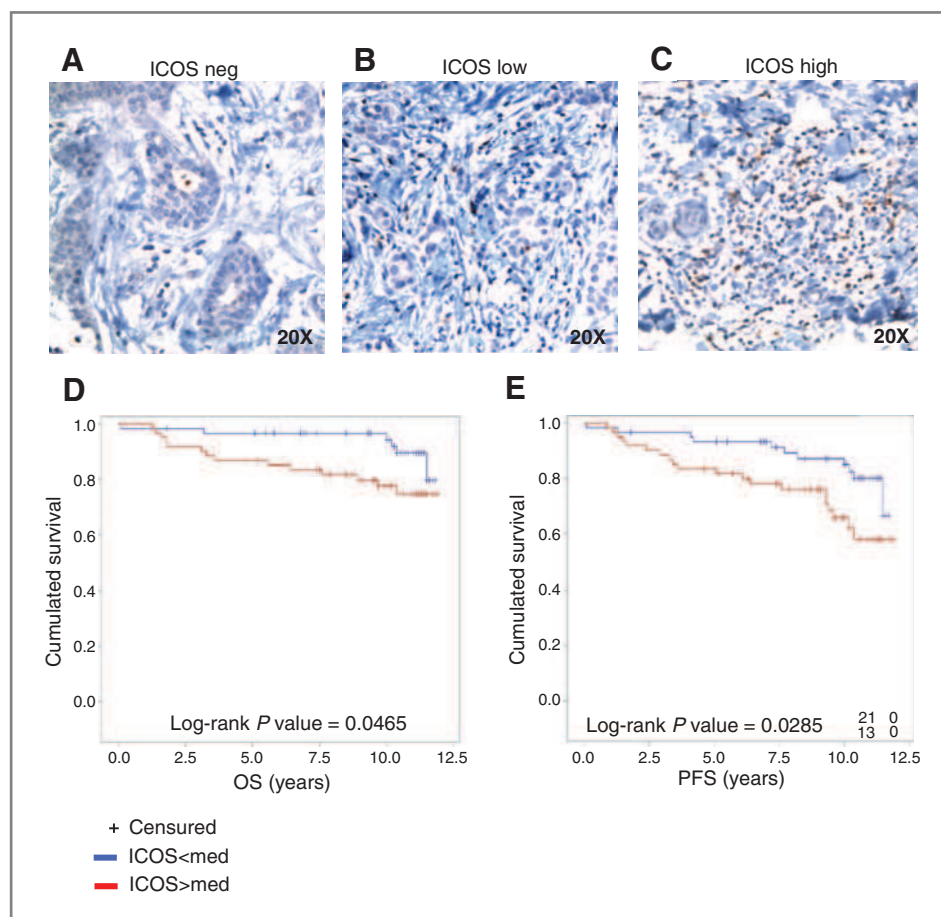
To date TA-Treg origin is not fully elucidated. pDC are known to favor immunosuppressive T-cell induction on both TCD4 $^{+}$ (15, 41) and TCD8 $^{+}$ (42) subsets and we cannot formally exclude the differentiation of Treg from naive TCD4 $^{+}$, as previously reported for both human and mouse pDC (41, 43, 44). However, we recently showed (i) a specific recruitment of CCR4 $^{+}$ Treg from the blood to breast tumor through the tumor cells CCL22 production (2, 11), and (ii) that all of TA-TCD4 $^{+}$ are of memory phenotype, consistent with a recruitment of TA-Treg from the periphery followed by their local expansion through ICOS/ICOS-L interaction with pDC in breast tumor environment.

In accordance with results in NOD type 1 diabetes murine model (27), ICOS $^{+}$ TA-Treg display high immunosuppressive function (2) through not yet characterized mechanisms that

may involve FASL, CD39/Adenosine, perforin, CTLA4, or PD-1 known to participate in Treg immunosuppressive functions (for review 4).

High IL-10 levels are detected in breast tumor environment and TA-TCD4 $^{+}$ secrete large amounts of IL-10 in coculture with pDC but not with mDC. ICOS costimulation of naive CD4 $^{+}$ T cells is already known to induce the differentiation of IL-10-secreting cells (26). Of importance, our results show that pDC preferentially activate preexisting IL-10 secreting cells among memory HD-Tconv. Furthermore, mDC-induced T-cell responses are not affected by ICOS blockade as they do not overexpress ICOS-L after activation. Interestingly, we note that ICOS blockade leads to IL-2 accumulation in cocultures with pDC suggesting that ICOS engagement favors the enrichment of TCD4 $^{+}$

Figure 7. High number of ICOS⁺ cells within primary breast tumor correlates with reduced patients' survival. A, 120 paraffin-embedded primary breast tumor samples with more than 10 years clinical follow-up were stained with anti-ICOS mAb and counterstained with hematoxylin. The number of positive cells was manually enumerated on 6 different cores for each tumor sample. Representative pictures of tumors noninfiltrated (A), weakly infiltrated (B), and highly infiltrated (C) by ICOS⁺ cells are shown (magnification, $\times 10$). C, log-rank analysis of progression-free (PFS) and overall (OS) survival of patients from the cohort according to the presence of ICOS⁺ cells (the median was chosen as cutoff ≥ 1.7 positive cells).



subpopulation that do not secrete and/or consume high amounts of IL-2 in culture. This correlates with previous results (45) showing that T-cell responses under ICOS stimulation depend on exogenous rhIL-2.

Of most importance, IHC staining on 120 primary breast tumors with more than 10 years clinical follow-up allows to show that presence of high numbers of ICOS⁺ cells infiltrating primary breast tumors is associated with poor prognosis in univariate analysis but is no more significant when introduced in the multivariate analysis together with other significant clinical and biologic parameters.

Collectively our results suggest that abrogation of ICOS/ICOS-L interaction using neutralizing anti-ICOS mAb may reduce Treg expansion, IL-10 secretion, and IL-2 consumption by TA-TCD4⁺ that can favor antitumor immunity through ICOS-independent TCD8⁺ and TCD4⁺ activation.

This role of ICOS in TA-Treg biology is supported by the fact that (i) ICOS⁺ Treg have a stronger suppressive function in melanoma (46) and murine models (27, 28), and (ii) ICOS deletion in human (22) and mice (23) correlates to a decreased Treg proportion.

On the other hand ICOS could be expressed on activated T cells (47) and ICOS expression is upregulated on IFN γ secreting T cells during anti-CTLA4 treatment in phase III trials in melanoma patients (for review 33). However, there

is no evidence in these clinical trials that ICOS contributes to antitumor immunity and ICOS may simply represent a T-cell effector marker. This could suggest that treatment with neutralizing anti-ICOS mAb needs to be restricted to a short time period to abrogate Treg amplification without impacting on potential restoration of effector cells expressing ICOS.

The treatment by the anti-ICOS 314.8 mAb may be particularly relevant in neo-adjuvant settings combined to therapies inducing antitumor immunity by favoring tumor cell death such as therapies targeting tumor molecular alterations (Herceptin, lapatinib; ref. 48) or immunogenic chemotherapies (anthracyclins; ref. 49).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: J. Faget, M. Gobert, J.-Y. Blay, C. Caux, C. Menetrier-Caux

Development of methodology: J. Faget, M. Gobert, D. Olive, C. Biota, J.-Y. Blay, C. Menetrier-Caux

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): J. Faget, N. Bendriss-Vermare, C. Biota, T. Bachelot, I. Treilleux, S. Goddard-Leon

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): J. Faget, N. Bendriss-Vermare, D. Olive, E. Lavergne, S. Chabaud, J.-Y. Blay, C. Caux, C. Menetrier-Caux

Writing, review, and/or revision of the manuscript: J. Faget, N. Bendriss-Vermare, J.-Y. Blay, C. Caux, C. Menetrier-Caux

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): T. Bachelot, C. Menetrier-Caux

Study supervision: J.-Y. Blay, C. Caux, C. Menetrier-Caux

Flow cytometry and cell sorting: I. Durand

Acknowledgments

The authors are grateful to the breast cancer patients who accepted to participate in this study and to the institutional Biological Research Center from the Centre Léon Bérard who provided us with breast tumor specimens. The authors thank Dr Rosenbusch, D. Giroux, and colleagues from clinics who provided us with tonsils samples. The authors thank Anthony Besse for statistical analyses.

References

- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity* 2004;21:137–48.
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000–9.
- Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 2011;470:548–53.
- Ménétrier-Caux C, Curiel T, Faget J, Manuel M, Caux C, Zou W. Targeting regulatory T cells. *Target Oncol* 2012;7:15–28.
- Klages K, Mayer CT, Lahl K, Loddenkemper C, Teng MW, Ngiew SF, et al. Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Res* 2010;70:7788–99.
- Morse MA, Hobeika AC, Osada T, Serra D, Niedzwiecki D, Lyerly HK, et al. Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood* 2008;112:610–8.
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2455–65.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443–54.
- Menard C, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Mateus C, Grohmann U, et al. Ctlα-4 blockade confers lymphocyte resistance to regulatory T-cells in advanced melanoma: surrogate marker of efficacy of tremelimumab? *Clin Cancer Res* 2008;14:5242–9.
- Vonderheide RH, LoRusso PM, Khalil M, Gartner EM, Khaira D, Soulières D, et al. Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells. *Clin Cancer Res* 2010;16:3485–94.
- Faget J, Biota C, Bachelot T, Gobert M, Treilleux I, Goutagny N, et al. Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to Treg recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Res* 2011;71:6143–52.
- Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:7466–74.
- Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, Gobert M, Treilleux I, Bajard A, et al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2011;71:5423–34.
- Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ, Donskov F, Hoyer M, Sjoegren P, et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 2012;118:2476–85.
- Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008;28:870–80.
- Ouabed A, Hubert FX, Chabannes D, Gautreau L, Heslan M, Josien R. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J Immunol* 2008;180:5862–70.
- Sisirak V, Faget J, Gobert M, Goutagny N, Vey N, Treilleux I, et al. Impaired IFN-α production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T cell expansion and may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res* 2012. [Epub ahead of print].
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999;397:263–6.
- Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001;409:97–101.
- McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001;409:102–5.
- Tafari A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001;409:105–9.
- Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, et al. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol* 2009;182:5515–27.
- Burmeister Y, Lischke T, Dahler AC, Mages HW, Lam KP, Coyle AJ, et al. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008;180:774–82.
- Watanabe M, Watanabe S, Hara Y, Harada Y, Kubo M, Tanabe K, et al. ICOS-mediated costimulation on Th2 differentiation is achieved by the enhancement of IL-4 receptor-mediated signaling. *J Immunol* 2005;174:1989–96.
- Janke M, Witsch EJ, Mages HW, Hutloff A, Kroczeck RA. Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 2006;118:353–60.
- Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Goutagny N, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 2007;204:105–15.
- Kornete M, Sgouroudis E, Piccirillo CA. ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3⁺ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2012;188:1064–74.
- Chen Y, Shen S, Grentla BK, Gao J, Zhong XP. Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression. *J Immunol* 2012;188:1698–707.
- Fong L, Small EJ. Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment. *J Clin Oncol* 2008;26:5275–83.
- Ménétrier-Caux C, Gobert M, Caux C. Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res* 2009;69:7895–8.
- Svensson H, Olofsson V, Lundin S, Yakkala C, Björck S, Borjesson L, et al. Accumulation of CCR4(+)CTLA-4 FOXP3(+)CD25(hi) regulatory T cells in colon adenocarcinomas correlate to reduced activation of conventional T cells. *PLoS One* 2012;7:e30695.

Grants Support

This work was supported by institutional grants from Breast Cancer Research Foundation, Association pour la Recherche sur le Cancer (grant n 7896), Comité départemental du Rhône de la Ligue contre le cancer, ACI 2007–2009, ANR11-EMMA-045 VICIT-01, INCa-PLBio 2011 (2011-1-PL-Bio-12-IC-1), and FUI Project PLATINE. J. Faget is a recipient of a grant from la Ligue Nationale contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received June 19, 2012; revised September 13, 2012; accepted September 13, 2012; published OnlineFirst October 1, 2012.

32. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.
33. Verschraegen C. The monoclonal antibody to cytotoxic T lymphocyte antigen 4, ipilimumab, in the treatment of melanoma. *Cancer Manag Res* 2012;4:1–8.
34. Conrad C, Gregorio J, Wang YH, Ito T, Meller S, Hanabuchi S, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS co-stimulation of Foxp3+ T regulatory cells. *Cancer Res* 2012. [Epub ahead of print].
35. Xiao X, Gong W, Demirci G, Liu W, Spoerl S, Chu X, et al. New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance *in vivo*. *J Immunol* 2012;188:892–901.
36. Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, Billiard F, Goldstein JD, Gregoire S, et al. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* 2010;120:4558–68.
37. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol* 2010;184:5885–94.
38. Labidi-Galy SI, Treilleux I, Goddard-Leon S, Combes JD, Blay JY, Ray-Coquard I, et al. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *Oncol Immunology* 2012;1:380–2.
39. Martin-Orozco N, Li Y, Wang Y, Liu S, Hwu P, Liu YJ, et al. Melanoma cells express ICOS ligand to promote the activation and expansion of T-regulatory cells. *Cancer Res* 2010;70:9581–90.
40. Schreiner B, Wischhusen J, Mitsdoerffer M, Schneider D, Bornemann A, Melms A, et al. Expression of the B7-related molecule ICOSL by human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Glia* 2003;44:296–301.
41. Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 2010;115:5366–75.
42. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:695–704.
43. Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 2008;9:1253–60.
44. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006;7:652–62.
45. Riley JL, Blair PJ, Musser JT, Abe R, Tezuka K, Tsuji T, et al. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol* 2001;166:4943–8.
46. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski MJ, Lang S, Kirkwood JM, Whiteside TL. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J Immunol* 2008;180:2967–80.
47. Xu F, Li D, Zhang Q, Fu Z, Zhang J, Yuan W, et al. ICOS gene polymorphisms are associated with sporadic breast cancer: a case-control study. *BMC Cancer* 2011;11:392.
48. Guameri V, Barbieri E, Conte P. Biomarkers predicting clinical benefit: fact or fiction? *J Natl Cancer Inst Monogr* 2011;2011:63–6.
49. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009;15:1170–8.

Supplementary data

Figure S1: ICOS is mainly expressed by TA-Treg.

(A) BT single cell suspensions were stained as in Fig. 1C. Representative dot plot of FoxP3 expression (left) or Ki67 and ICOS co-expression (right) on TA-TCD8⁺ after gating on CD3⁺CD8⁺CD45⁺ viable cells in tumor single cell suspensions. Results are representative of 5 independent tumors.

Figure S2: pDC expanded Treg sustain suppressive activity.

(A) cytokine production was analyzed in pDC/T cell co-culture in presence of rhIL-2 (100IU/ml). After 5 hours PMA/Ionomycine reactivation in presence of Golgi STOP, cells were stained with CD3, IFN γ , and FoxP3 mAbs. (B & C) HD-Treg (CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻) were sorted from blood and co-cultured with R848-activated HD-pDC in presence of rhIL-2 (500IU/ml) for 10 days. pDC-expanded Treg were then tested in suppression assay in presence of anti-CD3/anti-CD28-coated beads and allogeneic HD-TCD4⁺ as responders for 4 days. (B) Responder's proliferation was assessed by Cell trace violet dilution, histograms represent percentage of control proliferation (responders alone + anti-CD3/anti-CD28-coated beads). (C) IL-2 concentration was quantified by ELISA.

Figure S3: ICOS-L is highly expressed on R848-activated HD-pDC.

(A) FACS-sorted HD-pDC or mDC were activated or not by IL-3+R848 for 48h. HLA-DR, CD80, CD86 and ICOS-L expression were analyzed by FACS on viable (DAPI^{neg}) cells. (B) BT single cell suspensions were cultured for 48h in presence of anti-ICOS (314.8), anti-CD28 (CD28.2) or isotype control and expression of CD86 on TA-pDC or TA-mDC was analyzed as in Fig. 3C.

Figure S4: ICOS blockade reduces Treg but not Tconv proliferation induced by pDC without impacting mDC/T cell activation.

Overnight R848+IL-3+GM-CSF HD-mDC or HD-pDC were co-cultured for 5 days in absence of rhIL-2 with CFSE-labeled HD-TCD4⁺ and anti-ICOS 314.8 or control mAbs. At day 5, T cell proliferation was assessed by CFSE dilution on FoxP3^{hi} Treg or FoxP3^{low/neg} Tconv among TA-TCD3⁺. Results are representative of 4 independent experiments.

Figure S5: Strong IL-10 secretion in culture of BT single cell suspension.

Levels of cytokines (IL-2, IL-10, IL-17 and IFN γ) were quantified by ELISA in 48h-culture supernatants of BT single cell suspensions.

Figure S6: Correlation between TA-pDC and TA-Treg percentages in fresh primary BT and in retrospective IHC cohort

(A) Spearman rank correlations between the proportions of Lin⁻CD4⁺BDCA2⁺CD123⁺ TA-pDC and CD4⁺CD45RO⁺CD25^{high} TA-Treg as determined by flow cytometry in enzymatic disaggregation of fresh samples of primary invasive non-metastatic BC tumor cohort (n=60) published recently by Sisirak *et al* (17). (B) Analysis on the retrospective cohort (n=162) previously analysed (2, 17) of percentages of breast cancer patients with or without detectable TA-pDC among Foxp3^{high} or FoxP3^{low/neg} patients (the highest quartile ≥ 28 FoxP3⁺ cells used as cutoff value).

Table S1: Clinical characteristic of the cohort of BT patients enrolled for TMA analysis (n=120)

Table S2: clones of mAbs used for the multi-parametric flow cytometry analyses

Figure S1 : ICOS is mainly expressed by TA-Treg

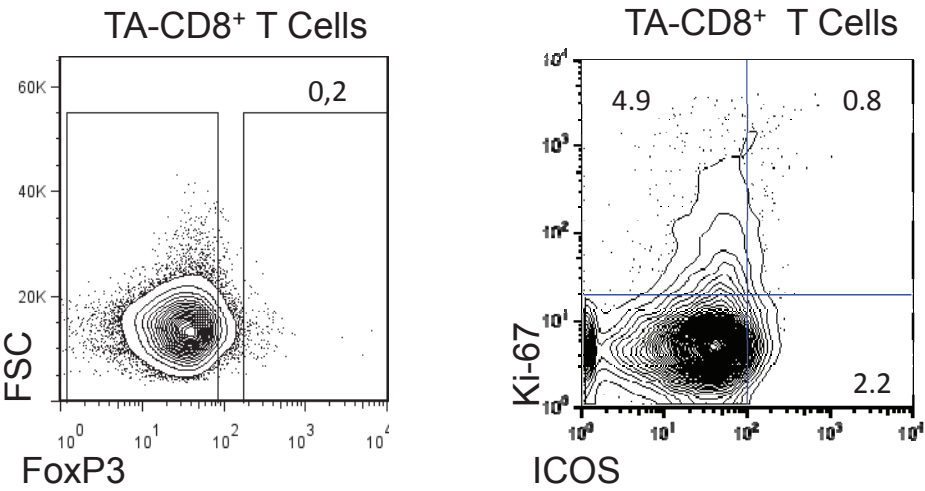


Figure S2: pDC expanded Treg sustain suppressive activity

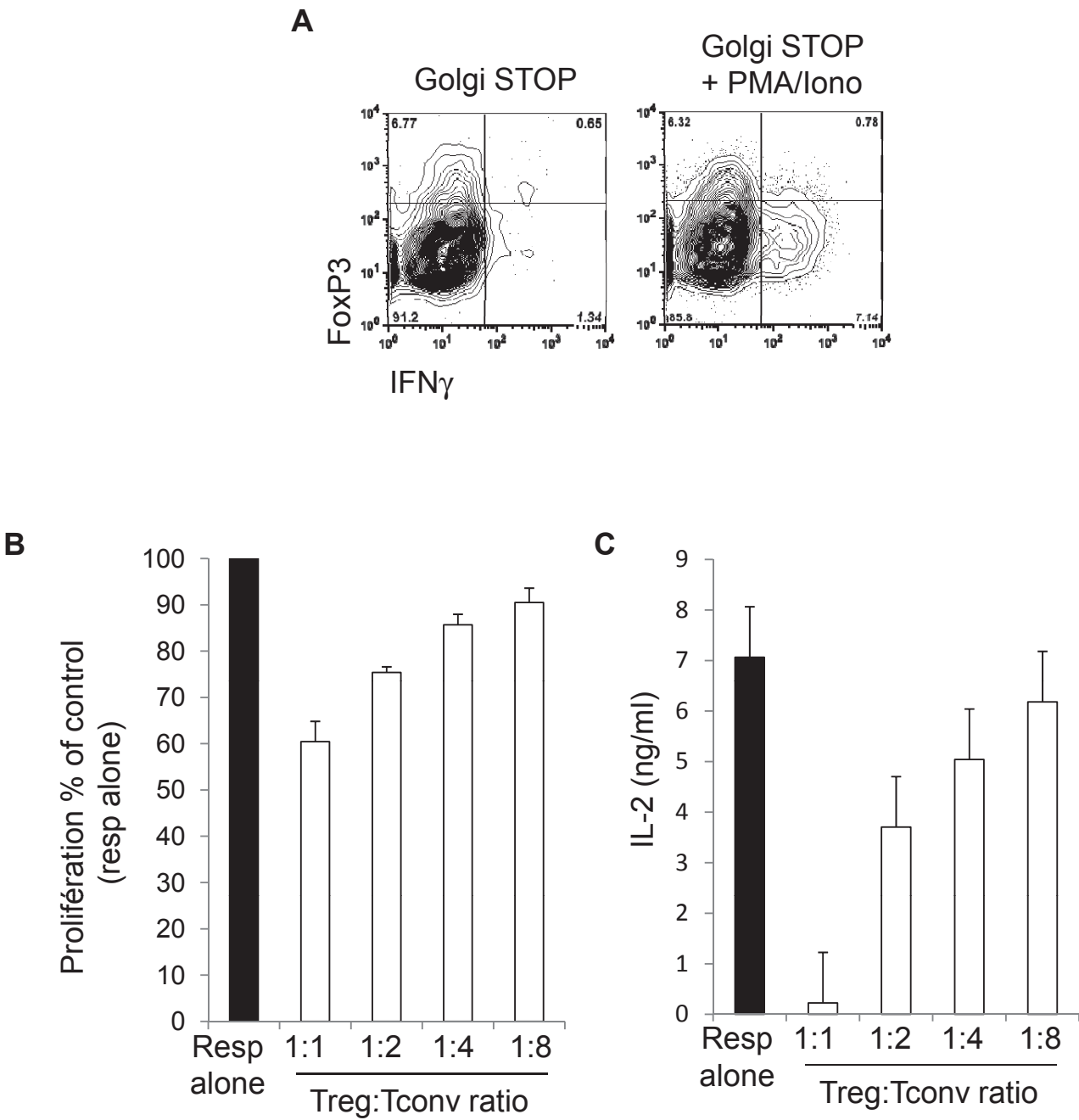


Figure S3: ICOS-L is highly expressed on R848-activated HD-pDC

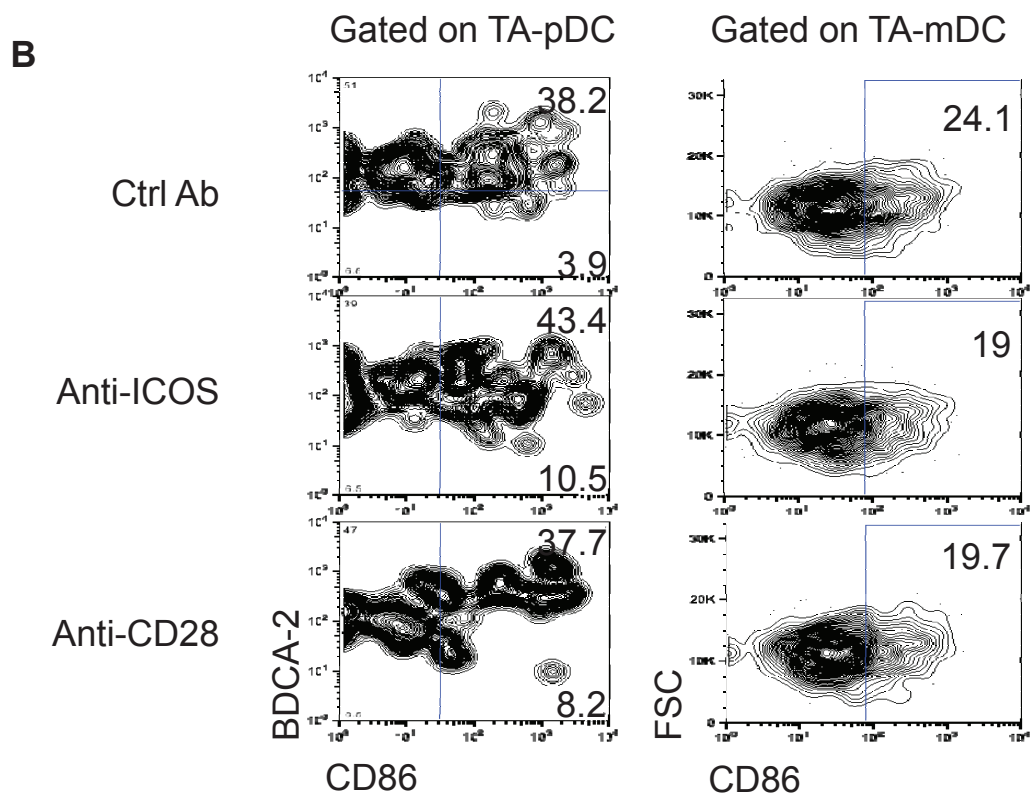
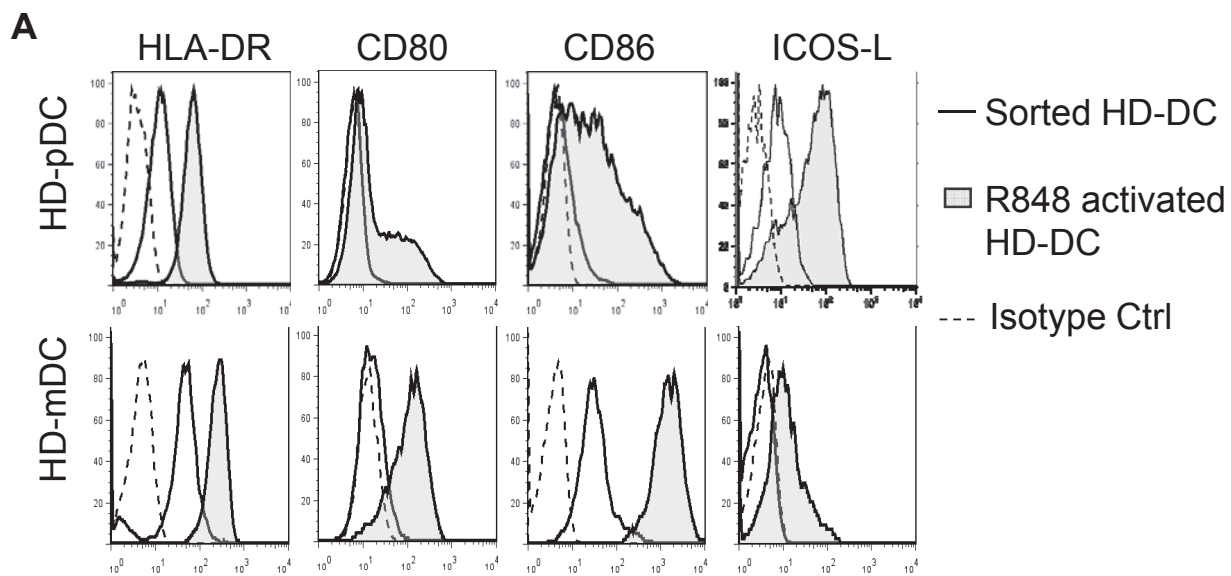


Figure S4: ICOS blockade reduces Treg but not Tconv proliferation induced by pDC without impacting mDC/T cell activation

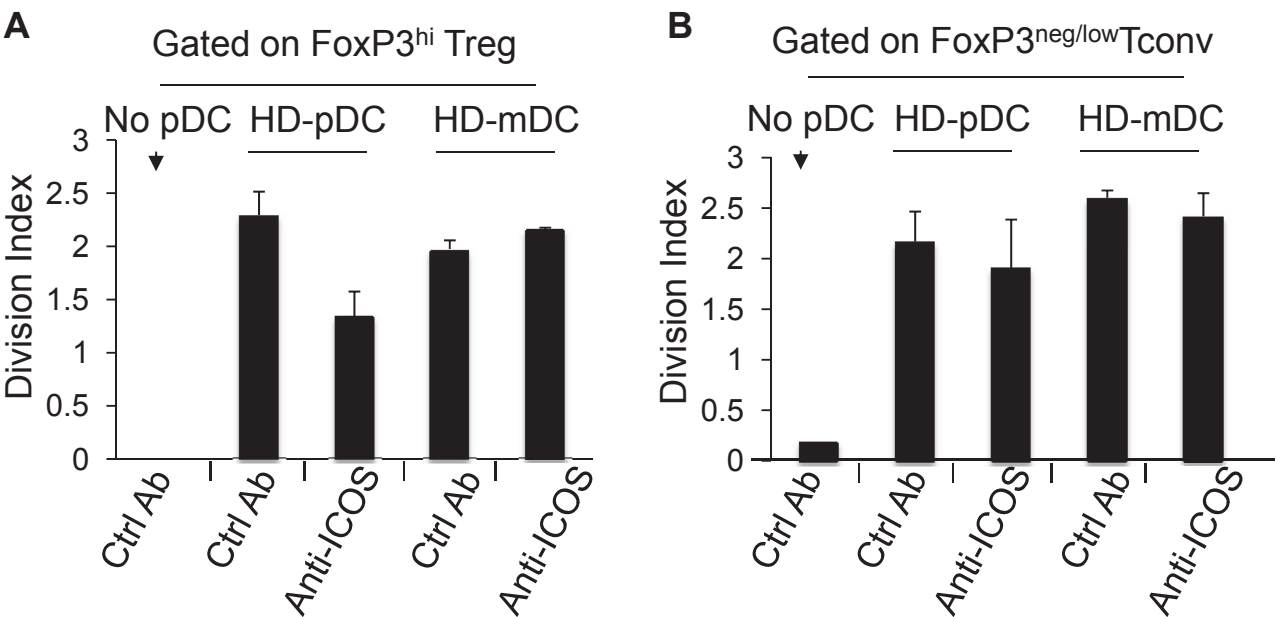


Figure S5: Strong IL-10 secretion in culture of BT single cell suspension

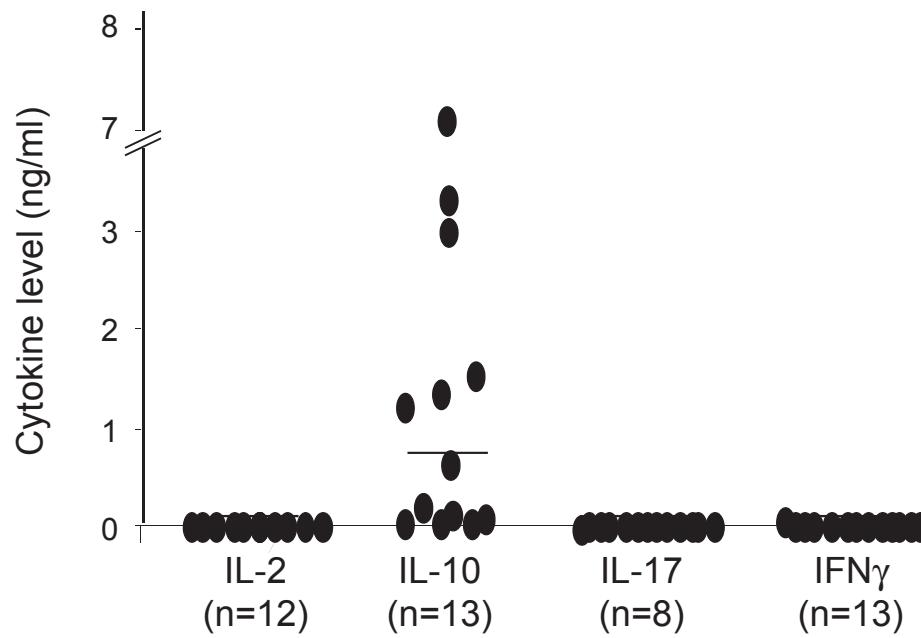
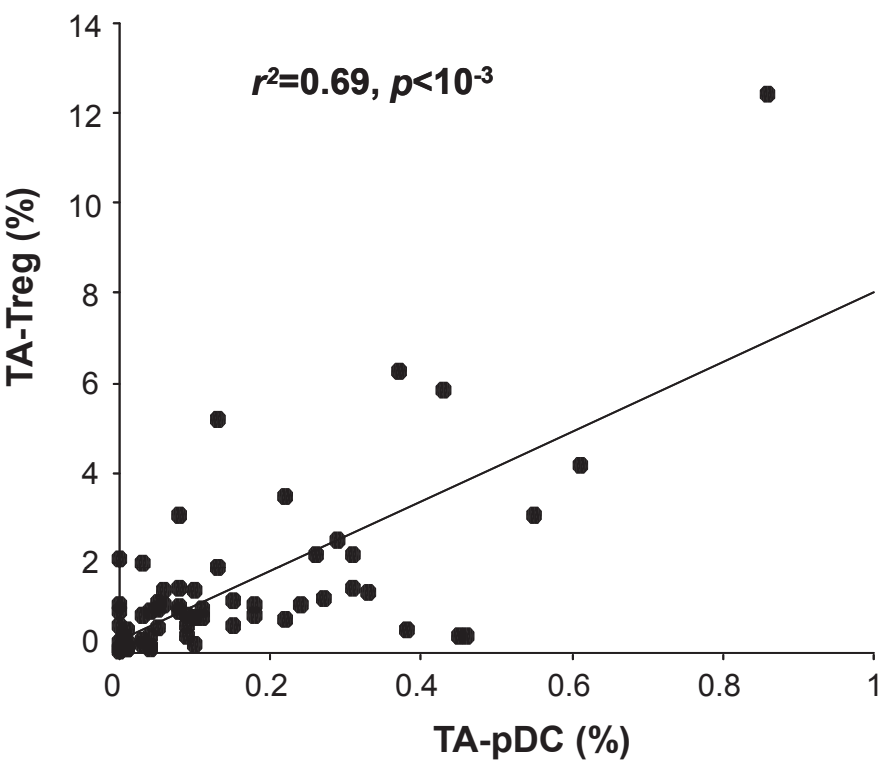
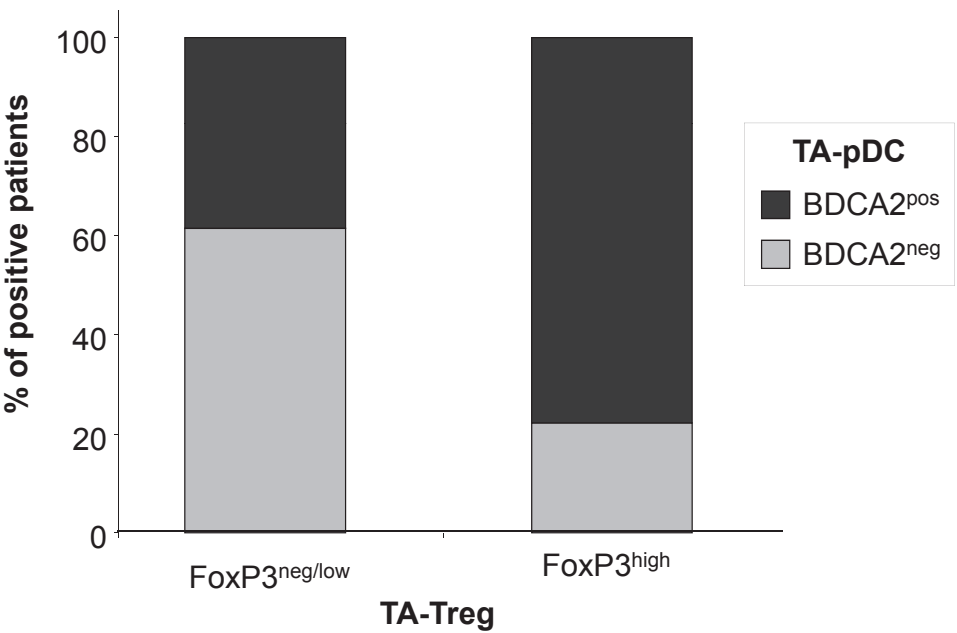


Figure S6

A



B



		Patients		ICOS ^{neg} (<1.7)		ICOS ⁺ (≥1.7)		<i>p</i> =	<i>Test</i>
		N	%	N	%	N	%		
Age (years)	< 50	40	33.3	18	30.5	22	36.1	0.519	Chi-2
	≥ 50	80	66.7	41	69.5	39	63.9		
Menopause	no	43	36.8	21	35.6	22	37.9	0.793	Chi-2
	yes	74	63.2	38	64.4	36	62.1		
Tumor Size (mm)	< 30	85	70.8	42	71.2	43	70.5	0.933	Chi-2
	≥ 30	35	29.2	17	28.8	18	29.5		
SBR	1	24	20.0	18	30.5	6	9.8	<0.001	Chi-2
	2	61	50.8	33	55.9	28	45.9		
	3	35	29.2	8	13.6	27	44.3		
Lymphatic emboles	no	71	59.2	44	25.4	27	55.7	<0.001	Chi-2
	yes	49	40.8	15	74.8	34	44.3		
Lymph node involvement	0	53	44.2	29	49.2	24	39.3	0.277	Chi-2
	1-3	44	36.7	22	37.3	22	36.1		
	>3	23	19.2	8	13.6	15	24.6		
PgR (%)	< 10	29	24.4	10	17.2	19	31.1	0.077	Chi-2
	≥ 10	90	75.6	48	82.8	42	68.9		
ER (%)	< 10	15	12.6	3	5.2	12	19.7	0.025	Fisher Exact
	≥ 10	104	87.4	55	94.8	49	80.3		
Triple Negative	no	100	90.1	55	96.5	45	83.3	0.020	Chi-2
	yes	11	9.9	2	3.5	9	16.7		
Her2/neu	Non amplified	103	88.8	54	96.4	49	81.7	0.017	Fisher Exact
	amplified	13	11.2	2	3.6	11	18.3		
Histology	Luminal A	71	61.7	44	80.0	27	45.0	<0.001	Fisher Exact
	Luminal B	29	25.2	8	14.5	21	35.0		
	Her2 amplified	4	3.5	1	1.8	3	5.0		
	Triple negative	11	9.6	2	3.6	9	15.0		

Table S1: Patients characteristics and correlation of ICOS^{neg} or ICOS⁺ with clinical parameters

Target	Providers	Clone	Target	providers	Clone
CD3	Becton Dickinson	SK7	CD45RO	Becton Dickinson	UCHL1
CD4	Becton Dickinson	RPAT4	CD56	Becton Dickinson	B159
CD8	Becton Dickinson	SK1	CD80	Becton Dickinson	L307.4
CD11c	Biolegende	Bu15	CD86	Becton Dickinson	IT2.2
CD14	Becton Dickinson	M5E2	CD123	Becton Dickinson	7G3
CD15	Becton Dickinson	HI98	CD127	eBioscience	eBioRDR5
CD19	Becton Dickinson	HIB19	BDCA2	Miltenyi	AC144
CD20	Becton Dickinson	2H7	ICOS	eBioscience	ISA-3
CD25	eBioscience	BC96	ICOS-L	eBiocience	MIH12
CD40	Beckman coulter	MAB89	HLA-DR	Becton Dickinson	L243
CD45	Becton Dickinson	HI30	Ki67	Becton Dickinson	B56
CD45RA	Becton Dickinson	HI100	FoxP3	eBioscience	PCH101

Table S2 : Clones of mAbs used for flow cytometry analyses

7 Discussion

Nous avons vu en introduction de nombreuses données suggérant que les Treg exercent leur pouvoir supprimeur *in situ*. En effet, la présence de Treg dans la tumeur est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Gobert et al., 2009), de l'ovaire (Curiel et al., 2004), dans les carcinomes du poumon non à petites cellules (Petersen et al., 2006), les carcinomes hépatocellulaires (Gao et al., 2007), les carcinomes de l'endomètre (Yamagami et al., 2011), le cancer du pancréas (Hiraoka et al., 2006), et les mélanomes (Mougiakakos et al., 2010). De plus, les TA-Treg montrent un fort pouvoir supprimeur *in vitro* (Gobert et al., 2009; Strauss et al., 2008) et expriment un phénotype activé ainsi que de nombreuses molécules impliquées dans leur pouvoir supprimeur telles que CD39 (Mandapathil et al., 2012; Schuler et al., 2012), et Granzyme B (Cao et al., 2007; Li et al., 2011). Durant ma thèse, nous avons obtenu des données, qui s'inscrivent dans un schéma global (Figure 10) et suggèrent que i) les Treg sont recrutés spécifiquement dans la tumeur *via* l'axe de chimiotactisme CCR4/CCL22 suite à la détection des cellules transformées par les NK et les macrophages (Article n°1), ii) la présence de facteurs solubles dans l'environnement inhibe la sécrétion d'IFN- α par les pDC favorisant fortement leur capacité à induire un enrichissement en cellules FoxP3⁺ et en T CD4 producteur d'IL-10 (Article n°2) enfin, iii) l'engagement d'ICOS est nécessaire pour permettre la prolifération des Treg et la sécrétion d'IL-10 par les T CD4 lors de leur activation par les TA-pDC dans les tumeurs de sein (Article n°3). (Figure 11)

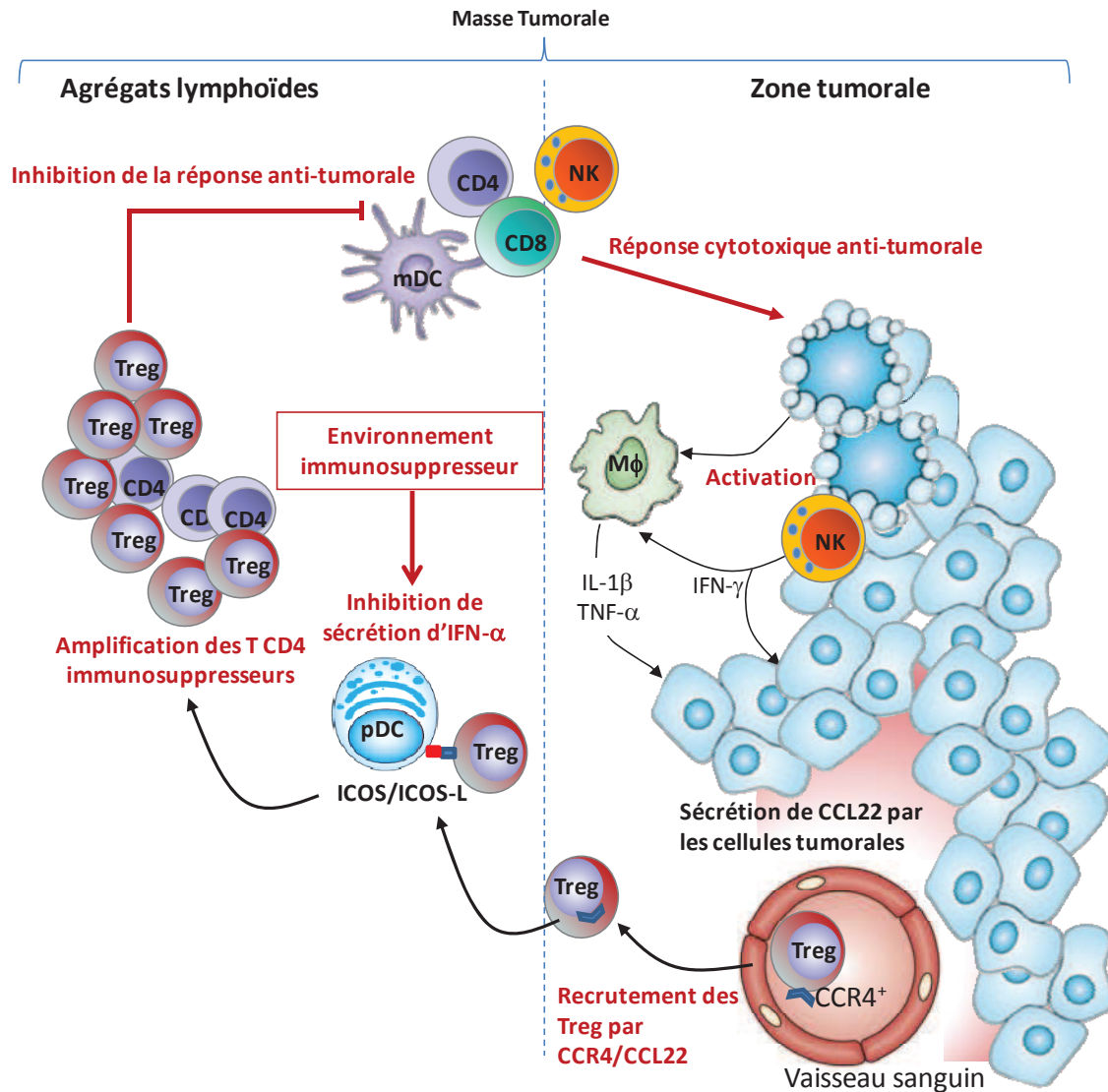


Figure 11: *Modèle* La sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-1 β par les NK et les Macrophages conduit à la production de CCL22 par les cellules tumorales participant au recrutement des Treg qui sont alors amplifiés *in situ* par les TA-pDC sous la dépendance de l'axe de co-stimulation ICOS/ICOS-L

La sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α et d'IFN- γ respectivement produits par les macrophages et les NK suite à la détection des cellules transformées conduit à la sécrétion de CCL22 par les cellules tumorales. CCL22 participe au recrutement des Treg du sang vers la tumeur. Les TA-Treg sont alors activés puis amplifiés par les TA-pDC altérées qui induisent également la génération d'une forte proportion de T CD4 sécréteurs d'IL-10. Le blocage de l'interaction ICOS/ICOS-L supprime l'amplification des Treg et la sécrétion d'IL-10 par les T CD4 suite à leur activation par les TA-pDC altérées dans l'environnement tumoral et pourrait permettre de bloquer la réponse des cellules T CD4 immunosuppressives induite par les TA-pDC.

7.1 Coopération entre NK, macrophages et cellules tumorales dans la production de CCL22 et le recrutement précoce des Treg

Les travaux dans le cancer de l'ovaire (Curiel et al., 2004), de l'estomac (Mizukami et al., 2008), du sein (Gobert et al., 2009) et du colon (Svensson et al., 2012) ont clairement démontré l'implication de CCR4/CCL22 dans le recrutement des Treg au sein des tumeurs. Plus de 80% des Treg du sang expriment fortement CCR4. De ce fait, aucune étape d'activation dans les organes lymphoïdes secondaires n'est nécessaire pour le recrutement de ces Treg dans les tumeurs suite à la sécrétion de CCL22 par les cellules transformées. A l'inverse, les cellules Th2 spécifiques des Ag tumoraux proviennent de cellules T CD4 naïves qui ont été polarisées dans les organes lymphoïdes avant d'acquérir l'expression de CCR4 et leurs fonctions effectrices, ainsi les Treg pourraient être recrutés avant les cellules T effectrices dans la masse tumorale.

Nos résultats d'IHC sur coupes de tumeurs, démontrent que les cellules tumorales constituent la principale source de CCL22 dans les tumeurs de sein, au contraire de ce qui est décrit dans le modèle murin de carcinome pulmonaire où les NK et les mDC sont les cellules produisant CCL22 dans la masse tumorale (Mailloux and Young, 2009). Nos expériences *in vitro* réalisées sur lignées cellulaires de cancer du sein sont en cohérence avec les observations de la littérature montrant que les cellules épithéliales du colon (Berin et al., 2001) ou les kératinocytes (Xiao et al., 2003) soumis à des signaux inflammatoires (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) sécrètent de forts niveaux de CCL22 alors que les cytokines IL-4 et IL-13 qui favorisent la sécrétion de CCL22 par les mDC ont un effet inhibiteur (Xiao et al., 2003) (Article n°1). L'ensemble de ces données suggère que la sécrétion de CCL22 par les cellules tumorales requiert une stimulation impliquant IFN- γ et IL-1 β ou TNF- α .

D'après nos données, les NK intra-tumoraux, après interaction avec les cellules tumorales, peuvent être la source de l'IFN- γ . En effet, les marquages NKp46 montrent que les NK sont localisés au contact des cellules transformées dans les tumeurs de sein, en accord avec les données récemment publiées par Mamessier et coll. (Mamessier et al., 2011) et non, comme pour les cellules T, dans l'infiltrat lymphoïde en périphérie des cellules tumorales. En dépit de leur altération fonctionnelle (sécrétion d'IFN- γ et cytotoxicité) dans l'environnement immuno-suppresseur des tumeurs établies (Mamessier et al., 2011), les NK participent à l'immunité anti-tumorale en réduisant la croissance tumorale et la dissémination métastatique de tumeurs de sein humaines transplantées dans des souris SCID (Dewan et al., 2005). Les expériences *in vitro* réalisées dans notre étude (Article n°1), confirment que les cellules NK provenant d'ascite de

cancer du sein sont capables d'induire la sécrétion de CCL22 par les cellules tumorales se substituant ainsi à l'ajout d'IFN- γ exogène dans les cultures.

