



HAL
open science

Etude du rôle de NF- κ B dans les lymphocytes T régulateurs chez la souris

Émilie Ronin

► **To cite this version:**

Émilie Ronin. Etude du rôle de NF- κ B dans les lymphocytes T régulateurs chez la souris. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066222 . tel-01884171

HAL Id: tel-01884171

<https://theses.hal.science/tel-01884171>

Submitted on 30 Sep 2018

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 « Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique »

Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses de Paris

Equipe « Biologie des lymphocytes T régulateurs et Thérapie »

Thèse de doctorat d'Immunologie

Etude du rôle de NF- κ B dans les lymphocytes T régulateurs chez la souris

Présentée par

Emilie Ronin

Soutenue publiquement le Jeudi 28 Septembre 2017 devant un jury composé de :

Professeur Carole ELBIM

Docteur Sylvie MEMET

Docteur Cédric AUFFRAY

Docteur Eliane PIAGGIO

Docteur Robert WEIL

Docteur Benoit SALOMON

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse



SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABBREVIATIONS	5
PREAMBULE.....	2
INTRODUCTION.....	5
I. La tolérance immunitaire	5
1. Tolérance centrale	5
1.1. La sélection positive.....	6
1.2. La sélection négative.....	6
2. Tolérance périphérique.....	8
2.1. Ignorance.....	8
2.2. Anergie.....	9
2.3. Déviation phénotypique	9
2.4. Délétion	10
2.5. Suppression par des cellules régulatrices	11
II. Les lymphocytes T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ régulateurs.....	14
1. Découverte et caractéristiques	14
1.1. Découverte	14
1.2. Caractéristiques phénotypiques.....	14
2. Ontogénie	17
2.1. Lymphocytes T régulateurs thymiques	17
2.2. Lymphocytes T régulateurs périphériques	19
2.3. Lymphocytes T régulateurs induits	21
3. Mécanismes de régulation.....	21
3.1. Cytokines immunosuppressives	21
3.2. Cytolyse.....	22
3.3. Perturbations métaboliques	23
3.4. Inhibition des cellules dendritiques.....	24
4. Plasticité et stabilité.....	26
4.1. Acquisition de nouvelles fonctions	27
4.2. Perte de FoxP3	28

5. Impact du TNF α	30
5.1. Le TNF α	30
5.2. Rôle du TNF α sur les Tregs	31
5.3. L'effet du TNF α sur les Tregs implique NF- κ B	31
III. Rôle de NF- κ B dans le système immunitaire.....	32
1. Voies de signalisation de NF- κ B	32
1.1. Activation des voies de signalisation NF- κ B	33
1.2. I κ B kinases	33
1.3. I κ B.....	34
1.4. Les sous-unités NF- κ B.....	35
2. Implication de NF- κ B dans le système immunitaire.....	38
2.1. Dans les lymphocytes T CD4 ⁺ régulateurs	39
2.2. Dans les lymphocytes T CD4 ⁺ conventionnels	40
2.3. Dans les lymphocytes T CD8 ⁺ conventionnels	42
2.4. Dans les lymphocytes T $\gamma\delta$ non conventionnels	42
OBJECTIFS ET PRINCIPES EXPERIMENTAUX.....	43
MATERIELS ET METHODES	45
1. Souris.....	45
2. Western blot	45
3. Histologie	45
4. Isolement des cellules.....	45
5. Immunomarquages et analyses de cytométrie.....	46
6. Analyse quantitative des cytokines	46
7. Analyse quantitative des immunoglobulines et auto-anticorps.....	47
8. Purification des Tregs et Tconv	47
9. Culture cellulaire	47
10. Colite	48
11. Transferts adoptifs.....	48
12. Analyses statistiques.	48
RESULTATS	49
I. Etude du rôle de la voie canonique de NF- κ B dans les Tregs	49
1. Introduction	49
2. Résultats	50

3. Conclusion.....	53
II. Etude du rôle de la voie non canonique de NF-κB dans les Tregs.....	91
1. Introduction	91
2. Résultats	91
2.1. Suivi clinique des souris <i>Foxp3^{Cre} Relb^{lox}</i>	91
2.2. Etude des populations lymphocytaires des souris <i>Foxp3^{Cre} Relb^{lox}</i>	93
2.3. Etude des populations myéloïdes et NK des souris <i>Foxp3^{Cre} Relb^{lox}</i>	95
2.4. Etude des Tregs des souris <i>Foxp3^{Cre} Relb^{lox}</i>	96
3. Conclusion.....	100
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	101
I. Rôle de RelA dans les Tregs.....	101
1. Rôle de RelA dans le développement des Tregs	102
2. Rôle de RelA sur la biologie des Tregs	102
2.1. Impact sur la migration	103
2.2. Impact sur la survie	103
2.3. Impact sur l'activation.....	104
2.4. Impact sur la capacité suppressive	104
2.5. Impact sur la stabilité	105
3. Physiopathologie des souris <i>Foxp3^{Cre} Relb^{lox}</i>	106
3.1. Défaut multifonctionnel des Tregs.....	106
3.2. Activation incontrôlée des lymphocytes T et B	106
3.3. Instabilité et perte des Tregs.....	107
3.4. Génèse d'ex-Tregs pathogènes.....	107
3.5. Développement d'une inflammation systémique de type auto-immun.....	108
II. Rôle de RelB dans les Tregs.....	110
1. Rôle de RelB dans le développement des Tregs	110
2. Rôle de RelB dans la biologie des Tregs.....	111
2.1. Impact sur la migration et la survie.....	111
2.2. Impact sur l'activation et la prolifération.....	111
2.3. Impact sur la stabilité	112
2.4. Impact sur la capacité suppressive	112
3. Dans l'organogenèse des ganglions	113
4. Physiopathologie des souris <i>Foxp3^{Cre} Relb^{lox}</i>	114
III. Le système CRElox, un modèle idéal ?.....	115

1. Un modèle spécifique.....	115
2. ... mais qui a des limites	116
IV. Applications thérapeutiques	118
1. Stratégies actuelles ciblant les Tregs.....	118
2. Traitements envisageables.....	119
ANNEXES	121
Annexe 1 : Article Pouchy C. <i>et al.</i> , en préparation.....	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
LISTE DES FIGURES.....	182
LISTE DES TABLEAUX.....	183

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AIRE : AutoImmune REgulator

AMPc : Adénosine Mono-Phosphate cyclique

ARN : Acide RiboNucléique

ATF1 : *Activating Transcription Tactor 1*

ATP : Adénosine TriPhosphate

BSA : *Bovine Serum Albumin*

CBA : *Cytometric Bead Array*

CD : *Cluster of Differentiation*

cCET : Cellules Epithéliales Thymiques corticales

mCET : Cellules Epithéliales Thymiques médullaires

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNS : *Conserved non-Coding Sequence*

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

CREB : *Cyclic-AMP Response Element Binding Protein*

CTLA-4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4*

DC : *Dendritic Cells*

DID : Diabète Insulino-Dépendant

DN : Double Négatifs

DP : Double Positifs

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EMSA : *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

Foxp3 : *Forkhead box P3*

GALT : *Gut-Associated Lymphoid Tissues*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GITR : *Glucocorticoid-Induced TNF Receptor*

GVH : *Graft Versus Host*

HLA : *Human Leucocyte Antigen*

IBD : *Inflammatory Bowel Disease*

ICOS : *Inducible T-cell COStimulator*

IDO : Indoleamine 2 3-dioxygénase

Ig : Immunoglobulines

IKK : IκB kinases

IL : InterLeukine

IFN : InterFéroN

IPEX : *Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked*

KO : *Knock-Out*

LAG-3 : *Lymphocyte Activation Gene-3*

LFA-1 : *Leukocyte Function-associated Antigen-1*

LN : *Lymph Nodes*

LPS : LipoPolySaccharide

LT : LymphoToxine

MAI : Maladies Auto-Immunes

MFI : *Mean Fluorescence Intensity*

mLN : *mesenteric Lymph Nodes*

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

NFAT : *Nuclear Factor of Activated T cells*

NF- κ B : *Nuclear Factor- κ B*

NK : *Natural-Killer cells*

NKT : *Natural-Killer T cells*

NOD : *Non-Obese Diabetic*

Nrp1 : *Neuropiline 1*

OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PD-1 : *Programmed Death 1*

RAG : *Recombination-Activating Genes*

RHD : *Domaine d'Homologie Rel*

SNC : *Système Nerveux Central*

SP : *Simple Positifs*

SVF : *Sérum de Veau Fœtal*

TCR : *T Cell Receptor*

Teffs : *lymphocytes T effecteurs*

Tfh : *T follicular helper cells*

Tfr : *T follicular regulatory cells*

TGF- β : *Ttransforming Growth Factor- β*

Th : *T helper cell*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNFR : *TNF receptor*

iTregs : *lymphocytes T régulateurs induits in vitro*

pTregs : *lymphocytes T régulateurs périphériques*

tTregs : *lymphocytes T régulateurs thymiques*

WT : *Wild Type*

YFP : *Yellow Fluorescent Protein*

PREAMBULE

Ces dernières décennies le nombre de cas recensé dans le monde de personnes atteintes de maladies auto-immunes (MAI) telles que la sclérose en plaques, le diabète insulino-dépendant (DID) ou encore le psoriasis n'a cessé d'augmenter. En effet, une récente étude rapporte qu'entre 1985 et 2015 l'incidence des MAI dans le monde a augmenté d'environ 19,1%/an (Lerner *et al.*, 2015).

L'importante progression dans la qualité des dépistages participe très certainement à l'augmentation de ces chiffres mais l'évolution considérable de notre société dans divers domaines depuis des dizaines d'années y contribue très fortement également. Comme l'a rapporté Jean-François Bach, l'amélioration globale de notre hygiène de vie et l'attention, parfois excessive, que nous y portons a certes permis de diminuer drastiquement les cas d'infection mais semble avoir favorisé l'émergence de MAI et d'allergies (Bach, 2002). D'autre part, notre contact grandissant avec divers perturbateurs endocriniens présents dans certains cosmétiques, médicaments, pesticides ou encore plastiques, permet également d'expliquer cette hausse. Il a notamment été récemment démontré que les oestrogènes sont capables de moduler l'élimination des cellules à l'origine des MAI conduisant ainsi à une sensibilité plus forte à développer ces pathologies (Dragin *et al.*, 2016). Cette sensibilité pourrait être augmentée par les perturbateurs endocriniens.

Les traitements actuels des MAI consistent en la prise de corticoïdes pour limiter l'inflammation, d'immunosuppresseurs afin de diminuer les réponses immunitaires, l'injection d'insuline dans le cas du DID, la réalisation d'une plasmaphèrese qui permet d'éliminer transitoirement les auto-anticorps, ou encore l'injection d'anticorps monoclonaux ou d'analogues de récepteurs solubles ciblant des cytokines pro-inflammatoires telles que le *Tumor Necrosis Factor* (TNF). L'ensemble de ces thérapies a comme principal défaut qu'elles sont non spécifiques et ont donc des conséquences plus ou moins importantes parmi lesquelles l'augmentation du risque d'infections, de par l'inhibition voire la destruction des cellules immunitaires, ainsi qu'une toxicité sur les cellules saines de l'organisme.

Ainsi, la croissance importante de l'incidence de ces maladies et les effets néfastes de leurs traitements existants poussent à vouloir mieux comprendre les mécanismes à l'origine de leur apparition, leur évolution et leur persistance afin de pouvoir les traiter le plus efficacement possible en limitant les effets indésirables.

Le système immunitaire tient un rôle très important dans la physiopathologie des MAI notamment du fait que c'est un défaut de son fonctionnement qui va contribuer à leurs développements. En effet, dans le cas des MAI des cellules du système immunitaire attaquent de façon anormale des cellules saines de l'organisme conduisant par exemple à des dysfonctionnements hormonaux, dans le cas du diabète insulino-dépendant, ou neurologiques, dans le cas de la sclérose en plaques. Ces réponses immunes sont majoritairement contrôlées par les lymphocytes T régulateurs (Tregs), cellules du système immunitaire ayant la particularité de pouvoir stopper l'activation de ce dernier. Par conséquent, les Tregs ont un rôle bénéfique dans le cas des MAI puisqu'ils vont inhiber la réaction immune anormale qui a lieu contre l'organisme (Sakaguchi *et al.*, 2006; Brusko *et al.*, 2008). De façon similaire, les Tregs jouent également un rôle important dans la tolérance materno-foetale (La Rocca *et al.*, 2014), la transplantation (Safinia *et al.*, 2013) ou encore les allergies (Noval Rivas and Chatila, 2016). En revanche, ils ont un effet délétère dans certains cancers du fait qu'ils vont empêcher l'élimination efficace des cellules tumorales (Onizuka *et al.*, 1999a; Nishikawa and Sakaguchi, 2010). Les Tregs jouent donc un rôle critique dans l'évolution de ces pathologies et sont donc une cible thérapeutique intéressante.

La modulation, par l'inhibition ou la stimulation, spécifique des Tregs fait ainsi partie des nouvelles thérapies développées pour le traitement de ces maladies. Le ciblage à l'aide d'anticorps de molécules préférentiellement exprimé par les Tregs fait partie de ces nouveaux traitements. Il a ainsi été montré que l'injection chez la souris d'anti-CD25, qui est la chaîne α du récepteur à l'interleukine (IL)-2 et qui est fortement exprimé par les Tregs, conduit à une diminution de la proportion de ces cellules associée à un rejet tumoral (Onizuka *et al.*, 1999a). La thérapie cellulaire qui consiste à extraire les Tregs du patient pour les amplifier et/ou les modifier *ex vivo* avant de les réinjecter dans le tissu malade montre également des résultats prometteurs dans le traitement des MAI (Bluestone *et al.*, 2015; Grégoire *et al.*, 2016). Plusieurs études ont également mis en évidence l'intérêt de l'injection d'IL-2, cytokine essentielle au fonctionnement des Tregs, dans le traitement du diabète insulino-dépendant (Grinberg-Bleyer *et al.*, 2010a; Hartemann *et al.*, 2013). L'ensemble de ces nouvelles thérapies sera traité plus en détails dans la discussion de ma thèse.

L'ensemble de ces données conduit donc à poursuivre la recherche sur le fonctionnement des cellules impliquées dans les MAI et cancers, notamment des Tregs qui jouent un rôle important dans leur développement. En effet, une meilleure connaissance de ces cellules permettra d'améliorer les thérapies existantes voire d'en envisager de nouvelles qui soient encore plus spécifiques et donc, par conséquent, plus efficaces tout en limitant les effets secondaires.

INTRODUCTION

I. La tolérance immunitaire

La tolérance immunitaire est un processus physiologique qui permet de prévenir et inhiber toute réaction du système immunitaire envers les tissus sains de l'organisme. Il se déroule de façon continue en plusieurs endroits du corps et implique des cellules et mécanismes variés. Le tissu spécialisé de ce processus est le thymus où la grande majorité des cellules pouvant réagir contre le soi est éliminée, il s'agit de la tolérance centrale. Celle-ci n'étant pas absolue, certaines de ces cellules auto-réactives parviennent à gagner les tissus lymphoïdes périphériques où elles peuvent être activées. Afin d'empêcher une réaction anormale de ces dernières contre l'organisme, d'autres mécanismes existent pour les réguler dans les différents tissus du corps, c'est la tolérance périphérique.

1. Tolérance centrale

Les précurseurs des lymphocytes T, dépourvus de récepteur à l'antigène (TCR pour *T Cell Receptor*) et des molécules co-réceptrices CD8 et CD4, sont produits dans la moelle osseuse. Ils vont ensuite migrer dans le thymus où ils vont se différencier en lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺ conventionnels ou en lymphocytes T régulateurs. C'est dans ce tissu qu'ils vont acquérir leur TCR, constitué pour la presque totalité des lymphocytes T d'une chaîne α et d'une chaîne β , qui permet l'initiation de leur activation suite à la reconnaissance spécifique d'un antigène présenté, sous forme de peptide, par une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). La génération du TCR, qui s'accompagne de l'expression des co-récepteurs CD8 et CD4, se fait par une recombinaison aléatoire de différents segments géniques grâce notamment aux protéines *Recombination-Activating Genes* (RAG) et conduit à la création d'un répertoire de TCR vaste et non pleinement opérationnel. Une sélection des lymphocytes T ainsi produits va donc être nécessaire avant que ces derniers ne gagnent les organes lymphoïdes périphériques, comme la rate et les ganglions lymphatiques (**Figure 1**).

1.1. La sélection positive

La première étape de cette sélection va consister à conserver uniquement les lymphocytes T capables de reconnaître un complexe peptide du soi-CMH présenté par les cellules épithéliales thymiques (CET) du cortex (cCET), c'est la sélection positive. Celle-ci est dépendante de l'affinité du TCR pour les complexes peptide du soi-CMH puisque seuls les lymphocytes T ayant un TCR présentant une affinité suffisante vont recevoir des signaux de survie (Kyewski and Klein, 2006; Klein *et al.*, 2009; **Figure 2**). Ceci va conduire à l'élimination d'environ 90% des lymphocytes T tandis que les 10% restant vont maturer vers un stade n'exprimant plus que le co-récepteur CD8 ou CD4.

1.2. La sélection négative

Suite à cet important écrémage, les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ vont migrer du cortex vers la medulla où ils vont résider pendant 4 à 5 jours. Durant cette période va avoir lieu l'élimination des lymphocytes T ayant une affinité trop forte de leur TCR envers les complexes peptide du soi-CMH (Kappler *et al.*, 1987; Ober *et al.*, 2000) (**Figure 2**), présentés par les CET de la medulla (mCET) ainsi que par les cellules dendritiques (DC pour *Dendritic Cells*) qui y sont présentes, c'est la sélection négative. Ceci est un point clé de la tolérance centrale puisque ces lymphocytes T, dits auto-réactifs, sont capables de créer une réponse immunitaire contre le soi en périphérie (Kurobe *et al.*, 2006) susceptibles d'engendrer ainsi une pathologie auto-immune. Afin de diminuer ce risque, les mCET ont la capacité de présenter un large panel de peptides du soi grâce au facteur de transcription AutoImmune REgulator (AIRE) (Anderson *et al.*, 2002). Quant aux DC, résidentes ou en provenance de la périphérie, elles vont présenter des antigènes du soi qu'elles auront capté au sein du thymus suite à l'apoptose des mCET (Gallegos and Bevan, 2004), dans les tissus périphériques (Hadeiba *et al.*, 2012) ou encore dans le sang (Atibalentja *et al.*, 2011). C'est également lors de cette étape que certains lymphocytes T se différencient en Tregs. En effet, un intervalle d'affinité situé entre les niveaux conduisant à la sélection positive et à la sélection négative serait à l'origine du développement des Tregs (Jordan *et al.*, 2001) (Apostolou *et al.*, 2002), point qui sera plus détaillé par la suite.

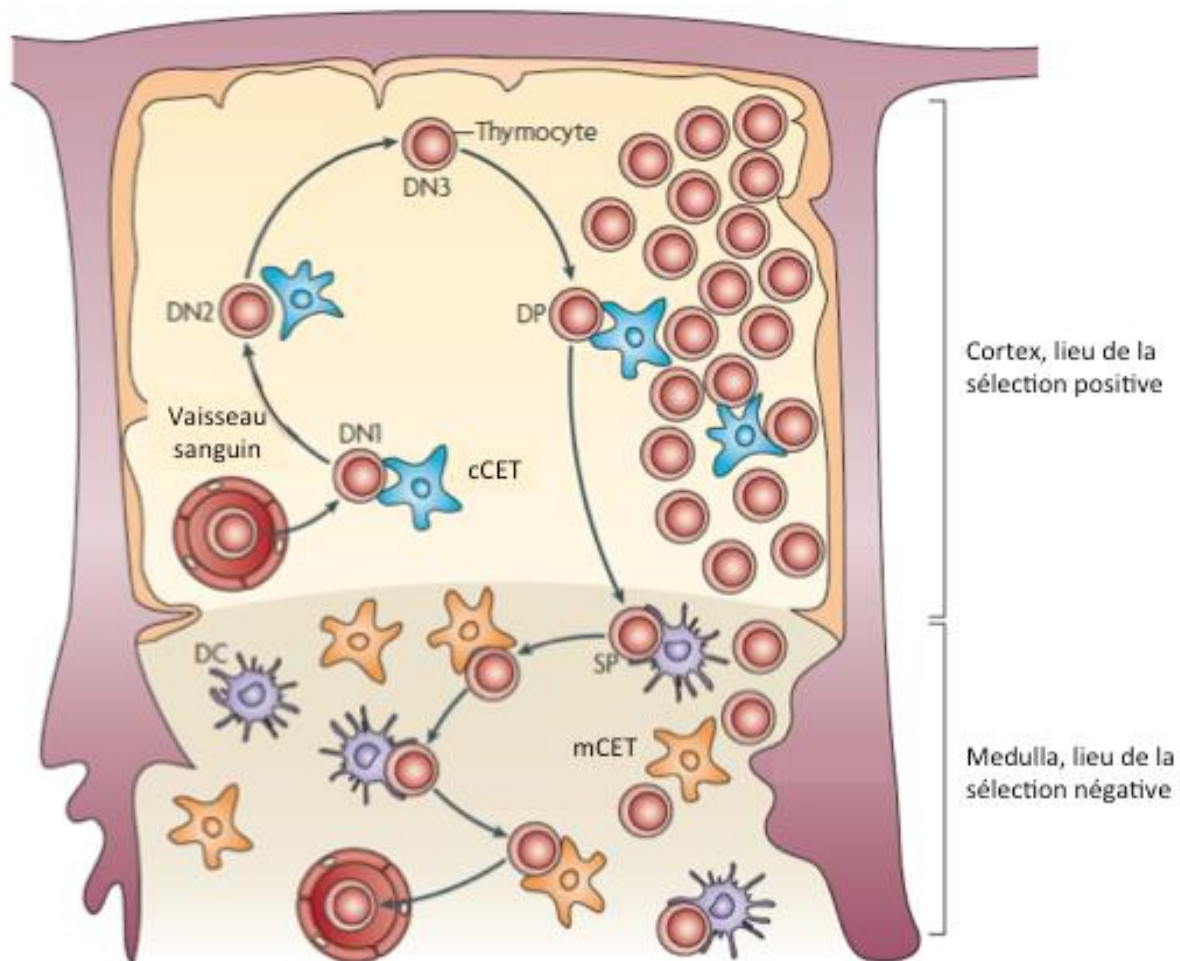


Figure 1 : Etapes thymiques de formation des lymphocytes T (Adapté de Klein *et al.*, 2009). Les précurseurs des lymphocytes T, dits doubles négatifs (DN) de par l'absence des co-récepteurs CD8 et CD4, entrent dans le thymus au niveau du cortex. Leur TCR est alors généré et les molécules CD8 et CD4 exprimées, conduisant à la formation d'une population dite double positive (DP). Les lymphocytes T capables de reconnaître de façon modérée un complexe peptide du soi-CMH présenté par les cCET reçoivent des signaux de survie, c'est la sélection positive, et maturent vers un stade dit simple positif (SP) où ils n'expriment plus que le co-récepteur CD8 ou CD4. Ils migrent ensuite vers la medulla où ceux ayant une affinité trop forte envers les complexes peptide du soi-CMH présentés par les mCET et les DC qui y sont présentes vont être éliminés, c'est la sélection négative. Les lymphocytes T restant sortent alors du thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes périphériques.

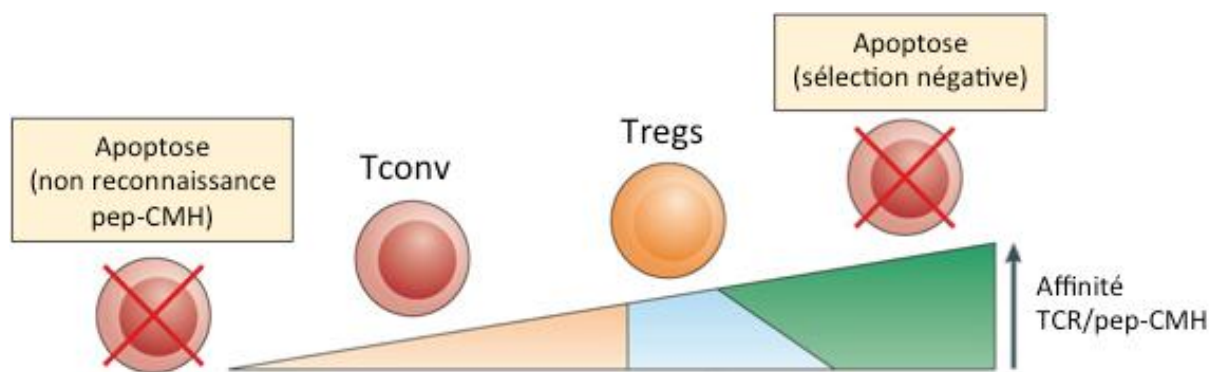


Figure 2 : Sélection thymique des lymphocytes T en fonction du niveau d'affinité de leur TCR (Adapté de Klein *et al.*, 2014). Les lymphocytes T incapables de reconnaître un complexe peptide du soi-CMH (pep-CMH) (à gauche) ou ayant une affinité trop forte pour ce dernier (à droite) sont éliminés par apoptose. Ceux ayant une affinité modérée reçoivent des signaux de survie et formeront la population de lymphocytes T conventionnels (Tconv), tandis que ceux ayant une affinité légèrement plus forte se différencieraient en lymphocytes T régulateurs (Tregs).

2. Tolérance périphérique

Bien que les processus de sélection positive et négative conduisent à l'élimination d'environ 95% des lymphocytes T générés, certains lymphocytes T auto-réactifs parviennent tout de même à gagner la périphérie. Ceci peut conduire à l'altération importante des tissus sains de façon directe par l'induction d'une pathologie auto-immune. D'autre part, si une réponse immune à une infection ou un allergène n'est pas correctement contrôlée cela peut conduire à l'altération des tissus environnants. Par ailleurs, il est important lors de la grossesse de rendre le système immunitaire tolérant à l'embryon. Afin donc d'éviter toute réaction non désirée contre l'organisme de la part de lymphocytes T activés, différents mécanismes existent pour les inhiber et/ou les éliminer (**Figure 4**).

2.1. Ignorance

Un de ces mécanismes est « l'ignorance » de l'auto-antigène. Cela signifie que soit ce dernier n'est pas accessible aux lymphocytes T auto-réactifs, comme c'est le cas pour le cerveau et les yeux qui sont protégés par les barrières hémato-encéphalique et hémato-oculaires respectivement et sont ainsi définis comme des sites « immuno-privilegiés » (Shechter *et al.*, 2013) ; soit que l'auto-antigène est présent en trop faible quantité pour pouvoir déclencher une réponse immune (Kurts *et al.*, 1999).

2.2. Anergie

Si le lymphocyte T auto-réactif rencontre son antigène cible, 1^{ère} étape de son activation, mais qu'il ne reçoit pas de signaux de co-stimulation, 2^{nde} étape indispensable à son activation, il se retrouve alors dans un état inactif défini comme anergique (Jenkins and Schwartz, 1987; Schwartz, 1990). La molécule *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4* (CTLA-4) présente à la surface des lymphocytes T activés peut également conduire à cette anergie en rentrant en compétition avec le CD28 pour les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 présentes à la surface des Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) (Krummel and Allison, 1995; Walunas *et al.*, 1996). Il a également été montré que l'activation du récepteur *Programmed cell Death 1* (PD-1) conduit à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés et de leur sécrétion de cytokines (Freeman *et al.*, 2000). Ces cellules anergiques sont caractérisées par l'expression de deux marqueurs phénotypiques, CD73 et FR4 (Martinez *et al.*, 2012).

2.3. Déviation phénotypique

L'environnement cytokinique dans lequel se trouve un lymphocyte T CD4⁺ reconnaissant un antigène dicte son devenir. Ainsi, la présence par exemple d'IL-12 conduit à sa différenciation en lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire (Th pour *T helper*) 1, celle d'IL-4 en Th2, celle du *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) et d'IL-6 en Th17 tandis que la présence de TGF-β seul aboutit à une conversion en Tregs (**Figure 3**). Chacune de ces sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ ayant un profil de sécrétion cytokinique différent, leurs rôles et conséquences tissulaires peuvent être très différents (Zhou *et al.*, 2008; Tangye *et al.*, 2013; Kaplan *et al.*, 2015).

La déviation phénotypique correspond à une réorientation de la réponse immune vers un sous-type différent de lymphocyte T. Par exemple, dans l'intestin, la sécrétion de TGF-β permet d'induire et de maintenir une tolérance envers le microbiote intestinal et les antigènes alimentaires, antigènes pourtant exogènes (Mowat, 2003).

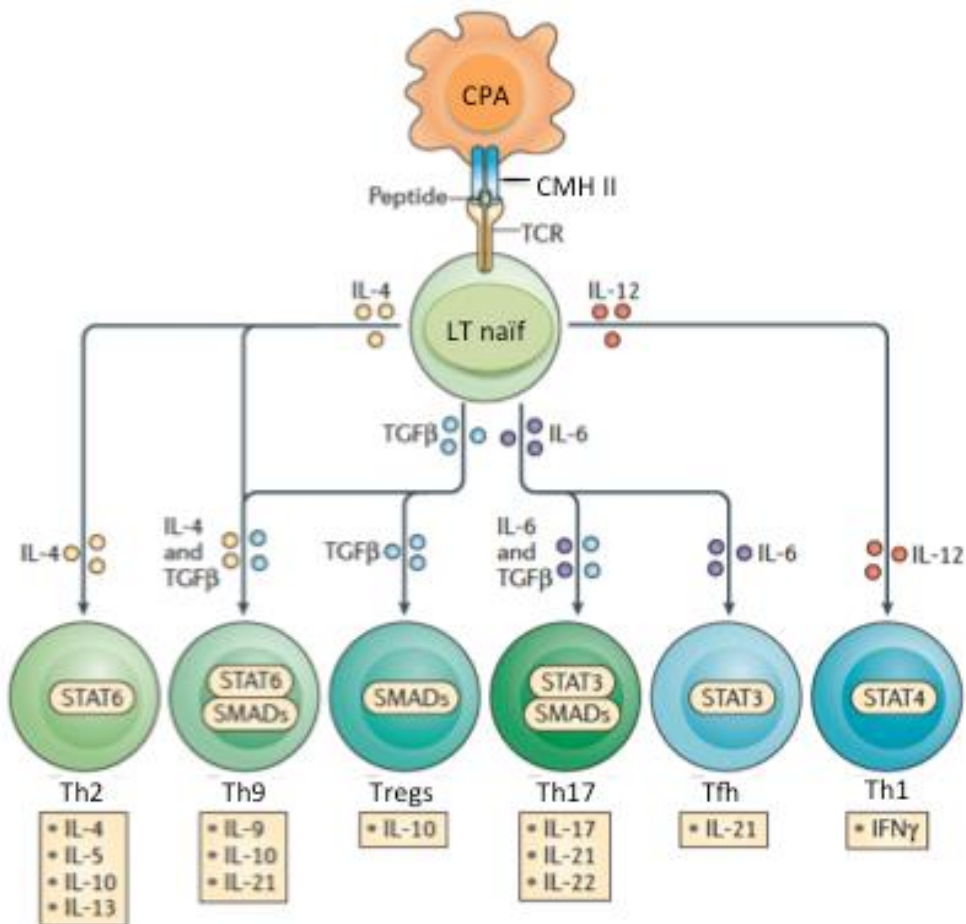


Figure 3 : Différentiation d'un lymphocyte T CD4⁺ naïf en fonction de l'environnement cytokinique (Adapté de Kaplan *et al.*, 2015). Le lymphocyte T CD4⁺ naïf (LT naïf) reconnaît un complexe peptide-CMH de classe II présenté par une CPA ainsi que les molécules de co-stimulation présentes à la surface de cette dernière. La ou les cytokines présente(s) dans son environnement, telles que l'IL-4 ou l'IL-12, vont induire l'expression de facteurs de transcription au sein des lymphocytes T, comme STAT6 ou STAT4, qui vont eux-mêmes conduire à la sécrétion de cytokines spécifiques, définissant un sous-type de lymphocyte T CD4⁺ particulier, Th2 ou Th1 par exemple.

2.4. Délétion

La dernière régulation intrinsèque que les lymphocytes T peuvent subir est similaire à la sélection négative puisqu'il s'agit de l'induction de leur mort par apoptose suite à la reconnaissance d'un auto-antigène. Ce mécanisme implique le récepteur de mort Fas et son ligand FasL, présents à la surface des lymphocytes T et CPA respectivement (Singer and Abbas, 1994; Dhein *et al.*, 1995). Il a notamment été observé que les souris déficientes pour ce récepteur ou son ligand développent une maladie similaire au lupus érythémateux (Cohen and Eisenberg, 1991) et que les patients atteints du syndrome auto-immun lymphoprolifératif ont également un défaut dans ce récepteur (Fisher *et al.*, 1995; Price *et al.*, 2014).

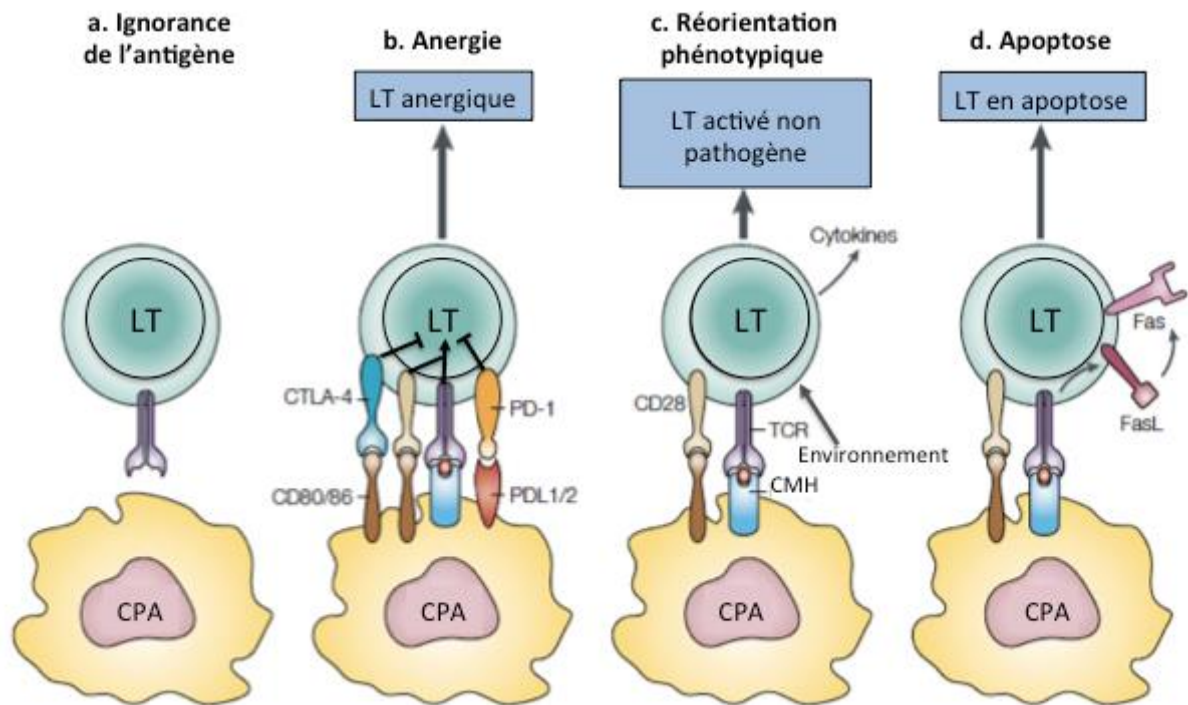


Figure 4 : Mécanismes intrinsèques de régulation périphérique des lymphocytes T (Walker and Abbas, 2002). L'activation des lymphocytes T auto-réactifs peut être inhibée intrinsèquement en périphérie de différentes façons : par la restriction d'accès à l'auto-antigène (a), par l'induction d'un phénotype incapable de répondre à une stimulation (b), par une réorientation phénotypique (c) ou encore par l'induction de leur mort par apoptose (d).

2.5. Suppression par des cellules régulatrices

En dehors des mécanismes intrinsèques de régulation précédemment présentés, l'activité des lymphocytes T peut également être contrôlée par des cellules ayant une capacité immuno-suppressive.

Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ FoxP3⁺

Les cellules régulatrices les mieux décrites sont les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ *Forkhead box P3* (FoxP3)⁺. Ces derniers se différencient soit dans le thymus, on parle de tTregs (pour *thymic Tregs*), soit en périphérie, on parle alors de pTregs (pour *peripheral Tregs*), et régulent les réponses immunitaires au travers de différents mécanismes, tels que l'inhibition par la molécule CTLA-4 ou la cytokine TGF-β. La délétion spécifique de ces cellules chez la souris aboutit au développement d'une maladie auto-immune sévère qui est restaurée par la réinjection de cette même population (Kim *et al.*, 2009). La partie suivante de cette introduction est entièrement consacrée à la présentation de cette population.

Les lymphocytes T CD4⁺ Tr1 et Th3

Des lymphocytes T CD4⁺ FoxP3⁻ sécrétant des cytokines immunosuppressives ont également été décrits. En effet, Groux *et al.* ont montré que des lymphocytes T CD4⁺ naïfs cultivés en présence d'IL-10 acquéraient la capacité de sécréter de l'IL-10 et d'inhiber la prolifération de lymphocytes T CD4⁺. Ils ont confirmé ce phénotype régulateur *in vivo* dans un modèle de colite et ont ainsi choisi de dénommer cette population « Tr1 » (Groux *et al.*, 1997). Dans une autre pathologie, l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), modèle murin de la sclérose en plaques, Chen *et al.* ont mis en évidence l'existence de lymphocytes T CD4⁺ produisant de grande quantité de TGF-β capables de réguler la maladie. Cette population, souvent dénommée « Th3 », produit également des quantités variables d'IL-4 et IL-10 (Chen *et al.*, 1994).

Les lymphocytes T régulateurs CD8⁺

Les lymphocytes T régulateurs CD8⁺ constituent une population régulatrice émergente. D'origine thymique, différents sous-types ont été décrits chez l'homme et la souris qui sont distingués par l'expression et la production différentes de certaines molécules et cytokines (Pomié *et al.*, 2008; Dinesh *et al.*, 2010). Leur capacité suppressive *in vitro* envers des lymphocytes T effecteurs (Teffs) a été montré comme équivalente, voire plus grande, que les Tregs CD4⁺ FoxP3⁺ (Churlaud *et al.*, 2015). D'autre part, de nombreuses études mettent en évidence leur rôle régulateur *in vivo* de par leur capacité à prévenir diverses maladies auto-immunes. Il a notamment été montré que la déplétion de la population de lymphocytes T CD8⁺ CD122⁺ chez la souris conduit à une augmentation de l'infiltrat cellulaire T dans le Système Nerveux Central (SNC) au cours de l'EAE. En revanche, le transfert de cette population pré-activée diminue la sévérité de la maladie (Lee *et al.*, 2008). L'importance de la régulation des Teffs par ces cellules a également été observée dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin (IBD pour *Inflammatory Bowel Disease*) (MÉNager–Marcq *et al.*, 2006) et le diabète auto-immun (Wang *et al.*, 2009).

Les lymphocytes T γδ

Originaires du thymus comme les lymphocytes T αβ, les lymphocytes T γδ représentent une faible population de lymphocytes T dont le TCR est constitué d'une chaîne γ et d'une chaîne δ. Ils ont la capacité de sécréter une grande variété de cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-6 ou encore l'IL-10, en fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent (Kapp *et al.*, 2004). L'absence de ces cellules augmente la sévérité du lupus érythémateux

chez des souris (Peng *et al.*, 1996) ainsi que de l'arthrite dans le modèle murin correspondant lorsqu'elles sont éliminées au cours de la pathologie (Peterman *et al.*, 1993).

Les cellules Natural-Killer T

Les cellules *Natural-Killer T* (NKT) partagent des propriétés à la fois avec les lymphocytes T et les cellules *Natural-Killer* (NK). En effet, elles possèdent un TCR $\alpha\beta$, dont la chaîne α est invariante pour la grande majorité, et expriment les molécules CD44 et CD69, marqueurs des lymphocytes T, ainsi que NK1.1 et Ly 49, marqueurs des cellules NK (Godfrey *et al.*, 2004). Elles ont la capacité de ne reconnaître que des sphingolipides présentés par la molécule CD1d, molécule du CMH de classe I non classique (Zhou *et al.*, 2004). Un rôle régulateur de ces cellules a été montré dans diverses pathologies dont notamment dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVH pour *Graft Versus Host*), où ils en empêchent l'apparition grâce à la sécrétion d'IL-4 (Zeng *et al.*, 1999), et dans le modèle murin du diabète auto-immun, où leur injection prévient le développement de la maladie grâce à leur production d'IL-4 et d'IL-10 (Hammond *et al.*, 1998; Lehuen *et al.*, 1998).

II. Les lymphocytes T CD4⁺ FoxP3⁺ régulateurs

Les lymphocytes T CD4⁺ FoxP3⁺ régulateurs constituent la population régulatrice la mieux décrite. Comme présenté précédemment, il en existe différentes populations, définies en fonction de leur lieu de différenciation, et ils ont pour rôle de réguler les réponses immunes au travers de différents mécanismes. Leur découverte a été une avancée majeure dans la compréhension du système immunitaire et a ouvert la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des maladies auto-immunes et des cancers notamment.

1. Découverte et caractéristiques

1.1. Découverte

La première suspicion de l'existence de cellules régulatrices date de 1969. Nishizuka et Sakakura ont observé qu'une thymectomie réalisée chez des souris de 3 jours conduisait à un développement anormal des ovaires, restauré grâce à une greffe de thymus réalisée au plus tard 7 jours après (Nishizuka and Sakakura, 1969). Dans le même temps, Gershon et Kondo ont montré que des cellules du thymus étaient capables d'inhiber les réponses immunes (Gershon and Kondo, 1970). Quelques années plus tard, des expériences similaires de thymectomie réalisée chez le rat adulte montraient que celle-ci aboutissait au développement d'une maladie auto-immune, la thyroïdite (Penhale *et al.*, 1973). Enfin, il a été montré que l'injection de lymphocytes T était capable de restaurer ces phénotypes (Penhale *et al.*, 1976; Sakaguchi *et al.*, 1982).

1.2. Caractéristiques phénotypiques

L'ensemble des résultats précédemment exposés conduisit à une recherche intensive de marqueurs spécifiques de cette population lymphocytaire T régulatrice en vue de pouvoir mieux l'étudier et l'exploiter.

CD5

Le 1^{er} marqueur mis en évidence fut CD5 (Lyt-1). En effet, il a été observé que le transfert chez la souris de cellules spléniques en ayant préalablement éliminé celles CD5^{hi} aboutissait au développement d'une maladie auto-immune, restaurée par l'injection de ces mêmes cellules CD5^{hi} (Sakaguchi *et al.*, 1985).

CD45RB

Le même type d'expériences permet de montrer que les cellules CD4⁺ CD45RB^{low} avaient la capacité d'inhiber le développement de la maladie auto-immune sévère induite par le transfert seul en souris lymphopéniques des lymphocytes CD4⁺ CD45RB^{hi} (Powrie and Mason, 1990).

CD25

L'état se resserra lorsqu'en 1995 Sakaguchi *et al.* observèrent que toutes les cellules CD25^{hi}, qui est la chaîne α du récepteur à l'IL-2, étaient positives pour les précédents marqueurs mis en évidence. Puis, ils ont montré que le transfert de cellules CD25⁻ induisait une auto-immunité qui était inhibée par le co-transfert de cellules CD25⁺ (Sakaguchi *et al.*, 1995). L'équipe observa également que le transfert des cellules CD25⁺ dans des souris ayant subi une thymectomie permettait à nouveau de prévenir le développement de la pathologie auto-immune initialement présente chez ces souris (Asano *et al.*, 1996).

FoxP3

C'est finalement au début des années 2000 que fut identifié le marqueur clé des Tregs : le facteur de transcription FoxP3. Il fut tout d'abord mis en évidence comme étant le gène à l'origine du développement des maladies auto-immunes sévères observées chez les souris scurfy et les patients atteints du syndrome *Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked* (IPEX) (Bennett *et al.*, 2001; Brunkow *et al.*, 2001). Puis, différentes équipes de recherche démontrèrent qu'il s'agissait du marqueur spécifique des Tregs CD4⁺ CD25⁺ et qu'il était essentiel à leur fonction (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003). En effet, ils ont observé que FoxP3 était très fortement et presque uniquement exprimé par les Tregs CD4⁺ CD25⁺ et qu'il y avait une corrélation entre l'expression de FoxP3 et la capacité suppressive des cellules. De plus, ils ont montré que l'expression ectopique de FoxP3 dans des cellules CD4⁺ CD25⁻ leur conférait un phénotype identique aux Tregs CD4⁺ CD25⁺ « naturels », de par leur surexpression de CD25, CTLA-4, *Glucocorticoid-Induced TNF Receptor* (GITR) et leur capacité suppressive. La spécificité et l'importance de FoxP3 dans le contrôle de la réponse immune ont ensuite été confirmées par l'utilisation de souris transgéniques dans lesquelles l'élimination spécifique des cellules exprimant FoxP3 induisait le développement d'une maladie auto-immune sévère similaire à celle des souris scurfy (Fontenot *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2007; Lahl *et al.*, 2007).

Après l'activation des Tregs, FoxP3 induit de façon directe ou indirecte l'expression et la répression de centaines de gènes ainsi que de microARN (miARN). Parmi les gènes régulés, il

a été montré que certains sont impliqués dans le contrôle épigénétique ou encore l'activation des lymphocytes T (Marson *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été mis en évidence que FoxP3 régule l'expression de certains gènes, tels que ceux de l'IL-2 et CTLA-4, en formant des complexes avec d'autres facteurs de transcription comme NFAT et AML-1 (Wu *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2007).

Les principaux marqueurs utilisés pour identifier et analyser les Tregs murins et humains sont résumés dans le **tableau 1**.

Marqueurs	Expression chez la souris	Expression chez l'homme	Fonction et commentaires
CD25	+ (80% des Tregs)	fort (<50% des Tregs)	expression augmente avec leur activation, nécessaire à leur survie, participe à leur effet suppresseur
FoxP3	+ (100% des Tregs)	+ (100% des Tregs)	expression spécifique des Tregs, indispensable à leur développement et fonction
CTLA-4	+ (40% des Tregs)	+ (100% des Tregs)	expression augmente avec leur activation, participe à leur effet suppresseur
ICOS	+ (>50% des Tregs)	+	expression augmente avec leur activation
CD103	+ (10-30% des Tregs)	+ (<5% des Tregs)	permet leur migration vers la peau et les muqueuses
CCR6	+ (15-30% des Tregs)	+ (20-80% des Tregs)	permet leur migration vers les tissus enflammés avec présence de Th17
CD127	-/faible	-/faible	expression augmente avec leur activation
GITR	fort	+	expression augmente avec leur activation
CD39	+ (100% des Tregs)	+ (60% des Tregs)	participe à leur effet suppresseur
TNFR2	+ (30-80% des Tregs)	+ (70-100% des Tregs)	neutraliserait le TNF et permet son effet stimulant sur leur prolifération
HLA-DR		+ (30% des Tregs)	participe à leur effet suppresseur
CD49d		-	permet l'exclusion des Teffs

Tableau 1 : Marqueurs murins et humains des Tregs (adapté de Chen et Oppenheim 2011).