Nous avons montré que les monocytes produisent de l'IL-1 β et du TNF- α dans les co-cultures de lignées tumorales en présence d'IFN- γ exogène, augmentant ainsi la production de CCL22 par les cellules tumorales. Les macrophages purifiés d'ascite de patientes atteintes de cancer du sein induisent la production de CCL22 dans les co-cultures avec les cellules tumorales.

Notre modèle suppose que le même mécanisme prend place dans la tumeur, suggérant que les TAM produisent du TNF- α et de l'IL-1 β *in situ*. L'analyse en cytométrie en flux sur les suspensions cellulaires de tumeurs primaires de sein met en évidence des TAM (cellules CD68⁺) exprimant fortement CD163 traduisant une activation non classique de type M2 immunosuppresseur. En accord avec notre modèle, la présence d'IL-1 β dans la masse tumorale a été positivement corrélée avec le taux d'infiltration des TAM (CD68⁺) (Jin et al., 1997). Des données préliminaires, obtenues sur un nombre restreints de tumeurs primaires de sein (n=20) confirment la présence d'IL-1 β et de TNF- α dans l'environnement tumoral. D'autre part, la présence de macrophages dans la masse tumorale corrèle avec l'infiltration en Treg dans le cancer de l'ovaire (Kryczek et al., 2007) et le nombre de TAM (analysé sur la base de l'expression de CD163 et CD68) infiltrant la masse tumorale est associé à un mauvais pronostic dans les cancers du sein (Campbell et al., 2011; Leek et al., 1996; Medrek et al., 2012; Tsutsui et al., 2005), du rein (Komohara et al., 2011), « tête et cou » (Fujii et al., 2012) du pancréas (Hanada et al., 2000; Kurahara et al., 2012; Ohno et al., 2003), le mélanome (Bronkhorst et al., 2011), et le carcinome hépatocellulaire (Zhou et al., 2009a). Chez la souris, la présence de TAM infiltrant les tumeurs colorectales corrèle avec la présence de Treg (Liu et al., 2011b). Le modèle que nous proposons suggère que les Treg sont recrutés très précocement lors de la détection des cellules transformées par les effecteurs de l'immunité innée.

Le tissu mammaire normal contient des NK et des macrophages (Coussens and Pollard, 2011; Misra et al., 2012; Zhao et al., 2010) pouvant détecter très précocement les cellules transformées conduisant à la sécrétion d'IFN- γ , d'IL-1 β et de TNF- α qui favorise la production de CCL22 par les cellules tumorales. Ainsi les Treg du sang sont recrutés spécifiquement et très rapidement après l'activation des cellules de l'immunité innée dans les tumeurs.

Cependant, les données publiées par Gobert et coll. montrent que seuls les Treg présents dans les agrégats lymphoïdes sont associées à un mauvais pronostic et que suite à leur infiltration dans la masse tumorale, ils perdent l'expression de CCR4 (Gobert et al., 2009).

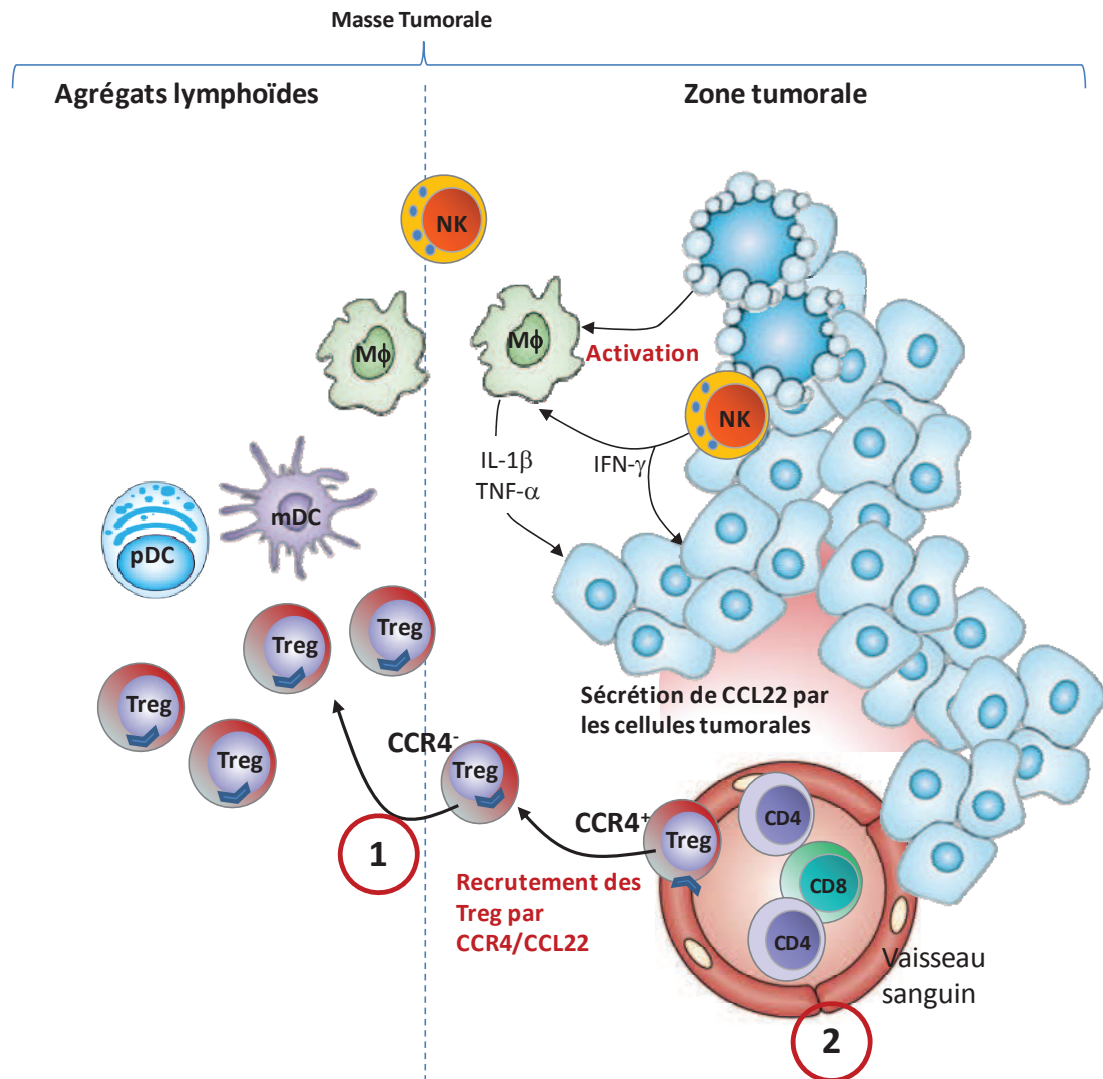


Figure 12: Quels sont les mécanismes de détection des cellules tumorales par les NK et les macrophages, l'axe de chimiotactisme CCR4/CCL22 permet-il un recrutement précoce des Treg et quel mécanisme permet la migration des Treg de la zone tumorale vers les agrégats lymphoïdes?

Notre modèle suggère que les NK et les macrophages sont capables de détecter les cellules transformées dès les premiers stades du développement du cancer. La sécrétion de CCL22 par les cellules tumorales pourrait avoir lieu très rapidement lors de l'initiation de la réponse immune anti-tumorale, ce qui conduirait à un recrutement très précoce des Treg dans la masse tumorale. Les Treg représentent la principale sous-population de cellules exprimant CCR4 dans le sang, ce qui provoquerait l'établissement d'une réponse de type immunosuppressive avant même que les cellules effectrices n'infiltrant la tumeur. CCL22 est produit par les cellules transformées, les Treg devraient donc migrer dans la zone tumorale, or seuls les TA-Treg présents dans les agrégats lymphoïdes sont associés à un mauvais pronostic.

- ① Quels sont les mécanismes impliqués dans la migration des Treg vers les agrégats lymphoïdes, une fois entrés dans la masse tumorale ?
- ② L'axe CCR4/CCL22 conduit-il à un recrutement précoce des Treg par rapport aux cellules T effectrices?

La présence de Treg dans les agrégats lymphoïdes suggère que d'autres mécanismes de recrutement interviennent après l'extravasation des Treg conduisant à leur adressage vers les agrégats lymphoïdes et non au contact de la source de CCL22 que sont les cellules tumorales. Liu et coll. ont montré dans un modèle de tumeurs colorectales que la production de CCL20 par

les macrophages permet le recrutement des Treg qui expriment CCR6 (Liu et al., 2011b). CCL20 étant produite dans l'environnement tumoral dans le cancer du sein (Bell et al., 1999), elle pourrait participer à cette migration des Treg vers les zones d'agrégats lymphoïdes. L'analyse de l'expression de CCR6 à la surface des TA-Treg pourrait permettre de confirmer cette hypothèse.

Deux questions majeures sont soulevées par notre modèle et devront être résolues pour le confirmer pleinement (Figure 12)

- Quels sont les mécanismes impliqués dans la migration des Treg vers les agrégats lymphoïdes après leur entrée dans la masse tumorale?
- L'axe CCR4/CCL22 conduit-il à un recrutement plus précoce des Treg comparé aux cellules T effectrices?

7.2 Relation entre pDC altérées et cellules T CD4 immunosuppressives dans les tumeurs

La présence de pDC dans les tumeurs primaires est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Treilleux et al., 2004), de l'ovaire (Annexe n°2 : (Labidi-Galy et al., 2011)) le mélanome (Jensen et al., 2012) et le cancer « tête et cou » (Hartmann et al., 2003). D'autre part, nous avons montré que l'infiltration des tumeurs de sein par les pDC est positivement corrélée avec la présence de Treg que ce soit sur coupe de tumeurs (IHC) ou en cytométrie en flux sur tumeurs fraîches (Article n°2).

7.2.1 Mécanismes de recrutement des pDC dans la masse tumorale

Nous avons montré que, la proportion de pDC est diminuée dans le sang des patientes atteintes de cancer du sein et d'ovaire par comparaison avec des donneurs sains (Article n°2, et Annexe n° 2). D'autre part, l'infiltration en pDC est plus importante dans les cancers du sein de type basal like (triple négatif) et dans les tumeurs à fort index mitotique. Ces observations suggèrent l'existence d'un mécanisme de recrutement des pDC spécifique de certains sous-types tumoraux conduisant à leur accumulation dans ces tumeurs. Aujourd'hui ce mécanisme n'est pas caractérisé dans le cancer du sein mais les données de la littérature permettent de suggérer différentes hypothèses.

En 2001 Zou et coll. (Zou et al., 2001), ont montré la production par les cellules épithéliales de tumeurs d'ovaire de SDF-1/CXCL12 et l'expression de son récepteur CXCR4 par les pDC dans le sang et la tumeur de patientes porteuses d'un carcinome ovarien. Les pDC sont capables de migrer *in vitro* en réponse à CXCL12 suggérant que le couple CXCL12/CXCR4 pourrait participer à

leur recrutement dans les tumeurs d'ovaire. La forte production de CXCL12 dans les tumeurs de sein rapportée par Mirisola et coll. (Mirisola et al., 2009) et que nous avons pu confirmer dans les surnageants tumoraux de tumeurs du sein (données non publiées), pourrait également participer au recrutement des pDC dans les tumeurs de sein.

Très récemment, l'expression de CCR9 par les pDC a été associée à leur fonction tolérogène (Hadeiba et al., 2008). En effet, la vaccination contre un peptide d'OVA quelques jours après l'injection des pDC CCR9⁺ chargées par ce peptide aboutit à l'inhibition de la prolifération des cellules T spécifiques dans les ganglions lymphatique chez la souris. Les pDC CCR9⁺ présentent un phénotype immature, ne sécrètent pas d'IFN- α et migrent dans les ganglions. Suite à leur activation par un ligand de TLR, elles perdent l'expression de CCR9 et acquièrent un phénotype mature, qui coïncide avec la perte de leurs propriétés tolérogènes (Hadeiba et al., 2008). CCL25 le ligand de CCR9 est exprimé dans les xénogreffes de cellules tumorales de cancer du sein humaines chez la souris (Johnson-Holiday et al., 2011). De même CCL25 est exprimé dans les tumeurs humaines de l'ovaire (Johnson-Holiday et al., 2011). La présence de CCL25 dans la masse tumorale pourrait donc conduire au recrutement des pDC CCR9⁺ immuno-suppressives du sang vers la tumeur. Cette hypothèse n'a cependant pas été explorée chez l'homme à ce jour.

D'autre part, le groupe de N Bendriss-Vermare dans notre équipe (Sisirak et al., 2011), a montré chez l'homme dans l'amygdale, l'expression par les pDC de CCR6 et CCR10. Cette expression est induite en présence d'IL-3 produite par les cellules T activées dans les organes lymphoïdes secondaires ou les muqueuses. *In vivo* chez la souris, l'expression de CCR6 et CCR10 est associée à une perte de l'expression de CCR7 par les pDC qui favorise leur migration des organes lymphoïdes vers la peau inflammée ou le tissu tumoral (mélanome, B16 transplanté) *via* l'expression de CCR6 et le recrutement en réponse à CCL20. Chez l'homme, le rôle de CCR6 dans la migration des pDC vers la masse tumorale a été démontré dans le mélanome (Charles et al., 2010). La présence de CCL20 a été mise en évidence par Bell et coll. dans les tumeurs de sein (Bell et al., 1999) et confirmée par notre équipe (Thomachot et al., 2004). Cependant, si le couple CCR6/CCL20 a été associé à la séquestration des mDC immatures dans le lit tumoral au contraire du couple CCR7/CCL19 associé lui à la détection des mDC matures dans la périphérie de la tumeur au contact des lymphocytes T (Bell et al., 1999), l'impact de CCR6/CCL20 sur le recrutement des pDC n'a jamais été évalué dans le contexte du cancer du sein et de l'ovaire.

7.2.2 Les pDC sont altérées et ne produisent pas d'IFN- α dans les tumeurs de sein

L'activation des pDC dans la tumeur contraste avec leur perte de capacité à sécréter de l'IFN- α après stimulation *via* un ligand de TLR7 ou 9. Nous montrons (Article n°2), que l'addition de

surnameants de tumeurs dans des cultures de pDC de donneurs sains en présence de ligands de TLR7 et 9, inhibe la sécrétion d'IFN- α sans altérer les sécrétions d'IP-10/CXCL10 et la surexpression des marqueurs d'activation (CD83, CD86). Ceci suggère que cette altération des fonctions innées (inhibition d'IFN- α) des pDC de tumeurs ne résulte pas d'une réduction d'expression des TLRs comme rapporté dans le cancer « Tête et cou » (Hartmann et al., 2003). Dans notre équipe, Sisirak et coll. ont caractérisé les mécanismes responsables de cette inhibition de sécrétion d'IFN- α par les pDC dans l'environnement tumoral du cancer du sein par l'addition d'Ac bloquants ou de cytokines exogènes (Sisirak et al. Int J Cancer en révision). En résumé, la présence de TGF- β et de TNF- α dans l'environnement tumoral inhibe la translocation d'IRF-7 dans le noyau cellulaire durant l'activation des pDC par des ligands de TLR-7 et 9 *in vitro* conduisant à l'inhibition sélective de la production d'IFN- α . En collaboration avec le groupe de N Bendriss-Vermare, nous avons aussi démontré dans le cancer de l'ovaire la perte de capacité à sécréter de l'IFN- α et du TNF- α par les pDC intra-tumorales, et le rôle majeur du TGF- β et du TNF- α dans cette altération (Annexe 2).

D'autre part, des données récentes de notre équipe montrent que la déplétion des pDC réduit la croissance tumorale dans un modèle murin porteur de tumeur mammaire syngénique surexprimant l'oncogène Her2/Neu activé de rat (I. Le Mercier et al. Cancer Res en révision). De même, la déplétion des pDC dans le modèle de tumeur mammaire 4T1 (injecté en intra-cardiaque) réduit la dissémination métastatique et diminue la proportion de Treg dans la moelle au profit de cellules T CD8 cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales (Sawant et al., 2012).

7.2.3 Les pDC altérées activent préférentiellement les T CD4 mémoires immuno-suppresseurs

Dans le but d'expliquer la corrélation entre l'infiltration en Treg et en pDC dans les tumeurs de sein, nous avons émis l'hypothèse que les pDC de tumeurs pouvaient être responsables de l'induction d'iTreg à partir de cellules T naïves. En effet, Martin-Gayo en 2010 (Martin-Gayo et al., 2010) a montré la capacité des pDC thymiques humaines à induire l'émergence de Treg à partir de thymocytes au stade DP et au stade SP CD4⁺. Cependant, l'addition de pDC purifiées de tumeur en présence de CD4 naïves allogéniques n'induit aucun enrichissement en cellules FoxP3⁺ parmi les T CD4 ayant proliféré *in vitro* (Article n°2). De même les pDC sont capables d'induire une polarisation des cellules T CD4 naïves de type Tr1-like sécrétrices de fortes quantités d'IL-10 parmi les T CD4 (Ito et al., 2008). Lors de co-cultures de cellules T CD4 naïves allogéniques avec des TA-pDC, nous confirmons que les TA-pDC comme les pDC de donneurs sains stimulent fortement l'émergence de cellules T CD4 productrices d'IL10, à partir de T naïfs. Donc les TA-pDC ont une capacité à induire des cellules T CD4 productrices d'IL-10 équivalente à

celle des pDC issues de donneurs sains. En somme, l'environnement tumoral ne modifie pas de façon significative les capacités des pDC dans la polarisation des T CD4 naïfs.

Dans les tumeurs de sein, l'ensemble des T CD4 expriment un phénotype mémoire. Les pDC de donneurs sains, les TA-pDC et les pDC conditionnées par les surnageants de tumeur induisent la prolifération de Treg mais seules les pDC pré-incubées par les surnageants de tumeur et les TA-pDC favorisent un fort enrichissement en Treg parmi les cellules T CD4 mémoires allogéniques (Article n°2, Article n°3). Nous avons montré que l'ajout d'IFN- α dans les co-cultures de T CD4 mémoires et de TA-pDC inhibe leur capacité à induire la prolifération et l'enrichissement en Treg. De même, l'élimination de l'IFN- α sécrété, augmente fortement la capacité de ces pDC à induire un enrichissement en Treg et en cellules sécrétrices d'IL-10 parmi les T CD4 mémoires. Ainsi les TA-pDC n'entraînent pas une polarisation immuno-suppressive des cellules T naïves mais favorisent l'activation et l'enrichissement en Treg et en cellules productrices d'IL-10 parmi les T CD4 mémoires. L'incapacité de ces pDC issues de tumeurs à produire de l'IFN- α est favorable à l'émergence d'une réponse immuno-suppressive puisque l'ajout d'IFN- α recombinant dans les co-cultures de cellules T CD4 mémoires et de pDC altérées inhibe cet enrichissement en Treg et favorise la sécrétion d'IFN- α par les cellules T en réduisant la sécrétion d'IL-10.

Cependant ce travail pose deux questions majeures qui n'ont pas été résolues à ce jour (Figure 13):

Quels sont les facteurs impliqués dans l'activation et la maturation des TA-pDC ?

Quel est le mécanisme de recrutement des TA-pDC du sang vers la tumeur ou le mécanisme de leur séquestration dans l'environnement tumoral ?

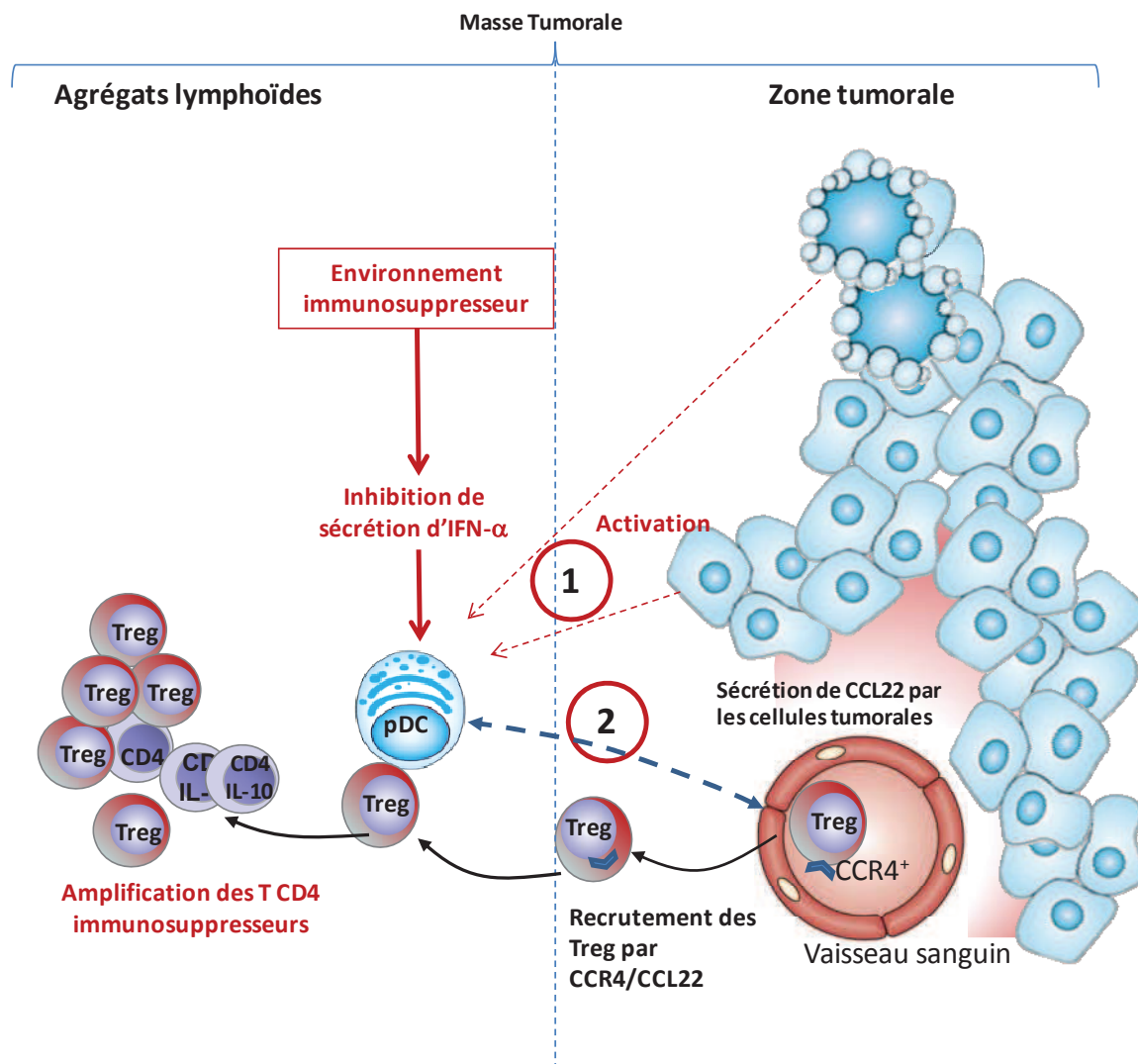


Figure 13: Les TA-pDC sont capables d'amplifier les TA-Treg. Quels sont les facteurs induisant leur maturation et leur recrutement dans les tumeurs?

Les TA-pDC présentent un état d'activation partiel sur la base de leur expression des molécules de co-stimulation et du CMH-II. L'environnement tumoral contient du TGF- β et du TNF- α qui conduisent à une altération des TA-pDC qui perdent alors leur capacité à sécréter de l'IFN- α en réponse à l'engagement des TLR 7 et 9. Cette absence de sécrétion d'IFN- α par les pDC favorise l'amplification des TA-Treg et des TA-T CD4 mémoires producteurs d'IL-10.

① Quels sont les facteurs impliqués dans l'activation et la maturation des TA-pDC ?

② Quel est le mécanisme de recrutement et ou de séquestration des TA-pDC du sang vers la tumeur ?

7.3 ICOS joue un rôle central dans la réponse immuno-suppressive intra-tumorale induite par les pDC.

Plusieurs données issues de l'équipe suggèrent qu'ICOS est associée à une réponse immuno-suppressive dans la masse tumorale : i) les Treg (Gobert et al., 2009) et les pDC (Treilleux et al., 2004) sont de mauvais pronostic dans le cancer du sein, ii) les Treg et les pDC interagissent dans la tumeur (Article n°2) et iii) cette interaction médiée par ICOS est indispensable pour la

prolifération des Treg et la sécrétion d'IL-10 par les cellules T CD4 en présence de pDC (Article n°3) et ces données peuvent expliquer l'impact pronostic défavorable de la détection de cellules ICOS⁺ dans le cancer du sein (Article n°3). Il est intéressant de noter que des données similaires ont été obtenues très récemment dans le cancer de l'ovaire (Conrad et al., 2012), tumeur dans laquelle les pDC (Labidi-Galy et al., 2012) et les Treg (Curiel et al., 2004) ont un impact pronostic défavorable.

7.3.1 L'interaction ICOS/ICOS-L participe à l'induction de cellules T immuno-suppressives par les TA-pDC

Dans nos expériences *in vitro*, les Treg isolés de tumeur prolifèrent fortement en présence de pDC. L'ajout de l'Ac bloquant anti-ICOS supprime la prolifération des Treg et ne module que très faiblement la prolifération des autres cellules T CD4, montrant l'importance majeure d'ICOS dans l'activation des Treg par les pDC. Ces données sont confirmées par les travaux de Conrad et coll. dans le cancer de l'ovaire (Conrad et al., 2012). Les Treg de tumeur ne prolifèrent pas lorsqu'ils sont co-stimulés par anti-CD3/anti-CD28 en présence d'IL-2. De façon identique, Ito et coll. ont montré que les Treg ICOS⁺ purifiés de sang ou de thymus humain, au contraire des Treg ICOS^{neg}, ne prolifèrent pas lorsqu'ils sont activés par anti CD3/anti CD28 en présence d'IL-2 exogène, alors qu'ils prolifèrent fortement après addition de la chimère ICOS-L-Ig en plus de la signalisation *via* le TCR et CD28 ou en présence de pDC (Ito et al., 2008).

D'autre part, l'inhibition de l'interaction ICOS/ICOS-L réduit très fortement la sécrétion d'IL-10, alors que la production d'IFN- γ n'est pas altérée dans les surnageants de co-culture [pDC - T CD4 mémoires déplétés en Treg]. Ces résultats sont en accord avec les observations d'Ito et coll. démontrant un rôle majeur de la signalisation *via* ICOS dans la sécrétion d'IL-10 par les cellules T CD4 (Ito et al., 2007). L'action des TA-pDC porte sur les T CD4 mémoires, induit l'émergence de cellules T immuno-suppressives alors que la polarisation des cellules naïves n'est pas modifiée (Article n°2). Ceci est en adéquation avec le rôle d'ICOS dans l'induction de la réponse immuno-suppressive par les pDC altérées de tumeur sur les cellules T CD4 mémoires. En effet, il a été montré, chez la souris, qu'ICOS interviendrait dans un second temps par rapport à CD28 et que sa fonction première ne serait pas de modifier la polarisation des cellules T naïves mais au contraire, d'amplifier une réponse déjà initiée (Coyle et al., 2000; Gigoux et al., 2009). L'utilisation de souris KO pour CD28 ou ICOS et double KO CD28/ICOS lors d'un test d'hypersensibilité montre que CD28 joue un rôle prédominant pour l'instauration de l'hypersensibilité alors qu'ICOS intervient plus tardivement (Wong et al., 2009). Cette hypothèse a de plus été confirmée dans un modèle murin où l'interaction entre ICOS et la Pi3K a été abolie

par mutation, confirmant que CD28 participe de façon transitoire à l'activation des cellules T alors qu'ICOS intervient dans les dernières étapes de la différenciation de ces cellules en cellules TFh *via* une très forte activation de la Pi3K (Gigoux et al., 2009).

7.3.2 ICOS induit exclusivement des cellules T CD4 immuno-suppressives dans les tumeurs primaires de sein

ICOS joue de multiples rôles dans la réponse immunitaire. Des données chez la souris (Choi et al., 2011; McAdam et al., 2001) et chez les patients immuno-déficients atteints de mutations sur le gène d'ICOS (Salzer et al., 2004; Yong et al., 2009) montrent le rôle majeur joué par ICOS sur les cellules TFh lors de la formation des centres germinatifs et la maturation des lymphocytes B. De plus, de nombreux modèles murins ont établi l'implication ICOS dans le développement ou l'exacerbation de pathologies auto-immunes. En effet, le blocage d'ICOS-L permet de supprimer le développement du lupus érythémateux disséminé chez la souris NZB (Hu et al., 2009), l'injection d'ICOS-Ig supprime l'interaction ICOS/ICOS-L et réduit la sécrétion d'IFN- γ par les cellules T dans un modèle de myocardite expérimentale (Liu et al., 2006). De même ICOS participe à l'accumulation de cellules Th1 et Th17 dans l'arthrite auto-immune (Frey et al., 2010) et les cellules T ICOS KO transplantées dans des souris SCID induisent une faible réaction allogénique contre l'hôte par comparaison avec des cellules T normales (Hubbard et al., 2005). Chez l'homme, les patients déficients pour ICOS montrent une forte réduction du nombre et une altération de la fonction effectrice des cellules T CD4 et CD8 mémoires (Takahashi et al., 2009). Paulos et coll. ont montré que la co-stimulation *via* CD3 plus ICOS favorise l'émergence de cellules Th17 en présence d'IL-6, IL-23 et IL-1 β comparé à une co-stimulation classique *via* CD3/CD28 (Paulos et al., 2010). L'ensemble de ces résultats montre que l'engagement d'ICOS amplifie fortement les réponses des cellules T en complément de la co-stimulation médiée par CD28. Il joue un rôle complémentaire de CD28 (Shilling et al., 2009) et peut donc participer à une augmentation des réponses pro-inflammatoires effectrices de type Th1 ou Th17.

Cependant, l'environnement tumoral contient de fortes quantités d'IL-10, de TNF- α et de TGF- β qui inhibent les fonctions des cellules T effectrices. De plus, on détecte de très faibles quantités d'IFN- γ , d'IL-17 et les pDC sont altérées pour leur capacité à produire de l'IFN- α favorisant l'émergence de Treg et suggérant que l'environnement en cytokines dans les tumeurs est donc très défavorable à l'émergence de cellules effectrices pro-inflammatoires. Nous avons observé que le blocage d'ICOS dans les co-cultures de T CD4 avec des pDC permet l'augmentation des concentrations d'IL-2 dans les surnageants. Cela suggère que le blocage d'ICOS supprime l'accumulation de cellules qui consomment et/ou ne sécrètent pas d'IL-2 ou

que l'engagement d'ICOS inhibe la production d'IL-2 par les cellules T. La stimulation des cellules T en présence d'anti-CD3 et d'un Ac agoniste d'ICOS (clone 88.2, D Olive, Marseille) nécessite l'addition d'IL-2 exogène pour induire la sécrétion d'IL-10 par les T CD4 (Brevet PCT/EP2012/055735) en accord avec les données de la littérature montrant que l'engagement d'ICOS ne permet pas la production d'IL-2 par les T CD4 (Harada et al., 2003).

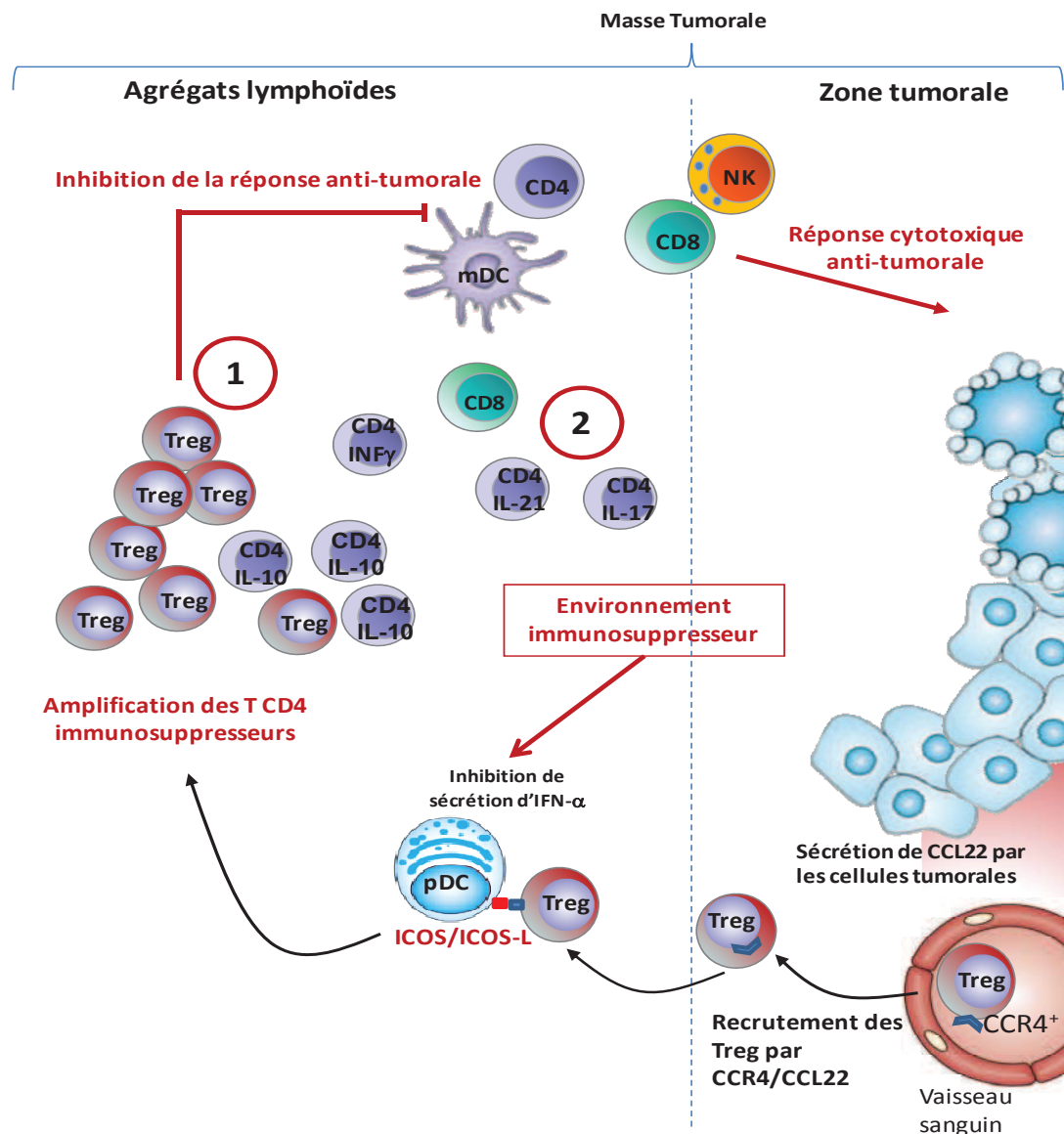


Figure 14: Les TA-Treg sont fortement dépendants d'ICOS. Quelle est la nature de ces cellules ? ICOS peut-il intervenir dans la réponse immune anti-tumorale ?

L'axe de co-stimulation ICOS/ICOS-L est nécessaire pour induire la prolifération des TA-Treg par les pDC et participe à l'amplification des T CD4 mémoires producteurs d'IL-10. Les Treg du sang ne sont pas dépendants d'ICOS pour proliférer car ils répondent à la co-stimulation CD3/CD28 montrant une différence majeure entre les Treg du sang et les TA-Treg. D'autre part, l'interaction ICOS/ICOS-L peut également intervenir dans les fonctions effectrices des cellules T mais nos résultats suggèrent que l'environnement est défavorable à l'induction d'une réponse anti-tumorale suite à la co-stimulation par ICOS des cellules T car contrairement à l'IL-10, nous ne détectons pas d'IFN-γ, d'IL-17 ni d'IL-2 dans la masse tumorale et une forte infiltration en cellules ICOS⁺ est un facteur de mauvais pronostic.

- ① Quelle est la nature des TA-Treg FoxP3⁺ dans les tumeurs de sein (iTreg, nTreg, plasticité) ?
- ② Pouvons-nous mieux caractériser le rôle d'ICOS sur les sous-populations de cellules T effectrices dans l'environnement tumoral ?

Nous montrons que l'expression d'ICOS dans la masse tumorale est un facteur de mauvais pronostic ce qui suggère très fortement que l'ensemble des T CD4 ICOS⁺ intra-tumoraux (dont les T CD4 ICOS⁺ non Treg) ont une fonction immuno-suppressive *in situ*. En effet, si l'activation de cellules T CD4 *via* leur TCR et ICOS favorise la sécrétion d'IFN- γ en présence d'IL-2 ou d'IFN- γ exogène, en présence d'IL-4, en absence d'IFN- γ ou en absence d'IL-2 dans l'environnement, on observe l'émergence de cellules productrices de TGF- β et qui expriment FoxP3 (Mesturini et al., 2006).

D'autre part, nous avons observé que la présence des signaux CD3/ICOS/CD28 délivrés par des billes sur lesquels sont fixés les Ac agonistes ne permet pas d'induire la prolifération des TA-Treg *in vitro* (données non montrées). Ces observations suggèrent fortement qu'ICOS est nécessaire mais non suffisant pour induire la prolifération des TA-Treg. Les pDC elles-mêmes, et possiblement l'environnement tumoral, sont associés à la présence de facteurs permettant, lorsqu'ils sont conjugués à l'engagement d'ICOS, de favoriser cette prolifération.

Dans l'environnement tumoral, la stimulation des cellules T mémoires, dont les Treg, *via* l'engagement d'ICOS conduirait donc, principalement à un fort enrichissement en cellules T immuno-suppressives parmi les T CD4.

Cependant, ce travail soulève deux questions majeures (figure 14):

Quelle est la nature des Treg FoxP3⁺ dans les tumeurs de sein? (Cellules T activées, iTreg, nTreg, plasticité)?

Pouvons-nous mieux caractériser le rôle d'ICOS sur les sous-populations de cellules T effectrices dans l'environnement tumoral?

8 Perspectives sur l'étude des Treg intra-tumoraux

Les données expérimentales obtenues par Michael Gobert et au cours de ma thèse, ainsi que les données de la littérature suggèrent très fortement un recrutement spécifique des Treg CCR4⁺ du sang vers la tumeur (Article n°1). De plus, avons identifié un lien étroit entre les TA-pDC altérées et les TA-Treg impliquant l'altération fonctionnelle des TA-pDC (Article n°2) et le rôle de l'interaction ICOS/ICOS-L (Article n°3). Nos observations suggèrent un modèle pouvant expliquer les mécanismes conduisant à l'enrichissement et à l'état d'activation des Treg dans les tumeurs, ce qui ouvre de nouvelles perspectives en immunothérapie du cancer.

Cependant, nous ne pouvons exclure qu'une fraction de ces Treg pourrait être induite par la différenciation de cellules T naïves en iTreg exprimant FoxP3. Cette question est importante car la nature des cellules FoxP3⁺ présentes dans la masse tumorale conditionne leur plasticité (capacité à se transdifférencier en cellules T effectrices de type Th1, Th2 ou Th17), ce qui doit être pris en compte pour la conception de futures stratégies visant à modifier les propriétés de ces cellules. D'autre part, les mécanismes de suppression associés aux TA-Treg n'étant pas encore clairement identifiés dans le cancer du sein, leur caractérisation pourrait permettre de définir de nouveaux outils thérapeutiques.

8.1 Mieux déterminer la nature des Treg dans le cancer du sein

Dans le travail que nous avons réalisé, nous avons identifié les Treg sur la base de leur expression de FoxP3. Pour valider cette stratégie, nous avons tout d'abord montré que les cellules FoxP3⁺ co-expriment fortement CD25 et n'expriment pas CD127 et avons validé que les cellules CD4⁺CD25⁺CD127^{Neg} de tumeur ont un important pouvoir suppresseur sur les autres T CD4 (Gobert et al., 2009). Cependant, les cellules T activées peuvent exprimer FoxP3 de façon transitoire (Walker et al., 2003). L'identification de la ou des sous-populations de cellules FoxP3⁺ infiltrant les tumeurs permettrait probablement de conclure sur la notion de plasticité des cellules FoxP3⁺ dans le cancer du sein.

En ce sens Wang et coll (Komatsu et al., 2009; Wang et al., 2009) ont montré que l'activation de cellules T par les signaux anti-CD3/anti-CD28 induit un fort pourcentage de cellules exprimant FoxP3 et CD25 dont une fraction exprime GARP. Seule la sous-population GARP⁺ parmi ces cellules T activées présente une forte activité suppressive, et n'exprime ni IL-17 ni IFN- γ après purification et réactivation (Wang et al., 2009). Cette co-expression de LAP, GARP et Foxp3 est aussi retrouvée au sein des lymphocytes infiltrant les tumeurs « tête et cou » (Schuler et al.,

2012). Les patients porteurs du VIH présentent une augmentation, dans le sang, de la proportion de cellules FoxP3⁺CD25⁺, mais l'analyse de l'expression de GARP parmi ces cellules a montré que la proportion de Treg CD25⁺FoxP3⁺GARP⁺ n'est pas modifiée dans le sang des patients par rapport aux donneurs sains (Wang et al., 2009). Cette donnée suggère que la proportion de Treg n'est pas modifiée dans les patients porteurs du VIH mais que la proportion de cellules FoxP3⁺ accrue dans le sang des patients est due à une activation chronique des cellules T due à la présence du virus.

Les Treg sont également caractérisés par la déméthylation de la région TSDR (Treg Specific Demethylated Region) qui stabilise la transcription de foxP3 (Polansky et al., 2008). Chez les patients atteints de diabète auto-immun, un enrichissement en cellules FoxP3⁺IFN- γ ⁺ ayant un pouvoir suppresseur *in vitro* a été montré. Cependant, ces cellules n'expriment pas Helios et présenteraient une méthylation importante de la région TSDR. Ainsi ces cellules possèderaient les caractéristiques d'iTreg ayant un phénotype proche des cellules Th1 (CXCR3⁺ IFN- γ ⁺). Contrairement aux nTreg, qui présentent une forte déméthylation de la région TSDR et une forte expression de Helios même en présence d'IL-12 et de signaux activateurs (McClymont et al., 2011). Récemment, l'analyse de la région TSDR dans les T CD4 a permis de montrer une réduction de la déméthylation chez des patients atteints d'un syndrome auto-immun proche de l'IPEX mais pour lequel le pourcentage de cellules T CD25⁺FoxP3⁺ n'est pas significativement inférieure à celui des donneurs sains (Barzaghi et al., 2012).

L'utilisation d'animaux porteurs d'un chromosome bactérien codant pour la protéine de fusion GFP-Cre et l'insertion de la séquence ROSA26YFP inducible par la Cre-recombinase dans leur ADN génomique montre qu'une fraction des cellules T FoxP3⁻ (GFP négatives) a exprimé FoxP3 de façon transitoire (YFP⁺) puis a dérivé en cellules effectrices ne présentant pas de pouvoir suppresseur. Cette donnée propose l'existence d'une plasticité des Treg, qui seraient capables de se trans-différencier en cellules effectrices (Zhou et al., 2009b). Contrairement aux Treg purifiés à partir du thymus, les cellules FoxP3⁺ obtenues à partir de l'activation de cellules naïves perdent l'expression de FoxP3 en présence des cytokines IL-4, IL-6, IL21 *in vitro*. Le transfert de T CD4 naïfs porteurs du marqueur congénique Ly5.1 chez une souris Ly5.2 a permis d'observer également l'induction d'une faible proportion de cellules FoxP3⁺ parmi les cellules d'origine Ly5.1⁺ (ex-naïves). Le transfert de toutes les cellules FoxP3⁺ (Ly5.1 et Ly5.2) des animaux receveurs dans une souris Rag^{-/-} dépourvue de cellules T démontre que les cellules Ly5.1 perdent l'expression de FoxP3 et prolifèrent fortement dans l'environnement lymphopénique devenant des ex-FoxP3⁺. A l'opposé, les cellules FoxP3⁺ Ly5.1 conservent l'expression de FoxP3 dans les

souris immuno-déficientes. De plus, les T FoxP3⁺ induits à partir de cellules T naïves n'expriment pas Helios, présentent une méthylation importante de la région TSDR du gène foxp3. Ces résultats démontrent que certaines cellules T peuvent exprimer FoxP3 de façon transitoire avant d'acquiescer leur fonction effectrices dans un environnement pro-inflammatoire et de devenir des cellules effectrices ex-FoxP3, alors que les nTreg ne présentent pas de réelle plasticité (Miyao et al., 2012).

En somme, l'identification des Treg sur la base de FoxP3 peut présenter un biais important car certaines cellules T activées non nTreg peuvent exprimer FoxP3 de façon transitoire. De même il reste important de déterminer si les Treg retrouvés dans la masse tumorale correspondent à des iTreg ou des nTreg et de développer des outils qui permettraient d'appréhender la notion de plasticité des TA-Treg. Afin de confirmer que les cellules T FoxP3⁺ ICOS⁺ présentes dans les tumeurs du sein sont des nTreg ou des iTreg il faudrait étudier si i) ces cellules co-expriment Helios, BDCA-4, GARP et LAP, ii) présentent une importante déméthylation de la région TSDR et iii) perdent leur pouvoir suppresseur et leur expression de FoxP3 en présence de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-1 β) ou en absence de TGF- β . Ces études pourraient de plus être complétées par une analyse de l'expression des différentes isoformes de FoxP3.

8.2 L'axe CD39/CD73 un mécanisme par collaboration entre Treg et T effecteurs chez l'homme ?

Au cours de ma thèse nous avons mis en évidence la forte surexpression de CD39 sur les Treg de Tumeur (Figure 14), en accord avec les observations de Mandapathil et coll. dans le cancer « tête et cou » (Mandapathil et al., 2012). La dégradation de l'ATP extracellulaire dans les tumeurs par CD39 pourrait constituer une réduction de signal 2 (ATP extracellulaire) permettant l'activation de l'inflammasome et donc la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages. Il est possible que l'expression de CD39 par les Treg dans les tumeurs de sein (Figure 15) intervienne dans les mécanismes d'inhibition des réponses pro-inflammatoires en dégradant l'ATP extracellulaire relargué par les cellules en apoptose, qui constituerait une perte de signal activateur pour les macrophages et les DC.

La co-expression de CD39 et CD73 par les Treg chez la souris joue un rôle central dans leur fonction suppressive, leur permettant de dégrader l'ATP exogène et l'ADP extracellulaire en Ado (Deaglio et al., 2007). La délétion de CD73 spécifiquement dans les Treg permet l'établissement d'une réponse immune anti-tumorale conduisant au rejet de tumeurs transplantées chez la souris (Stagg et al., 2011; Stagg et al., 2010). Ado est une molécule fortement immuno-

suppressive qui altère les fonctions des cellules T, favorise la sécrétion d'IL-10 par les monocytes et inhibe la sécrétion d'IL-12 par les mDC (Beavis et al., 2012).