2. Ontogénie

Différentes populations de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ FoxP3⁺ ont été définies en fonction de leur origine. On distingue ainsi les Tregs qui se développent dans le thymus (tTregs, anciennement dénommés « Tregs naturels » ou nTregs), ceux qui se différencient en périphérie (pTregs anciennement dénommés « Tregs induits » ou iTregs) et ceux induits *in vitro* (iTregs).

2.1. Lymphocytes T régulateurs thymiques

Les tTregs se développent dans le thymus à partir de lymphocytes T CD4⁺ soumis à un enchaînement de différents signaux (**Figure 5**).

Affinité et avidité du TCR

Le 1^{er} signal de différenciation est une interaction spécifique et forte du TCR des lymphocytes T CD4⁺ avec un complexe peptide du soi-CMH. En effet, il a été démontré que des souris exprimant un unique TCR transgénique reconnaissant un peptide de l'ovalbumine présentaient une déficience en Tregs (Itoh *et al.*, 1999). De façon similaire, il a été observé que les Tregs ayant un TCR transgénique se développaient uniquement si l'antigène correspondant était exprimé (Jordan *et al.*, 2001; Apostolou *et al.*, 2002). D'autre part, Moran *et al.* ont mis en évidence l'importance de l'avidité du TCR pour le complexe peptide du soi-CMH dans la génération des Tregs à l'aide d'une souris transgénique exprimant la *Green Fluorescent Protein* (GFP) sous le contrôle du promoteur d'un gène induit précocement par la stimulation du TCR, *Nur77* (Moran *et al.*, 2011). Ils ont en effet constaté que les lymphocytes T CD4⁺ FoxP3⁺ exprimaient un niveau plus important de GFP que ceux FoxP3⁻. De plus, Cozzo Picca *et al.* ont observé dans un modèle de TCRs transgéniques ayant des affinités différentes pour des peptides de l'hémagglutinine, que seul le peptide reconnu avec une forte affinité permettait la genèse de tTregs (Picca *et al.*, 2011).

Signal de co-stimulation

Cependant, cette stimulation TCR semble ne pas être suffisante et être dépendante de la molécule de co-stimulation CD28. En effet, les souris qui en sont déficientes présentent une très forte diminution de la proportion en Tregs (Salomon *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2005).

Le facteur de transcription NF-κB

La stimulation du TCR conduit à l'activation du facteur de transcription Nuclear Factor-κB (NF-κB) (Weil and Israël, 2006) qui joue un rôle important dans la différenciation

des Tregs. En effet, plusieurs lignées de souris déficientes chacune pour une protéine impliquée dans la voie de signalisation de NF- κ B présentait un défaut dans la proportion des Tregs (Feuerer *et al.*, 2009). Plus particulièrement, il a été démontré un rôle de la sous-unité cRel dans l'expression de FoxP3. Ce dernier se fixe sur la séquence conservée non codante 3 (CNS3, voir la partie II. 4.2.) du locus du gène et contribuerait ainsi à l'accessibilité du promoteur (Isomura *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2009). Le rôle majeur de ce facteur de transcription dans la biologie des Tregs est discuté en détails dans la partie III.2.1. de cette introduction.

L'IL-2

Enfin, l'IL-2 a été montrée comme étant une molécule importante dans ce processus de différenciation. Tout d'abord, le délai de génération des Tregs par rapport aux lymphocytes T conventionnels, suggéré par les expériences de thymectomie précédemment présentées (partie II.1.), met en évidence l'implication de signaux supplémentaires à la stimulation du TCR pour la différenciation de ces cellules. D'autre part, les souris déficientes en IL-2 développent une colite (Sadlack *et al.*, 1993) et il a été observé que les cellules CD4⁺ CD25⁺ précèdent l'apparition des Tregs (Fontenot *et al.*, 2005b; Lio and Hsieh, 2008). Il a donc été proposé que la stimulation du TCR conduit à l'accumulation de CD25 à la surface des précurseurs des Tregs, probablement grâce à l'activation de NF- κ B. Ainsi, les précurseurs des Tregs sont plus sensibles à une stimulation par l'IL-2 qui a été montré comme participant à la régulation de l'expression de FoxP3 grâce à la fixation du facteur de transcription STAT5 sur le locus du gène (Zorn *et al.*, 2006; Burchill *et al.*, 2007; Lio and Hsieh, 2008).

Autres facteurs

D'autres facteurs ont été également décrits comme participant à l'expression de FoxP3 tels que les facteurs de transcription Satb1 en se fixant à la région CNS0 (Kitagawa *et al.*, 2017), *Nuclear Factor of Activated T cells* (NFAT) en se fixant à son promoteur (Mantel 2006) et *Cyclic-AMP Response Element Binding protein/ activating transcription factor 1* (CREB/ATF1) en se fixant à la séquence CNS2 (Kim and Leonard, 2007) (voir la partie II. 4.2.).

Voie PI3kinase-mTor

Enfin, l'inhibition de la voie PI3 kinase (PI3k)-*mammalian Target of rapamycin* (mTor) semble également importante dans la genèse des tTregs. En effet, il a été observé que

l'activation constitutive d'Akt, protéine impliquée dans cette voie, inhibe l'expression de FoxP3 (Haxhinasto *et al.*, 2008).

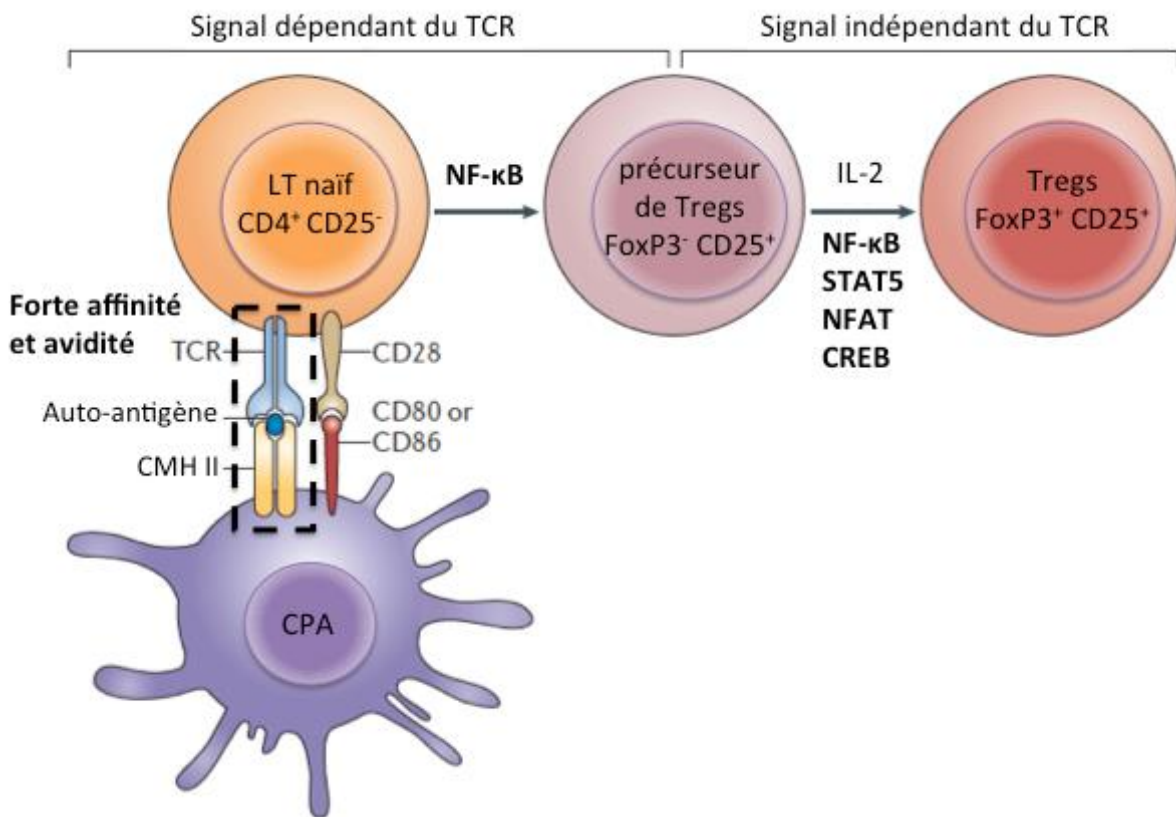


Figure 5 : Développement des Tregs thymiques (adapté de Hsieh *et al.*, 2012). Hsieh *et al.* proposent un développement en deux temps des Tregs thymiques, le premier étant dépendant du signal induit par le TCR et le second indépendant. Ainsi, la stimulation spécifique et forte du lymphocyte T CD4⁺ joint à la co-stimulation par CD28 va induire l'activation de différents facteurs, dont NF-κB, et l'expression de CD25. Ces deux événements vont permettre aux précurseurs des Tregs, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁻, de répondre efficacement à une stimulation par l'IL-2 qui va contribuer à finaliser la différenciation en Tregs. En effet, celle-ci va activer STAT5 qui en se fixant directement sur le locus de Foxp3, préalablement rendu accessible par NF-κB, va en réguler l'expression conjointement à d'autres facteurs de transcription.

2.2. Lymphocytes T régulateurs périphériques

En dehors du thymus, des Tregs peuvent être induits en périphérie (pTregs) à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs, principalement à partir des plus auto-réactifs caractérisés par la non expression de Ly6C (Martin *et al.*, 2013). Tout comme pour les tTregs, la qualité et l'intensité du signal induit par le TCR sont importantes dans la différenciation des pTregs. En effet, il a été montré qu'une faible quantité d'un antigène ayant une forte affinité permettait

l'induction la plus efficace et la plus durable de FoxP3 (Gottschalk *et al.*, 2010). En revanche, contrairement aux tTregs, il a été mis en évidence que cette différenciation nécessite la présence de TGF- β qui induit l'expression de FoxP3 via STAT3 et NFAT et confère une capacité suppressive aux cellules (Chen *et al.*, 2003; Fantini *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que l'IL-2 était indispensable à cet effet du TGF- β (Davidson *et al.*, 2007; Horwitz *et al.*, 2008) dont le rôle serait de contribuer à la survie des cellules, potentialiser l'expression de FoxP3 via STAT5 mais aussi d'inhiber la différenciation en Th17, induite par la présence de TGF- β et d'IL-6 (Laurence *et al.*, 2007). CTLA-4 a également été montré comme nécessaire à l'action du TGF- β (Zheng *et al.*, 2006). D'autre part, il a été observé que des DC CD103⁺ présentes dans les organes lymphoïdes associés au tube digestif (GALT pour *Gut-Associated Lymphoid Tissues*) ou dans les ganglions mésentériques induisent des pTregs grâce à la production de TGF- β et de l'acide rétinoïque (Benson *et al.*, 2007; Coombes *et al.*, 2007). Enfin, comme pour les tTregs, l'inhibition de la voie PI3k-mTOR permet l'expression stable de FoxP3 (Haxhinasto *et al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2008).

Les différents signaux et facteurs impliqués dans l'ontogénie des tTregs et pTregs sont résumés dans le **tableau 2**.

Type de signal	tTregs	pTregs
TCR	Forte affinité et avidité	Forte affinité, faible avidité
Co-stimulation	Nécessité de CD28	Nécessité de CTLA-4
Cytokine	IL-2	IL-2 TGF- β
Facteurs autres	STAT5, NFAT, CREB NF- κ B Inhibition voie PI3k-mTor	STAT3, NFAT Acide rétinoïque Inhibition voie PI3k-mTor

Tableau 2 : Comparaison des signaux impliqués dans le développement des tTregs et pTregs. La génération des Tregs thymiques (tTregs) et périphériques (pTregs) implique de multiples signaux identiques (stimulation spécifique du TCR, présence d'IL-2, inhibition de la voie PI3k-mTor) ou non (co-stimulation par CD28 ou CTLA-4, présence de TGF- β).

2.3. Lymphocytes T régulateurs induits

L'induction de Tregs *in vitro* est très similaire à celle des pTregs. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (définis par le phénotype suivant FoxP3⁻ CD44^{low} CD62L^{hi}) sont isolés et mis en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ou de CPA et anti-CD3, pour stimuler le TCR, ainsi que d'IL-2 et de TGF-β.

3. Mécanismes de régulation

Afin de contrôler les réponses immunitaires et l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ effecteurs (Teffs), les Tregs vont réguler l'activation des cellules immunes au travers de différents mécanismes tels que la sécrétion de cytokines immunosuppressives, la lyse des cellules, le dérèglement de leur métabolisme ou encore l'induction d'un phénotype tolérogène des DC (**Figure 6**).

3.1. Cytokines immunosuppressives

La sécrétion de cytokines particulières par les Tregs pour inhiber les réponses immunes est sûrement le mécanisme le plus documenté et le plus étudié. En effet, via la production d'IL-10, de TGF-β ou encore d'IL-35, les Tregs régulent l'activation d'un grand nombre de cellules ce qui génère un intérêt thérapeutique certain.

IL-10

L'un des mécanismes de suppression des Tregs est la sécrétion de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10. L'importance du rôle régulateur de cette dernière a été tout d'abord mis en évidence dans les souris déficientes pour cette cytokine qui développent une inflammation importante de l'intestin (Kühn *et al.*, 1993). Par la suite, Rubtsov *et al.* ont montré sa nécessité dans la régulation exercée par les Tregs au niveau du poumon, du tube digestif et de la peau. En effet, ils ont observé que les souris spécifiquement déficientes en IL-10 dans les Tregs développaient une inflammation du poumon et du côlon et présentaient une hypersensibilité cutanée (Rubtsov *et al.*, 2008). L'effet suppresseur des Tregs médié par l'IL-10 a également été mis en évidence dans des modèles de cancers, d'asthme ou encore dans la tolérance materno-fœtale (Vignali *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été rapporté que l'IL-10 induit un phénotype tolérogène des DC (Steinbrink *et al.*, 1997) et la production de cette même cytokine par des CD4 naïfs (Groux *et al.*, 1997). Bien qu'un rôle direct des Tregs n'ait pas été montré, il est tout à fait envisageable que de tels phénomènes leur soient attribuables.

TGF-β

Les Tregs peuvent également inhiber les réponses immunes par la sécrétion de TGF-β ou par une interaction directe entre cellules via du TGF-β membranaire. Ainsi, les souris déficientes pour cette cytokine développent une pathologie auto-immune sévère similaire à celle développée par les souris scurfy (Shull *et al.*, 1992). Il a également été montré que l'effet suppresseur des Tregs nécessite la production de TGF-β *in vitro* (Marie *et al.*, 2005) et *in vivo* permettant l'inhibition des Th1 (Li *et al.*, 2007). Nakamura *et al.* ont également observé que les Tregs expriment d'importantes quantités de TGF-β membranaire et que celui-ci contribue à leur fonction suppressive par un contact direct entre les cellules (Nakamura *et al.*, 2001). D'autre part, il a été montré que le TGF-β confère un phénotype tolérogène aux DC via l'induction d'indoleamine 2 3-dioxygénase (IDO), enzyme qui dégrade le tryptophane, un acide aminé essentiel, en kynurénine, métabolite immuno-suppresseur (Pallotta *et al.*, 2011).

IL-35

Plus récemment, il a été mis en évidence l'utilisation par les Tregs d'une autre cytokine, l'IL-35, pour réguler les réponses immunes. Cette cytokine est constituée de 2 sous-unités : Epstein–Barr virus-induced gene 3 (Ebi3) et p35 (aussi connue sous le nom de IL-12α). Collison *et al.* ont observé que ces 2 sous-unités étaient préférentiellement et intensément exprimées par les Tregs, par rapport aux Teffs CD4⁺ naïfs ou activés. Ils ont également constaté que l'IL-35 était constitutivement produite par les Tregs. Puis, ils ont montré que les Tregs déficients pour Ebi3 ou p35 avaient une capacité régulatrice fortement diminuée *in vitro* et qu'ils n'étaient plus capables de contrôler une IBD (Collison *et al.*, 2007).

3.2. Cytolyse

Outre l'utilisation de cytokines immuno-suppressives, les Tregs ont également la capacité d'induire la mort des cellules par la production des perforines et granzymes ainsi que des galectines.

Perforines et granzymes

La cytolyse des cellules par les perforines et granzymes est un mécanisme largement décrit et connu comme étant utilisé par les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK. Il a été démontré que les Tregs pouvaient également utiliser ce processus pour réguler les réponses immunes. Ainsi, Gondek *et al.* ont observé que des Tregs incapables de produire du granzyme B avaient une activité suppressive amoindrie *in vitro*. Ils ont constaté que l'action des Tregs par la granzyme induisait l'apoptose des Teffs CD4⁺ (Gondek *et al.*, 2005). Il a également été

mis en évidence que les Tregs étaient capables de la même façon et en présence de perforines d'induire la mort des lymphocytes T et B *in vitro* (Zhao *et al.*, 2006). Cao *et al.* ont démontré le rôle de ces molécules dans l'induction de tolérance aux tumeurs par les Tregs qui lysaient ainsi les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ (Cao *et al.*, 2007). L'importance de ces mécanismes de régulation par les Tregs a également été mise en évidence dans la tolérance de greffons (Gondek *et al.*, 2008) et dans l'EAE (Beeston *et al.*, 2010).

Galectines

D'autres études ont montré que les galectines, des molécules également capables d'induire la mort cellulaire, participaient au rôle cytolytique des Tregs. En effet, il a été observé que les galectines 1 et 10 sont fortement exprimées par les Tregs et que l'absence ou l'inhibition de ces protéines dans les Tregs diminue leur activité suppressive (Garín *et al.*, 2007; Kubach *et al.*, 2007).

3.3. Perturbations métaboliques

Un autre mécanisme utilisé par les Tregs pour contrôler l'activité du système immunitaire est l'altération du métabolisme des Teffs. En effet, les Tregs ont la capacité de les priver de molécules essentielles à leur fonction et homéostasie telles que l'IL-2 et l'Adénosine TriPhosphate (ATP), ou de bloquer leur fonction par la sécrétion de composés métaboliques tels que l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPc).

Consommation d'IL-2

Les Tregs ne produisent pas d'IL-2 bien que celle-ci soit essentielle à leur développement, survie, stabilité et fonction. En effet, les souris déficientes en IL-2 ou en la chaîne de haute affinité de son récepteur, CD25, développent une colite (Sadlack *et al.*, 1993; Willerford *et al.*, 1995), qui peut être régulée par l'injection de cellules CD4⁺ CD25⁺ (Willerford *et al.*, 1995). Suite à la neutralisation de l'IL-2 par un anticorps, Setoguchi *et al.* ont observé un phénotype similaire qui corrélait avec une diminution spécifique des cellules CD4⁺ CD25⁺ (Setoguchi *et al.*, 2005). Ainsi, l'importance de l'IL-2 pour les Tregs et la surexpression de CD25 par ces derniers ont conduit à supposer que les Tregs consommaient l'IL-2 produite par les Teffs, inhibant de fait ces derniers. La preuve la plus notable de ce mécanisme a été démontrée par Pandiyan *et al.* qui ont observé que la co-culture de Teffs avec des Tregs conduisait à une quantité moindre d'IL-2 dans le milieu, sans modification de sa production, par rapport à une co-culture de Teffs (Pandiyan *et al.*, 2007). De plus, Thornton

et al. ont constaté que l'ajout d'IL-2 dans la co-culture de Teffs rendait ces derniers réfractaires à la suppression par les Tregs (Thornton and Shevach, 1998).

Dégradation de l'ATP

L'activation des lymphocytes T requière une consommation importante d'ATP. Il a été constaté que CD39 et CD73, deux enzymes qui conduisent à la dégradation séquentielle de l'ATP en AMP puis en adénosine, sont préférentiellement exprimées à la surface des Tregs (Kobie *et al.*, 2006; Borsellino *et al.*, 2007; Deaglio *et al.*, 2007). Ainsi, les Tregs inhibent les réponses immunes par la fixation de l'adénosine ainsi produite sur son récepteur A2A présent à la surface des lymphocytes T (Deaglio *et al.*, 2007). L'importance de ce mécanisme de régulation est démontrée par le fait que les Tregs issus de souris déficientes pour CD39 ont une capacité suppressive diminuée (Deaglio *et al.*, 2007).

Transfert d'AMPc

Enfin, il a été observé que les Tregs expriment très faiblement l'enzyme *cAMP-cleaving enzyme phosphodiesterase 3B* (PDE3B) qui dégrade l'AMPc, conduisant à une accumulation de ce dernier. Il a ensuite été montré qu'ils peuvent transférer cet AMPc aux lymphocytes T par des jonctions GAP, conduisant à l'activation du répresseur *Inducible cAMP Early Repressor* (ICER) et inhibant ainsi la prolifération et la production d'IL-2 des lymphocytes T (Bodor *et al.*, 2001; Bopp *et al.*, 2007).

3.4. Inhibition des cellules dendritiques

Un autre mécanisme de régulation connu et utilisé par les Tregs est l'inhibition de la fonctionnalité des DC. La principale molécule impliquée dans cette action est CTLA-4 qui inhibe notamment l'activité co-stimulatrice des DC. D'autres protéines permettent également aux Tregs d'empêcher efficacement l'interaction des DC avec les Teffs.

Inhibition par CTLA-4

L'inhibition par CTLA-4 semble être un des mécanismes principaux de régulation des Tregs puisque les souris déficientes spécifiquement pour cette protéine dans ces cellules présentent une maladie presque aussi sévère que celle des souris déficientes en Tregs (Wing 2008). Il a ainsi été montré que CTLA-4, qui est un homologue de CD28, entre en compétition avec ce dernier pour se lier aux molécules de co-stimulation, CD80 et CD86, présentes à la surface des CPA avec une plus grande affinité (Teff *et al.*, 2006; Yokosuka *et al.*, 2010). En dehors de la compétition avec CD28, il a été décrit que CTLA-4 peut induire la trans-endocytose de CD80 et CD86 au sein des Tregs ce qui aboutit à la dégradation de ces 2

molécules au sein de ces cellules et donc à l'absence de co-stimulation par les DC (Qureshi *et al.*, 2011). D'autre part, il a été démontré que CTLA-4 peut induire l'activation du facteur de transcription Foxo3 au sein des CPA, inhibant ainsi la production d'IL-6 et de TNF α par ces dernières (Dejean *et al.*, 2009). Enfin, Grohmann *et al.* ont mis en évidence qu'*in vitro* CTLA-4 était capable d'induire l'expression de l'enzyme IDO par les DCs, rendant ainsi ces cellules régulatrices (Grohmann *et al.*, 2002).

Compétition interactions avec DC

Outre l'inhibition directe des DC, les Tregs ont la capacité de rentrer en compétition avec les lymphocytes T conventionnels pour l'interaction avec ces cellules. Il a été montré que cette compétition s'opère notamment par leur capacité à interagir plus rapidement et plus intensément avec les DC grâce à l'expression de la molécule *Leukocyte Function-associated Antigen-1* (LFA-1) (Onishi *et al.*, 2008). De façon similaire, il a été décrit que l'expression spécifique de la neuropiline 1 (Nrp1) par les Tregs leur permet une interaction durable avec les DC (Sarris *et al.*, 2008). Enfin, Huang *et al.* ont mis en évidence l'expression spécifique de *lymphocyte activation gene-3* (LAG-3), un homologue de CD4 qui interagit avec une forte affinité au CMH II, par les Tregs et qui participe à leur activité suppressive (Huang *et al.*, 2004). Puis, Liang *et al.* ont démontré que LAG-3 conduit à l'inhibition de la maturation et de la capacité stimulante des DC (Liang *et al.*, 2008).

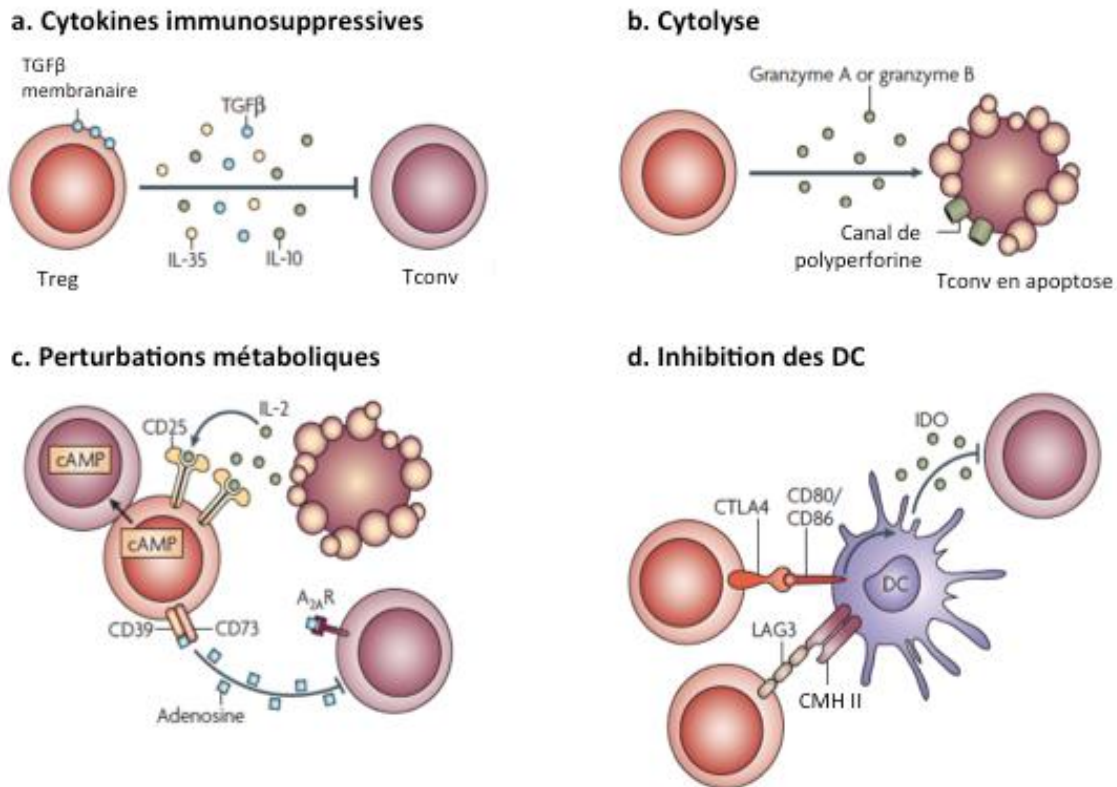


Figure 6 : Mécanismes de régulation du système immunitaire utilisés par les Tregs (Vignali *et al.*, 2008). Les Tregs contrôlent l'activation des cellules immunes au travers de différents mécanismes. Ils peuvent : (a) produire des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β , (b) lyser les cellules en sécrétant des perforines et granzymes, (c) altérer le métabolisme des cellules en les privant d'IL-2 ou en produisant de l'adénosine, (d) induire un phénotype tolérogène des DC via une inhibition par CTLA-4 notamment.

Ainsi, les Tregs présentent une grande diversité de mécanismes de suppression qui passent par la régulation de différentes cellules au travers de différentes molécules. Il est supposé que les Tregs vont préférentiellement utiliser un ou plusieurs de ces mécanismes en fonction du tissu, et donc de l'environnement, dans lequel ils se trouvent. En effet, il est notamment observé que les souris déficientes pour l'IL-10 ou le CTLA-4 dans les Tregs ne développent pas les mêmes pathologies (Rubtsov *et al.*, 2008; Wing *et al.*, 2008).

4. Plasticité et stabilité

Ainsi les Tregs jouent un rôle majeur dans le contrôle des réponses immunitaires et dans la prévention des maladies auto-immunes. En particulier, leur stabilité, fonctionnelle et numérique, dans le temps est donc essentielle. Des études récentes mettent en évidence la capacité des Tregs à acquérir de nouvelles fonctions tout en conservant FoxP3, considéré ici

comme de la plasticité ; tandis que leur capacité à conserver durablement FoxP3, considéré ici comme de la stabilité, reste débattue.

4.1. Acquisition de nouvelles fonctions

De nombreuses études montrent que les Tregs ont la capacité de s'adapter à leur environnement et ainsi de co-exprimer FoxP3 avec d'autres facteurs de transcription dont notamment ceux impliqués dans la différenciation des lymphocytes CD4⁺ Th. Une étude épigénétique a notamment permis de mettre en évidence qu'au sein des Tregs les loci des facteurs de transcription et cytokines des différents sous-types de Th ne sont pas complètement réprimés (Wei *et al.*, 2009). Ainsi, les Tregs semblent dotés d'une potentielle plasticité.

Tbet-Th1

Il a été montré que les Tregs peuvent exprimer le facteur de transcription Tbet qui à son tour induit l'expression du récepteur CXCR3, deux marqueurs spécifiques des Th1, permettant ainsi aux Tregs de migrer vers le site d'une inflammation induite par des Th1 (Koch *et al.*, 2009). En revanche, si les Tregs ne peuvent exprimer Tbet ils ne sont pas capables de s'accumuler au site de cette même inflammation ni de contrôler les réponses Th1 (Koch *et al.*, 2009). De plus, Müller *et al.* ont constaté qu'au cours de l'EAE l'expression de CXCR3 sur les Tregs leur permet de migrer dans le SNC et de s'y localiser en étant au plus près des Teffs (Müller *et al.*, 2007). D'autre part, une forte augmentation du nombre de Tregs produisant de l'IFN γ a été observée dans des patients atteints de diabète insulino-dépendant. Les Tregs naïfs de ces patients sont également capables d'exprimer Tbet, CXCR3 et de produire de l'IFN γ suite à une stimulation avec de l'IL-12 *in vitro* (McClymont *et al.*, 2011).

Irf4-Th2

De façon similaire, il a été montré que la délétion spécifique de Irf4, facteur de transcription exprimé par les Th2, dans les Tregs aboutit à leur incapacité de réguler efficacement les réactions immunitaires induites par les Th2. Ces Tregs expriment moins fortement les gènes codant notamment pour l'IL-10, le granzyme B ou encore CCR8, le récepteur impliqué dans la migration au site d'inflammation de type Th2 (Zheng *et al.*, 2009).

STAT3, ROR γ – Th17

Des observations identiques ont été faites concernant le facteur de transcription STAT3, impliqué dans la différenciation des Th17. En effet, les Tregs ayant une délétion

spécifique de STAT3 expriment moins les gènes codant pour l'IL-10, l'IL-35 et CCR6, récepteur qui permet la migration des cellules vers le site d'une inflammation induite par des Th17. De plus, ces Tregs ne parviennent pas à contrôler le développement d'une colite, inflammation majoritairement due aux Th17 (Chaudhry *et al.*, 2009). Ces résultats corrélerent avec ceux de Yamazaki *et al.* qui ont montré que les Tregs expriment CCR6 et que cela leur permet de migrer vers le SNC au cours de l'EAE, pathologie due aux Th17 (Yamazaki *et al.*, 2008). D'autre part, il a été observé que les Tregs humains pouvaient exprimer à la fois FoxP3 et ROR γ t. Ces Tregs expriment ainsi CCR6 et produisent de l'IL-17 tout en conservant une capacité suppressive (Voo *et al.*, 2009).

Bcl6 – Tfh

Enfin, deux équipes de recherche ont mis en évidence l'existence de Tregs localisés au niveau du centre germinatif exprimant le facteur de transcription Bcl6 et le récepteur CXCR5. Ce dernier marqueur est impliqué dans la migration vers les follicules B des tissus lymphoïdes des *T follicular helper* (Tfh), sous-population de CD4 impliquée dans la maturation des lymphocytes B. Ils ont montré que l'expression de CXCR5 sur les Tregs était dépendante de Bcl6 et indispensable au contrôle des Tfh par ces Tregs, ainsi dénommés Tfr pour *Follicular Regulatory T cells* (Chung *et al.*, 2011; Linterman *et al.*, 2011).

4.2. Perte de FoxP3

Ainsi, les Tregs peuvent s'adapter à l'environnement dans lequel ils se trouvent pour en réguler au mieux les réponses immunes. Mais cette acquisition de fonctions effectrices peut avoir des conséquences négatives si les Tregs perdent leur phénotype régulateur, dépendant de FoxP3. En effet, cela pourrait notamment contribuer au développement des maladies auto-immunes. De nombreuses investigations ont donc été menées pour étudier la stabilité des Tregs, c'est à dire leur capacité à conserver durablement FoxP3.

CNS2, point clé de la stabilité

L'expression de FoxP3 est notamment régulée par des modifications épigénétiques du promoteur et de 3 séquences conservées non codantes, CNS1, 2 et 3, situées dans le locus du gène. La séquence CNS1 est impliquée dans la génération des pTreg de par sa sensibilité au TGF- β et contient des sites de fixation pour les facteurs de transcription NFAT et SMAD3 (Huehn *et al.*, 2009; Müller and Rao, 2010; Zheng *et al.*, 2010). La séquence CNS2, également appelée *Treg-Specific Determining Regions* (TSDRs), a été décrite comme essentielle à la stabilité de FoxP3 lorsqu'elle est complètement déméthylée (Huehn *et al.*,

2009; Polansky *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2010; Müller and Rao, 2010). De plus, Zheng *et al.* ont montré d'une part que FoxP3 s'associe à RUNX1 pour se fixer à CNS2 et ainsi contrôler sa propre expression, et d'autre part que la délétion de CNS2 conduit à une perte de l'expression de FoxP3 au cours des divisions cellulaires (Zheng *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été constaté que, chez l'homme et la souris, cette région est totalement déméthylée dans les tTregs tandis qu'elle ne l'est pas du tout dans les lymphocytes T conventionnels et seulement partiellement dans les pTregs, ce qui est associé à une instabilité de FoxP3 (Baron *et al.*, 2007; Floess *et al.*, 2007). La déméthylation de cette séquence permet la fixation d'un certain nombre de facteurs de transcription tels que CREB et STAT5 (Huehn *et al.*, 2009; Polansky *et al.*, 2010). Enfin, la séquence CNS3 a été décrite comme étant importante pour la génération des tTregs. La fixation de cRel sur cette séquence permettrait en effet d'initier la déméthylation des autres CNS (Huehn *et al.*, 2009; Müller and Rao, 2010; Zheng *et al.*, 2010).

Le grand débat

La stabilité de FoxP3 a notamment été évaluée en utilisant des souris transgéniques dans lesquelles une protéine fluorescente permet de voir les cellules qui expriment ou ont exprimé *Foxp3*. Ainsi, Rubtsov *et al.* ont évalué que les Tregs constituent une population stable dans le temps en conditions physiologique et inflammatoires. En effet, ils ont analysé l'expression de FoxP3 dans ces souris sur plusieurs mois et n'ont pas observé de perte significative de celle-ci ni à l'homéostasie ni dans le cas d'une lymphopénie induite par irradiations, d'une infection ou encore d'une réaction auto-immune (Rubtsov *et al.*, 2010).

En revanche, en utilisant le même type de souris, Zhou *et al.* ont mis en évidence une certaine instabilité des Tregs. En effet, ils ont observé qu'une proportion non négligeable des Tregs perd FoxP3 et produit de l'IFN γ à l'homéostasie, population dénommée « exTregs ». De plus, ils ont constaté que cette proportion d'exTregs augmentait dans les îlots pancréatiques de souris *Non-Obese Diabetic* (NOD), souris qui développent spontanément un diabète insulino-dépendant, suggérant qu'ils contribuent à la pathologie. Ceci a été confirmé par le transfert de ces exTreg dans des souris immuno-déficientes qui développent alors un diabète auto-immun (Zhou *et al.*, 2009). Par la suite, ils ont observé des résultats similaires dans le cas de l'EAE, corroborant leurs précédentes analyses (Bailey-Bucktrout *et al.*, 2013).

Bien que des explications puissent être apportées à ces résultats contradictoires telles que l'utilisation par Rubtsov *et al.* d'un gène rapporteur induit par le tamoxifène qui pourrait ne marquer ainsi que les Tregs qui expriment fortement FoxP3 et qui sont donc sûrement les plus

stables ; et la durée de vie courte des protéines fluorescentes utilisées (Bailey-Bucktrout and Bluestone, 2011; Hori, 2014) ; le doute quant à l'instabilité des Tregs semble persister.

Pourtant, comme Zhou *et al.*, d'autres études ont également mis en évidence la capacité des Tregs à perdre FoxP3 dans un environnement donné. En effet, Duarte *et al.* ont montré que dans des conditions de lymphopénie sévère, environ 50% des Tregs perdaient FoxP3, acquéraient un phénotype de Teffs et n'étaient plus capables de contrôler la prolifération des Teffs (Duarte *et al.*, 2009). Il a également été décrit que les Tregs peuvent perdre FoxP3 et se convertir en Tfh dans les plaques de Peyer (Tsuji *et al.*, 2009). De plus, différentes équipes de recherche ont mis en évidence que des Tregs stimulés avec de l'IL-6 perdent FoxP3 et acquièrent un phénotype de Th17 (Xu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008). Enfin, il a été constaté que la stimulation répétée du TCR de Tregs humains induisait la perte de FoxP3 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par ces derniers (Hoffmann *et al.*, 2009).

Afin de concilier l'ensemble de ces données, Hori propose un modèle « d'hétérogénéité » des Tregs. Celui-ci est notamment fondé sur l'observation de son équipe que les Tregs CD25^{low} sont plus prompts à perdre FoxP3 que ceux CD25^{hi} lorsqu'ils sont transférés dans des souris immuno-déficientes ou à la suite d'une stimulation *in vitro* (Komatsu 2009). Ainsi, ce modèle propose que les Tregs constituent une population hétérogène dans laquelle certains Tregs sont pleinement engagés dans la différenciation en Tregs tandis que d'autres, nouvellement générés, peuvent perdre FoxP3 et acquérir de nouvelles compétences en fonction de leur environnement (Hori, 2014).

5. Impact du TNF α

L'effet suppresseur des Tregs peut avoir lieu dans un environnement enflammé et il est donc important d'étudier les conséquences de celui-ci sur leur biologie. Un des principaux médiateurs de l'inflammation est le TNF α .

5.1. Le TNF α

Le TNF α est une cytokine aux fonctions pléiotropes impliquée dans des mécanismes pro- et anti-inflammatoires. Elle est sécrétée par un grand nombre de cellules dont les leucocytes, les fibroblastes ou encore les cellules endothéliales (Vassalli, 1992). Cette molécule possède deux récepteurs : le TNFReceptor (TNFR) 1, exprimé de façon presque ubiquitaire (Chen and Goeddel, 2002), et le TNFR2, présent sur les lymphocytes T, les cellules endothéliales et certaines cellules du système nerveux central (Faustman and Davis,

2013).

5.2. Rôle du TNF α sur les Tregs

Il a été démontré que le TNF α a un rôle délétère dans de nombreuses pathologies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis (Ware, 2005). Ceci a conduit au développement d'anticorps anti-TNF qui ont montré des effets bénéfiques indiscutables pour le traitement de certaines de ces maladies. Cependant, dans le cas de la sclérose en plaques, ces traitements aggravent la pathologie (van Oosten *et al.*, 1996; Group, 1999). Ces observations suggèrent donc un rôle immuno-régulateur du TNF α .

Cet aspect du TNF α a été mis en évidence par différentes études réalisées chez la souris qui démontrent l'effet stimulant de ce dernier sur les Tregs. En effet, Chen *et al.* ont constaté que les Tregs, comparés aux Teffs, expriment fortement et préférentiellement le récepteur TNFR2. De plus, ils ont observé que la stimulation *in vitro* des Tregs avec du TNF α augmente leur prolifération ainsi que leur capacité suppressive (Chen *et al.*, 2007). D'autre part, notre équipe a mis en évidence qu'au cours du diabète insulino-dépendant les Teffs stimulent l'expansion et l'activité régulatrice des Tregs et que cet effet est dépendant du TNF α (Grinberg-Bleyer *et al.*, 2010b). Enfin, des données récentes et encore non publiées de notre équipe montrent des effets identiques de cette cytokine sur les Tregs au cours de l'EAE. Cette action est directe et passe par la fixation du TNF α sur le TNFR2 présent à la surface des Tregs (Pouchy *et al.*, en préparation, voir Annexes).

5.3. L'effet du TNF α sur les Tregs implique NF- κ B

Des résultats récents de notre équipe suggèrent que la prolifération des Tregs induite par le TNF α implique l'activation du facteur de transcription NF- κ B au sein de ces cellules. En effet, l'équipe a récemment constaté que l'injection de TNF α dans des souris sauvages induisait l'expansion des Tregs et que cette prolifération était associée à une translocation nucléaire de NF- κ B, révélant son activation. En revanche, ce phénomène n'a pas été observé chez les souris injectées avec du *Phosphate Buffered Saline* (PBS) ni dans celles déficientes pour le TNFR2 (données non publiées). D'autre part, il est connu que le TNF α active la voie canonique de NF- κ B en se fixant sur le TNFR1 (Chen and Goeddel, 2002; Wajant and Scheurich, 2011) et la voie non canonique en se fixant sur le TNFR2 (Rauert *et al.*, 2010).

III. Rôle de NF- κ B dans le système immunitaire

Le facteur de transcription NF- κ B a été initialement identifié comme étant une protéine nucléaire spécifique des lymphocytes B régulant l'expression du gène codant pour la chaîne légère κ (Sen and Baltimore, 1986). De nombreuses études ont montré par la suite que ce facteur de transcription est impliqué dans la maturation des lymphocytes B (Gerondakis and Siebenlist, 2010). Aujourd'hui, il est connu et reconnu que NF- κ B est présent dans presque toutes les cellules de l'organisme et joue un rôle dans de nombreux mécanismes biologiques.

1. Voies de signalisation de NF- κ B

Il existe deux voies de signalisation de NF- κ B: la voie canonique, ou classique, impliquant préférentiellement les sous-unités NF- κ B1 (p105/50), RelA (p65) et c-Rel ; et la voie non canonique, ou alterne, impliquant majoritairement les sous-unités NF- κ B2 (p100/52) et RelB. Dans chacune des voies, les sous-unités vont s'homo- ou s'hétérodimériser pour former des dimères de NF- κ B fonctionnels. A la suite d'une cascade de phosphorylations impliquant des I κ B kinases (IKK), les protéines inhibitrices I κ B sont ubiquitinylées, permettant leur dégradation et ainsi la libération des dimères de NF- κ B (**Figure 7**). Ces derniers vont alors moduler l'expression d'un grand nombre de gènes.

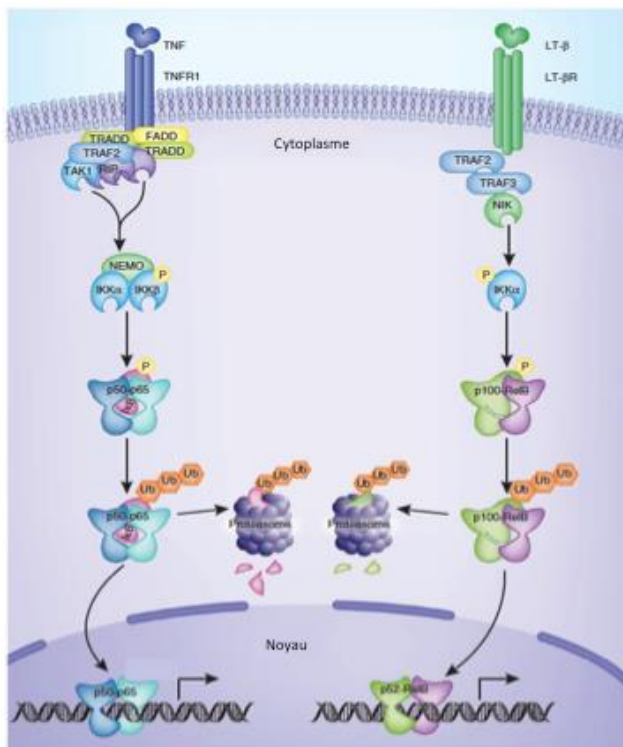


Figure 7 : Voies de signalisation de NF- κ B (Adapté d'Oeckinghaus *et al.*, 2011).

Dans chacune des voies, canonique (à gauche) et alterne (à droite), la fixation du ligand à son récepteur va induire le recrutement de protéines adaptatrices et kinases telles que TRAF2 et NIK. Les protéines kinases vont phosphoryler les I κ B kinases, IKK α , IKK β et NEMO, conduisant à leur activation. Ces kinases vont à leur tour phosphoryler les protéines inhibitrices de NF- κ B, I κ B pour la voie classique et la sous-unité p100 pour la voie alterne, conduisant à leur ubiquitinylation et donc dégradation, partielle pour p100. Les dimères de NF- κ B vont alors pouvoir migrer dans le noyau et réguler leurs gènes cibles.

1.1. Activation des voies de signalisation NF- κ B

L'activation des voies de signalisation de NF- κ B débute par la fixation du ligand sur son récepteur. Il est décrit que la voie canonique est notamment activée par le TNF α (via le TNFR1), l'IL-1 et le LPS, tandis que la voie alterne est activée par la lymphotoxine β , CD40L ainsi que par le TNF α (via le TNFR2). Cette interaction induit la mobilisation de protéines adaptatrices telles que celles de la famille TRAF qui vont à leur tour recruter des protéines kinases telles que PKC θ et NIK. Ces dernières vont alors phosphoryler les IKK et ainsi les activer (Vallabhapurapu and Karin, 2009).

1.2. I κ B kinases

Il y a 3 IKK: IKK α ou IKK1, IKK β ou IKK2 et IKK γ ou NEMO. Dans la voie canonique, ces 3 sous-unités forment un trimère où IKK α et IKK β jouent le rôle de kinases et NEMO d'unité régulatrice. IKK α et IKK β ont 50% d'homologie de séquence et IKK β a été décrit comme ayant l'activité kinase la plus importante. Dans la voie alterne, IKK α est la seule kinase impliquée (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009).

En dehors de la présence d'un domaine leur conférant leur activité de kinase, ces 3 protéines contiennent un domaine de glissière à leucine (LZ pour *Leucine Zipper*) qui permet à IKK α et IKK β de former des dimères, interaction essentielle à leur activité enzymatique. Ces 2 protéines peuvent former des homo- ou hétérodimères mais il a été montré que ces derniers ont une activité catalytique supérieure. Ces dimères se lient à NEMO grâce à leur domaine d'interaction spécifique avec cette protéine situé dans leur partie C-terminale (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009) (**Figure 8**).

Ces IKK, trimérisées ou seule, une fois activées vont phosphoryler les protéines inhibitrices de NF- κ B, les I κ B pour la voie canonique et p100 pour la voie alterne. Ceci va conduire à leur ubiquitinylation, notamment via des ubiquitines ligases E2 et E3, et donc à leur dégradation, partielle pour p100, par le protéasome.

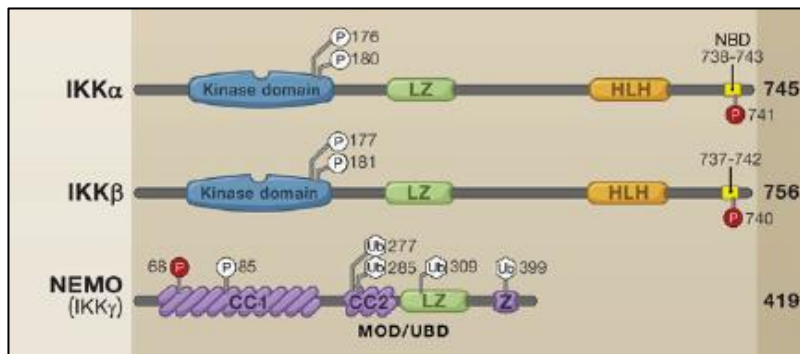


Figure 8 : Représentation des différentes I κ B kinases (IKK) : IKK α , IKK β et NEMO (IKK γ) (Hayden and Ghosh, 2008). LZ (*Leucine Zipper*) : domaine de glissière à leucine; HLH (*Helix-Loop-Helix*) : domaine hélice-boucle-hélice ; NBD (*NEMO Binding Domain*) : domaine de fixation de NEMO ; CC1/2 (*Coiled Coil*): domaine de superhélice; Z : domaine de doigt de Zinc; MOD/UBD : Domaine d'Oligomérisation Minimale/Domaine de fixation des Ubiquitines. En blanc figurent les phosphorylations (P) et ubiquitinylations (Ub) activatrices, en rouge celles inhibitrices. A droite est indiqué le nombre d'acides aminés de ces protéines chez l'homme.