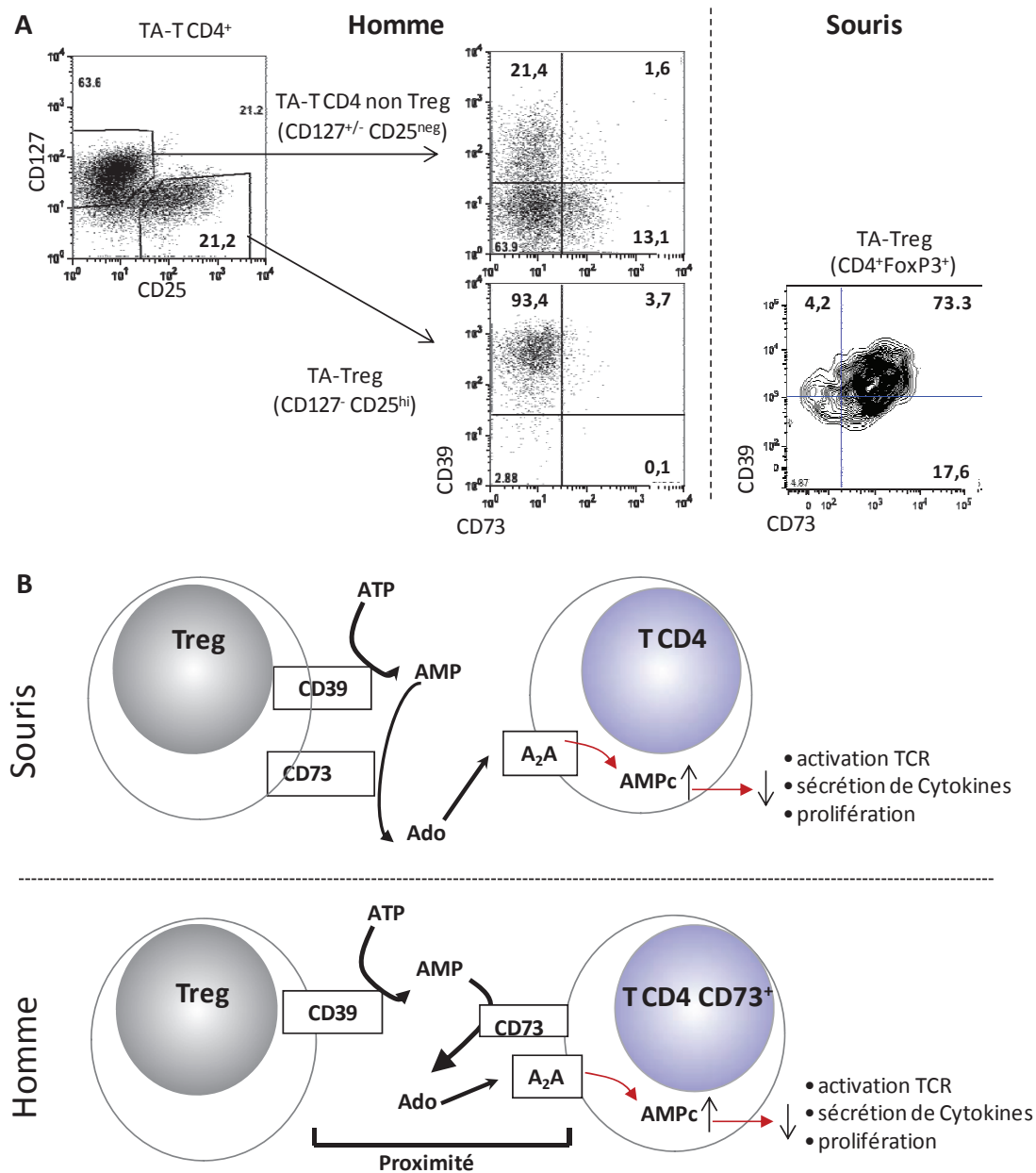


Figure réalisée d'après les résultats préliminaires obtenus durant ma thèse et le Master 2 de Nicolas Gourdin

Figure 15: Chez l'homme, la dégradation de l'ATP extra-cellulaire en Ado par les T CD4 nécessite la collaboration entre les Treg CD39⁺ et la sous-population T CD4 CD73⁺

A) l'analyse par cytométrie en flux de l'expression de CD39 et CD73 sur les cellules T CD3⁺ CD4⁺ en fonction de l'expression de FoxP3 montre que les TA-Treg humains expriment très fortement CD39 mais pas CD73 et qu'une sous-population de T CD4 non Treg exprime CD73 ce qui les différencie des TA-Treg murins qui co-expriment CD39 et CD73. B) Les Treg murins sont capables de dégrader directement l'ATP en Ado par l'action consécutive de CD39 et CD73. Chez l'homme la génération d'Ado nécessiterait la collaboration des Treg CD39⁺ et des T CD4 CD73⁺. Chez l'homme, le mécanisme de suppression par génération d'Ado se rapprocherait alors des mécanismes par contact cellulaire, les T CD4 CD73⁺ pourraient représenter une cible privilégiée des Treg CD39⁺ nécessitant une grande proximité entre ces cellules.

Cependant, contrairement aux résultats obtenus chez la souris, nous avons pu observer que dans les tumeurs du sein et de l'ovaire chez l'homme, les Treg ne co-expriment pas CD73. Par contre, une sous-population de cellules T CD4 non Treg exprime CD73 dans le sang et la tumeur (Figure 15). Ces données suggèrent que les Treg et les T CD4 CD73⁺ non Treg coopèrent pour induire la production d'Ado. Dans ce contexte, il est important de comprendre la fonction des T CD4 CD73⁺, qui fera l'objet du projet de thèse développé par Nicolas Gourdin. Les T CD4 CD73⁺ pourraient ainsi être sélectivement ciblés par les Treg CD39⁺ dans l'environnement tumoral. Une analyse transcriptomique pan-génome nous permettra de déterminer si les T CD4 CD73⁺ présentent des caractéristiques particulières par rapport aux autres cellules T CD4 non Treg.

L'expression de CD73 n'est pas restreinte aux cellules de l'immunité et CD73 est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs humaines (Sein, ovaire, poumon, colon, gliome..) dans lesquelles il favorise la prolifération tumorale (Zhang, 2012). CD73 est associé à un mauvais pronostic dans le cancer du colon (Wu et al., 2012) et favorise les métastases dans le cancer du sein (Zhang, 2012). Le ciblage de CD73 pourrait donc faire partie des futures stratégies thérapeutiques.

8.3 Stratégies thérapeutiques:

L'ensemble des données obtenues durant ma thèse a mis en évidence trois mécanismes impliqués dans l'immuno-suppression associée aux T CD4 dans les tumeurs de sein qui débouche sur des stratégies thérapeutiques : i) CCR4 constitue une cible de choix pour supprimer le recrutement des Treg dans la tumeur, ii) restaurer la capacité des pDC à produire de l'IFN- α semblerait être un élément clef dans l'induction d'une réponse T anti-tumorale et iii) le ciblage d'ICOS offrirait la possibilité de bloquer l'amplification de Treg et de cellules T CD4 sécrétrices d'IL-10, *via* les TA-pDC.

8.3.1 Bloquer CCR4

En dehors de CCR4 (Iellem et al., 2001), d'autres récepteurs de chimiokines tels que CCR5 (Yurchenko et al., 2006), CCR6 (Kleinewietfeld et al., 2005), CCR7 (Szanya et al., 2002), CXCR3 (Saeki et al., 2010) et CXCR4 (Zou et al., 2004) sont exprimés par les Treg et impliqués dans leur fonction *in vivo* dans différents contextes inflammatoires.

Notre équipe a montré en 2004 la présence de CCL20 (ligand de CCR6) dans les tumeurs de sein (Thomachot et al., 2004). Récemment, le couple CCR6/CCL20 a été rapporté comme jouant un rôle dans le recrutement des Treg dans le cancer du sein (Xu et al., 2011) et le carcinome

hépatocellulaire (Chen et al., 2011). Dans un modèle murin de cancer colorectal [Liu](#) et coll. démontrent l'importance des TAM, *via* leur propre capacité à produire CCL20 ou à induire sa sécrétion par les cellules tumorales, dans le recrutement des Treg CCR6⁺ (Liu et al., 2011b). De plus, la présence de Treg CCR6⁺ a été décrite dans les tumeurs mammaires chez la souris (Xu et al., 2011) suggérant que CCR6 peut aussi intervenir dans le recrutement des Treg dans le cas du cancer du sein. Comme nous l'avons suggéré précédemment, l'analyse de l'expression de CCR6 à la surface des TA-Treg issus de tumeurs de sein pourrait permettre de déterminer le rôle de CCR6 dans le recrutement des Treg dans les tumeurs primaires de sein.

Dans les tumeurs d'ovaire les Treg co-expriment CXCR3, T-bet et FoxP3, ne produisent pas d'IFN- γ et possèdent un fort pouvoir suppresseur. Selon les auteurs, l'IL-12 et l'IFN- γ jouent un rôle important dans l'induction de l'expression de T-bet et de CXCR3 sur ces cellules. La sécrétion de CXCL10 par les cellules tumorales et les TAM dans les tumeurs et les ascites d'ovaire favorise le recrutement de ces Treg CXCR3⁺ tout comme pour les Th1 (Redjimi et al., 2012).

Alors que CCR6 est aussi exprimé par les cellules Th17, et CXCR3 par les cellules Th1 qui jouent un rôle important dans la réponse immune anti-tumorale, CCR4 n'est exprimé que par les Treg, les Th17 suppresseurs FoxP3⁺ et les cellules Th2. Ainsi, l'inhibition de CCR4 pourrait permettre de supprimer les réponses immuno-suppressives associées aux Treg sans affecter la fonctionnalité des cellules Th1 importantes pour le développement d'une réponse cytotoxique anti-tumorale, comme le montre leur impact favorable sur la progression tumorale (Teschendorff et al., 2010). L'utilisation d'un modèle murin humanisé (souris NOD/SCID/ $\beta 2^{-/-}$ possédant un système immunitaire humain par transfert adoptif de progéniteurs CD34⁺ ou de cellules T) a permis de montrer que la présence de cellules Th2 dans les tumeurs de sein humaines transplantées favorise la croissance tumorale (Pedroza-Gonzalez et al., 2011). Dans ce modèle, Ox40-L, exprimé par les mDC suite à la sécrétion de TSLP par les cellules tumorales, active les cellules Th2. Ces observations suggèrent que l'impact de l'inhibition de CCR4 sur les Th2 pourrait être favorable à une réduction de la croissance tumorale. Dès lors, l'utilisation d'antagonistes de CCR4 devient un bon candidat médicament dans l'objectif de supprimer le recrutement des Treg dans la masse tumorale.

Le développement d'antagonistes de CCR4 capables *in vitro* de bloquer la migration des Treg humains et murins a permis de montrer, *in vivo* chez la souris, que le blocage de CCR4 augmente l'efficacité de la vaccination contre des Ag de la tuberculose et du virus de l'hépatite B (respectivement Ag85A et rHBsAg). Cependant l'inhibition de CCR4 sur les Th2 bloque également leur recrutement par CCL22 et les conséquences de cet impact sur les Th2 n'ont pas été évaluées

lors de tests de vaccination utilisant ces inhibiteurs (Bayry et al., 2008). Chez la souris, le recrutement des Treg dans les tissus transplantés lors de greffe de cœur est dépendant de CCR4 et de CCL22 (Lee et al., 2005) et l'injection de Treg CCR4 KO dans un modèle murin de colite inflammatoire ne permet pas de reverser la pathologie, (Yuan et al., 2007). L'ensemble de ces données démontre clairement l'impact spécifique du blocage de l'axe de chimiotactisme CCR4/CCL22 sur l'immuno-suppression liée aux Treg dans différents contextes inflammatoires chez l'homme et la souris

Les travaux du groupe d'Eric Tartour ont montré que l'utilisation d'antagonistes de CCR4 permettait d'accroître l'efficacité d'une vaccination contre des auto-Ag conduisant à une réduction de la croissance tumorale en facilitant l'émergence de T CD8 spécifiques (Pere et al., 2011). D'autre part, dans la leucémie T de l'adulte (Yoshie et al., 2002), le cancer du sein (Li et al., 2012a) et le lymphome T cutané (Chang et al., 2012), les cellules tumorales expriment CCR4. Une étude récente réalisée sur une large cohorte (n=483) de patientes souffrant de cancer du sein, démontre que l'expression de CCR4 dans les cellules tumorales est un facteur indépendant de mauvais pronostic pour la SSR et la SG (Li et al., 2012a). Par ailleurs, dans le mélanome, CCR4 est impliqué dans la génération de métastases cérébrales (Izraely et al., 2010). De ce fait, différents outils ayant pour objectif le ciblage des cellules CCR4⁺ ont été développés (Nakamura et al., 2006). Ils présenteraient deux avantages i) le ciblage des cellules tumorales et ii) une réduction du niveau d'infiltration par les Treg. Les petites molécules inhibitrices développées par Bayry et coll. (Bayry et al., 2008) pourrait permettre dans le cancer du sein d'augmenter la réponse immunitaire cytotoxique anti-tumorale (Pere et al., 2011) lors d'approches vaccinales et d'agir directement sur les cellules tumorales.

8.3.2 Restaurer et/ou induire la sécrétion d'IFN- α par les pDC dans les tumeurs de sein

La présence d'IFN- α dans les tumeurs de sein est associée à une plus forte proportion de cellules T CD8 spécifique des Ag tumoraux, corrélée à une meilleure survie des patientes (Domschke et al., 2009). Cette donnée suggère que l'inhibition de la capacité des pDC à produire de l'IFN- α favorise la croissance tumorale.

L'administration d'IFN- α (Roferon), utilisé pour ses propriétés immuno-stimulatrices, en combinaison avec IL-2 est utilisée dans le traitement des carcinomes du rein (Negrier et al., 1998) et des mélanomes (Dutcher, 2002) métastatiques mais les effets secondaires associés limitent fortement son bénéfice.

Dunn et coll. en 2005 ont montré que le rejet de tumeurs murines hautement immunogènes par les souris immuno-compétentes est fortement dépendant de l'IFN- α et de l'expression d'un des récepteurs de l'IFN- α (IFNARI) par les leucocytes (Domschke et al., 2009; Dunn et al., 2005). Plus récemment, l'utilisation de souris chimériques obtenues par transfert adoptif de moelle a permis de montrer le rôle du récepteur IFNARI sur les mDC CD8 α dans le rejet de tumeurs immunogènes. En effet, l'activation des mDC CD8 α par l'IFN- α est nécessaire pour l'induction de la présentation croisée permettant l'établissement d'une réponse cytotoxique anti-tumorale par les cellules T CD8 (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011). D'autre part, dans un modèle murin de mélanome (B16), l'utilisation de ligand de TLR9 (CpG) permet la réactivation des pDC qui sécrètent de l'IFN- α permettant l'activation des mDC CD8 α et favorisant l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative anti-tumorale (Nierkens et al., 2011). De même, l'administration d'un ligand de TLR-7 (852A) *in vivo* permet de réduire les métastases pulmonaires de mélanome B16 chez la souris *via* un mécanisme qui dépend de la présence de pDC et de leur production d'IFN- α lors du traitement (Inglefield et al., 2008). Dans un modèle murin de tumeur mammaire, l'efficacité de stratégie vaccinale par administration d'Ag (OVA) exprimé par la tumeur est fortement augmentée lors de l'administration en adjuvant d'un ligand de TLR-7 (PolyUs21) et l'effet dépend de la sécrétion d'IFN- α par les pDC. A l'opposé, l'utilisation en adjuvant d'un autre ligand de TLR-7 (R837) ne permet pas une vaccination efficace car il n'induit qu'une faible sécrétion d'IFN- α par les pDC. Lors de la vaccination contre OVA, si R848 est utilisé comme adjuvant, l'injection d'IFN- α exogène permet d'augmenter fortement la réponse T CD8 spécifique d'OVA (Rajagopal et al., 2010). De plus, le traitement de souris porteuses de mélanome B16 par Imiquimod un ligand de TLR-7 conduit à une sécrétion d'IFN- α par les pDC associée à une activité cytotoxique à l'encontre des cellules tumorales indépendante des cellules de l'immunité adaptative (Drobits et al., 2012).

L'ensemble de ces données chez la souris suggère que l'altération de la capacité des pDC à produire de l'IFN- α est une étape importante dans l'immuno-suppression tumorale et que la réactivation de ces pDC dans leur capacité à sécréter IFN- α participe à la restauration d'une immunité anti-tumorale. Actuellement des analogues de TLR7 (Imiquimod, Resiquimod, 852A) sont en cours d'évaluation dans plusieurs essais cliniques seuls ou en combinaison (Galluzzi et al., 2012).

8.3.3 Le ciblage d'ICOS en immunothérapie

Nos travaux ont permis de montrer le rôle majeur d'ICOS dans l'enrichissement en cellules T sécrétrices d'IL-10 et en Treg parmi les T CD4 infiltrant les tumeurs de sein. L'utilisation d'un Ac

anti-CD25 (Daclizumab) ou d'IL-2-couplée à la toxine diphtérique conduit à une réduction du nombre de Treg dans le sang des patients, mais ne permet pas d'augmenter la survie ni même l'efficacité de la vaccination si on regarde le pourcentage de cellules T CD8 spécifiques des Ag cibles (Deaglio et al., 2007; Jacobs et al., 2010). Nous avons vu en introduction que le traitement des patients atteints de mélanome (Weber et al., 2012) par l'Ac anti CTLA-4 permet d'augmenter leur survie dans différentes études cliniques (Annexe n°1)). Cependant ce traitement est associé à de nombreux effets secondaires (Verschraegen, 2012) et, de façon surprenante, il conduit également à une augmentation du nombre de Treg dans les tumeurs (Khan et al., 2010), montrant qu'il ne permet pas de cibler directement les T CD4 FoxP3⁺, mais qu'il supprime un important mécanisme d'inhibition des cellules T. L'Ac anti-PD-1 (BMS-936558) permet également de lever, un point de contrôle négatif de la réponse immunitaire conduisant à une plus forte activation de l'ensemble des cellules T et augmente la survie de patients atteints de mélanome, de cancer du rein ou de cancer du poumon non à petites cellules (Topalian et al., 2012). De même, l'utilisation d'Ac agonistes de GITR ou d'OX40 conduisent à l'augmentation de la réponse T en induisant une plus forte activation et les rend moins sensibles à la suppression par les Treg, mais les données de la littérature suggèrent qu'ils stimulent également la prolifération et les fonctions des Treg (Howie et al., 2009; Liao et al., 2010; Xiao et al., 2012). Ceci révèle qu'il est primordial de développer des outils permettant de cibler spécifiquement les Treg. En ce sens, bloquer l'interaction ICOS/ICOS-L est très prometteur car contrairement au blocage de CD25 impliqué dans la signalisation de l'IL-2, ICOS semble avoir une fonction essentielle, spécifiquement dans l'amplification des Treg et des cellules T CD4 productrices d'IL-10 infiltrant les tumeurs de sein et d'ovaire (Article n°3 et (Conrad et al., 2012)). En effet, nous avons montré que l'inhibition d'ICOS réduit faiblement la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ des cellules T non Treg en culture avec des pDC. D'autre part, les mDC n'exprimant pas ICOS-L, la réponse des cellules T CD4 mémoires (prolifération, production de cytokines) en présence de mDC n'est donc pas modifiée par la neutralisation d'ICOS. Cependant, l'impact défavorable d'ICOS observé dans les tumeurs de sein (Article n°3) est probablement étroitement lié à l'environnement immuno-suppresseur.

Toutefois, lors de traitement permettant une activation forte des T CD4 dans les tumeurs, le ciblage d'ICOS pourrait également réduire la réponse effectrice. En ce sens, le traitement chez l'homme par Ipilimumab induit des cellules ICOS⁺IFN- γ ⁺ qui sont des T CD4 très fortement activées (Chen et al., 2009) et chez la souris, l'efficacité du traitement par anti-CTLA-4 sur la croissance de mélanome B16 est fortement réduite chez des souris déficientes pour ICOS (Fu et al., 2011). Cependant, dans ces deux études, la fonction d'ICOS n'a pas été déterminée

directement. En effet, l'expression d'ICOS sur les T CD4 IFN- γ ⁺ dans le traitement par Ipilimumab chez l'homme pourrait résulter de leur forte activation sans pour autant jouer un rôle fonctionnel majeur. D'autre part, l'effet réduit du traitement par anti CTLA-4 sur la croissance tumorale dans les souris ICOS KO pourrait être lié aux modifications globales (réduction de la proportion de cellules T mémoires dans le sang périphérique et absence de centre germinatif dans les organes lymphoïdes secondaires) du système immunitaire chez ces animaux indépendamment de l'immuno-subversion tumorale impliquant les cellules T.

En somme, afin d'avoir une efficacité thérapeutique majeure du ciblage d'ICOS, il serait important de le tester sur des tumeurs primaires en néo-adjuvant avec pour objectif de réduire les quantités de Treg et de Tr1 et donc l'environnement immuno-suppresseur dans la tumeur avant d'induire une mort des cellules tumorales par une chimiothérapie immunogène (anthracyclines) ou une thérapeutique ciblée (ex: Ac anti-Her2/neu) qui *via* le relargage d'Ag tumoraux pourrait favoriser le développement d'une réponse immune anti-tumorale spécifique, associée ou non à l'activation des DC par ciblage des ligands de TLR.

8.3.4 Validation de la neutralisation d'ICOS en modèle pré-clinique

Pour aller plus loin dans notre évaluation du potentiel que représente le ciblage d'ICOS dans le traitement du cancer du sein, nous avons débuté un travail pour valider cette stratégie thérapeutique dans un modèle murin de tumeur mammaire transplanté développé dans le groupe d'Isabelle Puisieux. La transplantation de la lignée NEU15, qui surexprime l'Ag HER2/Neu de rat, dans des souris FVB transgéniques MMTV-Neu^{RAT} mais aussi dans des souris FVB sauvages génère des tumeurs qui sont infiltrées par les effecteurs de l'immunité. Ceci permet d'exploiter deux modèles. En effet, la transplantation de la lignée NEU15 dans les souris FVB sauvage est un modèle dans lequel la tumeur est hautement immunogénique car l'Ag HER2/Neu^{RAT} est totalement absent des souris FVB sauvages. On observe ainsi une forte infiltration de ces tumeurs par les leucocytes et la présence d'Ac dirigés contre HER2/Neu^{RAT}. A l'opposé, la transplantation de la lignée NEU15 dans les souris FVB/MMTV-Neu^{RAT} correspond à un modèle immuno-tolérant dans lequel les tumeurs poussent plus rapidement et avec un taux de prise tumorale plus élevé car l'Ag HER2/Neu est un Ag du soi pour ces souris. L'analyse extensive de ces modèles a permis de montrer leur forte similitude avec la pathologie humaine caractérisée par i) une forte infiltration par des Treg, ii) une infiltration par des pDC fonctionnellement altérées pour leur capacité à produire de l'IFN- α . Le traitement des souris porteuses de tumeur par un ligand de TLR7 permet de réduire très fortement la croissance tumorale (I LeMercier et al. Cancer Res en révision).

L'analyse du modèle immunogénique montre une expression importante d'ICOS sur l'ensemble des TA-T CD4 et un pourcentage important (15%) de TA-T CD4 FoxP3^{neg} exprimant Ki67 contrairement à ce qui est observé chez l'homme où ICOS est exprimé principalement par les TA-Treg et où Ki67 est exprimé par les TA-Treg et une faible proportion de TA-T CD4 non Treg (3.9%) (Article n°3) (Figure 16A). Ces données suggèrent que les T CD4 effecteurs sont fortement activés dans ce modèle, empêchant probablement un ciblage spécifique des Treg *via* ICOS. Cependant les données préliminaires obtenues par injection d'un Ac anti-ICOS de rat (17G9) montrent une diminution de la proportion de Treg parmi les T CD4 et une augmentation du rapport TCD8/Treg dans la masse tumorale (Figure 16B), suggérant qu'ICOS joue un rôle important dans le maintien des fortes proportions de TA-Treg parmi les TA-T CD4. En parallèle, l'expression d'ICOS-L est augmentée sur les TA-pDC suite au traitement par l'Ac anti-ICOS, confirmant que l'interaction ICOS/ICOS-L a lieu entre les TA-pDC et des cellules ICOS⁺ dans la masse tumorale. A ce jour, les premiers résultats dans le modèle immunogénique n'ont pas permis d'observer d'impact majeur du traitement par l'Ac anti-ICOS sur la croissance tumorale. Le fort niveau d'activation des TA-T CD4 effecteurs et l'expression d'ICOS par ces cellules contraste avec les observations réalisées chez l'homme et pourraient expliquer l'absence d'activité anti-tumorale du traitement par l'Ac anti ICOS. Nous avons vu que l'expression d'ICOS est importante dans la fonctionnalité des cellules TFh, il est possible que le blocage d'ICOS réduise la fonctionnalité des TFh, or dans ce modèle, l'expression de l'Ag Her2/neu^{RAT} par les cellules tumorales conduit à l'établissement d'une réponse humorale spécifique. Le ciblage d'ICOS pourrait inhiber ou réduire l'efficacité de la réponse humorale anti-Her2/neu^{RAT}, cette dernière étant susceptible de participer au contrôle de la croissance tumorale.

L'utilisation de souris déficientes pour ICOS ou de souris chimériques par transfert de moelle de souris ICOS^{-/-} et de souris FoxP3^{ΔDTR} (souris DREG) permettra d'obtenir des animaux dans lesquels seuls les Treg seront totalement déficients en ICOS après administration de toxine diphtérique (collaboration B Salomon, Institut Curie, Paris). Il sera alors possible de déterminer si l'expression d'ICOS est indispensable pour l'enrichissement en Treg dans les tumeurs mammaires.

Par ailleurs, nous développons en collaboration avec G Marodon (Institut Curie, Paris) un modèle de souris humanisées (souris NSG immuno-déficientes ayant reçu un transfert adoptif de progéniteurs CD34⁺ de sang de cordon humain) (Marodon et al., 2009) chez qui on injectera des lignées de tumeurs de sein humaines surexprimant Her2/neu (BT474, SKBR3 ou MDA-MB231) capables de générer des tumeurs. Ces souris seront traitées *in vivo* avec l'anticorps anti-ICOS

neutralisant (clone 314.8) afin de déterminer si le traitement de ces souris, dans lesquelles on retrouve l'ensemble des sous-populations immunes dont les pDC et les Treg, permet de réduire la croissance tumorale.

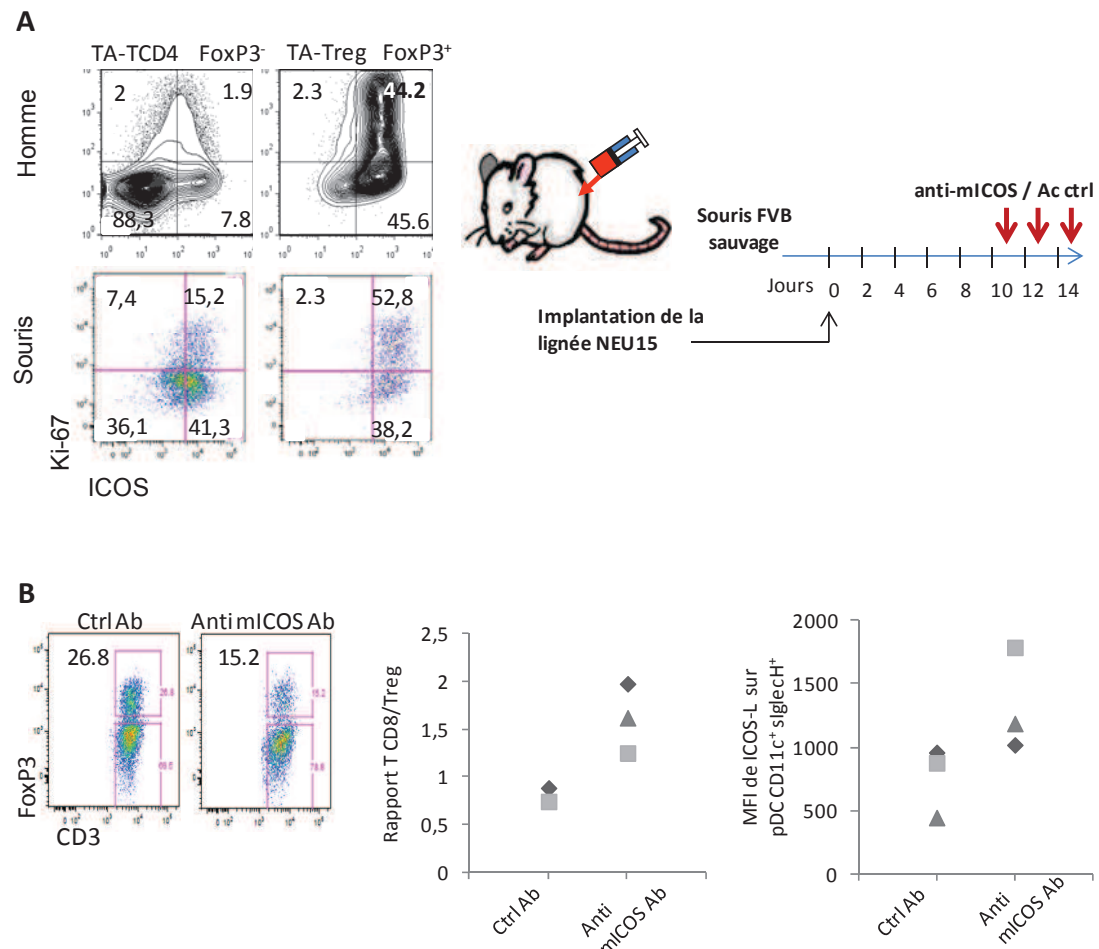


Figure réalisée d'après des résultats préliminaires obtenus durant ma thèse et par Renaud Colisson en Post-Doc dans l'équipe

Figure 16: Le blocage d'ICOS restaure l'expression de ICOS-L sur les pDC intra-tumorales et diminue le pourcentage de Treg *in vivo* spécifiquement dans les tumeurs

A) Expression d'ICOS et Ki67 sur les cellules T CD4 dans les tumeurs primaires de sein humaines ou les tumeurs murines obtenues par transplantation de la lignée NEU-15 dans les souris FVB sauvages

Chez l'homme, l'expression d'ICOS et de Ki67 est faible sur les TA-T CD4 FoxP3^{neg} alors que chez la souris la majorité des TA-T CD4 FoxP3^{neg} expriment ICOS et un pourcentage important de ces cellules prolifère. B) **Chez la souris**, le blocage d'ICOS permet de diminuer le pourcentage de Treg parmi les T CD4 et conduit à une augmentation du rapport T CD8/Treg dans les tumeurs. De plus, le blocage d'ICOS est associé à une augmentation de l'expression d'ICOS-L sur les TA-pDC (CD45⁺D11c⁺SiglecH⁺) analysées par cytométrie en flux.

8.3.5 Utilisation combinée d'une thérapie ciblée pour activer les pDC et d'un anti-ICOS comme stratégie pour traiter les tumeurs de sein

L'utilisation de drogue inhibant le récepteur CCR4 combinée à un blocage d'ICOS par notre Ac anti-ICOS montrerait potentiellement un effet synergique sur la réduction du nombre de Treg dans la masse tumorale *via* une inhibition combinée du recrutement et de l'expansion des Treg.

L'administration de ligand de TLR-7 en combinaison avec un inhibiteur du TGF- β pourrait permettre de restaurer la sécrétion d'IFN- α par les TA-pDC. Cependant, le traitement cutané par Imiquimod, de souris porteuses de tumeurs mammaires Her2/neu, augmente fortement la proportion de cellules Tr1 et de Treg dans les tumeurs et les taux sériques d'IL-10 (Lu et al., 2010) suggérant que l'activation des pDC permet d'augmenter la réponse anti-tumorale mais est également associée à une forte augmentation de la réponse T immuno-suppressive, qui limite l'efficacité du traitement par ligand de TLR-7. Le traitement combiné par Imiquimod et un Ac anti-IL-10 permet de réduire fortement la croissance tumorale en réduisant cette immuno-suppression (Lu et al., 2010). Ainsi, le blocage d'ICOS combiné au traitement par un ligand de TLR-7, pourrait permettre de favoriser la réponse T CD8 contre les cellules tumorales.

Au final, la réduction du nombre de Treg dans la tumeur couplée à une ré-activation des pDC pourrait aboutir à l'activation des mDC BDCA-3⁺ qui seraient alors capables *via* un mécanisme de cross-présentation de présenter les Ag tumoraux aux cellules T CD8. L'ensemble de ces stratégies d'immunothérapie utilisées en néo-adjuvant avec une chimiothérapie provoquant une mort immunogène des cellules tumorales (anthracyclines) permettrait potentiellement d'établir une réponse immune anti-tumorale durable contre les Ag tumoraux chez les patientes.

9 Conclusion générale

Le cancer du sein est une pathologie à forte incidence sur la population mondiale. Cette pathologie comme de nombreux autres cancers est associée à une modification du système immunitaire, indispensable à la croissance tumorale. L'évolution de la pathologie peut en effet être accompagnée par un processus d'immuno-suppression conduisant à la tolérisation des clones tumoraux et des Ag qui leurs sont associés. L'immunothérapie du cancer vise à restaurer la réponse immunitaire à l'encontre des cellules tumorales afin de réduire la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Aujourd'hui, l'utilisation de drogues agissant sur le système immunitaire tel que l'Ipilimumab dans le cas du mélanome ou les Ac anti PD-1 et PDL-1 dans le mélanome et le cancer du rein a apporté les premières démonstrations que les approches d'immunothérapie peuvent avoir un impact favorable réel sur la survie des patients.

Mon travail de thèse centré sur les mécanismes de régulation de la réponse immune impliquant les Treg et les pDC a permis de montrer que ces cellules jouent un rôle central dans l'immuno-suppression du cancer du sein.

Les données obtenues durant ma thèse, mises en relief avec les observations antérieures de notre équipe et d'autre groupes de recherche suggèrent fortement que i) les Treg sont recrutés par CCL22 dans la masse tumorale suite à la détection, par les macrophages et les NK, des cellules transformées, ii) leur interaction avec les pDC altérées conduit à leur activation et leur prolifération et iii) l'engagement d'ICOS par ICOS-L exprimé par les TA-pDC est indispensable pour l'enrichissement en Treg et l'induction de cellules T CD4 productrices d'IL-10. Ces observations permettent de dégager différentes stratégies thérapeutiques qui pourront être évaluées dans des modèles pré-cliniques.

Cependant, notre connaissance des TA-Treg reste limitée à ce jour, des investigations complémentaires sont indispensables pour déterminer la nature de ces cellules (sont-elles induites ou proviennent-elle du thymus?), la plasticité dont elles peuvent faire preuve (conversion en cellules effectrices) et les mécanismes par lesquels elles suppriment la réponse immunitaire. D'autre part, ce manuscrit est centré sur les Treg, mais comme nous l'avons vu en introduction, d'autres cellules T exercent une fonction immuno-régulatrice. De même, des cellules myéloïdes telles que les macrophages (Savage et al., 2008) et les cellules myéloïdes suppressives (Diaz-Montero et al., 2009; Lechner et al., 2011; Hoechst et al., 2008) infiltrant les tumeurs où elles jouent aussi un rôle immuno-suppresseur. Développer des outils permettant i) de mieux caractériser l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs de sein s'inspirant de ce qui a été

réalisé par l'équipe de Jérôme Galon (Fridman et al., 2012) dans le cancer du côlon, ainsi que ii) mettre en place un suivi des cellules immunes dans le sang des patientes durant la prise en charge classique ou lors de traitement d'immunothérapie, dans la ligne du travail réalisé par Walker et coll (Walker et al., 2004) permettra sans doute de dégager de nouvelles variables importantes pour le diagnostic et l'évaluation du pronostic de chaque patiente. Au final deux questions majeures restent à ce jour totalement ouvertes :

- Quelle est la cinétique gouvernant la mise en place de la réponse immuno-suppressive associée aux Treg dans le cancer du Sein ?

Pour répondre à cette question il est nécessaire de définir i) les facteurs conduisant à l'initiation de la réponse immune anti-tumorale (signaux de danger détectés par les cellules de l'immunité innée), d'établir si les Treg sont bien recrutés et activés très précocement dans les tumeurs (avant les cellules effectrices), d'évaluer l'impact des Treg sur les autres populations immunes infiltrant les tumeurs en fonction du temps et de la progression de la pathologie.

- Quel(s) est / sont le(s) site(s) d'action de l'immuno-suppression médiée par les Treg lors du développement tumoral ?

Les Treg semblent exercer leur pouvoir immuno-supresseur dans les tumeurs et leur migration dans la masse tumorale est une condition essentielle conduisant à leur impact défavorable dans le cancer. Cependant les Treg peuvent exercer leur fonction dans les organes lymphoïde et dans la moelle osseuse. Si les Treg agissent dans la moelle osseuse, sont-ils directement associés à la dissémination métastatique dans ce site ?

En somme le travail que nous avons réalisé durant ma thèse est une pierre de plus dans la construction de nouvelles stratégies pour lutter contre le cancer du sein. Mais au-delà des perspectives à cours terme que sont l'évaluation du ciblage d'ICOS ou de l'inhibition de CCR4 dans un modèle pré-clinique, ce travail suggère de nouvelles questions et démontre en ce sens que notre connaissance de la réponse immune associée aux tumeurs et du rôle des Treg dans l'évolution de la pathologie cancéreuse reste fragmentaire et constitue un défi pour les années à venir. Les résultats obtenus par le traitement avec Ipilimumab ou les Ac ciblant PD-1 ou PDL-1 dans le cancer démontrent que l'immunothérapie du cancer est aujourd'hui bien plus qu'un concept. C'est avec une immense satisfaction que j'ai acquis la conviction qu'intervenir et suivre la réponse immunitaire chez les patients constituera une avancée importante de la recherche translationnelle du XXIème siècle.

10 Annexes

10.1 Annexe 1

Targeting Regulatory T cell

Ménétrier-Caux C, Curiel T, Faget J, Manuel M, Caux C, Zou W.

Targeted oncology 2012 7:15-28

Targeting regulatory T cells

Christine Ménétrier-Caux · Tyler Curiel · Julien Faget ·
Manuarii Manuel · Christophe Caux · Weiping Zou

Received: 9 August 2011 / Accepted: 13 January 2012 / Published online: 12 February 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Cancers express tumor-associated antigens that should elicit immune response to antagonize the tumor growth, but spontaneous immune rejection of established cancer is rare, suggesting an immunosuppressive environment hindering host antitumor immunity. Among the specific and active tumor-mediated mechanisms, CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells (Treg) are important mediators of active immune evasion in cancer. In this review, we will discuss Treg subpopulations and the mechanisms of their suppressive functions. Treg depletion improves endogenous antitumor immunity and the efficacy of active immunotherapy in animal models for cancer, suggesting that inhibiting Treg function

could also improve the limited successes of human cancer immunotherapy. We will also discuss specific strategies for devising effective cancer immunotherapy targeting Treg.

Keywords Regulatory T cells · Immunosuppression · Targeted therapy

Introduction

A number of strategies have been tested to increase the potency of the immune system to target cancer. To date, these approaches have been largely focused on the enhancement of the tumor immunogenicity or the induction and expansion of immune effectors to target and eradicate the tumor. However, these efforts to stimulate the immune system against tumors in patients have been disappointing despite evidence that peripheral immune responses against tumor antigens (TAA) can be stimulated. One plausible explanation is the strongly immunosuppressive local tumor environment suggesting that there is a need to overcome mechanisms of immunosuppression to improve antitumor immunotherapy.

Tumor immunity could in part be considered an autoimmune response, and the mechanisms for maintaining immune quasi-self-tolerance against this tumor may hinder tumor immunity. Among key mechanisms of self-tolerance, regulatory T cells (Treg) play an important role in the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis by suppressing a wide variety of physiological and pathological immune responses against self and nonself as well as quasi-self TAA. Treg represent a heterogeneous population of cells composed of discrete subsets with different phenotypes and functions.

It is now accepted that there are two main Treg groups, i.e., natural Treg (nTreg) and induced or adaptive Treg (iTreg) with different origins. nTreg developed in the thymus play a key

C. Ménétrier-Caux (✉) · J. Faget · M. Manuel · C. Caux
Université de Lyon,
F-69000 Lyon, France
e-mail: christine.caux@lyon.unicancer.fr

C. Ménétrier-Caux · J. Faget · M. Manuel · C. Caux
Université Lyon 1, ISPB,
F-69008 Lyon, France

C. Ménétrier-Caux · J. Faget · M. Manuel · C. Caux
Team 11, CRCL INSERM U-1052/CNRS5286,
F-69008 Lyon, France

C. Ménétrier-Caux · J. Faget · M. Manuel · C. Caux
LabEx DEVweCAN, Centre Léon Bérard,
F-69008 Lyon, France

T. Curiel
Cancer Therapy and Research Center, Department of Medicine,
UTHSCSA,
San Antonio, TX, USA

W. Zou
University of Michigan Department of Surgery and Cancer Center,
Graduate programs in Immunology and Cancer Biology,
C558 MSRBII,
Ann Arbor, MI 48109-5669, USA

role in maintaining self-tolerance and were originally characterized as a subset of human CD4⁺ T cells (2% to 3% of peripheral CD4⁺ T cells) constitutively expressing IL-2R α chain (CD25) and specifically expressing the transcription factor forkhead box p3 (FOXP3) that is crucial for their development and suppressive function [1]. Indeed, in human, the loss-of-function mutation of the *foxp3* gene impairs Treg development and clearly causes a breach in self-tolerance that leads to a severe autoimmune syndrome called immune deficiency polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome [2].

In addition to nTreg, FOXP3⁺ iTreg are induced in the periphery in response to antigenic stimulation under tolerogenic conditions and thus contribute to the development of an antigen-specific immunosuppressive response. Moreover, these cells can secrete transforming growth factor-beta (TGF- β) and interleukin (IL)-10 that participate in their immunosuppressive effect against conventional T cells (Tconv), but are heterogeneous with respect to their suppressive functions.

Apart from these two main Treg groups, several types of regulatory T cells have also been described. These include type 1 regulatory (Tr1) and Th3 cells that do not express high levels of FOXP3 or CD25. Tr1 arise from CD4⁺ T cells in the periphery in response to self-antigen stimulation in the presence of IL-10 but exert their suppressive function in an antigen-nonspecific manner through the secretion of IL-10 and TGF- β and actively downregulate pathological immune responses in vivo [3, 4]. Th3 cells expressing TGF- β have been largely involved in oral tolerance (for review: [5]).

Treg are found in all the lymphoid organs including the blood, lymph node, spleen, and thymus. Much evidence accumulated for a decade in rodents and humans demonstrates the increased levels of functional FOXP3⁺CD4⁺CD25^{high} Treg either in the peripheral blood and/or the tumor microenvironment in cancer patients that play an important role in the inhibition of antitumor immunity. The presence of Treg is also likely to hinder the development of antitumor immune responses after treatment with immunotherapeutic agents. For this reason, methods to neutralize these cells or their function could be critical for the successful immunotherapeutic treatment of cancer.

In this review, we will discuss the roles of Treg in suppressing immune responses and possible strategies for devising effective cancer immunotherapy targeting Treg.

Treg markers

Treg were initially described by Gershon and Kondo in the early 1970s [6] and called suppressor T cells. However, there was extensive skepticism in the immunological field about the existence of these suppressor T cells due to the lack of specific markers. In 1995, the work of Sakaguchi rejuvenated

the Treg field by reporting on a small proportion of T cells with a particular cell surface phenotype (CD4⁺CD25^{high}) that maintains self-tolerance and whose elimination leads to the development of autoimmune diseases [7]. Treg express all components of high-affinity IL-2R (CD25, CD122, and CD132), and numerous studies have demonstrated IL-2 as a key growth and survival factor of nTreg. The discovery of FOXP3 helped jumpstart work in the field in 2003 [1]. In the mouse, FOXP3 is restricted to functionally suppressive Treg, whereas it is well known that in human cell types other than Treg cells, such as activated T cells, express CD25 or FOXP3 [8–10]. Thus, *foxp3* mRNA and FOXP3 protein are transiently induced in human non-Treg CD4⁺ T cells in response to TCR stimulation alone, even though at lower levels than its constitutive expression in Treg [11]. Notably, primary human FOXP3⁺ T cells may express effector cytokines including IL-17 [12] or interferon gamma (IFN- γ) [13].

However, surface markers are required for the identification of Treg to better understand the mechanisms of their suppressive functions and favor their in vivo neutralization. Among those markers, glucocorticoid-induced tumor necrosis factor (TNF) receptor-related (GITR) protein and cytotoxic lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) are the most important with respect to development and Treg function [14, 15]. CTLA-4 is an essential receptor involved in the negative regulation of T cell activation. However, these markers are not Treg restricted as they are also expressed on activated Tconv.

In recent years, extensive efforts have been made to identify more specific markers of Treg. Ex vivo, CD127 expression is strongly downregulated on Treg and is inversely correlated with FOXP3 expression. In combination with CD4 and CD25 expression, CD127 provided a new set of cell surface markers for accurate estimation of homeostatic Treg and will favor the more specific purification of Treg compared to methods using CD25^{high} expression only [16, 17], although how the tumor environment affects Treg CD127 expression remains to be fully defined. However, in humans, the majority of these markers are no longer usable after culture as FOXP3 could be induced on activated Tconv and CD127 is upregulated on activated nTreg.

Recent studies reported that expression of inducible co-simulator (ICOS) [18], a homolog of CTLA-4 and CD28 linked to the development of T follicular helper cells, allows the characterization of highly suppressive Treg. Within tumor environment, in particular in melanoma [19] and breast carcinoma [20], high ICOS expression was observed on tumor-associated Treg (TATreg) that are highly suppressive compared to their blood counterpart. At homeostasis, Ito et al. described ICOS⁺FOXP3⁺ nTreg in the thymus that suppress dendritic cells (DC) and T cell function through IL-10 and TGF- β secretion, respectively [21].

CD39, an ectonucleotidase triphosphate diphosphohydrolase 1, is the dominant ectonucleotidase expressed by Treg that drives the sequential hydrolysis of ATP and ADP to

adenosine monophosphate (AMP). The formation of adenosine is then accomplished by ecto-5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl phosphatidyl inositol-linked membrane protein widely expressed. Whereas resting murine Treg constitutively expressed CD39, their activation is required for CD39 to become functional. In humans, CD39 expression efficiently allows separation of functionally suppressive Treg from other resting or activated T cells [22].

TNFR2 in combination with CD4 and CD25 allow the identification of a larger population of anergic and most potently suppressive Treg in healthy peripheral blood [23] as previously described in human thymus [24, 25].

Through DNA microarray studies in murine cell subpopulations, Sugimoto et al. defined several Treg-specific genes (*Gpr83*, *Ecm1*, and *Helios*) as potential specific markers of Treg [26]. Helios, an ikaros transcription factor family member in mice and human Treg, would help to differentiate nTreg (FOXP3⁺Helios⁺) from iTreg (FOXP3⁺Helios⁻) [27].

Moreover, murine Treg express the lymphocyte activation gene-3 (Lag-3 or CD223), a CD4 homologue that binds major histocompatibility complex (MHC) class II molecules with very high affinity, and anti-Lag-3 antagonist Ab inhibits the suppressive function of Treg in vitro and in vivo [28]. Lag-3 was recently reported in humans as a marker of a discrete subpopulation of CD4⁺CD25^{high} FOXP3⁺ Treg preferentially expanded at the tumor site and in peripheral blood of cancer patients [29].

Moreover, recent studies have highlighted the possibility of using other surface markers to distinguish true Treg from activated Tconv expressing FOXP3. Among them, IL-1RI/II expression could help to distinguish activated Treg from FOXP3-expressing non-Treg [30]. Further, latency-associated protein identifies a subset of CTLA4⁺GITR⁺ Treg whose suppressive function is TGF- β dependent and that also express TGF- β receptor [31].

In addition, the expression of a transmembrane protein called glycoprotein A repetition predominant (GARP also called LLRC32) that acts as a receptor and an anchor for the surface expression of latent TGF- β has been reported to characterize healthy bona fide human activated Treg. siRNA-mediated downregulation of GARP in nTreg reduced their suppressive capacity, whereas GARP overexpression in non-Treg cells leads to a suppressive phenotype comparable to nTreg, suggesting that GARP plays a functional role in activated Treg [32–34].

Mechanisms of suppression

Treg can suppress most immune cells including CD4⁺ and CD8⁺ T cells, DC, B cells, macrophages, and natural killer (NK) cells. In vivo and in vitro studies suggest Treg-mediated suppression could be through multiple mechanisms and that various molecules could be secreted or expressed at the cell

surface that actively participate simultaneously and synergistically to their suppressive functions. Diverse mechanisms are used by Treg to affect these different cell subsets.

IL-2

IL-2 is required in vitro to favor the suppressive function of suboptimally activated Treg, whereas fully activated ones do not require IL-2. IL-2 may increase Treg suppressive function by upregulating FOXP3 expression via STAT5. Moreover, studies have suggested that Treg could deprive local IL-2 by consumption through their high-affinity IL-2R receptor, thus hampering activation of other T cell subsets and favoring their apoptosis.

Cytokine secretion

IL-10 and TGF- β observed in supernatants of in vitro suppression assays have been suspected to mediate part of Treg suppressive functions. However, their in vitro neutralization is not sufficient to block nTreg suppression, whereas it plays a role at least in part in the in vivo effect of Treg in the inhibition of autoimmune inflammatory bowel disease (IBD), and in some iTreg. IL-35, a novel IL-12 member with immune-suppressive function, has been suggested to participate in the Treg suppressive mechanisms as Treg isolated from IL-35-deficient IL-35^{-/-} mice fail to control IBD in vivo and are less suppressive in vitro [32–35]. Controversial data exist for a role of IL-35 in human Treg functions [36, 37].

Granzyme-dependent cell cytotoxicity

Human activated Treg express perforin and granzyme A after activation through CD3/CD46 antibodies and kill activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells and other cell types independently from Fas/FasL [38]. Cao et al. report in murine tumor models (lymphoma, melanoma, and acute myeloid leukemia) the presence of 5% to 30% of Treg expressing granzyme B within the tumor microenvironment that are lytic for NK and CTL [39]. In addition, Treg from granzyme B^{-/-} mice were reported to have reduced suppressive activity in vitro [40].

Extracellular nucleotide metabolism via CD39 and CD73

The degradation of ATP by CD39 in tandem with CD73 represents a mechanism that may be used by Treg to induce the production of pericellular adenosine that inhibits a series of T cell responses through adenosine receptor (A₂A) including Ag-induced proliferation, secretion of IL-2 and inflammatory cytokines [IFN- γ , TNF- α], induction of cytolytic effector molecules (perforin and FasL) and granules exocytosed by CTL and favors T cell apoptosis. However, whereas most studies reported CD39 and CD73 co-expression on murine

Treg [41, 42], results strongly suggest that human Treg in peripheral blood [43] or in breast tumor environment (Faget et al., manuscript in preparation) express CD39 independently of CD73 that is mainly expressed on surrounding cells (Tconv, endothelial cells, and fibroblasts).

Cyclic AMP increase

Furthermore, Bopp et al. [44] identified cyclic AMP (cAMP) as a crucial mediator of Treg suppression, which delivers a negative signal through transfer by gap junctions in responder T cells affecting their survival by inhibiting IL-2 production and proliferation. Moreover, Treg also indirectly boost cAMP levels in targets cells by increasing adenosine-mediated signaling (through A2A) via generation of this nucleoside from nucleotide degradation [41].

Targeting DC

Interaction of CTLA-4, constitutively expressed on the Treg surface with its ligands CD80 and CD86 on DC, is an important pathway by which Treg can mediate their suppressive function. Indeed, Treg downregulate or prevent CD80 and CD86 upregulation on murine as well as human DC in vitro blocking their co-stimulatory function and subsequent T cell activation and function [45, 46]. This could be reversed by anti-CTLA-4 Fab fragment in vitro.

Lag-3 expressed on Treg may play a role in Treg-induced suppression of DC function as Lag-3, by binding MHC class II molecules expressed by immature DC, induces an ITAM-mediated inhibitory signal that blocks their maturation and reduces their allostimulatory functions [47].

Moreover, as T cells can also express MHC class II and CD80/CD86 molecules upon activation, Treg-mediated ligation of Lag-3 or CTLA-4 on these effectors might downregulate effector T cell function. In this context, Treg CTLA-4 deficiency or anti-CTLA-4 treatment abrogates their suppressive effect in vivo on systemic autoimmune disease (IBD) [48, 49] without affecting their development or homeostasis, strongly suggesting that part of Treg suppressive function is mediated through CTLA-4. Treg also compete with Tconv for DC interaction [50].

Treg in tumors

Prevalence phenotype and localization of Treg cells within tumors

TA-Treg are a heterogeneous population of cells arising through distinct pathways of development and mediating disparate functions through a variety of different mechanisms. There are no definitive reports to date documenting the

relative contributions of specific developmental pathways (such as iTreg versus nTreg) in a given Treg population in a given tumor, although it has been established in a mouse model that both nTreg and iTreg can contribute to tumor tolerance [51]. Such a study in humans has not yet been reported.

As compared to healthy peripheral blood, increased numbers and prevalence of Treg cells have been observed in peripheral blood and tumor tissues in most, if not all, of the patients with cancer, including pancreatic and breast cancer [20, 52], colorectal cancer [11, 53, 54], gastric and esophageal cancer [55, 56], leukemia and lymphoma [57, 58], melanoma [59, 60], non-small cell lung cancer, ovarian cancer [54, 61], and hepatocellular carcinoma [62]. Treg cells are found in tumor stroma as well as tumor islets [16, 17, 20], co-localized with their target immune cells including effector T cells and tumor-associated APC (e.g., macrophages and DC) [63, 64]. This suggests that Treg might actively interact with target immune cells within the tumor microenvironment [65, 66].

TA-Treg also possess characteristics unique and specific to them that are engendered by the tumor microenvironment. For example, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg in the blood of patients with prostate cancer are more suppressive than those in the blood from control individuals, even if total numbers do not differ [67]. TA-Treg in some human cancers could be more prone to kill CD8⁺ effector T cells through FasL-mediated apoptosis [68]. A novel population of tumor-induced CD4⁺CD25⁺CD69⁺ Treg that suppress T cell function through membrane-bound TGF- β was recently described in mouse models of melanoma, hepatocellular carcinoma, and lung cancer [69]. The functional consequences of CD127 expression are relatively unstudied in TA-Treg. We have demonstrated that both CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127⁺ and CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ T cells in the blood and ascites of patients with ovarian carcinoma are suppressive Treg (Curiel et al., manuscript submitted). Additional differences are sure to be described over the near term. As other cell types such as activated T cells express CD25 or FOXP3, their remains the need to assess if these FOXP3⁺ TA-Treg are functionally suppressive. Thus, FOXP3 remains a valid marker to define primary Treg cells in the microenvironment of human tumors and autoimmune diseases [11, 12]. However, this phenotype indicates that these Treg may not solely mediate immune suppression. Thus, the functional relevance of TA-Treg cells may not only be determined by their tissue levels but also the tissue localization and phenotype.

Treg cell tumor trafficking

Chemokines are small molecules that regulate trafficking of immune cells between normal and pathologically altered tissues, among other functions [70]. While normal tissues produce differing chemokines, cancers likewise secrete them [71]. Treg trafficking within tumor is one of the important

mechanisms whereby CD4⁺ Treg accumulate in the tumor microenvironment. In support of this hypothesis, CCL22 secretion within tumor environment is strongly correlated with TA-Treg infiltration in ovarian as well as breast carcinoma [20, 63]. The source of CCL22 within the tumor environment appears to be cancer cells and TA-macrophages in ovarian and breast carcinoma [20, 63]. We recently demonstrated that CCL22 secretion by tumor cells in breast carcinoma occurs after interaction with innate immune cells (NK and macrophages) [72]. Intriguingly, whereas malignant ovarian ascites TA-Treg express membrane CCR4, the CCL22 receptor, and migrate towards tumor microenvironmental CCL22 in vitro and in vivo [63], TA-Treg within breast tumor environment strongly downregulate CCR4 compared to their blood counterpart [20] suggesting modulation according to tumor histology or CCL22 concentration within tumor environment as we demonstrated membrane CCR4 loss in the presence of high CCL22 concentrations [20]. Subsequent studies confirmed the relevance of CCR4/CCL22 signaling in Treg tumor trafficking in other cancers [73, 74].

In addition to CCR4/CCL22, other chemokines and chemokine receptors may be also important for Treg trafficking to specific tumor. In pancreatic cancer, tumor cells produce CCL5 and promote Treg tumor migration through CCR5 [75]. High levels of Treg are found in normal bone marrow, particularly in patients with prostate cancer bone metastasis [76]. Bone marrow CD4⁺ Treg express functional CXCR4, the receptor for CXCL12, and Treg cell release from bone marrow is achieved through granulocyte colony-stimulating factor reducing marrow expression of CXCL12 [76]. Interestingly, activation of Treg upregulates CXCR4 expression and enables them to migrate to the bone marrow through CXCL12 [76]. Thus, CXCR4/CXCL12 signals are crucial for activated CD4⁺ Treg bone marrow trafficking. This suggests that bone marrow is a preferential site for migration and/or selective retention of Treg, and bone marrow may function as an immunoregulatory organ [76]. It may explain at least partially why human cancers often metastasize to the bone marrow [77].

In summary, emerging evidence suggests that Treg compartmentalization and trafficking may be tissue or/and organ specific and that distinct chemokine receptors and integrin expression may contribute to selective retention and trafficking of Treg at sites where regulation is required. Manipulation of Treg migration may be therapeutically meaningful.

Treg and disease prognostic values

Treg have been quantified in many human tumors. Much of the data suggest that a higher Treg number within the tumor microenvironment would imply a worse prognosis. However, Treg infiltration in and around the tumor can be beneficial, or no significant effects, depending on the type of tumor in question (for review: [66]).

The first comprehensive Treg study in humans was in patients with ovarian cancer [63]. In these patients, Treg were recruited into tumor, suppressed tumor-specific T cell immunity and contributed to in vivo tumor growth. Treg were not only more populous in malignant ascites and tumors of patients with stage III and stage IV disease but were also associated with a strikingly high death hazard and reduced survival. A subsequent study in ovarian cancer demonstrated that patients with high ratios of CD8/Treg lived more than two times longer than those with lower ratios [78]. These studies concluded that detection of Treg in tumor tissue can negatively impact patient prognosis. Along this line, Treg, particularly the diffusely distributed TA-Treg, are reported to negatively predict patient outcome in gastric cancer [79], esophageal cancer [80], pancreatic cancer [81], lymphoma [82], renal cell carcinoma [83], and liver cancer [84]. In breast cancer, patients with increased levels of TA-Treg are at increased risk of relapse and have shorter disease-free survival and overall survival [20, 85].

Treg are reported to positively predict patient outcome in some patient populations. In colorectal cancer [86], high FOXP3⁺ cell frequency in healthy tissue was associated with worse prognosis, while higher frequencies of FOXP3⁺ cells in tumors were associated with better survival. However, in another study in colon cancer patients [87], a low intraepithelial CD3⁺/FOXP3⁺ ratio served as a prognostic indicator for reduced disease-free survival. In head and neck cancer, higher numbers of intratumoral Treg was positively associated with and served as a significant prognostic factor for better regional control of the tumor [88].

Treg are reported not to be associated with patient survival in some patient populations. For example, in anal cancer [89] the authors found no prognostic effects for Treg cells. However, the prognostic significance of these cell populations must be considered in light of the fact that the patients examined had already been treated with radiochemotherapy. In patients with lymphoma [90], it was also reported that FOXP3⁺ and FOXP3[−] leukemia/lymphoma cases did not differ in clinical stage, age distribution, lactate dehydrogenase and calcium in serum, or in overall survival. In patients with prostate cancer, Treg are not associated with clinical efficacy in vaccination and androgen deprivation [91, 92].

Altogether, Treg have negative and positive prognostic values in patients with different cancers. This may depend on the cancer type, Treg distribution, and localization. More importantly, it may be associated with the functional phenotype and plasticity of Treg in different cancer environments. For example, in the microenvironment of ulcerative colitis and the associated colon cancer, FOXP3⁺ Treg are functionally suppressive, but highly express effector cytokines including TNF- α , IFN- γ , and IL-17 [12], which may promote T cell immunity [93]. This may explain why Treg cells positively predict patient survival in colorectal cancer [86]. Nonetheless,

it is well accepted that TA-Treg infiltrating tumors suppress tumor immunity and dampen therapeutic efficacy of immune intervention as well as conventional cancer therapy including chemotherapy and radiotherapy.

Treg in cancer prevention

Most work on Treg in cancer examines effects in existing tumors. Nonetheless, Treg could also operate during immune surveillance or immunoediting. For example, in a mouse model of chronic colon inflammation, Treg reduced cancer by dampening this inflammation [94]. In carcinogen-induced sarcoma, Treg reduced immune surveillance [95]. CD4⁺CD25⁺ Treg can reduce concomitant tumor immunity [96], suggesting that they could dampen antitumor immunity in preclinical cancers.

Therapeutic targeting of Treg

Understanding the role of Treg in limiting antitumor immunity has provided the impetus for the development of therapeutic modalities to override their immune inhibitory effects.

Elimination of Treg

Chemotherapy regimen

There is evidence that certain chemotherapy regimens are able to mediate their effect at least in part by affecting Treg. Metronomic doses of cyclophosphamide or fludarabine in humans apart from reducing all T cells also reduced the number of Treg and also reduced their suppressive function that resulted in an increased efficiency of the immune response [97, 98]. Cyclophosphamide treatment affects a discrete population of cycling Treg expressing ICOS^{high}TNFR2⁺ enriched within the tumor environment [99]. Moreover, paclitaxel-based chemotherapy selectively decreased the size of the Treg population rather than other subsets including effector T cells [100]. Such low-dose chemotherapy may also represent a clinical practice to enhance antitumor immune response by targeting Treg. Recent results reported the improvement of chemotherapy efficiency on Treg in combination with anti-CD25 treatments.

CD25 targeting/depletion of CD25-expressing cells

CD25 expression remains the master target for Treg-depleting strategies. In vivo studies in murine models demonstrated that administration of depleting anti-CD25 mAb (PC61) allowed a strong Treg reduction in peripheral lymphoid tissue and induced regression of established tumors in syngenic mice [101].

Denileukin diftitox (Ontak®, DAB389IL-2) is a recombinant protein fusing the active domain of diphtheria toxin to

human IL-2 approved by the FDA regulation to treat cutaneous T cell leukemia/lymphoma [102]. It is targeted to the IL-2 receptor and is proposed to be internalized through IL-2Rα by endocytosis [103]. It inhibits protein synthesis and induces apoptosis. Denileukin diftitox also targets cells through IL-2 receptors β and γ chains (CD122 and CD132, respectively) [103, 104] (Curiel et al., unpublished results). Its administration in humans prior to DC vaccination increased the vaccine-mediated antitumor T cell response in renal cell carcinoma patients in conjunction with efficient depletion of peripheral Treg and reduced Treg-associated immunosuppression [105]. Similar results were observed in melanoma patients treated with denileukin diftitox combined with melanoma peptides. In addition to in vitro work supporting the concept that denileukin diftitox may deplete recently activated T cells, we have recently shown that weekly denileukin diftitox in patients with advanced cancers will also deplete effector cell populations (Curiel et al., manuscript submitted). An optimal balance between Treg depletion and effector function may be attained with different denileukin diftitox schedules or doses. Monthly infusions are now being tested in ovarian cancer in this regard. Treatment of melanoma patients with anti-CD25 antibody single-chain Fv fragment fused with *Pseudomonas* exotoxin A (LMB-2) showed a partial reduction of Treg in the periphery or within the tumor but without any increased immune response or clinical response nor autoimmune syndrome.

Daclizumab (Zenapex®) and basiliximab (Simulect®) are antihuman CD25 mAbs approved for use in autoimmune disease, transplantation, and cancer including HTLV-1-induced adult T cell lymphoma/leukemia. In metastatic breast carcinoma patients, daclizumab treatment durably reduced circulating CD25^{high}FOXP3⁺ Treg and favors the emergence of cancer-specific CTL after vaccination with cancer antigen peptides (hTERT/survivin) [106]. However, because of the nonspecific expression of CD25, the major risk of such a strategy is to eradicate activated T cells present within the tumor that could help in the development/initiation of T cell antitumor immunity.

Blockade of Treg function

Blockade of Treg suppressive function through Treg receptors

Antagonist anti-CTLA-4 mAb Treg targeting could be achieved with other Treg receptors. Among them, the major work has been performed with anti-CTLA-4 antagonist mAb. Two fully humanized mAbs developed by BMS (MDX-100: ipilimumab®, Yervoy®) and Pfizer (CP675206: tremelimumab®) have been tested in clinical trials in cancer patients with various tumor types including melanoma, renal cell carcinoma, and prostate cancers. Response rate has been consistently observed in the range of 10% to 15%. Several

phase II trials of ipilimumab® in stage IV melanoma patients showed impressive 1- and 2-year survival, suggesting that it provides durable clinical benefit leading to its approval to treat metastatic (stage IV) melanoma by the United States Food and Drug Administration in April 2011. Importantly, treatments with anti-CTLA-4 mAb are frequently associated with significant pathologic autoimmune-mediated side effects (rashes, diarrhea, and colitis) invariably reversible in patients who also develop a therapeutic response, suggesting that immune-related symptoms might mean more than just an adverse effect. Accumulating evidence indicates that anti-CTLA-4 mAb increases Treg numbers without reducing their suppressive function in vitro [107–109], suggesting that the therapeutic impact of CTLA-4 blockade through mAb acts mainly through a direct activation of effector T cells. Indeed, these mAb will lead to an alleviation of the inhibition of the T cell immune response by favoring the binding of C80/CD86 to CD28 by blocking interaction of CTLA-4 on T cells with CD80/CD86 on DC.

Antagonist of VEGFR (Sutent and sorafenib) Human Treg also express other receptors like vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) [110] that could be targeted by small molecules (sunitinib and sorafenib) blocking multiple tyrosine kinase receptors involved in angiogenesis including PDGFR, Flt3, cKit, VEGFR2, and VEGFR3. Neoadjuvant treatment of patients suffering from metastatic renal cell carcinoma (RCC) with sorafenib strongly reduces peripheral blood Treg [111] as well as TA-Treg [112]. Monotherapy of RCC patients with sunitinib was associated with a decline in peripheral blood Treg [113] and correlated to enhanced overall survival in 5/7 patients treated in a neoadjuvant setting [114]. However, this effect on Treg may be indirect because it does not alter in vitro expansion of either Treg or effector T cells and may be related to negative effects on myeloid-derived suppressive cells [115]. A combination of such targeted therapies with immunotherapy may enhance efficiency as previously described for denileukin diftitox treatment [105]. Indeed, in murine Lewis lung carcinoma model, combination of sunitinib with immune therapy (IL-12 and CD137 agonist) significantly improved the long-term survival rate of large tumor-bearing mice [116].

Agonist anti-GITR mAb Treatments with agonist anti-GITR mAb reverse suppression mediated by Treg in murine models [117, 118]. However, as GITR is also rapidly upregulated on activated T cells, it is tricky to conclude on a unique effect of anti-GITR on Treg. Moreover, engagement of GITR on effector T cells by its ligand expressed on DC renders them resistant to Treg suppression suggesting the possible action of agonist anti-GITR mAb on these effectors cells by reducing their sensitivity to Treg suppressive effect. To our knowledge, this strategy has not yet been tested in a human clinical trial. Recently, the combined action of anti-CTLA-4 and anti-GITR

mAb revealed a better effect than individual therapies in murine models [119, 120].

Other blocking mAb OX40 (CD134), a co-stimulatory molecule of the TNF receptor family, is constitutively expressed on Treg and transiently expressed on activated T cells. Treatment with agonistic mAb anti-OX40 inhibits Treg suppressive activity [121]. Moreover, experiments using OX40^{-/-} Treg and effectors T cells demonstrate that OX40 signal alters either Treg suppressive functions or activation of T cell effector function, suggesting that anti-OX40 mAb mediates the tumor rejection observed in murine models by reducing Treg suppressive function and increasing T cell effectors' function [122].

In a murine model, folate receptor-4 (FR4), a GPI-anchored protein, is predominantly and constitutively expressed on Treg and closely associated with FOXP3 gene expression, and upregulated after activation [123, 124]. Moreover, TA-Treg expressed high levels of FR4, and the administration of anti-FR4 mAb that specifically depletes activated Treg enhanced antitumor immune reaction favoring tumor rejection. However, the FR4 human equivalent remains to be described.

Blockade of Treg suppressive function through TLR agonist stimulation

Toll-like receptors (TLR) are expressed ubiquitously on a variety of mammalian cells, including human Treg. They recognize bacterial and viral pathogen-associated molecular patterns and affect significant elements of specific immunity including DC maturation [125]. TLR signaling for tumor immunotherapy is important as demonstrated by in vitro experiments showing that only vaccines providing appropriate TLR signals can reverse Treg-mediated tolerance. Recent data obtained in vitro using purified human Treg demonstrate that agonist TLR2 signaling (PAM₂CSK₄, PAM₃CSK₄, FSL-1) reduced Treg suppressive function through a mechanism involving a downregulation of the Cdk-inhibitor p27Kip1 and a restoration of Akt phosphorylation [126]. In addition to these direct effects on Treg, TLR2 agonists induced proliferation and IL-2 secretion by T effectors cells, rendering them more resistant to Treg suppressive function [127]. In murine tumor models (melanoma, lung carcinoma, and leukemia), treatment of mice with TLR1/2 agonist mediates tumor regression through reducing Treg suppressive effect and increasing CD8⁺ CTL cytotoxic function [128]. Treg-mediated suppression can be inhibited in vitro by TLR8-derived signals [129], and treatment of melanoma patients with CpG (TLR9 agonist) in vivo results in a reduced frequency of Treg [130]. These experiments suggest that TLR ligation may be a novel way to enhance the potency of certain cancer vaccines by inhibiting Treg suppressive function or rendering T effectors cells resistant to Treg suppression.

Blockade of Treg cell induction and recruitment

Chemokine receptor inhibitors We recently demonstrated that CCL22 mediates Treg migration into human ovarian cancer and breast tumors [20, 63] and that blockade of CCL22 significantly decreases Treg migration into ovarian tumors in an immune-deficient murine xenograft model, leading to immune rejection in the presence of antitumor effector T cells [63]. Thus, blocking Treg trafficking into the tumor site may be achieved through blockade of the CCR4/CCL22 axis. However, CCL22 may also facilitate trafficking of effector T cells. Therefore, any potential benefit of CCL22 blockade, or of interrupting other trafficking signals, requires further study as to potential therapeutic utility. Selective *in silico* studies identified small-molecule chemokine receptor antagonists or mAb able to block *in vitro* CCL22-mediated recruitment of human Treg and Th2 cells [131] and have gone into phase I clinical trials [132]. Therapeutic utility may be limited by the binding promiscuity of chemokine receptors, the redundancy of chemokine/ligand pairs, or the role of chemokines in normal tissue homeostasis or antitumor immunity. These additional effects of chemokine/receptor antagonism must be taken into account in strategies to block chemokines and their receptors.

Blockade of Treg development from CD4⁺ T cells through TGF- β inhibitors As TGF- β is one of the elements driving the development of FOXP3⁺ iTreg from naïve CD4⁺ T cells in the periphery, targeting TGF- β pathway would help in reducing this development. The antisense therapeutics targeting TGF- β 2 with the inhibitor AP 12009 was tested in a phase I/II clinical trial for advanced pancreatic cancer and other malignancies [133]. Inhibition of TGF- β with LY2109761, a novel inhibitor of TGF- β I/II receptors, was described to suppress pancreatic cancer metastases [134]. However, as TGF- β signaling is involved in a lot of processes governing tumor development and regulates the tumor microenvironment apart from Treg differentiation (reduction of NK cell proliferation and cytolytic function, negative regulation of CTL cytotoxicity, Th17 differentiation, etc.) [135], the efficiency of this inhibitor could be related to a direct antitumor effect, an inhibition of development of Treg or other targets (Th17) as well as the functional reactivation of other immune cell subsets. However, once clinical efficacy is evident, mechanistic studies are needed.

Reactivating IFN- α production by TA-pDC to counteract Treg expansion DC are Ag-presenting cells with diverse anatomic localizations, cell surface phenotypes, and immunological functions [136]. Two major subsets are described in human: myeloid and plasmacytoid (pDC). Whereas their role in initiation or upregulation of immune responses is currently well established, there is strong evidence of their involvement in the induction of immune tolerance [137]. Distinct

mechanisms by which DC can induce Treg that could impede tumor immunity have been identified (for review [138]).

Thymic pDC favor the generation of Treg via a mechanism involving ICOS/ICOS-L or CD40/CD40L [21, 139, 140]. In ovarian carcinoma, TA-pDC that are recruited through CXCL12/CXCR4 axis were shown to favor the development of CD4⁺ or CD8⁺ Treg producing IL-10 [141, 142]. In breast tumors, TA-Treg and TA-pDC have been associated with poor patient prognosis [20, 143]. Both DC subsets are co-localized within the lymphoid aggregates surrounding primary breast tumors suggesting the capacity of pDC to favor Treg expansion. TA-pDC purified from ovarian tumors [144] as well as from breast tumors (Sisirak et al., manuscript submitted) are strongly deficient in their capacity to secrete IFN- α . *In vitro*, these TA-pDC are capable of favoring Treg expansion (Sisirak et al., manuscript submitted) through mechanisms that are currently under investigation (Faget et al., manuscript in preparation) and addition of exogenous IFN- α in Treg/TA-pDC cocultures strongly drop Treg expansion, suggesting that therapeutic strategies aimed at reactivating TA-pDC through TLR agonist stimulation could reduce Treg expansion. Moreover, antagonizing CXCR4 with bicyclam compounds or antibodies may also be useful in the tumor microenvironment by reducing pDC entry thus reducing pDC–T cell interactions.

Inhibition of B7-H1/PD-1 axis The expression of PD-L1/B7-H1, member of the B7 family co-signaling molecules, has been detected in the majority of human cancers either on tumor cells (melanoma, kidney, ovary, lung, and colon; for review: [145]) or in TA-mDC as described by Curiel et al. in ovarian tumors [146]. The receptor, programmed death-1 (PD-1), is expressed on activated T cell subsets, antigen-specific CD8⁺ T cells, and Treg [147], and its engagement leads to anergy and apoptosis of activated T cells then favoring tumor cells to overcome host response. Furthermore, PD-L1/B7-H1 signals in the tumor environment induce IL-10 production by T cells, causing immune suppression [146]. Pre-clinical cancer models suggest that interruption of PD-1/PD-L1 interactions leads to antigen-specific CTL infiltration and improved antitumor T cell responses, decreased Treg suppressive function all together favoring tumor control (for review: [145]). MAbs developed against both PD-1 and PD-L1 are being evaluated in phase I/II clinical trials in patients with a variety of cancers (breast carcinoma, renal cell carcinoma, melanoma, etc.) with some evidence of antitumor activity.

Tumor Treg effects of anticancer therapies

Anticancer treatments could impact Treg numbers and function (for review [148]). Indeed, histone deacetylase inhibitors

increase Treg numbers and their suppressive function [149, 150], and IL-2 can further enhance this effect in a murine model of renal cell carcinoma [151]. Retinoids, including all-*trans* retinoic acid, also favor gut-homing Treg [152, 153], whereas in breast cancer patients, the aromatase inhibitor letrozole can reduce Treg numbers and function [153]. Moreover, systemic IL-2 changes Treg trafficking molecules and boosts Treg numbers in ovarian cancer [154]. Association of gp100 vaccine with IL-2 injections variably increased or decreased phenotypic blood Treg, but effects on clinical responses are uncertain [155]. These results suggest it will be of importance to reassess the mechanisms of action of anticancer therapies in light of their potential impact on Treg activity and will provide clues as to how to alter their use for better therapeutic effects.

Cancer vaccines can induce the emergence of tumor-specific Treg in humans as demonstrated by the emergence of circulating MAGE-A3-specific CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells after MAGE-A3 melanoma vaccine [156]. In this context, development of novel vaccine strategies generating Ag-specific antitumor effector cells while minimizing simultaneous Treg generation [157] remains crucial to optimal immunotherapy strategies.

Conflict of interest No benefits in any form have been received from a commercial party related directly or indirectly to the content of this paper.

References

- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057–1061
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20–21
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, De Vries JE, Roncarolo MG (1997) A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737–742
- Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK (2006) Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28–50
- Weiner HL (2001) Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207–214
- Gershon RK, Kondo K (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723–737
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151–1164
- Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, deRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY (2006) Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6659–6664
- Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 66:13–20
- Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE (2007) Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 37:129–138
- Kryczek I, Liu R, Wang G, Wu K, Shu X, Szeliga W, Vatan L, Finlayson E, Huang E, Simeone D, Redman B, Welling TH, Chang A, Zou W (2009) FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res* 69:3995–4000
- Kryczek I, Wu K, Zhao E, Wei S, Vatan L, Szeliga W, Huang E, Greenson J, Chang A, Rolinski J, Radwan P, Fang J, Wang G, Zou W (2011) IL-17⁺ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J Immunol* 186:4388–4395
- Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA (2011) Identification of T helper type 1-like, Foxp3(+) regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med* 17:673–675
- Jago CB, Yates J, Camara NO, Lechler RI, Lombardi G (2004) Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol* 136:463–471
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC (2002) CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311–323
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St GB, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701–1711
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St GB (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693–1700
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA (1999) ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263–266
- Strauss L, Bergmann C, Szczepanski MJ, Lang S, Kirkwood JM, Whiteside TL (2008) Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4⁺ CD25^{high}Foxp3⁺ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J Immunol* 180:2967–2980
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menetrier-Caux C (2009) Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69:2000–2009
- Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FX, Gilliet M, Liu YJ (2008) Two functional subsets of FOXP3(+) regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28(6):870–880
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rotzschke O, Falk K (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg

- cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110:1225–1232
23. Chen X, Subleski JJ, Hamano R, Howard OM, Wiltroft RH, Oppenheim JJ (2010) Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol* 40:1099–1106
 24. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S (2002) Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4⁺CD25⁺ human thymocytes. *J Exp Med* 196:379–387
 25. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OM, Mannel DN, Oppenheim JJ (2008) Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* 180:6467–6471
 26. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, Sakaguchi S (2006) Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol* 18:1197–1209
 27. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM (2010) Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 184:3433–3441
 28. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA (2004) Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21:503–513
 29. Camisaschi C, Casati C, Rini F, Perego M, De FA, Triebel F, Parmiani G, Belli F, Rivoltini L, Castelli C (2010) LAG-3 expression defines a subset of CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol* 184:6545–6551
 30. Tran DQ, Andersson J, Hardwick D, Bebris L, Illei GG, Shevach EM (2009) Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113:5125–5133
 31. Chen ML, Yan BS, Bando Y, Kuchroo VK, Weiner HL (2008) Latency-associated peptide identifies a novel CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell subset with TGFβ-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180:7327–7337
 32. Battaglia M, Roncarolo MG (2009) The Tregs' world according to GARP. *Eur J Immunol* 39:3296–3300
 33. Probst-Keppler M, Kroger A, Garritsen HS, Buer J (2009) Perspectives on regulatory T cell therapies. *Transfus Med Hemother* 36:302–308
 34. Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D (2008) Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One* 3:e2705
 35. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566–569
 36. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Hermine A, Devergne O (2008) Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 181:6898–6905
 37. Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DA (2011) Cutting edge: human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol* 186:6661–6666
 38. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ (2004) Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589–601
 39. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, Ley TJ (2007) Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635–646
 40. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ (2005) Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783–1786
 41. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257–1265
 42. Ring S, Oliver SJ, Cronstein BN, Enk AH, Mahnke K (2009) CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 123:1287–1296
 43. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, Hill PA, Pommey S, McRae JL, Winterhalter A, Doherty G, Deaglio S, Koulmanda M, Gao W, Robson SC, Strom TB (2010) Expression of CD39 by human peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant* 10:2410–2420
 44. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303–1310
 45. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV (2004) Cutting edge: human CD4⁺ CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 172:4676–4680
 46. Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, Verduguer J, Santamaria P (2003) CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Immunity* 19:877–889
 47. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R (2008) Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180:5916–5926
 48. Read S, Malmstrom V, Powrie F (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295–302
 49. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S (2008) CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322:271–275
 50. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S (2008) Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10113–10118
 51. Zhou G, Levitsky HI (2007) Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol* 178:2155–2162
 52. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169:2756–2761
 53. Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, Caputo L, Song H, Basak S, Monos D, Peritt D, Marincola F, Cai D, Birebent B, Bloome E, Kim J, Berencsi K, Mastrangelo M, Herlyn D (2002) Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res* 62:5267–5272

54. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstein B (2003) Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9:606–612
55. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H (2003) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 9:4404–4408
56. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A (2003) CD4 + CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98:1089–1099
57. Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawano R, Suzumiya J, Utsunomiya A, Harada M, Kikuchi M (2004) Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Br J Haematol* 126:81–84
58. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA (2004) Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 103:1755–1762
59. Gray CP, Arosio P, Hersey P (2003) Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+ CD25+ regulatory T-cell levels in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 9:2551–2559
60. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L (2004) Foxp3 expressing CD4 + CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173:1444–1453
61. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH (2001) Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early- stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61:4766–4772
62. Ormandy LA, Hilleman T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2005) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 65:2457–2464
63. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942–949
64. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L, Lackner A, Alvarez X, Ochoa A, Chen L, Zou W (2006) B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 203:871–881
65. Zou W (2006) Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:295–307
66. Menetrier-Caux C, Gobert M, Caux C (2009) Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res* 69:7895–7898
67. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Schlom J, Tsang KY (2008) Enhanced functionality of CD4 + CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14:1032–1040
68. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL (2009) Human circulating CD4 + CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8 + but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 182:1469–1480
69. Han Y, Guo Q, Zhang M, Chen Z, Cao X (2009) CD69+ CD4+. *J Immunol* 182:111–120
70. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121–127
71. Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, Yang BG, Hayasaka H, Miyasaka M (2005) Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci* 96:317–322
72. Faget J, Biota C, Bachelot T, Gobert M, Treilleux I, Goutagny N, Durand I, Leon-Goddard S, Blay JY, Caux C, Menetrier-Caux C (2011) Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to Treg recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Res* 71(19):6143–6152
73. Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB (2008) Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 57:123–131
74. Olkhanud PB, Baatar D, Bodogai M, Hakim F, Gress R, Anderson RL, Deng J, Xu M, Briest S, Biragyn A (2009) Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res* 69:5996–6004
75. Tan MC, Goedegebuure PS, Belt BA, Flaherty B, Sankpal N, Gillanders WE, Eberlein TJ, Hsieh CS, Linehan DC (2009) Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 182:1746–1755
76. Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-Hogan M, Mottram P, Wei S, David O, Curiel TJ, Zou W (2004) Bone marrow is a reservoir for CD4 + CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* 64:8451–8455
77. Wei S, Kryczek I, Zou W (2006) Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108:426–431
78. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K (2005) Intra-epithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18538–18543
79. Kawaida H, Kono K, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Ooi A, Fujii H (2005) Distribution of CD4 + CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *J Surg Res* 124:151–157
80. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H (2006) CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 55:1064–1071
81. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S (2006) Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12:5423–5434
82. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J, Banham AH, Roncador G, Montalban C, Piris MA (2005) Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 11:1467–1473
83. Liotta F, Gacci M, Frosali F, Querci V, Vittori G, Lapini A, Santarlasci V, Serni S, Cosmi L, Maggi L, Angeli R, Mazzinghi B, Romagnani P, Maggi E, Carini M, Romagnani S, Annunziato F (2011) Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int* 107:1500–1506
84. Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, Nakajima A, Hirohashi S (2007) FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 13:902–911
85. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 24:5373–5380
86. Salama P, Phillips M, Grieve F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B (2009) Tumor-infiltrating FOXP3+ T

- regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:186–192
87. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ (2009) Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* 137:1270–1279
 88. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay NH, Mosseri V, Laccourreye O, Bruneval P, Fridman WH, Brasnu DF, Tartour E (2006) Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 12:465–472
 89. Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G (2006) Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:3355–3360
 90. Karube K, Aoki R, Sugita Y, Yoshida S, Nomura Y, Shimizu K, Kimura Y, Hashikawa K, Takeshita M, Suzumiya J, Utsunomiya A, Kikuchi M, Ohshima K (2008) The relationship of FOXP3 expression and clinicopathological characteristics in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Mod Pathol* 21:617–625
 91. Derhovanessian E, Adams V, Hahnel K, Groeger A, Pandha H, Ward S, Pawelec G (2009) Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *Int J Cancer* 125:1372–1379
 92. Sorrentino C, Musiani P, Pompa P, Cipollone G, Di CE (2011) Androgen deprivation boosts prostatic infiltration of cytotoxic and regulatory T lymphocytes and has no effect on disease-free survival in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 17:1571–1581
 93. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114:1141–1149
 94. Poutahidis T, Haigis KM, Rao VP, Nambiar PR, Taylor CL, Ge Z, Watanabe K, Davidson A, Horwitz BH, Fox JG, Erdman SE (2007) Rapid reversal of interleukin-6-dependent epithelial invasion in a mouse model of microbially induced colon carcinoma. *Carcinogenesis* 28:2614–2623
 95. Betts G, Twohig J, Van den Broek M, Sierro S, Godkin A, Gallimore A (2007) The impact of regulatory T cells on carcinogen-induced sarcogenesis. *Br J Cancer* 96:1849–1854
 96. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN (2004) Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 200:771–782
 97. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le CA, Zitvogel L, Chauffert B (2007) Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4 + CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 56:641–648
 98. Shaffer J, Villard J, Means TK, Alexander S, Dombkowski D, Dey BR, McAfee S, Ballen KK, Saidman S, Preffer FI, Sachs DH, Spitzer TR, Sykes M (2007) Regulatory T-cell recovery in recipients of haploidentical nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with a humanized anti-CD2 mAb, MEDI-507, with or without fludarabine. *Exp Hematol* 35:1140–1152
 99. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BW, Nowak AK, Lake RA (2009) Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58:1219–1228
 100. Zhang L, Dermawan K, Jin M, Liu R, Zheng H, Xu L, Zhang Y, Cai Y, Chu Y, Xiong S (2008) Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin Immunol* 129:219–229
 101. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25 + CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163:5211–5218
 102. Olsen E, Duvic M, Frankel A, Kim Y, Martin A, Vonderheid E, Jegasothy B, Wood G, Gordon M, Heald P, Oseroff A, Pinter-Brown L, Bowen G, Kuzel T, Fivenson D, Foss F, Glode M, Molina A, Knobler E, Stewart S, Cooper K, Stevens S, Craig F, Reuben J, Bacha P, Nichols J (2001) Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin difitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 19:376–388
 103. Foss F, Demierre MF, DiVenuti G (2005) A phase-I trial of bexarotene and denileukin difitox in patients with relapsed or refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 106:454–457
 104. Morgan SJ, Seymour JF, Prince HM, Westerman DA, Wolf MM (2004) Confirmation of the activity of the interleukin-2 fusion toxin denileukin difitox against chemorefractory chronic lymphocytic leukemia, including cases with chromosome 17p deletions and without detectable CD25 expression. *Clin Cancer Res* 10:3572–3575
 105. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang A, Dahm P, Chao N, Gilboa E, Vieweg J (2005) Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 115:3623–3633
 106. Rech AJ, Vonderheide RH (2009) Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann NY Acad Sci* 1174:99–106
 107. Kavanagh B, O'Brien S, Lee D, Hou Y, Weinberg V, Rini B, Allison JP, Small EJ, Fong L (2008) CTLA4 blockade expands FoxP3+ regulatory and activated effector CD4+ T cells in a dose-dependent fashion. *Blood* 112:1175–1183
 108. Maker AV, Attia P, Rosenberg SA (2005) Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 175:7746–7754
 109. Ralph C, Elkord E, Burt DJ, O'Dwyer JF, Austin EB, Stern PL, Hawkins RE, Thistlethwaite FC (2010) Modulation of lymphocyte regulation for cancer therapy: a phase II trial of tremelimumab in advanced gastric and esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 16:1662–1672
 110. Suzuki H, Onishi H, Wada J, Yamasaki A, Tanaka H, Nakano K, Morisaki T, Katano M (2010). VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3high CD4+ Treg. *Eur J Immunol* 40:197–203
 111. Busse A, Asemisen AM, Nonnenmacher A, Braun F, Ochsenreither S, Stather D, Fusi A, Schmittel A, Miller K, Thiel E, Keilholz U (2011) Immunomodulatory effects of sorafenib on peripheral immune effector cells in metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 47:690–696
 112. Desar IM, Jacobs JFM, Hulsbergen-vandeKaa CA, Oyen WJ, Mulders PF, van der Graaf WT, Adema GJ, van Herpen CM, de Vries IJ (2011) Sorafenib reduces the percentage of tumour infiltrating regulatory T cells in renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer* 129:507–512
 113. Finke JH, Rini B, Ireland J, Rayman P, Richmond A, Golshayan A, Wood L, Elson P, Garcia J, Dreicer R, Bukowski R (2008) Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 14:6674–6682
 114. Adotevi O, Pere H, Ravel P, Haicheur N, Badoual C, Merillon N, Medioni J, Peyrard S, Roncelin S, Verkarre V, Mejean A, Fridman WH, Oudard S, Tartour E (2010) A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother* 33:991–998

115. Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, Golshayan A, Rayman PA, Wood L, Garcia J, Dreicer R, Bukowski R, Finke JH (2009) Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 15:2148–2157
116. Ozao-Choy J, Ma G, Kao J, Wang GX, Meseck M, Sung M, Schwartz M, Divino CM, Pan PY, Chen SH (2009) The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immunebased cancer therapies. *Cancer Res* 69:2514–2522
117. Cohen AD, Schaer DA, Liu C, Li Y, Hirschhorn-Cymerman D, Kim SC, Diab A, Rizzuto G, Duan F, Perales MA, Merghoub T, Houghton AN, Wolchok JD (2010) Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One* 5:e10436
118. Shevach EM, Stephens GL (2006) The GITR–GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol* 6:613–618
119. Ko K, Yamazaki S, Nakamura K, Nishioka T, Hirota K, Yamaguchi T, Shimizu J, Nomura T, Chiba T, Sakaguchi S (2005) Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3 + CD25 + CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 202:885–891
120. Mitsui J, Nishikawa H, Muraoka D, Wang L, Noguchi T, Sato E, Kondo S, Allison JP, Sakaguchi S, Old LJ, Kato T, Shiku H (2010) Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin Cancer Res* 16:2781–2791
121. Kitamura N, Murata S, Ueki T, Mekata E, Reilly RT, Jaffee EM, Tani T (2009) OX40 costimulation can abrogate Foxp3+ regulatory T cell-mediated suppression of antitumor immunity. *Int J Cancer* 125:630–638
122. Piconese S, Valzasina B, Colombo MP (2008) OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J Exp Med* 205(4):825–839
123. Jia Z, Zhao R, Tian Y, Huang Z, Tian Z, Shen Z, Wang Q, Wang J, Fu X, Wu Y (2009) A novel splice variant of FR4 predominantly expressed in CD4 + CD25+ regulatory T cells. *Immunol Invest* 38:718–729
124. Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S (2007) Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity* 27:145–159
125. Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987–995
126. Oberg HH, Juricke M, Kabelitz D, Wesch D (2011) Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur J Cell Biol* 90:582–592
127. Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY (2006) Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7048–7053
128. Zhang Y, Luo F, Cai Y, Liu N, Wang L, Xu D, Chu Y (2011) TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J Immunol* 186:1963–1969
129. Peng G, Guo Z, Kuniwa Y, Voo KS, Peng W, Fu T, Wang DY, Li Y, Wang HY, Wang RF (2005) Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 309:1380–1384
130. Molenkamp BG, van Leeuwen PA, Meijer S, Sluiter BJ, Wijnands PG, Baars A, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, de Gruij TD (2007) Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 13:2961–2969
131. Bayry J, Tchilian EZ, Davies MN, Forbes EK, Draper SJ, Kaveri SV, Hill AV, Kazatchkine MD, Beverley PC, Flower DR, Tough DF (2008) In silico identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10221–10226
132. Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K, Yamaguchi K, Yamada Y, Hanada S, Tamura K, Nakamura S, Inagaki H, Ohshima K, Kiyoi H, Ishida T, Matsushima K, Akinaga S, Ogura M, Tomonaga M, Ueda R (2010) Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 28:1591–1598
133. Schlingensiepen KH, Fischer-Blass B, Schmaus S, Ludwig S (2008) Antisense therapeutics for tumor treatment: the TGF-beta2 inhibitor AP 12009 in clinical development against malignant tumors. *Recent Results Cancer Res* 177:137–150
134. Melisi D, Ishiyama S, Scialabba GM, Fleming JB, Xia Q, Tortora G, Abbruzzese JL, Chiao PJ (2008) LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer Ther* 7:829–840
135. Yang L, Pang Y, Moses HL (2010) TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31:220–227
136. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–252
137. Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5:263–274
138. Maldonado RA, von Andrian UH (2010) How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 108:111–165
139. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, Qin XF, Liu YJ, Gilliet M (2007) Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 204:105–115
140. Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML (2010) Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 115:5366–5375
141. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, Curiel T, Lange A, Zou W (2005) Plasmacytoid dendritic cells induce CD8 + regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65:5020–5026
142. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselin I, Gordon A, Pustilnik T, Curiel DT, Galanaud P, Capron F, Emilie D, Curiel TJ (2001) Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7:1339–1346
143. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, Bremond A, Goddard S, Pin JJ, Barthelemy-Dubois C, Lebecque S (2004) Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:7466–7474
144. Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, Gobert M, Treilleux I, Bajard A, Combes JD, Faget J, Mithieux F, Cassagnol A, Tredan O, Durand I, Menetrier-Caux C, Caux C, Blay JY, Ray-Coquard I, Bendriss-Vermare N (2011) Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* 71(16):5423–5434
145. Ascierto PA, Simeone E, Sznol M, Fu YX, Melero I (2010) Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol* 37:508–516
146. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burrow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, Zou W (2003) Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 9:562–567
147. Wang W, Lau R, Yu D, Zhu W, Korman A, Weber J (2009) PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific

- CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells. *Int Immunol* 21:1065–1077
148. Curiel TJ (2008) Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 20:241–246
 149. Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Bembas K, Tao R, Basu S, Riley JL, Hancock WW, Shen Y, Saouaf SJ, Greene MI (2007) FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4571–4576
 150. Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E, Chen C, Wang L, Porrett PM, Li B, Turka LA, Olson EN, Greene MI, Wells AD, Hancock WW (2007) Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med* 13:1299–1307
 151. Kato Y, Yoshimura K, Shin T, Verheul H, Hammers H, Sanni TB, Salumbides BC, Van EK, Schulick R, Pili R (2007) Synergistic in vivo antitumor effect of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in combination with interleukin 2 in a murine model of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:4538–4546
 152. Kang SG, Lim HW, Andrisani OM, Broxmeyer HE, Kim CH (2007) Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 179:3724–3733
 153. Generali D, Bates G, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S, Dogliotti L, Banham AH, Harris AL, Bottini A, Fox SB (2009) Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 15:1046–1051
 154. Wei S, Kryczek I, Edwards RP, Zou L, Szeliga W, Banerjee M, Cost M, Cheng P, Chang A, Redman B, Herberman RB, Zou W (2007) Interleukin-2 administration alters the CD4 + FOXP3+ T-cell pool and tumor trafficking in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Res* 67:7487–7494
 155. Sosman JA, Carrillo C, Urba WJ, Flaherty L, Atkins MB, Clark JI, Dutcher J, Margolin KA, Mier J, Gollob J, Kirkwood JM, Panka DJ, Crosby NA, O'Boyle K, LaFleur B, Ernstoff MS (2008) Three phase II cytokine working group trials of gp100 (210 M) peptide plus high-dose interleukin-2 in patients with HLA-A2-positive advanced melanoma. *J Clin Oncol* 26:2292–2298
 156. Francois V, Ottaviani S, Renkvist N, Stockis J, Schuler G, Thielemans K, Colau D, Marchand M, Boon T, Lucas S, van der Bruggen P (2009) The CD4(+) T-cell response of melanoma patients to a MAGE-A3 peptide vaccine involves potential regulatory T cells. *Cancer Res* 69:4335–4345
 157. Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J (2007) Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev* 220:129–150

10.2 Annexe 2

**Quantitative and functional altérations of plasmacytoid dendritic cells contribute to tolerance
in ovarian cancer**

**Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, Gobert M, Treilleux I, Bajard A, Combes JD, Faget J, Mithieux
F, Cassagnol A, Tredan O, Durand I, Ménétrier-Caux C, Caux C, Blay JY, Ray-Coquard I, Bendriss-
Vermare N.**

Cancer research 2001 ;71 :5423-5434

Quantitative and Functional Alterations of Plasmacytoid Dendritic Cells Contribute to Immune Tolerance in Ovarian Cancer

Sana Intidhar Labidi-Galy^{1,5}, Vanja Sisirak⁵, Pierre Meeus³, Michael Gobert⁵, Isabelle Treilleux^{2,5}, Agathe Bajard⁴, Jean-Damien Combes⁴, Julien Faget⁵, François Mithieux³, Alexandre Cassagnol⁶, Olivier Tredan^{1,5}, Isabelle Durand⁵, Christine Ménétrier-Caux⁵, Christophe Caux⁵, Jean-Yves Blay^{1,5}, Isabelle Ray-Coquard¹, and Nathalie Bendriss-Vermare⁵

Abstract

In ovarian cancer, the immune system fails to eradicate established tumors partly due to the induction of immune tolerance within tumor microenvironment. In this study, we investigated the contribution of plasmacytoid dendritic cells (pDC) in the establishment of immune tolerance in a cohort of 44 ovarian cancer patients. In the tumor and malignant ascites, CD4⁺CD123⁺BDCA2⁺ pDC were the most abundant dendritic cell subset; however, they were profoundly depleted in peripheral blood. The presence of pDC in primary ovarian cancer, but not ascites, was an independent prognostic factor associated with early relapse. Following chemotherapy, we observed a partial restoration of blood pDC levels in patients in complete remission. These findings show preferential recruitment of pDC into tumors where they express a partially mature phenotype that may reflect an *in situ* activation. Importantly, compared with pDC found in ascites or blood, tumor-associated pDC (TApDC) produced less IFN- α , TNF- α , IL-6, macrophage inflammatory protein-1 β , and RANTES in response to toll-like receptor stimulation, and alterations in pDC functions were mainly mediated through tumor-derived TNF- α and TGF- β . Unlike ascites-derived pDC, TApDC induced IL-10 production from allogeneic naive CD4⁺ T lymphocytes, suggesting the existence of a paracrine immunosuppressive loop. Taken together, our findings indicate that both local and systemic dysfunction of pDC play a critical role in the progression of ovarian cancer via induction of immune tolerance. *Cancer Res*; 71(16): 5423–34. ©2011 AACR.

Introduction

Ovarian cancers are the leading cause of death from gynecologic cancers and the fifth most common overall cause of cancer death among women (1). Most women (~75%) present with advanced stage disease, for which the 5-year survival rate is a dismal 30% or less, and has not changed over 3 decades (2). Thus, understanding mechanisms underlying therapeutic success and failure has important clinical relevance: predicting nonresponse and developing new therapeutic approaches may improve outcome.

Authors' Affiliations: Departments of ¹Medical Oncology, ²Pathology, ³Surgery, and ⁴Biostatistics; ⁵Université Lyon 1, ISPB, INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon; and ⁶Department of Surgery, Infirmerie Protestante, Chemin du Penthod Caluire, Caluire et Cuire, Rhone, France

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Sana Intidhar Labidi-Galy, Department of Medical Oncology, Centre Léon Bérard and Université Lyon 1, ISPB; or INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69008 Lyon, France. Phone: 33478782938; Fax: 33478782716; E-mail: labidi@lyon.fnclcc.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0367

©2011 American Association for Cancer Research.