1.3. I κ B

Dans la voie canonique, les protéines I κ B retiennent les dimères de NF- κ B dans le cytoplasme les empêchant ainsi d'aller réguler leurs gènes cibles. Il existe des protéines I κ B dites classiques, I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ , et d'autres dites atypiques, Bcl-3, I κ B ζ et I κ BNS, définies ainsi par leur mode de régulation différent. La protéine I κ B γ a été récemment découverte et est un transcrite alternatif de *nfkb1* dont le rôle exact reste encore à définir. D'autre part, les sous-unités de NF- κ B, NF- κ B1 (p105) et NF- κ B2 (p100) ont également une capacité d'inhibition, NF- κ B2 jouant le rôle d'inhibiteur de NF- κ B pour la voie alterne (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009).

Les protéines I κ B possèdent des domaines avec des répétitions ankyrine qui leur permettent de lier le domaine d'homologie Rel (RHD) des sous-unités de NF- κ B, cachant ainsi leur domaine de localisation nucléaire (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009) (**Figure 9**).

Une possible redondance existe entre ces différentes protéines mais elles ont des affinités différentes pour les dimères de NF- κ B régulant ainsi différenciellement son activité. En effet, il a été décrit que l'activation de la voie canonique implique majoritairement I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ , la voie alterne NF- κ B2 tandis que Bcl3 peut se lier à des homodimères de p50 ou p52 (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009).

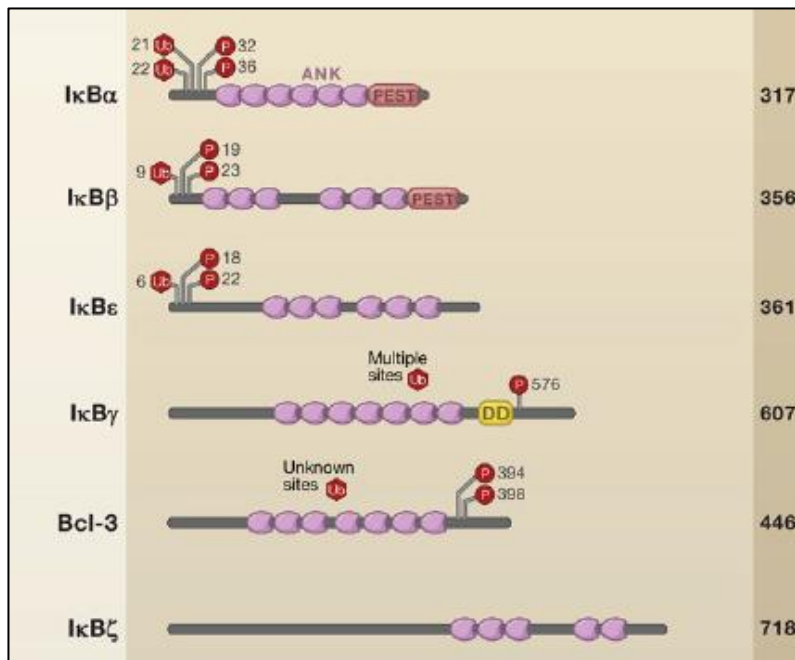


Figure 9 : Représentation des différentes protéines inhibitrices de NF- κ B : I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3 et I κ B ζ (Hayden and Ghosh, 2008). ANK : répétitions ankyrine; PEST : séquence signal de dégradation riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T) ; DD (*Death domain*) : domaine de mort. En rouge figurent les phosphorylations (P) et ubiquitinylations (Ub) inhibitrices. A droite est indiqué le nombre d'acides aminés de ces protéines chez l'homme.

1.4. Les sous-unités NF- κ B

Comme décrit précédemment, il existe 5 sous-unités de NF- κ B : NF- κ B1 (p105/50), RelA (p65) et c-Rel qui sont préférentiellement impliquées dans la voie canonique ; NF- κ B2 (p100/52) et RelB préférentiellement impliquées dans la voie alterne.

Toutes ces sous-unités possèdent dans leur partie N-terminale un domaine RHD qui contribue à leur homo- ou hétérodimérisation ainsi qu'à leur liaison à l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN). RelA, RelB et cRel ont également un domaine d'activation de la transcription (TAD) qui leur permet d'initier l'expression de leurs gènes cibles. NF- κ B1 et NF- κ B2 ne possédant pas ce domaine, il est proposé que ces sous-unités régulent négativement les gènes cibles de NF- κ B lorsqu'elles ne sont pas liées à l'une des autres sous-unités ou à une autre protéine capable de recruter des co-activateurs. Par ailleurs, la sous-unité RelB a également un domaine LZ qui participe à la régulation de son activité transcriptionnelle. Enfin, comme les protéines I κ B, NF- κ B1 et NF- κ B2 possèdent un domaine avec des répétitions ankyrine qui leur confère leur activité inhibitrice. Cette partie est dégradée après ubiquitinylation

aboutissant à la production des sous-unités p50 et p52, respectivement, qui vont être capables de se lier à l'ADN (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009) (**Figure 10**). Ces différentes sous-unités ont donc la capacité de s'homo- ou s'hétérodimériser pour former des dimères de NF-κB fonctionnel qui se fixent sur une séquence κB consensus : 5' GGGRNWYYCC 3', où R est une purine, N est n'importe quelle base, W est une adénine ou une thymine et Y une pyrimidine. Le plus fréquemment il est observé une association de RelA ou cRel avec p50 et de NF-κB2 avec RelB. Chaque dimère régule ainsi différents gènes par le recrutement de co-activateurs ou de co-represseurs. Leur activité peut être régulée par leur phosphorylation ou acétylation, régulant ainsi leur interaction avec les co-activateurs transcriptionnels ; ou par leur compétition avec d'autres protéines pour les mêmes co-activateurs. Ces dimères peuvent également s'auto-réguler en induisant la transcription des gènes codant pour les protéines IκB ou d'autres membres de la voie situés en amont (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009).

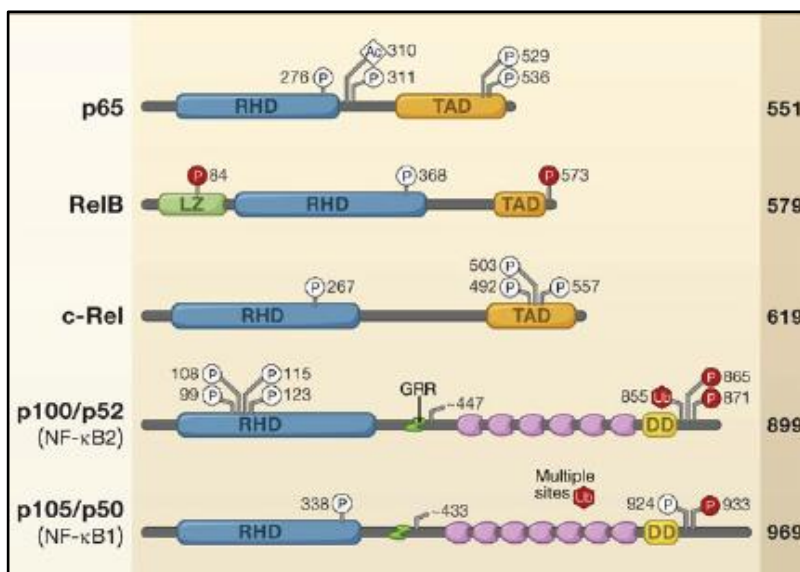


Figure 10 : Représentation des différentes sous-unités de NF-κB : NF-κB1 (p105/50), RelA (p65), c-Rel, NF-κB2 (p100/52) et RelB (Hayden and Ghosh, 2008). RHD : Domaine d'Homologie Rel ; TAD : Domaine d'Activation Transcriptionnelle ; LZ : (*Leucine Zipper*) : domaine de glissière à leucine ; DD : (*Death domain*) : domaine de mort. En rose figurent les répétitions ankyrine, en blanc les phosphorylations (P) et acétylations (Ac) activatrices et en rouge les phosphorylations et ubiquitinylations (Ub) inhibitrices. A droite est indiqué le nombre d'acides aminés de ces protéines chez l'homme.

Les rôles distincts mais aussi redondants des différentes sous-unités de NF- κ B ont été mis en évidence par l'analyse des souris déficientes pour une ou plusieurs d'entre elles. Les phénotypes de ces souris sont résumés dans le **tableau 3**.

Sous-unité(s) inactivée(s)	Phénotype des souris	Références
RelA	Létalité embryonnaire (E15-16) due à l'apoptose des hépatocytes induite par le TNF α , défaut d'activation des lymphocytes	Beg and Baltimore, 1996; Doi <i>et al.</i> , 1999
cRel	Développement normal, défaut fonctionnel des lymphocytes T et B	Köntgen <i>et al.</i> , 1995; Gerondakis <i>et al.</i> , 1996; Grigoriadis <i>et al.</i> , 1996; Grumont <i>et al.</i> , 1998
NF-κB1	Développement normal, nombreux défauts fonctionnels du système immunitaire, susceptibilité à certaines infections	Sha <i>et al.</i> , 1995; Snapper <i>et al.</i> , 1996; Grumont <i>et al.</i> , 1998
RelB	Développement normal jusqu'à 10 semaines puis décèdent d'une inflammation systémique, défaut de développement des organes lymphoïdes, défaut de réponse des immunités innée et adaptative	Burkly <i>et al.</i> , 1995; Weih <i>et al.</i> , 1995; Wu <i>et al.</i> , 1998
NF-κB2	Développement normal, désorganisation architecturale de la rate et des ganglions, absence de plaques de Peyer, défaut d'activation des lymphocytes sûrement dû à un défaut des CPA	Caamaño <i>et al.</i> , 1998; Franzoso <i>et al.</i> , 1998
RelA / cRel	Létalité embryonnaire (E13-13,5) due à l'apoptose des hépatocytes induite par le TNF α	Grossmann <i>et al.</i> , 1999
RelA / NF-κB1	Létalité embryonnaire (E13) due à l'apoptose des hépatocytes induite par le TNF α	Horwitz <i>et al.</i> , 1997
cRel / NF-κB1	Développement normal, défaut de différenciation des précurseurs hématopoïétiques, absence de centres germinatifs, défaut d'activation des lymphocytes	Pohl <i>et al.</i> , 2002

RelB / NF-κB1	Pathologie bien plus sévère que les souris <i>relb</i> ^{-/-} qui conduit à la mort des souris en 3 à 4 semaines après leur naissance	Weih <i>et al.</i> , 1997
NF-κB2 / NF-κB1	Défaut de développement qui conduit à la mort des souris rapidement après la naissance, défaut de maturation des lymphocytes B, défaut de différenciation des ostéoclastes	Franzoso <i>et al.</i> , 1997; Iotsova <i>et al.</i> , 1997

Tableau 3 : Phénotypes des souris déficientes pour une ou plusieurs sous-unités de NF-κB.

Le phénotype très sévère des animaux *Rela*^{-/-} suggère que cette protéine joue un rôle crucial dans un ou plusieurs types de cellules de l'organisme. L'analyse des souris *cRel*^{-/-}, *Relb*^{-/-}, *Nfkb1*^{-/-} et *Nfkb2*^{-/-} démontre une implication majeure de NF-κB dans le développement et la fonction des cellules du système immunitaire, avec un rôle plus important de RelB. D'autre part, le phénotype plus sévère des souris déficientes pour *Relb* et *Nfkb1* par rapport aux animaux *Relb*^{-/-} démontre l'existence de phénomènes compensatoires et/ou complémentaires entre ces 2 sous-unités. De façon similaire, il semble y avoir une redondance entre NF-κB1 et NF-κB2 notamment au niveau de leur implication dans la différenciation des lymphocytes B et des ostéoclastes, ces derniers étant important pour le développement osseux. Enfin, la mort légèrement plus précoce chez les souris déficientes pour *Rela* et *cRel* et celles déficientes pour *Rela* et *Nfkb1*, par rapport aux animaux *Rela*^{-/-}, suggère une compensation partielle entre cRel ou NF-κB1 avec RelA. cRel et NF-κB1 semblent également présenter des redondances fonctionnelles entre elles au vu des défauts plus marqués des cellules du système immunitaire dans les souris déficientes pour ces 2 sous-unités.

2. Implication de NF-κB dans le système immunitaire

NF-κB joue donc un rôle important dans le système immunitaire puisque la délétion d'une ou plusieurs sous-unités conduit à des défauts majeurs de celui-ci. Il semble ainsi notamment intervenir dans le développement des organes lymphoïdes et des lymphocytes, ainsi que dans la fonction des cellules immunes. Ces premières observations ont conduit à une recherche importante sur l'implication des différents membres des voies de signalisation de NF-κB dans la biologie des cellules du système immunitaire. Je vais ici me concentrer sur le rôle de ce facteur de transcription dans les lymphocytes T mais l'ensemble des données accumulées sur son implication dans le développement et la fonction des autres cellules

immunes est très bien résumé dans plusieurs revues récentes (Gerondakis and Siebenlist, 2010; Hayden and Ghosh, 2011; Vallabhapurapu and Karin, 2009).

Un grand nombre d'études ont été menées sur le rôle de NF- κ B dans les lymphocytes T mais très peu ont été réalisées en utilisant des délétions spécifiques. Je vais ici me focaliser sur celles qui, selon moi, ont mis en évidence le plus spécifiquement le rôle intrinsèque de NF- κ B dans la différenciation et la fonction des lymphocytes T.

Une des fonctions ubiquitaires de NF- κ B est celle de facteur anti-apoptotique qui joue ainsi un rôle important dans les sélections positive et négative des lymphocytes T (Gerondakis and Siebenlist, 2010; Voll *et al.*, 2000). Cette implication a été confirmée par le fait que l'inhibition de l'activation de NF- κ B conduit à l'inhibition du facteur anti-apoptotique Bcl-2, essentiel dans ces processus de développement des lymphocytes T (Mandal *et al.*, 2005). Cependant, il a été montré qu'une sur-activation de NF- κ B au sein de ces cellules T conduit à leur apoptose suggérant la nécessité d'une fine régulation de NF- κ B pour leur maintien (Goudeau *et al.*, 2003). D'autre part, il a été démontré que NF- κ B1 est impliqué dans la voie de signalisation du TCR et que son activation est ainsi importante pour la prolifération des lymphocytes T (Sriskantharajah *et al.*, 2009).

2.1. Dans les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs

Plus spécifiquement, différentes études mettent en lumière l'importance de l'activation de la voie NF- κ B dans le développement et la fonction des Tregs.

Développement

Concernant la génération des Tregs, il a été montré que les délétions spécifiques de IKK α et IKK β dans les cellules CD4⁺ conduisent à une forte diminution du nombre de Tregs dans le thymus, la rate et les ganglions (Chen *et al.*, 2015; Schmidt-Supprian *et al.*, 2003). Il a également été montré que l'inhibition de NF- κ B dans les thymocytes abolit la réponse des Tregs à l'IL-2 (Gückel *et al.*, 2011), cytokine importante pour la génération des tTregs. Par ailleurs, une population de pré-précurseurs de Tregs, CD4⁺CD122⁺GITR⁺CD25⁻FoxP3⁻, a été mise en évidence. Ces cellules se différencieraient en précurseurs de Tregs, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻, suite à la fixation de cRel sur le locus du gène de CD25 (Schuster *et al.*, 2017). Enfin, il a été montré que cRel est essentiel pour le développement thymique des Tregs (Isomura *et al.*, 2009) en se fixant à la région CNS3 du locus du gène *foxp3* alors que celle-ci est encore méthylée (Long *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2009). Il est proposé que cette fixation

initierait la déméthylation de la séquence CNS2 du gène *foxp3*, permettant à d'autres facteurs de transcription de se fixer dessus et d'initier ainsi l'expression du gène *foxp3* (Ruan *et al.*, 2009).

Fonction

D'un point de vue fonctionnel, Chang *et al.* ont montré que l'expression constitutive de IKK β permet de restaurer la capacité suppressive des Tregs déficients pour Ubc13, une E2 ubiquitine ligase responsable notamment de l'activation de IKK β (Chang *et al.*, 2012). De plus, ils ont mis en évidence que des Tregs spécifiquement déficients pour IKK β sont sensibles à une conversion en Th *in vivo* et qu'ils présentent un défaut de production d'IL-10 et de SOCS1, facteur impliqué dans la stabilité des Tregs (Takahashi *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012). D'autre part, il a été observé que les Tregs de souris ayant une déficience spécifique pour IKK α dans les cellules CD4⁺ ont un défaut de suppression et de prolifération *in vivo* (Chen *et al.*, 2015). Enfin, Gerondakis *et al.* ont montré que l'absence de RelA dans les Tregs conduit au développement d'une maladie auto-immune sévère. Par l'utilisation de différents modèles de souris, ils concluent que le développement de la pathologie est dû à un défaut de capacité des Tregs à devenir des Tregs effecteurs (Messina *et al.*, 2016). Je reviendrai plus en détails sur les résultats de cet article dans ma discussion.

2.2. Dans les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels

Un certain nombre d'études ont également mis en évidence l'implication de la voie NF- κ B dans la fonction des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels. Il a ainsi été montré que NF- κ B est important pour l'acquisition d'un phénotype mémoire par les lymphocytes T CD4⁺ puisque la délétion de PKC θ ou de NEMO conduit à une perte de cette population en périphérie (Schmidt-Supprian *et al.*, 2003, 2004). Il a également été décrit que les lymphocytes T CD4⁺ déficients pour IKK α ne sont pas capables d'induire une colite et qu'ils présentent un défaut de prolifération (Chen *et al.*, 2015). De plus, l'absence de RelA dans les lymphocytes T CD4⁺ prévient la pathologie auto-immune développée par les souris déficientes pour RelA dans les Tregs (Messina *et al.*, 2016). D'autre part, des lymphocytes T CD4⁺ déficients pour NIK ne sont pas capables d'induire une GVH tandis que la surexpression de cette protéine dans ces cellules conduit au développement d'une maladie auto-immune (Murray *et al.*, 2011). Enfin, un rôle de NF- κ B dans la différenciation des Th1, Th2, Th17 et Th9 a également été décrit.

Th1

Le rôle de NF- κ B dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1 a été notamment mis en évidence par le fait que son inhibition dans les lymphocytes T conduit à un défaut de production d'IFN γ par ces derniers en réponse à un test d'hypersensibilité dermique (Aronica *et al.*, 1999). Plus spécifiquement, il a été décrit que l'absence de RelA conduit à un défaut de production d'IFN γ par les Th1. Les auteurs l'expliquent en démontrant que RelA est recruté par le facteur de transcription Tbet sur la région CNS du gène *Ifng*, où se fixe également le facteur de transcription STAT4 (Balasubramani *et al.*, 2010). Il a également été constaté que les lymphocytes T déficients pour cRel ne sont pas capables d'induire une EAE, pathologie due aux Th1 et Th17 (Hilliard *et al.*, 2002).

Th2

Li-Weber *et al.* ont mis en évidence que RelA se fixe au niveau du promoteur du gène de l'*Il4*, cytokine nécessaire à la différenciation des lymphocytes CD4⁺ naïfs en Th2 et caractéristique de ces derniers, et participe à son expression en coopération avec le facteur de transcription NFAT (Li-Weber *et al.*, 2004).

Th17

Comme décrit précédemment, il a été constaté que les lymphocytes T déficients pour cRel ne sont pas capables d'induire une EAE (Hilliard *et al.*, 2002). L'implication de cette sous-unité dans la différenciation des Th17 a été confirmée par Ruan *et al.* qui ont montré que cRel, ainsi que RelA, se lie au promoteur des gènes *Rorct* et *Rorc*, deux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation en Th17 (Ruan *et al.*, 2011). D'autre part, il a été montré que la protéine I κ B ζ collabore avec ROR γ t et ROR α pour induire l'expression du gène codant pour l'IL-17 (Okamoto *et al.*, 2010).

Th9

Il a été constaté que la surexpression des sous-unités p52 et RelB dans les lymphocytes T CD4⁺ suffit à induire la conversion de ces derniers en Th9 (Xiao *et al.*, 2012). Il a également été montré que les sous-unités p50 et RelA se fixent sur une région régulatrice du gène *pu.1* (Bonadies *et al.*, 2009), qui code pour un facteur de transcription défini comme important pour la différenciation des Th9 (Chang *et al.*, 2010). Ces deux sous-unités ont également été décrites comme se fixant sur le promoteur du gène de l'*Il9*, cytokine caractéristique des Th9 (Early *et al.*, 2009).

2.3. Dans les lymphocytes T CD8⁺ conventionnels

Le rôle de NF- κ B dans les lymphocytes T CD8⁺ semble surtout être celui d'un facteur anti-apoptotique. Ceci complique l'analyse approfondie de ce facteur de transcription dans la différenciation de ces cellules puisque son invalidation conduit à une diminution de leur nombre, justifiant le peu d'études sur ce sujet. Il a ainsi été montré que l'inhibition de NF- κ B dans les lymphocytes T empêche spécifiquement la sélection positive des lymphocytes T CD8⁺ (Hettmann and Leiden, 2000). Ceci corrèle avec l'observation d'une expression plus forte du facteur de transcription dans les lymphocytes T CD8⁺ dans le thymus, par rapport aux CD4⁺ (Jimi *et al.*, 2008). De plus, l'absence spécifique de IKK β dans les lymphocytes T conduit à une diminution du nombre de CD8⁺ en périphérie (Schmidt-Supprian *et al.*, 2003).

2.4. Dans les lymphocytes T $\gamma\delta$ non conventionnels

Enfin, il a été montré que RelB est impliqué dans la production d'IL-17 par les lymphocytes T $\gamma\delta$ via la régulation de l'expression du gène *Rorct* (Powolny-Budnicka *et al.*, 2011).

OBJECTIFS ET PRINCIPES EXPERIMENTAUX

Mon projet de thèse a consisté en l'analyse du rôle des voies canonique et non canonique de NF- κ B dans la biologie des Tregs.

Pour cela, nous avons généré différentes lignées de souris *knock-out* (KO) conditionnelles pour RelA ou RelB dans les Tregs basées sur le système de recombinaison Cre-lox. Ces deux sous-unités ont été choisies du fait de leurs rôles dominants dans les voies canonique et alterne de NF- κ B, respectivement, décrits dans la littérature (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009). Nous avons donc croisé des souris $Foxp3^{CreYFP}$, dans lesquelles la recombinaise CRE est exprimée sous le contrôle du promoteur de $Foxp3$ et fusionnée à la protéine fluorescente YFP, avec des souris RelA ou RelB dites floxées, dans lesquelles des parties des gènes RelA ou RelB sont encadrés par des séquences loxP. Ces croisements aboutissent ainsi à l'excision par la CRE de la partie des gènes RelA ou RelB se trouvant entre les deux séquences loxP dans les cellules exprimant $Foxp3$, et donc à la délétion spécifique de RelA ou RelB dans les Tregs. Trois lignées de souris ont ainsi été produites :

- (i) les souris $Foxp3^{Cre} RelA^{lox}$, où uniquement les Tregs sont déficients pour RelA,
- (ii) les souris $Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}$, où chez les femelles 50% des Tregs nouvellement générés présentent une déficience pour RelA due à l'inactivation aléatoire du chromosome X, où se situe le locus du gène $Foxp3$,
- (iii) les souris $Foxp3^{Cre} Relb^{lox}$, où uniquement les Tregs sont déficients pour RelB.

Nous avons alors analysé par différentes expériences les conséquences de chacune de ces invalidations sur l'homéostasie et la fonction des Tregs.

- (i) L'existence d'une inflammation dans les différents organes étudiés a pu être identifiée par la réalisation de coupes histologiques colorées en hématoxyline/éosine permettant ainsi de voir l'importance de l'infiltrat cellulaire présent dans les différents tissus.
- (ii) L'analyse de l'homéostasie et de l'activation des différentes populations lymphocytaires et myéloïdes présentes dans les organes lymphoïdes ainsi que dans le foie, les poumons, l'intestin grêle, le colon et la peau a été faite en utilisant la

technologie de cytométrie en flux qui permet d'observer les niveaux d'expression de différentes protéines membranaires ou intracellulaires à l'aide d'anticorps fluorescents.

- (iii) La caractérisation de l'inflammation a été approfondie par la quantification des niveaux de cytokines pro-inflammatoires, des différents sous-types d'Immunoglobulines (Ig) et d'auto-anticorps anti-ADN dans les sérums des souris à l'aide des techniques d'*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) et de *Cytometric Bead Array* (CBA).
- (iv) La capacité suppressive des Tregs a été évaluée *in vitro* en analysant par cytométrie en flux la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ conventionnels stimulés par des splénocytes totaux issus de souris CD3ε KO et d'un anti-CD3 en présence de différents ratios de Tregs déficients ou non pour RelA ou RelB, après 3 jours de cultures.
- (v) La capacité suppressive des Tregs a également été étudiée *in vivo* par l'évaluation du contrôle du développement d'une colite au sein de souris *Rag* KO. En effet, l'injection de lymphocytes T CD4⁺ conventionnels sauvages dans des souris *Rag* KO conduit au développement d'une colite, caractérisée par une perte de poids des souris, qui peut être contrôlée par la présence de Tregs fonctionnels. Des analyses approfondies de l'homéostasie et la fonctionnalité des Tregs et lymphocytes T CD4⁺ conventionnels ont été faites par cytométrie en flux après sacrifice des souris une fois la maladie développée.
- (vi) Enfin, la stabilité et le niveau d'activation des Tregs ont été évalués en réalisant des expériences de transferts adoptifs. Nous avons ainsi procédé au co-transfert de Tregs sauvages et déficients pour RelA dans des souris sauvages ou lymphopéniques et analysé quelques jours plus tard la proportion de Tregs restant ainsi que leur phénotype par cytométrie en flux.

MATERIELS ET METHODES

1. Souris

Les souris *Foxp3-CRE-IRES-YFP* (*Foxp3^{Cre}*) (Rubtsov 2008), *RelA^{fllox}* (Algül 2007), *RelB^{fllox}* (Powolny-Budnicka, 2011) et *Foxp3-IRES-GFP* (*Foxp3^{GFP}*) (Wang 2008) ont été gentiment données par les Prs. Alexander Rudensky, Falk Weih et Bernard Malissen, respectivement. Les souris *CD3e^{tm1Mal}* (*CD3^{-/-}*), *CD45.1*, *CD90.1* et *RAG2^{-/-}* ont été obtenues auprès du centre de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal (CDTA) d'Orléans (France). Toutes les souris ont été croisées sur un fond génétique C57Bl/6. Tous les protocoles expérimentaux ont reçu l'approbation du comité d'éthique local et sont conformes aux directives de l'Union Européenne.

2. Western blot

Les cellules ont été incubées pendant 20 min sur de la glace dans un tampon de lyse (0,4 M NaCl, 25 mM Hepes pH 7,7, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 1%, NP40, 20 mM glycérol-phosphate, 0,2 mM Na₃VO₄, 10 mM PNPP, 2mM DTT, 0,1 M PMSF). Après une centrifugation de 10 min à 9500 G, la totalité de l'extrait cellulaire a été récupéré. 20 µg ont ensuite été mis à migrer sur un gel de polyacrylamide à 7,5% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). Un anticorps polyclonal anti-RelA (C20, Santa Cruz Biotechnology), un anticorps monoclonal anti-RelB (D4, Santa Cruz Biotechnology) et un anticorps monoclonal anti-β-actine (Sigma Aldrich) ont été utilisés. Le western blot a été révélé à l'aide de kit de détection *ECL Western blotting* (Pierce).

3. Histologie

Les organes ont été collectés et fixés dans une solution de PBS 1X-Formaldehyde 4% pendant 48h puis transférés dans de l'éthanol 70%. Après avoir été inclus en paraffine, des sections de 5 µm ont été coupées et colorées en hématoxyline/éosine.

4. Isolement des cellules

Pour les tissus lymphoïdes, les cellules ont été isolées par dilacération mécanique. Pour les tissus non lymphoïdes, les souris ont été anesthésiées puis perfusées en intra-cardiaque avec du PBS 1X froid. Le foie et les poumons ont été coupés en petits morceaux, digérés en

présence de collagénase de type IV (0,3 mg/ml) et de DNase I (100 µg/ml) pendant 30 min à 37°C, puis soumis à un gradient de Percoll (30–70%). De la même façon, après avoir enlevé les plaques de Peyer et l'épithélium, l'intestin grêle et le côlon ont été coupés en petits morceaux, digérés en présence de collagénase de type IV (1 mg/ml) et de DNase I (10 µg/ml) pendant 30min à 37°C, puis soumis à un gradient de Percoll (40–80%). Quant à la peau, elle a également été coupée en petits morceaux qui ont été digérés en présence de libérase DL (0,4mg/ml), de collagénase D (0,05 mg/ml) et de DNase I (10 µg/ml) pendant 1h à 37°C, puis soumis à un gradient de Percoll (40–80%).

5. Immunomarquages et analyses de cytométrie

Les immunomarquages ont été réalisés sur $2 \cdot 10^6$ cellules après isolement à partir des tissus ou sur le nombre de cellules récupérées après culture. Les cellules ont ensuite été incubées 10 min à 4°C avec du 2.4G2, un hybridôme produisant des anticorps dirigés contre les récepteurs des fragments constants des anticorps. Après lavage, les cellules ont été incubées pendant 20 min à 4°C avec un mélange d'anticorps dirigés contre des protéines membranaires. Pour les marquages intracellulaires, les cellules ont été fixées et perméabilisées à l'aide du kit « FoxP3 staining buffer set » (eBioscience) selon les recommandations du fournisseur et incubées pendant 30 min à 4°C avec un mélange d'anticorps. Les anticorps utilisés suivant provenaient de chez BD Biosciences: anti-CD45 (30-F11), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD90.1 (OX-7), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CD25 (PC61 or 7D4), anti-ICOS (7E.17G9), anti-GITR (DTA-1), anti-CD103 (M290), anti-Helios (22F6), anti-CTLA-4 (UC10-4F10-11), anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (HL3), anti-CD19 (1D3), anti-IA/E (M5/114.15.2), anti-Ly6C (AL-21), anti-Ly6G (1A8). L'anticorps anti-GFP était issu de chez Life Technologies. Les anticorps anti-CD3 (145-2C11), anti-Foxp3 (FJK-16s), anti-CD44 (IM7), anti-Ki67 (SOLA15), anti-Nrp1 (3DS304M), anti-NKp46 (29A1.4) et anti-F4/80 (BM8) provenaient de chez eBioscience. Les acquisitions ont été faites en utilisant les cytomètres de flux BD LSR II et BD Fortessa X20 et les analyses faites à l'aide du logiciel FlowJo.

6. Analyse quantitative des cytokines

L'analyse quantitative des cytokines présentes dans le serum des souris a été faite en utilisant le kit « mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit » (BD Biosciences) selon les recommandations du fournisseur. Les acquisitions ont été faites en utilisant les cytomètres de flux BD LSR II et BD Fortessa X20 et les analyses faites à l'aide du logiciel « FCAP array ».

7. Analyse quantitative des immunoglobulines et auto-anticorps

Une plaque 96 puits fond plat a été coaté avec soit de l'ADN de sperm de saumon (Sigma) soit des anticorps de chèvre anti-IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG2b de souris (Southern Biotech). Après lavages, la plaque était saturée avec de l'albumine de serum bovin (BSA pour *Bovine Serum Albumin*) et incubée avec les serums des souris. Puis, la plaque a été incubée avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris biotinylé (Southern Biotech) ou avec des anticorps de chèvre anti-IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG2b de souris (Southern Biotech). De la streptavidine couplée à l'enzyme Horse Radish Peroxydase (HRP) (Sigma) a ensuite été ajoutée suivie d'une incubation avec du TMB (eBioscience). La réaction a été stoppée en ajoutant du HCl 1N et révélée à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA DTX880 Multimode Detector (Beckman Coulter).

8. Purification des Tregs et Tconv

Pour la purification des Tregs, les cellules isolées de la rate et des ganglions ont été incubées en présence d'un anticorps anti-CD25 biotinylé (7D4) et de billes magnétiques anti-biotine (Miltenyi Biotec) puis un tri magnétique a été effectué (AutoMACS, Miltenyi) afin d'enrichir la suspension en cellules CD25⁺. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps anti-CD4 (RM4.5) puis triées à l'aide d'un BD FACSAria II afin de récupérer les cellules CD4⁺ Foxp3/YFP⁺ ou CD4⁺ Foxp3/GFP⁺.

Les Tconv ont été purifiés en incubant les cellules avec un anticorps anti-CD25 biotinylé (7D4) ou un mix d'anticorps anti-CD8 (53-6.7), -CD19 (1D3) et -CD11b (M1/70) biotinylés avec des billes magnétiques anti-biotine (Miltenyi Biotec) suivi d'un tri magnétique (AutoMACS, Miltenyi). La fraction contenant les cellules CD25⁻ ou CD8⁻ CD19⁻ CD11b⁻ a été récupérée et incubée avec un anticorps anti-CD4 (RM4.5) puis triée à l'aide d'un BD FACSAria II afin de récupérer les cellules CD4⁺ Foxp3/YFP⁻ ou CD4⁺ Foxp3/GFP⁻.

9. Culture cellulaire

Les Tregs purifiés (CD4⁺YFP⁺, 25 x 10³ cellules/puits) ont été cultivés dans du RPMI 1640-SVF (Sérum de Veau Fœtal) 10% avec ou sans splénocytes isolés d'une souris CD3KO (7,5 x 10⁴ cellules/puits), un anticorps anti-CD3 (0,05 µg/ml, 2C11, BioXcell), du TNF (50 ng/ml, Protein Service Facility, VIB, Belgium) et de l'IL-2 (10 ng/ml, Peproteck) dans une plaque 96 puits fond rond.

Pour les tests de suppression, les Tconv (CD4⁺YFP⁻, 2,5 x 10⁴ cellules/puits), préalablement marqués au CellTrace Violet selon les recommandations du fournisseur (Life technologies), ont été mis en culture avec des quantités différentes de Tregs (CD4⁺YFP⁺) et stimulés avec des splénocytes issus de souris CD3 KO (7,5 x 10⁴ cellules/puits) et d'un anticorps anti-CD3 (0,05 µg/ml, 2C11, BioXCell) dans du RPMI 1640-SVF 10%.

10. Colite

Les Tconv (CD4⁺GFP⁻, 1 x 10⁵ cellules) et Tregs (CD4⁺YFP⁺, 2 x 10⁴ cellules) purifiés ont été injectés en intra-veineux dans des souris RAG2^{-/-}. Les souris étaient ensuite pesées et observées trois fois par semaine.

11. Transferts adoptifs

Les Tregs (CD4⁺YFP⁺, 5 x 10⁵ de chaque) purifiés de souris CD45.1/2 *Foxp3*^{Cre/+} et CD45.2/2 *Foxp3*^{Cre/+} *Rela*^{lox} ont été co-transférés dans des souris CD45.1/1. Les Tregs (CD4⁺YFP⁺, 9 x 10⁴ de chaque) purifiés de souris CD45.1/2 *Foxp3*^{Cre/+} et CD45.2/2 *Foxp3*^{Cre/+} *Rela*^{lox} et les Tconv (CD4⁺GFP⁻, 6,5 x 10⁵) purifiés de souris CD45.1/1 *Foxp3*^{GFP} ont été co-transférés dans des souris CD3 KO.

12. Analyses statistiques.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism. Les tests utilisés pour évaluer la significativité statistique des résultats étaient un test log-rank (Mantel-Cox) pour les courbes de survie et des tests Mann-Whitney ou T-test pour les autres analyses. Les valeurs de p sont représentées ainsi dans les figures : **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001, *****p*<0,0001.

RESULTATS

I. Etude du rôle de la voie canonique de NF- κ B dans les Tregs

1. Introduction

Les Tregs jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du système immunitaire et la prévention des maladies auto-immunes en régulant les réponses immunitaires. Aussi bien chez la souris que chez l'homme, il est établi que des mutations de *Foxp3* entraînent une déficience en Tregs qui induit un syndrome auto-immun conduisant à la mort (Sakaguchi *et al.*, 2006). Bien que *Foxp3* soit essentiel à la différenciation, la fonction et la stabilité des Tregs, ce n'est pas le seul facteur de transcription impliqué dans ces processus.

Il a notamment été montré que les facteurs de transcriptions NFAT et RunX1 sont important pour le maintien de la capacité suppressive des Tregs (Wu *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2007). Il a également été décrit que l'expression concomitante de FoxP3 et de facteurs de transcriptions caractéristiques des Th tels que Tbet, IRF4, Blimp-1 ou encore Bcl6, confère aux Tregs une régulation plus spécifique des réponses immunes (Koch *et al.*, 2009; Cretney *et al.*, 2011; Linterman *et al.*, 2011). Enfin, l'implication des facteurs de transcriptions STAT5, TET, et GATA3 dans le maintien de la stabilité des Tregs a également été mise en évidence (Wohlfert *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). D'autre part, de plus en plus d'études suggèrent un rôle important de NF- κ B dans le développement et la fonction des Tregs.

Il existe 5 sous-unités de NF- κ B : NF- κ B1 (p105/50), RelA (p65) et c-Rel qui sont préférentiellement impliquées dans la voie canonique ; NF- κ B2 (p100/52) et RelB préférentiellement impliquées dans la voie alterne. Ces différentes sous-unités s'homo- ou s'hétéro-dimèrisent pour former une molécule NF- κ B fonctionnelle. Il a notamment été montré que la sous-unité cRel se fixe sur le promoteur et la région CNS3 du locus de *Foxp3* et est ainsi essentielle à la différenciation thymique des Tregs (Isomura *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2009). D'autres études ont également mis en avant un rôle de NF- κ B dans la biologie des Tregs par l'inhibition de membres plus en amont de la voie. Il a ainsi été montré que la délétion spécifique d'IKK β dans les Tregs aboutit à une diminution de leur production d'IL-10 et à leur sécrétion d'IFN γ et d'IL-17 (Chang *et al.*, 2012). Il a aussi été décrit que les souris déficientes pour IKK α dans les lymphocytes T CD4⁺ présentent une

diminution de la proportion de Tregs dans les organes lymphoïdes qui semble être due à défaut de prolifération *in vivo* (Chen *et al.*, 2015). Ainsi, en dehors d'une étude récente (Messina *et al.*, 2016) qui sera discutée dans la partie discussion, rien n'est connu sur le rôle spécifique de RelA dans les Tregs, décrit comme l'une des sous-unités préférentiellement impliquée dans la biologie des lymphocytes T (Oh and Ghosh, 2013).

Nous avons donc généré des souris ayant une délétion spécifique de la sous-unité RelA dans les Tregs, par le croisement de souris *Foxp3^{CreYFP}* avec des souris *Rela^{lox}*, souris dénommées ensuite *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}*, afin d'étudier son rôle dans la biologie de ces cellules.

2. Résultats

Le suivi clinique des souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}* nous a permis de constater que ces souris développent spontanément une maladie auto-immune sévère vers l'âge de 7-8 semaines qui aboutit au décès de toutes les femelles et à celui de la majorité des mâles. Celle-ci est caractérisée par une alopecie et des lésions cutanées plus ou moins sévère ainsi qu'une adénomégalie et une inflammation des poumons, de l'estomac et du côlon, caractérisée notamment par la présence d'un important infiltrat cellulaire. Les souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}* présentaient également une diminution significative de leur poids par rapport aux souris contrôles *Foxp3^{Cre}*. La délétion de RelA spécifiquement dans les Tregs conduit donc au développement d'une inflammation systémique sévère.

Afin de mieux caractériser celle-ci, nous avons analysé les populations lymphocytaires effectrices des souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}* âgées de 12 semaines. Nous avons ainsi observé une augmentation importante du nombre de leucocytes dans les ganglions drainants la peau (sdLN) ainsi que dans les trois tissus majoritairement enflammés, les poumons, le côlon et la peau. Cette augmentation s'explique notamment par un plus grand nombre de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ ainsi que de lymphocytes B. De plus, les lymphocytes T de ces organes ont un phénotype beaucoup plus activé que ceux des souris contrôles *Foxp3^{Cre}*, défini par la forte hausse de différents marqueurs d'activation tels que CD44, Ki67 et ICOS exprimés par ces cellules. La même observation a été faite dans la rate, les ganglions profonds (iLN) et mésentériques (mLN), le foie et l'intestin grêle démontrant une activation systémique des lymphocytes T dans les souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}*. Celle-ci a été confirmée par la détection d'une forte quantité de différentes cytokines inflammatoires, IFN γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-6 et TNF α , dans le sérum de ces souris par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}*. Nous avons également

déecté une augmentation des IgM, IgG1, IgG2b, IgA et IgE ainsi que d'auto-anticorps anti-ADN dans le sérum des souris *Foxp3^{Cre} Relalox*.

L'étude du compartiment myéloïde nous a permis de compléter la caractérisation de cette inflammation systémique. Nous avons en effet observé une augmentation du nombre de cellules CD11b⁺ dans la rate, les ganglions, le foie, les poumons, l'intestin grêle, le côlon et la peau des souris *Foxp3^{Cre} Relalox* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}*. Celle-ci était due à une hausse du nombre de monocytes inflammatoires, d'éosinophiles et surtout de neutrophiles dans l'ensemble de ces organes. Il est important de noter que ces augmentations étaient plus marquées dans les organes les plus enflammés *i.e.* les sdLN, les poumons, le côlon et la peau.

Par ailleurs, l'analyse de souris *Foxp3^{Cre} Relalox* âgées de 5 semaines nous a permis de constater que l'inflammation était modérée à cet âge. En effet, le nombre de CD45⁺ était augmenté uniquement dans les sdLN, iLN et pas encore dans les poumons, le côlon et la peau. Nous avons également observé une tendance à une augmentation de la proportion de lymphocytes T effecteurs CD44^{hi}CD62L^{low} et Ki67⁺ mais qui restait moindre que celle observée dans les souris âgées de 12 semaines.

L'ensemble de ces résultats montre que les souris *Foxp3^{Cre} Relalox* développent progressivement une inflammation systémique sévère qui semble être de type auto-immun.

De façon surprenante, nous avons observé une augmentation de la proportion des Tregs dans l'ensemble des organes lymphoïdes des souris *Foxp3^{Cre} Relalox*. En revanche, celle-ci était diminuée dans les 3 tissus majoritairement enflammés, les poumons, le côlon et la peau, et ce dès 5 semaines, suggérant un défaut potentiel de migration, survie ou stabilité des Tregs déficients pour RelA dans ces organes. L'étude de l'expression de différents marqueurs d'activation tels que Ki67, GITR et CD103 a permis de mettre en évidence un phénotype plus activé des Tregs dans l'ensemble des organes étudiés des souris *Foxp3^{Cre} Relalox* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}*. La proportion de Tregs activés/mémoires CD44^{hi}CD62L^{low} était diminuée dans les ganglions et le foie, inchangée dans la rate, l'intestin grêle et le côlon et augmentée dans les poumons et la peau. Les niveaux d'expression de FoxP3 et CD25 étaient quant à eux inchangés dans l'ensemble des organes étudiés. Ces premiers résultats ne mettant pas en évidence un défaut fonctionnel évident des Tregs déficients pour RelA pouvant expliquer la pathologie observée, nous avons réalisé différentes expériences à partir de ces cellules. Nous les avons ainsi stimulées en présence ou non d'IL-2 avec ou non du TNF et avec ou non une stimulation du TCR et avons observé un léger défaut

de survie de ces Tregs comparés aux Tregs sauvages, issus des souris *Foxp3^{Cre}*, quelles que soient les conditions. Nous avons également évalué leur capacité suppressive *in vitro* et n'avons pas observé de différence entre ces derniers et les Tregs sauvages. Nous avons en revanche observé que les Tregs déficients pour RelA n'étaient pas capables de contrôler le développement d'une colite induite chez des souris RAG KO, voire même qu'ils l'aggravaient. L'analyse plus poussée de cette expérience nous a permis de constater que l'augmentation de cette sévérité n'était pas due à une augmentation du nombre de lymphocytes T conventionnels ou à un défaut de ces derniers de se convertir en pTregs mais à un défaut de stabilité des Tregs déficients pour RelA qui deviendraient pathogènes. Ces résultats suggèrent donc que la diminution de proportion des Tregs observée dans les poumons, le côlon et la peau des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* serait majoritairement due à un défaut de stabilité de ces Tregs, tandis que l'inflammation augmenterait leur proportion dans les organes lymphoïdes.

L'inflammation systémique développée par les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* impactant très certainement sur l'homéostasie et la fonction des Tregs, nous avons généré des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* pour étudier les conséquences de l'absence de RelA dans un contexte plus physiologique. En effet, ces souris ne présentent pas de signes de maladie ou d'inflammation probablement du fait de la présence de Tregs sauvages en plus de ceux déficients pour RelA. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence une forte diminution de la proportion de cellules CD44^{hi}CD62L^{low}, Ki67⁺ et CD103⁺ parmi les Tregs déficients pour RelA dans les organes lymphoïdes, le foie et les poumons des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}*, comparé aux Tregs exprimant également la CRE dans les souris *Foxp3^{Cre/wt}*. Nous avons également détecté une diminution d'expression de *Foxp3*, *Icos*, *Ctla-4* et *Gitr* au sein de ces cellules. Ainsi, en l'absence d'inflammation, RelA semble important pour l'activation des Tregs.

Enfin, afin de pouvoir approfondir l'étude du défaut biologique des Tregs déficients pour RelA nous avons réalisé des expériences de co-transfert de Tregs sauvages et déficients pour RelA, issus respectivement des souris *Foxp3^{Cre/wt}* et *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}*, distinguable par l'expression d'un marqueur congénique. Nous avons dans un premier temps réalisé ces co-injections chez des souris sauvages CD45.1 et avons observé, dans ces conditions, une proportion équivalente entre les Tregs déficients pour RelA et ceux sauvages. En revanche, nous avons noté une perte de FoxP3 par une partie des Tregs déficients pour RelA, soulignant le défaut de stabilité précédemment mis en évidence. La même injection additionnée de

lymphocytes T conventionnels faite chez des souris lymphopéniques CD3 KO a quant à elle mis en évidence un défaut de survie des Tregs déficients pour RelA et a permis de mettre en exergue le défaut de stabilité de ces Tregs. Ainsi, l'absence de RelA dans les Tregs conduit à une perte de FoxP3 par ces derniers aboutissant à la genèse d'ex-Tregs en conditions physiologiques et lymphopéniques.