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are one of 2 main subsets of human dendritic cells (DC) in blood. pDC are identified as a CD4⁺, CD11c⁺, lineage marker⁺, and HLA-DR⁺ cells that express CD123/IL-3 receptor alpha chain and/or as BDCA2- and BDCA4-expressing cells (3). At steady state, they are circulating in blood and directly enter in lymph nodes through the high endothelial venules (HEV; ref. 4, 5) and are absent from peripheral tissues. pDC are crucial effector cells in antiviral immunity. Indeed, in response to viral stimulation (6) through toll-like receptors (TLR) 7 and 9 (7), they produce high amounts of type I IFN (α , β , and ω). pDC link innate and adaptive immune responses by promoting the activation and differentiation of natural killer (NK) cells, B cells, myeloid DC (mDC), and T cells (7–9). Consistent with their antigen presentation capabilities, pDC were also shown to mediate tolerance to allogeneic antigens in cardiac allograft (10), oral antigens (11), and airway allergens (12).

Emerging evidence indicates that tumor infiltration by pDC may have clinical importance, as underlined by their identification in tumors including melanoma, head and neck, lung, ovarian, and breast cancers (13–15). Several types of cancers are characterized by impaired function and numbers of pDC (13, 16), but correlations of pDC frequency with disease progression in cancer remain poorly studied. Infiltration of primary breast carcinomas by pDC is variable and their

presence at high density is associated with poor clinical outcome (17) and their depletion in the blood of pancreatic cancer patients is correlated with reduced survival (18).

In ovarian cancer, several studies have shown an accumulation of pDC in malignant ascites, with depletion in blood (14, 19, 20). pDC were reported to be attracted into ascites through SDF-1/CXCL12, to produce high amounts of type I IFN in response to TLR ligand (14, 21), and to induce CD8⁺ regulatory T cells which suppress tumor antigen-specific T cells through the production of IL-10 (21). In addition, ascite pDC were shown to favor tumor angiogenesis *via* the production of TNF- α and IL-8 (20). However, the role of tumor infiltration by pDC [called tumor-associated pDC (TApDC)] in advanced ovarian cancer remains to be addressed.

In this report, we have characterized the tissue distribution, phenotype, and functions of pDC in advanced epithelial ovarian cancer and their impact on patients' clinical outcome. Our findings bring new insights into the physiopathology of pDC in the context of ovarian cancer in humans, showing quantitative systemic and local functional alterations of pDC associated with progression.

Materials and Methods

Patients

We studied 44 untreated patients with International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage I, II, III, and IV epithelial ovarian cancers. All patients gave written, informed consent. The study was approved by local Institutional Review Boards. Biological samples were collected at Centre Leon Bérard, Lyon, and other institutions in Rhône-Alpes Region, France.

Preparation of tumors and ascites cell suspensions

We collected fresh solid tumors and malignant ascites aseptically. Cells were harvested from ascites by centrifugation over a Ficoll-Hypaque density gradient. Ovarian tumors samples were minced into small pieces in serum-free RPMI medium and digested with collagenase Ia (1 μ g/mL) and DNase I (50 KU/mL; Sigma Aldrich) for 1 hour at 37°C with gentle agitation. The resulting cell suspensions were filtered, washed, and resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Lonza) and antibiotics (complete RPMI) before isolation of mononuclear cells (MNC) by centrifugation over a Ficoll-Hypaque density gradient for further analyses.

Peripheral blood MNCs

Peripheral blood was collected aseptically from healthy donors (HD; $n = 55$) or ovarian cancer patients ($n = 44$) in a CTAD-coated tube. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained over a Ficoll-Hypaque density gradient, washed twice, and resuspended in PBS containing 2% FCS (Lonza) and 0.5 mmol/L EDTA for flow cytometry analysis.

Ex vivo mononuclear cell stimulation

We stimulated MNC from tumors, ascites, and peripheral blood from 6 patients and 8 HDs in complete RPMI at 1×10^6 cells per well in duplicate wells with formaldehyde-inactivated

influenza (flu) virus (A/Wisconsin/67/05; generous gift from Aventis Pasteur) and CpG-A/ODN 2336 that were used at 100 HAU/mL and 5 μ g/mL, respectively in 24-well tissue culture plate at 37°C. Cell-culture supernatants were harvested after 18 hours and used for cytokines production quantitation by ELISA.

pDC purification from blood, tonsils, tumors, and ascites

To isolate pDC from biological samples, CD3-, CD8-, CD11b-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20-, CD56-, Glycophorin A-, and EpCAM-expressing cells were depleted using specific antibodies and paramagnetic beads (Invitrogen). pDC from blood and HD tonsils were purified from lineage-negative enriched MNC using the BDCA4 cell isolation kit (Miltenyi Biotec) according to the supplier's instructions. Ovarian tumors or malignant ascite pDC were sorted from lineage-negative enriched MNC using FACS (FACSVantage SE DiVa flow cytometer, BD Bioscience) as CD4⁺CD123⁺ cells using APC anti-CD123 (Biolegend) and PE-Cy5 anti-CD4 (Beckman Coulter). Purity was routinely 98% or more.

Preparation of ovarian tumors and ascites-derived supernatants

Single-cell suspensions from ovarian tumors and ascites were incubated at a final concentration of 1.5×10^6 cells/mL in complete RPMI in petri dishes. Culture supernatants were collected after 48 hours, filtrated on 0.2 μ m, and cryopreserved at -80°C until use.

Culture of ovarian tumor-associated or healthy pDC

Freshly isolated TApDC and ascite pDC were cultured at 5×10^5 cells/mL in 96-well flat-bottom plates in complete RPMI for 24 hours in presence of recombinant hIL-3 (Peprotech), formaldehyde-inactivated influenza (flu) virus (A/Wisconsin/67/05) and CpG-A/ODN 2336 that were used at 20 ng/mL, 100 HAU/mL, and 5 μ g/mL, respectively. Freshly isolated healthy blood or tonsil pDC were cultured as previously mentioned in the presence of hIL-3 with or without ovarian tumor (TUMSN) or ascite (ASCSN) supernatants supplied at 25% for 16 hours before addition of TLR ligands for another 24 hours. Cells and supernatants were harvested after 24 hours for TApDC and ascite pDC, and 40 hours for healthy pDC culture to analyze cell surface expression of activation markers and cell viability (by Propidium Iodide Incorporation) by flow cytometry and cytokines production by ELISA.

Flow cytometry analysis

Three-color staining was done by flow cytometry on a FACScan (BD Bioscience) using isotype-matched controls or monoclonal antibodies and data were analyzed with Cell-Quest software (BD Bioscience). pDC were identified as CD4⁺CD123⁺BDCA2⁺ cells using fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-BDCA2 (Miltenyi Biotec), PE anti-CD123 (BD Bioscience), and PE-Cy5 anti-CD4 (Beckman Coulter). mDC were identified as Lin⁻CD4⁺CD11c⁺ using FITC-conjugated lineage (Lin) cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, and CD56; BD Bioscience), PE anti-CD11c (BD Bioscience),

and PE-Cy5 anti-CD4 (Beckman Coulter) antibodies. CD4⁺ T lymphocytes were identified as CD3⁺CD4⁺ cells using FITC anti-CD3 (BD Bioscience) and PE-Cy5 anti-CD4 antibodies (Beckman Coulter). The phenotype of CD4⁺BDCA2⁺ pDC was analyzed with PE-coupled anti-CD86 (BD Bioscience) and anti-CD40 (Beckman Coulter). Monoclonal antibodies. Viability was assessed by Propidium Iodide Incorporation. Flow cytometry results are expressed as % positive cells and mean fluorescence intensity (MFI). At least 200,000 gated events/condition were analyzed on the total cell population and 5,000 gated events/condition on purified cells.

Allogeneic mixed leukocyte reaction

Allogeneic CD4⁺CD45RA⁺ naive T cells were purified from HD peripheral blood after magnetic depletion using anti-CD8, -CD14, -CD19, -CD16, -CD56, and -glycophorin A antibodies followed by anti-IgG beads (Invitrogen). The purity was routinely more than 95%. Highly purified fluorescence-activated cell sorting (FACS)-sorted pDC from ovarian tumors and ascites from the same patients were differentiated by culture in IL-3 (20 ng/mL) for 16 hours and then cultured with responder T cells in a ratio of 0;3;11;33;111;333;1,111;3,333, and 10,000 per 100,000 T cells for 96 hours in triplicate in round bottom 96-well plates. Finally, cells were pulsed with 0.5 μ Ci per well [3H]thymidine (Amersham Biosciences) and harvested 18 hours later. The [3H]thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation spectroscopy (Betaplate scintillation counter, Perkin Elmer). Culture supernatants were collected for cytokine analysis by ELISA.

Determination of cytokines production

The ELISA for hIFN- α (Bender MedSystems), hIL-10 (Bender MedSystems), hIFN- γ (Bender MedSystems), and hIP-10/CXCL10 (BD Biosciences) were used according to manufacturer's instructions. Levels of TNF- α , IL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β , IP-10, RANTES, IL-12p40, and IL-12 p70 in culture supernatants were determined using a Milliplex map, based on the Luminex xMAP technology by Millipore.

Statistical analysis

Comparison of independent samples was done by the Student's *t* test or nonparametric tests when appropriate. Correlation analysis of the data was done using the Spearman test. The following clinical variables were collected prospectively: age, performance status (PS), stage, debulking surgery, and the presence of macroscopic residual disease. pDC and mDC levels in tumors and ascites were categorized in upper tertile and lower 2 tertiles.

Progression-free survival (PFS) was defined as the time from pathologic diagnosis to progression. PFS was calculated using Kaplan-Meier method. To evaluate the relationship between survival and biological and/or clinical factors, all potential prognostic factors were included in univariate Cox proportional hazard regression models (22). Candidate prognostic factors with a 0.05 level of significance in univariate analysis were then selected for inclusion in the multivariate analysis. Independent prognostic variables of PFS were identified by a

Cox regression analysis using a backward selection procedure to adjust the time cohort effect on patient's characteristics. All statistical analyses were done using SAS software v.9.2 for Microsoft Windows (SAS Institute). All *P* values for 2-tailed tests were considered significant when *P* < 0.05.

Results

Accumulation of pDC in ascites and depletion in the blood

We evaluated the tissue distribution of CD4⁺CD123⁺BDCA2⁺ pDC (Refs. 3, 23; Supplementary Fig. S1A) and Lineage⁻CD4⁺CD11c⁺ mDC (Supplementary Fig. S1B; ref. 24) as a fraction of total MNC in 44 patients with previously untreated epithelial ovarian cancer. Patients' characteristics are detailed in Supplementary Table S1. Consistent with previous investigations (14), the percentage of both pDC and mDC in total PBMC were significantly reduced (*P* < 10⁻³) in ovarian cancer patients (mDC median% = 0.04, range 0–0.65; pDC median% = 0.11, range 0.01–0.98) compared with HD (mDC median% = 0.18, range 0–1.19; pDC median% = 0.32, range 0.07–0.78; Fig. 1A and B). The depletion of blood pDC tended to be deeper in advanced stages (III/IV; 0.1%) ovarian cancer patients compared with early stages (I/II; 0.19%), although this did not reach statistical significance (*P* = 0.09; Fig. 1C). Similar variations according to stage were observed with mDC (*P* = 0.43; Fig. 1D). These data suggest that pDC are actively recruited from blood to the tumor.

To document variations in pDC number in blood during treatment, we determined pDC levels in patients at diagnosis (*n* = 44), on therapy, that is, after 4 cycles of chemotherapy (*n* = 12), in complete remission (CR) 3 months after the end of treatment (*n* = 10) and at progression (*n* = 12). We observed partial restoration of blood pDC in most of the patients after 4 cycles of chemotherapy (*P* = 0.01; Fig. 1E) which was maintained in patients in CR (*P* < 10⁻²). In contrast, we observed a trend toward decreased pDC levels in patients with progressive disease when compared with those in CR (*P* = 0.22). For mDC, we observed significant lower levels in progressive patients when compared with HD (*P* < 10⁻³; Fig. 1F).

With regard to their tissue distribution, pDC infiltrated some tumors (median% = 0.06, range 0–0.68) and accumulated in the majority of malignant ascites (median% = 0.83, range 0.04–2.93; Fig. 1A). Indeed, ascite pDC were 7.2-fold higher than patient blood pDC (*P* < 10⁻³) and 13.8-fold higher than TApDC (*P* < 10⁻³). MDC were present in malignant ascites (median% = 0.06, range 0–0.86) but in lower proportions than pDC (*P* < 10⁻³) while their presence in tumors was scarce (median% = 0.01, range 0–0.13; Fig. 1B).

Correlation of TApDC frequency with poor clinical outcome

The distribution of pDC was skewed with depletion in blood in most of ovarian cancer patients and accumulation in some tumors and especially in malignant ascites. We questioned the impact of the presence of pDC in tumors and ascites on patients' outcome. We adopted a classification by tertile (33rd percentile) to compare the highest tertile subgroup to all

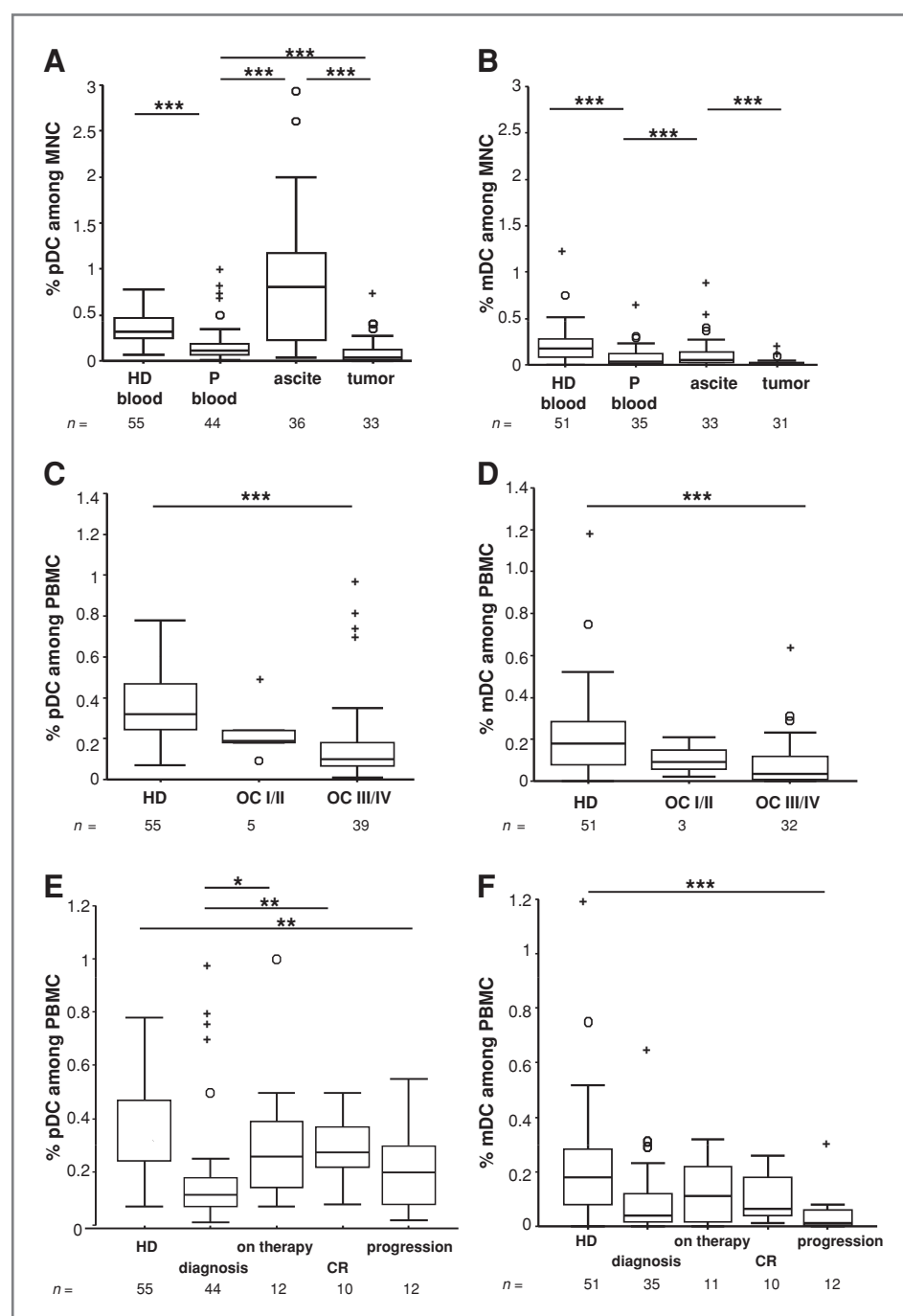


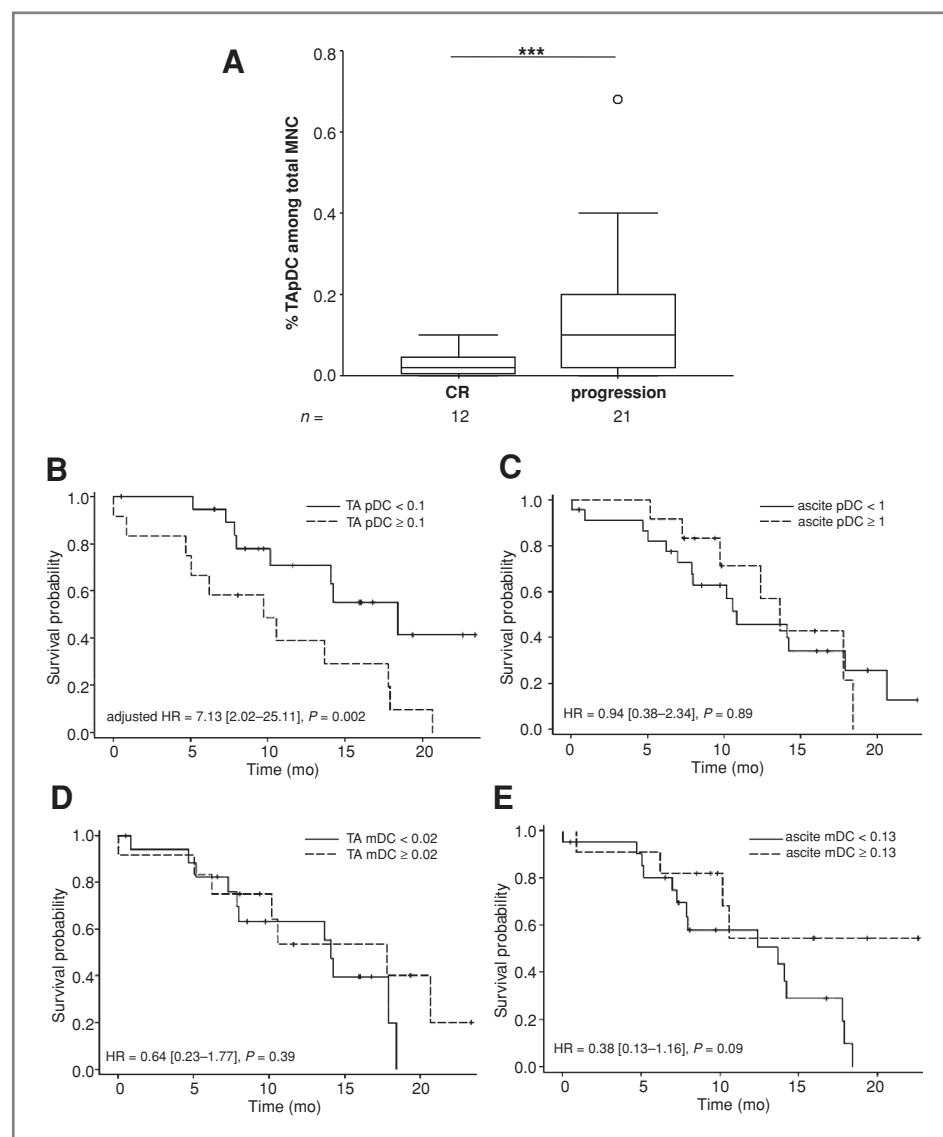
Figure 1. Distribution and frequency of $CD4^+ BDCA2^+ CD123^+$ pDC and $Lin^- CD4^+ CD11c^+$ mDC obtained by FACS analysis in biological samples. MNC from freshly untreated ovarian cancer, malignant ascites, and peripheral blood from ovarian cancer patients (P) and HDs were prepared. Box plot set of pDC and mDC levels determined as a percentage among total MNC. *P* values were derived from Mann-Whitney test or Student's test for each comparison. A and B, pDC and mDC levels among MNC in blood, ascite, and tumors of ovarian cancer patients and blood of HD. C and D, pDC and mDC levels among PBMC in HD and ovarian cancer patients according to the stage of the disease. E and F, pDC and mDC levels among PBMC in ovarian cancer patients during therapy and comparison with HD. +, extremes; ○, outlier. *, < 0.05 ; **, $< 10^{-2}$; ***, $< 10^{-3}$. OC, ovarian cancer.

others. To address this question, we analyzed all relevant clinical and pathologic information's (Supplementary Table S1) that were available on the 44 patients. As our study was prospective with a median follow-up of 14 months, we centred our analysis on PFS. In addition to TApDC levels, 5 clinico-pathologic variables (age, stage, PS, debulking surgery, and the presence of residual disease) were analyzed due to their previously described prognostic significance in ovarian cancer (25). We observed that the subgroup of patients who

progressed showed significantly higher levels of TApDC than those in CR ($P < 0.05$; Fig. 2A). In univariate analysis, the following factors were associated with prolonged PFS: early stage (I-II), debulking surgery, absence of residual tumors and low tumor infiltration by pDC defined as less than 0.1% of total MNC (Fig. 2B and Supplementary Table S2).

In contrast, high levels of ascite pDC had no impact on ovarian cancer patients' outcome (Fig. 2C). When using a cut-off of ascite pDC 1% or more of total MNC (10-fold

Figure 2. Tumors highly infiltrated by pDC showed early relapse. PFS rates were calculated using Kaplan–Meier method and compared using log-rank test. A, box plot set showing tumor-associated pDC (TApDC) levels in patients in CR and those with progressive disease after a median follow-up of 14 months. B–E, PFS of patients with the highest tertile (33rd percentile) frequency of TApDC ($\geq 0.1\%$), ascite pDC ($\geq 1\%$), TAmDC ($\geq 0.02\%$), and ascite mDC ($\geq 0.13\%$) compared with all others. ***, $<10^{-3}$.



higher than in tumors), median PFS was estimated to 13.6 months compared with 10.8 months in patients with ascite pDC less than 1% [hazard ratio (HR) = 0.94, CI: 0.38–2.34, $P = 0.89$]. To assess whether this effect was specific to pDC or concerned all DCs, we further investigated the impact of mDC accumulation in ascites and tumors on PFS. We did not observe any impact of tumor-associated mDC (TAmDC) nor ascite mDC on PFS of ovarian cancer patients (Fig. 2D and E; Supplementary Table S2).

In multivariate analysis, TApDC remained an independent prognostic factor associated with early relapse. Median PFS for patients with the highest tertile of pDC ($\geq 0.1\%$ of total MNC) was 9.7 months whereas those with TApDC less than 0.1% showed a median PFS of 18.4 months (HR = 7.13, CI: 2.02–25.11, $P = 0.002$; Fig. 2B and Supplementary Table S2) suggesting that infiltration of ovarian tumor by pDC has a deleterious effect on patients' outcome.

Partial phenotypic activation of TApDC

To examine the possibility that tumors alter pDC status, expression levels of markers involved in pDC maturation/activation or in T cell costimulation (24) were measured directly *ex vivo* comparing blood, ascite, and tumor-associated pDC from 17 patients. We found that TApDC expressed a semimature phenotype with significantly higher levels of CD40 and CD86, compared with ascites and blood pDC, which showed classic immature phenotype (Fig. 3). These findings suggest that ovarian tumors induce partial activation of TApDC *in situ*. To assess whether this observation could be explained by the presence of dead cells (26), we investigated by flow cytometry the percentage of dead cells among MNC in ascites and tumors from 13 ovarian cancer patients identified by Propidium Iodide Incorporation. We observed 5-fold higher levels of dead MNC in tumors (median% = 20) than ascites (median% = 4.94, $P < 10^{-3}$).

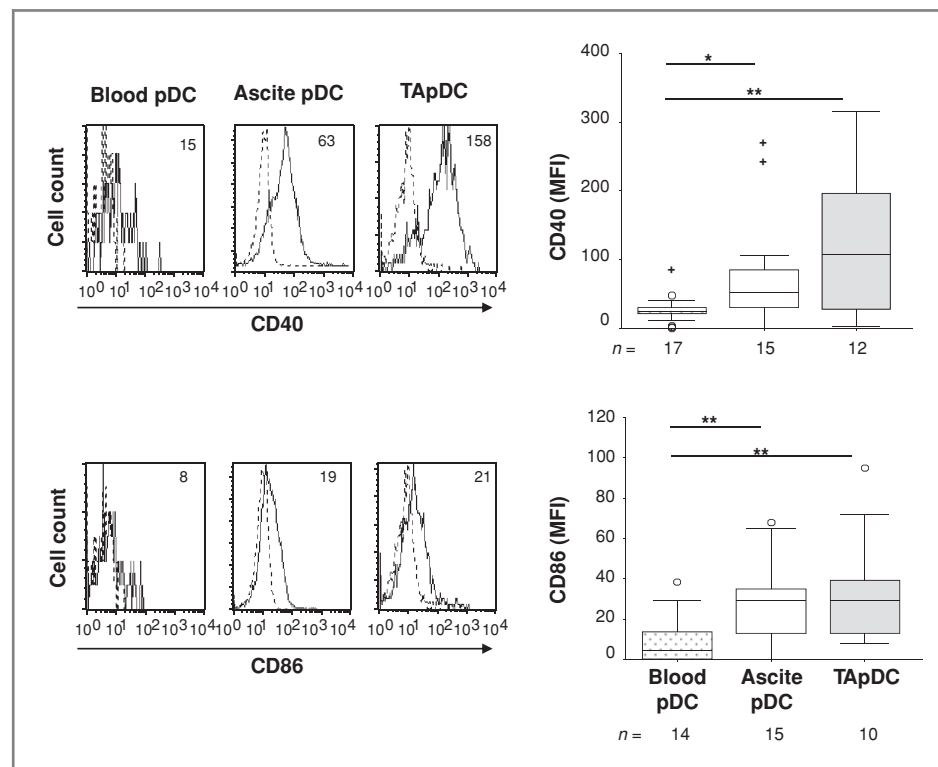


Figure 3. TApDC isolated from ovarian tumors display a partially activated phenotype. Three-color flow cytometry analysis was used to assess the expression of CD40 and CD86 on CD4⁺CD123⁺ pDC from blood, ascites, and tumors from 17 ovarian cancer patients. Statistical analysis was done using Mann-Whitney test. Values are expressed as MFI minus FMO control. +, extremes; ○, outlier. *, < 0.05; **, <10⁻².

Full maturation of TApDC and ascite pDC after *in vitro* stimulation

Highly purified pDC from ascites, ovarian tumors, and HD blood were cultured with IL-3 and TLR ligands (TLR-L). Changes in expression levels were determined using paired analysis of expression of CD40 and CD86 before and after stimulation. CD40 and CD86 expression increased following IL-3, CpG-A, and influenza virus (flu) stimulation in both ascite and tumor pDC at higher levels than blood pDC (Fig. 4). Interestingly, TApDC seemed to be more prompted than blood and ascite pDC to mature *in vitro* even in the absence of TLR-L as culture in IL-3 induced high expression of both activation markers. Another important observation is the acquisition of a fully mature CD40^{high} CD86^{high} phenotype by both ascite pDC and TApDC but not blood pDC in response to CpG-A. These observations were similar to those obtained with Flu virus. Thus, tumor microenvironment seemed to have altered TLR9 response of ascite pDC and TApDC induced by CpG-A. These findings show that both TApDC and ascite pDC conserve their ability to achieve full maturation following *in vitro* TLR stimulation despite an altered phenotype at baseline.

Amplification of IL-10 production by T cells in response to TApDC

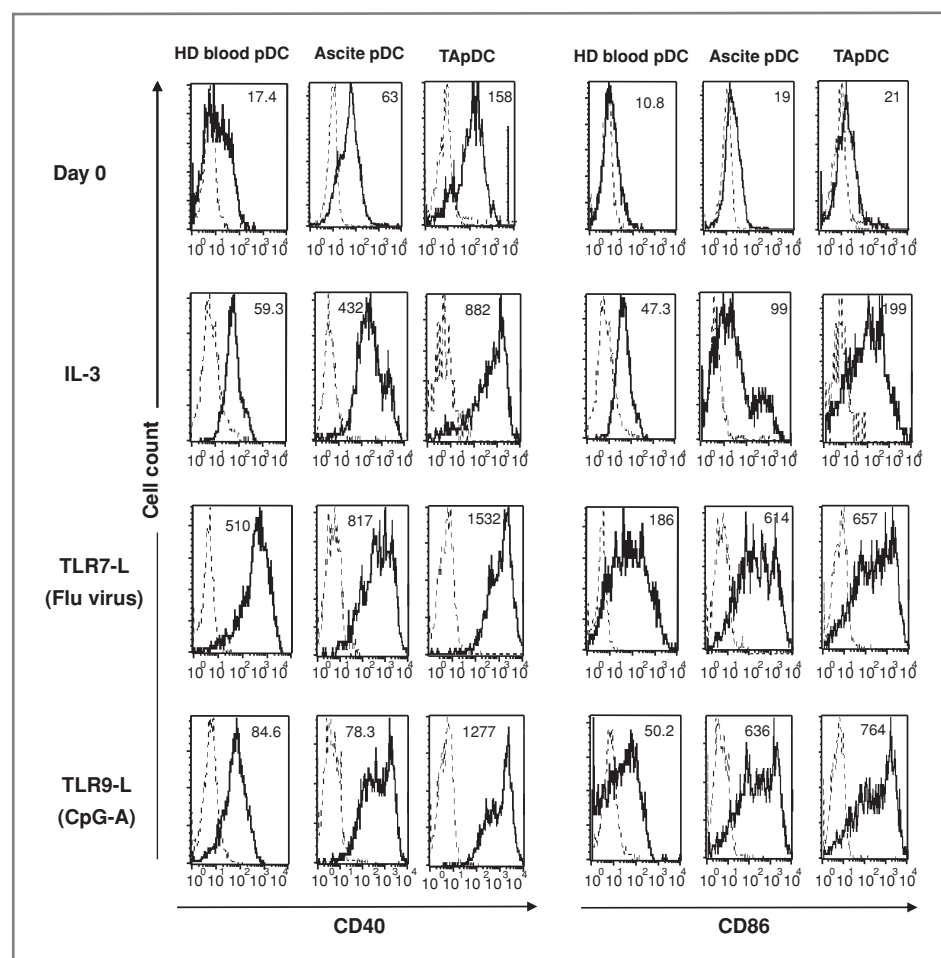
pDC play an important role as antigen-presenting cell by inducing antitumor CD4⁺ T cell responses (27). We observed significant correlation between TApDC and CD4⁺ T lymphocytes infiltration in tumors ($r^2 = 0.657$, $P < 10^{-3}$; Fig. 5A) whereas no significant correlation was observed with mDC

($r^2 = 0.278$, $P = 0.13$). Next, we examined the function of TApDC in priming T-cell responses. Freshly, FACS-sorted pDC from ascites and ovarian tumors from the same patients ($n = 2$) were used to stimulate naive allogeneic CD4⁺ T cells purified from HD blood *in vitro*. Both TApDC and ascite pDC induced proliferation of allogeneic naive CD4⁺ T cells in a dose-dependent manner (Fig. 5B). Strikingly, TApDC induced strong IL-10 ($P < 0.05$) production by primed T cells and slightly higher levels of IFN- γ in comparison to ascite pDC (Fig. 5C). These results lead us to propose that TApDC may contribute to create an immunosuppressive environment through the generation of IL-10-producing T cells.

Inhibition of IFN- α production in TApDC

The production of IFN- α in response to TLR 7 and 9 ligands represents a key mediator in pDC innate function (28). We compared the capacity of blood pDC from HD ($n = 12$), TApDC and ascite pDC from ovarian cancer patients ($n = 5$) to produce IFN- α in response to TLR ligands. Consistent with a previous report (14), ascite pDC produced high levels of IFN- α in response to TLR7 and 9 ligands (Fig. 6A). Although not significant, they produce even more IFN- α than HD blood pDC in response to Flu ($P = 0.1$; Fig. 6A) but not CpG-A ($P = 0.54$; Fig. 6B). In contrast, we observed a severe inhibition of IFN- α production in TApDC compared with ascite and blood pDC mainly in response to TLR9 (CpG-A) and to a lower extent to TLR7 ligands (flu virus). These results indicate that the capacity of pDC to produce IFN- α was selectively altered at the tumor site.

Figure 4. TApDC and ascite pDC acquire a fully mature phenotype after TLR ligands activation *in vitro*. Highly purified TApDC ($n = 5$), ascite pDC ($n = 5$), and HD blood pDC ($n = 2$) were cultured with IL-3 (20 ng/mL), inactivated flu (Influenza) virus (100 HAU/mL), and CpG-A (5 μ g/mL) for 40 hours. Activation of pDC was monitored by analyzing CD40 and CD86 expression by flow cytometry. Data are representative of 2 or 5 independent experiments and MFI values of total cells are indicated in each histogram.



pDC were profoundly depleted from the blood of ovarian cancer patients preventing their isolation. As pDC is the main cellular source of IFN- α in response to TLR ligands, we compared the capacity of total MNC (adjusted to the percentage of pDC) of blood, ascite, and tumors from the same patients ($n = 6$) and PBMC from HD ($n = 8$) to produce this cytokine. IFN- α production was reduced in tumor-associated MNC compared with ascite or blood MNC after exposure to CpG-A (Fig. 6D) confirming that only pDC into tumor mass are altered for this innate function. Although pDC are severely depleted in ovarian cancer patient's blood, they are still functional as patients' PBMC produced similar levels of IFN- α in response to TLR ligands than HD (Fig. 6C and D).

We further investigated the production of 8 cytokines/chemokines (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-12p70, MIP-1 β , IP-10, and RANTES) by FACS-sorted TApDC and ascite pDC that were activated *in vitro* by TLR ligands (Supplementary Fig. S2A and B). We observed, similar to IFN- α , a significant inhibition of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) and chemokines (MIP-1 β and RANTES) production by TApDC mainly in response to TLR9 ligand (Supplementary Fig. S2A). By contrast, there was no significant difference for the production of IL-8 and IP-10 by TLR-activated TApDC and ascite pDC (Supplementary Fig. S2B).

Altogether, the substantial differences between TApDC and ascite pDC in term of frequencies, phenotype, response to TLR ligands, and impact on patients' outcome suggest that pDC are differentially affected in the microenvironment of ascites and tumors suggesting that malignant ascites do not closely mirror the tumor microenvironment of the tumor mass.

Inhibition of IFN- α production of healthy pDC by ovarian tumor-derived supernatants mainly through TGF- β and TNF- α dependent mechanism *in vitro*

The weak IFN- α production of TApDC compared with ascite and blood pDC suggests that the tumor microenvironment actively and specifically inhibits TApDC ability to produce IFN- α . To decipher the mechanisms involved in TApDC dysfunction, pDC isolated from blood and/or tonsils of HD were preincubated in presence of IL-3 and ovarian tumor-derived supernatants (TUMSN, $n = 5$) for 16 hours and then stimulated during 24 hours with TLR ligands (flu virus or CpG-A). Most of TUMSN inhibited IFN- α production of pDC to both flu virus (median% of inhibition = 60.8%) and CpGA (median% of inhibition = 53.2%; Fig. 7A). In contrast, IP-10 production remained unaffected (Fig. 7A) and no effect on pDC viability was detected (data not shown), excluding that the negative effect of TUMSN on IFN- α production by

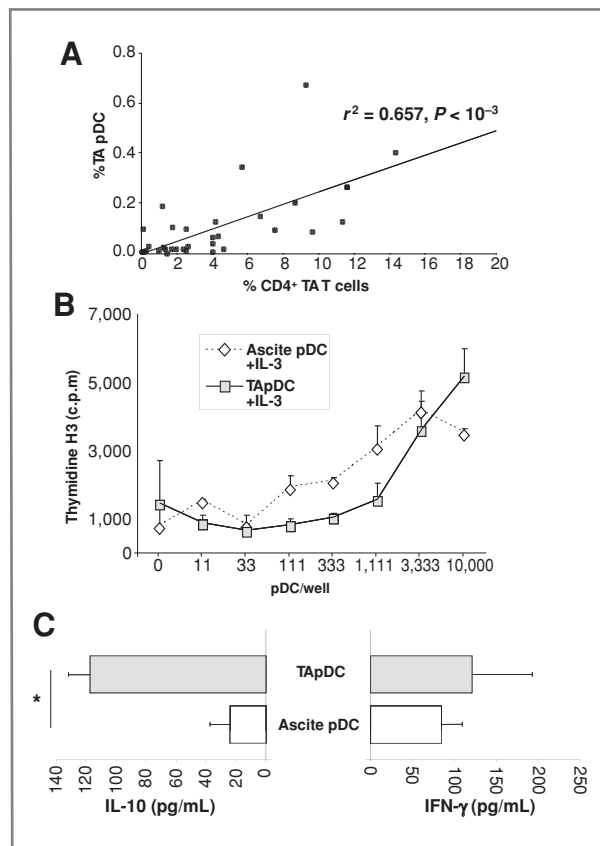


Figure 5. TApDC prime allogeneic naive $CD4^+$ T cells and induce IL-10 T cell response. **A**, Spearman rank correlations between the proportion of $CD4^+BDCA2^+CD123^+$ pDC and $CD3^+CD4^+$ T lymphocytes in ovarian tumors. **B**, FACS-sorted TApDC and ascite pDC were cultured with IL-3 (20 ng/mL) for 24 hours and then incubated at graded doses with naive allogeneic $CD4^+CD45RA^+$ T cells for 5 days. T cell proliferation was determined by 3H thymidine incorporation [mean and s.e.m (error bars) of triplicate cultures]. **C**, culture supernatants were collected and IL-10 and IFN- γ were analyzed by ELISA. Data are one of 2 independent experiments. *, <0.05 . TA, tumor-associated.

TLR-activated pDC involved induction of cell death. These results suggest that soluble factors present within the tumor environment contribute to the functional inhibition of TLR-activated pDC. Of most importance, supernatants derived from tumors (TUMSN) were more efficient than those derived from ascites (ASCSN; 48%–67% compared with 14%–23% of inhibition, respectively; $P < 10^{-2}$) to block IFN- α production by CpG-A-activated pDC (Supplementary Fig. S3).

We next investigated the involvement of several well-known immunomodulators including TGF- β (29), TNF- α , and IL-10 (30) to inhibit IFN- α production by pDC. We observed that TUMSN contained significantly higher levels of TNF- α (median = 470 pg/mL, range 279–2,503 pg/mL) than ASCSN (median = 218 pg/mL, range 64–476 pg/mL; $P = 0.03$; Supplementary Fig. S4A). IL-10 was also higher in TUMSN (median = 2,900 pg/mL, range 263–5,862 pg/mL) than ASCSN (median = 1,638 pg/mL, range 530–2,864 pg/mL) but this difference was not significant ($P = 0.07$; Supplementary

Fig. S4B) whereas active TGF- β 1 was present at similar levels in both TUMSN and ASCSN (Supplementary Fig. S4C).

To investigate the role of IL-10, TGF- β , and TNF- α in pDC alteration by the tumor microenvironment, we blocked these cytokines in ovarian TUMSN using neutralizing antibodies (Ab). Blocking TNF- α and TGF- β independently, but not IL-10, induced a partial reversion of ovarian TUMSN-mediated inhibitory effect on IFN- α production of healthy pDC (Fig. 7B). TUMSN-mediated inhibitory effect on IFN- α production was totally reversed when TNF- α and TGF- β were simultaneously blocked, while blocking IL-10 together with either TNF- α or TGF- β has only minor additional effect. Collectively, these observations show that the specific inhibitory effect associated to the soluble fraction of the ovarian tumor environment on pDC innate functions is mainly mediated through TGF- β and TNF- α cooperation.

Discussion

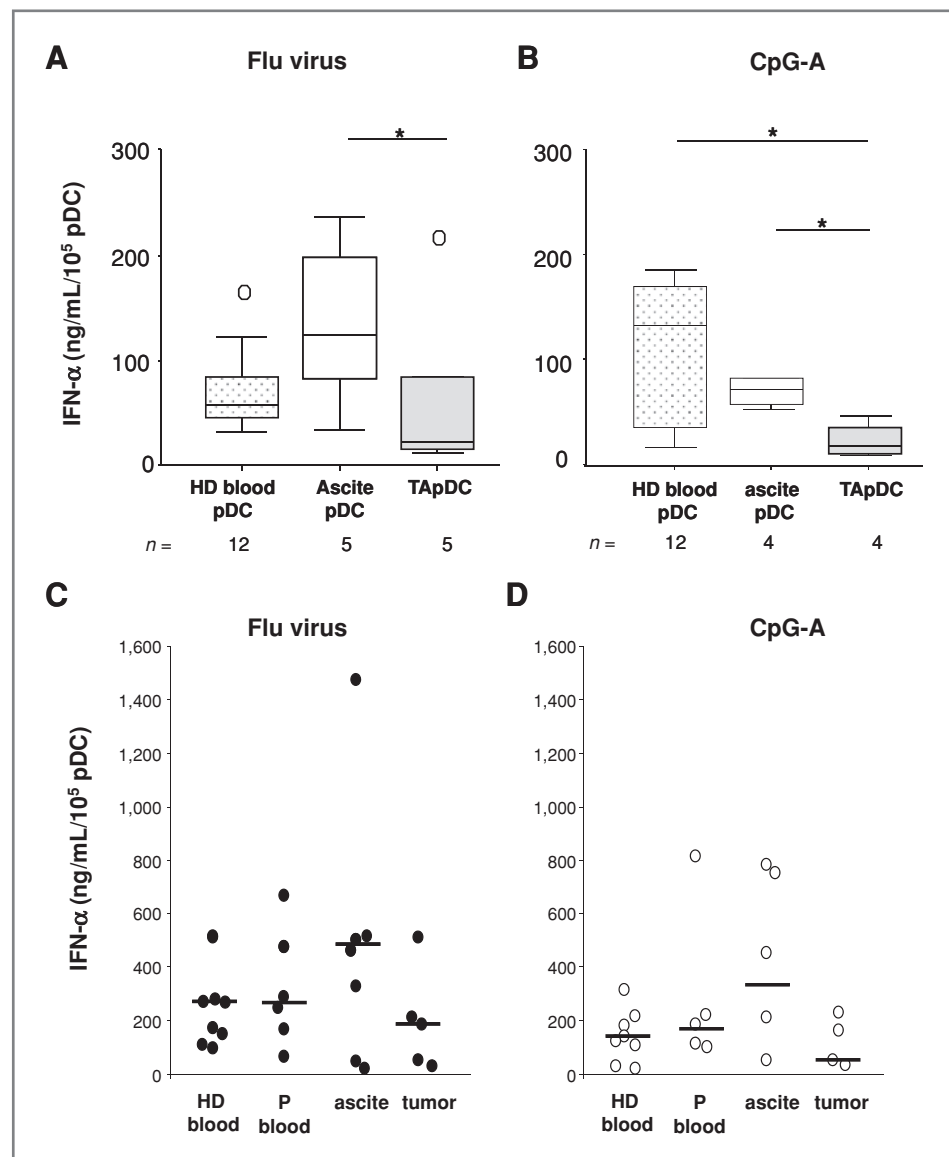
In this prospective study on 44 patients presenting ovarian cancer and using *ex vivo* analysis, we showed that TApDC are different from ascite and blood pDC in terms of distribution, phenotype, innate and adaptative functions, and impact on patients' outcome. Indeed, pDC accumulate mainly in malignant ascites whereas their frequencies were variable in ovarian tumors. Of most importance, only accumulation of TApDC was an independent prognostic factor associated with early relapse whereas their presence in ascites was not deleterious for patients. The presence of mDC in ascites and tumors had no impact on patients' outcome highlighting the specific pejorative role of pDC in the context of tumor microenvironment.

To further investigate the clinical significance of the presence of pDC in tumors and ascites, we conducted a systematic comparison of TApDC and ascite pDC. TApDC showed a semimature phenotype as illustrated by higher levels of activation molecules CD40 and CD86. This partial activation of TApDC might be due to endogenous danger signals such as self-nucleic acids released by dying cells in the tumor microenvironment (26) which were in higher proportions in tumors than ascites. We also observed increased levels of TNF- α in ovarian TUMSN when compared with ASCSN, a cytokine previously shown to induce pDC maturation (31). In addition to their baseline semimature phenotype, TApDC were more potent than ascite or blood pDC to mature *in vitro* in response to both TLR-independent and TLR-dependent signals.

In contrast, TApDC but not ascite pDC were strongly affected for their capacity to produce IFN- α upon TLR stimulation, in particular in response to CpG-A, a TLR9 ligand known to induce type I IFN secretion in pDC (32). Collectively, these results showed that TApDC seemed to respond to signals by maturing rather than by producing IFN- α , even in response to IFN- α inducers.

Moreover, ovarian tumor-derived supernatants blocked specifically IFN- α production by TLR-activated pDC *in vitro*. These results suggest that soluble factors present in the tumor microenvironment are involved in TApDC dysfunction. In this context, we showed that cytokines such as TGF- β and TNF- α

Figure 6. TApDC are inhibited for their IFN- α production following TLR ligands stimulation. A and B, FACS-sorted TApDC, ascite pDC, and blood pDC from HDs were cultured with inactivated flu virus (100 HAU/mL) and CpG-A (5 μ g/mL) for 24 hours. IFN- α production in culture supernatants was determined by ELISA. Results were standardized by calculating the production of IFN- α for 1×10^5 pDC for each sample. C and D, total MNC (1×10^6 cells/well) from blood, ascites, and tumors of the same patients ($n = 6$) and from blood of HD ($n = 8$) were activated in duplicate with TLR-7 (flu) and 9 (CpG-A) ligands for 18 hours in 24-well tissue culture plates. IFN- α production was measured by ELISA and standardized to the percentage of pDC contained in each sample as determined by FACS analysis. The production of IFN- α was adjusted to 1×10^5 pDC. Median values are represented by horizontal lines in each series.



detected in ovarian tumor derived-supernatants, were involved in this pDC dysfunction. The inhibitory role of TGF- β is consistent with a previous study showing that increased intratumoral IFN- α levels correlates with reduced TGF- β 1 in breast cancer patients (33). Moreover, recent reports in mice and human showed that this cytokine contributes to peyer patches, splenic stromal, and tumor environments mediated inhibition of pDC capacity to produce IFN- α (29, 34, 35).

The deleterious prognostic effect of TApDC in ovarian cancer could be related to the alteration of IFN- α production. This cytokine is indeed active against ovarian cancer *in vitro* (36, 37) and *in vivo* (38, 39). Inhibition of IFN- α production by TApDC might confer a selective advantage for ovarian tumors, as IFN- α has direct antitumor activities, by inhibiting tumor cell proliferation and neoangiogenesis, but also by promoting

immunosurveillance through the activation of B cells, NK cells and macrophages (reviewed in reference 40) and inhibiting tumor stem cell-like population (41).