3. Conclusion

L'ensemble des données générées à l'aide des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* et *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* met en évidence un rôle important de la sous-unité RelA de NFκB dans la biologie des Tregs. En effet, l'altération spécifique de celle-ci au sein des Tregs conduit au développement d'un syndrome auto-immun sévère caractérisé notamment par une alopecie et des lésions cutanées plus ou moins importantes et aboutit en quelques semaines au décès de la majorité des animaux. Les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* développent rapidement une inflammation majeure des poumons, de l'estomac, du côlon et de la peau et présentent une adénomégalie conséquente. De plus, nous avons observé une activation très élevée des Teffs des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* ainsi qu'une augmentation majeure de leur nombre et de ceux des populations myéloïdes dans beaucoup de tissus. D'importantes quantités de cytokines inflammatoires, d'auto-anticorps et de différentes Ig ont également été détectées dans leur sérum. Ces données suggèrent donc qu'il y a un défaut homéostatique et/ou fonctionnel des Tregs déficients pour RelA.

De façon surprenante, nous avons observé une augmentation de la proportion des Tregs dans les organes lymphoïdes des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* qui avaient un phénotype beaucoup plus activé. Dans les tissus enflammés de ces souris, les poumons, le côlon et la peau, les Tregs avaient également un haut niveau d'activation par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}* mais leur proportion y était diminuée. La stimulation des Tregs des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* dans différentes conditions *in vitro* a mis en évidence un léger défaut de survie de ces derniers. L'analyse des Tregs déficients pour RelA dans un contexte non inflammatoire, par l'utilisation des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}*, nous a permis d'observer également un défaut d'activation de ces derniers. Deux méthodes couramment utilisées pour évaluer la fonctionnalité des Tregs sont la réalisation d'un test de suppression *in vitro* et leur capacité à contrôler une colite induite chez des souris lymphopéniques. Nous n'avons pas observé de différence *in vitro* entre les Tregs déficients pour RelA et ceux sauvages. En revanche, le modèle de colite nous a permis de mettre en évidence un défaut fonctionnel des Tregs déficients pour RelA qui semble majoritairement dû à un défaut de stabilité. Cependant, le

modèle de colite peut être critiquable par la différence d'inflammation qu'il existe entre les souris ayant reçu les Tregs sauvages et celles ayant reçu les Tregs déficients pour RelA où la pathologie est plus sévère. De plus, ce modèle ne permet pas de différencier entre un défaut de suppression, de survie, de migration et de prolifération. Nous avons donc réalisé des co-transferts de Tregs sauvages et de Tregs déficients pour RelA dans des souris sauvages ou lymphopéniques afin de les étudier dans un contexte similaire et en ayant un marqueur congénique qui nous permet de mieux suivre leur devenir. Nous avons ainsi confirmé le défaut de stabilité des Tregs déficients pour RelA.

L'ensemble de ces résultats sera rediscuté dans la discussion générale (partie « Discussion » I.).

RelA is critical in the control of autoimmunity by maintaining regulatory T cell stability

Emilie Ronin¹, Martina Lubrano¹, Romain Vallion¹, Sylvie Grégoire¹, Davi Collares², Audrey Baeyens¹, Angéline Rouers¹, Jochen Huehn³, Véronique Baud², Christophe Benoist⁴ and Benoit L Salomon¹

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France.

²Laboratoire NF- κ B, Differentiation and Cancer, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

³Department Experimental Immunology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany.

⁴Division of Immunology, Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115.

Correspondence should be addressed to B.L.S. (benoit.salomon@upmc.fr).

Les lymphocytes T CD4⁺FoxP3⁺ régulateurs (Tregs) jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du système immunitaire et la prévention des maladies auto-immunes en régulant les réponses immunitaires. Bien que *Foxp3* soit essentiel à la différenciation, la fonction et la stabilité des Tregs, ce n'est pas le seul facteur de transcription impliqué dans ces processus. Il a notamment été montré que la sous-unité cRel de NF- κ B se fixe sur le promoteur et la région CNS3 de *Foxp3*, jouant ainsi un rôle essentiel dans le développement thymique des Tregs. Cependant, peu de données existent sur le rôle de NF- κ B dans les Tregs à la périphérie. Nous avons donc généré des souris ayant une délétion spécifique dans les Tregs pour l'une des sous-unités principales de NF- κ B, RelA. Son invalidation dans les Tregs conduit au développement d'un syndrome auto-immun sévère caractérisé par des lésions cutanées, l'inflammation de nombreux organes et une activation forte des lymphocytes T conventionnels. En dehors des poumons, du côlon et de la peau, la proportion des Tregs était augmentée dans ces souris tout comme leur niveau d'activation. Cependant, nous avons observé une propension marquée de ces Tregs à perdre FoxP3. Ainsi, RelA semble jouer un rôle critique dans la biologie des Tregs en participant à leur stabilité.

ABSTRACT

Regulatory T cells (Tregs) play a major role in the control of immune homeostasis and in the prevention of autoimmune diseases. It has shown that cRel/NF- κ B is critical in the differentiation of thymic Tregs but very is known on the role of NF- κ B on biology of mature Tregs. Here, we generated mice that have a specific knockout of RelA, a key member of NF- κ B, in Tregs. These mice developed a systemic and severe autoimmune syndrome with multi-organ immune infiltration and high activation of lymphoid and myeloid cells. Except in the colon and skin, the mice did not have reduced proportion of Tregs. Whereas there was no direct evidence of major defect of activation or suppressive function of Tregs, RelA-deficient Tregs had reduced stability and lost Foxp3 expression. Thus, RelA appears to be critical in Treg biology by maintaining their integrity.

INTRODUCTION

CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) play a critical role in immune homeostasis and in the prevention of autoimmune diseases by regulating immune responses. In humans and mice, it is well established that *forkhead box protein 3* (*Foxp3*) deficiency conducts to the development of an autoimmune syndrome leading to early death (Sakaguchi *et al.*, 2006). Although *Foxp3* plays a critical role in differentiation, suppressive function or stability of Tregs, other transcription factors (TFs), some of which interacting in multi-molecular complexes with Foxp3, are also involved in different aspects of their biology. Some, such as cRel, are involved in Treg differentiation (Isomura *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009). Others, such as NFAT, RunX1, BACH2 or Eos are critical to maintain their suppressive activity (Wu *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009; Roychoudhuri *et al.*, 2013). Another group of TFs, such as Blimp1, Myb, STAT3, Tbet, IRF4, Bcl6 or PPAR γ are involved in further differentiation of activated Tregs and in their capacity to suppress different types of immune responses (Chaudhry *et al.*, 2009; Koch *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009; Cretney *et al.*, 2011; Linterman *et al.*, 2011; Cipolletta *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2017). Other TFs, such as STAT5, TET, GATA3, p300/CBP or Ezh2 are involved in maintaining Treg integrity and stability by controlling Foxp3 transcription and epigenetics (Wohlfert *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; DuPage *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Although it has been reported that NF- κ B is able to bind to the regulatory sequence of *Foxp3* and to interact with a complex containing Foxp3 (Bettelli *et al.*, 2005; Isomura *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009), the role of this TF in Treg biology is poorly defined, besides for cRel in thymic Treg differentiation.

The NF- κ B TFs are active as homo or heterodimeric molecules of NF- κ B1 (p105/50), RelA (p65) and c-Rel subunits for the canonic pathway and of NF- κ B2 (p100/52) and RelB

subunits for the non-canonic pathway. As mentioned above, cRel is essential for thymic Treg development by binding to the promoter sequence and the conserved non-coding sequence (CNS) 3 of *Foxp3* (Isomura *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2009). The role of NF- κ B in mature Treg biology has been addressed by knocking-out upstream activators of the pathway. IKK α and IKK β are kinases that activate NF- κ B. Mice with a conditional KO in Tregs of Ubc13, an E2 ubiquitin ligase activation IKK β , develop a spontaneous autoimmune syndrome associated with conversion of Tregs into effector like T cells without *Foxp3* loss (Chang *et al.*, 2012). Mice with a conditional knockout of IKK α in whole CD4⁺ T cells have a decreased proportion of Tregs in lymphoid organs, which seem to have a defective suppression and proliferation capacities *in vivo* (Chen *et al.*, 2015). Besides one recent report that will be discussed later (Messina *et al.*, 2016), nothing is known on the specific role of RelA in Tregs, which is considered as the main factor of the 5 NF- κ B members in conventional T cells (Oh and Ghosh, 2013). We thus generated mice with a conditional KO of RelA in Tregs. These mice developed a severe and early spontaneous autoimmune syndrome, revealing the critical role of this factor in Treg biology.

RESULTS

Mice with RelA deficient Tregs develop systemic inflammation

To assess the role of RelA in Treg biology, we generated *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice that have a specific deletion of RelA in Tregs by crossing mice expressing CRE in Tregs with mice expressing a *Rela* floxed allele. In these mice, Tregs expressed a non-functional truncated form of RelA (Fig. 1A), as expected using this floxed allele (Algül *et al.*, 2007). From 5-10 weeks of age, *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice developed a spontaneous disease characterized by localized alopecia and skin lesions (epidermal hyperplasia, hyperparakeratosis, cystic hair), and reduced weight growth compared to *Foxp3^{Cre}* control mice (Fig. 1B, C). This pathology had high penetrance and was severe since all females and most males died by 40 weeks of age (Fig. 1D, E). At 10-12 weeks of age, *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice exhibited adenomegaly and macroscopic signs of mild colon inflammation (Fig. 1F, G). Histological analyses showed moderate immune cell infiltration in the lung, stomach and colon and massive infiltration in the skin (Fig. 1H). The liver and small intestine were not or minimally infiltrated. Thus, mice with RelA-deficient Tregs developed a severe and systemic inflammatory syndrome.

***Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice develop a spontaneous autoimmune syndrome**

We then analyzed the lymphocyte compartment of 10-12 week-old *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. Numbers of CD45⁺ leukocytes were significantly increased in the skin draining lymph nodes (sdLN), the inguinal LN (iLN) and the inflamed non-lymphoid tissues (lung, colon and skin) but not in the spleen, mesenteric LN or the non-inflamed non-lymphoid tissues (liver, small intestine) (Fig. 2A). This leukocyte expansion was due to increased numbers of CD8⁺ and CD4⁺ T cells, B cells (Fig. 2B and not shown) and myeloid cells (see below). Moreover, the proportions of CD44^{high}CD62L^{low}, Ki67⁺ and ICOS⁺ activated/memory CD8⁺ and CD4⁺ T

cells were significantly increased in the sdLN and lung of *Foxp3^{Cre} Rel^{lox}* mice compared to *Foxp3^{Cre}* control mice (Fig. 2C, D and Sup. Fig. 1A). The same tendency was observed in the colon and skin, although it was not significant, probably because basal levels of activated cells were already high in *Foxp3^{Cre}* control mice. Interestingly, an increased proportion of activated/memory T cells was also observed in the spleen, iLN and mesenteric LN (mLN) as well as in the non-inflamed liver and small intestine, demonstrating a global systemic T cell activation in *Foxp3^{Cre} Rel^{lox}* mice (Fig. 2C, D and Sup. Fig. 1B). Systemic inflammation was confirmed by quantifying cytokines in the serum since levels of IFN γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-6 and TNF α were highly increased (Fig. 2E). Also, serum levels of IgM, IgG1, IgG2b, IgA and IgE (Fig. 2F) and of anti-DNA autoantibodies (Fig. 2G) were increased in 12-14 week-old sick *Foxp3^{Cre} Rel^{lox}* mice compared to *Foxp3^{Cre}* control mice. Numbers of NK cells and dendritic cells were variable with an increase in some tissues (sdLN and skin) and a decrease in others (spleen and liver) (Sup. Fig. 2A). The systemic inflammation was further documented by analyzing myeloid CD11b⁺ cells, characterized as shown in figure 3A, since their numbers were strongly increased in the spleen and sdLN as well as in the non-lymphoid tissues (lung, liver, colon and skin) in *Foxp3^{Cre} Rel^{lox}* mice compared to controls (Fig. 3B and Sup. Fig. 2B). This increase of myeloid cells was due to an increase of neutrophils in all these tissues and of eosinophils and monocytes in all tissues except lung and liver (Fig. 3C and Sup. Fig. 2C).

Only part of this inflammatory phenotype was observed in 4-6 week-old *Foxp3^{Cre} Rel^{lox}* mice. Increased numbers of whole CD45⁺ leukocytes were observed in sdLN and iLN but not yet in the lung, colon and skin (Sup. Fig. 3A). A trend for higher proportion of activated/memory T cells, defined by expression of CD44, CD62L and Ki67, was observed in all analyzed lymphoid and non-lymphoid tissues (Sup. Fig. 3B). Finally, inflammatory cytokines, natural antibodies and anti-DNA antibodies were not or minimally increased in 4-6

week-old *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* compared to control mice (Fig. 2E-G). In conclusion, *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice developed a severe systemic autoimmune syndrome, already uncovered at 4-6 weeks of age, followed, 1-3 months later, by massive activation of lymphoid and myeloid cells, immune infiltration of several tissues and high rise of serum inflammatory cytokines, immunoglobulins and auto-antibodies.

Homeostasis and function of Tregs in *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice

We then analyzed Treg homeostasis in 10-12 week-old *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. Strikingly, Treg proportion was significantly increased in lymphoid organs, except in mLN, whereas it was decreased in the colon and skin and unchanged in the liver, lung and small intestine compared to *Foxp3^{Cre}* control mice (Fig. 4A). The proportion of activated/memory CD44^{hi}CD62L^{low} Tregs was decreased in all LN and the liver, unchanged in the spleen, colon and small intestine and increased in the lung and skin (Fig. 4B and Sup. Fig. 4A). Finally, Tregs of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice had a more activated phenotype, based on the expression of the ICOS, GITR and CD103 Treg activation markers, in most lymphoid and non-lymphoid organs (Fig. 4 C and Sup. Fig. 4B). Foxp3 and CD25 expressions were unchanged (data not shown). In 4-5 week-old *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice, Treg proportion and markers of activation (CD44, ICOS and Ki67) were not significantly increased in lymphoid tissues (Sup. Fig. 4C, D). Interestingly, Treg proportion was already decreased in the intestine and skin of these young mice (Sup. Fig. 4C).

To assess factors that may impact on Treg homeostasis, we cultured purified Tregs in different conditions, with or without IL-2, and with or without TCR stimulation and TNF because of their capacity to activate the NF-kB pathway (Vallabhapurapu and Karin, 2009). We observed that RelA-deficient Tregs were able to respond and proliferate normally to TCR

and TNF stimulation at day 3. Their only defect was a slight decreased survival at day 1 that was not anymore observed at day 3 (Sup. Fig. 5).

The severe disease of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice in the absence of major Treg quantitative defect suggests that Tregs may be dysfunctional. In vitro assays showed that RelA-deficient Tregs, purified from 5-6 week-old mice, were able to suppress proliferation of conventional T cells almost as efficiently as control Tregs (Fig. 4D). To further analyze their function, we assessed their capacity to suppress colitis induced by effector T cells transferred in lymphopenic mice, measured by weight loss and histology. Surprisingly, not only RelA-deficient Tregs were unable to control colitis but the disease was even more severe compared to mice transferred with effector T cells alone (Fig. 4E, F). This exacerbated colitis was not associated with increased number of cells from Tconv origin or to their lower propensity to differentiate in peripheral Treg (Sup. Fig. 6). Instead, the severe colitis was rather due to the fact that most RelA-deficient Tregs lost Foxp3 expression in the colon and mLN, potentially differentiating in pathogenic effector T cells (Fig. 4G). In conclusion, *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice had increased numbers of Tregs in lymphoid tissues, probably due to systemic inflammation, but lower numbers of Tregs in the colon and skin, which could be due to Treg instability and loss of Foxp3 expression.

RelA deficient Tregs have reduced expression of some activation markers at steady state

Foxp3^{Cre} RelA^{lox} mice developed systemic inflammation, which may impact on Treg biology. To assess the intrinsic role of RelA in Tregs at steady state, we generated *Foxp3^{Cre/+} RelA^{lox}* heterozygote females, in which theoretically half of Tregs expressed RelA and the other half were RelA-deficient because the *Foxp3* locus is on the X chromosome. We first observed that these mice did not have any sign of disease and inflammation, which was most likely due to the presence of functional RelA-sufficient Tregs. Indeed, numbers of leukocytes, CD4, CD8,

and Tregs and proportions of activated Tconv and Tregs were similar in *Foxp3^{Cre/+} RelA^{lox}* females and *Foxp3^{Cre/+}* controls (Sup. Fig. 7). In the *Foxp3^{Cre/+}* control females, CRE-expressing Tregs were present in lower proportion and with slightly lower expression of activation markers compared to Tregs not expressing CRE, suggesting that the CRE transgene moderately impact on Treg biology in this competitive condition (Fig. 5A, B). That is why it was critical to compare *Foxp3^{Cre/+} RelA^{lox}* mice with *Foxp3^{Cre/+}* controls. Compared to these controls, the knock-out of RelA slightly but not significantly reduced the proportion of Tregs in spleen and LNs (Fig. 5A). The absence of RelA expression had a more severe impact on Treg activation since the proportions of CD44^{high}, Ki67⁺ and CD103⁺ Tregs were strongly reduced in all tissues and the ones of ICOS, CTLA-4 and GITR were reduced in some tissues (Fig. 5B and Sup. Fig. 8). Also, the proportion of Nrp1⁺ and Helios⁺ thymic derived Tregs and FoxP3 expression were slightly but not significantly reduced in the absence of RelA (Fig. 5C, D). In conclusion, in the absence of inflammation, RelA expression appears to promote Treg activation.

Lack of stability of RelA-deficient Tregs.

We tested whether RelA has any role in maintenance of Treg stability and integrity by analyzing Foxp3 expression after transfer of RelA-deficient Tregs. Cells were purified from *Foxp3^{Cre/+} RelA^{lox}* mice (*Foxp3^{Cre/+}* for controls) and not from *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice since systemic inflammation in these latter mice would modify Treg biology in addition to the impact of the RelA defect. We first co-transferred RelA-deficient and -sufficient Treg in lymphoreplete mice to assess Treg stability at steady state. The 2 types of donor cells were traced in the recipients using congenic markers to be able to compare their biology in the very same environment (Fig. 6A). Six days after transfer, the proportions of the 2 cell types were similar to the one of injected cells in lymphoid and non-lymphoid tissues suggesting that

RelA has no major impact on Treg migration and survival in this condition (Fig. 6B). Compared to RelA-sufficient Tregs, an increased fraction of injected RelA-deficient Treg became Foxp3⁻, and thus so-called ex-Tregs, in the spleen and iLN, whereas the cells that remained Foxp3⁺ had a tendency to express lower levels of Foxp3 (Fig. 6C). Also, RelA-deficient Treg expressed lower levels of CTLA4 and CD103 (Fig. 6D), which could be partly due to the lower expression of these markers before transfer (Fig. 5B and Sup. Fig. 8). We then addressed similar questions in a lymphopenic environment. CD3 KO mice were co-transferred with the same RelA-deficient and -sufficient Treg but this time we added Tconv cells to sustain viability and expansion of injected Tregs (Fig. 6E). 11 days after transfer, the proportions of RelA-deficient cells were much reduced compared to the ones of RelA-sufficient cells, specifically in the intestine, a location subjected to high inflammation in this setting. Also, a higher fraction of RelA-deficient Tregs became ex-Tregs in all lymphoid and non-lymphoid tissues. In conclusion, in both lymphoreplete and lymphopenic conditions, the absence of RelA expression affects Treg stability leading to Foxp3 loss and increased differentiation of Tregs in ex-Tregs.

DISCUSSION

Here, we show that RelA plays a major role in Treg biology since its specific deletion in these cells leads to the development of a spontaneous, severe and systemic autoimmune syndrome. The disease recapitulates some of the symptoms observed in Treg-deficient scurfy mice, although with a slower kinetics (Sakaguchi *et al.*, 2006). As in scurfy mice, *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice developed inflammation of the skin, stomach, colon or lung, massive activation of effector T cells and myeloid cells and high levels of inflammatory cytokines, immunoglobulins and anti-DNA in the serum. The injection of WT Tregs before 7 days of age was sufficient to stop the development of the pathology (data not shown). The disease was not due to a global defect of Tregs since they were present in even increased proportion in lymphoid tissues.

Investigating initial events that led to disease could not be properly analyzed in *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice since inflammation has major impact on Treg migration, survival, activation, suppressive function or stability (Zhou *et al.*, 2009; van der Veecken *et al.*, 2016), confounding the interpretation of what was due to inflammation or to the intrinsic RelA deficit. *Foxp3^{Cre/+} RelA^{lox}* mice allowed us to study RelA-deficient Tregs biology in the absence of inflammation. Differentiation of thymic and peripheral Tregs seems normal or closed to normal in these mice, either because RelA does not play a role, contrary to cRel (Isomura *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2009), or because RelA deletion, controlled by Foxp3 expression, was too late to impact on Treg differentiation. The increased proportion of Tregs in the thymus of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice likely resulted from the re-circulation of activated Tregs from the periphery to this tissue, a phenomenon recently described (Thiault *et al.*, 2015). We observed a defect of expansion and/or survival of RelA-deficient Tregs but only in the specific context of competition with RelA-sufficient Tregs and in a lymphopenic

environment. This defect was not found in *Foxp3^{Cre/+} RelA^{lox}* mice or in RelA-deficient and -sufficient Tregs co-transferred in lymphoreplete mice (competition but no lymphopenia) or in the colitis model (lymphopenia but no competition) and thus could not explain the disease of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. *In vitro* assays did not reveal Treg suppressive defect. Proper evaluation of Treg suppressive function *in vivo* is difficult if not impossible. Using the standard assay of colitis control by Tregs, we found that RelA-deficient Tregs were unable to regulate the disease. This could be due to a genuine Treg dysfunction but it may also result from a defect of Treg survival, migration or stability, confounding the interpretation of the experiment. Our data are more in favor of Treg un-stability, as discussed below. Another mean, rather indirect, to assess Treg function is the analysis of the expression of activation markers and molecules involved in suppressive function. Phenotypic data are ambivalent since in the competitive environment of *Foxp3^{Cre/+} RelA^{lox}* mice, RelA-deficient Tregs had lower expression of activation markers (CD44, Ki67, CD103, ICOS) and suppressive molecules (CTLA4) in some tissues whereas it was quite the opposite in the inflamed environment of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice.

What was more consistent and unexpected was the increased un-stability of RelA-deficient Tregs. We first observed this phenomenon in the colitis model, as previously reported (Messina *et al.*, 2016). However, one cannot conclude from this finding that RelA plays an intrinsic role in Treg stability. Indeed, compared to lymphopenic mice co-transferred with Teff and WT Tregs, the ones co-transferred with Teff and RelA-deficient Treg developed very severe colitis. Increased Treg un-stability could be well due to increased inflammation, and not RelA deficiency, since it is well established that different inflammatory factors precipitate Foxp3 loss (Zhou *et al.*, 2009). Direct evidence came from studies when we compared RelA-sufficient and -deficient Tregs in the same environment after cell co-transfer in lymphopenic mice. We clearly showed that most RelA-deficient Tregs became ex-Tregs,

contrary to control Tregs. Although with reduced intensity, increased un-stability of RelA-deficient Tregs was also observed in the absence of inflammation, as measured after transfer in lymphoreplete mice.

All these information putting together help us to speculate on the pathophysiology of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. Whereas Treg proportion was normal in lymphoid tissues of young (5-week old) mice, it was already low in the intestine and the skin, tissues that are in contact with external environment and microbiota. Inflammatory factors in this environment may alter stability of RelA-deficient Tregs, some of them becoming pathogenic ex-Tregs because of their high autoreactivity, precipitating local inflammation. The combination of reduced Treg proportion and the presence of pathogenic ex-Tregs in these tissues maybe the driving forces of the autoimmune syndrome of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. These initial events may ignite the whole immune system, leading to widespread activation of the lymphoid and myeloid compartments and release of inflammatory cytokines that will boost global Treg activation and expansion, which remains insufficient to control the pathology.

A recent publication describing similar conditional KO mice developing a related autoimmune syndrome suggested that a major alteration of RelA-deficient Tregs was their defect to differentiate in effector Tregs (Messina *et al.*, 2016). However, in this work, this defect was only partial, observed in LN and not in the spleen, and mostly analyzed in a quite irrelevant model since RelA was knock-out in whole T cells. As discussed above, our data do not support a major defect of effector Tregs and point out the ambivalent role of RelA in Treg activation that differed depending on the tissue, the analyzed activation marker and the context (competition with WT Tregs or not). This recent publication also described instability of RelA-deficient Tregs but this was only observed in the model of colitis in which it could perfectly explained by the increased inflammation in these mice compared to mice transferred with RelA-sufficient Tregs and not by an intrinsic role of RelA in Treg stability. Also, they

did not analyze Tregs of non-lymphoid tissues. Our work completes their analysis and reveals the critical role of RelA in Treg stability.

What are the molecular mechanisms explaining un-stability of RelA-deficient Tregs? Foxp3 stability is controlled by histone and protein acetylation and by DNA methylation in the conserved noncoding sequence 2 (CNS 2) of *Foxp3*. RelA activity may impact on these epigenetic modulations by different ways. RelA interacts with CBP and p300 histone/protein acetyltransferases, which seems to be critical for the recruitment of CBP and p300 to their target promoter sites, as shown in fibroblasts (Mukherjee *et al.*, 2013). Because CBP and p300 promote *Foxp3* transcription, *Foxp3* stability at the level of CNS2 and prevent Foxp3 degradation (Liu *et al.*, 2014; van Loosdregt and Coffey, 2014), RelA-deficient Tregs may have major un-stability. Also, Foxp3 and RelA seem to cooperate to promote Foxp3 and CD25 expression by bindings to their regulatory sequences (Soligo *et al.*, 2011; Camperio *et al.*, 2012), which may favor Treg stability given the known role of IL-2 receptor signaling pathway in maintenance of Treg identity (Feng *et al.*, 2014). Some of these RelA activities cannot be compensated by cRel (Soligo *et al.*, 2011), suggesting that RelA and cRel play complementary role in Treg biology. Interestingly, we observed an increased binding of cRel to its target DNA sequences in Tregs of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice that have systemic inflammation (not shown). This may further increase conversion of Tregs in pathogenic Th17 cells since cRel favors ROR γ t expression and Th17 differentiation (Ruan *et al.*, 2011).

In conclusion, our study shows the non-redundant role of RelA in Treg biology since its specific deletion leads to a severe autoimmune disease. Although further studies will be required to decipher molecular mechanisms, our data reveals an intrinsic role of RelA in Treg stability and maintenance of Foxp3 expression.

METHODS

Mice. *Foxp3-CRE-IRES-YFP* (*Foxp3^{Cre}*) (Rubtsov 2008), *RelA^{fllox}* (Algül 2007) and *Foxp3-IRES-GFP* (Wang 2008) knock-in (*Foxp3^{GFP}*) mice were kindly given by Prs. Alexander Rudensky, Falk Weih and Bernard Malissen, respectively. *CD3e^{tm1Mal}* (*CD3^{-/-}*), *CD45.1*, *CD90.1* and *RAG2^{-/-}* mice were obtained from the cryopreservation distribution typing and animal archiving department (Orléans, France). All mice were on a C57Bl/6 background. Mice were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with European Union guidelines.

Western blot

Cells were lysed for 20 min on ice in extraction buffer (0.4 M NaCl, 25 mM Hepes pH 7.7, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1%, NP40, 20 mM glycerol phosphate, 0.2 mM Na₃VO₄, 10 mM PNPP, 2mM DTT, 0.1 M PMSF). Whole cell extract was harvested after centrifuging the lysate for 10 min at 9500 X g. 20 µg of whole cell extract were separated on 7.5% SDS–polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Immunoblotting was performed with anti-RelA (C20) polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology) and anti-β-actin antibody (Sigma Aldrich) and visualized using the ECL Western blotting detection kit (Pierce).

Histology. Organs were collected and fixed in PBS containing 4% formaldehyde for 48 hours and then transferred in 70% ethanol. Five-micrometer paraffin-embedded sections were cut and stained with hematoxylin and eosin and then blindly analyzed.

Cell preparation from tissues. For lymphoid tissues, cells were isolated by mechanical dilacerations. For non-lymphoid tissues, anesthetized mice were perfused intracardially with cold PBS. Small pieces of livers and lungs were digested in type IV collagenase (0.3 mg/ml) and DNase I (100 µg/ml) for 30 min at 37°C, followed by Percoll gradient (30–70%) separation. Small pieces of intestines, removed of their Peyer patches and epithelium, were digested in type IV collagenase (1 mg/ml) and DNase I (10 µg/ml) for 30 min at 37°C, followed by Percoll gradient (40–80%) separation. Small pieces of skin were digested in liberase DL (0.4mg/ml), collagenase D (0.05 mg/ml) and DNase I (10µg/ml) for 1h at 37°C, followed by Percoll gradient (40–80%) separation.

Antibodies and flow cytometry analysis. The following mAbs from BD Biosciences were used: anti-CD45 (30-F11), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD90.1 (OX-7), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CD25 (PC61 or 7D4), anti-ICOS (7E.17G9), anti-GITR (DTA-1), anti-CD103 (M290), anti-Helios (22F6), anti-CTLA-4 (UC10-4F10-11), anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (HL3), anti-CD19 (1D3), anti-IA/E (M5/114.15.2), anti-Ly6C (AL-21), anti-Ly6G (1A8). Anti-GFP antibody was purchased from Life Technologies. Anti-CD3 (145-2C11), anti-Foxp3 (FJK-16s), anti-CD44 (IM7), anti-Ki-67 (SOLA15), anti-Nrp1 (3DS304M), anti-NKp46 (29A1.4) and anti-F4/80 (BM8) were purchased from eBioscience, and Foxp3 staining was performed using the eBioscience kit and protocol. Cells were acquired on a BD LSRII and a BD Fortessa X20 cytometers and analyzed using FlowJo software.

Cytokine quantification. Serum cytokines were quantified using the mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit (BD Biosciences) according to manufacturer's procedure. Datas were analyzed using FCAP array software.

Immunoglobulin and autoantibody quantification by ELISA. 96-well flat plates were coated with either salmon sperm DNA (Sigma) or with goat anti-mouse IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG2b (Southern Biotech). After washes, they were saturated with BSA and first incubated with mice sera, then with biotinylated goat anti-mouse IgG (Southern Biotech) or goat anti-mouse IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG2b (Southern Biotech). A streptavidin-horseradish conjugate (Sigma) was added followed by the addition of TMB (eBioscience). The reaction was stopped with HCl (1N) and revealed with an ELISA plate reader DTX880 Multimode Detector (Beckman Coulter).

Treg and Tconv cell purification. Treg were purified after enrichment of CD25⁺ cells using biotinylated anti-CD25 mAb (7D4) and anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec), followed by CD4 staining (RM4.5) and cell sorting of CD4⁺ Foxp3/YFP⁺ cells or CD4⁺ Foxp3/GFP⁺ using the BD FACSAria II. Tconv were purified after enrichment of CD25⁻ cells using biotinylated anti-CD25 mAb (7D4) or of CD8⁻CD19⁻CD11b⁻ cells using biotinylated anti-CD8 (53-6.7), CD19 (1D3) and CD11b (M1/70) mAbs and anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec), followed by CD4 staining (RM4.5) and cell sorting of CD4⁺ Foxp3/YFP⁻ cells or CD4⁺ Foxp3/GFP⁻ using the BD FACSAria II.

Cell cultures. Purified Treg (CD4⁺YFP⁺, 25 x 10³ cells/well) were cultured with or without whole splenocyte from CD3KO mice (7.5 x 10⁴ cells/well), anti-CD3 mAb (0,05µg/ml, BioXcell), TNF (50ng/ml, Protein Service Facility, VIB, Belgium) and IL-2 (10ng/ml, Peproteck) in a 96-well round plate in RPMI 1640 10% FCS. For suppression assays, after labeling with CellTrace Violet Proliferation Kit (Life technologies), Tconv (CD4⁺YFP⁻, 2.5 x 10⁴ cells/well) were co-cultures with various Treg (CD4⁺YFP⁺) numbers and stimulated by

splenocytes from CD3 KO mice (7.5×10^4 cells/well) and soluble anti-CD3 (0.05 μ g/ml 2C11, BioXCell) in RPMI 1640-10% FCS.

Colitis. Tconv (CD4⁺GFP⁻, 1×10^5 cells) and Treg cells (CD4⁺YFP⁺, 2×10^4 cells) were injected intravenously into sex-matched RAG2^{-/-} mice. The clinical evaluation was performed three times a week by measuring body weight.

T-cell adoptive transfer. CD45.1/1 were co-transferred with Treg (CD4⁺YFP⁺, 5×10^5 each) purified from age and sex-matched CD45.1/2 *Foxp3*^{Cre/+} and CD45.2/2 *Foxp3*^{Cre/+} *Rela*^{lox} mice. CD3 KO mice were co-transferred with Treg (CD4⁺YFP⁺, 9×10^4 each) purified from age and sex-matched CD45.1/2 *Foxp3*^{Cre/+} and CD45.2/2 *Foxp3*^{Cre/+} *Rela*^{lox} mice and Tconv (CD4⁺GFP⁻, 6.5×10^5) purified from CD45.1/1 *Foxp3*^{GFP} mice.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software. Statistical significance was determined using a log-rank (Mantel- Cox) test for the mouse survival data and the two-tailed unpaired nonparametric Mann–Whitney U test or T-test for all the other statistical analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Means \pm s.e.m. were used throughout the figures.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pr. Alexander Rudensky and Pr. Falk Weih for providing us the *Foxp3^{Cre}* and *Rela^{lox}* mice, respectively, and Christelle Enond, Doriane Foret, Flora ISSERT, Olivier Bregerie and Bocar Kane for their expert care of the mouse colony. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENO-006-01, ANR-15-CE15-0015-03), the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20160435696), the Fondation Bettencourt Schueller.

REFERENCES

- Algül, H., Treiber, M., Lesina, M., Nakhai, H., Saur, D., Geisler, F., Pfeifer, A., Paxian, S., and Schmid, R.M. (2007). Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J. Clin. Invest.* *117*, 1490–1501.
- Bettelli, E., Dastrange, M., and Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5138–5143.
- Camperio, C., Caristi, S., Fanelli, G., Soligo, M., Porto, P.D., and Piccolella, E. (2012). Forkhead Transcription Factor FOXP3 Upregulates CD25 Expression through Cooperation with RelA/NF- κ B. *PLOS ONE* *7*, e48303.
- Chang, J.-H., Xiao, Y., Hu, H., Jin, J., Yu, J., Zhou, X., Wu, X., Johnson, H.M., Akira, S., Pasparakis, M., et al. (2012). Ubc13 maintains the suppressive function of regulatory T cells and prevents their conversion into effector-like T cells. *Nat. Immunol.* *13*, 481–490.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4⁺ Regulatory T Cells Control TH17 Responses in a Stat3-Dependent Manner. *Science* *326*, 986–991.
- Chen, X., Willette-Brown, J., Wu, X., Hu, Y., Howard, O.M.Z., Hu, Y., and Oppenheim, J.J. (2015). IKK α is required for the homeostasis of regulatory T cells and for the expansion of both regulatory and effector CD4 T cells. *FASEB J.* *29*, 443–454.
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2012). PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* *486*, 549–553.
- Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *12*, 304–311.
- Dias, S., D’Amico, A., Cretney, E., Liao, Y., Tellier, J., Bruggeman, C., Almeida, F.F., Leahy, J., Belz, G.T., Smyth, G.K., et al. (2017). Effector Regulatory T Cell Differentiation and Immune Homeostasis Depend on the Transcription Factor Myb. *Immunity* *46*, 78–91.
- DuPage, M., Chopra, G., Quiros, J., Rosenthal, W.L., Morar, M.M., Holohan, D., Zhang, R., Turka, L., Marson, A., and Bluestone, J.A. (2015). The Chromatin-Modifying Enzyme Ezh2 Is Critical for the Maintenance of Regulatory T Cell Identity after Activation. *Immunity* *42*, 227–238.
- Feng, Y., Arvey, A., Chinen, T., van der Veecken, J., Gasteiger, G., and Rudensky, A.Y. (2014). Control of the Inheritance of Regulatory T Cell Identity by a cis Element in the Foxp3 Locus. *Cell* *158*, 749–763.

- Isomura, I., Palmer, S., Grumont, R.J., Bunting, K., Hoyne, G., Wilkinson, N., Banerjee, A., Proietto, A., Gugasyan, R., Wu, L., et al. (2009). c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *206*, 3001–3014.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* *10*, 595–602.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* *17*, 975–982.
- Liu, Y., Wang, L., Han, R., Beier, U.H., Akimova, T., Bhatti, T., Xiao, H., Cole, P.A., Brindle, P.K., and Hancock, W.W. (2014). Two Histone/Protein Acetyltransferases, CBP and p300, Are Indispensable for Foxp3⁺ T-Regulatory Cell Development and Function. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 3993–4007.
- Long, M., Park, S.-G., Strickland, I., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2009). Nuclear Factor- κ B Modulates Regulatory T Cell Development by Directly Regulating Expression of Foxp3 Transcription Factor. *Immunity* *31*, 921–931.
- van Loosdregt, J., and Coffey, P.J. (2014). Post-translational modification networks regulating FOXP3 function. *Trends Immunol.* *35*, 368–378.
- Messina, N., Fulford, T., O'Reilly, L., Loh, W.X., Motyer, J.M., Ellis, D., McLean, C., Naem, H., Lin, A., Gugasyan, R., et al. (2016). The NF- κ B transcription factor RelA is required for the tolerogenic function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Autoimmun.* *70*, 52–62.
- Mukherjee, S.P., Behar, M., Birnbaum, H.A., Hoffmann, A., Wright, P.E., and Ghosh, G. (2013). Analysis of the RelA:CBP/p300 Interaction Reveals Its Involvement in NF- κ B-Driven Transcription. *PLOS Biol.* *11*, e1001647.
- Oh, H., and Ghosh, S. (2013). NF- κ B: roles and regulation in different CD4⁺ T-cell subsets. *Immunol. Rev.* *252*, 41–51.
- 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.
- Pan, F., Yu, H., Dang, E.V., Barbi, J., Pan, X., Grosso, J.F., Jinasena, D., Sharma, S.M., McCadden, E.M., Getnet, D., et al. (2009). Eos Mediates Foxp3-Dependent Gene Silencing in CD4⁺ Regulatory T Cells. *Science* *325*, 1142–1146.
- Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C.A., Bonelli, M., Sciumè, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., et al. (2013). BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature* *498*, 506–510.
- Ruan, Q., Kameswaran, V., Tone, Y., Li, L., Liou, H.-C., Greene, M.I., Tone, M., and Chen, Y.H. (2009). Development of Foxp3⁺ Regulatory T Cells Is Driven by the c-Rel Enhanceosome. *Immunity* *31*, 932–940.

- Ruan, Q., Kameswaran, V., Zhang, Y., Zheng, S., Sun, J., Wang, J., DeVirgiliis, J., Liou, H.-C., Beg, A.A., and Chen, Y.H. (2011). The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR γ -ROR γ T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* *208*, 2321–2333.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* *212*, 8–27.
- Soligo, M., Camperio, C., Caristi, S., Scottà, C., Porto, P.D., Costanzo, A., Mantel, P.-Y., Schmidt-Weber, C.B., and Piccolella, E. (2011). CD28 costimulation regulates FOXP3 in a RelA/NF- κ B-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* *41*, 503–513.
- Thiault, N., Darrigues, J., Adoue, V., Gros, M., Binet, B., Peral, C., Leobon, B., Fazilleau, N., Joffre, O.P., Robey, E.A., et al. (2015). Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.* *16*, 628–634.
- Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 693–733.
- van der Veeke, J., Gonzalez, A.J., Cho, H., Arvey, A., Hemmers, S., Leslie, C.S., and Rudensky, A.Y. (2016). Memory of Inflammation in Regulatory T Cells. *Cell* *166*, 977–990.
- Wohlfert, E.A., Grainger, J.R., Bouladoux, N., Konkel, J.E., Oldenhove, G., Ribeiro, C.H., Hall, J.A., Yagi, R., Naik, S., Bhairavabhotla, R., et al. (2011). GATA3 controls Foxp3⁺ regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 4503–4515.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., et al. (2006). FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* *126*, 375–387.
- Yang, R., Qu, C., Zhou, Y., Konkel, J.E., Shi, S., Liu, Y., Chen, C., Liu, S., Liu, D., Chen, Y., et al. (2015). Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis. *Immunity* *43*, 251–263.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.-T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature* *458*, 351–356.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J.A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* *10*, 1000–1007.

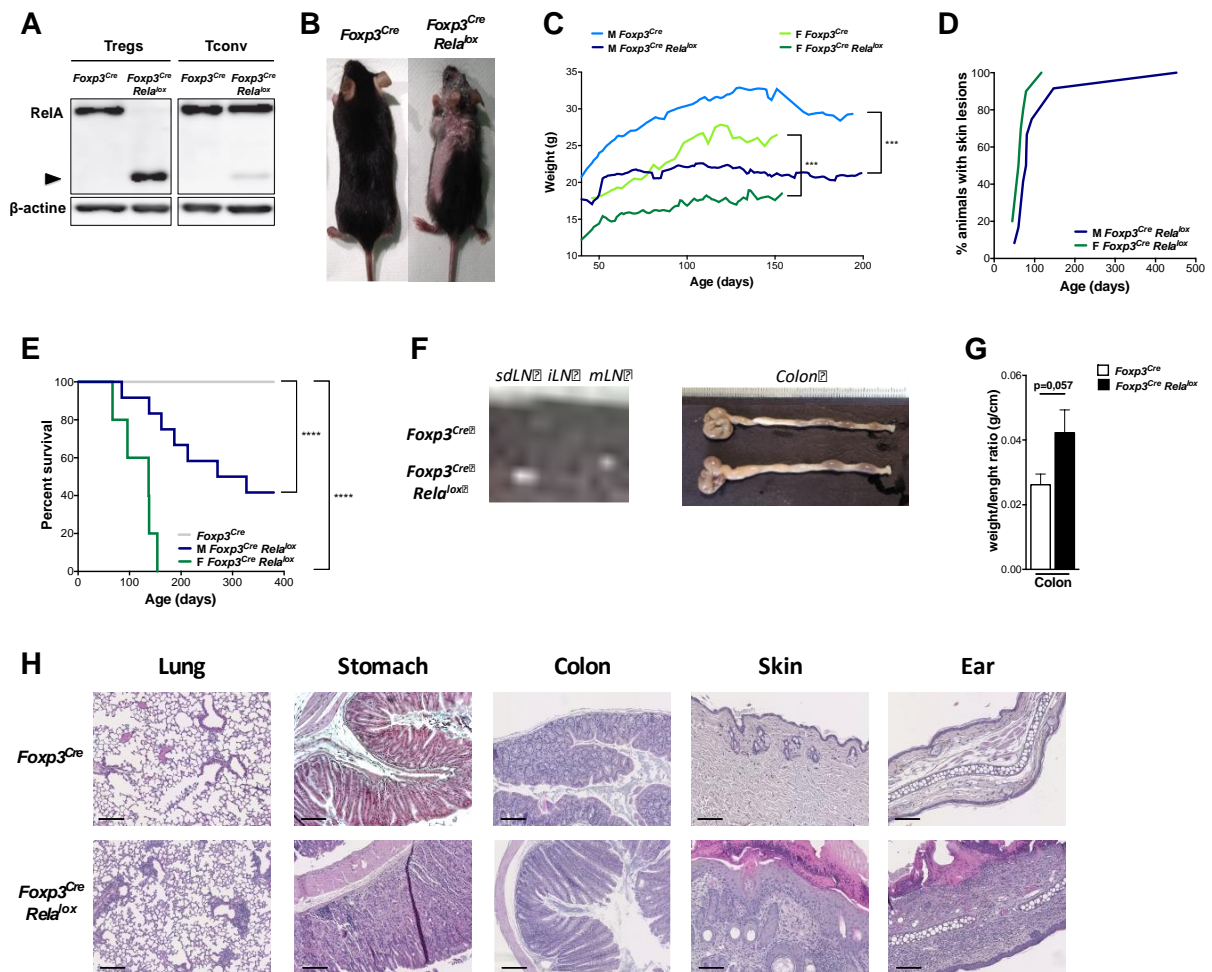


Figure 1. Mice with RelA deficient Tregs develop systemic inflammation. Western blot analysis of RelA expression in Tregs and CD4⁺ conventional T cells (Tconv) isolated from *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. The blot is representative of 2 independent experiments. (B) Representative pictures of 12 week-old *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. (C) Body weight monitoring of *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* males and females. (D) Percentages of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* males and females with skin lesions. (E) Survival monitoring of *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* males and females. (F) Representative pictures from 20 mice of LN and colon of 12 week-old *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. (G) Weight/length ratio of colon of 12 week-old *Foxp3^{Cre}* (n=3) and *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* (n=4) mice. Data are representative of 2 independent experiments (H) Representative histology from 4 12 week-old mice of lung, stomach, colon, skin and ear of *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. Scale bars represent 200μm (lung, *Foxp3^{Cre}* stomach, colon), 150μm (*Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* stomach) and 100μm (skin, ear).

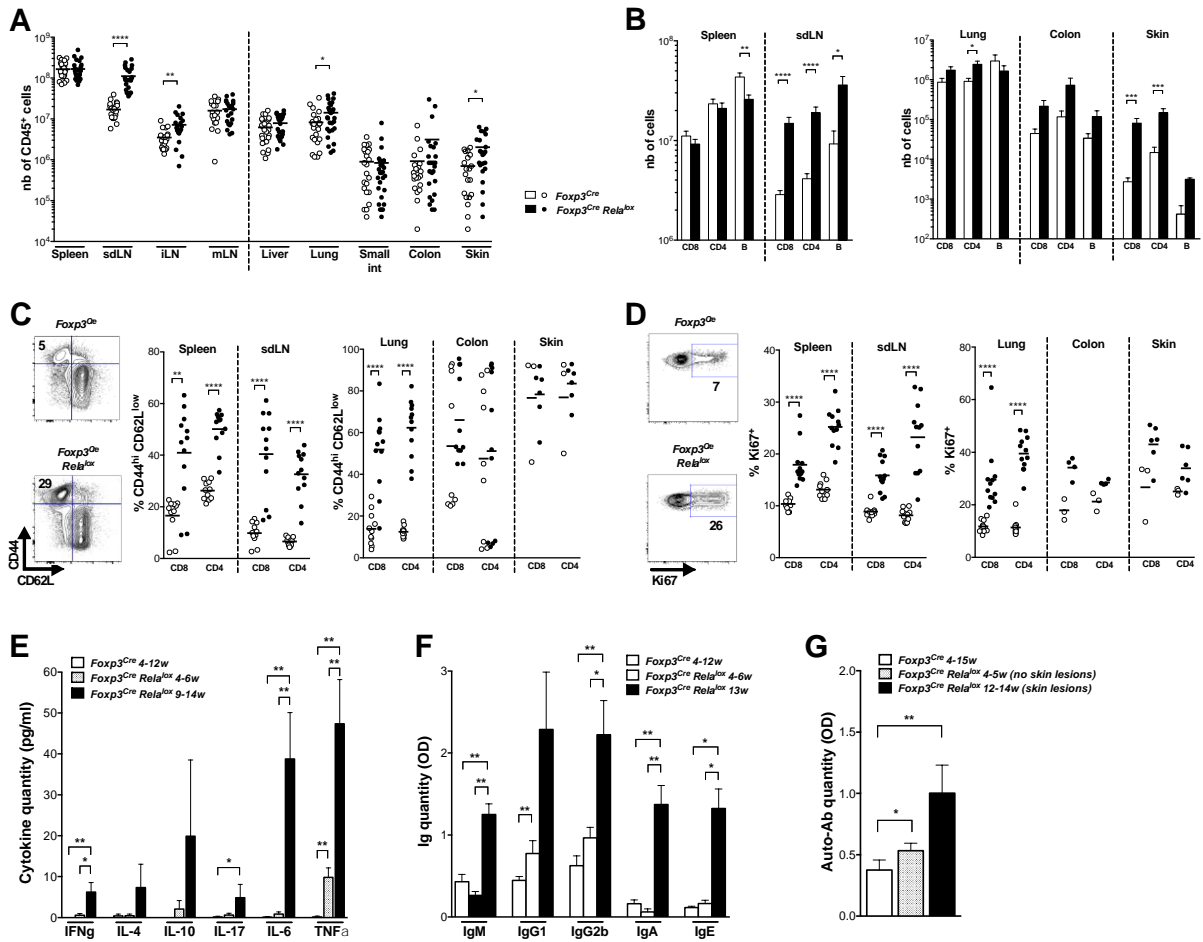


Figure 2. High activation of T and B lymphocytes in *Foxp3^{Cre} Relal^{lox}* mice. (A, B) Number of CD45⁺ (A), CD8⁺, CD4⁺ and B cells (B) in the indicated organs of 12 week-old *Foxp3^{Cre} Relal^{lox}* mice. Each dot represents a mouse, collected from 8 independent experiments. (C, D) Representative dot plots and proportion of CD44^{hi} CD62L^{low} (C) and Ki67⁺ (D) among CD8⁺ and CD4⁺ Tconv in the indicated organs of 12 week-old *Foxp3^{Cre} Relal^{lox}* mice. Each dot represents a mouse, collected from 5 (spleen, sdLN and lung) and 2 (colon and skin) independent experiments. (E) Cytokine quantification in the serum of 4-12 week-old *Foxp3^{Cre}* and 4-6 week-old and 9-14 week-old *Foxp3^{Cre} Relal^{lox}* mice (n=5). (F) Immunoglobulin quantification in the serum of 4-12 week-old *Foxp3^{Cre}* mice and 4-6 week-old and 13 week-old *Foxp3^{Cre} Relal^{lox}* mice (n=5). (G) Anti-DNA antibody quantification in the serum of 4-15 week-old *Foxp3^{Cre}* mice (n=15) and 4-12 week-old (n=6) and 12-14 week-old (n=9) *Foxp3^{Cre} Relal^{lox}* mice. Data were pooled from 2 independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001, two-way unpaired t or Mann-Whitney tests.

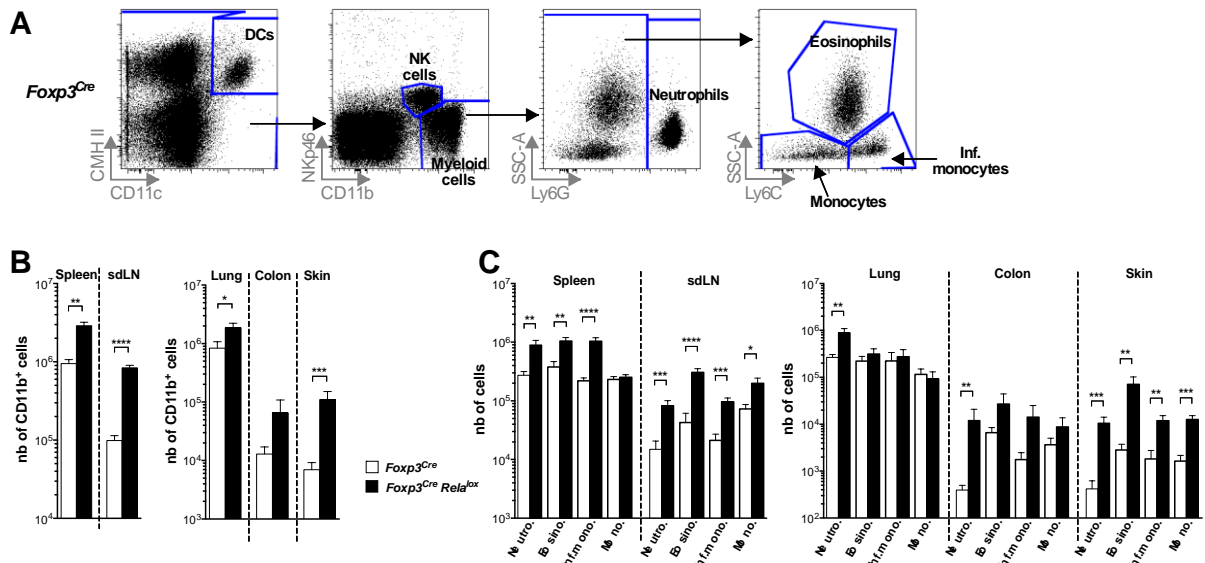


Figure 3. Increased numbers of myeloid cells in *Foxp3^{Cre} Rela^{Iox}* mice. (A) Gating strategy of myeloid and NK cells. (B, C) Number of CD11b⁺ (B) and of neutrophils, eosinophils, inflammatory monocytes and monocytes (C) in the indicated organs of 12 week-old *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Rela^{Iox}* mice. Data were from 3 independent experiments (n=8 to 10). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001, two-way unpaired t or Mann-Whitney tests.

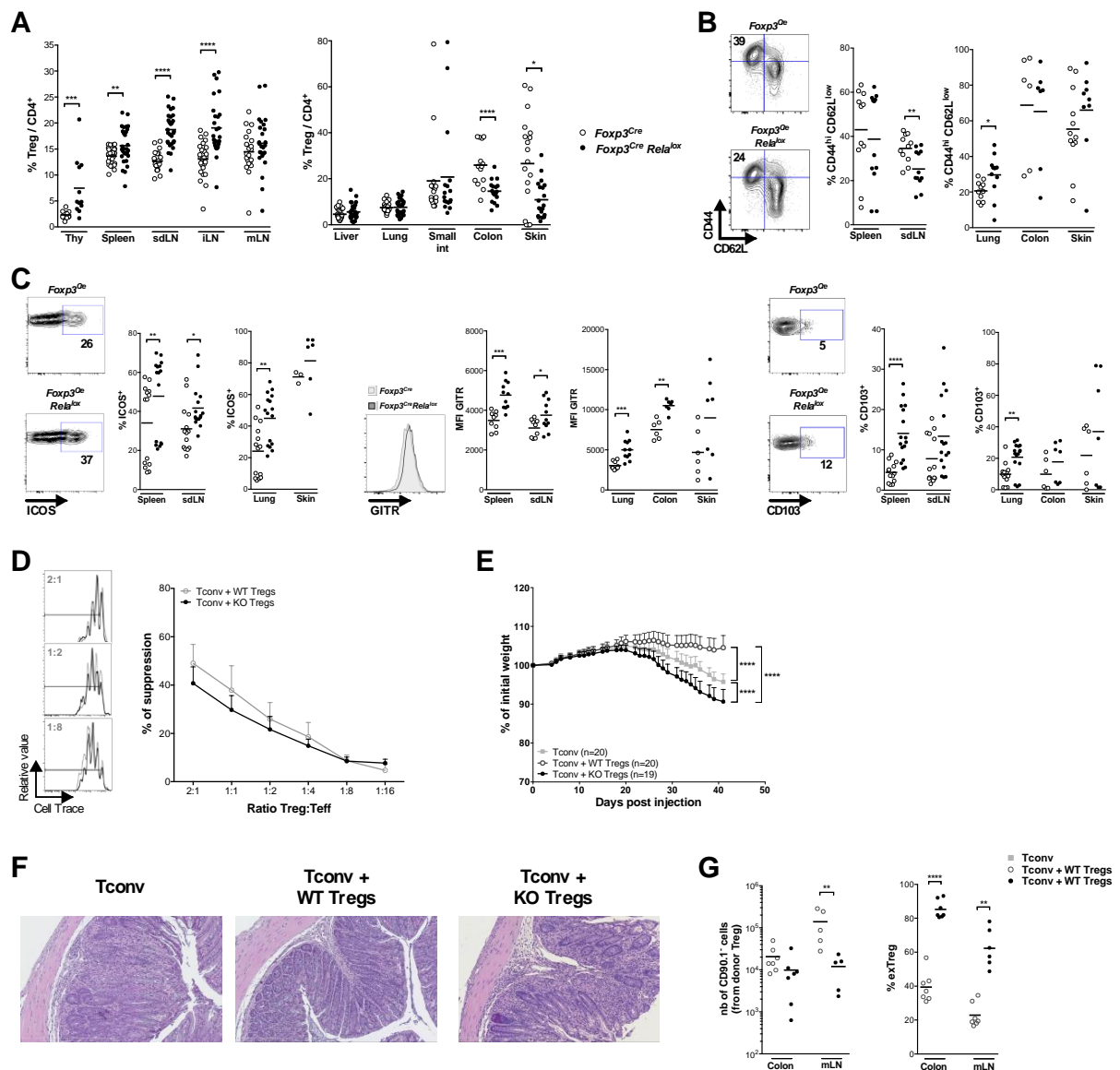


Figure 4. Homeostasis and function of Treg in *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. (A) Proportion of Tregs among the CD4⁺ T cells of 12 week-old *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. (B, C) Representative dot plots or histograms and proportions of CD44^{hi} CD62L^{low} (B) and ICOS⁺, CD103⁺ and MFI GTR (C) among the Tregs of 12 week-old *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. Each dot represents a mouse, collected from 4 to 8 independent experiments. (D) *In vitro* suppressive activity of Treg cells from *Foxp3^{Cre}* (WT Tregs) and *Foxp3^{Cre} Relalox* (KO Tregs) mice. Representative data at 2:1, 1:2 and 1:8 (left) and different (right) Treg:Tconv ratios of 4 independent experiments. (E-G) *In vivo* suppressive activity of Treg cells from *Foxp3^{Cre}* (WT Tregs) and *Foxp3^{Cre} Relalox* (KO Tregs) mice, determined in a colitis model stopped at 6 weeks for analyses. (E) Percentage of initial body weight pooled from 4 independent experiments. (F) Representative histology of the colon from 4 mice. (G) Numbers of CD4⁺CD90.1⁻ cells derived from Tregs and proportions of exTreg defined by their CD4⁺CD90.1⁻ Foxp3⁻ phenotype in the mLN and colon. Each dot represents a mouse, collected from 2 independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001, two-way unpaired t or Mann-Whitney tests.

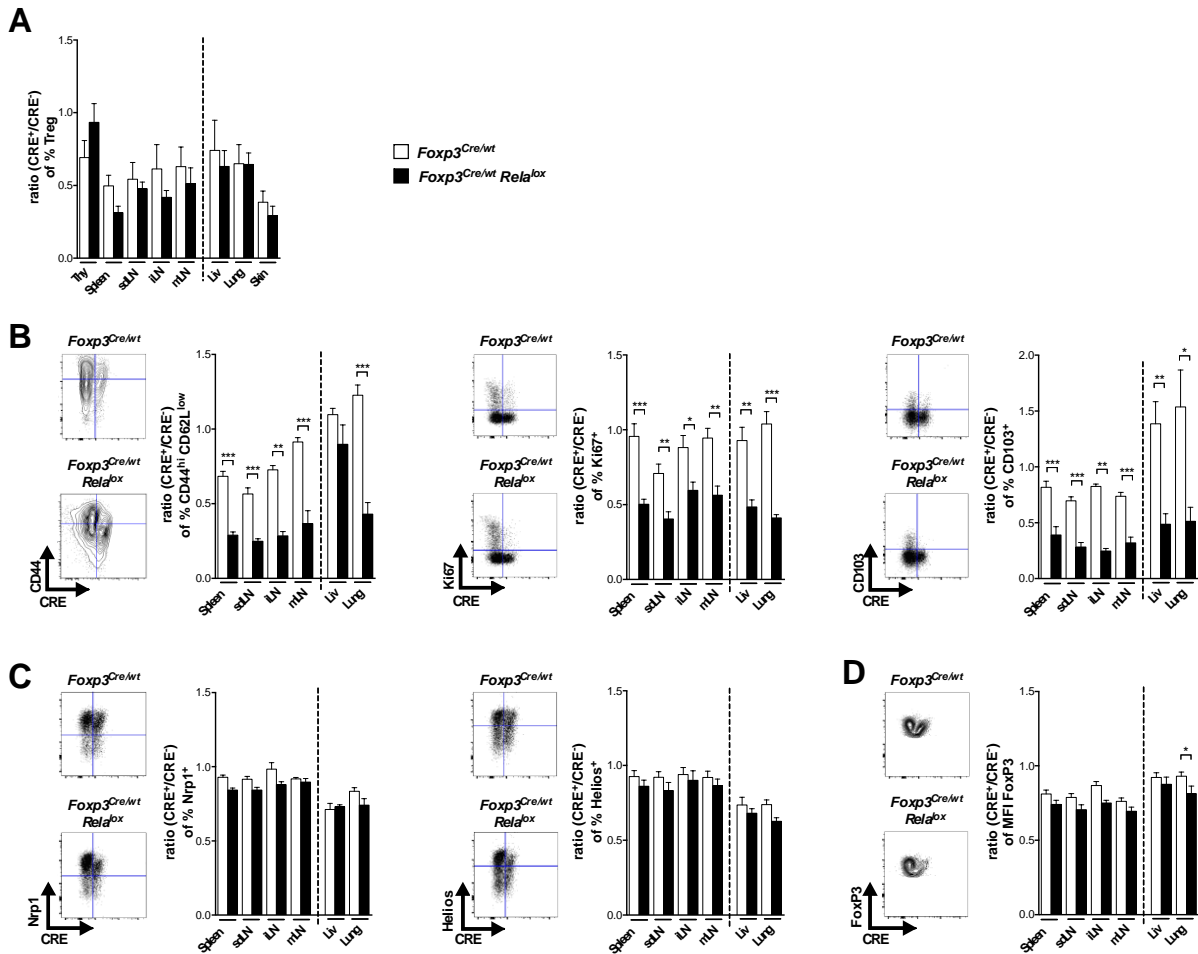


Figure 5. Reduced expression of activation markers in RelA deficient Tregs at steady state. Analyses in 8 week-old *Foxp3^{Cre/wt}* and *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* mice. (A) Ratios of Tregs expressing (CRE⁺) or not (CRE⁻) CRE. (B, C) Representative dot plots and ratios of the percentage of CD44^{hi}CD62L^{low}, ICOS⁺, Ki67⁺, Nrp1⁺ and Helios⁺ among the CRE⁺ Tregs by the same percentage among the CRE⁻ Tregs. (D) Representative dot plots and ratios of the Foxp3 MFI in CRE⁺ Tregs by the Foxp3 MFI in CRE⁻ Tregs. Data are from 2 or 3 independent experiments (n=5 to 10). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, two-way unpaired Mann-Whitney tests.

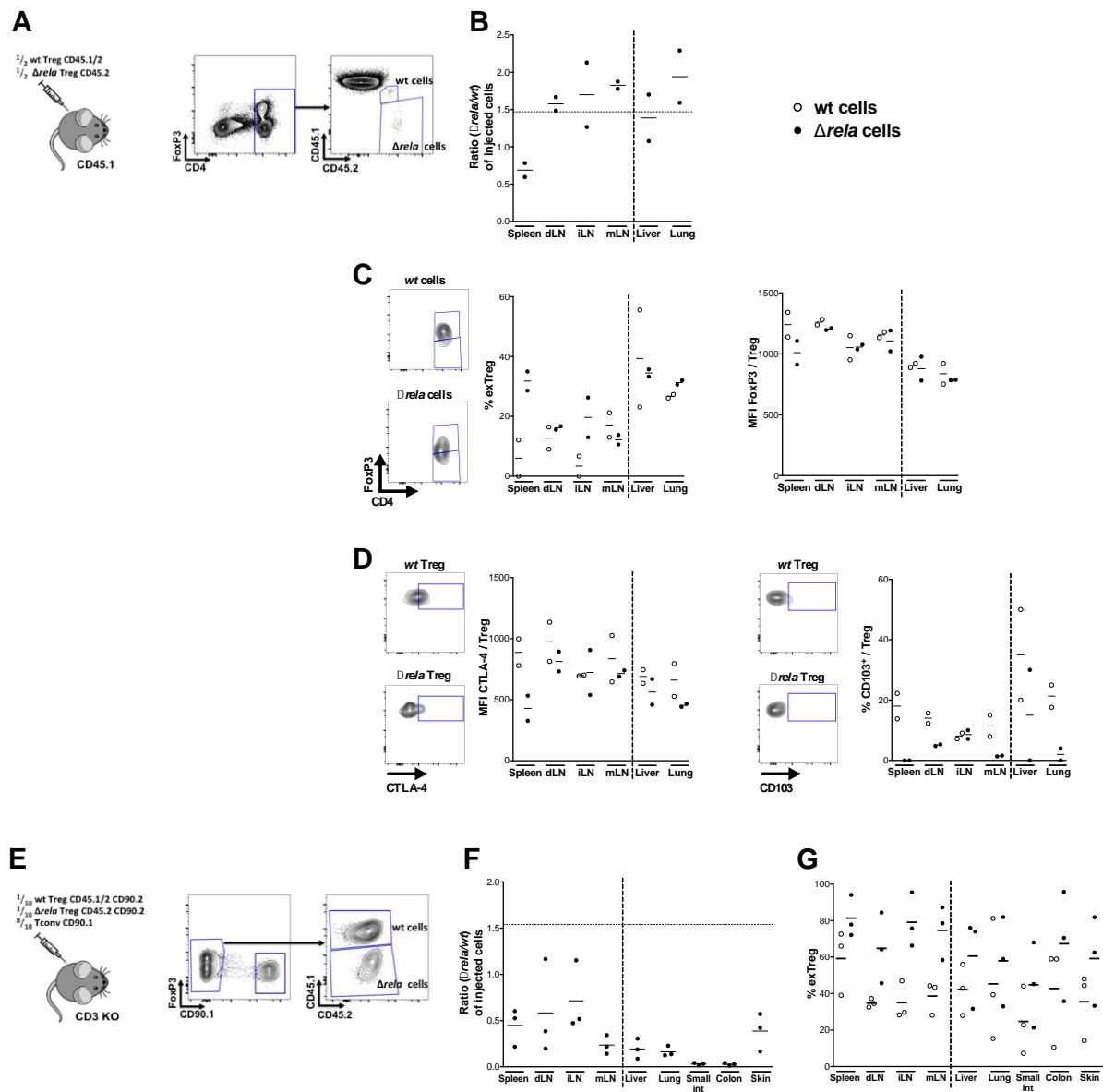
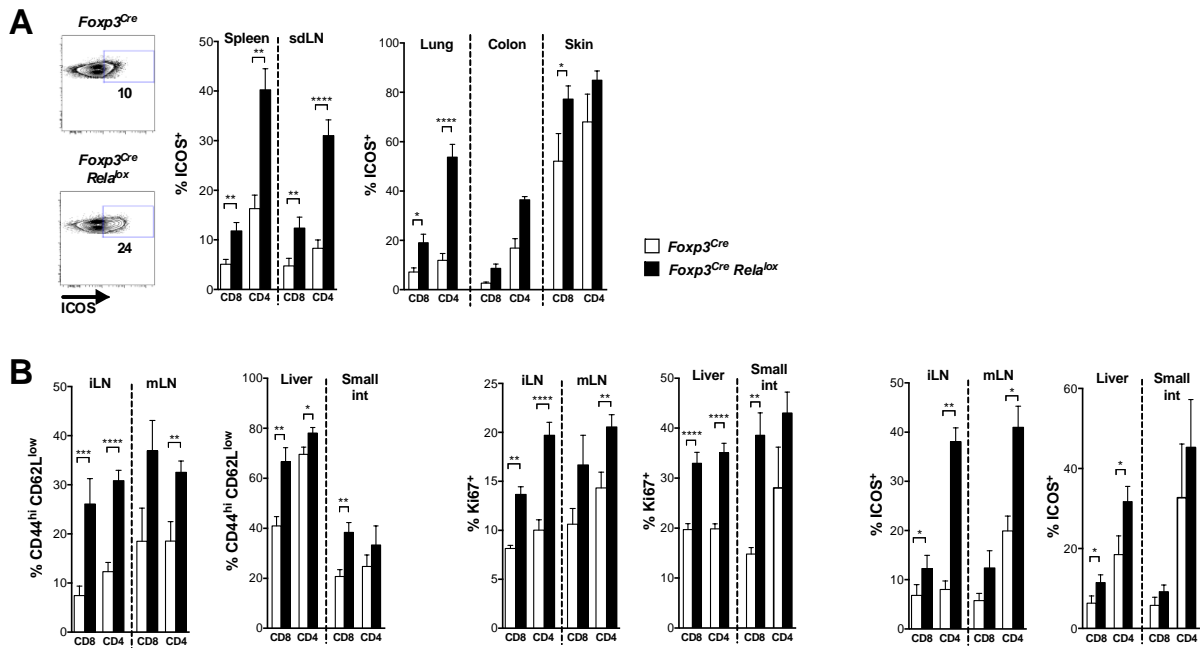
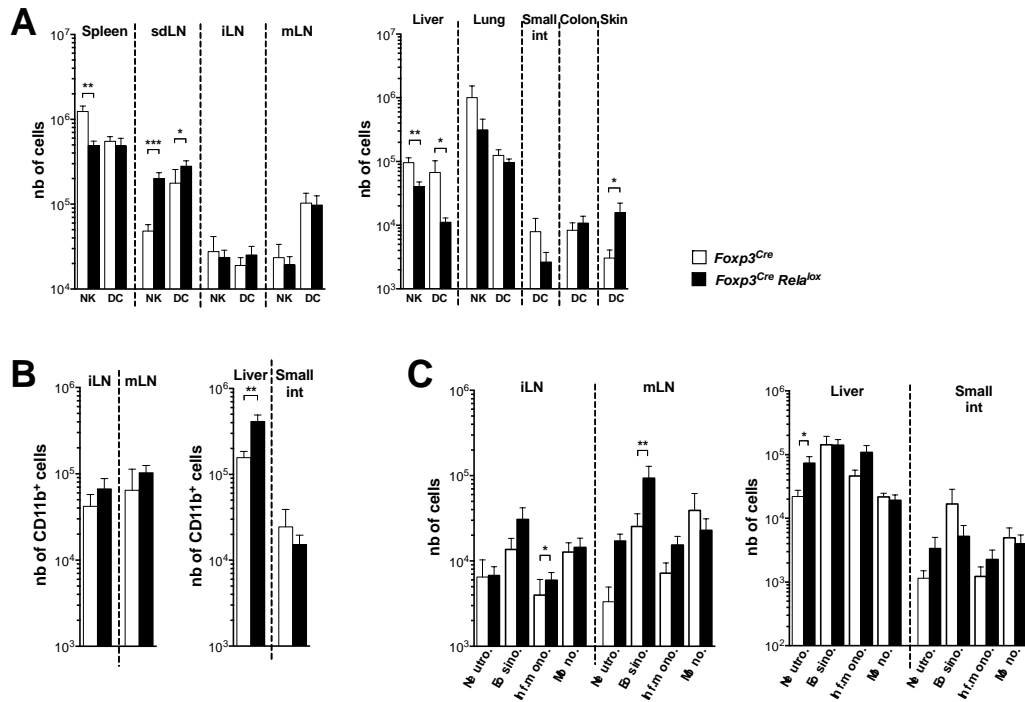


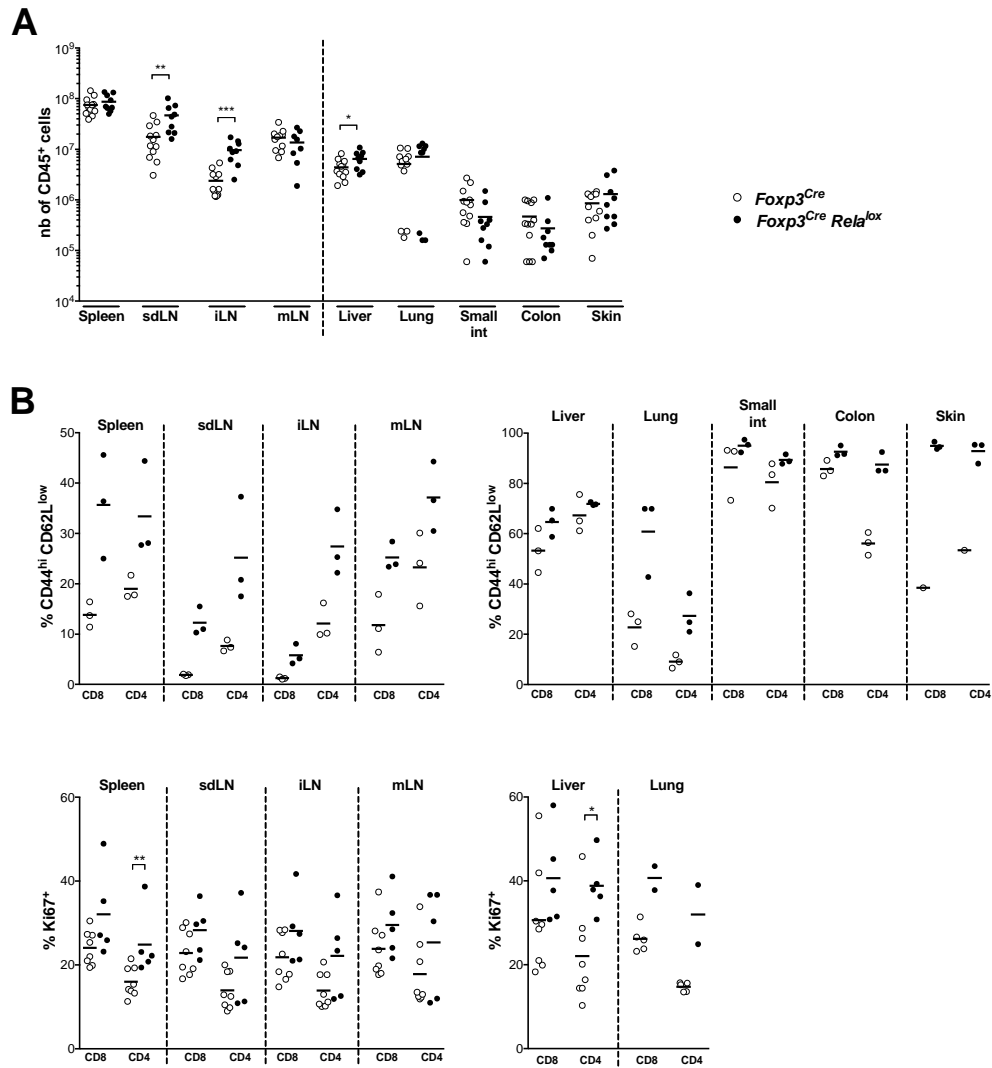
Figure 6. RelA deficient Tregs have a defect of stability. (A-D) Adoptive transfer of a 1:1.5 ratio of a mix of CRE-expressing Tregs from *Foxp3*^{Cre/wt} (CD45.1/2 wt Tregs) and *Foxp3*^{Cre/wt} *Rela*^{lox} (CD45.2 Δ rela Treg) mice into CD45.1 mice and analysis of donor cells 6 days later. Data are from one experiment. (A) Experimental scheme and representative gating strategy. (B) Ratio of injected Δ rela cells to wt cells. (C) Representative contour plots from the spleen and proportion of exTreg from injected wt cells and Δ rela cells in different tissues. (D) Representative contour plots from the spleen, MFI of CTLA-4 and proportion of CD103⁺ among the injected Foxp3⁺ cells Treg in different tissues. (E-G) Adoptive transfer of a 1:1.5:8 ratio of a mix of CRE-expressing Tregs from *Foxp3*^{Cre/wt} (CD45.1/2 CD90.2 wt Tregs), *Foxp3*^{Cre/wt} *Rela*^{lox} (CD45.2 CD90.2 Δ rela Treg) mice and CD4⁺ conventional T cells (CD90.1 Tconv) into CD3 KO mice and analysis of donor cells 16 days later. Data are from one experiment. (E) Experimental scheme and representative gating strategy. (F) Ratio of injected Δ rela cells to wt cells. (G) Proportion of exTreg from injected wt cells and Δ rela cells in different tissues.



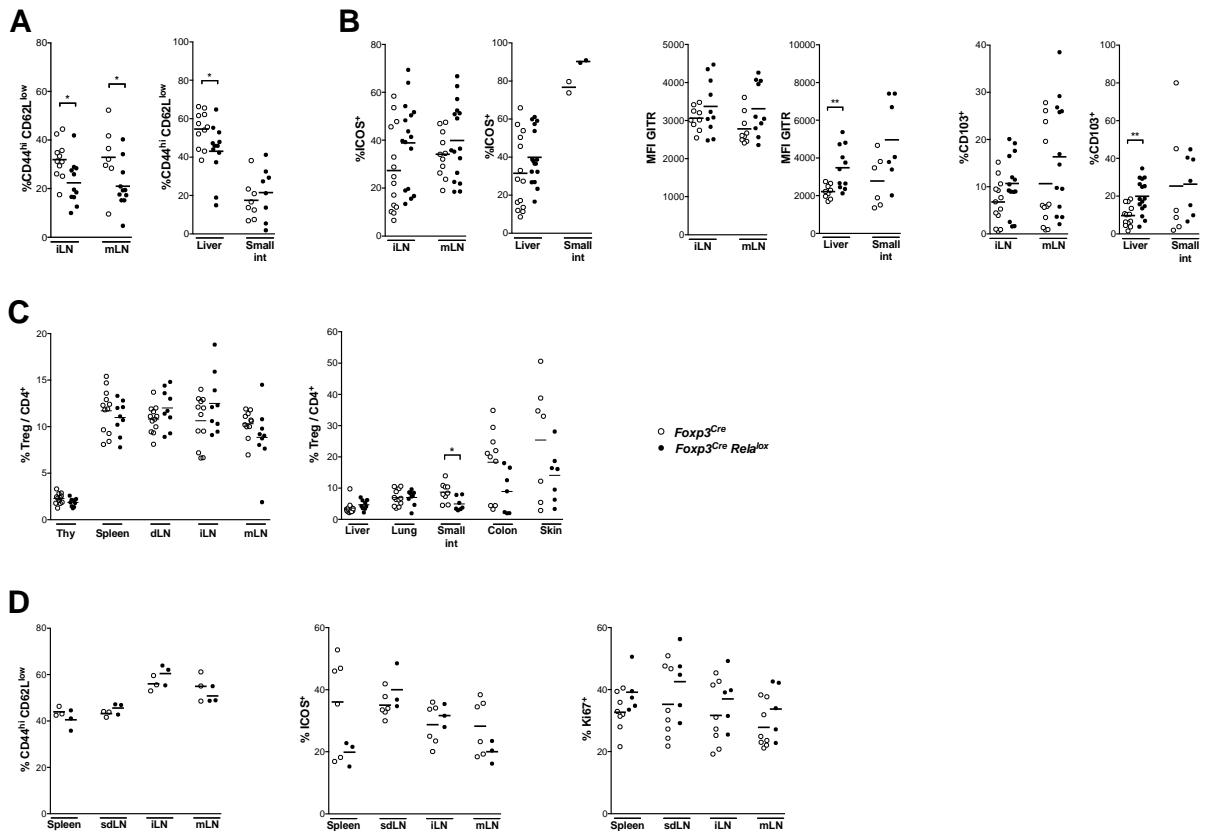
Supplementary Figure 1. Systemic activation of CD8⁺ and CD4⁺ conventional T cells in *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. (A) Representative dot plots and proportion of ICOS⁺ among CD8⁺ and CD4⁺ conventional T cells in different tissues of *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Relalox*. Proportion of CD44^{hi}CD62L^{low} (B), Ki67⁺ (C) and ICOS⁺ (D) among CD8⁺ and CD4⁺ conventional T cells in different tissues of *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Relalox*. Each dot represents a mouse, collected from 2 to 5 independent experiments in 12 week-old mice (n=4 to 15). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001, two-way unpaired t or Mann-Whitney tests.



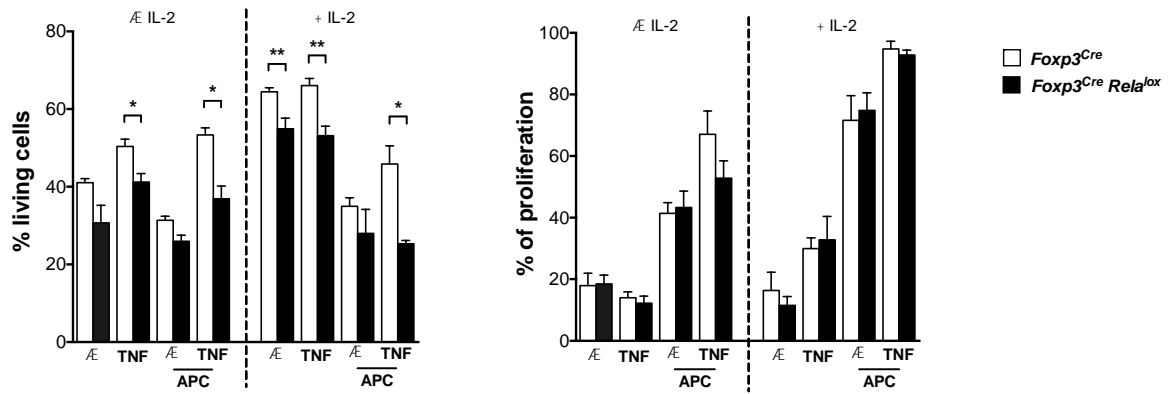
Supplementary Figure 2. Myeloid and NK cells in *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. Number of DC and NK cells (A), of CD11b⁺ (B) and of neutrophils, eosinophils, inflammatory monocytes and monocytes (C) in different tissues of *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Relalox*. Data are collected from 3 independent experiments in 12 week-old mice (n=4 to 10). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, two-way unpaired t or Mann-Whitney tests.



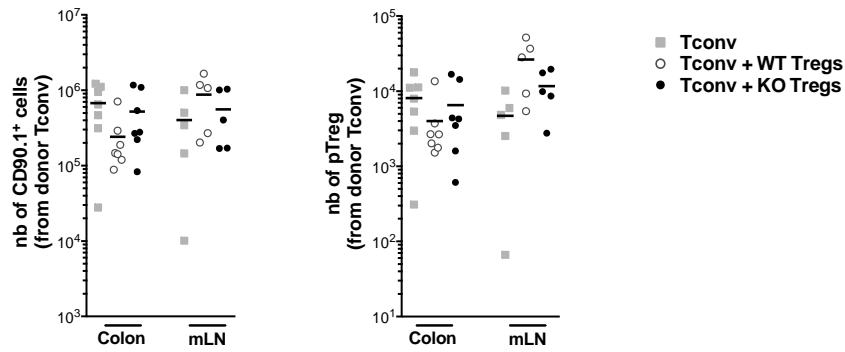
Supplementary Figure 3. Homeostasis and phenotype of T cells in 5 week-old *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* mice. Number of CD45⁺ (A) and proportion of CD44^{hi}CD62L^{low}, ICOS⁺ and Ki67⁺ among CD8⁺ and CD4⁺ conventional T cells (B) in different tissues of *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. Each dot represents a mouse, collected from 2 or 3 independent experiments in 5 week-old mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way unpaired t or Mann-Whitney tests.



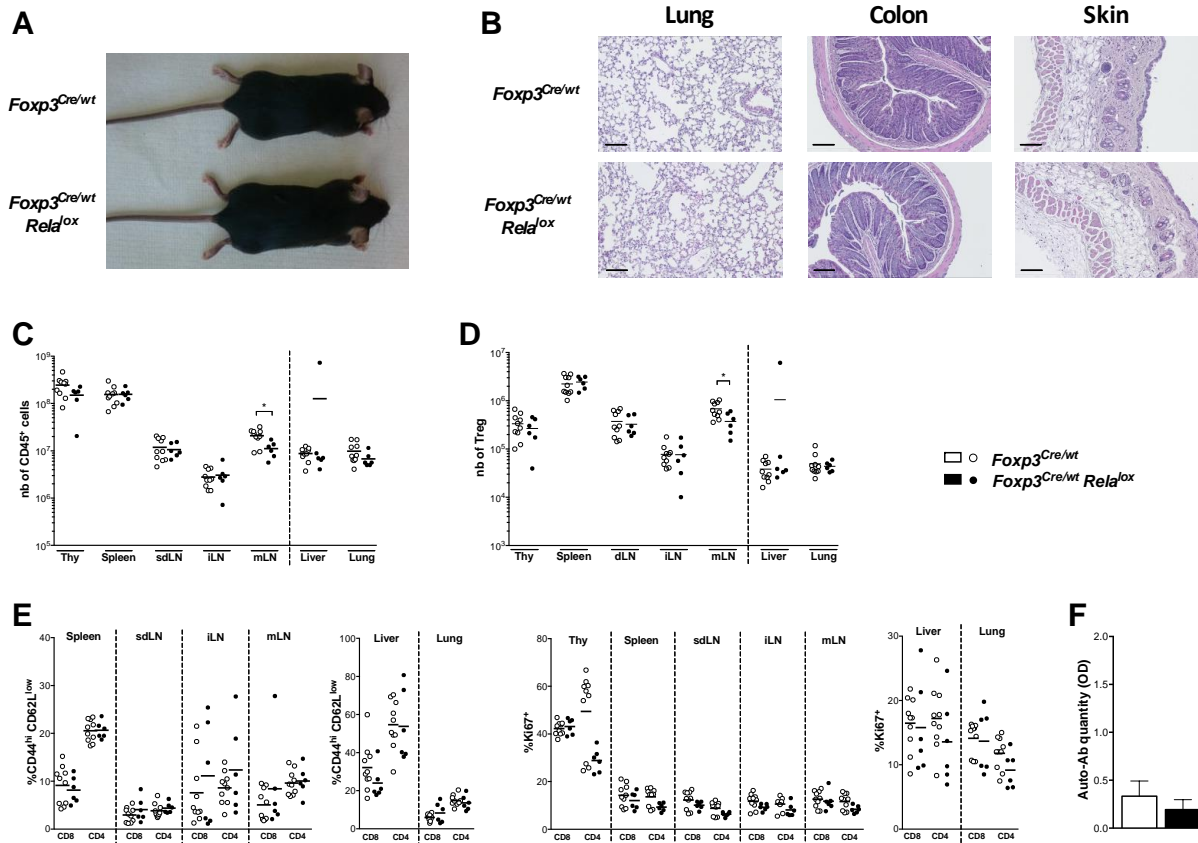
Supplementary Figure 4. Homeostasis and function of Tregs in *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. (A, B) Proportion of CD44^{hi}CD62L^{low} (A) and of ICOS⁺ and CD103⁺ and MFI GITR (B) among Tregs in 12 week-old *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. (C, D) Proportion of Tregs among CD4⁺ cells (C) and of CD44^{hi}CD62L^{low}, ICOS⁺ and CD103⁺ among Tregs (D) in 5 week-old *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. Each dot represents a mouse, collected from 4-5 (A, B) or 2-3 (C, D) independent experiments. **p*<0.05, two-way unpaired Mann-Whitney tests.



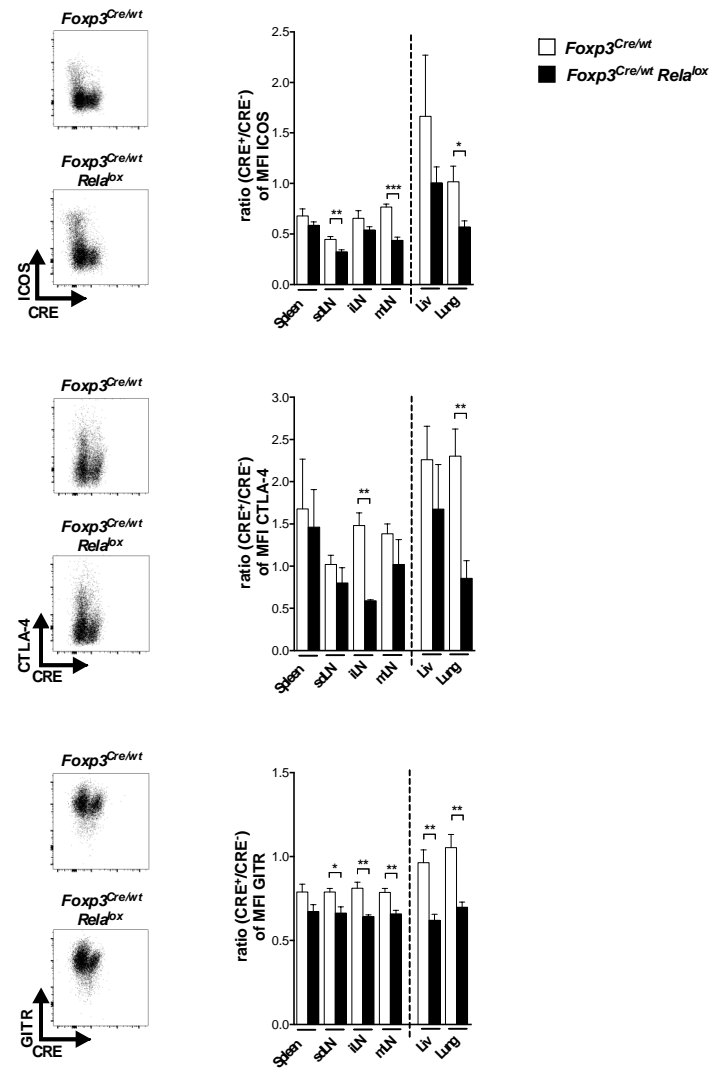
Supplementary Figure 5. In vitro viability and proliferation of Tregs from *Foxp3^{Cre} Relalox* mice. Tregs from 6 week-old *Foxp3^{Cre}* and *Foxp3^{Cre} Relalox* mice were cultured with or without IL-2, TCR stimulation and TNF α . Viability was measured at 24 hours and proliferation at 72 hours. Data are from 4 independent experiments.



Supplementary Figure 6. Tconv survival and pTreg in lymphopenic mice transferred with Tconv and RelA-deficient Tregs. Tconv and Tregs were injected in RAG KO mice to induce colitis as described in figure 4E-G. Whole number of cells (CD90.1⁺) and of pTregs (CD90.1⁺Foxp3⁺) derived from donor Tconv in the mLN and colon of mice injected with Tconv only or Tconv and WT or RelA KO Tregs analyzed 6 weeks after transfer. Each dot represents a mouse, collected from 2 independent experiments.



Supplementary Figure 7. *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* mice have no sign of disease. (A) Representative pictures of 8 week-old mice. (B) Representative histology of lung, colon and skin of 8 week-old. Scale bars represent 100 μ m. Number of CD45⁺ (C), of Tregs among CD4⁺ T cells (D) and proportion of CD44^{hi}CD62L^{low} and Ki67⁺ among CD8⁺ and CD4⁺ conventional T cells (E) in different tissues of 8 week-old *Foxp3^{Cre/wt}* and *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* mice. Each dot represents a mouse, collected from 3 independent experiments. (F) Anti-DNA auto-antibodies quantification in the serum of 8 week-old *Foxp3^{Cre/wt}* and *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* mice (n=5 and 10, respectively). **p*<0.05, two-way unpaired t or Mann-Whitney tests.



Supplementary Figure 8. RelA deficient Tregs have reduced expression of some activation markers at steady state. Representative dot plots and ratios of the MFI of ICOS, CTLA-4 and GITR in CRE⁺ Tregs by the same MFI in CRE⁻ Tregs in different tissues of 8 week-old *Foxp3^{Cre/wt}* and *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* mice. Data are from 2 or 3 independent experiments (n=6 to 10). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, two-way unpaired Mann-Whitney tests.

II. Etude du rôle de la voie non canonique de NF- κ B dans les Tregs

1. Introduction

Bien que RelA soit rapportée comme une des sous-unités principales de NF- κ B, elle est aussi décrite comme étant préférentiellement impliquée dans la voie de signalisation canonique. Afin donc d'évaluer le rôle de la voie alterne de NF- κ B dans la biologie des Tregs et de comparer son implication à celle de la voie canonique, nous avons généré des souris présentant une délétion spécifique dans les Tregs de RelB, sous-unité décrite comme étant préférentiellement impliquée dans cette voie. Ces souris, dénommées ensuite *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*, ont été obtenues en croisant des souris *Foxp3^{CreYFP}* avec des souris *Relb^{lox}*.

2. Résultats

2.1. Suivi clinique des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*

Après avoir vérifié la délétion de RelB dans les Tregs par western blot (**Figure 11A**), nous avons souhaité dans un premier temps voir les conséquences de l'inactivation spécifique de RelB dans les Tregs sur la « physiologie générale » des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* en les observant régulièrement et sur une longue période. Pour cela, elles ont été pesées et observées 2 fois par semaine (**Figure 11B-E**).

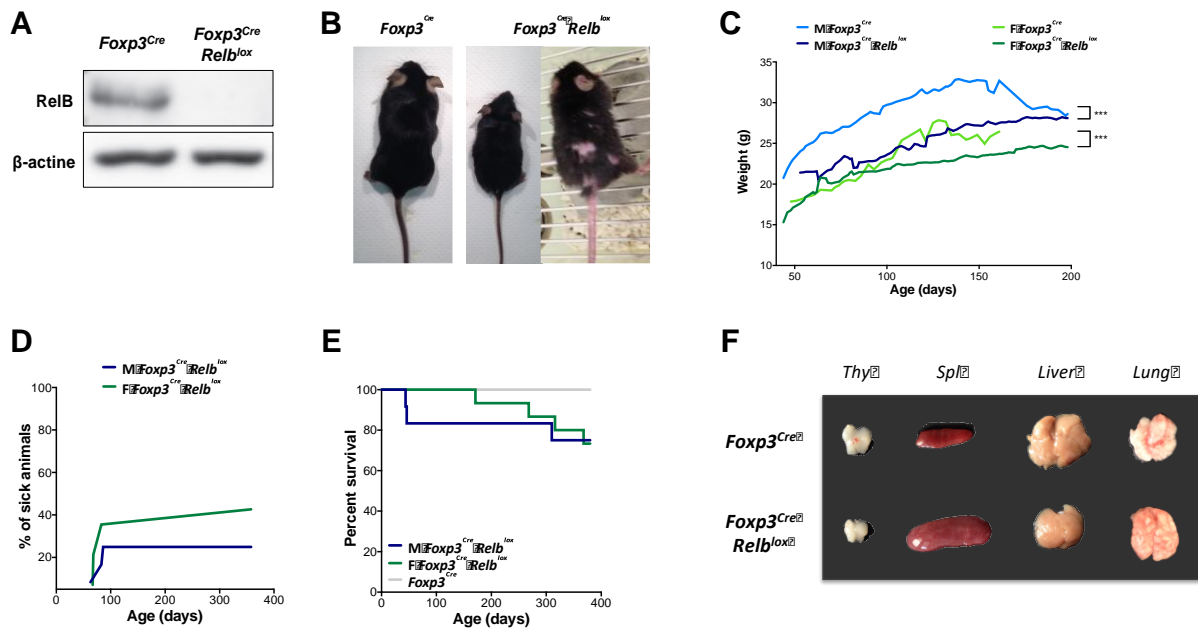


Figure 11. Suivi clinique des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. (A) Vérification de la délétion de RelB dans les Tregs par western blot. (B) Photographies représentatives d'une souris *Foxp3^{Cre}* âgée de 6 semaines et de deux souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* âgées de 6 (à gauche) et 8 (à droite) semaines. (C) Evolution du poids des mâles et femelles *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* (bleu et vert foncés respectivement) comparée aux souris mâles et femelles *Foxp3^{Cre}* (bleu et vert clairs respectivement). (D) Incidence de la maladie développée spontanément par les mâles (bleu foncé) et femelles (vert foncé) *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. (E) Courbe de survie des animaux *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. (F) Photographie du thymus (Thy), de la rate (Spl), du foie (Liver) et des poumons (Lung) des animaux *Foxp3^{Cre}* et *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* de 6 semaines. *** $p < 0,001$, test de Log-rank.