In this study, we observed that both TLR-activated TApDC and ascite pDC were able to induce CD4⁺ T cell proliferation consistently with the acquisition of a fully mature phenotype. Importantly, T cell proliferation induced by TApDC correlated with high IL-10 production, confirming the role of TApDC in inducing immune tolerance in ovarian cancer. Taken together, the differences observed between TApDC and ascite pDC suggest that the role of these immune cells are different and possibly opposite according to the tissue. pDC play a pro-inflammatory role in malignant ascites, whereas they are immunosuppressive in tumors. IFN- α produced primarily from pDC, in addition to having direct antitumoral activity (36, 37), provides an important signal for T helper precursor differentiation

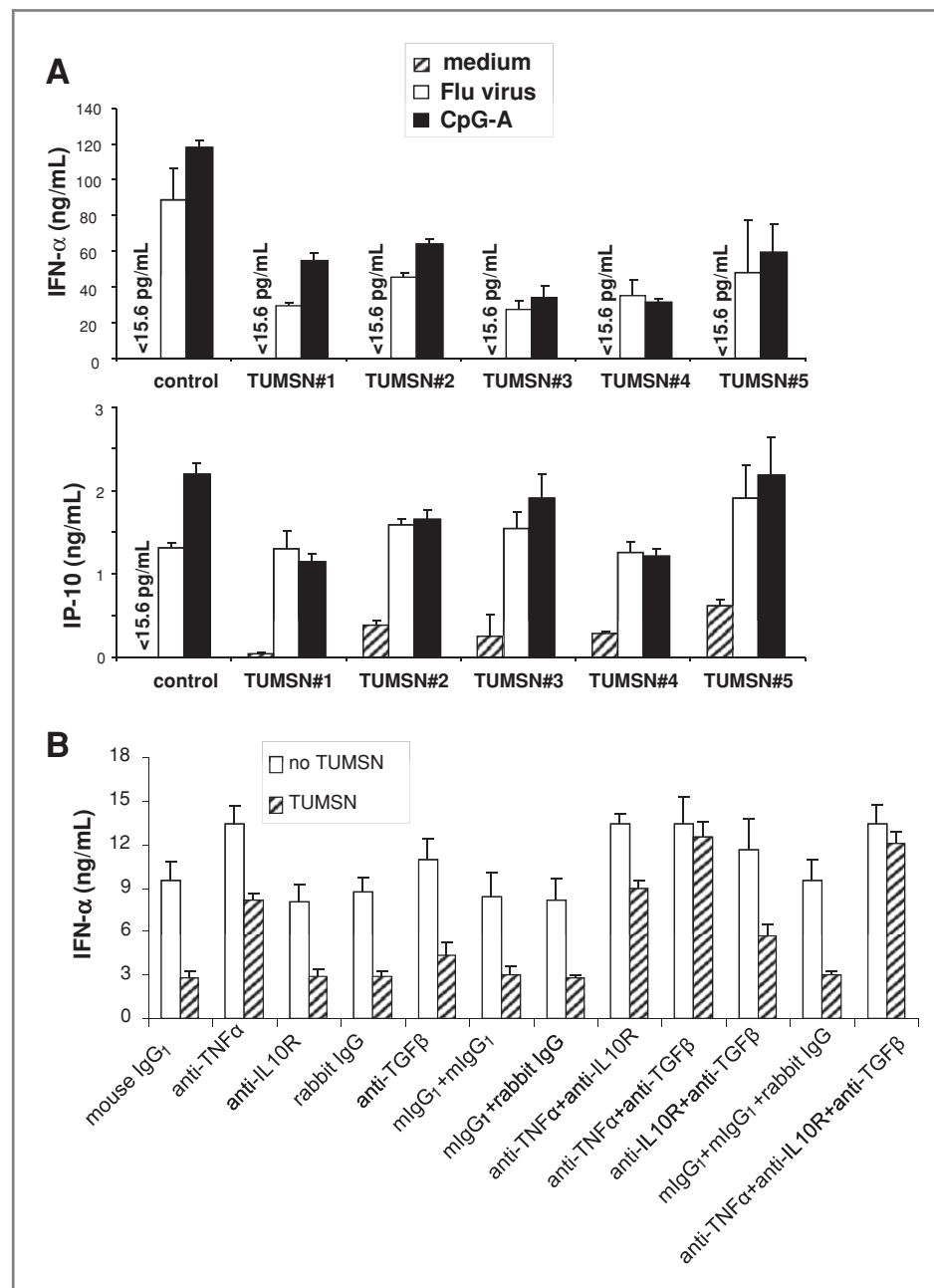


Figure 7. Ovarian tumor microenvironment inhibits IFN- α production by healthy pDC through TGF- β and TNF- α cooperation. Supernatants of single-cell suspensions from ovarian tumors (TUMSN) were collected after 48 hours and frozen. A, purified blood pDC from HD were preincubated with 20 ng/mL IL-3 either alone or with 25% of TUMSN derived from 5 different ovarian cancer patients for 16 hours and then activated or not for another 24 hours with inactivated fu virus (100 HAU/mL) or CpG-A (5 μ g/mL). After 40 hours, the production of IFN- α and IP-10 was measured by ELISA. No IFN- α was detected in media conditions (no TLR activation) and IP-10 was detected in some ovarian tumor-derived supernatants at low levels. B, purified tonsil pDC were preincubated with IL-3 either alone or in combination with 25% of ovarian TUMSN in the presence or absence of specific control isotype antibodies, anti-TNF- α , anti-IL-10 receptor, and anti-TGF- β blocking antibodies (10 μ g/mL) for 16 hours. Flu virus was then added for another 24 hours. IFN- α was measured in culture supernatants by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SD and are representative of 3 independent experiments.

in favor of a T helper type 1 immune response (42). The dramatically decreased secretion of IFN- α by TApDC associated with IL-10 T-cell response would have serious consequences on the induction of efficient antitumoral immune response and explain the deleterious impact of the presence of pDC into tumors. Therefore, tumors may deregulate immunity by attracting and manipulating pDC behaviour.

Our data also clearly show that malignant ascites could not serve as a model for tumor microenvironment in the context of ovarian cancer. Indeed, TApDC and ascite pDC from ovarian cancer patients have clearly distinct phenotype, functions, and impact on survival. Our observations are in agreement with the

work published by Zou and colleagues (14, 21) showing that pDC isolated from malignant ascites are functional in terms of IFN- α production. We further provide here novel information showing that the accumulation of pDC in ascites (up to 10-fold higher than in tumors) had no impact on patients' outcome whereas their presence in tumors was deleterious. Moreover, we showed that TApDC were strongly inhibited for their innate response. Thus, functional inhibition of TApDC is strictly dependent on ovarian tumor microenvironment.

In our study, we found that blood pDC and mDC were significantly decreased compared with HDs, consistent with prior studies in breast (13) and pancreatic cancer (18)

patients. This imbalance in the circulating pDC pool is not just exclusively a finding in cancers, but is also observed in patients with autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (43) and in chronic HIV infections (44, 45). Importantly, during primary HIV infection, numbers of blood pDC and levels of IFN- α production have been shown to be severely reduced, leading to speculation that HIV disease progression may result in part from the failure of pDC to limit viral replication (45–47). Upon initiation of effective antiretroviral therapy in HIV-infected individuals, the levels of pDC have been shown to partially recover (48, 49).

We reported in this work several similarities between ovarian cancer patients and HIV patients. Indeed, we observed severe reduction in blood pDC in patients with advanced stages ovarian cancer, similarly to HIV patients (44, 45, 50), in comparison with those with early stages, and to HDs. We have also shown severe alteration of IFN- α production in TApDC in comparison with HD blood pDC in response to TLR ligands. Similarly, to HIV patients undergoing antiretroviral therapy (48), levels of blood pDC partially recovered in patients undergoing chemotherapy or in CR whereas there was a trend toward decrease levels in patients with progressive disease. Taken together, these data suggest that the solid tumors exert systemic modulatory effects on the immune system, in addition to their effects in the tumor microenvironment. These similarities observed between HIV and ovarian cancer patients suggest similar mechanisms implicated in the disturbance of blood pDC homeostasis in both diseases.

To our knowledge, this work represents the first systematic comparison of pDC phenotype and function in blood, ascites,

and tumors from cancer patients. We showed that pDC's functional alterations occurred in tumors whereas they seem to have a proinflammatory role in malignant ascites. The correlation of TApDC with poor outcome confirms their participation in immune tolerance. Likewise, identifying molecular pathways implicated in the inhibition of IFN- α production by TApDC will help to develop targeted therapies reversing the deleterious role of TApDC in the context of ovarian cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors thank the ovarian cancer patients who consented to participate in this study and to the medical staff from Centre Leon Berard (CLB). We thank Dr. Philippe Gabelle from Clinique des Eaux-Clares, Grenoble, and Dr. Philippe Bouchard from Clinique des Cèdres, Grenoble, for their active participation in this translational research program. We also thank Dr. Philippe Cassier from CLB for his editorial assistance.

Grant Support

This work was supported by institutional grant from Comité départemental du Puy-de-Dôme de la Ligue nationale contre le cancer. S-I. Labidi-Galy is a recipient of a grant Soutien à la formation à la recherche translationnelle en cancérologie from Institut National du cancer (INCa), France.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received February 4, 2011; revised June 1, 2011; accepted June 15, 2011; published OnlineFirst June 22, 2011.

References

1. Society AC. Cancer facts & figures 2007. Atlanta: American Cancer Society;2007.
2. Chan JK, Zhang M, Hu JM, Shin JY, Osann K, Kapp DS. Racial disparities in surgical treatment and survival of epithelial ovarian cancer in United States. *J Surg Oncol* 2008;97:103–7.
3. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165:6037–46.
4. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Aleardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919–23.
5. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, et al. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 2004;16:915–28.
6. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835–7.
7. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275–306.
8. Kamath AT, Sheasby CE, Tough DF. Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN- α and IFN- γ . *J Immunol* 2005;174:767–76.
9. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003;19:225–34.
10. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006;7:652–62.
11. Goubier A, Dubois B, Gheit H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 2008;29:464–75.
12. de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 2004;200:89–98.
13. Sisirak VGM, Renaudineau S, Menetrier-Caux C, Aspori C, Banchereau J, Palucka AK, et al. Breast carcinoma environment inhibits human plasmacytoid dendritic cells functions. In the 10th International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan). 2008.
14. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Herminier A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001;7:1339–46.
15. Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 2003;200:255–68.
16. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003;63:6478–87.
17. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:7466–74.

18. Tjomsland V, Sandstrom P, Spangeus A, Messmer D, Emilsson J, Falkmer U, et al. Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC Cancer* 10:87.
19. Wertel I, Polak G, Bednarek W, Barczynski B, Rolinski J, Kotarski J. Dendritic cell subsets in the peritoneal fluid and peripheral blood of women suffering from ovarian cancer. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:251–58.
20. Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, et al. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64:5535–38.
21. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:5020–6.
22. DR C. Regression model and life tables (with discussion). *JR Stat Soc* 1972;34:187–220.
23. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12551–6.
24. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
25. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009;115:1234–44.
26. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516–21.
27. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219–26.
28. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987–95.
29. Bekerjian-Ding I, Schafer M, Hartmann E, Pries R, Parcina M, Schneider P, et al. Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 2009;128:439–50.
30. Dolganiuc A, Chang S, Kodys K, Mandrekar P, Bakis G, Cormier M, et al. Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* 2006;177:6758–68.
31. Palucka AK, Blanck JP, Bennett L, Pascual V, Banchereau J. Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3372–7.
32. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154–63.
33. Domschke C, Schuetz F, Ge Y, Seibel T, Falk C, Brors B, et al. Intratumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis. *Cancer Res* 2009;69:8420–28.
34. Contractor N, Louten J, Kim L, Biron CA, Kelsall BL. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol* 2007;179:2690–94.
35. Li L, Liu S, Zhang T, Pan W, Yang X, Cao X. Splenic stromal micro-environment negatively regulates virus-activated plasmacytoid dendritic cells through TGF-beta. *J Immunol* 2008;180:2951–56.
36. Epstein LB, Shen JT, Abele JS, Reese CC. Sensitivity of human ovarian carcinoma cells to interferon and other antitumor agents as assessed by an in vitro semi-solid agar technique. *Ann N Y Acad Sci* 1980;350:228–44.
37. Einhorn N, Cantell K, Einhorn S, Strander H. Human leukocyte interferon therapy for advanced ovarian carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1982;5:167–72.
38. Berek JS, Markman M, Blessing JA, Kucera PR, Nelson BE, Anderson B, et al. Intraperitoneal alpha-interferon alternating with cisplatin in residual ovarian carcinoma: a phase II Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1999;74:48–52.
39. Berek JS, Markman M, Stonebraker B, Lentz SS, Adelson MD, DeGeest K, et al. Intraperitoneal interferon-alpha in residual ovarian carcinoma: a phase II gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 1999;75:10–14.
40. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting. *Nat Rev Immunol* 2006;6:836–48.
41. Moserle L, Indraccolo S, Ghisi M, Frasson C, Fortunato E, Canevari S, et al. The side population of ovarian cancer cells is a primary target of IFN-alpha antitumor effects. *Cancer Res* 2008;68:5658–68.
42. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators—a new look. *Immunity* 2001;14:661–4.
43. Robak E, Smolewski P, Wozniacka A, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T. Clinical significance of circulating dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm* 2004;13:171–80.
44. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, Lebon P, Deveau C, Goujard C, et al. Reduced blood CD123⁺ (lymphoid) and CD11c⁺ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001;98:3016–21.
45. Soumelis V, Scott I, Gheys F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001;98:906–12.
46. Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003;187:26–37.
47. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, et al. Loss of blood CD11c⁺ myeloid and CD11c⁺ plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 2001;98:2574–76.
48. Killian MS, Fujimura SH, Hecht FM, Levy JA. Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *Aids* 2006;20:1247–52.
49. Schmidt B, Fujimura SH, Martin JN, Levy JA. Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol* 2006;26:55–64.
50. Feldman S, Stein D, Amrute S, Denny T, Garcia Z, Kloser P, et al. Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 2001;101:201–10.

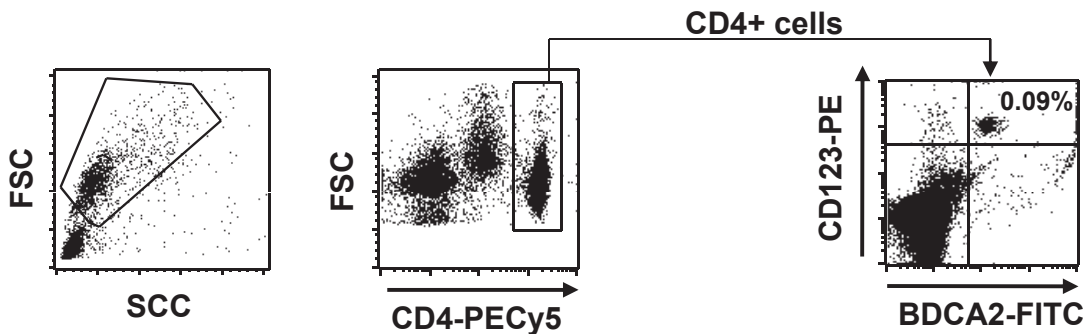
Supplementary figures

- **Figure S1. Identification of pDC and mDC in blood, ascites, and tumors.** A single-cell suspension of freshly resected tumor, malignant ascites, and blood of patients with OC was prepared. (A) pDC were identified as CD4⁺BDCA2⁺CD123⁺ cells. Numbers indicate the frequency of pDC (percentage) among total mononuclear cells of blood, tumor, and ascite single-cell suspensions. Representative FACS analysis showed a higher percentage of pDC in ascite compared to patient blood and tumor. (B) mDC were identified as Lineage-CD4⁺CD11c⁺ cells in the same samples as in (A).
- **Figure S2. TApDC were inhibited for their production of TNF- α , IL-6, MIP-1 β , and RANTES in response to TLR ligands.** FACS-sorted TApDC and ascite pDC were cultured with inactivated flu virus (100 HAU/ml) and CpG-A (5 mg/ml) for 24 h. Levels of (A) TNF- α , IL-6, MIP-1 β , and RANTES and of (B) IP-10 and IL-8 were determined in culture supernatants by multiplex quantification. Data are from 6 different OC patients. Results are compared using Mann-Whitney test. + : extremes; O : outlier. * :< 0.05.
- **Figure S3. TUMSN are more efficient than ASCSN to inhibit IFN- α production by TLR-activated pDC.** Supernatants of single-cell suspensions from ovarian tumors (TUMSN) and ascites (ASCSN) were collected after 48 h and frozen. Purified blood pDC from healthy donors were cultured with 20 ng/ml IL-3 in the presence or not of 25% TUMSN or ASCSN derived from five different OC patients for 16 h before CpG-A (5 mg/ml) was added for another 24 h. After 40 h, IFN- α production was measured by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SD of 4 to 7 independent experiments.
- **Figure S4. Ovarian tumor supernatants contain active TGF- β , IL-10, and TNF- α .** Active TGF- β 1, IL-10, and TNF- α were measured by ELISA in ovarian tumor (TUMSN) and ascite supernatants (ASCSN) from 7 different patients. TNF- α levels were significantly higher in TUMSN than ASCSN. Results are compared using Mann-Whitney test . * :< 0.05.

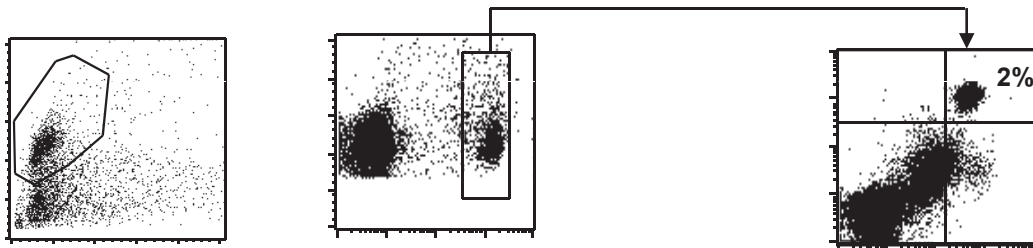
Figure S1

A

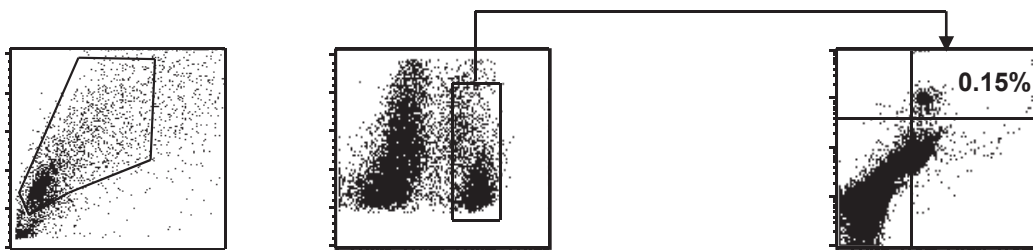
Blood



Ascite

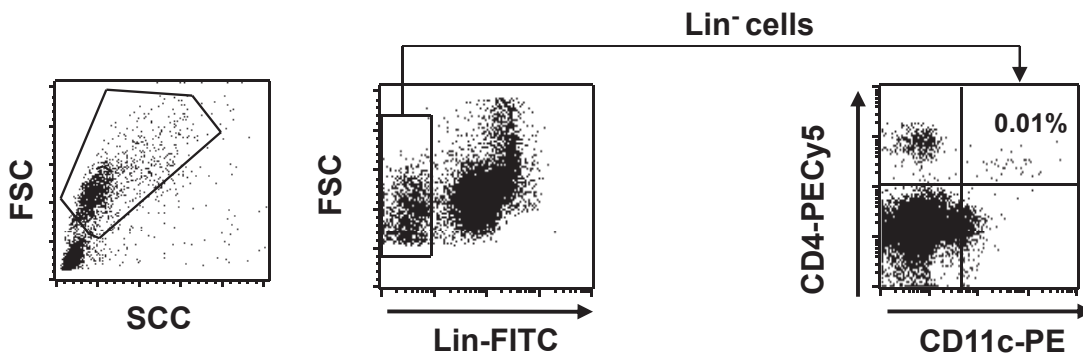


Tumor

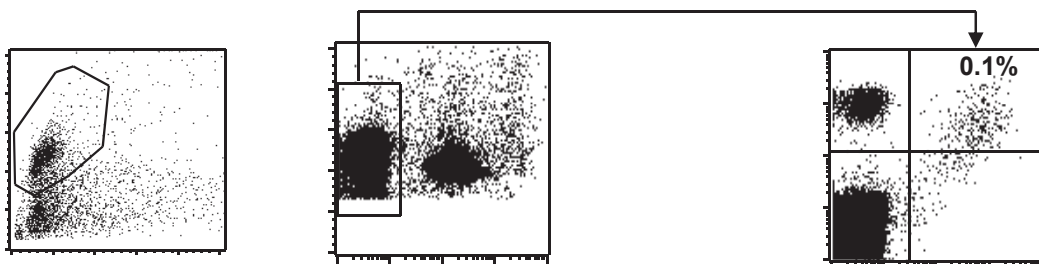


B

Blood



Ascite



Tumor



Figure S2

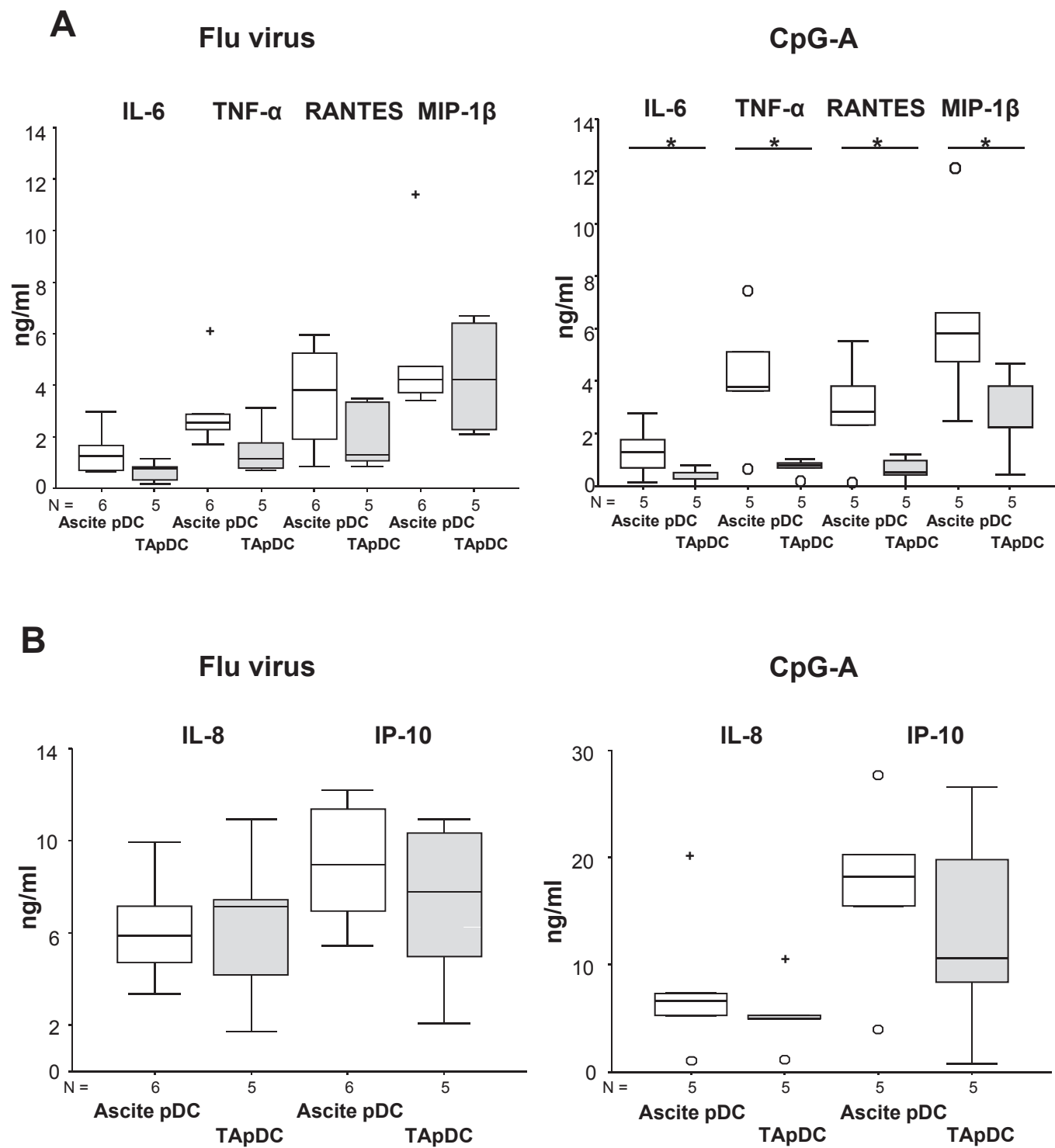


Figure S3

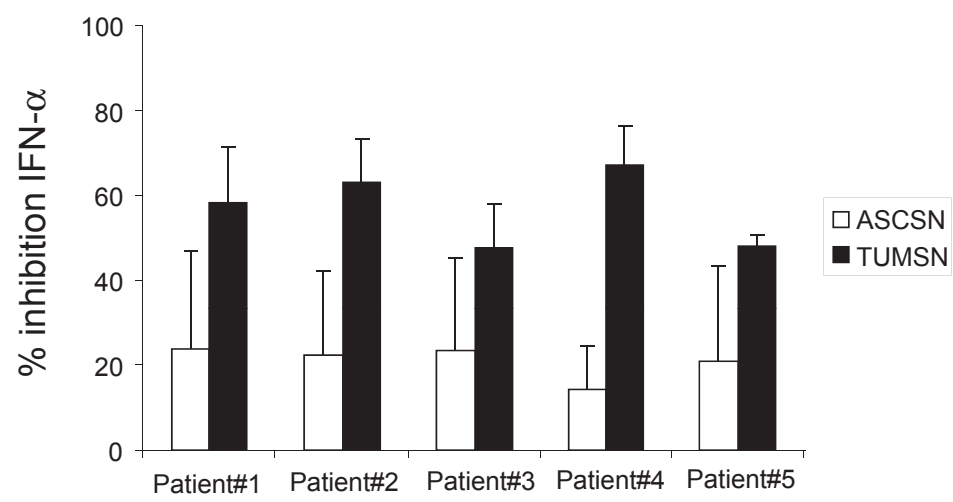
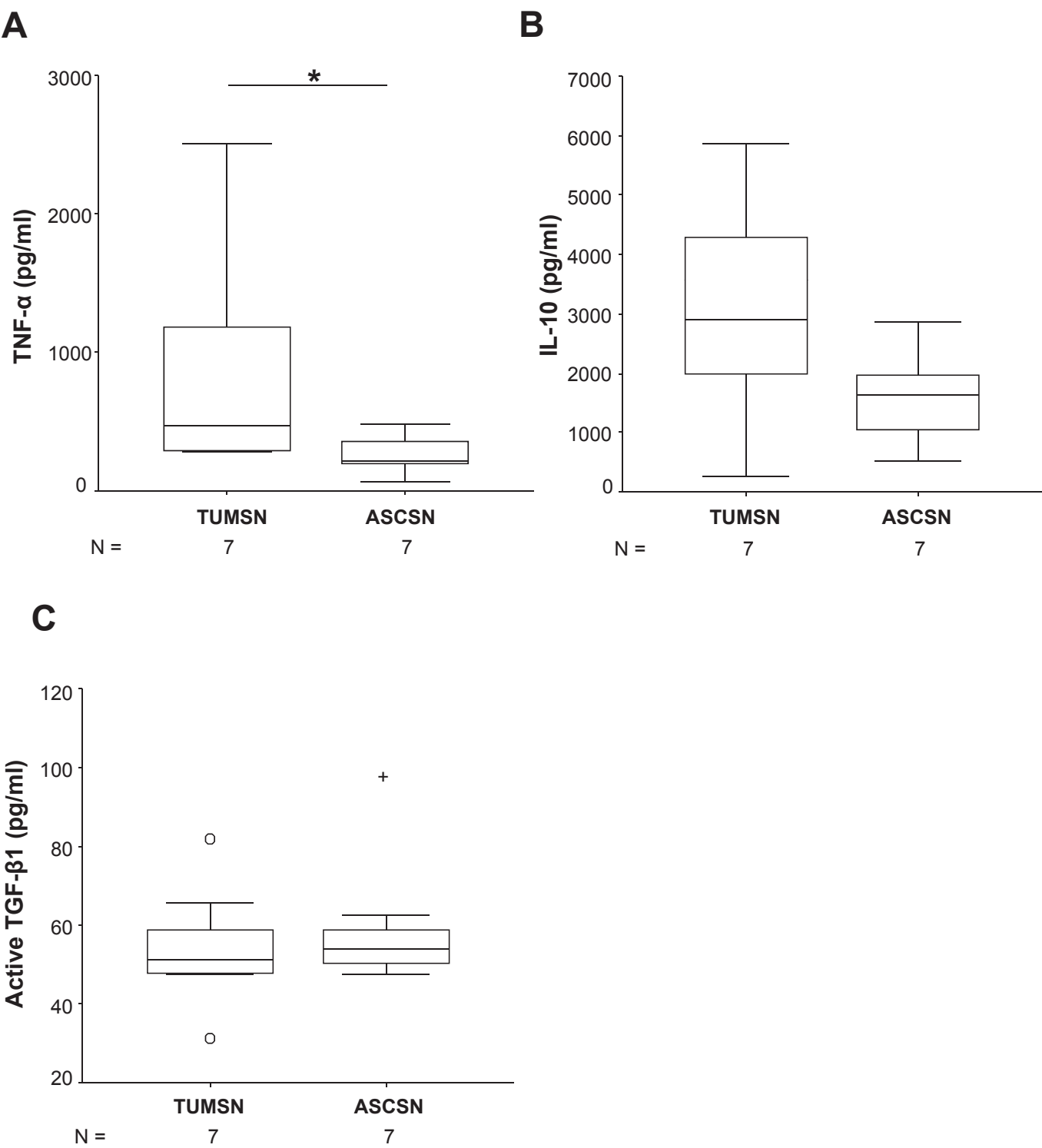


Figure S4



Supplementary tables

- **Table S1. Patient characteristics**
- **Table S2. Univariate and multivariate analysis of prognostic factors associated with progression-free survival.**
PFS=Progression-free survival, NC= Not Computed (no events occurred in the I-II subgroup), HR=Hazard Ratio, CI= Confidence Index.
R Reference item, * = Not computed (no events occurred in the I-II subgroup), **= No value

Table S1

Characteristics	N	%
Number of evaluable patients	44	
Age, years		
Median	67	
Range	26-90	
Stage		
I-II	5	11.4
III-IV	39	88.6
Grade		
1-2	4	13.8
3	25	86.2
Unknown	15	
Histological type		
Papillary serous	33	75
Endometroid	3	7
Mucinous	1	3
Others	7	16
Estrogen Receptor		
Yes	21	70
No	9	30
Unknown	14	
Progesterone Receptor		
Yes	9	30
No	21	70
Unknown	14	
HER-2		
Yes	0	0
No	23	100
Unknown	21	
Involved nodes		
Yes	14	56
No	11	44
Unknown	19	
Debulking surgery		
Yes	25	57
No	19	45
Residual tumor		
Yes	34	78
No	10	22
Progression		
Yes	24	55
No	20	45

Table S2

Explanatory variables	n	Median PFS (months)	UNIVARIATE			MULTIVARIATE		
			HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Age (years)								
≤65 ^R	17	18.4						
>65	27	10.2	2.10	1.89 - 4.95	0.09	0.72	0.17 – 3.01	0.65
PS								
0-1 ^R	29	14.2						
>1	12	9.7	1.86	0.76 - 4.55	0.17	1.57	0.32 – 7.65	0.58
Debulking surgery								
Yes ^R	25	17.9						
No	19	7.2	3.18	1.41 - 7.18	0.005	3.70	1.02 - 13.39	0.046
Stage								
I-II ^R	5	NC*						
III-IV	39	12.4	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Residual tumor								
Absent ^R	10	18.4						
Present	34	10.8	4.0	1.18 - 13.53	0.03	1.73	0.33 – 8.96	0.51
Tumor pDC								
<0.1 ^R	20	18.4						
≥0.1	12	9.7	2.99	1.20 - 7.50	0.02	7.13	2.02 - 25.11	0.002
Ascite pDC								
<1 ^R	23	10.8						
≥1	12	13.6	0.94	0.38 - 2.34	0.89	**	**	**
Tumor mDC								
<0.02 ^R	18	14.1						
≥0.02	12	17.8	0.64	0.23 - 1.77	0.39	**	**	**
Ascite mDC								
<0.13 ^R	21	13.6						
≥0.13	11	**	0.38	0.13 - 1.16	0.09	**	**	**

11 Bibliographie

Adotevi,O., Pere,H., Ravel,P., Haicheur,N., Badoual,C., Merillon,N., Medioni,J., Peyrard,S., Roncelin,S., Verkarre,V., Mejean,A., Fridman,W.H., Oudard,S., and Tartour,E. (2010). A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J. Immunother.* 33, 991-998.

Aharinejad,S., Paulus,P., Sioud,M., Hofmann,M., Zins,K., Schafer,R., Stanley,E.R., and Abraham,D. (2004). Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res.* 64, 5378-5384.

Akin,Y., Koksoy,S., Yucel,S., Erdogan,T., and Baykara,M. (2011). Increased peripheral CD4+CD25^{high} Treg in prostate cancer patients is correlated with PSA. *Saudi. Med. J.* 32, 1003-1008.

Almand,B. and Carbone,D.P. (2001). Biological considerations in lung cancer. *Cancer Treat. Res.* 105, 1-30.

Andre,F., Domont,J., and Delaloge,S. (2007). What can breast cancer molecular sub-classification add to conventional diagnostic tools? *Ann. Oncol.* 18 Suppl 9, ix33-ix36.

Annes,J.P., Chen,Y., Munger,J.S., and Rifkin,D.B. (2004). Integrin α V β 6-mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1. *J. Cell Biol.* 165, 723-734.

Anz,D., Eiber,S., Scholz,C., Endres,S., Kirchner,T., Bourquin,C., and Mayr,D. (2011). In breast cancer, a high ratio of tumour-infiltrating intraepithelial CD8⁺ to FoxP3⁺ cells is characteristic for the medullary subtype. *Histopathology* 59, 965-974.

Asano,M., Toda,M., Sakaguchi,N., and Sakaguchi,S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* 184, 387-396.

Ashour,H.M. and Niederkorn,J.Y. (2006). Gammadelta T cells promote anterior chamber-associated immune deviation and immune privilege through their production of IL-10. *J. Immunol.* 177, 8331-8337.

Aspord,C., Pedroza-Gonzalez,A., Gallegos,M., Tindle,S., Burton,E.C., Su,D., Marches,F., Banchereau,J., and Palucka,A.K. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4⁺ T cells that facilitate tumor development. *J. Exp. Med.* 204, 1037-1047.

Audia,S., Nicolas,A., Cathelin,D., Larmonier,N., Ferrand,C., Foucher,P., Fanton,A., Bergoin,E., Maynadie,M., Arnould,L., Bateman,A., Lorcerie,B., Solary,E., Chauffert,B., and Bonnotte,B. (2007). Increase of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4⁺ CD25⁺ T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 150, 523-530.

Aymeric,L., Apetoh,L., Ghiringhelli,F., Tesniere,A., Martins,I., Kroemer,G., Smyth,M.J., and Zitvogel,L. (2010). Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res.* 70, 855-858.

Babusikova,O., Novotna,L., Schnekova,K., Turkova,D., and Havrankova,M. (1976). T and B lymphocytes in malignant melanoma patients. *Neoplasma* 23, 635-644.

Bachem,A., Guttler,S., Hartung,E., Ebstein,F., Schaefer,M., Tannert,A., Salama,A., Movassaghi,K., Opitz,C., Mages,H.W., Henn,V., Kloetzel,P.M., Gurka,S., and KroczeK,R.A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1273-1281.

Bachem,A., Hartung,E., Guttler,S., Mora,A., Zhou,X., Hegemann,A., Plantinga,M., Mazzini,E., Stoitzner,P., Gurka,S., Henn,V., Mages,H.W., and KroczeK,R.A. (2012). Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol.* 3, 214.

Baecher-Allan,C., Brown,J.A., Freeman,G.J., and Hafler,D.A. (2001). CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167, 1245-1253.

Baek,S., Kim,C.S., Kim,S.B., Kim,Y.M., Kwon,S.W., Kim,Y., Kim,H., and Lee,H. (2011). Combination therapy of renal cell carcinoma or breast cancer patients with dendritic cell vaccine and IL-2: results from a phase I/II trial. *J. Transl. Med.* 9, 178.

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

Barzaghi,F., Passerini,L., Gambineri,E., Ciullini,M.S., Cornu,T., Kang,E.S., Choe,Y.H., Cancrini,C., Corrente,S., Ciccocioppo,R., Cecconi,M., Zuin,G., Discepolo,V., Sartirana,C., Schmidtko,J., Ikcinciogullari,A., Ambrosi,A., Roncarolo,M.G., Olek,S., and Bacchetta,R. (2012). Demethylation analysis of the FOXP3 locus shows quantitative defects of regulatory T cells in IPEX-like syndrome. *J. Autoimmun.* 38, 49-58.

Bates,G.J., Fox,S.B., Han,C., Leek,R.D., Garcia,J.F., Harris,A.L., and Banham,A.H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* 24, 5373-5380.

Bayry,J., Tchilian,E.Z., Davies,M.N., Forbes,E.K., Draper,S.J., Kaveri,S.V., Hill,A.V., Kazatchkine,M.D., Beverley,P.C., Flower,D.R., and Tough,D.F. (2008). In silico identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 10221-10226.

Bayry,J., Triebel,F., Kaveri,S.V., and Tough,D.F. (2007). Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 178, 4184-4193.

Beavis,P.A., Stagg,J., Darcy,P.K., and Smyth,M.J. (2012). CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 33, 231-237.

Beckhove,P., Feuerer,M., Dolenc,M., Schuetz,F., Choi,C., Sommerfeldt,N., Schwendemann,J., Ehlert,K., Altevogt,P., Bastert,G., Schirmmacher,V., and Umansky,V. (2004). Specifically activated

memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J. Clin. Invest* 114, 67-76.

Bekaii-Saab,T.S., Roda,J.M., Guenterberg,K.D., Ramaswamy,B., Young,D.C., Ferketich,A.K., Lamb,T.A., Grever,M.R., Shapiro,C.L., and Carson,W.E., III (2009). A phase I trial of paclitaxel and trastuzumab in combination with interleukin-12 in patients with HER2/neu-expressing malignancies. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2983-2991.

Bekeredjian-Ding,I., Schafer,M., Hartmann,E., Pries,R., Parcina,M., Schneider,P., Giese,T., Endres,S., Wollenberg,B., and Hartmann,G. (2009). Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128, 439-450.

Bell,D., Chomarat,P., Broyles,D., Netto,G., Harb,G.M., Lebecque,S., Valladeau,J., Davoust,J., Palucka,K.A., and Banchereau,J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J. Exp. Med.* 190, 1417-1426.

Ben-Baruch,A. (2006). Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin. Cancer Biol.* 16, 38-52.

Bennett,C.L., Christie,J., Ramsdell,F., Brunkow,M.E., Ferguson,P.J., Whitesell,L., Kelly,T.E., Saulsbury,F.T., Chance,P.F., and Ochs,H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20-21.

Beres,A., Komorowski,R., Mihara,M., and Drobyski,W.R. (2011). Instability of Foxp3 expression limits the ability of induced regulatory T cells to mitigate graft versus host disease. *Clin. Cancer Res.* 17, 3969-3983.

Bergmann,C., Strauss,L., Zeidler,R., Lang,S., and Whiteside,T.L. (2007). Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 67, 8865-8873.

Berin,M.C., Dwinell,M.B., Eckmann,L., and Kagnoff,M.F. (2001). Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 280, G1217-G1226.

Beriou,G., Bradshaw,E.M., Lozano,E., Costantino,C.M., Hastings,W.D., Orban,T., Elyaman,W., Khoury,S.J., Kuchroo,V.K., Baecher-Allan,C., and Hafler,D.A. (2010). TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J. Immunol.* 185, 46-54.

Beriou,G., Costantino,C.M., Ashley,C.W., Yang,L., Kuchroo,V.K., Baecher-Allan,C., and Hafler,D.A. (2009). IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 113, 4240-4249.

Bertin-Maghit,S., Pang,D., O'Sullivan,B., Best,S., Duggan,E., Paul,S., Thomas,H., Kay,T.W., Harrison,L.C., Steptoe,R., and Thomas,R. (2011). Interleukin-1beta produced in response to islet autoantigen presentation differentiates T-helper 17 cells at the expense of regulatory T-cells: Implications for the timing of tolerizing immunotherapy. *Diabetes* 60, 248-257.

Bhagat,G., Naiyer,A.J., Shah,J.G., Harper,J., Jabri,B., Wang,T.C., Green,P.H., and Manavalan,J.S. (2008). Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J. Clin. Invest* 118, 281-293.

Bigley,V., Haniffa,M., Doulatov,S., Wang,X.N., Dickinson,R., McGovern,N., Jardine,L., Pagan,S., Dimmick,I., Chua,I., Wallis,J., Lordan,J., Morgan,C., Kumararatne,D.S., Doffinger,R., van der Burg,M., van,D.J., Cant,A., Dick,J.E., Hambleton,S., and Collin,M. (2011). The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.* *208*, 227-234.

Birnberg,T., Bar-On,L., Sapoznikov,A., Caton,M.L., Cervantes-Barragan,L., Makia,D., Krauthgamer,R., Brenner,O., Ludewig,B., Brockschneider,D., Riethmacher,D., Reizis,B., and Jung,S. (2008). Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity.* *29*, 986-997.

Blake-Mortimer,J.S., Sephton,S.E., Carlson,R.W., Stites,D., and Spiegel,D. (2004). Cytotoxic T lymphocyte count and survival time in women with metastatic breast cancer. *Breast J.* *10*, 195-199.

Blomberg,S., Eloranta,M.L., Magnusson,M., Alm,G.V., and Ronnblom,L. (2003). Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *48*, 2524-2532.

Boasso,A. and Shearer,G.M. (2007). How does indoleamine 2,3-dioxygenase contribute to HIV-mediated immune dysregulation. *Curr. Drug Metab* *8*, 217-223.

Bodor,J., Feigenbaum,L., Bodorova,J., Bare,C., Reitz,M.S., Jr., and Gress,R.E. (2001). Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J. Leukoc. Biol.* *69*, 1053-1059.

Boissonnas,A., Scholer-Dahirel,A., Simon-Blancal,V., Pace,L., Valet,F., Kissenpfennig,A., Sparwasser,T., Malissen,B., Fetler,L., and Amigorena,S. (2010). Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity.* *32*, 266-278.

Boks,M.A., Kager-Groenland,J.R., Haasjes,M.S., Zwaginga,J.J., van Ham,S.M., and ten,B.A. (2012). IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin. Immunol.* *142*, 332-342.

Bonneville,M., O'Brien,R.L., and Born,W.K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 467-478.

Bopp,T., Radsak,M., Schmitt,E., and Schild,H. (2010). New strategies for the manipulation of adaptive immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 1443-1448.

Borsellino,G., Kleinewietfeld,M., Di,M.D., Sternjak,A., Diamantini,A., Giometto,R., Hopner,S., Centonze,D., Bernardi,G., Dell'Acqua,M.L., Rossini,P.M., Battistini,L., Rotzschke,O., and Falk,K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* *110*, 1225-1232.

Brahmer,J.R., Tykodi,S.S., Chow,L.Q., Hwu,W.J., Topalian,S.L., Hwu,P., Drake,C.G., Camacho,L.H., Kauh,J., Odunsi,K., Pitot,H.C., Hamid,O., Bhatia,S., Martins,R., Eaton,K., Chen,S., Salay,T.M., Alaparthi,S., Grosso,J.F., Korman,A.J., Parker,S.M., Agrawal,S., Goldberg,S.M., Pardoll,D.M., Gupta,A., and Wigginton,J.M. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2455-2465.

Bresson,D., Togher,L., Rodrigo,E., Chen,Y., Bluestone,J.A., Herold,K.C., and von,H.M. (2006). Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *J. Clin. Invest* *116*, 1371-1381.

- Bronkhorst,I.H., Ly,L.V., Jordanova,E.S., Vrolijk,J., Versluis,M., Luyten,G.P., and Jager,M.J. (2011). Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 643-650.
- Bruder,D., Probst-Kepper,M., Westendorf,A.M., Geffers,R., Beissert,S., Loser,K., von,B.H., Buer,J., and Hansen,W. (2004). Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 623-630.
- Brunkow,M.E., Jeffery,E.W., Hjerrild,K.A., Paeper,B., Clark,L.B., Yasayko,S.A., Wilkinson,J.E., Galas,D., Ziegler,S.F., and Ramsdell,F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68-73.
- Burchill,M.A., Yang,J., Vang,K.B., and Farrar,M.A. (2007). Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol. Lett.* 114, 1-8.
- Burmeister,Y., Lischke,T., Dahler,A.C., Mages,H.W., Lam,K.P., Coyle,A.J., Kroczeck,R.A., and Hutloff,A. (2008). ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J. Immunol.* 180, 774-782.
- Busse,A., Asemissen,A.M., Nonnenmacher,A., Braun,F., Ochsenreither,S., Stather,D., Fusi,A., Schmittl,A., Miller,K., Thiel,E., and Keilholz,U. (2011). Immunomodulatory effects of sorafenib on peripheral immune effector cells in metastatic renal cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* 47, 690-696.
- Busse,M., Krech,M., Meyer-Bahlburg,A., Hennig,C., and Hansen,G. (2012a). ICOS mediates the generation and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells conveying respiratory tolerance. *J. Immunol.* 189, 1975-1982.
- Busse,M., Krech,M., Meyer-Bahlburg,A., Hennig,C., and Hansen,G. (2012b). ICOS mediates the generation and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells conveying respiratory tolerance. *J. Immunol.* 189, 1975-1982.
- Calderwood,S.K. (2012). HSF1, a versatile factor in tumorogenesis. *Curr. Mol. Med.*
- Camisaschi,C., Casati,C., Rini,F., Perego,M., De,F.A., Triebel,F., Parmiani,G., Belli,F., Rivoltini,L., and Castelli,C. (2010). LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J. Immunol.* 184, 6545-6551.
- Campbell,M.J., Tonlaar,N.Y., Garwood,E.R., Huo,D., Moore,D.H., Khramtsov,A.I., Au,A., Baehner,F., Chen,Y., Malaka,D.O., Lin,A., Adeyanju,O.O., Li,S., Gong,C., McGrath,M., Olopade,O.I., and Esserman,L.J. (2011). Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* 128, 703-711.
- Cao,W. and Bover,L. (2010). Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234, 163-176.
- Cao,X., Cai,S.F., Fehniger,T.A., Song,J., Collins,L.I., Piwnica-Worms,D.R., and Ley,T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 27, 635-646.

Caramalho,I., Lopes-Carvalho,T., Ostler,D., Zelenay,S., Haury,M., and Demengeot,J. (2003). Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 197, 403-411.

Carrier,Y., Yuan,J., Kuchroo,V.K., and Weiner,H.L. (2007a). Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J. Immunol.* 178, 179-185.

Carrier,Y., Yuan,J., Kuchroo,V.K., and Weiner,H.L. (2007b). Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J. Immunol.* 178, 172-178.

Castellana,D., Kunzelmann,C., and Freyssinet,J.M. (2009). Pathophysiologic significance of procoagulant microvesicles in cancer disease and progression. *Hamostaseologie.* 29, 51-57.

Caux,C., Dezutter-Dambuyant,C., Schmitt,D., and Banchereau,J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-261.

Caux,C., Massacrier,C., Vanbervliet,B., Barthelemy,C., Liu,Y.J., and Banchereau,J. (1994). Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int. Immunol.* 6, 1177-1185.

Cella,M., Jarrossay,D., Facchetti,F., Alebardi,O., Nakajima,H., Lanzavecchia,A., and Colonna,M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5, 919-923.

Chalmin,F., Mignot,G., Bruchard,M., Chevriaux,A., Vegran,F., Hichami,A., Ladoire,S., Derangere,V., Vincent,J., Masson,D., Robson,S.C., Eberl,G., Pallandre,J.R., Borg,C., Ryffel,B., Apetoh,L., Rebe,C., and Ghiringhelli,F. (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity.* 36, 362-373.

Chang,D.K., Sui,J., Geng,S., Muvaffak,A., Bai,M., Fuhlbrigge,R.C., Lo,A.S., Yammanuru,A., Hubbard,L., Sheehan,J., Campbell,J.J., Zhu,Q., Kupper,T.S., and Marasco,W.A. (2012). Humanization of an anti-CCR4 antibody that kills Cutaneous T Cell Lymphoma cells and abrogates suppression by T regulatory cells. *Mol. Cancer Ther.*

Chang,J.H., Kim,Y.J., Han,S.H., and Kang,C.Y. (2009). IFN-gamma-STAT1 signal regulates the differentiation of inducible Treg: potential role for ROS-mediated apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 39, 1241-1251.

Charles,J., Di,D.J., Salameire,D., Bendriss-Vermare,N., Aspod,C., Muhammad,R., Lefebvre,C., Plumas,J., Leccia,M.T., and Chaperot,L. (2010). Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor. *J. Invest Dermatol.* 130, 1646-1656.

Cheever,M.A., Allison,J.P., Ferris,A.S., Finn,O.J., Hastings,B.M., Hecht,T.T., Mellman,I., Prindiville,S.A., Viner,J.L., Weiner,L.M., and Matrisian,L.M. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.* 15, 5323-5337.

Chen,C.A., Ho,C.M., Chang,M.C., Sun,W.Z., Chen,Y.L., Chiang,Y.C., Syu,M.H., Hsieh,C.Y., and Cheng,W.F. (2010). Metronomic chemotherapy enhances antitumor effects of cancer vaccine by

depleting regulatory T lymphocytes and inhibiting tumor angiogenesis. *Mol. Ther.* **18**, 1233-1243.

Chen,H., Liakou,C.I., Kamat,A., Pettaway,C., Ward,J.F., Tang,D.N., Sun,J., Jungbluth,A.A., Troncso,P., Logothetis,C., and Sharma,P. (2009). Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOShi T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 2729-2734.

Chen,K.J., Lin,S.Z., Zhou,L., Xie,H.Y., Zhou,W.H., Taki-Eldin,A., and Zheng,S.S. (2011). Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis. *PLoS. One.* **6**, e24671.

Chen,M.L., Yan,B.S., Bando,Y., Kuchroo,V.K., and Weiner,H.L. (2008). Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **180**, 7327-7337.

Chen,W., Bluestone,J.A., and Herold,K.C. (2005). Achieving antigen-specific tolerance in diabetes: regulating specifically. *Int. Rev. Immunol.* **24**, 287-305.