Sur l'ensemble des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* des phénotypes très hétérogènes, aussi bien dans le type de symptômes que leur évolution, ont été observés. En effet, outre le poids inférieur mesurait pour l'ensemble des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* étudiées par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}* (**Figure 11C**), la majorité des souris ne présentaient pas de signes cliniques de maladie tandis que certaines avaient un retard de croissance ou une alopecie associée à des lésions cutanées plus ou moins sévères, pouvant aboutir au décès de l'animal (**Figure 11D, E**). De plus, Par ailleurs, dans la majorité des souris, tout phénotype confondu, aucun ganglion n'était observé et ceci était associé à une légère atrophie du thymus et une splénomégalie. Elles semblaient également avoir une mauvaise irrigation du foie et des poumons qui avaient une couleur « blanchâtre » et également une texture « rugueuse » (**Figure 11F**). Ainsi, l'inactivation spécifique de RelB dans les Tregs ne semble pas induire de défaut fonctionnel important de ces cellules, les souris présentant une pathologie modérée par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}*

Relb^{lox}, mais pourrait avoir des conséquences dans l'organogenèse des organes lymphoïdes secondaires.

2.2. Etude des populations lymphocytaires des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*

Nous avons ensuite procédé à l'analyse des cellules lymphocytaires de souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* âgées de 6 semaines. Nous avons ainsi observé que le nombre absolu de leucocytes est diminué dans le thymus tandis qu'il est augmenté dans la rate, le foie et les poumons, comparé aux souris *Foxp3^{Cre}* du même âge (**Figure 12A**), ce qui corrèle avec les observations macroscopiques faites de ces organes (**Figure 11F**). Ces différences s'expliquent notamment par une diminution des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans le thymus et une augmentation de ces derniers dans le foie et les poumons (**Figure 12B**). L'analyse des marqueurs d'activation CD44/CD62L, Ki67 et ICOS nous a permis de constater que ces deux populations sont plus activées dans la rate (**Figure 12C-E**). Dans le foie et les poumons, la proportion de CD44^{hi} CD62L^{low} augmente fortement au sein des deux populations lymphocytaires T tandis que celles de Ki67⁺ et ICOS⁺ n'augmentent significativement que dans les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels et principalement dans le foie (**Figure 12C-E**). Les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* semblent donc développer une inflammation systémique. Celle-ci a été confirmée par l'augmentation de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6, l'IL-17 ou encore l'IFN γ , détectées dans le sérum de ces souris comparées aux souris contrôles *Foxp3^{Cre}* (**Figure 12F**). De façon surprenante, une augmentation importante de l'IL-10, cytokine régulatrice, a également été observée dans le sérum des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* (**Figure 12F**). D'autre part, une augmentation de la quantité d'IgM, d'IgG1 et d'IgE totales a également été détectée dans le sérum de ces souris (**Figure 12G**) alors qu'on observe pas d'augmentation de la quantité d'auto-anticorps anti-ADN (**Figure 12H**). L'ensemble de ces résultats suggère donc que les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* développent une maladie inflammatoire qui ne semble pas être de type auto-immun, appuyant l'hypothèse d'un faible défaut fonctionnel des Tregs déficients pour RelB.

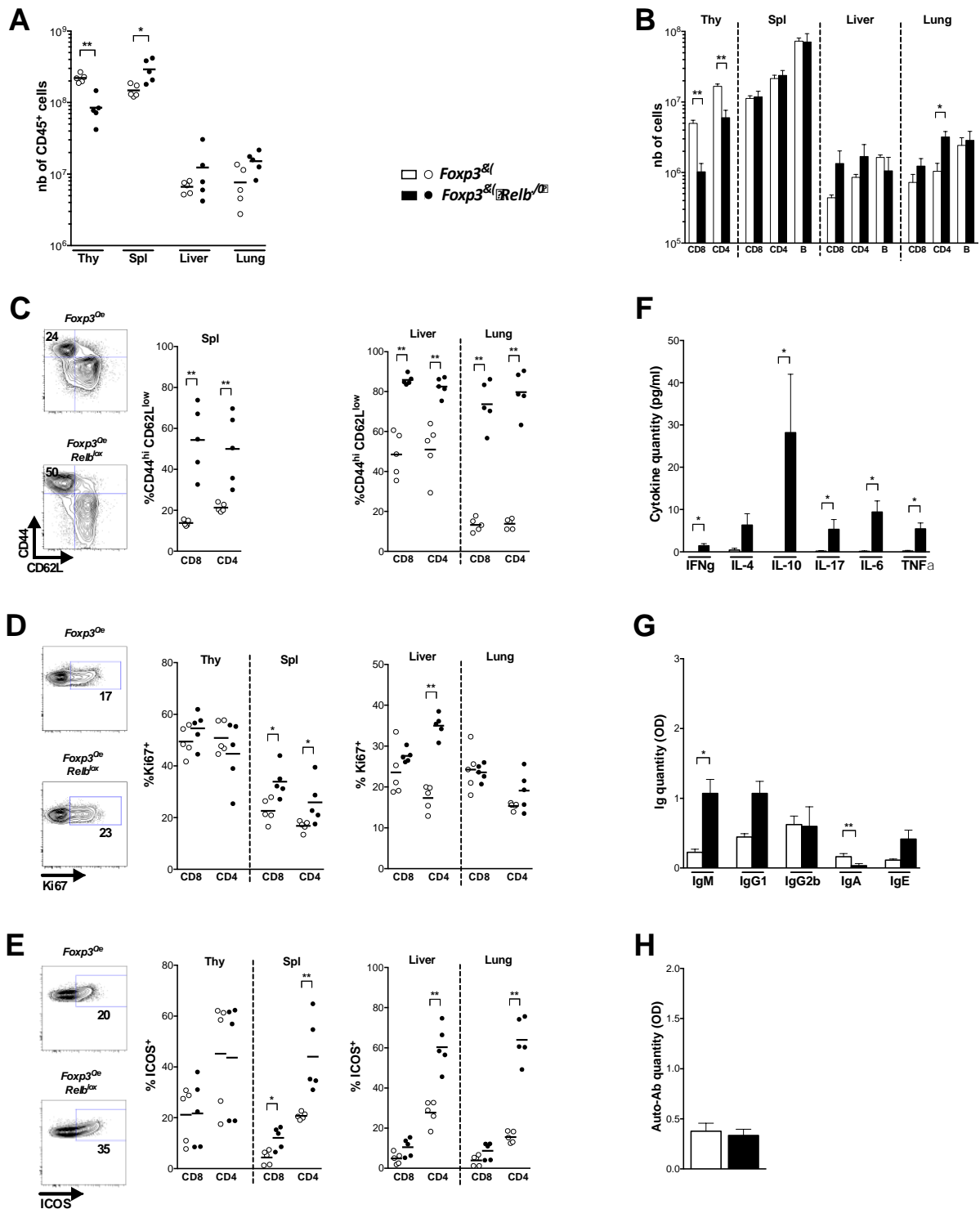


Figure 12. Analyse des compartiments lymphocytaires T et B des souris *Foxp3*^{Cre} *Relb*^{lox}. (A et B) Nombre absolu de cellules CD45⁺ (A) et de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que des lymphocytes B (B) dans le thymus, la rate, le foie et les poumons des souris *Foxp3*^{Cre} et *Foxp3*^{Cre} *Relb*^{lox}. (C à E) Pourcentages et dotplots représentatifs des populations CD44^{hi}CD62L^{low} (C), Ki67⁺ (D) et ICOS⁺ (E) parmi les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ conventionnels dans le thymus, la rate, le foie et les poumons de ces mêmes souris. Chaque point représente une souris et les données collectées proviennent de 2 expériences indépendantes. (F à H) Quantification dans les sérums des souris *Foxp3*^{Cre} et *Foxp3*^{Cre} *Relb*^{lox}.

Relb^{lox} de différentes cytokines, n=5 et n=10 respectivement (F), de sous-types d'immunoglobulines, n=5 et n=10 respectivement (G) et des auto-anticorps anti-ADN, n=15 et n=20 respectivement (H). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, test non paramétrique de Mann-Whitney.

2.3. Etude des populations myéloïdes et NK des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*

Afin de mieux caractériser l'inflammation développée par les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* nous avons étudié la répartition des cellules myéloïdes et NK (**Figure 13A**) dans les différents tissus précédemment analysés.

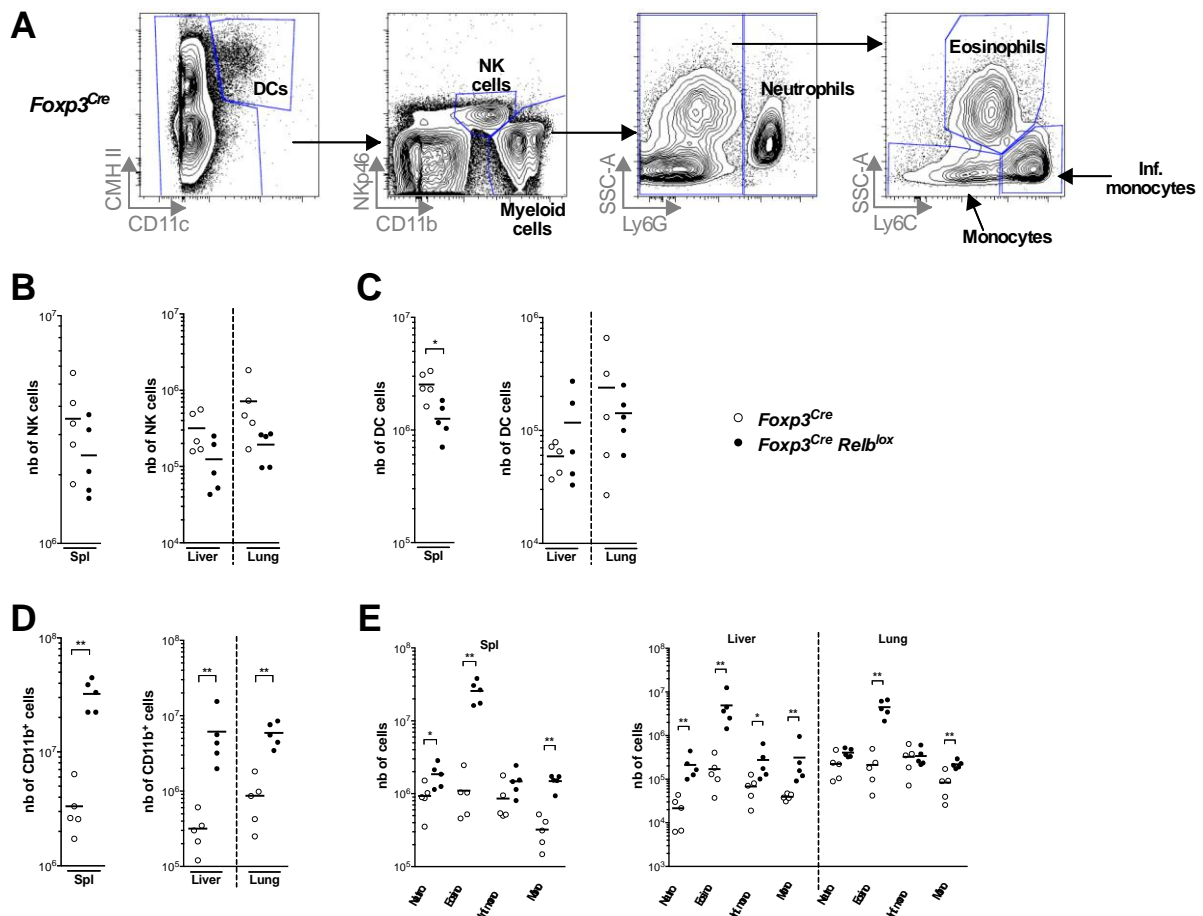


Figure 13 : Analyse des cellules myéloïdes et NK des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. (A) Stratégie représentative d'identification par cytométrie en flux des différentes populations myéloïdes et des cellules NK. (B-E) Nombre de cellules NK (B), de DC (C), de cellules CD11b⁺ (D) et de neutrophiles, éosinophiles, monocytes inflammatoires et monocytes (E) dans la rate, le foie et les poumons des souris *Foxp3^{Cre}* et *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. Chaque point représente une souris et les données collectées proviennent de 2 expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, test non paramétrique de Mann-Whitney.

De façon surprenante dans un contexte inflammatoire, le nombre de NK était diminué dans la rate, le foie et les poumons des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* (**Figure 13B**). Excepté dans le foie, la même observation fût faite pour les DC (**Figure 13C**). En revanche, le nombre de cellules CD11b⁺ était fortement augmenté dans ces 3 organes, augmentation qui s'expliquait par une hausse des neutrophiles, des monocytes et principalement des éosinophiles (**Figure 13D-E**).

2.4. Etude des Tregs des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'homéostasie et à la fonctionnalité des Tregs chez les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. Dans un premier temps, nous avons analysé ces paramètres chez les souris âgées de 6 semaines et avons observé une augmentation de la proportion des Tregs dans la rate, le foie et les poumons (**Figure 14A**). Ces Tregs présentaient un phénotype très activé au vu de l'augmentation forte des pourcentages de Tregs CD44^{hi} CD62L^{low}, ICOS⁺, Ki67⁺ ainsi que des Moyennes d'Intensité de Fluorescence (MFI pour *Mean Fluorescence Intensity*) de GITR, CD103 et CTLA-4 (**Figure 14B**). De façon plus modérée, une hausse de la MFI de FoxP3 a été constatée tandis que celle de CD25 était diminuée (**Figure 14B**). Ces premiers résultats suggèrent donc que les Tregs déficients pour RelB n'ont pas de défaut fonctionnel.

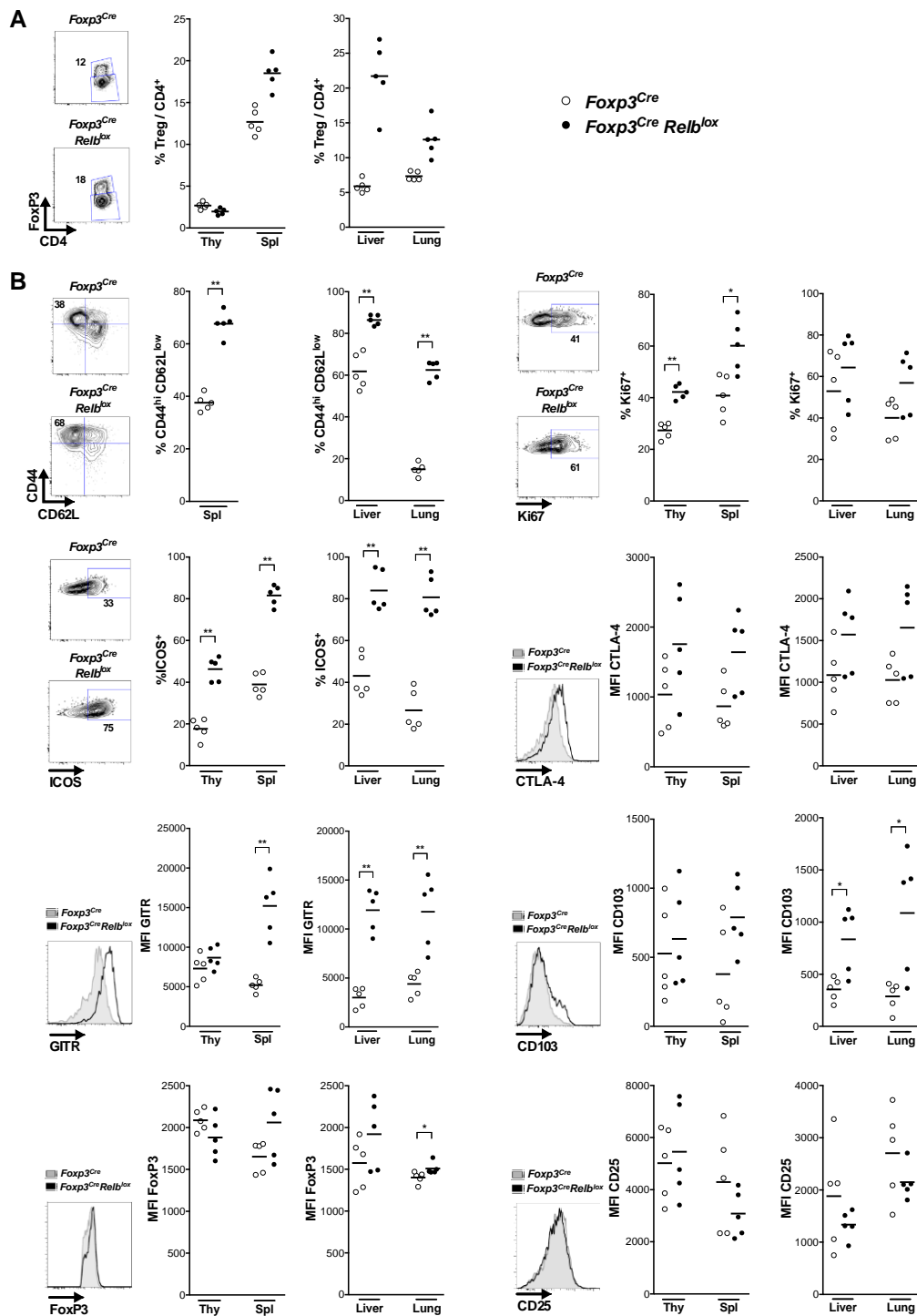


Figure 14 : Analyse des Tregs des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. (A) Dotplot représentatif et proportions des Tregs parmi les lymphocytes T CD4⁺ dans le thymus, la rate, le foie et les poumons des souris *Foxp3^{Cre}* et *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. (B) Dotplots représentatifs et proportions des populations CD44^{hi}CD62L^{low}, Ki67⁺ et ICOS⁺ et MFI de CTLA-4, GITR, CD103, FoxP3 et CD25 parmi les Tregs dans le thymus, la rate, le foie et les poumons de ces mêmes souris. Chaque point représente une souris et les données collectées proviennent de 2 expériences indépendantes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, test non paramétrique de Mann-Whitney.

Afin d'approfondir l'étude des Tregs, nous avons ensuite analysé leur capacité à survivre et proliférer *in vitro* dans différentes conditions. Pour cela, nous avons mis en culture pendant 24h ou 72h les Tregs de souris *Foxp3^{Cre}* et *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* marqués au *Cell Trace Violet* en présence ou non d'IL-2 avec ou non du TNF α et avec ou non stimulation anti-CD3. Nous avons ainsi constaté que quelles que soient les conditions de culture les Tregs déficients pour RelB ont une viabilité et une prolifération légèrement moindre que les Tregs contrôles (données non montrées). En revanche, en présence d'IL-2 et/ou de stimulation anti-CD3 les Tregs issus des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* surexpriment FoxP3 à 24h et CD25 à 24h et 72h, par rapport aux Tregs issus des souris *Foxp3^{Cre}* (**Figure 15A-B**), présentant ainsi un phénotype plus stable que ces derniers.

Puis, afin d'étudier leur capacité suppressive, nous avons réalisé un test de suppression *in vitro*. Pour cela, nous avons mis en culture des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels sauvages en présence de CPA et de différents ratios de Tregs issus de souris *Foxp3^{Cre}* ou de souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* (**Figure 15C**). Nous avons ainsi constaté que les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels proliféraient beaucoup moins en présence des Tregs déficients pour RelB qu'en présence des Tregs sauvages et ce aux différents ratios. Ainsi, les Tregs déficients pour RelB semblent avoir une capacité suppressive augmentée par rapport aux Tregs contrôles. Dans ces conditions nous n'observions pas de surexpression de CD25 voire même une tendance à une diminution de FoxP3 dans les Tregs issus des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* par rapport à ceux des Tregs issus des souris *Foxp3^{Cre}* (**Figure 15D**). L'analyse de leur capacité suppressive *in vivo* en induisant une colite à des souris RAG KO semble confirmer ces résultats (**Figure 15E**).

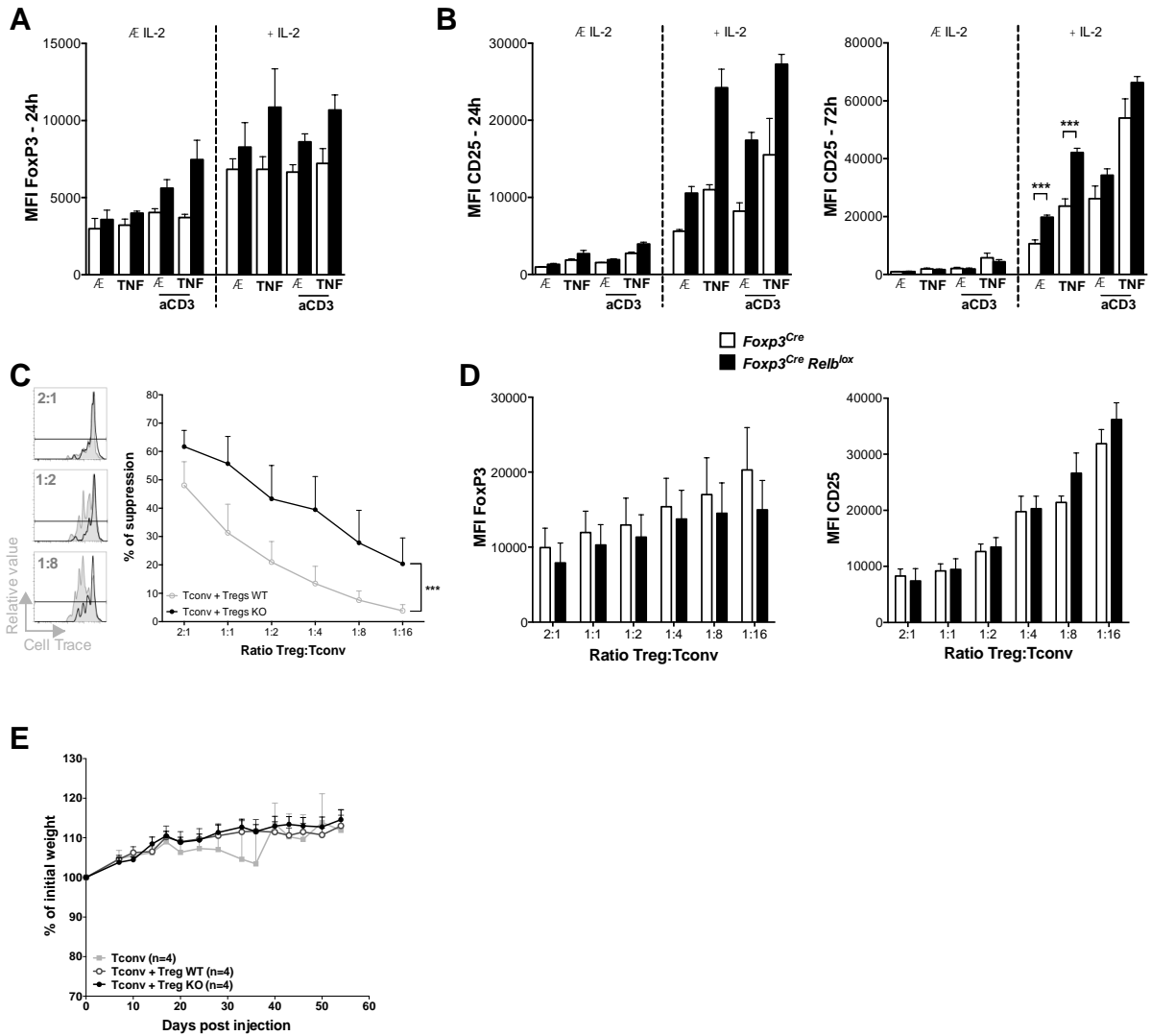


Figure 15 : Evaluation du phénotype et de la capacité suppressive des Tregs déficients pour RelB *in vitro*. (A, B) Niveau d'expression de FoxP3 après 24h (A) et de CD25 après 24h et 72h (B) de culture en présence d'IL-2 ou non avec ou sans TNF α et avec ou non stimulation anti-CD3 dans les Tregs des souris *Foxp3^{Cre}* et *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. (C) Profil de dilution du Cell Trace Violet dans les Tconv en présence de différents ratios de Tregs issus de souris *Foxp3^{Cre}* (Tregs WT) ou de Tregs issus de souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* (Tregs KO) (à gauche) et graphique représentant le pourcentage de suppression de ces 2 types de Tregs en fonction des différents ratios Tregs :Tconv (à droite). (D) Niveau d'expression de FoxP3 et CD25 au sein des 2 types de Tregs en fonction des différents ratios Tregs :Tconv à la fin du test de suppression *in vitro*. Les données collectées proviennent de 3 ou 4 expériences indépendantes. (E) Pourcentage du poids initial de souris RAG KO injectées avec Tconv seuls ou co-injectés avec des Tregs de souris *Foxp3^{Cre}* (WT Tregs) ou de souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* (KO Tregs).

3. Conclusion

Les résultats obtenus montrent que les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* développent une inflammation systémique caractérisée par l'absence de ganglions, des anomalies macroscopiques des organes lymphoïdes, du foie et des poumons ainsi que par d'éventuels lésions cutanées et un retard de croissance. Ces altérations sont associées à une activation forte des lymphocytes T conventionnels, à une augmentation de la proportion de cellules myéloïdes et à une hausse de la quantité de cytokines inflammatoires et d'IgM et IgG1 dans leur sérum.

Il est difficile pour le moment d'expliquer l'ensemble de ces observations puisque ni la proportion ni le niveau d'activation des Tregs de ces souris ne sont diminués, au contraire ils sont même augmentés, potentiellement à cause de l'inflammation. De plus, l'analyse *in vitro* de la capacité régulatrice des Tregs déficients pour RelB montrent que celle-ci est fortement augmentée par rapport aux Tregs sauvages. Il nous faut donc poursuivre et approfondir l'analyse de ces souris et de leurs Tregs.

L'ensemble des ces points sera rediscuté dans la discussion générale (partie « Discussion » II.).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des données générées au cours de ma thèse à l'aide des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*, *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* et *Foxp3^{Cre} RelB^{lox}* mettent en évidence un rôle important des voies de signalisation canonique et alterne de NFκB dans la biologie des Tregs. En effet, l'altération spécifique de chacune d'elle par la délétion des sous-unités RelA et RelB au sein des Tregs aboutit à des anomalies physiologiques plus ou moins sévères dues à un dysfonctionnement de ces cellules.

I. Rôle de RelA dans les Tregs

Nous avons pu constater que RelA joue un rôle important dans les Tregs puisque sa délétion spécifique conduit au développement d'une maladie semblable à celle développée par les souris scurfy bien que moins sévère (Lyon *et al.*, 1990; Godfrey *et al.*, 1991; Brunkow *et al.*, 2001; Lahl *et al.*, 2007). En effet, les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* développent rapidement une inflammation majeure des poumons, de l'estomac, du côlon et de la peau et présentent une adénomégalie consécutive. De plus, comme dans les souris scurfy, nous avons observé une activation très élevée des Teffs des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* ainsi qu'une augmentation majeure de leur nombre et de ceux des populations myéloïdes dans beaucoup de tissus. D'importantes quantités de cytokines inflammatoires, d'auto-anticorps et de différentes Ig ont également été détectées dans leur sérum. D'autre part, l'injection de Tregs sauvages dans des nouveau-nés *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* de moins de 7 jours suffit à empêcher le développement de la pathologie, confirmant que celle-ci est bien due à un défaut initial de développement et/ou de fonction des Tregs déficients pour RelA.

L'inflammation systémique développée par les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* perturbant la biologie des Tregs (Zhou *et al.*, 2009; van der Veecken *et al.*, 2016), nous avons également étudié le rôle de RelA dans les Tregs des femelles *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}*, dans lesquelles 50% des Tregs nouvellement générés présentent une déficience pour RelA. En effet, ces souris se développent normalement et ne présentent aucun signe clinique de pathologie. Nous n'y avons pas observé de différences significatives dans le nombre de leucocytes, excepté dans les mLN, ni des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (données non montrées). De même, le niveau d'activation de ces lymphocytes et la quantité d'auto-anticorps anti-ADN détectée dans le sérum des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* étaient similaires à ceux des souris contrôles *Foxp3^{Cre/wt}*.

Ainsi, les souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* offrent la possibilité d'étudier les conséquences de la délétion de RelA dans les Tregs dans un contexte physiologique et de mieux cerner les mécanismes à l'origine de la pathologie des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*.

1. Rôle de RelA dans le développement des Tregs

La forte proportion de Tregs observée dans le thymus ainsi que dans les organes lymphoïdes secondaires des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}* contrôles suggère que, contrairement à cRel (Isomura *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2009) RelA n'est pas impliqué dans le développement des Tregs. Bien que l'augmentation observée dans le thymus soit probablement due à une recirculation des Tregs activés (Thiault *et al.*, 2015), il pourrait être envisagé que l'inflammation systémique développée par les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* puisse cacher ce rôle en induisant une prolifération intense des Tregs. Cependant nous n'avons pas observé de différence de pourcentage de Tregs Ki67⁺ entre les deux lignées de souris (données non montrées). De plus, les souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* ne présentent pas de défaut de proportion des Tregs déficients pour RelA dans le thymus et seulement une légère diminution dans les organes lymphoïdes secondaires qui semble être imputable à un défaut de prolifération de ces Tregs. Enfin, il se peut que le système d'étude utilisé ici ne permette pas d'apprécier ce rôle. En effet, la délétion de RelA nécessitant l'expression de FoxP3 pour avoir lieu, il est envisageable que celle-ci soit trop tardive pour impacter sur le développement des Tregs. En effet, Messina *et al.* ont observé que la délétion de RelA dans l'ensemble des lymphocytes T (souris *Lck^{Cre} RelA^{lox}*) conduit à une diminution drastique de la proportion des Tregs dans les organes lymphoïdes périphériques, perte pouvant provenir d'un défaut thymique (Messina, 2016).

2. Rôle de RelA sur la biologie des Tregs

De façon surprenante, l'analyse fonctionnelle des Tregs des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* n'a pas permis de mettre en évidence un net défaut de ces derniers. En effet, les Tregs des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* ont un phénotype bien plus activé que ceux des souris *Foxp3^{Cre}*, caractérisé par une nette augmentation de la proportion de Tregs ICOS⁺, CD103⁺ ainsi que de la MFI GITR. De plus, l'analyse de leur capacité suppressive *in vitro* n'a pas révélé de défaut des Tregs déficients pour RelA à inhiber la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ conventionnels. En revanche, contrairement aux organes lymphoïdes, nous avons observé une diminution de la proportion des Tregs dans les organes enflammés tels que le côlon et la peau des souris

Foxp3^{Cre} Rel^{lox}. L'ensemble de ces résultats suggère donc un potentiel défaut de survie, de migration ou encore de stabilité des Tregs dans ces organes.

2.1. Impact sur la migration

L'analyse de la proportion des Tregs déficients pour RelA dans les souris *Foxp3^{Cre/wt} Rel^{lox}* tend à infirmer l'hypothèse d'un défaut de migration. En effet, contrairement à ce que nous avons observé dans les souris *Foxp3^{Cre} Rel^{lox}*, la proportion des Tregs déficients pour RelA des souris *Foxp3^{Cre/wt} Rel^{lox}* est légèrement diminuée dans l'ensemble des organes lymphoïdes et non lymphoïdes analysés, sans observer une quelconque accumulation dans l'un d'eux. De façon similaire, dans l'expérience de co-transfert de Tregs dans les souris CD45.1 nous n'avons pas observé de défaut de proportion des Tregs déficients pour RelA dans le foie et les poumons. Afin de pouvoir pleinement réfuter cette hypothèse, il serait intéressant (i) de vérifier les niveaux d'expression de différents marqueurs de migration vers la peau, tels que CCR4 et CCR10, et le tube digestif, tels que CCR6 et $\alpha 4\beta 7$, sur les Tregs déficients pour RelA et (ii) d'analyser leur proportion dans le sang pour évaluer leur capacité à quitter les ganglions lymphatiques.

2.2. Impact sur la survie

La plus faible proportion des Tregs déficients pour RelA observée dans les différents organes étudiés des souris *Foxp3^{Cre/wt} Rel^{lox}* soutient en revanche l'hypothèse d'un défaut de survie. Elle est également étayée par notre observation d'un phénomène similaire, mais bien plus sévère, dans les souris lymphopéniques ayant reçu à la fois des Tregs sauvages et déficients pour RelA. La stimulation *in vitro* dans différentes conditions des Tregs des souris *Foxp3^{Cre} Rel^{lox}* a également permis de mettre en évidence ce défaut de survie. En revanche, en dehors de la rate, l'expérience de co-transfert en souris sauvages CD45.1 n'a pas révélé de défaut de survie des Tregs déficients pour RelA. Ces divergences peuvent s'expliquer (i) par l'existence d'un défaut de stabilité des Tregs dans les souris *Foxp3^{Cre/wt} Rel^{lox}* en plus d'un défaut de survie et (ii) par l'inflammation importante présente dans les souris CD3 KO et *Foxp3^{Cre} Rel^{lox}*, dont sont issus les Tregs de l'expérience *in vitro*, qui peut amplifier la sensibilité des Tregs déficients pour RelA à l'apoptose. L'analyse de l'expression de molécules pro-apoptotiques telles que la caspase 3 ou anti-apoptiques telles que Bcl2, décrit comme impliqué dans le rôle anti-apoptotique de NF- κ B au cours du développement thymique des lymphocytes T (Mandal 2005), dans les Tregs déficients pour RelA permettrait d'étayer cette hypothèse.

2.3. Impact sur l'activation

L'analyse de différents marqueurs d'activation tels que CD44, CD62L, Ki67, CD103, ICOS et GITR dans les souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* nous a permis de mettre en évidence un fort défaut d'activation et de prolifération des Tregs déficients pour RelA que nous n'observions pas dans les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. En effet, nous avons seulement constaté une diminution de la proportion des Tregs CD44^{hi}CD62L^{low} dans les ganglions et le foie dans ces souris. Basée sur une observation similaire, une récente étude utilisant les mêmes souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* a conclu à un défaut des Tregs déficients pour RelA à acquérir un phénotype effecteur (Messina *et al.*, 2016). Cependant, la méthodologie de cette étude rend cette conclusion très critiquable. En effet, les auteurs n'ont analysé la proportion des Tregs CD44^{hi}CD62L^{low} que dans les ganglions et la rate, dans laquelle ils n'observaient pas de différences, tandis que notre analyse plus poussée permet d'observer que seul le foie présente la même tendance que les ganglions et qu'il y a même une augmentation de la proportion de Tregs CD44^{hi}CD62L^{low} dans les poumons et la peau. Ils ont également basé cette conclusion sur une analyse transcriptomique où très peu de gènes confirmaient cette hypothèse et surtout qui a été réalisée à partir de Tregs issus de souris où toutes les cellules hématopoïétiques sont déficientes pour RelA. Ainsi, notre analyse plus approfondie des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* complétée avec celle des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* a permis de mettre en évidence un défaut global et significatif d'activation des Tregs déficients pour RelA.

2.4. Impact sur la capacité suppressive

Enfin, les analyses des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* et de l'expérience de transfert adoptif dans les souris sauvages CD45.1 nous ont permis de mettre en évidence une diminution d'expression de la molécule suppressive CTLA-4 sein des Tregs déficients pour RelA, ce qui nous avait été difficile d'apprécier dans les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. Or, les souris *Foxp3^{Cre} Ctla4^{lox}* développent une pathologie auto-immune similaire à nos souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* (Wing *et al.*, 2008) suggérant un potentiel rôle de RelA dans l'expression de cette molécule et donc dans la fonction suppressive des Tregs. La réalisation d'un test de suppression *in vitro*, fortement dépendant des interactions entre CTLA-4 et CD80/CD86, avec des Tregs déficients pour RelA issus des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* permettrait d'éclaircir ce point.

D'autre part, il a été mis en évidence que l'IL-10 sécrétée par les Tregs joue un rôle important dans le contrôle d'une inflammation des poumons, du côlon et de la peau (Rubtsov *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2011), les 3 tissus particulièrement enflammés dans les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. De plus, il a été montré que les Tregs spécifiquement déficients pour IKK β ou

TRAF3, une protéine permettant la transduction du signal de différents récepteurs et impliquée dans l'activation de NF- κ B, présentent un défaut de production d'IL-10 (Chang *et al.*, 2012). Cependant, le phénotype plus sévère développé par les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre} Il10^{lox}* suggère qu'en plus d'une potentielle déficience en production d'IL-10 les Tregs déficients pour RelA présentent un autre défaut fonctionnel, tels qu'une moindre expression de CTLA-4. Afin d'approfondir cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier par ELISA l'IL-10 produite par des Tregs de souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* et *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* restimulés *in vitro* avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-2.

2.5. Impact sur la stabilité

L'ensemble des données discutées précédemment met en évidence divers défauts fonctionnels et de survie des Tregs déficients pour RelA et certaines suggèrent même un défaut de stabilité de ces derniers.

Les premiers résultats suggérant une instabilité des Tregs déficients pour RelA furent ceux obtenus dans le modèle de colite. En effet, nous avons constaté que la présence des Tregs issus des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* conjointement aux lymphocytes T conventionnels conduisait au développement d'une maladie plus sévère que lorsque ces derniers étaient injectés seuls. L'incapacité des Tregs déficients pour RelA à contrôler le développement de la pathologie peut être due à un défaut de suppression mais aussi de migration, de survie ou de stabilité des Tregs. C'est ce dernier phénomène que nous avons mis en évidence ici, constatation également faite par Messina *et al.* (Messina *et al.*, 2016), et qui permet aussi d'expliquer l'aggravation observée de la colite. Cependant, il est difficile de conclure à un rôle intrinsèque de RelA dans ces conditions puisque, contrairement aux souris co-injectées avec les lymphocytes T conventionnels et des Tregs sauvages, les souris ayant reçu des Tregs déficients pour RelA ont développé une inflammation bien plus importante. Or, il a été démontré que différents facteurs inflammatoires peuvent provoquer la perte de FoxP3 (Zhou *et al.*, 2009; van der Veeken *et al.*, 2016). Pour pallier ce problème, nous avons réalisé des expériences de co-transfert des Tregs sauvages et déficients pour RelA dans des souris sauvages ou lymphopéniques qui permettent d'étudier ces deux types de Tregs dans un même environnement. Nous avons ainsi observé une tendance plus marquée des Tregs déficients pour RelA à perdre FoxP3 et donc à devenir des ex-Tregs par rapport aux Tregs sauvages, phénomène qui était encore plus important dans les souris lymphopéniques. Ces résultats

corrèlent avec (i) la diminution de l'expression de FoxP3 au sein des Tregs déficients pour RelA observée dans les souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* et (ii) la baisse importante de proportion des Tregs constatée dans le côlon et la peau des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* dans lesquelles ces 2 tissus sont très enflammés. De plus, il a été décrit que la déficience spécifique dans les Tregs de TRAF6, une protéine de la même famille que TRAF3 et impliquée dans l'activation de NF-κB, aboutit au développement d'une maladie similaire à celle des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. De façon remarquable, l'absence de TRAF6 dans les Tregs favorise leur perte de FoxP3 notamment en conditions inflammatoires (Muto *et al.*, 2013).

3. Physiopathologie des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*

L'ensemble de ces informations nous permet de proposer une chronologie des différents phénomènes à l'origine de la pathologie développée par les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* (Figure 16).

3.1. Défaut multifonctionnel des Tregs

Nous supposons ainsi qu'initialement la déficience de RelA induit principalement un défaut d'activation et de survie, et potentiellement de suppression, des Tregs. Les marqueurs majoritairement impactés, CD44, Ki67, CD103, ICOS et CTLA-4, n'étant pas spécifiques des Tregs, nous faisons l'hypothèse d'une régulation de ces gènes, directe ou indirecte, par RelA indépendamment du niveau d'expression de *Foxp3*. Ceci est appuyé par le fait que Messina *et al.* ont observé que l'inactivation de RelA dans les lymphocytes T conventionnels n'impacte pas leur proportion mais leur phénotype en les rendant incapable d'induire une colite (Messina *et al.*, 2016). A ce stade, nous supposons que l'instabilité des Tregs resterait mineure, n'ayant observé qu'une faible diminution de FoxP3 dans les souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* et une proportion faible d'exTregs dans l'expérience de transfert adoptif dans les souris CD45.1.

3.2. Activation incontrôlée des lymphocytes T et B

Ce défaut fonctionnel des Tregs conduirait ainsi à une activation incontrôlée des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ conventionnels, qui serait plus marquée dans les tissus en contact avec des antigènes exogènes comme le tractus digestif, la peau et les poumons. Il pourrait également concourir à une mauvaise régulation des Tfh par les Tfr conduisant à une activation anormale des lymphocytes B, expliquant l'augmentation majeure de la quantité des différents sous-types d'Ig dans le serum des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. Il a d'ailleurs été décrit

que TRAF3 semble particulièrement impliqué dans la prolifération des Tfr et ainsi dans le contrôle des Tfh et des réponses humorales (Chang *et al.*, 2014).

3.3. Instabilité et perte des Tregs

Cette inflammation mettrait alors en exergue l'instabilité des Tregs déficients pour RelA conduisant à une perte des Tregs dans la peau et le côlon, observable dès 5 semaines dans les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. Comme présenté dans l'introduction de ma thèse, il a été montré que cRel se fixe sur la région CNS3 du gène *Foxp3* et il est supposé que cela initierait la déméthylation de la région CNS2, décrite comme essentielle à la stabilité de FoxP3 et sur laquelle se fixent un certain nombre de facteurs de transcription tels que CREB et STAT5. Au vu de nos résultats, on peut supposer que RelA se fixe également à la région CNS3 en formant un dimère avec cRel et participe ainsi à la stabilité des Tregs. En effet, les souris déficientes pour cRel présentent une forte diminution, mais pas complète, de la proportion des tTregs (Isomura *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2009). De plus, les souris déficientes pour IKK β dans les CD4 ont une réduction plus importante en tTregs (Schmidt-Supprian *et al.*, 2003) suggérant l'implication d'une autre sous-unité de la voie canonique de NF- κ B dans le processus de développement de ces Tregs. Or, une étude récente suggère que NF- κ B1 n'est pas impliquée dans ce processus (Deenick *et al.*, 2010).

De plus, Ruan *et al.* ont constaté que la transfection de RelA dans des lymphocytes T permet l'induction de l'expression de FoxP3, et pas celle de p50. Ils ont également montré que l'induction de Tregs *in vitro* est associée à la formation d'un complexe de plusieurs facteurs de transcription impliquant RelA et qui se fixe sur le promoteur de *Foxp3* (Ruan *et al.*, 2009). Afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués, nous sommes actuellement dans l'attente de résultats de collaborateurs sur le séquençage ARN et l'évaluation de la méthylation du gène *Foxp3* de Tregs déficients pour RelA issus des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}*. Nous avons également débuté le croisement de souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* avec des souris Rosa26-loxp-stop-loxp-RFP pour générer des animaux *Foxp3^{Cre} RelA^{lox} Rosa^{loxRFP}* dans lesquels toutes les cellules exprimant ou ayant exprimé la CRE seront RFP⁺, ce qui nous permettra d'évaluer la proportion et le phénotype des ex-Tregs qui seront RFP⁺ FoxP3⁻.

4.4. Génèse d'ex-Tregs pathogènes

Cette instabilité des Tregs déficients pour RelA pourrait également conduire à la genèse d'ex-Tregs pathogènes.

En effet, il a été démontré que FoxP3 régule la production d'IL-17 en inhibant directement l'expression de ROR γ t (Zhou *et al.*, 2008). De plus, la conversion des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Tregs ou en Th17 est dépendante de la présence de TGF- β et d'IL-6. Or, nous avons observé une augmentation importante de la quantité d'IL-6 dans le sérum des souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}* qui pourrait donc favoriser la conversion des exTreg en Th17. Par ailleurs, les Tregs spécifiquement déficients pour IKK β se mettent à produire de l'IFN γ et de l'IL-17 *in vivo* et présentent un défaut de production de SOCS1, facteur impliqué dans la stabilité des Tregs (Takahashi *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012). Cependant, la perte de Foxp3 dans ces souris reste faible suggérant l'existence d'un mécanisme supplémentaire et/ou différent dans les souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}*.

D'autre part, des résultats que nous avons récemment obtenus montrent une compensation critique de l'absence de RelA par une augmentation de l'expression de cRel et de sa fixation sur ses cibles ADN. Ceci est cohérent avec le fait que, comme présenté dans l'introduction, les souris *Rela^{-/-} cRel^{-/-}* meurent plus précocément que les animaux *Rela^{-/-}*, suggérant l'existence d'une compensation partielle entre ces deux sous-unités. Or, il a été décrit que cRel est impliquée dans l'expression de ROR γ t et donc dans la conversion en Th17 (Ruan *et al.*, 2011). Ainsi, l'augmentation de l'activité de cette sous-unité dans les Tregs déficients pour RelA pourrait favoriser leur différenciation en Th17. Il serait également intéressant de regarder si l'absence de RelA ne serait pas également compensée par une augmentation de l'expression de p50. En effet, comme pour cRel, les souris *Rela^{-/-} Nfkb1^{-/-}* meurent plus précocément que les animaux *Rela^{-/-}* et il a été montré que p50 est impliqué dans la conversion des Th9 (Bonadies *et al.*, 2009 ; Early *et al.*, 2009), cellules pouvant être impliquées dans des réactions auto-immunes telles que la colite (Dardhalon, 2008) ou l'EAE (Jäger, 2009).

Plusieurs études récentes démontrent également la capacité d'ex-Tregs à devenir pathogènes, suite à leur transfert dans des souris lymphopéniques, de par la production de cytokines inflammatoires et par leur expression d'un TCR autoréactif (Guo and Zhou, 2015). Il serait donc très intéressant de transférer les ex-Tregs issus des souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox} Rosa^{loxRFP}* âgées de 12 semaines dans des souris RAG KO ou CD3 KO afin d'observer l'éventuel développement d'une pathologie similaire à celle développée par les souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}*.

3.5. Développement d'une inflammation systémique de type auto-immun

L'ensemble de ces phénomènes pourrait ainsi conduire à une inflammation systémique de type auto-immune qui (i) amplifierait les phénomènes de perte des Tregs et de genèse d'ex-

Tregs pathogènes et (ii) augmenterait l'activation et la prolifération des Tregs mais insuffisamment pour contrôler la pathologie.