Chen,W., Jin,W., Hardegen,N., Lei,K.J., Li,L., Marinos,N., McGrady,G., and Wahl,S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+. *J. Exp. Med.* **198**, 1875-1886.

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

Choi,Y.S., Kageyama,R., Eto,D., Escobar,T.C., Johnston,R.J., Monticelli,L., Lao,C., and Crotty,S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity.* **34**, 932-946.

Chung,F.T., Lee,K.Y., Wang,C.W., Heh,C.C., Chan,Y.F., Chen,H.W., Kuo,C.H., Feng,P.H., Lin,T.Y., Wang,C.H., Chou,C.L., Chen,H.C., Lin,S.M., and Kuo,H.P. (2012). Tumor-associated macrophages correlate with response to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* **131**, E227-E235.

Clayton,A., Mitchell,J.P., Court,J., Linnane,S., Mason,M.D., and Tabi,Z. (2008). Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J. Immunol.* **180**, 7249-7258.

Clifford,G.M., Polesel,J., Rickenbach,M., Dal,M.L., Keiser,O., Kofler,A., Rapiti,E., Levi,F., Jundt,G., Fisch,T., Bordonni,A., De,W.D., and Franceschi,S. (2005). Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 425-432.

Cobb,B.S., Hertweck,A., Smith,J., O'Connor,E., Graf,D., Cook,T., Smale,S.T., Sakaguchi,S., Livesey,F.J., Fisher,A.G., and Merckenschlager,M. (2006). A role for Dicer in immune regulation. *J. Exp. Med.* **203**, 2519-2527.

Coffer,P.J. and Burgering,B.M. (2004). Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 889-899.

Cohen,A.D., Diab,A., Perales,M.A., Wolchok,J.D., Rizzuto,G., Merghoub,T., Huggins,D., Liu,C., Turk,M.J., Restifo,N.P., Sakaguchi,S., and Houghton,A.N. (2006). Agonist anti-GITR antibody

enhances vaccine-induced CD8(+) T-cell responses and tumor immunity. *Cancer Res.* 66, 4904-4912.

Collin,M., Bigley,V., Haniffa,M., and Hambleton,S. (2011). Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat. Rev. Immunol.* 11, 575-583.

Collison,L.W., Chaturvedi,V., Henderson,A.L., Giacomini,P.R., Guy,C., Bankoti,J., Finkelstein,D., Forbes,K., Workman,C.J., Brown,S.A., Rehg,J.E., Jones,M.L., Ni,H.T., Artis,D., Turk,M.J., and Vignali,D.A. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* 11, 1093-1101.

Collison,L.W., Delgoffe,G.M., Guy,C.S., Vignali,K.M., Chaturvedi,V., Fairweather,D., Satoskar,A.R., Garcia,K.C., Hunter,C.A., Drake,C.G., Murray,P.J., and Vignali,D.A. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat. Immunol.* 13, 290-299.

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

Conrad,C., Gregorio,J., Wang,Y.H., Ito,T., Meller,S., Hanabuchi,S., Anderson,S., Atkinson,N., Ramirez,P.T., Liu,Y.J., Freedman,R., and Gilliet,M. (2012). Plasmacytoid Dendritic Cells Promote Immunosuppression in Ovarian Cancer via ICOS Costimulation of Foxp3+ T-Regulatory Cells. *Cancer Res.* 72, 5240-5249.

Correale,P., Rotundo,M.S., Del Vecchio,M.T., Remondo,C., Migali,C., Ginanneschi,C., Tsang,K.Y., Licchetta,A., Mannucci,S., Loiacono,L., Tassone,P., Francini,G., and Tagliaferri,P. (2010). Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemioimmunotherapy. *J. Immunother.* 33, 435-441.

Coussens,L.M. and Pollard,J.W. (2011). Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.

Coventry,B.J. and Morton,J. (2003). CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer. *Br. J. Cancer* 89, 533-538.

Coyle,A.J., Lehar,S., Lloyd,C., Tian,J., Delaney,T., Manning,S., Nguyen,T., Burwell,T., Schneider,H., Gonzalo,J.A., Gosselin,M., Owen,L.R., Rudd,C.E., and Gutierrez-Ramos,J.C. (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity.* 13, 95-105.

Crellin,N.K., Garcia,R.V., Hadisfar,O., Allan,S.E., Steiner,T.S., and Levings,M.K. (2005). Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 175, 8051-8059.

Curiel,T.J. (2008). Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 241-246.

Curiel,T.J., Coukos,G., Zou,L., Alvarez,X., Cheng,P., Mottram,P., Evdemon-Hogan,M., Conejo-Garcia,J.R., Zhang,L., Burow,M., Zhu,Y., Wei,S., Kryczek,I., Daniel,B., Gordon,A., Myers,L., Lackner,A., Disis,M.L., Knutson,K.L., Chen,L., and Zou,W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10, 942-949.

Curotto de Lafaille,M.A., Kutchukhidze,N., Shen,S., Ding,Y., Yee,H., and Lafaille,J.J. (2008). Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*. 29, 114-126.

Dalton,J.E., Howell,G., Pearson,J., Scott,P., and Carding,S.R. (2004). Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J. Immunol*. 173, 3660-3667.

Danaei,G., Vander,H.S., Lopez,A.D., Murray,C.J., and Ezzati,M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366, 1784-1793.

Darrasse-Jeze,G., Deroubaix,S., Mouquet,H., Victora,G.D., Eisenreich,T., Yao,K.H., Masilamani,R.F., Dustin,M.L., Rudensky,A., Liu,K., and Nussenzweig,M.C. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med*. 206, 1853-1862.

Davies,M.N., Bayry,J., Tchilian,E.Z., Vani,J., Shaila,M.S., Forbes,E.K., Draper,S.J., Beverley,P.C., Tough,D.F., and Flower,D.R. (2009). Toward the discovery of vaccine adjuvants: coupling in silico screening and in vitro analysis of antagonist binding to human and mouse CCR4 receptors. *PLoS One*. 4, e8084.

de Kruijf,E.M., Sajet,A., van Nes,J.G., Putter,H., Smit,V.T., Eagle,R.A., Jafferji,I., Trowsdale,J., Liefers,G.J., van de Velde,C.J., and Kuppen,P.J. (2012). NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer* 12, 24.

de Vries,I.J., Castelli,C., Huygens,C., Jacobs,J.F., Stockis,J., Schuler-Thurner,B., Adema,G.J., Punt,C.J., Rivoltini,L., Schuler,G., Coulie,P.G., and Lucas,S. (2011). Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clin. Cancer Res*. 17, 841-848.

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

Della,P.G., Canevari,S., and Fossati,G. (1973). Immune responses to tumour and embryo cells in patients with mammary carcinoma. *Br. J. Cancer Suppl* 1, 103-107.

Desar,I.M., Jacobs,J.F.M., Hulsbergen-vandeKaa,C.A., Oyen,W.J., Mulders,P.F., van der Graaf,W.T., Adema,G.J., van Herpen,C.M., and de Vries,I.J. (2011). Sorafenib reduces the percentage of tumour infiltrating regulatory T cells in renal cell carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 129, 507-512.

Dewan,M.Z., Terunuma,H., Ahmed,S., Ohba,K., Takada,M., Tanaka,Y., Toi,M., and Yamamoto,N. (2005). Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed. Pharmacother*. 59 Suppl 2, S375-S379.

Dhodapkar,M.V. and Steinman,R.M. (2002). Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 100, 174-177.

Dhodapkar,M.V., Steinman,R.M., Krasovsky,J., Munz,C., and Bhardwaj,N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193, 233-238.

Diamond,M.S., Kinder,M., Matsushita,H., Mashayekhi,M., Dunn,G.P., Archambault,J.M., Lee,H., Arthur,C.D., White,J.M., Kalinke,U., Murphy,K.M., and Schreiber,R.D. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* 208, 1989-2003.

Diaz-Montero,C.M., Salem,M.L., Nishimura,M.I., Garrett-Mayer,E., Cole,D.J., and Montero,A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 49-59.

Ding,C., Cai,Y., Marroquin,J., Ildstad,S.T., and Yan,J. (2009). Plasmacytoid dendritic cells regulate autoreactive B cell activation via soluble factors and in a cell-to-cell contact manner. *J. Immunol.* 183, 7140-7149.

Ding,Y., Xu,J., and Bromberg,J.S. (2012). Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol.* 33, 174-180.

DiPaolo,R.J., Glass,D.D., Bijwaard,K.E., and Shevach,E.M. (2005). CD4+CD25+ T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. *J. Immunol.* 175, 7135-7142.

Doll,R. and Kinlen,L. (1970). Immunosurveillance and cancer: epidemiological evidence. *Br. Med. J.* 4, 420-422.

Domschke,C., Schuetz,F., Ge,Y., Seibel,T., Falk,C., Brors,B., Vlodavsky,I., Sommerfeldt,N., Sinn,H.P., Kuhnle,M.C., Schneeweiss,A., Scharf,A., Sohn,C., Schirmacher,V., Moldenhauer,G., Momburg,F., and Beckhove,P. (2009). Intratumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis. *Cancer Res.* 69, 8420-8428.

Dougan,M. and Dranoff,G. (2009). The immune response to tumors. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 20*, Unit.

Douglas-Jones,A.G., Morgan,J.M., Appleton,M.A., Attanoos,R.L., Caslin,A., Champ,C.S., Cotter,M., Dallimore,N.S., Dawson,A., Fortt,R.W., Griffiths,A.P., Hughes,M., Kitching,P.A., O'Brien,C., Rashid,A.M., Stock,D., Verghese,A., Williams,D.W., Williams,N.W., and Williams,S. (2000). Consistency in the observation of features used to classify duct carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *J. Clin. Pathol.* 53, 596-602.

Drechsler,Y., Dolganiuc,A., Norkina,O., Romics,L., Li,W., Kodys,K., Bach,F.H., Mandrekar,P., and Szabo,G. (2006). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of acute alcohol on IL-10 induction involving p38 MAPK activation in monocytes. *J. Immunol.* 177, 2592-2600.

Drobits,B., Holcmann,M., Amberg,N., Swiecki,M., Grundtner,R., Hammer,M., Colonna,M., and Sibilio,M. (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J. Clin. Invest* 122, 575-585.

Dunn,G.P., Bruce,A.T., Ikeda,H., Old,L.J., and Schreiber,R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991-998.

Dunn,G.P., Bruce,A.T., Sheehan,K.C., Shankaran,V., Uppaluri,R., Bui,J.D., Diamond,M.S., Koebel,C.M., Arthur,C., White,J.M., and Schreiber,R.D. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* 6, 722-729.

Dunn,G.P., Old,L.J., and Schreiber,R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 21, 137-148.

DuPage,M., Cheung,A.F., Mazumdar,C., Winslow,M.M., Bronson,R., Schmidt,L.M., Crowley,D., Chen,J., and Jacks,T. (2011). Endogenous T cell responses to antigens expressed in lung adenocarcinomas delay malignant tumor progression. *Cancer Cell* 19, 72-85.

Dutcher,J. (2002). Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma. *Oncology (Williston. Park)* 16, 4-10.

Elpek,K.G., Yolcu,E.S., Franke,D.D., Lacelle,C., Schabowsky,R.H., and Shirwan,H. (2007). Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J. Immunol.* 179, 7295-7304.

Enk,A.H. (2005). Dendritic cells in tolerance induction. *Immunol. Lett.* 99, 8-11.

Ercan,C., van Diest,P.J., van der Ende,B., Hinrichs,J., Bult,P., Buerger,H., van der Wall,E., and Derksen,P.W. (2012). p53 mutations in classic and pleomorphic invasive lobular carcinoma of the breast. *Cell Oncol. (Dordr.)* 35, 111-118.

Erfani,N., Mehrabadi,S.M., Ghayumi,M.A., Haghshenas,M.R., Mojtahedi,Z., Ghaderi,A., and Amani,D. (2012). Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 77, 306-311.

Ezzelarab,M. and Thomson,A.W. (2011). Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin. Immunol.* 23, 252-263.

Fadok,V.A., Bratton,D.L., Konowal,A., Freed,P.W., Westcott,J.Y., and Henson,P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest* 101, 890-898.

Fallarino,F., Asselin-Paturel,C., Vacca,C., Bianchi,R., Gizzi,S., Fioretti,M.C., Trinchieri,G., Grohmann,U., and Puccetti,P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol.* 173, 3748-3754.

Faria,A.M. and Weiner,H.L. (2005). Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 206, 232-259.

Fassbender,M., Gerlitzki,B., Ullrich,N., Lupp,C., Klein,M., Radsak,M.P., Schmitt,E., Bopp,T., and Schild,H. (2010). Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol.* 265, 91-96.

Fenoglio,D., Ferrera,F., Fravega,M., Balestra,P., Battaglia,F., Proietti,M., Andrei,C., Olive,D., Antonio,L.C., Indiveri,F., and Filaci,G. (2008). Advancements on phenotypic and functional characterization of non-antigen-specific CD8+. *Hum. Immunol.* 69, 745-750.

Filaci,G., Fenoglio,D., Fravega,M., Ansaldo,G., Borgonovo,G., Traverso,P., Villaggio,B., Ferrera,A., Kunkl,A., Rizzi,M., Ferrera,F., Balestra,P., Ghio,M., Contini,P., Setti,M., Olive,D., Azzarone,B., Carmignani,G., Ravetti,J.L., Torre,G., and Indiveri,F. (2007). CD8+. *J. Immunol.* *179*, 4323-4334.

Finke,J.H., Rini,B., Ireland,J., Rayman,P., Richmond,A., Golshayan,A., Wood,L., Elson,P., Garcia,J., Dreicer,R., and Bukowski,R. (2008). Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6674-6682.

Fischer,K., Voelkl,S., Heymann,J., Przybylski,G.K., Mondal,K., Laumer,M., Kunz-Schughart,L., Schmidt,C.A., Andreesen,R., and Mackensen,A. (2005). Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* *105*, 2828-2835.

Floess,S., Freyer,J., Siewert,C., Baron,U., Olek,S., Polansky,J., Schlawe,K., Chang,H.D., Bopp,T., Schmitt,E., Klein-Hessling,S., Serfling,E., Hamann,A., and Huehn,J. (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS. Biol.* *5*, e38.

FOLEY,E.J. (1953). Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* *13*, 835-837.

Fontenot,J.D., Dooley,J.L., Farr,A.G., and Rudensky,A.Y. (2005). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J. Exp. Med.* *202*, 901-906.

Fontenot,J.D., Gavin,M.A., and Rudensky,A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330-336.

Franceschini,D., Paroli,M., Francavilla,V., Videtta,M., Morrone,S., Labbadia,G., Cerino,A., Mondelli,M.U., and Barnaba,V. (2009). PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest* *119*, 551-564.

Frassanito,M.A., Mayordomo,J.I., DeLeo,R.M., Storkus,W.J., Lotze,M.T., and DeLeo,A.B. (1995). Identification of Meth A sarcoma-derived class I major histocompatibility complex-associated peptides recognized by a specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte. *Cancer Res.* *55*, 124-128.

French,J.D., Kotnis,G.R., Said,S., Raeburn,C.D., McIntyre,R.C., Jr., Kloppe,J.P., and Haugen,B.R. (2012). Programmed death-1+ T cells and regulatory T cells are enriched in tumor-involved lymph nodes and associated with aggressive features in papillary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *97*, E934-E943.

Frey,O., Meisel,J., Hutloff,A., Bonhagen,K., Bruns,L., Krocze,R.A., Morawietz,L., and Kamradt,T. (2010). Inducible costimulator (ICOS) blockade inhibits accumulation of polyfunctional T helper 1/T helper 17 cells and mitigates autoimmune arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 1495-1501.

Fridman,W.H., Pages,F., Sautes-Fridman,C., and Galon,J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 298-306.

Fu,S., Zhang,N., Yopp,A.C., Chen,D., Mao,M., Chen,D., Zhang,H., Ding,Y., and Bromberg,J.S. (2004). TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + C. *Am. J. Transplant.* *4*, 1614-1627.

Fu,T., He,Q., and Sharma,P. (2011). The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Res.* *71*, 5445-5454.

Fuertes,M.B., Kacha,A.K., Kline,J., Woo,S.R., Kranz,D.M., Murphy,K.M., and Gajewski,T.F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 208, 2005-2016.

Fujii,N., Shomori,K., Shiomi,T., Nakabayashi,M., Takeda,C., Ryoke,K., and Ito,H. (2012). Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *J. Oral Pathol. Med.* 41, 444-451.

Fujimoto,S., Greene,M.I., and Sehon,A.H. (1976a). Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.* 116, 791-799.

Fujimoto,S., Greene,M.I., and Sehon,A.H. (1976b). Regulation of the immune response to tumor antigens. II. The nature of immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.* 116, 800-806.

Fujio,K., Okamura,T., and Yamamoto,K. (2010). The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Adv. Immunol.* 105, 99-130.

Fukaura,H., Kent,S.C., Pietruszewicz,M.J., Khoury,S.J., Weiner,H.L., and Hafler,D.A. (1996). Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest* 98, 70-77.

Galazka,K., Oplawski,M., Windorbska,W., Skret-Magierlo,J., Koper,K., Basta,P., Mach,P., Dutch-Wicherek,M., Mazur,A., and Wicherek,L. (2012). The immunohistochemical analysis of antigens such as RCAS1 and B7H4 in the cervical cancer nest and within the fibroblasts and macrophages infiltrating the cancer microenvironment. *Am. J. Reprod. Immunol.* 68, 85-93.

Galluzzi,L., Vacchelli,E., Eggermont,A., Fridman,W.H., Galon,J., Sautes-Fridman,C., Tartour,E., Zitvogel,L., and Kroemer,G. (2012). Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 1, 699-716.

Gambichler,T., Skrygan,M., Huyn,J., Bechara,F.G., Sand,M., Altmeyer,P., and Kreuter,A. (2006). Pattern of mRNA expression of beta-defensins in basal cell carcinoma. *BMC. Cancer* 6, 163.

Gao,Q., Qiu,S.J., Fan,J., Zhou,J., Wang,X.Y., Xiao,Y.S., Xu,Y., Li,Y.W., and Tang,Z.Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.* 25, 2586-2593.

Garcia-Sastre,A. (2006). Antiviral response in pandemic influenza viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 44-47.

Garofalo,R., Mei,F., Espejo,R., Ye,G., Haeberle,H., Baron,S., Ogra,P.L., and Reyes,V.E. (1996). Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells up-regulates class I MHC expression through the induction of IFN-beta and IL-1 alpha. *J. Immunol.* 157, 2506-2513.

Gavin,M.A., Rasmussen,J.P., Fontenot,J.D., Vasta,V., Manganiello,V.C., Beavo,J.A., and Rudensky,A.Y. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445, 771-775.

Gavin,M.A., Torgerson,T.R., Houston,E., DeRoos,P., Ho,W.Y., Stray-Pedersen,A., Ocheltree,E.L., Greenberg,P.D., Ochs,H.D., and Rudensky,A.Y. (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-

mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 6659-6664.

Georgiannos,S.N., Renaut,A., Goode,A.W., and Sheaff,M. (2003). The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. *Surgery* **134**, 827-834.

Gerber,J.S. and Mosser,D.M. (2001). Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J. Immunol.* **166**, 6861-6868.

Gershon,R.K. and Kondo,K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**, 723-737.

Ghebeh,H., Mohammed,S., Al-Omair,A., Qattan,A., Lehe,C., Al-Qudaihi,G., Elkum,N., Alshabanah,M., Bin,A.S., Tulbah,A., Ajarim,D., Al-Tweigeri,T., and Dermime,S. (2006). The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*. **8**, 190-198.

Ghiringhelli,F., Apetoh,L., Housseau,F., Kroemer,G., and Zitvogel,L. (2007). Links between innate and cognate tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 224-231.

Ghiringhelli,F., Menard,C., Terme,M., Flament,C., Taieb,J., Chaput,N., Puig,P.E., Novault,S., Escudier,B., Vivier,E., Lecesne,A., Robert,C., Blay,J.Y., Bernard,J., Caillat-Zucman,S., Freitas,A., Tursz,T., Wagner-Ballon,O., Capron,C., Vainchenker,W., Martin,F., and Zitvogel,L. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* **202**, 1075-1085.

Gigoux,M., Shang,J., Pak,Y., Xu,M., Choe,J., Mak,T.W., and Suh,W.K. (2009). Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 20371-20376.

Gilboa,E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*. **11**, 263-270.

Gilliet,M. and Liu,Y.J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**, 695-704.

Gnjatic,S., Nishikawa,H., Jungbluth,A.A., Gure,A.O., Ritter,G., Jager,E., Knuth,A., Chen,Y.T., and Old,L.J. (2006). NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv. Cancer Res.* **95**, 1-30.

Gobert,M., Treilleux,I., Bendriss-Vermare,N., Bachelot,T., Goddard-Leon,S., Arfi,V., Biota,C., Doffin,A.C., Durand,I., Olive,D., Perez,S., Pasqual,N., Faure,C., Ray-Coquard,I., Puisieux,A., Caux,C., Blay,J.Y., and Menetrier-Caux,C. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* **69**, 2000-2009.

Golding,A., Rosen,A., Petri,M., Akhter,E., and Andrade,F. (2010). Interferon-alpha regulates the dynamic balance between human activated regulatory and effector T cells: implications for antiviral and autoimmune responses. *Immunology* **131**, 107-117.

Goldman,S.A., Baker,E., Weyant,R.J., Clarke,M.R., Myers,J.N., and Lotze,M.T. (1998). Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **124**, 641-646.

- Gondek,D.C., Lu,L.F., Quezada,S.A., Sakaguchi,S., and Noelle,R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* **174**, 1783-1786.
- Gottschalk,R.A., Corse,E., and Allison,J.P. (2012). Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **188**, 976-980.
- Goubier,A., Dubois,B., Gheit,H., Joubert,G., Villard-Truc,F., Asselin-Paturel,C., Trinchieri,G., and Kaiserlian,D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity.* **29**, 464-475.
- Grabenbauer,G.G., Lahmer,G., Distel,L., and Niedobitek,G. (2006). Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3355-3360.
- Grewal,I.S. and Flavell,R.A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 111-135.
- Gri,G., Piconese,S., Frossi,B., Manfroi,V., Merluzzi,S., Tripodo,C., Viola,A., Odom,S., Rivera,J., Colombo,M.P., and Pucillo,C.E. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity.* **29**, 771-781.
- Grinberg-Bleyer,Y., Saadoun,D., Baeyens,A., Billiard,F., Goldstein,J.D., Gregoire,S., Martin,G.H., Elhage,R., Derian,N., Carpentier,W., Marodon,G., Klatzmann,D., Piaggio,E., and Salomon,B.L. (2010). Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J. Clin. Invest* **120**, 4558-4568.
- Grindebacke,H., Stenstad,H., Quiding-Jarbrink,M., Waldenstrom,J., Adlerberth,I., Wold,A.E., and Rudin,A. (2009). Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25high regulatory T cells. *J. Immunol.* **183**, 4360-4370.
- Griseri,T., Asquith,M., Thompson,C., and Powrie,F. (2010). OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *J. Exp. Med.* **207**, 699-709.
- Grohmann,U., Volpi,C., Fallarino,F., Bozza,S., Bianchi,R., Vacca,C., Orabona,C., Belladonna,M.L., Ayroldi,E., Nocentini,G., Boon,L., Bistoni,F., Fioretti,M.C., Romani,L., Riccardi,C., and Puccetti,P. (2007). Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat. Med.* **13**, 579-586.
- Groom,J.R. and Luster,A.D. (2011). CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 207-215.
- Grossman,W.J., Verbsky,J.W., Tollefsen,B.L., Kemper,C., Atkinson,J.P., and Ley,T.J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* **104**, 2840-2848.
- Grouard,G., Rissoan,M.C., Filgueira,L., Durand,I., Banchereau,J., and Liu,Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* **185**, 1101-1111.
- Groux,H. (2003). Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation* **75**, 8S-12S.

- Groux,H., O'Garra,A., Bigler,M., Rouleau,M., Antonenko,S., de Vries,J.E., and Roncarolo,M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Hadeiba,H., Sato,T., Habtezion,A., Oderup,C., Pan,J., and Butcher,E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 9, 1253-1260.
- Hagemann,T., Robinson,S.C., Schulz,M., Trumper,L., Balkwill,F.R., and Binder,C. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25, 1543-1549.
- Hanabuchi,S., Ito,T., Park,W.R., Watanabe,N., Shaw,J.L., Roman,E., Arima,K., Wang,Y.H., Voo,K.S., Cao,W., and Liu,Y.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J. Immunol.* 184, 2999-3007.
- Hanada,T., Nakagawa,M., Emoto,A., Nomura,T., Nasu,N., and Nomura,Y. (2000). Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int. J. Urol.* 7, 263-269.
- Hannier,S., Tournier,M., Bismuth,G., and Triebel,F. (1998). CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J. Immunol.* 161, 4058-4065.
- Hao,N.B., Lu,M.H., Fan,Y.H., Cao,Y.L., Zhang,Z.R., and Yang,S.M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 948098.
- Harada,Y., Ohgai,D., Watanabe,R., Okano,K., Koiwai,O., Tanabe,K., Toma,H., Altman,A., and Abe,R. (2003). A single amino acid alteration in cytoplasmic domain determines IL-2 promoter activation by ligation of CD28 but not inducible costimulator (ICOS). *J. Exp. Med.* 197, 257-262.
- Harris,J., Stewart,T., Sengar,D.P., and Hyslop,D. (1975). Quantitation of T- and B-lymphocytes in peripheral blood of patients with solid tumours. I. Relation to other parameters of in vivo and in vitro immune competence. *Can. Med. Assoc. J.* 112, 948-952.
- Hartmann,E., Wollenberg,B., Rothenfusser,S., Wagner,M., Wellisch,D., Mack,B., Giese,T., Gires,O., Endres,S., and Hartmann,G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* 63, 6478-6487.
- Hasko,G. and Pacher,P. (2008). A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J. Leukoc. Biol.* 83, 447-455.
- Hayes,D.F. (2005). Prognostic and predictive factors for breast cancer: translating technology to oncology. *J. Clin. Oncol.* 23, 1596-1597.
- Hedrich,C.M. and Bream,J.H. (2010). Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunol. Res.* 47, 185-206.
- Herschkowitz,J.I., Simin,K., Weigman,V.J., Mikaelian,I., Usary,J., Hu,Z., Rasmussen,K.E., Jones,L.P., Assefnia,S., Chandrasekharan,S., Backlund,M.G., Yin,Y., Khramtsov,A.I., Bastein,R., Quackenbush,J., Glazer,R.I., Brown,P.H., Green,J.E., Kopelovich,L., Furth,P.A., Palazzo,J.P., Olopade,O.I., Bernard,P.S., Churchill,G.A., Van,D.T., and Perou,C.M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.

Hill,J.A., Feuerer,M., Tash,K., Haxhinasto,S., Perez,J., Melamed,R., Mathis,D., and Benoist,C. (2007). Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*. 27, 786-800.

Hiraoka,N., Onozato,K., Kosuge,T., and Hirohashi,S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin. Cancer Res.* 12, 5423-5434.

Hodi,F.S., O'Day,S.J., McDermott,D.F., Weber,R.W., Sosman,J.A., Haanen,J.B., Gonzalez,R., Robert,C., Schadendorf,D., Hassel,J.C., Akerley,W., van den Eertwegh,A.J., Lutzky,J., Lorigan,P., Vaubel,J.M., Linette,G.P., Hogg,D., Ottensmeier,C.H., Lebbe,C., Peschel,C., Quirt,I., Clark,J.I., Wolchok,J.D., Weber,J.S., Tian,J., Yellin,M.J., Nichol,G.M., Hoos,A., and Urban,W.J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711-723.

Hoechst,B., Ormandy,L.A., Ballmaier,M., Lehner,F., Kruger,C., Manns,M.P., Greten,T.F., and Korangy,F. (2008). A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 135, 234-243.

Hoerning,A., Kohler,S., Jun,C., Tebbe,B., Fu,J., Menke,J., Wilde,B., Dolff,S., Feldkamp,T., Briscoe,D.M., Kribben,A., Hoyer,P.F., and Witzke,O. (2012). Peripherally circulating CD4(+) FOXP3(+) CXCR3(+) T regulatory cells correlate with renal allograft function. *Scand. J. Immunol.* 76, 320-328.

Hofmann,S.R., Rosen-Wolff,A., Tsokos,G.C., and Hedrich,C.M. (2012). Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clin. Immunol.* 143, 116-127.

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

Horny,H.P., Feller,A.C., Horst,H.A., and Lennert,K. (1987). Immunocytology of plasmacytoid T cells: marker analysis indicates a unique phenotype of this enigmatic cell. *Hum. Pathol.* 18, 28-32.

Howe,L.R. (2007). Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 9, 210.

Howie,D., Nolan,K.F., Daley,S., Butterfield,E., Adams,E., Garcia-Rueda,H., Thompson,C., Saunders,N.J., Cobbold,S.P., Tone,Y., Tone,M., and Waldmann,H. (2009). MS4A4B is a GITR-associated membrane adapter, expressed by regulatory T cells, which modulates T cell activation. *J. Immunol.* 183, 4197-4204.

Hsieh,C.S., Zheng,Y., Liang,Y., Fontenot,J.D., and Rudensky,A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* 7, 401-410.

Hsieh,M.Y., Hong,W.H., Lin,J.J., Lee,W.I., Lin,K.L., Wang,H.S., Chen,S.H., Yang,C.P., Jaing,T.H., and Huang,J.L. (2012). T-cell receptor excision circles and repertoire diversity in children with profound T-cell immunodeficiency. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*

Hu,Y.L., Metz,D.P., Chung,J., Siu,G., and Zhang,M. (2009). B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells. *J. Immunol.* 182, 1421-1428.

Hubbard,V.M., Eng,J.M., Ramirez-Montagut,T., Tjoe,K.H., Muriglan,S.J., Kochman,A.A., Terwey,T.H., Willis,L.M., Schiro,R., Heller,G., Murphy,G.F., Liu,C., Alpdogan,O., and van den Brink,M.R. (2005). Absence of inducible costimulator on alloreactive T cells reduces graft versus host disease and induces Th2 deviation. *Blood* 106, 3285-3292.

Huber,M., Steinwald,V., Guralnik,A., Brustle,A., Kleemann,P., Rosenplanter,C., Decker,T., and Lohoff,M. (2008). IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int. Immunol.* 20, 223-234.

Ichiyama,K., Yoshida,H., Wakabayashi,Y., Chinen,T., Saeki,K., Nakaya,M., Takaesu,G., Hori,S., Yoshimura,A., and Kobayashi,T. (2008). Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat. *J. Biol. Chem.* 283, 17003-17008.

Iellem,A., Mariani,M., Lang,R., Recalde,H., Panina-Bordignon,P., Sinigaglia,F., and D'Ambrosio,D. (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 194, 847-853.

Inglefield,J.R., Dumitru,C.D., Alkan,S.S., Gibson,S.J., Lipson,K.E., Tomai,M.A., Larson,C.J., and Vasilakos,J.P. (2008). TLR7 agonist 852A inhibition of tumor cell proliferation is dependent on plasmacytoid dendritic cells and type I IFN. *J. Interferon Cytokine Res.* 28, 253-263.

Ito,T., Hanabuchi,S., Wang,Y.H., Park,W.R., Arima,K., Bover,L., Qin,F.X., Gilliet,M., and Liu,Y.J. (2008). Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 28, 870-880.

Ito,T., Yang,M., Wang,Y.H., Lande,R., Gregorio,J., Perng,O.A., Qin,X.F., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* 204, 105-115.

Izraely,S., Klein,A., Sagi-Assif,O., Meshel,T., Tsarfaty,G., Hoon,D.S., and Witz,I.P. (2010). Chemokine-chemokine receptor axes in melanoma brain metastasis. *Immunol. Lett.* 130, 107-114.

Jacobs,J.F., Punt,C.J., Lesterhuis,W.J., Suttmuller,R.P., Brouwer,H.M., Scharenborg,N.M., Klasen,I.S., Hilbrands,L.B., Figdor,C.G., de Vries,I.J., and Adema,G.J. (2010). Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase I/II study in metastatic melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 16, 5067-5078.

James,E., Yeh,A., King,C., Korangy,F., Bailey,I., Boulanger,D.S., Van den Eynde,B.J., Murray,N., and Elliott,T.J. (2010). Differential suppression of tumor-specific CD8+ T cells by regulatory T cells. *J. Immunol.* 185, 5048-5055.

Janke,M., Witsch,E.J., Mages,H.W., Hutloff,A., and Kroczek,R.A. (2006). Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 118, 353-360.

Janson,P.C., Winerdal,M.E., Marits,P., Thorn,M., Ohlsson,R., and Winqvist,O. (2008). FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS. One.* 3, e1612.

Jensen,T.O., Schmidt,H., Moller,H.J., Donskov,F., Hoyer,M., Sjoegren,P., Christensen,I.J., and Steiniche,T. (2012). Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 118, 2476-2485.

- Jin,L., Yuan,R.Q., Fuchs,A., Yao,Y., Joseph,A., Schwall,R., Schnitt,S.J., Guida,A., Hastings,H.M., Andres,J., Turkel,G., Polverini,P.J., Goldberg,I.D., and Rosen,E.M. (1997). Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma. *Cancer* 80, 421-434.
- Joffre,O., Santolaria,T., Calise,D., Al,S.T., Hudrisier,D., Romagnoli,P., and van Meerwijk,J.P. (2008). Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* 14, 88-92.
- Johnson-Holiday,C., Singh,R., Johnson,E.L., Grizzle,W.E., Lillard,J.W., Jr., and Singh,S. (2011). CCR9-CCL25 interactions promote cisplatin resistance in breast cancer cell through Akt activation in a PI3K-dependent and FAK-independent fashion. *World J. Surg. Oncol.* 9, 46.
- Jonuleit,H., Schmitt,E., Schuler,G., Knop,J., and Enk,A.H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192, 1213-1222.
- Jordan,M.S., Boesteanu,A., Reed,A.J., Petrone,A.L., Holenbeck,A.E., Lerman,M.A., Naji,A., and Caton,A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2, 301-306.
- Juvet,S.C. and Zhang,L. (2012). Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 48-58.
- Kalinski,P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* 188, 21-28.
- Kan,Z., Jaiswal,B.S., Stinson,J., Janakiraman,V., Bhatt,D., Stern,H.M., Yue,P., Haverty,P.M., Bourgon,R., Zheng,J., Moorhead,M., Chaudhuri,S., Tomsho,L.P., Peters,B.A., Pujara,K., Cordes,S., Davis,D.P., Carlton,V.E., Yuan,W., Li,L., Wang,W., Eigenbrot,C., Kaminker,J.S., Eberhard,D.A., Waring,P., Schuster,S.C., Modrusan,Z., Zhang,Z., Stokoe,D., de Sauvage,F.J., Faham,M., and Seshagiri,S. (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466, 869-873.
- Kapp,J.A., Kapp,L.M., McKenna,K.C., and Lake,J.P. (2004). gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses ex vivo. *Immunology* 111, 155-164.
- Kaur,G., Goodall,J.C., Jarvis,L.B., and Hill Gaston,J.S. (2010). Characterisation of Foxp3 splice variants in human CD4+ and CD8+ T cells--identification of Foxp3Delta7 in human regulatory T cells. *Mol. Immunol.* 48, 321-332.
- Kerlikowske,K. (2010). Epidemiology of ductal carcinoma in situ. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr* 2010, 139-141.
- Khan,A.R., Dovedi,S.J., Wilkinson,R.W., and Pritchard,D.I. (2010). Tumor infiltrating regulatory T cells: tractable targets for immunotherapy. *Int. Rev. Immunol.* 29, 461-484.
- Khong,H.T., Yang,J.C., Topalian,S.L., Sherry,R.M., Mavroukakis,S.A., White,D.E., and Rosenberg,S.A. (2004). Immunization of HLA-A*0201 and/or HLA-DPbeta1*04 patients with metastatic melanoma using epitopes from the NY-ESO-1 antigen. *J. Immunother.* 27, 472-477.
- Kim,S.T., Jeong,H., Woo,O.H., Seo,J.H., Kim,A., Lee,E.S., Shin,S.W., Kim,Y.H., Kim,J.S., and Park,K.H. (2012). Tumor-infiltrating Lymphocytes, Tumor Characteristics, and Recurrence in Patients With Early Breast Cancer. *Am. J. Clin. Oncol.*

Kjaergaard,J., Tanaka,J., Kim,J.A., Rothchild,K., Weinberg,A., and Shu,S. (2000). Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer Res.* 60, 5514-5521.

Klein,L. and Jovanovic,K. (2012). Regulatory T cell differentiation: turning harmful into useful. *Immunity.* 37, 441-443.

Kleinewietfeld,M., Puentes,F., Borsellino,G., Battistini,L., Rotzschke,O., and Falk,K. (2005). CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood* 105, 2877-2886.

Knoechel,B., Lohr,J., Kahn,E., Bluestone,J.A., and Abbas,A.K. (2005). Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J. Exp. Med.* 202, 1375-1386.

Knutson,K.L., Dang,Y., Lu,H., Lukas,J., Almand,B., Gad,E., Azeke,E., and Disis,M.L. (2006). IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice. *J. Immunol.* 177, 84-91.

Ko,J.S., Zea,A.H., Rini,B.I., Ireland,J.L., Elson,P., Cohen,P., Golshayan,A., Rayman,P.A., Wood,L., Garcia,J., Dreicer,R., Bukowski,R., and Finke,J.H. (2009). Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* 15, 2148-2157.

Koch,S.D., Uss,E., van Lier,R.A., and ten Berge,I.J. (2008). Alloantigen-induced regulatory CD8+CD103+ T cells. *Hum. Immunol.* 69, 737-744.

Koebel,C.M., Vermi,W., Swann,J.B., Zerafa,N., Rodig,S.J., Old,L.J., Smyth,M.J., and Schreiber,R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903-907.

Kohrt,H.E., Nouri,N., Nowels,K., Johnson,D., Holmes,S., and Lee,P.P. (2005). Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS. Med.* 2, e284.

Komatsu,N., Mariotti-Ferrandiz,M.E., Wang,Y., Malissen,B., Waldmann,H., and Hori,S. (2009). Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 1903-1908.

Komohara,Y., Hasita,H., Ohnishi,K., Fujiwara,Y., Suzu,S., Eto,M., and Takeya,M. (2011). Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 102, 1424-1431.

Komohara,Y., Hirahara,J., Horikawa,T., Kawamura,K., Kiyota,E., Sakashita,N., Araki,N., and Takeya,M. (2006). AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 763-771.

Krahenbuhl,O., Rey,C., Jenne,D., Lanzavecchia,A., Groscurth,P., Carrel,S., and Tschopp,J. (1988). Characterization of granzymes A and B isolated from granules of cloned human cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 141, 3471-3477.

Krausz,L.T., Fischer-Fodor,E., Major,Z.Z., and Fetica,B. (2012). GITR-expressing regulatory T-cell subsets are increased in tumor-positive lymph nodes from advanced breast cancer patients as compared to tumor-negative lymph nodes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 25, 59-66.

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

Kryczek,I., Wei,S., Zhu,G., Myers,L., Mottram,P., Cheng,P., Chen,L., Coukos,G., and Zou,W. (2007). Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 67, 8900-8905.

Kryczek,I., Zou,L., Rodriguez,P., Zhu,G., Wei,S., Mottram,P., Brumlik,M., Cheng,P., Curiel,T., Myers,L., Lackner,A., Alvarez,X., Ochoa,A., Chen,L., and Zou,W. (2006). B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J. Exp. Med.* 203, 871-881.

Kurahara,H., Takao,S., Maemura,K., Mataka,Y., Kuwahata,T., Maeda,K., Sakoda,M., Iino,S., Ishigami,S., Ueno,S., Shinchi,H., and Natsugoe,S. (2012). M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage Infiltration of Regional Lymph Nodes Is Associated With Nodal Lymphangiogenesis and Occult Nodal Involvement in pN0 Pancreatic Cancer. *Pancreas.*

Kusmartsev,S. and Gabrilovich,D.I. (2006). Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 323-331.

Labidi-Galy,S.I., Sisirak,V., Meeus,P., Gobert,M., Treilleux,I., Bajard,A., Combes,J.D., Faget,J., Mithieux,F., Cassagnol,A., Tredan,O., Durand,I., Menetrier-Caux,C., Caux,C., Blay,J.Y., Ray-Coquard,I., and Bendriss-Vermare,N. (2011). Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 71, 5423-5434.

Labidi-Galy,S.I., Treilleux,I., Goddard-Leon,S., Combes,J.D., Blay,J.Y., Ray-Coquard,I., Caux,C., and Bendriss-Vermare,N. (2012). Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *Oncoimmunology.* 1, 380-382.

Lacey,J.V., Jr., Kreimer,A.R., Buys,S.S., Marcus,P.M., Chang,S.C., Leitzmann,M.F., Hoover,R.N., Prorok,P.C., Berg,C.D., and Hartge,P. (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC. Cancer* 9, 84.

Ladoire,S., Arnould,L., Mignot,G., Apetoh,L., Rebe,C., Martin,F., Fumoleau,P., Coudert,B., and Ghiringhelli,F. (2011). T-bet expression in intratumoral lymphoid structures after neoadjuvant trastuzumab plus docetaxel for HER2-overexpressing breast carcinoma predicts survival. *Br. J. Cancer* 105, 366-371.

Laguens,G., Coronato,S., Laguens,R., Portiansky,E., and Di,G., V (2002). Human regional lymph nodes draining cancer exhibit a profound dendritic cell depletion as comparing to those from patients without malignancies. *Immunol. Lett.* 84, 159-162.

Laufer,T.M., DeKoning,J., Markowitz,J.S., Lo,D., and Glimcher,L.H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383, 81-85.

Leach,D.R., Krummel,M.F., and Allison,J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-1736.

- Lechner,M.G., Megiel,C., Russell,S.M., Bingham,B., Arger,N., Woo,T., and Epstein,A.L. (2011). Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J. Transl. Med.* 9, 90.
- Lee,A.H., Happerfield,L.C., Bobrow,L.G., and Millis,R.R. (1997). Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *J. Clin. Pathol.* 50, 669-673.
- Lee,H.E., Park,D.J., Kim,W.H., Kim,H.H., and Lee,H.S. (2011). High FOXP3+ regulatory T-cell density in the sentinel lymph node is associated with downstream non-sentinel lymph-node metastasis in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 105, 413-419.
- Lee,I., Wang,L., Wells,A.D., Dorf,M.E., Ozkaynak,E., and Hancock,W.W. (2005). Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* 201, 1037-1044.
- Leek,R.D., Landers,R.J., Harris,A.L., and Lewis,C.E. (1999). Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 79, 991-995.
- Leek,R.D., Lewis,C.E., Whitehouse,R., Greenall,M., Clarke,J., and Harris,A.L. (1996). Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 56, 4625-4629.
- Lespagnard,L., Gancberg,D., Rouas,G., Leclercq,G., de Saint-Aubain,S.N., Di,L.A., Piccart,M., Verhest,A., and Larsimont,D. (1999). Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int. J. Cancer* 84, 309-314.
- Levings,M.K., Sangregorio,R., Galbiati,F., Squadrone,S., de Waal,M.R., and Roncarolo,M.G. (2001a). IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol.* 166, 5530-5539.
- Levings,M.K., Sangregorio,R., and Roncarolo,M.G. (2001b). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* 193, 1295-1302.
- Lewis,C.E. and Pollard,J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605-612.
- Li,C.H., Kuo,W.H., Chang,W.C., Huang,S.C., Chang,K.J., and Sheu,B.C. (2011). Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer. *Immunol. Res.* 51, 71-79.
- Li,J., Szekely,L., Eriksson,L., Heddson,B., Sundbom,A., Czene,K., Hall,P., and Humphreys,K. (2012a). High-throughput mammographic-density measurement: a tool for risk prediction of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 14, R114.
- Li,L., Patsoukis,N., Petkova,V., and Boussiotis,V.A. (2012b). Runx1 and Runx3 Are Involved in the Generation and Function of Highly Suppressive IL-17-Producing T Regulatory Cells. *PLoS. One.* 7, e45115.

- Liao,G., Nayak,S., Regueiro,J.R., Berger,S.B., Detre,C., Romero,X., de Waal,M.R., Chatila,T.A., Herzog,R.W., and Terhorst,C. (2010). GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* **22**, 259-270.
- Lin,E.Y., Gouon-Evans,V., Nguyen,A.V., and Pollard,J.W. (2002). The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **7**, 147-162.
- Linden,J. (2011). Regulation of leukocyte function by adenosine receptors. *Adv. Pharmacol.* **61**, 95-114.
- Lio,C.W. and Hsieh,C.S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity.* **28**, 100-111.
- Liu,F., Lang,R., Zhao,J., Zhang,X., Pringle,G.A., Fan,Y., Yin,D., Gu,F., Yao,Z., and Fu,L. (2011a). CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 645-655.
- Liu,G., Yang,K., Burns,S., Shrestha,S., and Chi,H. (2010). The S1P(1)-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of T(H)1 and T(reg) cells. *Nat. Immunol.* **11**, 1047-1056.
- Liu,J., Zhang,N., Li,Q., Zhang,W., Ke,F., Leng,Q., Wang,H., Chen,J., and Wang,H. (2011b). Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. *PLoS. One.* **6**, e19495.
- Liu,S., Lachapelle,J., Leung,S., Gao,D., Foulkes,W.D., and Nielsen,T.O. (2012). CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* **14**, R48.
- Liu,W., Gao,C., Zhou,B.G., and Li,W.M. (2006). Effects of adenovirus-mediated gene transfer of ICOSlg and CTLA4lg fusion protein on experimental autoimmune myocarditis. *Autoimmunity* **39**, 83-92.
- Liu,Y., Zhang,P., Li,J., Kulkarni,A.B., Perruche,S., and Chen,W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 632-640.
- Lizee,G., Radvanyi,L.G., Overwijk,W.W., and Hwu,P. (2006). Improving antitumor immune responses by circumventing immunoregulatory cells and mechanisms. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4794-4803.
- Loebbermann,J., Thornton,H., Durant,L., Sparwasser,T., Webster,K.E., Sprent,J., Culley,F.J., Johansson,C., and Openshaw,P.J. (2012). Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal. Immunol.* **5**, 161-172.
- Lonning,P.E., Knappskog,S., Staalesen,V., Chrisanthar,R., and Lillehaug,J.R. (2007). Breast cancer prognostication and prediction in the postgenomic era. *Ann. Oncol.* **18**, 1293-1306.
- Lu,H., Wagner,W.M., Gad,E., Yang,Y., Duan,H., Amon,L.M., Van,D.N., Larson,E.R., Chang,A., Tufvesson,H., and Disis,M.L. (2010). Treatment failure of a TLR-7 agonist occurs due to self-regulation of acute inflammation and can be overcome by IL-10 blockade. *J. Immunol.* **184**, 5360-5367.

- MacDonald,K.P., Munster,D.J., Clark,G.J., Dzionek,A., Schmitz,J., and Hart,D.N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512-4520.
- Magg,T., Mannert,J., Ellwart,J.W., Schmid,I., and Albert,M.H. (2012). Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 42, 1627-1638.
- Mahajan,S., Cervera,A., MacLeod,M., Fillatreau,S., Perona-Wright,G., Meek,S., Smith,A., MacDonald,A., and Gray,D. (2007). The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 1796-1808.
- Mahmoud,S., Lee,A., Ellis,I., and Green,A. (2012). CD8(+) T lymphocytes infiltrating breast cancer: A promising new prognostic marker? *Oncoimmunology.* 1, 364-365.
- Mahmoud,S.M., Paish,E.C., Powe,D.G., Macmillan,R.D., Grainge,M.J., Lee,A.H., Ellis,I.O., and Green,A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1949-1955.
- Mailer,R.K., Falk,K., and Rotzschke,O. (2009). Absence of leucine zipper in the natural FOXP3Delta2Delta7 isoform does not affect dimerization but abrogates suppressive capacity. *PLoS. One.* 4, e6104.
- Mailloux,A.W. and Young,M.R. (2009). NK-dependent increases in CCL22 secretion selectively recruits regulatory T cells to the tumor microenvironment. *J. Immunol.* 182, 2753-2765.
- Mamessier,E., Sylvain,A., Thibult,M.L., Houvenaeghel,G., Jacquemier,J., Castellano,R., Goncalves,A., Andre,P., Romagne,F., Thibault,G., Viens,P., Birnbaum,D., Bertucci,F., Moretta,A., and Olive,D. (2011). Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest* 121, 3609-3622.
- Manches,O., Munn,D., Fallahi,A., Lifson,J., Chaperot,L., Plumas,J., and Bhardwaj,N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J. Clin. Invest* 118, 3431-3439.
- Mandapathil,M., Szczepanski,M., Harasymczuk,M., Ren,J., Cheng,D., Jackson,E.K., Gorelik,E., Johnson,J., Lang,S., and Whiteside,T.L. (2012). CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4(+) T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology.* 1, 659-669.
- Mandapathil,M., Szczepanski,M.J., Szajnik,M., Ren,J., Jackson,E.K., Johnson,J.T., Gorelik,E., Lang,S., and Whiteside,T.L. (2010). Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* 285, 27571-27580.
- Mandl,S.J., Rountree,R.B., Dalpozzo,K., Do,L., Lombardo,J.R., Schoonmaker,P.L., Dirmeier,U., Steigerwald,R., Giffon,T., Laus,R., and Delcayre,A. (2012). Immunotherapy with MVA-BN(R)-HER2 induces HER-2-specific Th1 immunity and alters the intratumoral balance of effector and regulatory T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 19-29.
- Mansfield,A.S., Heikkila,P.S., Vaara,A.T., von Smitten,K.A., Vakkila,J.M., and Leidenius,M.H. (2009). Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC. Cancer* 9, 231.

Mantovani,A., Sica,A., Sozzani,S., Allavena,P., Vecchi,A., and Locati,M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686.

Manuel,M., Tredan,O., Bachelot,T., Clapisson,G., Courtier,A., Parmentier,G., Rabeony,T., Grives,A., Perez,S., Mouret,J.F., Perol,D., Chabaud,S., Ray-Coquard,I., Labidi-Galy,I., Heudel,P., Pierga,J.Y., Caux,C., Blay,J.Y., Pasqual,N., and Menetrier-Caux,C. (2012). Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. *Oncoimmunology.* 1, 432-440.

Marodon,G., Desjardins,D., Mercey,L., Baillou,C., Parent,P., Manuel,M., Caux,C., Bellier,B., Pasqual,N., and Klatzmann,D. (2009). High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.gamma c-/- mice. *Eur. J. Immunol.* 39, 2136-2145.

Marson,A., Kretschmer,K., Frampton,G.M., Jacobsen,E.S., Polansky,J.K., MacIsaac,K.D., Levine,S.S., Fraenkel,E., von,B.H., and Young,R.A. (2007). Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445, 931-935.

Martin-Gayo,E., Sierra-Filardi,E., Corbi,A.L., and Toribio,M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 115, 5366-5375.

Martin-Orozco,N., Li,Y., Wang,Y., Liu,S., Hwu,P., Liu,Y.J., Dong,C., and Radvanyi,L. (2010). Melanoma cells express ICOS ligand to promote the activation and expansion of T-regulatory cells. *Cancer Res.* 70, 9581-9590.

Martinez,F.O., Helming,L., and Gordon,S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451-483.

Maruyama,T., Konkel,J.E., Zamarron,B.F., and Chen,W. (2011). The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin. Immunol.* 23, 418-423.

Maruyama,T., Kono,K., Izawa,S., Mizukami,Y., Kawaguchi,Y., Mimura,K., Watanabe,M., and Fujii,H. (2010). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis. Esophagus.* 23, 422-429.

Matsuura,K., Yamaguchi,Y., Osaki,A., Ohara,M., Okita,R., Emi,A., Murakami,S., and Arihiro,K. (2009). FOXP3 expression of micrometastasis-positive sentinel nodes in breast cancer patients. *Oncol. Rep.* 22, 1181-1187.

Matsuura,K., Yamaguchi,Y., Ueno,H., Osaki,A., Arihiro,K., and Toge,T. (2006). Maturation of dendritic cells and T-cell responses in sentinel lymph nodes from patients with breast carcinoma. *Cancer* 106, 1227-1236.

Mauriac,L., Debled,M., and MacGrogan,G. (2005). When will more useful predictive factors be ready for use? *Breast* 14, 617-623.

McAdam,A.J., Greenwald,R.J., Levin,M.A., Chernova,T., Malenkovich,N., Ling,V., Freeman,G.J., and Sharpe,A.H. (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409, 102-105.

- McClymont,S.A., Putnam,A.L., Lee,M.R., Esensten,J.H., Liu,W., Hulme,M.A., Hoffmuller,U., Baron,U., Olek,S., Bluestone,J.A., and Brusko,T.M. (2011). Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J. Immunol.* 186, 3918-3926.
- McDermott,R.S., Beuvon,F., Pauly,M., Pallud,C., Vincent-Salomon,A., Mosseri,V., Pouillart,P., and Scholl,S.M. (2002). Tumor antigens and antigen-presenting capacity in breast cancer. *Pathobiology* 70, 324-332.
- Medrek,C., Ponten,F., Jirstrom,K., and Leandersson,K. (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC. Cancer* 12, 306.
- Mellor,A.L., Munn,D., Chandler,P., Keskin,D., Johnson,T., Marshall,B., Jhaver,K., and Baban,B. (2003). Tryptophan catabolism and T cell responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527, 27-35.
- Meloni,F., Morosini,M., Solari,N., Passadore,I., Nascimbene,C., Novo,M., Ferrari,M., Cosentino,M., Marino,F., Pozzi,E., and Fietta,A.M. (2006). Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+. *Hum. Immunol.* 67, 1-12.
- Menetrier-Caux,C., Curiel,T., Faget,J., Manuel,M., Caux,C., and Zou,W. (2012). Targeting regulatory T cells. *Target Oncol.* 7, 15-28.
- Menetrier-Caux,C., Gobert,M., and Caux,C. (2009). Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res.* 69, 7895-7898.
- Menges,M., Rossner,S., Voigtlander,C., Schindler,H., Kukutsch,N.A., Bogdan,C., Erb,K., Schuler,G., and Lutz,M.B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* 195, 15-21.
- Mesturini,R., Nicola,S., Chiocchetti,A., Bernardone,I.S., Castelli,L., Bensi,T., Ferretti,M., Comi,C., Dong,C., Rojo,J.M., Yagi,J., and Dianzani,U. (2006). ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naive CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 2601-2612.
- Miller,A.M., Lundberg,K., Ozenci,V., Banham,A.H., Hellstrom,M., Egevad,L., and Pisa,P. (2006). CD4+CD25^{high} T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J. Immunol.* 177, 7398-7405.
- Minas,K. and Liversidge,J. (2006). Is the CD200/CD200 receptor interaction more than just a myeloid cell inhibitory signal? *Crit Rev. Immunol.* 26, 213-230.
- Mirisola,V., Zuccarino,A., Bachmeier,B.E., Sormani,M.P., Falter,J., Nerlich,A., and Pfeffer,U. (2009). CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. *Eur. J. Cancer* 45, 2579-2587.
- Misra,Y., Bentley,P.A., Bond,J.P., Tighe,S., Hunter,T., and Zhao,F.Q. (2012). Mammary gland morphological and gene expression changes underlying pregnancy protection of breast cancer tumorigenesis. *Physiol Genomics* 44, 76-88.
- Mitsuhashi,M., Liu,J., Cao,S., Shi,X., and Ma,X. (2004). Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *J. Leukoc. Biol.* 76, 322-332.

- Mitsui,J., Nishikawa,H., Muraoka,D., Wang,L., Noguchi,T., Sato,E., Kondo,S., Allison,J.P., Sakaguchi,S., Old,L.J., Kato,T., and Shiku,H. (2010). Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2781-2791.
- Miyao,T., Floess,S., Setoguchi,R., Luche,H., Fehling,H.J., Waldmann,H., Huehn,J., and Hori,S. (2012). Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity.* **36**, 262-275.
- Mizukami,Y., Kono,K., Kawaguchi,Y., Akaike,H., Kamimura,K., Sugai,H., and Fujii,H. (2008). CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int. J. Cancer* **122**, 2286-2293.
- Montane,J., Bischoff,L., Soukhatcheva,G., Dai,D.L., Hardenberg,G., Levings,M.K., Orban,P.C., Kieffer,T.J., Tan,R., and Verchere,C.B. (2011). Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets. *J. Clin. Invest* **121**, 3024-3028.
- Moran,A.E., Holzapfel,K.L., Xing,Y., Cunningham,N.R., Maltzman,J.S., Punt,J., and Hogquist,K.A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279-1289.
- Morrissey,P.J., Charrier,K., Braddy,S., Liggitt,D., and Watson,J.D. (1993). CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **178**, 237-244.
- Mougiakakos,D., Johansson,C.C., Trocme,E., All-Ericsson,C., Economou,M.A., Larsson,O., Seregard,S., and Kiessling,R. (2010). Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. *Cancer* **116**, 2224-2233.
- Mucida,D., Kutchukhidze,N., Erazo,A., Russo,M., Lafaille,J.J., and Curotto de Lafaille,M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest* **115**, 1923-1933.
- Muller,G., Muller,A., Tuting,T., Steinbrink,K., Saloga,J., Szalma,C., Knop,J., and Enk,A.H. (2002). Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *J. Invest Dermatol.* **119**, 836-841.
- Murdoch,C., Giannoudis,A., and Lewis,C.E. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* **104**, 2224-2234.
- Muthuswamy,R., Urban,J., Lee,J.J., Reinhart,T.A., Bartlett,D., and Kalinski,P. (2008). Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res.* **68**, 5972-5978.
- Nagao,T., Kinoshita,T., Hojo,T., Tsuda,H., Tamura,K., and Fujiwara,Y. (2012). The differences in the histological types of breast cancer and the response to neoadjuvant chemotherapy: the relationship between the outcome and the clinicopathological characteristics. *Breast* **21**, 289-295.
- Nagorsen,D., Voigt,S., Berg,E., Stein,H., Thiel,E., and Loddenkemper,C. (2007). Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J. Transl. Med.* **5**, 62.

Naik,S.H., Sathe,P., Park,H.Y., Metcalf,D., Proietto,A.I., Dakic,A., Carotta,S., O'Keeffe,M., Bahlo,M., Papenfuss,A., Kwak,J.Y., Wu,L., and Shortman,K. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* 8, 1217-1226.

Nakamura,E.S., Koizumi,K., Kobayashi,M., Saitoh,Y., Arita,Y., Nakayama,T., Sakurai,H., Yoshie,O., and Saiki,I. (2006). RANKL-induced CCL22/macrophage-derived chemokine produced from osteoclasts potentially promotes the bone metastasis of lung cancer expressing its receptor CCR4. *Clin. Exp. Metastasis* 23, 9-18.

Negrier,S., Escudier,B., Lasset,C., Douillard,J.Y., Savary,J., Chevreau,C., Ravaud,A., Mercatello,A., Peny,J., Mousseau,M., Philip,T., and Tursz,T. (1998). Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. N. Engl. J. Med.* 338, 1272-1278.

Nestle,F.O., Conrad,C., Tun-Kyi,A., Homey,B., Gombert,M., Boyman,O., Burg,G., Liu,Y.J., and Gilliet,M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J. Exp. Med.* 202, 135-143.

Nierkens,S., den Brok,M.H., Garcia,Z., Togher,S., Wagenaars,J., Wassink,M., Boon,L., Ruers,T.J., Figdor,C.G., Schoenberger,S.P., Adema,G.J., and Janssen,E.M. (2011). Immune adjuvant efficacy of CpG oligonucleotide in cancer treatment is founded specifically upon TLR9 function in plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Res.* 71, 6428-6437.

Norian,L.A., Rodriguez,P.C., O'Mara,L.A., Zabaleta,J., Ochoa,A.C., Cella,M., and Allen,P.M. (2009). Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism. *Cancer Res.* 69, 3086-3094.

Nunes-Cabaco,H., Caramalho,I., Sepulveda,N., and Sousa,A.E. (2011). Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage. *Eur. J. Immunol.* 41, 3604-3614.

Nuti,M., Bellati,F., Visconti,V., Napoletano,C., Domenici,L., Caccetta,J., Zizzari,I.G., Ruscito,I., Rahimi,H., Benedetti-Panici,P., and Rughetti,A. (2011). Immune effects of trastuzumab. *J. Cancer* 2, 317-323.

Oh,J.Z., Kurche,J.S., Burchill,M.A., and Kedl,R.M. (2011). TLR7 enables cross-presentation by multiple dendritic cell subsets through a type I IFN-dependent pathway. *Blood* 118, 3028-3038.

Ohigashi,Y., Sho,M., Yamada,Y., Tsurui,Y., Hamada,K., Ikeda,N., Mizuno,T., Yoriki,R., Kashizuka,H., Yane,K., Tsushima,F., Otsuki,N., Yagita,H., Azuma,M., and Nakajima,Y. (2005). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 2947-2953.

Ohki,H., Martin,C., Corbel,C., Coltey,M., and Le Douarin,N.M. (1987). Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds. *Science* 237, 1032-1035.

Ohno,S., Inagawa,H., Dhar,D.K., Fujii,T., Ueda,S., Tachibana,M., Suzuki,N., Inoue,M., Soma,G., and Nagasue,N. (2003). The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Res.* 23, 5015-5022.

Ono,M., Yaguchi,H., Ohkura,N., Kitabayashi,I., Nagamura,Y., Nomura,T., Miyachi,Y., Tsukada,T., and Sakaguchi,S. (2007). Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446, 685-689.

Orlandi,F., Venanzi,F.M., Concetti,A., Yamauchi,H., Tiwari,S., Norton,L., Wolchok,J.D., Houghton,A.N., and Gregor,P.D. (2007). Antibody and CD8+ T cell responses against HER2/neu required for tumor eradication after DNA immunization with a Flt-3 ligand fusion vaccine. *Clin. Cancer Res.* 13, 6195-6203.

Ouyang,W. and Li,M.O. (2011). Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends Immunol.* 32, 26-33.

Pan,P.Y., Zang,Y., Weber,K., Meseck,M.L., and Chen,S.H. (2002). OX40 ligation enhances primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses in an immunotherapy for hepatic colon metastases. *Mol. Ther.* 6, 528-536.

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

Papatriantafyllou,M. (2012). T cells: Neuropilin 1 - distinguishing T(Reg) cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 746-747.

Pardoll,D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252-264.

Paulos,C.M., Carpenito,C., Plesa,G., Suhoski,M.M., Varela-Rohena,A., Golovina,T.N., Carroll,R.G., Riley,J.L., and June,C.H. (2010). The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci. Transl. Med.* 2, 55ra78.

Pedroza-Gonzalez,A., Xu,K., Wu,T.C., Asporid,C., Tindle,S., Marches,F., Gallegos,M., Burton,E.C., Savino,D., Hori,T., Tanaka,Y., Zurawski,S., Zurawski,G., Bover,L., Liu,Y.J., Banchereau,J., and Palucka,A.K. (2011). Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J. Exp. Med.* 208, 479-490.

Pere,H., Montier,Y., Bayry,J., Quintin-Colonna,F., Merillon,N., Dransart,E., Badoual,C., Gey,A., Ravel,P., Marcheteau,E., Batteux,F., Sandoval,F., Adotevi,O., Chiu,C., Garcia,S., Tanchot,C., Lone,Y.C., Ferreira,L.C., Nelson,B.H., Hanahan,D., Fridman,W.H., Johannes,L., and Tartour,E. (2011). A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood* 118, 4853-4862.

Perez,N., Karumuthil-Melethil,S., Li,R., Prabhakar,B.S., Holterman,M.J., and Vasu,C. (2008). Preferential costimulation by CD80 results in IL-10-dependent TGF-beta1(+) -adaptive regulatory T cell generation. *J. Immunol.* 180, 6566-6576.

Perou,C.M., Sorlie,T., Eisen,M.B., van de Rijn,M., Jeffrey,S.S., Rees,C.A., Pollack,J.R., Ross,D.T., Johnsen,H., Akslen,L.A., Fluge,O., Pergamenschikov,A., Williams,C., Zhu,S.X., Lonning,P.E., Borresen-Dale,A.L., Brown,P.O., and Botstein,D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Perrot,I., Blanchard,D., Freymond,N., Isaac,S., Guibert,B., Pacheco,Y., and Lebecque,S. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J. Immunol.* 178, 2763-2769.

Petersen,R.P., Campa,M.J., Sperlazza,J., Conlon,D., Joshi,M.B., Harpole,D.H., Jr., and Patz,E.F., Jr. (2006). Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 107, 2866-2872.

Poindexter,N.J., Sahin,A., Hunt,K.K., and Grimm,E.A. (2004). Analysis of dendritic cells in tumor-free and tumor-containing sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.* 6, R408-R415.

Polansky,J.K., Kretschmer,K., Freyer,J., Floess,S., Garbe,A., Baron,U., Olek,S., Hamann,A., von,B.H., and Huehn,J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.* 38, 1654-1663.

Popovic,P.J., DeMarco,R., Lotze,M.T., Winikoff,S.E., Bartlett,D.L., Krieg,A.M., Guo,Z.S., Brown,C.K., Tracey,K.J., and Zeh,H.J., III (2006). High mobility group B1 protein suppresses the human plasmacytoid dendritic cell response to TLR9 agonists. *J. Immunol.* 177, 8701-8707.

Pot,C., Apetoh,L., Awasthi,A., and Kuchroo,V.K. (2011). Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. *Semin. Immunol.* 23, 438-445.

Pot,C., Jin,H., Awasthi,A., Liu,S.M., Lai,C.Y., Madan,R., Sharpe,A.H., Karp,C.L., Miaw,S.C., Ho,I.C., and Kuchroo,V.K. (2009). Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J. Immunol.* 183, 797-801.

Powell,B.R., Buist,N.R., and Stenzel,P. (1982). An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J. Pediatr.* 100, 731-737.

Powrie,F., Leach,M.W., Mauze,S., Caddle,L.B., and Coffman,R.L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.* 5, 1461-1471.

Purev,E., Cai,D., Miller,E., Swoboda,R., Mayer,T., Klein-Szanto,A., Marincola,F.M., Mick,R., Otvos,L., Wunner,W., Birebent,B., Somasundaram,R., Wikstrand,C.J., Bigner,D., DeMichele,A., Acs,G., Berlin,J.A., and Herlyn,D. (2004). Immune responses of breast cancer patients to mutated epidermal growth factor receptor (EGF-RvIII, Delta EGF-R, and de2-7 EGF-R). *J. Immunol.* 173, 6472-6480.

Qin,H.Y., Mukherjee,R., Lee-Chan,E., Ewen,C., Bleackley,R.C., and Singh,B. (2006). A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int. Immunol.* 18, 1001-1015.

Quinn,C.M., Ostrowski,J.L., Parkin,G.J., Horgan,K., and Benson,E.A. (1997). Ductal carcinoma in situ of the breast: the clinical significance of histological classification. *Histopathology* 30, 113-119.

Rajagopal,D., Paturel,C., Morel,Y., Uematsu,S., Akira,S., and Diebold,S.S. (2010). Plasmacytoid dendritic cell-derived type I interferon is crucial for the adjuvant activity of Toll-like receptor 7 agonists. *Blood* 115, 1949-1957.

Ramos,R.N., Oliveira,C.E., Gasparoto,T.H., Malaspina,T.S., Belai,E.B., Cavassani,K.A., Garlet,G.P., Silva,J.S., and Campanelli,A.P. (2012). CD25+ T cell depletion impairs murine squamous cell carcinoma development via modulation of antitumor immune responses. *Carcinogenesis* 33, 902-909.

Ray-Coquard,I., Cropet,C., Van,G.M., Sebban,C., Le,C.A., Judson,I., Tredan,O., Verweij,J., Biron,P., Labidi,I., Guastalla,J.P., Bachelot,T., Perol,D., Chabaud,S., Hogendoorn,P.C., Cassier,P.,

Dufresne,A., and Blay,J.Y. (2009). Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res.* 69, 5383-5391.

Rech,A.J. and Vonderheide,R.H. (2009). Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1174, 99-106.

Redjimi,N., Raffin,C., Raimbaud,I., Pignon,P., Matsuzaki,J., Odunsi,K., Valmori,D., and Ayyoub,M. (2012). CXCR3+ T Regulatory Cells Selectively Accumulate in Human Ovarian Carcinomas to Limit Type I Immunity. *Cancer Res.* 72, 4351-4360.

Regateiro,F.S., Howie,D., Cobbold,S.P., and Waldmann,H. (2011). TGF-beta in transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 660-669.

Reizis,B. (2010). Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 206-211.

Ribot,J., Enault,G., Pilipenko,S., Hucheng,A., Calise,M., Hudrisier,D., Romagnoli,P., and van Meerwijk,J.P. (2007). Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J. Immunol.* 179, 6741-6748.

Richardsen,E., Uglehus,R.D., Johnsen,S.H., and Busund,L.T. (2012). Immunohistochemical expression of epithelial and stromal immunomodulatory signalling molecules is a prognostic indicator in breast cancer. *BMC. Res. Notes* 5, 110.

Romagnoli,P., Dooley,J., Enault,G., Vicente,R., Malissen,B., Liston,A., and van Meerwijk,J.P. (2012). The thymic niche does not limit development of the naturally diverse population of mouse regulatory T lymphocytes. *J. Immunol.* 189, 3831-3837.

Romagnoli,P., Hudrisier,D., and van Meerwijk,J.P. (2005a). Molecular signature of recent thymic selection events on effector and regulatory CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 175, 5751-5758.

Romagnoli,P., Tellier,J., and van Meerwijk,J.P. (2005b). Genetic control of thymic development of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 35, 3525-3532.

Rosenberg,S.A. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384.

Sabat,R., Grutz,G., Warszawska,K., Kirsch,S., Witte,E., Wolk,K., and Geginat,J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 331-344.

Saeki,C., Nakano,M., Takahashi,H., Saito,S., Homma,S., Tajiri,H., and Zeniya,M. (2010). Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. *Clin. Immunol.* 135, 156-166.

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

Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Shimizu,J., Yamazaki,S., Sakihama,T., Itoh,M., Kuniyasu,Y., Nomura,T., Toda,M., and Takahashi,T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory

T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182, 18-32.

Salek-Ardakani,S. and Croft,M. (2006). Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134). *Vaccine* 24, 872-883.

Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118.

Salzer,U., Maul-Pavicic,A., Cunningham-Rundles,C., Urschel,S., Belohradsky,B.H., Litzman,J., Holm,A., Franco,J.L., Plebani,A., Hammarstrom,L., Skrabl,A., Schwinger,W., and Grimbacher,B. (2004). ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Immunol.* 113, 234-240.

Sanner,T., Brennhovd,I., Christensen,I., Jorgensen,O., and Kvaloy,S. (1979). Cellular antitumor immune response in women with risk factors for breast cancer. *Cancer Res.* 39, 654-657.

Sato,E., Olson,S.H., Ahn,J., Bundy,B., Nishikawa,H., Qian,F., Jungbluth,A.A., Frosina,D., Gnjjatic,S., Ambrosone,C., Kepner,J., Odunsi,T., Ritter,G., Lele,S., Chen,Y.T., Ohtani,H., Old,L.J., and Odunsi,K. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 18538-18543.

Satoh,T., Saika,T., Ebara,S., Kusaka,N., Timme,T.L., Yang,G., Wang,J., Mouraviev,V., Cao,G., Fattah el,M.A., and Thompson,T.C. (2003). Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing interleukin 12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Res.* 63, 7853-7860.

Saukkonen,K., Nieminen,O., van,R.B., Vilkki,S., Harkonen,M., Juhola,M., Mecklin,J.P., Sipponen,P., and Ristimaki,A. (2001). Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7, 1923-1931.

Savage,N.D., de,B.T., Walburg,K.V., Joosten,S.A., van,M.K., Geluk,A., and Ottenhoff,T.H. (2008). Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. *J. Immunol.* 181, 2220-2226.

Sawant,D.V., Sehra,S., Nguyen,E.T., Jadhav,R., Englert,K., Shinnakasu,R., Hangoc,G., Broxmeyer,H.E., Nakayama,T., Perumal,N.B., Kaplan,M.H., and Dent,A.L. (2012). Bcl6 Controls the Th2 Inflammatory Activity of Regulatory T Cells by Repressing Gata3 Function. *J. Immunol.*

Schaefer,C., Kim,G.G., Albers,A., Hoermann,K., Myers,E.N., and Whiteside,T.L. (2005). Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br. J. Cancer* 92, 913-920.

Schiavoni,G., Sistigu,A., Valentini,M., Mattei,F., Sestili,P., Spadaro,F., Sanchez,M., Lorenzi,S., D'Urso,M.T., Belardelli,F., Gabriele,L., Proietti,E., and Bracci,L. (2011). Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res.* 71, 768-778.

Schreibelt,G., Tel,J., Sliepen,K.H., Benitez-Ribas,D., Figdor,C.G., Adema,G.J., and de Vries,I.J. (2010). Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications

for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1573-1582.

Schreiber,R.D., Old,L.J., and Smyth,M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.

Schreiner,B., Wischhusen,J., Mitsdoerffer,M., Schneider,D., Bornemann,A., Melms,A., Tolosa,E., Weller,M., and Wiendl,H. (2003). Expression of the B7-related molecule ICOSL by human glioma cells in vitro and in vivo. *Glia* 44, 296-301.

Schubert,L.A., Jeffery,E., Zhang,Y., Ramsdell,F., and Ziegler,S.F. (2001). Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* 276, 37672-37679.

Schuler,P.J., Schilling,B., Harasymczuk,M., Hoffmann,T.K., Johnson,J., Lang,S., and Whiteside,T.L. (2012). Phenotypic and functional characteristics of CD4⁺ CD39⁺ FOXP3⁺ and CD4⁺ CD39⁺ FOXP3^{neg} T-cell subsets in cancer patients. *Eur. J. Immunol.* 42, 1876-1885.

Shankaran,V., Ikeda,H., Bruce,A.T., White,J.M., Swanson,P.E., Old,L.J., and Schreiber,R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.

Sharma,M.D., Baban,B., Chandler,P., Hou,D.Y., Singh,N., Yagita,H., Azuma,M., Blazar,B.R., Mellor,A.L., and Munn,D.H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest* 117, 2570-2582.

Sharma,S., Yang,S.C., Zhu,L., Reckamp,K., Gardner,B., Baratelli,F., Huang,M., Batra,R.K., and Dubinett,S.M. (2005). Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.* 65, 5211-5220.

Shen,E., Zhao,K., Wu,C., and Yang,B. (2011). The suppressive effect of CD25⁺Treg cells on Th1 differentiation requires cell-cell contact partially via TGF- β production. *Cell Biol. Int.* 35, 705-712.

Shen,X., Li,N., Li,H., Zhang,T., Wang,F., and Li,Q. (2010). Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage of hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 1745-1754.

Shevach,E.M. (2000). Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 423-449.

Shevach,E.M. and Stephens,G.L. (2006). The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat. Rev. Immunol.* 6, 613-618.

Shigematsu,H., Reizis,B., Iwasaki,H., Mizuno,S., Hu,D., Traver,D., Leder,P., Sakaguchi,N., and Akashi,K. (2004). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity.* 21, 43-53.

Shilling,R.A., Clay,B.S., Tesciuba,A.G., Berry,E.L., Lu,T., Moore,T.V., Bandukwala,H.S., Tong,J., Weinstock,J.V., Flavell,R.A., Horan,T., Yoshinaga,S.K., Welcher,A.A., Cannon,J.L., and Sperling,A.I. (2009). CD28 and ICOS play complementary non-overlapping roles in the development of Th2 immunity in vivo. *Cell Immunol.* 259, 177-184.

- Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van, D.J., and Mantovani, A. (2000). Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J. Immunol.* *164*, 762-767.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835-1837.
- Sierro, S.R., Donda, A., Perret, R., Guillaume, P., Yagita, H., Levy, F., and Romero, P. (2011). Combination of lentivector immunization and low-dose chemotherapy or PD-1/PD-L1 blocking primes self-reactive T cells and induces anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2217-2228.
- Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., and Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 367-388.
- Sinicrope, F.A., Rego, R.L., Ansell, S.M., Knutson, K.L., Foster, N.R., and Sargent, D.J. (2009). Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* *137*, 1270-1279.
- Sisirak, V., Vey, N., Vanbervliet, B., Duhon, T., Puisieux, I., Homey, B., Bowman, E.P., Trinchieri, G., Dubois, B., Kaiserlian, D., Lira, S.A., Puisieux, A., Blay, J.Y., Caux, C., and Bendriss-Vermare, N. (2011). CCR6/CCR10-mediated plasmacytoid dendritic cell recruitment to inflamed epithelia after instruction in lymphoid tissues. *Blood* *118*, 5130-5140.
- Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., and Zitvogel, L. (2011). Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implications for vaccine design. *Semin. Immunopathol.* *33*, 369-383.
- Siveen, K.S. and Kuttan, G. (2009). Role of macrophages in tumour progression. *Immunol. Lett.* *123*, 97-102.
- Sjoberg, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S.D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J.K., Gazdar, A.F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B.H., Bachman, K.E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., and Velculescu, V.E. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* *314*, 268-274.
- Song, L., Weng, D., Liu, F., Chen, Y., Li, C., Dong, L., Tang, W., and Chen, J. (2012). Tregs promote the differentiation of Th17 cells in silica-induced lung fibrosis in mice. *PLoS. One.* *7*, e37286.
- Sonoda, K.H., Exley, M., Snapper, S., Balk, S.P., and Stein-Streilein, J. (1999). CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J. Exp. Med.* *190*, 1215-1226.
- Spence, P.J. and Green, E.A. (2008). Foxp3+ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 973-978.
- Stagg, J., Divisekera, U., Duret, H., Sparwasser, T., Teng, M.W., Darcy, P.K., and Smyth, M.J. (2011). CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* *71*, 2892-2900.

Stagg,J., Divisekera,U., McLaughlin,N., Sharkey,J., Pommey,S., Denoyer,D., Dwyer,K.M., and Smyth,M.J. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 1547-1552.

Stassen,M., Fondel,S., Bopp,T., Richter,C., Muller,C., Kubach,J., Becker,C., Knop,J., Enk,A.H., Schmitt,S., Schmitt,E., and Jonuleit,H. (2004). Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 1303-1311.

Steinbrink,K., Jonuleit,H., Muller,G., Schuler,G., Knop,J., and Enk,A.H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93, 1634-1642.

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

Steinman,R.M. and Cohn,Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142-1162.

Stoitzner,P., Green,L.K., Jung,J.Y., Price,K.M., Atarea,H., Kivell,B., and Ronchese,F. (2008). Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1665-1673.

Strassmann,G., Patil-Koota,V., Finkelman,F., Fong,M., and Kambayashi,T. (1994). Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J. Exp. Med.* 180, 2365-2370.

Strauss,L., Bergmann,C., Szczepanski,M.J., Lang,S., Kirkwood,J.M., and Whiteside,T.L. (2008). Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J. Immunol.* 180, 2967-2980.

Strioga,M., Pasukoniene,V., and Characiejus,D. (2011). CD8+. *Immunology* 134, 17-32.

Sucher,R., Kurz,K., Weiss,G., Margreiter,R., Fuchs,D., and Brandacher,G. (2010). IDO-Mediated Tryptophan Degradation in the Pathogenesis of Malignant Tumor Disease. *Int. J. Tryptophan. Res.* 3, 113-120.

Sun,C.M., Hall,J.A., Blank,R.B., Bouladoux,N., Oukka,M., Mora,J.R., and Belkaid,Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204, 1775-1785.

Suri-Payer,E., Amar,A.Z., Thornton,A.M., and Shevach,E.M. (1998). CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160, 1212-1218.

Sutmuller,R.P., Morgan,M.E., Netea,M.G., Grauer,O., and Adema,G.J. (2006). Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* 27, 387-393.

Svensson,H., Olofsson,V., Lundin,S., Yakkala,C., Bjorck,S., Borjesson,L., Gustavsson,B., and Quiding-Jarbrink,M. (2012). Accumulation of CCR4(+)CTLA-4 FOXP3(+)CD25(hi) regulatory T cells in colon adenocarcinomas correlate to reduced activation of conventional T cells. *PLoS. One.* 7, e30695.

Szajnik,M., Czystowska,M., Szczepanski,M.J., Mandapathil,M., and Whiteside,T.L. (2010). Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS. One.* 5, e11469.

Szanya,V., Ermann,J., Taylor,C., Holness,C., and Fathman,C.G. (2002). The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol.* 169, 2461-2465.

Taguchi,O. and Nishizuka,Y. (1981). Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* 46, 425-434.

Takahashi,H.K., Iwagaki,H., Hamano,R., Wake,H., Kanke,T., Liu,K., Yoshino,T., Tanaka,N., and Nishibori,M. (2007). Effects of adenosine on adhesion molecule expression and cytokine production in human PBMC depend on the receptor subtype activated. *Br. J. Pharmacol.* 150, 816-822.

Takahashi,N., Matsumoto,K., Saito,H., Nanki,T., Miyasaka,N., Kobata,T., Azuma,M., Lee,S.K., Mizutani,S., and Morio,T. (2009). Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J. Immunol.* 182, 5515-5527.

Teschendorff,A.E., Gomez,S., Arenas,A., El-Ashry,D., Schmidt,M., Gehrman,M., and Caldas,C. (2010). Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC. Cancer* 10, 604.

Thomachot,M.C., Bendriss-Vermare,N., Massacrier,C., Biota,C., Treilleux,I., Goddard,S., Caux,C., Bachelot,T., Blay,J.Y., and Menetrier-Caux,C. (2004). Breast carcinoma cells promote the differentiation of CD34+ progenitors towards 2 different subpopulations of dendritic cells with CD1a(high)CD86(-)Langerin- and CD1a(+)CD86(+)Langerin+ phenotypes. *Int. J. Cancer* 110, 710-720.

Thompson,R.H., Kuntz,S.M., Leibovich,B.C., Dong,H., Lohse,C.M., Webster,W.S., Sengupta,S., Frank,I., Parker,A.S., Zincke,H., Blute,M.L., Sebo,T.J., Cheville,J.C., and Kwon,E.D. (2006). Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 66, 3381-3385.

Thornton,A.M., Korty,P.E., Tran,D.Q., Wohlfert,E.A., Murray,P.E., Belkaid,Y., and Shevach,E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 184, 3433-3441.

Tian,Y., Yuan,C., Ma,D., Zhang,Y., Liu,Y., Zhang,W., Hou,F., and Cui,B. (2011). IL-21 and IL-12 inhibit differentiation of Treg and TH17 cells and enhance cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in patients with cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 21, 1672-1678.

Tivol,E.A., Boyd,S.D., McKeon,S., Borriello,F., Nickerson,P., Strom,T.B., and Sharpe,A.H. (1997). CTLA4lg prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. *J. Immunol.* 158, 5091-5094.

Tonini,G., Nunziata,C., Prete,S.P., Pepponi,R., Turriziani,M., Masci,G., Graziani,G., Bonmassar,E., and De,V.L. (1998). Adjuvant treatment of breast cancer: a pilot immunochemotherapy study with CMF, interleukin-2 and interferon alpha. *Cancer Immunol. Immunother.* 47, 157-166.

Topalian,S.L., Hodi,F.S., Brahmer,J.R., Gettinger,S.N., Smith,D.C., McDermott,D.F., Powderly,J.D., Carvajal,R.D., Sosman,J.A., Atkins,M.B., Leming,P.D., Spigel,D.R., Antonia,S.J., Horn,L., Drake,C.G.,

- Pardoll,D.M., Chen,L., Sharfman,W.H., Anders,R.A., Taube,J.M., McMiller,T.L., Xu,H., Korman,A.J., Jure-Kunkel,M., Agrawal,S., McDonald,D., Kolia,G.D., Gupta,A., Wigginton,J.M., and Sznol,M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443-2454.
- Tran,D.Q., Andersson,J., Wang,R., Ramsey,H., Unutmaz,D., and Shevach,E.M. (2009). GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 13445-13450.
- Treilleux,I., Blay,J.Y., Bendriss-Vermare,N., Ray-Coquard,I., Bachelot,T., Guastalla,J.P., Bremond,A., Goddard,S., Pin,J.J., Barthelemy-Dubois,C., and Lebecque,S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7466-7474.
- Tsuji-Takayama,K., Suzuki,M., Yamamoto,M., Harashima,A., Okochi,A., Otani,T., Inoue,T., Sugimoto,A., Toraya,T., Takeuchi,M., Yamasaki,F., Nakamura,S., and Kibata,M. (2008). The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. *J. Immunol.* **181**, 3897-3905.
- Tsutsui,S., Yasuda,K., Suzuki,K., Tahara,K., Higashi,H., and Era,S. (2005). Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol. Rep.* **14**, 425-431.
- Turner,M.S., Kane,L.P., and Morel,P.A. (2009). Dominant role of antigen dose in CD4+Foxp3+ regulatory T cell induction and expansion. *J. Immunol.* **183**, 4895-4903.
- van der Bruggen,P., Traversari,C., Chomez,P., Lurquin,C., De,P.E., Van den Eynde,B., Knuth,A., and Boon,T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-1647.
- van Maren,W.W., Jacobs,J.F., de Vries,I.J., Nierkens,S., and Adema,G.J. (2008). Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology* **124**, 445-452.
- van Meerwijk,J.P., Marguerat,S., Lees,R.K., Germain,R.N., Fowlkes,B.J., and MacDonald,H.R. (1997). Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J. Exp. Med.* **185**, 377-383.
- Verschraegen,C. (2012). The monoclonal antibody to cytotoxic T lymphocyte antigen 4, ipilimumab, in the treatment of melanoma. *Cancer Manag. Res.* **4**, 1-8.
- Vincent,M.S., Roessner,K., Lynch,D., Wilson,D., Cooper,S.M., Tschopp,J., Sigal,L.H., and Budd,R.C. (1996). Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J. Exp. Med.* **184**, 2109-2117.
- Vinh,D.C., Patel,S.Y., Uzel,G., Anderson,V.L., Freeman,A.F., Olivier,K.N., Spalding,C., Hughes,S., Pittaluga,S., Raffeld,M., Sorbara,L.R., Elloumi,H.Z., Kuhns,D.B., Turner,M.L., Cowen,E.W., Fink,D., Long-Priel,D., Hsu,A.P., Ding,L., Paulson,M.L., Whitney,A.R., Sampaio,E.P., Frucht,D.M., DeLeo,F.R., and Holland,S.M. (2010). Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* **115**, 1519-1529.
- Vlad,G., Chang,C.C., Colovai,A.I., Vasilescu,E.R., Cortesini,R., and Suci-Foca,N. (2010). Membrane and soluble ILT3 are critical to the generation of T suppressor cells and induction of immunological tolerance. *Int. Rev. Immunol.* **29**, 119-132.

Vu,M.D., Xiao,X., Gao,W., Degauque,N., Chen,M., Kroemer,A., Killeen,N., Ishii,N., and Li,X.C. (2007). OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood* **110**, 2501-2510.

Walker,E.B., Haley,D., Miller,W., Floyd,K., Wisner,K.P., Sanjuan,N., Maecker,H., Romero,P., Hu,H.M., Alvord,W.G., Smith,J.W., Fox,B.A., and Urba,W.J. (2004). gp100(209-2M) peptide immunization of human lymphocyte antigen-A2+ stage I-III melanoma patients induces significant increase in antigen-specific effector and long-term memory CD8+ T cells. *Clin. Cancer Res.* **10**, 668-680.

Walker,L.S. and Sansom,D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 852-863.

Walker,M.R., Kasprovicz,D.J., Gersuk,V.H., Benard,A., Van,L.M., Buckner,J.H., and Ziegler,S.F. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J. Clin. Invest* **112**, 1437-1443.

Wang,B., Zaidi,N., He,L.Z., Zhang,L., Kuroiwa,J.M., Keler,T., and Steinman,R.M. (2012). Targeting of the non-mutated tumor antigen HER2/neu to mature dendritic cells induces an integrated immune response that protects against breast cancer in mice. *Breast Cancer Res.* **14**, R39.

Wang,E.C., Moss,P.A., Frodsham,P., Lehner,P.J., Bell,J.I., and Borysiewicz,L.K. (1995). CD8^{high}CD57⁺ T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J. Immunol.* **155**, 5046-5056.

Wang,R., Kozhaya,L., Mercer,F., Khaitan,A., Fujii,H., and Unutmaz,D. (2009). Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 13439-13444.

Watowich,S.S. and Liu,Y.J. (2010). Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol. Rev.* **238**, 76-92.

Weber,J.S., Kahler,K.C., and Hauschild,A. (2012). Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2691-2697.

Wei,S., Kryczek,I., Zou,L., Daniel,B., Cheng,P., Mottram,P., Curiel,T., Lange,A., and Zou,W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **65**, 5020-5026.

Weigelt,B., Geyer,F.C., and Reis-Filho,J.S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol. Oncol.* **4**, 192-208.

Weinberg,A.D., Rivera,M.M., Prell,R., Morris,A., Ramstad,T., Vetto,J.T., Urba,W.J., Alvord,G., Bunce,C., and Shields,J. (2000). Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J. Immunol.* **164**, 2160-2169.

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

Weiss,V.L., Lee,T.H., Song,H., Kouo,T.S., Black,C.M., Sgouros,G., Jaffee,E.M., and Armstrong,T.D. (2012). Trafficking of high avidity HER-2/neu-specific T cells into HER-2/neu-expressing tumors after depletion of effector/memory-like regulatory T cells. *PLoS. One.* **7**, e31962.

- Wilson,J.M., Ross,W.G., Agbai,O.N., Frazier,R., Figler,R.A., Rieger,J., Linden,J., and Ernst,P.B. (2009). The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J. Immunol.* **182**, 4616-4623.
- Wing,K., Onishi,Y., Prieto-Martin,P., Yamaguchi,T., Miyara,M., Fehervari,Z., Nomura,T., and Sakaguchi,S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271-275.
- Wolf,D., Wolf,A.M., Rumpold,H., Fiegl,H., Zeimet,A.G., Muller-Holzner,E., Deibl,M., Gastl,G., Gunsilius,E., and Marth,C. (2005). The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 8326-8331.
- Wong,S.C., Tan,A.H., and Lam,K.P. (2009). Functional hierarchy and relative contribution of the CD28/B7 and ICOS/B7-H2 costimulatory pathways to T cell-mediated delayed-type hypersensitivity. *Cell Immunol.* **256**, 64-71.
- Workman,C.J., Wang,Y., El Kasmi,K.C., Pardoll,D.M., Murray,P.J., Drake,C.G., and Vignali,D.A. (2009). LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J. Immunol.* **182**, 1885-1891.
- Wu,X.R., He,X.S., Chen,Y.F., Yuan,R.X., Zeng,Y., Lian,L., Zou,Y.F., Lan,N., Wu,X.J., and Lan,P. (2012). High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* **106**, 130-137.
- Wu,Y., Borde,M., Heissmeyer,V., Feuerer,M., Lapan,A.D., Stroud,J.C., Bates,D.L., Guo,L., Han,A., Ziegler,S.F., Mathis,D., Benoist,C., Chen,L., and Rao,A. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **126**, 375-387.
- Wyckoff,J., Wang,W., Lin,E.Y., Wang,Y., Pixley,F., Stanley,E.R., Graf,T., Pollard,J.W., Segall,J., and Condeelis,J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res.* **64**, 7022-7029.
- Wyckoff,J.B., Wang,Y., Lin,E.Y., Li,J.F., Goswami,S., Stanley,E.R., Segall,J.E., Pollard,J.W., and Condeelis,J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* **67**, 2649-2656.
- Xiao,S., Jin,H., Korn,T., Liu,S.M., Oukka,M., Lim,B., and Kuchroo,V.K. (2008). Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J. Immunol.* **181**, 2277-2284.
- Xiao,T., Kagami,S., Saeki,H., Sugaya,M., Kakinuma,T., Fujita,H., Yano,S., Mitsui,H., Torii,H., Komine,M., Asahina,A., Nakamura,K., and Tamaki,K. (2003). Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF-alpha and IFN-gamma enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *J. Dermatol. Sci.* **31**, 111-117.
- Xiao,X., Balasubramanian,S., Liu,W., Chu,X., Wang,H., Taparowsky,E.J., Fu,Y.X., Choi,Y., Walsh,M.C., and Li,X.C. (2012). OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat. Immunol.* **13**, 981-990.
- Xiong,Z., Gharagozlou,S., Vengco,I., Chen,W., and Ohlfest,J.R. (2008). Effective CpG immunotherapy of breast carcinoma prevents but fails to eradicate established brain metastasis. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5484-5493.

Xu,L., Xu,W., Wen,Z., and Xiong,S. (2011). In situ prior proliferation of CD4+ CCR6+ regulatory T cells facilitated by TGF-beta secreting DCs is crucial for their enrichment and suppression in tumor immunity. *PLoS. One.* 6, e20282.

Yamagami,W., Susumu,N., Tanaka,H., Hirasawa,A., Banno,K., Suzuki,N., Tsuda,H., Tsukazaki,K., and Aoki,D. (2011). Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 21, 1628-1634.

Yamamoto,T., Yanagimoto,H., Satoi,S., Toyokawa,H., Hirooka,S., Yamaki,S., Yui,R., Yamao,J., Kim,S., and Kwon,A.H. (2012). Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 41, 409-415.

Yang,X.O., Nurieva,R., Martinez,G.J., Kang,H.S., Chung,Y., Pappu,B.P., Shah,B., Chang,S.H., Schluns,K.S., Watowich,S.S., Feng,X.H., Jetten,A.M., and Dong,C. (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 29, 44-56.

Ye,Z.J., Zhou,Q., Zhang,J.C., Li,X., Wu,C., Qin,S.M., Xin,J.B., and Shi,H.Z. (2011). CD39+ regulatory T cells suppress generation and differentiation of Th17 cells in human malignant pleural effusion via a LAP-dependent mechanism. *Respir. Res.* 12, 77.

Yi,K.H. and Chen,L. (2009). Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol. Rev.* 229, 145-151.

Yigit,R., Massuger,L.F., Figdor,C.G., and Torensma,R. (2010). Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecol. Oncol.* 117, 366-372.

Yong,P.F., Salzer,U., and Grimbacher,B. (2009). The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol. Rev.* 229, 101-113.

Yoshie,O., Fujisawa,R., Nakayama,T., Harasawa,H., Tago,H., Izawa,D., Hieshima,K., Tatsumi,Y., Matsushima,K., Hasegawa,H., Kanamaru,A., Kamihira,S., and Yamada,Y. (2002). Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* 99, 1505-1511.

Yoshioka,T., Miyamoto,M., Cho,Y., Ishikawa,K., Tsuchikawa,T., Kadoya,M., Li,L., Mishra,R., Ichinokawa,K., Shoji,Y., Matsumura,Y., Shichinohe,T., Hirano,S., Shinohara,T., Itoh,T., and Kondo,S. (2008). Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 98, 1258-1263.

Yuan,Q., Bromley,S.K., Means,T.K., Jones,K.J., Hayashi,F., Bhan,A.K., and Luster,A.D. (2007). CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* 204, 1327-1334.

Yurchenko,E., Tritt,M., Hay,V., Shevach,E.M., Belkaid,Y., and Piccirillo,C.A. (2006). CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J. Exp. Med.* 203, 2451-2460.

Zabransky,D.J., Nirschl,C.J., Durham,N.M., Park,B.V., Ceccato,C.M., Bruno,T.C., Tam,A.J., Getnet,D., and Drake,C.G. (2012). Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS. One.* 7, e34547.

Zhang,B. (2012). CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncoimmunology.* 1, 67-70.

- Zhang,N., Schroppel,B., Lal,G., Jakubzick,C., Mao,X., Chen,D., Yin,N., Jessberger,R., Ochando,J.C., Ding,Y., and Bromberg,J.S. (2009). Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity*. 30, 458-469.
- Zhao,F., Hoechst,B., Gamrekelashvili,J., Ormandy,L.A., Voigtlander,T., Wedemeyer,H., Ylaya,K., Wang,X.W., Hewitt,S.M., Manns,M.P., Korangy,F., and Greten,T.F. (2012). Human CCR4+ CCR6+ Th17 cells suppress autologous CD8+ T cell responses. *J. Immunol.* 188, 6055-6062.
- Zhao,W., Grubbs,C.J., Myers,R.K., and Nilsen-Hamilton,M. (2010). Parity is associated with an expanded macrophage population in the mammary gland. *Int. J. Oncol.* 37, 1195-1202.
- Zheng,Y., Josefowicz,S., Chaudhry,A., Peng,X.P., Forbush,K., and Rudensky,A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808-812.
- Zhou,J., Ding,T., Pan,W., Zhu,L.Y., Li,L., and Zheng,L. (2009a). Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 125, 1640-1648.
- Zhou,L., Lopes,J.E., Chong,M.M., Ivanov,I.I., Min,R., Victora,G.D., Shen,Y., Du,J., Rubtsov,Y.P., Rudensky,A.Y., Ziegler,S.F., and Littman,D.R. (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240.
- Zhou,X., Bailey-Bucktrout,S.L., Jeker,L.T., Penaranda,C., Martinez-Llordella,M., Ashby,M., Nakayama,M., Rosenthal,W., and Bluestone,J.A. (2009b). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 10, 1000-1007.
- Ziegler,S.F. (2007). FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur. J. Immunol.* 37, 21-23.
- Zou,L., Barnett,B., Safah,H., Larussa,V.F., Evdemon-Hogan,M., Mottram,P., Wei,S., David,O., Curiel,T.J., and Zou,W. (2004). Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res.* 64, 8451-8455.
- Zou,W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 295-307.
- Zou,W., Machelon,V., Coulomb-L'Hermin,A., Borvak,J., Nome,F., Isaeva,T., Wei,S., Krzysiek,R., Durand-Gasselin,I., Gordon,A., Pustilnik,T., Curiel,D.T., Galanaud,P., Capron,F., Emilie,D., and Curiel,T.J. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* 7, 1339-1346.
- Zweier,C., Sticht,H., Aydin-Yaylagul,I., Campbell,C.E., and Rauch,A. (2007). Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 510-517.