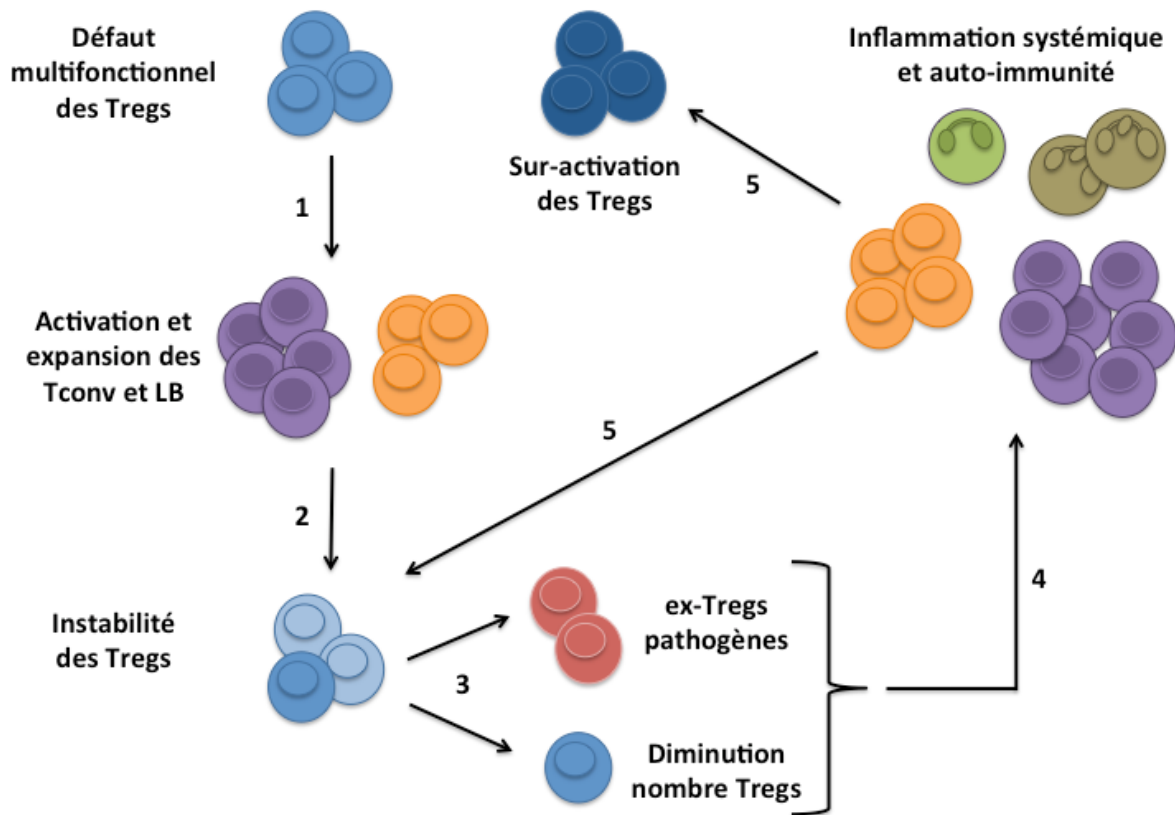


Figure 16 : Schéma hypothétique de la physiopathologie des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}*. L'absence de RelA dans les Tregs induit de multiples défauts fonctionnels (activation, survie, suppression) de ces derniers. (1) Ce dysfonctionnement des Tregs conduirait à une activation incontrôlée des lymphocytes B et T conventionnels aboutissant au développement d'une inflammation. (2) Celle-ci mettrait alors en exergue l'instabilité des Tregs déficients pour RelA conduisant à (3) une diminution du nombre de Tregs ainsi qu'à la genèse d'ex-Tregs pathogènes. (4) L'ensemble de ces phénomènes aboutirait à une réaction inflammatoire et auto-immune systémique qui (5) (i) amplifierait le phénomène d'instabilité des Tregs et (ii) augmenterait leur activation et prolifération mais insuffisamment pour contrôler la pathologie.

II. Rôle de RelB dans les Tregs

Sur l'ensemble des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* étudiées des phénotypes très hétérogènes, aussi bien dans le type de symptômes que leur évolution, ont été observés. Ces souris présentaient également un poids inférieur aux souris *Foxp3^{Cre}* mais avec une différence moindre que les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. Par ailleurs, dans la majorité des souris, tout phénotype confondu, aucun ganglion n'était observé et ceci était associé à une légère atrophie du thymus et une splénomégalie. Elles présentaient également des anomalies macroscopiques du foie et des poumons. L'activation importante des lymphocytes T et l'augmentation des leucocytes, et plus spécifiquement des cellules myéloïdes, observées dans ces organes suggère le développement d'une inflammation dans ces derniers. L'augmentation de la quantité de différentes cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'IgM et d'IgG1, indépendamment d'une augmentation d'auto-anticorps, dans le sérum des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* témoigne même d'une inflammation systémique. Des analyses histologiques de plusieurs organes des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* sont en cours afin de mettre plus en évidence cette inflammation généralisée. Ainsi l'inactivation spécifique de RelB dans les Tregs semble, comme RelA, avoir des conséquences sur la biologie de ces cellules impactant notamment l'organogenèse des organes lymphoïdes secondaires.

1. Rôle de RelB dans le développement des Tregs

La forte proportion de Tregs observée dans la rate des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}* contrôles et l'absence de différence dans le thymus suggèrent que RelB n'est pas impliqué dans le développement des tTregs. Cependant, comme pour les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*, il pourrait être envisagé que l'inflammation développée par les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* puisse cacher ce rôle en induisant une prolifération intense des Tregs. En l'occurrence, nous observons une proportion plus importante de Tregs Ki67⁺ dans les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}*. Comme pour RelA, il se peut donc que le système d'étude utilisé ici ne permette pas d'apprécier ce rôle, la délétion de RelB nécessitant l'expression de FoxP3 pour avoir lieu. Le croisement des souris *Relb^{lox}* avec des souris *CD4^{Cre}* ou *Lck^{Cre}* permettrait de répondre à cette question.

2. Rôle de RelB dans la biologie des Tregs

Les données accumulées jusqu'à présent sur le rôle de RelB dans la fonction des Tregs restent préliminaires mais nous permettent tout de même d'émettre des hypothèses sur son implication.

2.1. Impact sur la migration et la survie

La proportion fortement augmentée des Tregs dans la rate, le foie et les poumons des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* suggèrent que les Tregs déficients pour RelB n'ont ni défaut de migration ni défaut de survie *in vivo*. Cependant, la stimulation *in vitro* dans différentes conditions de ces Tregs met en évidence un léger défaut de survie de ces derniers (données non montrées). Il serait donc intéressant, comme pour les Tregs déficients pour RelA, d'étudier l'expression de facteurs anti-et pro-apoptiques au sein des Tregs des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*. Il faudrait également élargir l'analyse à d'autres tissus tels que la peau, certaines souris ayant présenté des lésions cutanées plus ou moins sévères qui pourraient être dues à une déficience en Tregs dans ce tissu.

2.2. Impact sur l'activation et la prolifération

L'analyse de différents marqueurs d'activation sur les Tregs des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* nous a permis de constater un phénotype très activé de ces derniers. En effet, nous avons observé une forte augmentation de la proportion de Tregs CD44^{hi}CD62L^{low}, ICOS⁺ ainsi que des MFI de GITR, CD103 et CTLA-4 dans le thymus, la rate, le foie et les poumons des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* comparé aux souris *Foxp3^{Cre}*. L'observation d'une diminution de la MFI de CD25 dans la rate, le foie et les poumons corrèle avec ce phénotype très activé des Tregs (Smigiel *et al.*, 2014).

De plus, comme présenté précédemment, nous avons constaté une hausse importante du pourcentage de Tregs Ki67⁺ dans les différents organes étudiés des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}*. La stimulation *in vitro* dans différentes conditions de ces Tregs a confirmé cette absence de défaut de prolifération.

Tout comme pour les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*, il n'est cependant pas impossible que l'inflammation présente dans les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* impacte le phénotype et la proportion des Tregs. Il faudrait donc réitérer ces analyses dans les souris *Foxp3^{Cre/wt} Relb^{lox}*.

2.3. Impact sur la stabilité

L'augmentation de la proportion des Tregs et de la MFI de FoxP3 dans la rate, le foie et les poumons des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* comparées aux souris *Foxp3^{Cre}* suggère que les Tregs déficients pour RelB n'ont pas de défaut de stabilité. L'augmentation *in vitro* des MFI de FoxP3 et CD25 au sein des Tregs issus des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* par rapport à ceux des souris *Foxp3^{Cre}*, quelles que soit les conditions de culture, confirme cela et suggère même que l'absence de RelB les rendrait plus stables. Cependant, il serait prudent de confirmer cela en croisant les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* avec des souris Rosa26-loxp-stop-loxp-RFP afin de vérifier l'absence d'ex-Tregs. En effet, Komatsu *et al.* ont décrit que les Tregs CD25^{low} voire CD25⁻ sont plus sensibles à une perte de FoxP3 que les Tregs CD25^{hi} (Komatsu *et al.*, 2009). Ces croisements sont en cours.

2.4. Impact sur la capacité suppressive

L'évaluation de la capacité suppressive *in vitro* des Tregs des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* nous a permis de constater que celle-ci était fortement augmentée. En effet, la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels était grandement inhibée par les Tregs déficients pour RelB comparée à celle observée en présence de Tregs sauvages. La diminution de MFI de FoxP3 observée aux différents ratios coïncide avec ce phénotype. En effet, la forte suppression exercée par les Tregs déficients pour RelB conduit certainement à une diminution de la quantité d'IL-2 dans le milieu, cytokine sécrétée par les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels et nécessaire à l'expression de FoxP3.

Concernant les données *in vivo*, nous avons pour le moment réalisé une seule expérience de colite mais celle-ci tend à confirmer l'absence de défaut de suppression des Tregs déficients pour RelB (données non montrées). Ce résultat fut surprenant pour nous étant donné l'inflammation développée par les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* et notamment au vu du phénotype très activé des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ conventionnels dû à celle-ci. Cependant, bien que le nombre de leucocytes était augmenté dans la rate, le foie et les poumons des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}*, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ conventionnels ne l'était pas dans la rate et que très faiblement dans le foie et les poumons. Ceci démontre donc que non seulement les Tregs déficients pour RelB régulent la prolifération des lymphocytes T conventionnels mais tend aussi à confirmer l'augmentation de leur capacité suppressive au vu de l'activation importante de ces cellules. Les fortes augmentations de la MFI de CTLA-4 et de la quantité d'IL-10 dans le sérum des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}* corréleront également avec ce phénotype très

suppresseur des Tregs déficients pour RelB. Par ailleurs, il a été décrit que dans les Tregs l'inhibition de la protéine PKC- θ , impliquée notamment dans la voie de signalisation du TCR à NF- κ B, augmente leur capacité suppressive (Zanin-Zhorov *et al.*, 2010). Les auteurs démontrent que ce mécanisme implique notamment l'inhibition des sous-unités p50 et p65 de NF- κ B. Cependant, celle-ci reste faible et permet de faire l'hypothèse que ce phénomène implique majoritairement RelB qui n'a pas été étudié dans ce travail.

3. Dans l'organogenèse des ganglions

La non détection de ganglions dans certaines souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* fut très surprenante et nous amena à poser trois hypothèses : (i) l'expression de RelB dans les Tregs est essentielle à l'organogenèse des ganglions, (ii) le phénotype très suppressor des Tregs déficients pour RelB aboutit à une destruction des ganglions et (iii) il y a une fuite d'expression de la CRE dans d'autres cellules ayant un rôle important dans l'organogenèse des ganglions.

Le développement des ganglions se déroule entre E12,5 et E15,5 chez la souris et débute avec la migration des cellules hématopoïétiques vers les cellules stromales via la signalisation α 4 β 7 et MAdCAM-1 présents respectivement sur chacune de ces cellules. Puis, l'activation du récepteur à l'IL-7 présent à la surface des cellules hématopoïétiques conduit à la surexpression par ces dernières d'hétérodimères de lymphotoxine (LT) α 1 β 2. Ces dimères vont se fixer sur leur récepteur, le LT β R, présent à la surface des cellules stromales et induire la production de CXCL13. Ceci va permettre le recrutement d'autres cellules leucocytaires via leur expression de CXCR5, le récepteur de CXCL13, constituant ainsi une boucle de rétro-contrôle positif. S'en suit le recrutement des DC puis des lymphocytes T et B. La connaissance des protéines impliquées dans ce processus a été rendue possible par l'utilisation de plusieurs souris KO. Il a ainsi été observé que les souris *Relb^{-/-}* ne possèdent pas de ganglions et que l'activation de cette sous-unité au sein des cellules stromales est essentielle au développement des ganglions (Weih and Caamaño, 2003; Hayden and Ghosh, 2011). Cependant, il n'est pas connu si le maintien des ganglions est un processus passif ou actif impliquant des cellules particulières.

Au vu de nos résultats, il pourrait être envisagé que l'importante capacité suppressive des Tregs déficients pour RelB aboutisse à une diminution drastique des lymphocytes T au niveau

des ganglions et donc à une déstructuration de l'architecture de ces derniers. Cependant, nous n'observons pas de diminution du nombre des lymphocytes T conventionnels dans les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* par rapport aux souris *Foxp3^{Cre}*, en dehors du thymus dans lequel la baisse peut s'expliquer par la sensibilité importante des thymocytes à l'apoptose due à l'inflammation. De plus, le phénotype très similaire de nos souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* et des souris *Relb^{-/-}* (absence de ganglions et développement d'une pathologie vers 10 semaines pouvant aboutir au décès de certains animaux) suggère une fuite d'expression de la CRE dans des cellules impliquées dans l'organogenèse des ganglions telles que les cellules stromales. Nous venons tout récemment d'observer un déficit d'expression de RelB dans les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*, appuyant cette hypothèse. Nous avons donc initié des croisements entre des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* et des souris Rosa26-loxp-stop-loxp-RFP afin de pouvoir identifier les cellules n'exprimant pas RelB dans nos souris.

Si la fuite généralisée de la CRE se confirme, nous pourrions alors réaliser des chimères mixtes de moelle osseuse pour confirmer ou non que le phénotype très activé et très suppresseur des Tregs des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* est bien lié à un rôle intrinsèque de RelB dans les Tregs.

S'il n'y a pas de fuite de la CRE ou si celle-ci est restreinte aux lymphocytes T, il faudra alors que nous identifions s'il s'agit d'un défaut de développement des ganglions ou de leur destruction par les Tregs. Pour cela, nous envisageons (i) d'injecter de l'Evans blue dans les souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* qui permet de voir le réseau lymphatique et les ganglions et (ii) de regarder si les nouveau-nés *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* ont des ganglions ou pas. Si les résultats vont en faveur d'une destruction des ganglions nous pourrions alors voir (i) si l'injection de Tregs déficients pour RelB aboutit à la destruction des ganglions de souris *Foxp3^{Cre}* et (ii) si l'injection de Tregs sauvages dans des nouveau-nés *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* permet d'empêcher la destruction des ganglions.

4. Physiopathologie des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*

La nécessité de confirmer et d'étayer la majorité des résultats obtenus jusqu'à présent ainsi que le phénotype très similaire des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* à celui des souris *Relb^{-/-}* nous empêchent pour le moment d'établir une hypothèse sur le phénotype des souris *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}*.

III. Le système CRElox, un modèle idéal ?

1. Un modèle spécifique...

Les connaissances sur le rôle des voies de signalisation de NF- κ B dans les lymphocytes T proviennent de données accumulées notamment à partir de différents modèles murins dans lesquels différents membres des voies de NF- κ B ont été inhibés, sur-activés ou encore supprimés.

Cependant, dans beaucoup de ces modèles, la modification de la voie de NF- κ B n'était pas spécifique à une population cellulaire rendant complexe l'analyse du rôle intrinsèque de ce facteur de transcription. En effet, il est clairement établi que NF- κ B joue un rôle dans de nombreux types cellulaires dont l'inactivation pourrait impacter de façon indirecte sur le développement et/ou la fonction des lymphocytes T.

Par exemple, Messina *et al.* ont réalisé des chimères à partir de cellules souches de foie fœtale de souris RelA^{-/-} greffées dans des souris sauvages afin de pouvoir étudier le rôle de RelA dans les Tregs dans un environnement non inflammatoire (Messina *et al.*, 2016). Ces souris ne présentent effectivement pas de signes de maladie mais les Tregs se développent dans un environnement où l'ensemble des cellules hématopoïétiques sont déficientes en RelA, ce qui peut impacter indirectement sur leurs phénotype et fonctionnalité. De façon similaire, Corn *et al.* ont isolé des lymphocytes T de souris RelB^{-/-} et ont observé que ces derniers présentaient *in vitro* un défaut de différenciation en Th1 et de production d'IFN γ dû à une diminution d'expression de Tbet (Corn *et al.*, 2005). Cependant, il est difficile dans ces conditions de conclure à un rôle intrinsèque de RelB dans ce processus de différenciation. En effet, les lymphocytes s'étant développés *in vivo* dans un environnement où toutes les cellules sont déficientes pour RelB, il n'est pas impossible que cela ait impacté sur leur propre programme interne.

Ce type d'études nécessite donc (i) de réaliser des chimères mixtes de moelle osseuse afin que les cellules immunes étudiées se développent dans un environnement qui soit le plus physiologique possible et/ou (ii) de faire des analyses poussées sur les différents facteurs extrinsèques connus pouvant impacter sur le dysfonctionnement cellulaire observé.

L'utilisation du système CRElox permet de pallier ce problème puisqu'il permet d'induire l'inactivation d'une protéine dans une population cellulaire donnée.

Cependant, il peut persister un manque de spécificité sur l'étude de la voie de NF- κ B en elle-même.

Par exemple, les souris déficientes pour TAK1, protéine impliquée dans la voie de signalisation du TCR, dans les lymphocytes T CD4⁺ présentent un défaut dans la proportion des Tregs (Wan *et al.*, 2006). Cependant, l'activation de cette molécule ne conduit pas uniquement à l'activation de la voie de NF- κ B et ne permet donc pas de conclure à un rôle de ce facteur de transcription dans le phénomène observé. Une façon de mettre cela en évidence serait d'induire l'activation de la voie de NF- κ B, par activation des IKK ou inhibition des I κ B, et de voir si cela permet de restaurer le phénotype observé.

Ainsi, le choix de la protéine supprimée doit également être le plus spécifique possible.

Les modèles murins utilisés au cours de ma thèse ont donc permis d'étudier le plus spécifiquement possible le rôle de NF- κ B dans la biologie des lymphocytes T régulateurs, FoxP3 étant spécifique de cette population cellulaire chez la souris et ayant supprimé précisément des sous-unités de ce facteur de transcription. Les résultats ainsi obtenus permettent donc de compléter et préciser les données de la littérature existantes (voir partie I.3. de la discussion).

2. ... mais qui a des limites

Bien que très utile, le système CRElox présente néanmoins certaines limites.

En effet, il a été montré que l'expression seule de la CRE impacte la proportion et le phénotype des lymphocytes T (Carow *et al.*, 2016). C'est également ce que nous avons observé dans les souris *Foxp3^{Cre/wt}* dans lesquelles la proportion de Tregs CRE⁺ était fortement diminuée par rapport à celle des Tregs CRE⁻. Leur phénotype était également impacté mais de façon moins importante. Ceci implique d'utiliser les souris *Foxp3^{Cre}* ou *Foxp3^{Cre/wt}* comme contrôles et pas, dans notre cas, les souris *Rela^{lox}* ou *Relb^{lox}*. D'autre part, si le défaut induit par la délétion de la protéine considérée est faible celui-ci peut être caché par l'impact de la CRE, empêchant ainsi l'analyse de son rôle.

D'autre part, il a été rapporté que l'allèle *Foxp3^{Cre}* peut s'exprimer de façon stochastique dans des cellules n'exprimant pas *Foxp3* et à un niveau suffisant pour induire une recombinaison de certains gènes floxés. Ce phénomène pourrait conduire à un KO complet si cela se produisait dans la lignée germinale. Il a également été décrit que cet allèle est hypomorphe, pouvant entraîner une diminution de l'expression de FoxP3 (Franckaert *et al.*, 2015).

Plus spécifiquement dans notre étude, nous sommes confrontés aux limites suivantes :

- (i) l'expression transitoire de *Foxp3* par les lymphocytes T conventionnels activés peut poser problème pour l'étude de la stabilité de FoxP3 et l'existence d'ex-Tregs ;
- (ii) comme discuté précédemment, nos modèles ne sont pas idéaux pour étudier les rôles potentiels de RelA et RelB dans le développement thymique des Tregs, leur délétion nécessitant l'expression préalable de *Foxp3* ;
- (iii) l'inflammation développée par les souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* et *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* et la compétition entre Tregs sauvages et Tregs déficients pour RelA dans les souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* peuvent également cacher ou accentuer le(s) dysfonctionnement(s) des Tregs ;
- (iv) comme présenté dans la partie I.3.4. de cette discussion, nous avons observé une surexpression et activation de cRel dans les Tregs des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* âgées de 12 semaines. Ce phénomène peut être dû à l'inflammation développée par ces souris ou être initialement présent du fait de l'absence de RelA, auquel cas cela signifierait que nous n'étudions pas uniquement les conséquences de la délétion de RelA dans les Tregs dans ces souris. Afin de préciser cela, nous allons analyser si ce même phénomène a lieu dans les lymphocytes T conventionnels des souris *Foxp3^{Cre} RelA^{lox}* âgées de 12 semaines et dans les Tregs des souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}*. Il semble donc important de vérifier l'existence d'éventuels phénomènes compensatoires lors de l'étude de la voie de signalisation de NF- κ B, en l'occurrence, des redondances fonctionnelles existant entre différents membres de cette voie.

IV. Applications thérapeutiques

1. Stratégies actuelles ciblant les Tregs

Différentes thérapies ciblant spécifiquement les Tregs pour le traitement de maladies auto-immunes ou encore des cancers sont en cours de développement ou d'évaluation.

A l'heure actuelle, le traitement le plus connu est l'utilisation de faibles doses d'IL-2 afin de stimuler la prolifération et l'activation des Tregs testé dans différentes maladies auto-immunes. En effet, les Tregs expriment bien plus fortement CD25 que les lymphocytes T conventionnels suggérant que l'injection de faibles quantités d'IL-2 impacterait préférentiellement les Tregs. Il a ainsi été montré que ce traitement augmente la proportion et l'activation des Tregs chez la souris NOD permettant de les guérir du diabète qu'elles développent spontanément (Grinberg-Bleyer *et al.*, 2010a). L'augmentation de la proportion des Tregs en réponse à ce traitement a également été observée chez des patients atteints de DID (Hartemann *et al.*, 2013). Des résultats similaires ont été observés chez des patients atteints de vascularite auto-immune aboutissant même à une amélioration de la pathologie (Saadoun *et al.*, 2011). Il a par ailleurs été montré que l'injection continue de faibles doses d'IL-2 chez la souris n'impacte pas les réponses effectrices lors d'une vaccination, infection ou du cancer (Churlaud *et al.*, 2014).

La thérapie cellulaire, qui consiste à amplifier et/ou modifier *ex vivo* les cellules d'intérêt du patient avant de les lui ré-injecter, est en pleine expansion. En effet, c'est une stratégie très prometteuse notamment pour les maladies auto-immunes puisqu'elle permettrait d'assurer une certaine spécificité et efficacité tout en évitant les effets secondaires liés aux immunosuppresseurs habituellement utilisés. Différents protocoles sont ainsi actuellement utilisés ou à l'étude tels que (i) l'expansion *ex vivo* de Tregs polyclonaux à l'aide de billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, (ii) l'induction de Tregs *in vitro* à partir de lymphocytes T conventionnels spécifiques de l'antigène, ou encore (iii) l'utilisation de nouvelles avancées biotechnologiques pour faire exprimer un récepteur spécifique de l'antigène et capable d'induire un fort signal de stimulation (Bluestone *et al.*, 2015).

Enfin, l'utilisation d'anticorps ciblant des molécules préférentiellement exprimées par les Tregs a également montré des effets prometteurs. Il a ainsi été montré que l'injection chez la souris d'anticorps anti-CD25, anti-GITR, ou encore d'anti-CTLA-4 permet de diminuer le nombre de Tregs ou leur capacité suppressive permettant ainsi un rejet tumoral (Onizuka *et al.*, 1999b; Shimizu *et al.*, 2002; Peggs *et al.*, 2009).

2. Traitements envisageables

L'ensemble des données générées au cours de ma thèse suggère des rôles opposés de RelA et RelB dans la biologie des Tregs. En effet, la délétion spécifique de RelA dans ces cellules aboutissant à un défaut de leur fonction et de leur stabilité, cette sous-unité de NF- κ B semble avoir un rôle activateur au sein des Tregs. Au contraire, la délétion spécifique de RelB dans ces derniers augmente fortement leurs capacités suppressive et d'activation suggérant un rôle inhibiteur de cette sous-unité au sein des Tregs. Ces résultats ouvrent la voie à de nouveaux traitements pour les pathologies impliquant les Tregs telles que les maladies auto-immunes, les cancers ou encore le rejet du greffon. En effet, il pourrait être envisagé de stimuler ou d'inhiber la fonction des Tregs en modulant l'activation de la voie canonique ou alterne de NF- κ B. Seulement, NF- κ B jouant un rôle dans de nombreuses cellules, son ciblage spécifique par des drogues pourrait causer de nombreux effets secondaires néfastes. Pour parvenir à le cibler spécifiquement dans les Tregs l'utilisation d'anticorps agonistes ou antagonistes du TNFR2 semble une piste intéressante. En effet, comme décrit dans mon introduction (partie II.5.) le TNFR2 est préférentiellement exprimé par les Tregs et j'ai participé à un travail qui a démontré que la signalisation de celui-ci dans les Tregs est essentielle pour protéger de l'EAE. De plus, nous avons récemment débuté l'étude des effets d'un anticorps agoniste du TNFR2, STAR2, dans l'EAE. Les résultats préliminaires montrent un effet protecteur de cet anticorps dans le développement de cette pathologie chez des souris sauvages. Une fois que nous les aurons confirmé, nous vérifierons que cet effet passe bien par une activation des Tregs en réalisant les mêmes expériences dans les souris *Foxp3^{Cre} Tnfr2^{lox}*. Par ailleurs, une accumulation de Tregs TNFR2⁺ est observée dans différents types de cancers humains et murins (Chen *et al.*, 2008; Govindaraj *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2015) et la diminution de ces derniers a été retrouvée associée à une rémission totale ou partielle dans la leucémie aigüe myéloïde chez des patients traités par chimiothérapie (Govindaraj *et al.*, 2014). Il a également été observé que les souris TNFR2 KO étaient résistantes au développement d'un cancer de la peau (Arnott *et al.*, 2003). Enfin, différentes données accumulées par l'équipe chez la souris et une étude récente réalisée chez l'homme (Nagar *et al.*, 2010) montrent une activation de NF- κ B au sein des Tregs par le TNF. Il faut cependant identifier les sous-unités de NF- κ B impliquées dans ce processus avant de pouvoir l'exploiter en thérapie.

Pour ce faire, nous pourrions comparer la réponse au TNF des Tregs déficients pour RelA ou RelB à celle des Tregs sauvages dans les souris *Foxp3^{Cre/wt} RelA^{lox}* et *Foxp3^{Cre/wt} RelB^{lox}*, et

non pas chez les souris *Foxp3^{Cre} Rela^{lox}* et *Foxp3^{Cre} Relb^{lox}* du fait de leur inflammation systémique qui peut compliquer l'interprétation des données. Nous pourrions également stimuler *in vitro* des Tregs de souris sauvages avec du TNF et analyser, par microscopie à fluorescence ou par la technique de retard sur gel (EMSA pour *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), l'activation des différentes sous-unités de NF-κB.

Ainsi, l'utilisation d'anticorps ciblant le TNFR2 permettrait de moduler spécifiquement l'activité des Tregs via l'activation ou l'inhibition de NF-κB. Ceci permettrait d'avoir une action la plus efficace possible tout en limitant les effets secondaires. On pourrait donc utiliser des agonistes du TNFR2 pour stimuler les Tregs dans le cas de MAI et des antagonistes pour les traitements anti-cancéreux. Dans ce dernier cas, cela permettrait d'éliminer préférentiellement les effets délétères du TNFα sur les Tregs tout en conservant les effets anti-tumoraux, qui passent notamment par une stimulation des lymphocytes T CD8 effecteurs via le TNFR1 (Chopra *et al.*, 2013). Par ailleurs, si l'effet souhaité de l'anti-TNFR2 utilisé n'est que partiel, on pourrait combiner son injection (i) à celle de faibles doses d'IL-2 dans le cas des maladies auto-immunes ou de greffes ou (ii) à celle d'anticorps déjà utilisées en thérapie anti-cancéreuse, tel que l'anti-PD1, afin d'en potentialiser les effets.

Notre équipe étudie actuellement le rôle d'autres récepteurs de la famille du TNFR sur les Tregs et analysera si les effets observés passe ou non par une activation de NF-κB, potentialisant le nombre de cibles envisageables pour moduler l'activité des Tregs.

ANNEXES

Annexe 1 : Article Pouchy C. *et al.*, en préparation

Au cours de ma thèse, j'ai participé à un autre projet scientifique ayant pour but l'étude du rôle de la voie de signalisation TNF α /TNFR2 dans les Tregs au cours de l'EAE, un modèle murin de la sclérose en plaques.

Il est bien établi que les anticorps anti-TNF α ont un effet bénéfique dans le traitement de différentes maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et la maladie de Crohn. En revanche, de nombreuses études mettent en évidence un effet délétère de ceux-ci dans la sclérose en plaques. Ces observations suggèrent un rôle régulateur de cette cytokine qui pourrait passer par une stimulation des Tregs, cellules ayant un rôle important dans ces pathologies. En effet, notre équipe ainsi que celle d'Oppenheim ont mis en évidence la capacité du TNF α a augmenté la prolifération et la capacité suppressive des Tregs en se fixant sur le TNFR2, récepteur préférentiellement exprimé par ces cellules. Ainsi, l'équipe a confirmé l'aggravation de l'EAE à la suite d'injection d'un anticorps anti-TNF α , associée à une diminution de la proportion et de la prolifération des Tregs dans le SNC, et a observé le même phénomène en utilisant un anticorps bloquant le TNFR2. Afin de préciser le mécanisme, des souris présentant une déficience spécifique du TNFR2 sur les Tregs ont été utilisées. Ces souris ont développé une maladie plus sévère que les souris contrôles et qui était associée à une diminution de la proportion et de l'activation des Tregs dans le SNC. Des expériences de transfert adoptif suggèrent un rôle spécifique du TNF α sur les Tregs dans cet organe.

Ma contribution au sein de ce projet a été d'apporter une aide technique ponctuelle à mon ancienne collègue Mme Pouchy lorsqu'elle était encore présente au laboratoire et, suite à son départ, de réaliser les expériences nécessaires à la description plus précise du mécanisme mis en jeu ici. Cependant, du fait de problèmes de dérives génétiques de la lignée, ces dernières expériences ne sont pas exploitables et ne figurent donc pas dans la version actuelle du papier. Je vais m'atteler à les réitérer sur les prochains mois.

Regulatory T cells control central nervous system autoimmunity through the TNF/TNFR2 pathway

Charlotte Pouchy, Emilie Ronin, Sylvie Grégoire, David Sleurs, Gaëlle Martin, Noémie Chanson, Gilles Marodon, Yenkel Grinberg-Bleyer* and Benoit L Salomon* .

* co-senior authors.

Abstract

Anti-TNF therapy has improved medical care of many autoimmune diseases. However, these treatments may paradoxically initiate signs of multiple sclerosis (MS) and are formally contra-indicated in MS patients because of risk of disease exacerbation. Here we bring a mechanistic explanation to this long-term unresolved clinical conundrum. Anti-TNF drugs exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a murine model of MS, replicating the observation in patients. Strikingly, mice with conditional deletion of TNF receptor type 2 (TNFR2) in Treg cells were highly sensitive to EAE, and displayed altered Treg numbers and phenotype in the inflamed central nervous system (CNS). Cell transfer experiments suggested a CNS-restricted effect of TNF- α on Treg cells. Thus, TNF- α directly stimulates the expansion and activation of Treg cells in the inflamed central nervous system during EAE to control the disease, which may explain some of the adverse effects of anti-TNF therapy.

INTRODUCTION

The inflammatory properties of TNF- α have been extensively studied and are well recognized. This cytokine plays a central role in inflammation and has detrimental effects on several autoimmune diseases¹. Anti-TNF therapies have significantly improved the treatment of rheumatoid arthritis, Crohn disease, psoriasis and other inflammatory diseases. However, several unexplained observations limit the utilization of these drugs. Some patients develop paradoxical aggravation of their autoimmunity or a new form of demyelinating disease at a prevalence of 0.075%^{2,3}. Also, these therapies are formally contra-indicated in multiple sclerosis (MS) patients because of disease exacerbation^{4,5}. The mechanism of this long-term conundrum, well known to clinicians, remains essentially unexplained.

Aggravation of autoimmune diseases upon anti-TNF therapy reveals an immuno-regulatory facet of TNF- α . This is further supported by mouse data, as TNF-deficient mice exhibit increased Th1 immune responses⁶ and TNF- α administration inhibits lupus, type 1 diabetes and T-cell immune responses⁷. Several mechanisms have been proposed to explain the immunosuppressive properties of TNF- α . The cytokine may promote tolerogenic innate cells, such as myeloid-derived stem cells or semi-mature dendritic cells⁸⁻¹⁰ or down-modulate inflammatory cytokine production by myeloid cells¹¹. TNF- α may also kill or inhibit the activation of conventional T-cells (Tconv cells)^{7,12}. Alternatively, the immuno-regulatory property of TNF- α may be due to its effects on Treg cells that play a central role in the control of autoimmune diseases¹³. Indeed, our group and others reported that TNF- α increased the proliferation and suppressive function of Treg cells by signaling through its type 2 receptor (TNFR2)¹⁴⁻¹⁶. Here, we tested whether MS aggravation by anti-TNF therapy could be explained by an effect of the cytokine on Treg cells, using the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mouse disease model. We first validated the model by showing that anti-TNF treatment indeed induced EAE exacerbation. Then, we showed that TNF- α directly stimulated the accumulation and activation of Treg cells in the inflamed central nervous system (CNS) to control the disease.

RESULTS

Anti-TNF treatment induces EAE exacerbation and limits Treg cell expansion in the CNS

We first assessed whether MS exacerbation following anti-TNF therapy could be recapitulated in the EAE mouse model. Mice were treated with an anti-TNF mAb from day 10, when they developed the first neurological signs, up to day 20. Compared to isotype-control treated mice, they developed an aggravated form of EAE after day 20 leading to death in 35% of the mice (**Fig. 1a**). Similar findings were obtained when the treatment was extended up to day 30, or when using a clinically-approved soluble TNF receptor (**Fig. 1b** and **Supplementary Fig. 1**). We then analysed Treg cells in the inflamed CNS. In control mice, the proportion of Treg cells was 15% of CD4⁺ T-cells at the beginning of CNS infiltration (day 7), and rapidly reached 40-50% after the peak of disease (day 20) (**Supplementary Fig. 2**). This high Treg cell proportion was likely due to their earlier and higher proliferation compared to Tconv cells (**Supplementary Fig. 2**). In anti-TNF treated mice, Treg cell accumulation and proliferation were decreased at late time points in the CNS, but unchanged in LN draining the site of immunization (dLN), thereby suggesting a CNS-restricted role of TNF- α (**Fig. 1c-e**). Because TNF- α stimulates Treg cell proliferation through its interaction with TNFR2 rather than TNFR1¹⁴, we analysed expression of this receptor. TNFR2 was higher expressed on Treg than Tconv cells at steady state and in the dLN and the inflamed CNS after EAE induction (**Fig. 1f**). As with anti-TNF, blocking TNFR2 induced EAE worsening (**Fig. 1g**). Together, blocking TNF/TNFR2 after disease onset induced EAE exacerbation, reminiscent of the human situation, which was associated with reduced Treg cell accumulation in the inflamed CNS.

TNFR2 expression by hematopoietic cells is required to limit EAE severity and promotes Treg cell intrinsic expansion

To further study the role of the TNF/TNFR2 pathway in EAE, we performed experiments with mice deficient in *Tnfr2* (*Tnfr2*^{-/-}). As previously observed¹⁷⁻¹⁹, *Tnfr2*^{-/-} mice that have a significant defect of Treg cells in the spleen (**Supplementary Fig. 3**), developed more severe EAE than WT controls (**Fig. 2a,b**). This was associated with reduced Treg cell accumulation in the inflamed CNS at day 10-15 (**Fig. 2c**). We next generated bone marrow chimeric mice to assess the role of TNFR2 expression by hematopoietic and non-hematopoietic cells. In WT mice reconstituted with TNFR2-deficient hematopoietic cells, EAE was more severe and Treg

cell expansion in the CNS was reduced when compared to mice reconstituted with WT hematopoietic cells (**Fig. 2d-f**). In contrast, EAE severity was similar in *Tnfr2*^{-/-} and WT recipients reconstituted with WT hematopoietic cells (**Fig. 2g,h**). To evaluate the intrinsic role of TNFR2 expression by Treg cells, we reconstituted WT animals with a mix of bone marrow cells from WT and *Tnfr2*^{-/-} mice (**Fig. 2i**). After EAE induction, the expansion of TNFR2-deficient Treg cells was highly reduced in the CNS compared to TNFR2-sufficient Treg cells (**Fig. 2j,k**). In conclusion, aggravation of EAE in *Tnfr2*^{-/-} mice was due to lack of TNFR2 expression by hematopoietic cells, which was associated with a cell intrinsic deficit of TNFR2-deficient Treg cell expansion in the CNS.

TNFR2 is dispensable in Treg cell biology at steady state

To further analyse the intrinsic role of TNFR2 in Treg cell biology, we generated mice with a conditional ablation of TNFR2 in Treg cells by crossing mice expressing CRE-recombinase in Treg cells (*Foxp3*^{Cre}) with mice expressing a floxed *Tnfr2* allele (*Tnfr2*^{fl/fl}). Specific ablation of TNFR2 in Treg cells was confirmed by flow cytometry (**Fig. 3a,b**). These mice had no sign of spontaneous autoimmunity, their weight growth and litter size were normal (**Supplementary Fig. 4**) and transmission of mutated alleles followed Mendel's law. In the steady state, Treg cell numbers and Foxp3 expression in lymphoid tissues were similar in *Foxp3*^{Cre}*Tnfr2*^{fl/fl} mice compared to controls (**Fig. 3c,d**). Their *in vitro* suppressive capacity was slightly reduced. Moreover, in an *in vivo* suppression assay, TNFR2-deficient Treg cells were partially but not fully functional to prevent colitis (**Fig. 3e,f**). Finally, we utilized *Foxp3*^{Cre/wt} heterozygote female mice, in which only roughly half of Treg cells carry a functional CRE recombinase because of its localization on the X chromosome, to assess the role of TNFR2 in mature Treg cells in a competitive environment. In *Foxp3*^{Cre/wt}*Tnfr2*^{wt} control mice, CRE-expressing cells represented 50% of Treg cells as expected, whereas in *Foxp3*^{Cre/wt}*Tnfr2*^{fl/fl} mice they represented only 30-35% of Treg cells (**Fig. 3g**). Interestingly, this Treg cell unbalance was observed in 8 week-old but not 10 day-old mice. In conclusion, TNFR2 is mainly dispensable for Treg cell homeostasis and impacts partially on their suppressive function at steady state. .

Intrinsic expression of TNFR2 by Treg cells is required to maintain their proper activation in the CNS and control EAE

We then explored the intrinsic role of the TNF/TNFR2 signalling in Treg cells during CNS inflammation. Strikingly, compared to their WT littermates, *Foxp3*^{Cre}*Tnfr2*^{fl/fl} mice developed

a very severe EAE leading to death in half of the mice by day 15 (**Fig. 4a**). Remarkably, Treg cell proportions were significantly reduced in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice compared to controls in the CNS at day 10 (**Fig. 4b**). Also, CNS Treg cells of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice expressed lower levels of CTLA4, ICOS and Blimp-1 (**Fig. 4b**), which are markers of activation and effector Treg cells²⁰⁻²². These quantitative and phenotypic Treg cell alterations, observed in the CNS, were not present in the spleen or dLN (**Fig. 4b**). The expression of active effector caspase 3 and Ki67⁺ cells among Treg cells was similar in the 2 groups of mice (**Supplementary Fig. 5**). Intriguingly, the reduced proportions of Treg cells were not yet observed at day 7, when the first immune cells started infiltrating the CNS, and were abolished at day 15, when *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice were very sick (**Supplementary Fig. 6**). Thus, *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice that developed a severe EAE had a specific alteration of the numbers and activated phenotype of Treg cells in the CNS at day 10.

We then assessed the impact of this Treg cell deficit on pathogenic Th1 and Th17 cells²³ and on GM-CSF, the major pathogenic cytokine in the EAE²⁴. We performed the analysis in the CNS at day 15, when *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice exhibited severe disease compared to controls. We could not find reproducible differences in the numbers of Tconv cells (**Supplementary Fig. 7**) or of their production of IFN γ , IL-17 or GM-CSF at single or polyfunctional levels (**Fig. 4c,d**). Also, the expression levels of the master transcription factors of Th1 and Th17, Tbet and ROR γ t, were similar in the 2 groups of mice (**Fig. 4e**). Finally, we analyzed the proportions of the various myeloid cell populations (defined in **Supplementary Fig. 8**) in the CNS at day 15. They were similar in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and control mice (**Supplementary Fig. 9**). In conclusion, TNFR2 expression by Treg cells is critical in the control of EAE and plays a non-redundant role on their expansion and proper activation in the inflamed CNS at day 10.

Expression of TNFR2 by Treg cells is critical to control the autoimmune process in the CNS rather than in lymphoid tissues.

In the course of active EAE, the disease is initiated in dLN. Then, from day 5-6, pathogenic T-cells start migrating to the CNS, leading to a progressive increase of inflammation and accumulation of infiltrating immune cells (**Supplementary Fig. 7**), perpetuating locally the disease process²⁵. We performed experiments to assess whether TNFR2-expressing Treg cells control EAE by limiting the priming of pathogenic T-cells in dLN or by regulating the disease in the inflamed CNS. To quantify early T-cell priming, we transferred T-cell receptor-transgenic Tconv cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅ peptide in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and control mice, immunized the mice as for EAE induction, and

measured proliferation of donor cells in dLN 3 days later. The level of T-cell proliferation was similar in the 2 groups of mice (**Fig. 5a**). To assess more directly the pathogenicity of MOG-specific T-cells primed in dLN, we measured their capacity to induce EAE after adoptive transfer in naive mice. Remarkably, cells primed in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and control mice induced similar passive EAE (**Fig. 5b**). Then, to measure the control of EAE by TNFR2-expressing Treg cells within the inflamed CNS, we transferred WT pathogenic T-cells into *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and control naive mice since injected cells rapidly migrated into the CNS to damage the neural tissue during passive EAE. Strikingly, EAE was much more severe in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* than control recipients (**Fig. 5c**). We obtained similar findings when we transferred pathogenic T-cells in WT recipients that were treated with an anti-TNF blocking mAb (**Fig. 5d**). In conclusion, TNFR2 expression by Treg cells appears to be critical to control EAE within the inflamed CNS rather than limiting the priming of pathogenic T-cells in dLN.

DISCUSSION

A series of pre-clinical studies in mice conducted in the 90s concluded that blocking TNF was beneficial in EAE (reviewed in²⁶). These findings led to initiate 2 clinical trials in MS patients that had to be rapidly stopped because of disease aggravation^{4,5}. Here, we revisited this question in mice with better-defined reagents and found that blocking TNF- α induced EAE exacerbation, as in MS patients. The discrepancy between our results and previous studies has 2 explanations: spectre of action and the timing of injection. In early experiments, the drugs blocked both TNF- α and lymphotoxin- α , which is pathogenic in EAE²⁷. Here, we used a mAb that blocked only TNF- α . In some early experiments, anti-TNF drugs were administered at disease induction. When we performed similar timing, EAE was not exacerbated, and even slightly delayed (**Supplementary Fig. 10**). At disease initiation, TNF- α is likely pathogenic by activating antigen-presenting cells via TNFR1, whereas TNF- α would regulate the disease by activating Treg cells via TNFR2 later in the inflamed CNS. In this line, blocking TNFR1 at disease induction attenuated EAE²⁸, whereas we showed that blocking TNFR2 at day 10 induced disease exacerbation. Thus, aggravation of MS by anti-TNF drugs was recapitulated in the EAE mouse model as long as relevant reagents and timing are used.

It has been proposed that aggravated EAE in *Tnfr2*^{-/-} mice, which was previously described¹⁷⁻¹⁹, was due to the absence of TNFR2 on oligodendrocytes since TNF α promotes proliferation of their progenitors via TNFR2²⁹, or to a direct killing of autoreactive pathogenic Tconv cells by TNF α via TNFR2¹². Our results clearly exclude these 2 hypotheses.

Different results concur to strongly suggest that the control of EAE by TNFR2-expressing Treg cells is taking place in the inflamed CNS rather than in the dLN. (i) Treg cell proportions and phenotypes (CTLA4, ICOS, Blimp-1) were altered in the CNS but not in the dLN of *Foxp3*^{Cre}*Tnfr2*^{fl/fl} mice compared to controls. (ii) Anti-TNF treatment induced EAE aggravation when administered after day 10 but not at disease induction. Also, clinical scores were similar in *Foxp3*^{Cre}*Tnfr2*^{fl/fl} and control mice before day 13-14. These latter two findings suggest that the early autoimmune process that was initiated in dLN was not altered by the absence of TNFR2 in Treg cells, which was confirmed by showing that the priming of MOG-specific T-cells in dLN was similar in *Foxp3*^{Cre}*Tnfr2*^{fl/fl} and control mice as well as their capacity to induce passive EAE. (iii) Finally, after transfer of pathogenic T-cells in passive EAE, the disease was much more severe in *Foxp3*^{Cre}*Tnfr2*^{fl/fl} than in control recipients. These findings suggest that TNFR2-expressing Treg cells controlled the disease in the CNS since

donor cells rapidly migrate to this tissue after transfer. Our work brings the first evidence that the control of EAE by Treg cells is at least partially regulated in the inflamed CNS.

Our work reveals a non-redundant and critical role of TNF- α acting on Treg cells in the control of EAE. Quite remarkably, the quantitative and phenotypic alteration of Treg cells in the CNS of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice was observed at day 10 after disease induction but not at day 7 or day 15, pinpointing that TNFR2 expression by Treg cells is critical for disease control at this precise time-period in the CNS. This may be due to a boost of TNF- α or a high reactivity of Treg cells to the cytokine at this specific time. Alternatively, the defect of Treg cells in the CNS of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice at day 10 may trigger the release of other inflammatory factors, able to boost Treg cell expansion and activation, which led to catch up and compensate their defect at day 15. But this late Treg cell boost was inefficient to control the disease maybe because of irreversible tissue damage.

Several mechanisms may be responsible for the reduced numbers of Treg cells in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice at day 10 in the CNS. (i) Decreased proliferation. Our group and the one of Oppenheim showed that TNF- α triggered Treg cell proliferation and expansion via TNFR2^{14,16}. This seems unlikely since proportion of Ki67 among Treg cells was not reduced. However, one cannot exclude a transient decrease of Treg cell proliferation, not detectable with the Ki67 marker that is expressed not only during the S phase but also during the G1 and G2 phases of the cellular cycle. (ii) Increased cell death. We did not find evidence of increased cell death using an active caspase 3 marker. However, it is possible that dying cells would be very rapidly phagocytosed by myeloid cells that represented over 50% of the leukocytes, precluding their proper detection. (iii) Decreased stability. It was shown that TNFR2 was critical for maintaining stability and Foxp3 expression of Treg cells in the inflammatory environment of colitis³⁰. We did not see any decrease in the intensity of Foxp3 expression in Treg cells in the CNS at day 10 (**Supplementary Fig. 11**). However, it cannot be formally excluded that some TNFR2-deficient Treg cells would rapidly and entirely lose Foxp3 expression. (iv) Finally, reduced Treg cell numbers might be due to a defect of migration into the CNS, which was unlikely since their numbers were comparable to controls at day 7, or alternatively to an increased exclusion from the CNS at day 10.

In addition to be present in reduced numbers, Treg cells of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice at day 10 in the CNS had an altered phenotype with lower expression of CTLA4, ICOS and Blimp-1. This may impact on their suppressive activity since CTLA4 is one of the major mechanisms of Treg-mediated suppression and ICOS and Blimp-1 expression are critical to promote IL-10 production²⁰⁻²². It has been shown that these 3 molecules are up-regulated in Treg cells by T-

cell activation and inflammatory cytokines, such as IL-2 or IL-6^{21,22}, but the effect of TNF α has not been described. In conclusion, the role of TNFR2 expressed by Treg cells in the control of EAE is likely due to its capacity to promote their expansion and/or to increase their suppressive activity in the inflamed CNS.

We were not able to determine which pathogenic cells or molecules were increased in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice to explain their exacerbated EAE. Since GM-CSF is now considered as the major pathogenic cytokine in the disease²⁴, it will be important in the future to refine our analyses of myeloid cells to assess their capacity to produce molecules that are highly pathogenic for oligodendrocytes and neurones, such as reactive-oxygen species or IL-1.

It is increasingly clear that Treg cells are functionally heterogeneous. Various Treg cell populations acquire different biological properties under the influence of environment cues. At steady state, homeostasis of central Treg cells present in lymphoid tissues depends on IL-2³¹. We show here that TNF- α has no role at steady state, except in the non-physiological context of competition between TNFR2-sufficient and deficient cells after weaning. Recent findings emphasized the critical role of IL-33 in the accumulation of Treg cells residing in the intestine and the adipose tissues³²⁻³⁴. Factors responsible for the high Treg cell accumulation in the inflamed CNS have not been described. Here, we reveal a non-redundant function of TNF- α in this phenomenon. Thus, depending on the tissue and type of inflammation, Treg cells may rely on different environment cues (IL-33, TNF- α) for their homeostasis and function. This may partly explain why anti-TNF therapy would be beneficial in some autoimmune diseases and detrimental in others. We found that TNFR2-deficient Treg cells were partially able to control colitis. It would be interesting to test their role in arthritis or psoriasis as well because of the utilisation of anti-TNF therapy in these diseases. Our data indicate that the TNF/TNFR2 pathway is critical to reach an optimal Treg cell function and accumulation in the CNS during EAE, which is essential to control the disease. These results bring new insights in Treg cell biology, provide an explanation for the failure of anti-TNF therapy in MS patients and may provide new tools to treat autoimmune diseases.

METHODS

Mice. C57BL/6J (WT) mice were purchased from Janvier Labs (France). *Tnf^{ε/ε}* and *Tnfrsf1b^{-/-}* (*Tnfr2^{-/-}*) mice and 2D2 T cell receptor transgenic mice, specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein, were purchased from the Jackson Laboratory. B6-Cd3e^{tm1Mal} (*Cd3^{-/-}*) and *RAG2^{-/-}* mice were provided by Cryopreservation, Distribution, Typing and animal Archiving department (Orléans, France). Foxp3-IRES-GFP knock-in (*Foxp3^{GFP}*) mice were kindly provided by Pr. Bernard Malissen. Foxp3-CRE-IRES-YFP (*Foxp3^{Cre}*) mice were a gift from Pr. Alexander Rudensky. *Tnfrsf1b*-floxed (*Tnfr2^{fl/fl}*) mice were obtained from the EMMA consortium. 2D2 and Foxp3^{GFP} mice were crossed with CD90.1 congenic animals. All mice were on a C57Bl/6 background. Mice were housed under specific pathogen-free conditions and were studied at 7–14 weeks of age. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with European Union guidelines.

Reagents. Anti-TNF- α (XT3-11) and Anti-TNFR2 (TR75-54.7) were purchased from BioXCell and were injected at a dose of 500ug by intraperitoneal route every two days for 8 days. Etanercept was provided by Wyeth and was administered at a dose of 1mg by intraperitoneal route every two days for 8 days.

EAE induction. For active EAE, mice were injected subcutaneously in the flanks with 100 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Polypeptide) emulsified in 100 μ l of CFA (Sigma-Aldrich) supplemented with 50 μ g of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (BD Biosciences). Animals were additionally injected intravenously with 200 ng of *Bordetella pertussis* toxin (Enzo) at the time of, and two days following immunization. For the passive EAE model, we first induced active EAE in donor mice as described above to generate pathogenic cells. 10 days post-immunization, cells from spleen and dLN were cultured in RPMI (Gibbco) at 5 x 10⁶ cells/ml with 20 μ g/ml of MOG₃₅₋₅₅ peptide, 10 μ g/ml of anti-IFN γ (XMG1.2, BioXCell) and 5 ng/ml of IL-23 (R&D Systems). After 3 days, cells were harvested and dead cells eliminated with a Ficoll gradient, then 2 x 10⁶ cells were injected intravenously to recipient mice, leading to passive EAE. The clinical evaluation was performed on a daily bases by a 6-point scale ranging: 0, no clinical sign; 1, limp tail; 2, limp tail, impaired righting reflex, and paresis of one limb; 3, hindlimb paralysis; 4, hindlimb and forelimb paralysis; 5, moribund/death. A score of 5 was permanently attributed to dead animals.

Preparation of cell suspensions. For isolation of CNS-infiltrating leukocytes, mice were anesthetized with a Ketamine (Merial) / Xylazine (Bayer) solution and perfused with 20 ml of cold PBS. Spinal cords were removed by intrathecal hydrostatic pressure. Brain and spinal cords were cut into small pieces and digested in DMEM (Gibbco) supplemented with 1 mg/ml collagenase type IV (Sigma) and 1 mg/ml DNase I (Sigma) for 30 min at 37°C followed by mechanical desegregation. Single cell suspensions were washed once, re-suspended in Percoll 40% and laid on a Percoll 80% solution. Mononuclear cells were prepared from the interface of the 40:80% Percoll gradient after centrifugation for 20 min at 2,000 rpm at room temperature and washed two times in a PBS-3% FCS buffer. Cells were isolated from spleen and LN by mechanical dilacerations.

Antibodies and flow cytometry analysis. The following mAbs from BD Biosciences were used: anti-CD45 (30-F11), anti-CD4 (RM4-5), anti-Foxp3 (MF23), anti-Ki-67 (SOLA15), anti-active caspase 3 (C92-605), anti-CD90.1 (OX-7), anti-CD90.2 (30-H12), anti-ICOS (17G9), anti-CTLA-4 (UC10-4B9), anti-Blimp1 (5E7), anti-TNFR2 (TR75-89), anti-Vβ11 (RR3-15), anti-IFN-γ (XMG1.2), anti-IL-17 (TC11-18H10), anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (HL3), anti-IA/E (M5/11.15.2), anti-Ly6C (AL-21), anti-Ly6G(1AB), anti-NKp46 (29A1.4), anti-F4/80 (BM8). Anti-CD25 (PC61), anti-T-bet (eBio4B10), anti-RORγt (q31-378), anti-GM-CSF (MP1-22E9) and anti-Foxp3 (FJK16s) were purchased from eBioscience, and Foxp3 staining was performed using the eBioscience kit and protocol. For intracellular cytokine staining, cells were re-stimulated with 1μg/ml PMA (Sigma) and 0.5μg/ml Ionomycin (Sigma) for 3 hours in the presence of 1μl/ml GolgiPlug (BD Biosciences). After cell surface staining, intracellular staining was performed using the Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set from eBioscience. Cells were acquired on a BD LSRII cytometer and analyzed using FlowJo software.

Bone marrow chimeras. Bone marrow cells were isolated from tibia and femur of donor mice. Recipient mice were lethally irradiated (10.5 Gray) and transplanted intravenously with 10×10^6 bone marrow cells.

Treg suppression assays. Cells were isolated from the spleen and LN of *Foxp3^{YFP-Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and *Foxp3^{Cre}* mice. Cell suspensions were obtained as described above and stained with an anti-CD4 antibody. CD4⁺YFP⁻ cells (Tconv) and CD4⁺YFP⁺ cells (Treg) were then sorted using a BD FACSAria II.

For the in vitro suppressive assay, purified Tconv were labeled with CellTrace Violet Proliferation Kit (Life technologies) and plated in 96-well plate at 2.5×10^4 cells/well with splenocytes from *Cd3^{-/-}* mice at 7.5×10^4 cells/well. Culture medium was supplemented with anti-CD3 (2C11) from BioXCell at 0.05 µg/ml. Purified Treg were then added at different ratios from 1:1 to 1:8. At day 3, CellTrace dilution was assessed by flow cytometry. For the colitis model, purified Tconv and Treg cells (1×10^5 cells) were injected intravenously into sex-matched *RAG2^{-/-}* mice. The clinical evaluation was performed twice a week by measuring body weight. 8 weeks after transfer, mice were sacrificed and colons were collected and fixed in PBS containing 4% formaldehyde. Five-micrometer paraffin-embedded sections were cut and stained with haematoxylin and eosin and then blindly analyzed.

T-cell priming evaluation. LN and spleen cells from 2D2 CD90.1 mice were stained with the following biotin-labeled antibodies: anti-CD19 (6D5), anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (N418), anti-CD8 (53-6.7) and anti-CD25 (7D4) and then were coated with anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec). After magnetic sorting, cells of the CD4⁺ enriched negative fraction were labeled with CellTrace Violet Proliferation Kit and were intravenously injected in naive mice (10^6 cells/mouse). The following day, mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide as for EAE induction. CellTrace dilution of CD4⁺ CD90.1⁺ Vβ11⁺ (T cell receptor transgene) cells was assessed by flow cytometry from brachial and inguinal LNs at day 3.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software. Statistical significance was determined using the two-tailed nonparametric Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Means \pm s.e.m. were used throughout the figures.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pr. Alexander Rudensky for providing us the *Foxp3^{Cre}* mice and Christelle Enond, Flora Issert, Olivier Bregerie and Bocar Kane for their expert care of the mouse colony. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENO-006-01), the Fondation Bettencourt Schueller and by the Association de la Recherche sur la Sclérose en Plaques.

REFERENCES

1. Ware, C.F. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* **23**, 787-819 (2005).
2. Bosch, X., Saiz, A., Ramos-Casals, M. & Group, B.S. Monoclonal antibody therapy-associated neurological disorders. *Nat Rev Neurol* **7**, 165-172 (2011).
3. Kodama, S., Davis, M. & Faustman, D.L. The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1850-1862 (2005).
4. Study-group. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* **53**, 457-465 (1999).
5. van Oosten, B.W., *et al.* Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* **47**, 1531-1534 (1996).
6. Zganiacz, A., *et al.* TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest* **113**, 401-413 (2004).
7. Cope, A.P., *et al.* Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. *J Exp Med* **185**, 1573-1584 (1997).
8. Zhao, X., *et al.* TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest* **122**, 4094-4104 (2012).
9. Sade-Feldman, M., *et al.* Tumor Necrosis Factor-alpha Blocks Differentiation and Enhances Suppressive Activity of Immature Myeloid Cells during Chronic Inflammation. *Immunity* **38**, 541-554 (2013).
10. Menges, M., *et al.* 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 (2002).
11. Notley, C.A., *et al.* Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* **205**, 2491-2497 (2008).
12. Ban, L., *et al.* Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13644-13649 (2008).

13. Josefowicz, S.Z., Lu, L.F. & Rudensky, A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* **30**, 531-564 (2012).
14. Chen, X., Baumel, M., Mannel, D.N., Howard, O.M. & Oppenheim, J.J. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol* **179**, 154-161 (2007).
15. Chen, X., *et al.* 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 (2008).
16. Grinberg-Bleyer, Y., *et al.* Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* **120**, 4558-4568 (2010).
17. Probert, L., *et al.* TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. *Brain* **123** (Pt 10), 2005-2019 (2000).
18. Suvannavejh, G.C., *et al.* Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* **205**, 24-33 (2000).
19. Tsakiri, N., Papadopoulos, D., Denis, M.C., Mitsikostas, D.D. & Kollias, G. TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3⁺ Treg-cell function and disease suppression in EAE. *Eur J Immunol* **42**, 403-412 (2012).
20. Wing, K., *et al.* CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271-275 (2008).
21. Cretney, E., *et al.* The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* **12**, 304-311 (2011).
22. Neumann, C., *et al.* Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers. *J Exp Med* **211**, 1807-1819 (2014).
23. Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A. & Goverman, J.M. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* **14**, 337-342 (2008).
24. Codarri, L., Greter, M. & Becher, B. Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease. *Trends Immunol* **34**, 114-119 (2013).
25. Bailey, S.L., Schreiner, B., McMahon, E.J. & Miller, S.D. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4⁺ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol* **8**, 172-180 (2007).

26. Dendrou, C.A., Bell, J.I. & Fugger, L. A clinical conundrum: the detrimental effect of TNF antagonists in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics* **14**, 1397-1404 (2013).
27. Suen, W.E., Bergman, C.M., Hjelmstrom, P. & Ruddle, N.H. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* **186**, 1233-1240 (1997).
28. Williams, S.K., *et al.* Antibody-mediated inhibition of TNFR1 attenuates disease in a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One* **9**, e90117 (2014).
29. Arnett, H.A., *et al.* TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* **4**, 1116-1122 (2001).
30. Chen, X., *et al.* TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol* **190**, 1076-1084 (2013).
31. Smigiel, K.S., *et al.* CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J Exp Med* **211**, 121-136 (2014).
32. Schiering, C., *et al.* The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* **513**, 564-568 (2014).
33. Kolodin, D., *et al.* Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cell Metab* **21**, 543-557 (2015).
34. Vasanthakumar, A., *et al.* The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol* **16**, 276-285 (2015).

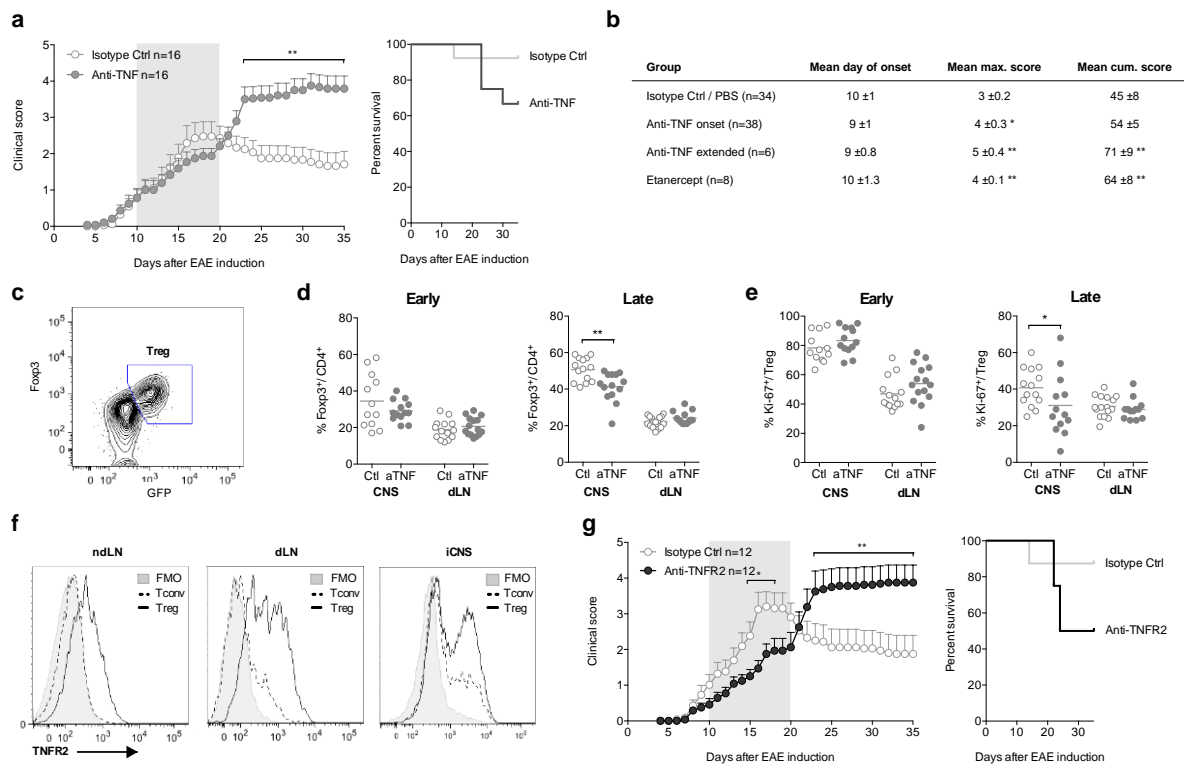


Figure 1. Anti-TNF treatment induces EAE exacerbation and limits Treg cell expansion in the CNS. (a) Clinical score of EAE and percent survival in mice immunized to induce EAE at day 0 and treated with anti-TNF or isotype control mAbs at day 10-18. Mean \pm SEM from 3 independent experiments. (b) Mean day of EAE onset \pm SEM, mean of maximum EAE score \pm SEM and mean of cumulative EAE score \pm SEM in mice immunized to induce EAE at day 0 and then treated with isotype control mAb or PBS at day 10-18 or with anti-TNF mAb at disease onset for 8 days (onset) or 18 days (extended) or with etanercept at disease onset for 8 days. Proportions of Treg cells among CD4⁺ cells (d), determined as in (c), and of Ki67⁺ among Treg cells (e) were measured at day 15-19 (early) or day 29-45 (late) in the CNS and dLN of *Foxp3*^{GFP} mice immunized to induce EAE and treated at day 10-18 with anti-TNF (a-TNF) mAb or isotype control mAbs or PBS (Ctrl). Each dot represents a mouse, collected from 5 independent experiments. (f) Representative TNFR2 expression in Tconv (CD4⁺Foxp3⁻) and Treg cells in non-draining LN (ndLN), dLN and CNS at day 15 after EAE induction. Control staining is the fluorescence minus one (FMO). (g) Clinical score of EAE and percent survival in mice immunized to induce EAE at day 0 and treated with anti-TNFR2 or isotype control mAbs at day 10-18. Mean \pm SEM from 2 independent experiments. * $p > 0.05$, ** $p > 0.01$, two-way unpaired Mann-Whitney test.

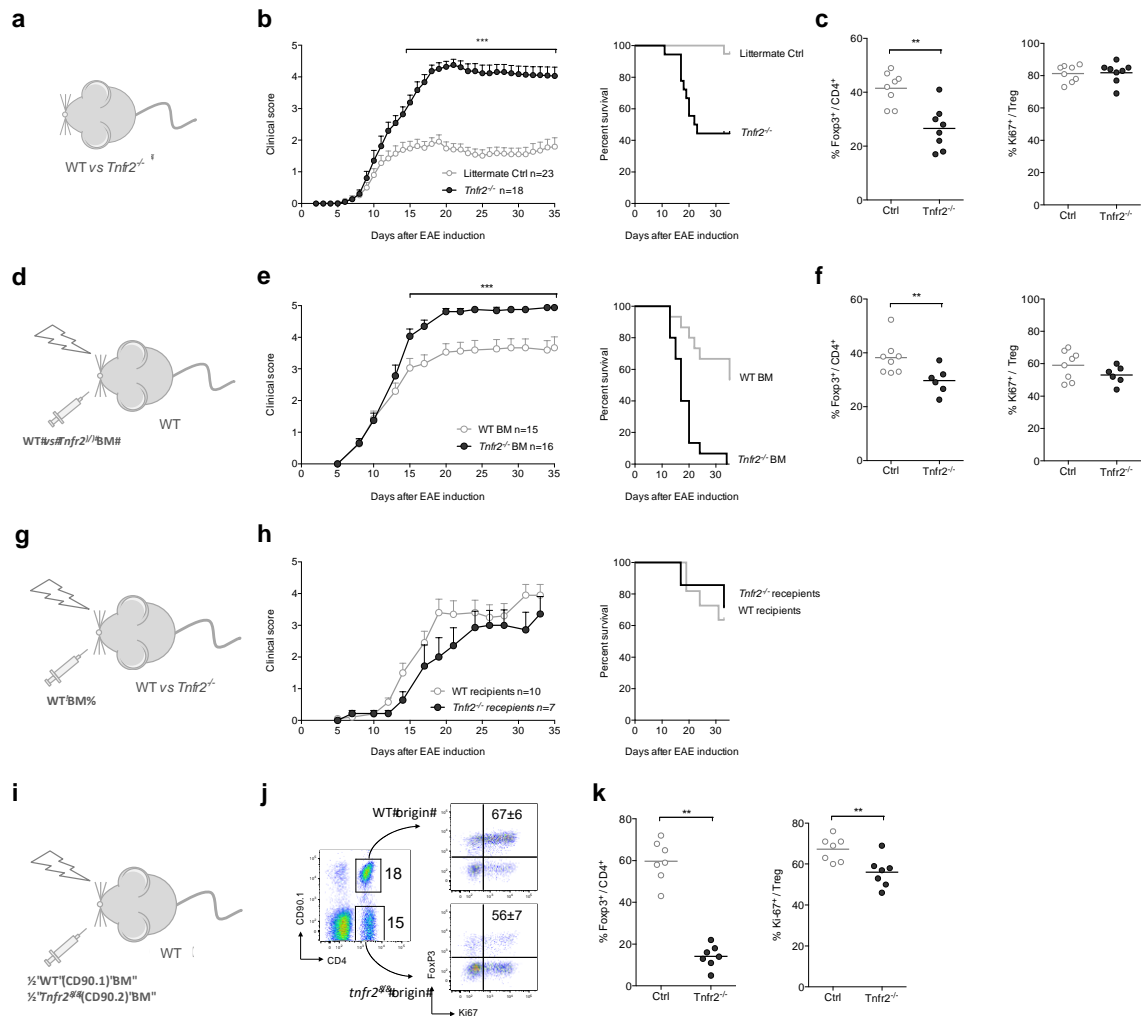


Figure 2. Mice with TNFR2-deficient hematopoietic cells develop severe EAE and cell intrinsic role of TNFR2 in Treg cell homeostasis in the CNS. (a-c) Mean clinical score of EAE \pm SEM and percent survival (b) and proportions of Treg cells and Ki67⁺ among Treg cells in the CNS at day 10-15 (c) in $Tnfr2^{-/-}$ and WT littermate control mice (a) immunized to induce EAE. (d-f) Mean clinical score of EAE \pm SEM and percent survival (e) and proportions of Treg cells and Ki67⁺ among Treg cells in the CNS at day 16-19 (f) in WT recipients reconstituted with $Tnfr2^{-/-}$ or WT bone marrow cells (d) and immunized to induce EAE. (g,h) Mean clinical score of EAE \pm SEM and percent survival (h) in $Tnfr2^{-/-}$ or WT recipients reconstituted with $Tnfr2^{-/-}$ or WT bone marrow cells (g) and immunized to induce EAE. (i-k) Proportions of Treg cells within cells of the WT and $Tnfr2^{-/-}$ origin and of Ki67⁺ cells among Treg cells within cells of the WT and $Tnfr2^{-/-}$ origin was determined in the CNS at day 20 (k), as shown in (j), in WT recipients reconstituted with 1:1 ratio of a mix of $Tnfr2^{-/-}$ CD90.2⁺ and WT CD90.1⁺ bone marrow cells (i). Data were collected from 4 (b, c) or 2 (e, f, h, j, k) independent experiments. ** $p > 0.01$, *** $p > 0.001$, two-way unpaired Mann-Whitney test.

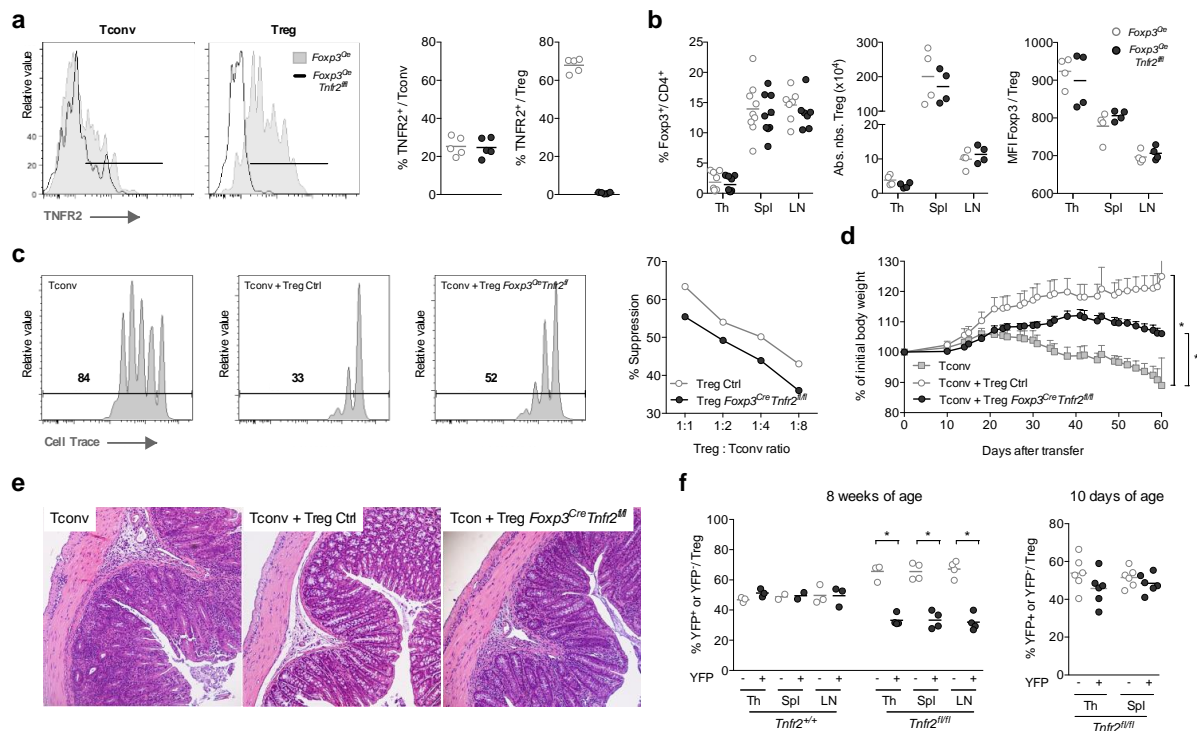


Figure 3. TNFR2 is dispensable in Treg cell biology at steady state. (a) TNFR2 expression in resting $CD4^+$ cells and in *in vitro* activated Treg and Tconv cells of $Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}$ and $Foxp3^{Cre}$ control mice. (b) Proportion of $Foxp3^+$ cells among $CD4^+$ cells, absolute numbers of Treg cells and MFI of Foxp3 expression among Treg cells of $Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}$ and $Foxp3^{Cre}$ control mice in the thymus (Th), spleen (Spl) and LN. Each dot represents a mouse, collected from 5 independent experiments. (c) *In vitro* suppressive activity of Treg cells from $Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}$ and $Foxp3^{Cre}$ control mice. Representative data at a 1:2 (left) and different (right) Treg:Tconv ratios of 3 independent experiments. (d,e) *In vivo* suppressive activity of Treg cells from $Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}$ and $Foxp3^{Cre}$ control mice, determined in a colitis model. Percentage of initial body weight pooled from 2 independent experiments (n=6) (d) and representative histology of the colon (e). (f) Percentage of CRE/YFP⁺ (+, ○) and CRE/YFP⁻ (-, ●) cells among Treg cells of 8-week and 10-day old $Foxp3^{Cre/+}Tnfr2^{fl/fl}$ and $Foxp3^{Cre/+}Tnfr2^{+/+}$ females in the thymus (Th), spleen (Spl) and LN. Each dot represents a mouse, collected from 2 independent experiments.

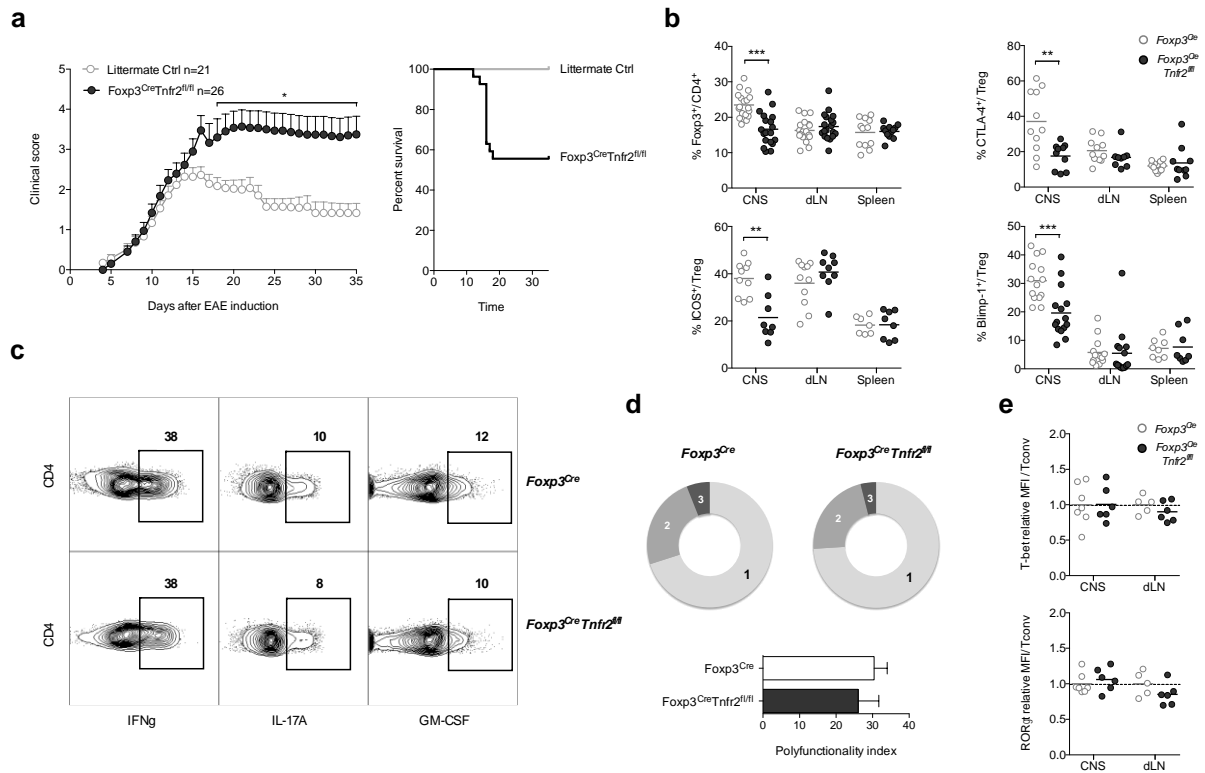


Figure 4. Control of EAE by Treg cells depends on their expression of TNFR2, which impacts on their numbers and effector phenotype in the inflamed CNS. (a) Mean clinical score of EAE \pm SEM and percent survival of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and *Foxp3^{Cre}* mice immunized to induce EAE. (b) Proportions of Treg cells among CD4⁺ T cells and of CTLA4, ICOS and Blimp-1 in the CNS, dLN and spleen at day 10 of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and *Foxp3^{Cre}* mice immunized to induce EAE. Each dot represents a mouse, collected from 4 independent experiments. (c,d) Representative expression of IFN γ , IL-17A and GM-CSF (c), proportion of cells co-expressing 1, 2 or 3 of these cytokines and polyfunctionality index (% cells expressing 3 cytokines) (d) among CD4⁺*Foxp3⁻* cells at day 15 in the CNS of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and *Foxp3^{Cre}* mice immunized to induce EAE. Data are from 2 independent experiments (n=6). (e) Relative mean fluorescence intensity (MFI) of ROR γ t and Tbet among CD4⁺*Foxp3⁻* cells at day 15 in the CNS of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and *Foxp3^{Cre}* mice immunized to induce EAE. The values correspond to each MFI divided by the mean MFI of *Foxp3^{Cre}* mice. Each dot represents a mouse, collected from 2 independent experiments. * $p > 0.05$, ** $p > 0.01$, *** $p > 0.001$, two-way unpaired Mann-Whitney test.

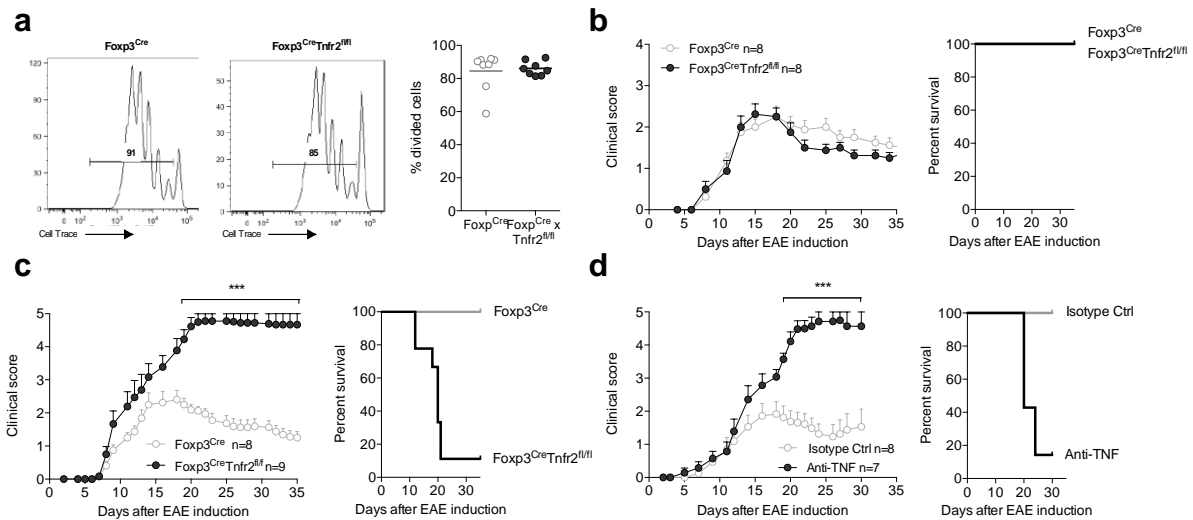
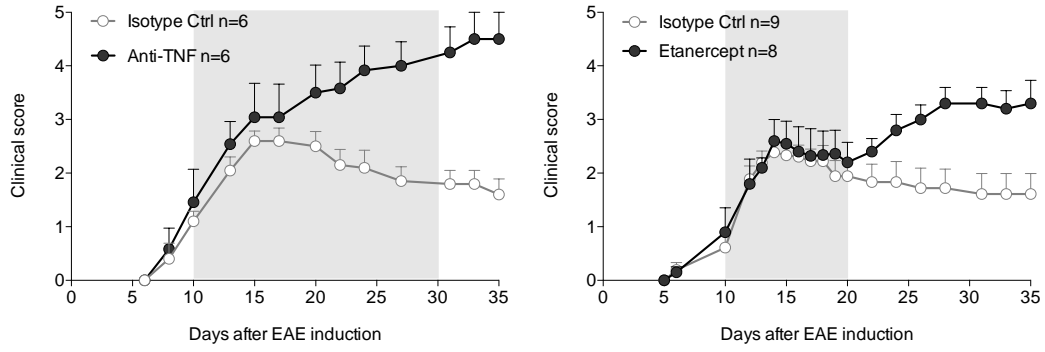
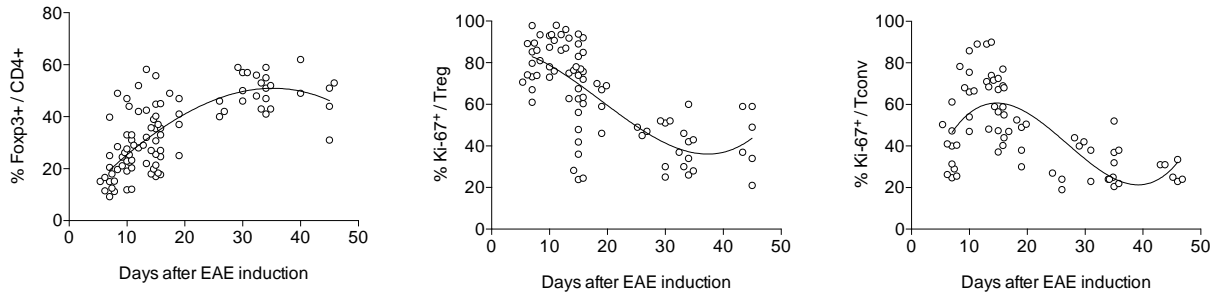


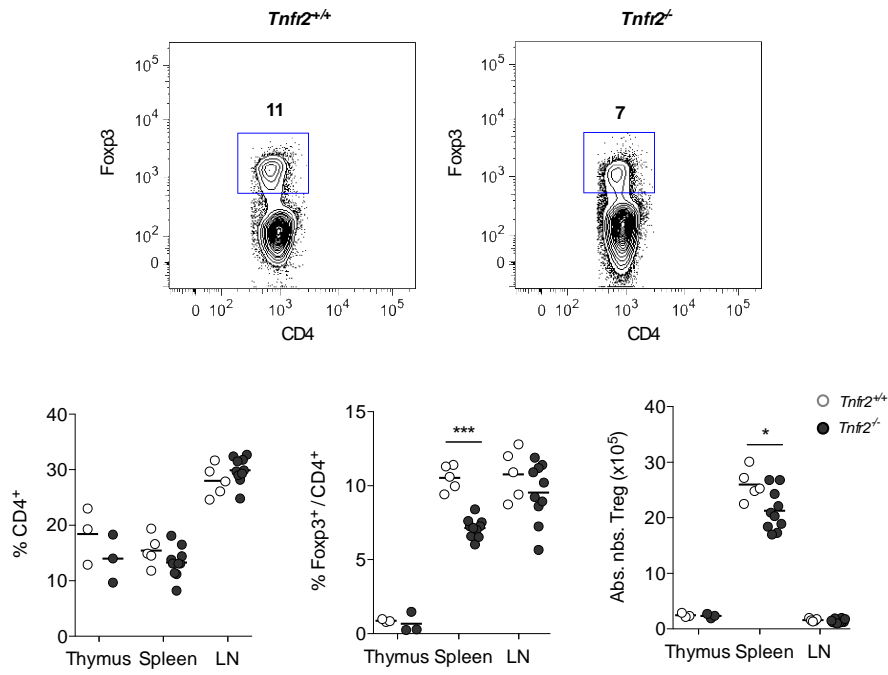
Figure 5. Expression of TNFR2 by Treg cells is critical to control EAE in the CNS. (a) Representative division profile (left) and cumulative percentages of divided cells (right) of T cell receptor transgenic myelin oligodendrocyte glycoprotein reactive Tconv cells 3 days after their transfer in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* and *Foxp3^{Cre}* mice immunized to induce EAE. **(b)** Mean clinical score of passive EAE \pm SEM and percent survival in WT recipients transferred with pathogenic cells obtained from dLN of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* or *Foxp3^{Cre}* mice immunized 10 earlier to induce EAE. **(c)** Mean clinical score of passive EAE \pm SEM and percent survival in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* or *Foxp3^{Cre}* recipients transferred with pathogenic cells obtained from dLN of WT mice immunized 10 earlier to induce EAE. **(d)** Mean clinical score of passive EAE \pm SEM and percent survival in WT recipients transferred with pathogenic cells obtained from dLN of WT mice immunized 10 earlier to induce EAE. Recipients were treated with an anti-TNF mAb or PBS from day 0 to 10 after cell transfer. Data are from 4 (a) and 2 (b,c,d) independent experiments.



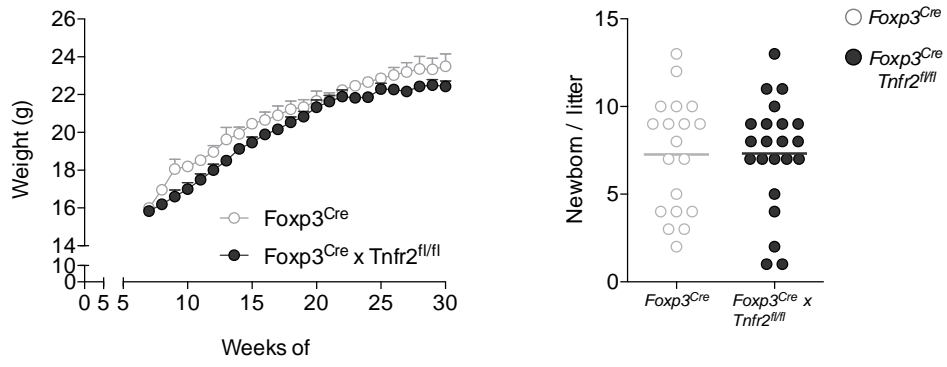
Supplementary Figure 1. Anti-TNF treatment induces EAE exacerbation. Active EAE was induced at day 0. Clinical score of EAE in WT mice treated with anti-TNF mAb or with isotype control mAb or PBS (Ctrl) at day 10-28 (left) or with Etanercept at disease onset for 8 days (right). Mean from 2 (left) and 3 (right) independent experiments.



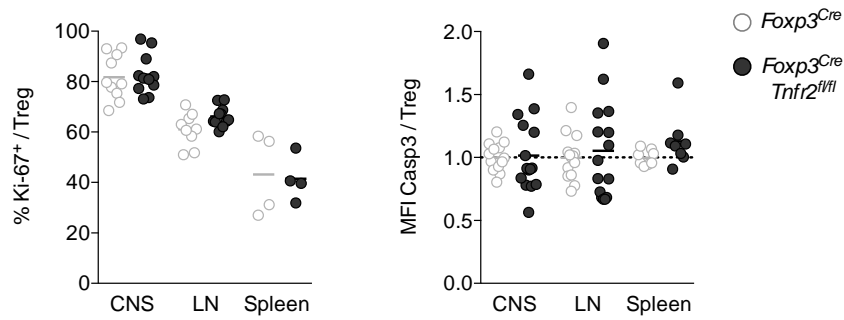
Supplementary Figure 2. Treg cell expansion in the CNS during EAE. Proportion and proliferation of Treg and Tconv cells in the CNS different times after induction of EAE. Each dot represents a mouse. Curves show third order polynomial non-linear regression.



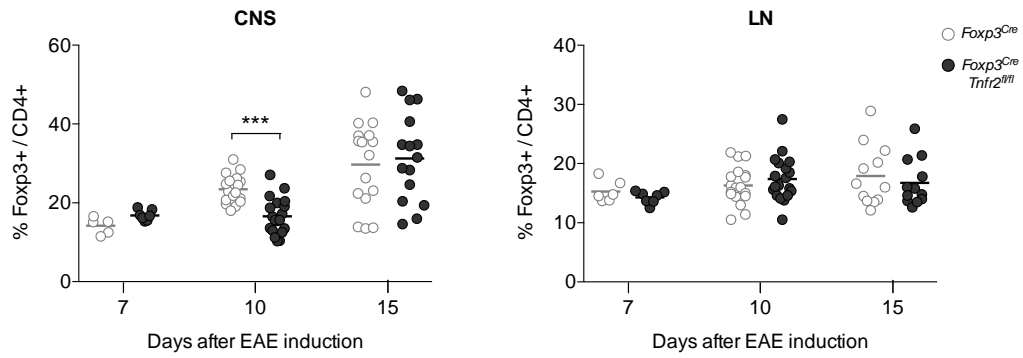
Supplementary Figure 3. Partial defect of Treg cells in the spleen of *Tnfr2*^{-/-} mice. Proportions and absolute numbers of CD4⁺ and Treg cells in *Tnfr2*^{-/-} and control mice in the spleen (upper and lower panels), thymus and LN (lower panels).



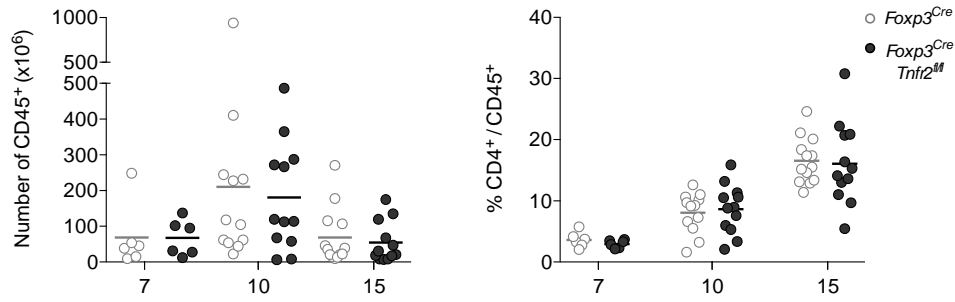
Supplementary Figure 4. Normal weight growth and litter size in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice.



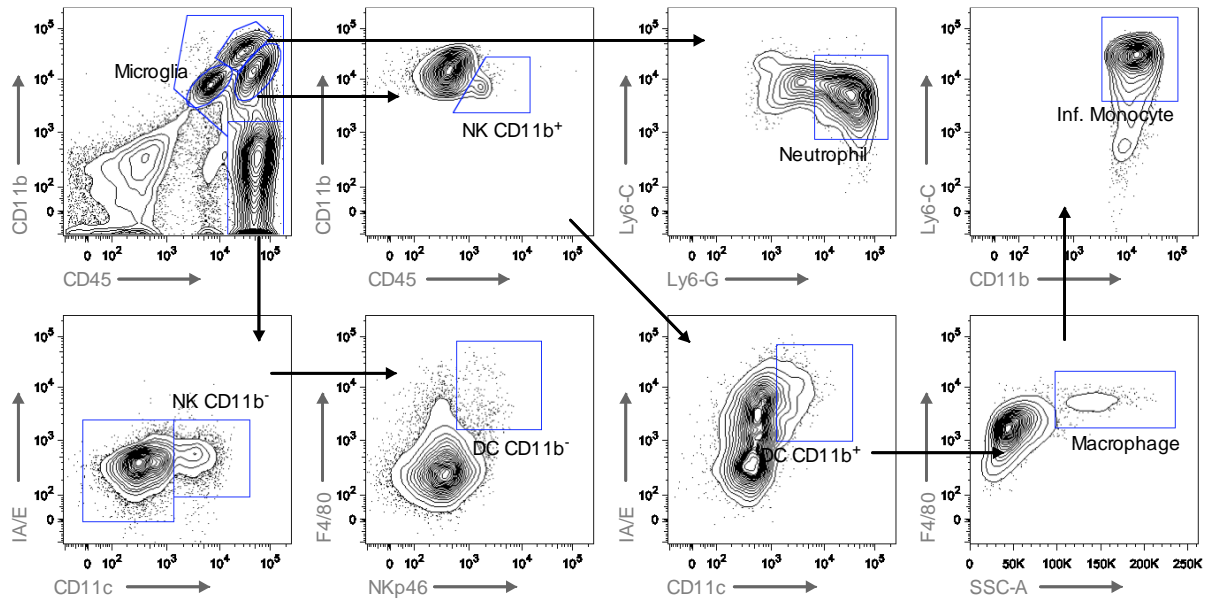
Supplementary Figure 5. Normal expression of Ki-67 and active caspase 3 in CNS Treg cells of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice in EAE. Proportion of Ki-67⁺ cells (left) and relative mean fluorescence intensity (MFI) of active caspase 3 (right) among Treg cells in the CNS at day 10 after EAE induction. For caspase 3 expression, the values correspond to each MFI divided by the mean MFI of *Foxp3^{Cre}* control mice. Each dot represents a mouse, collected from 2 independent experiments.



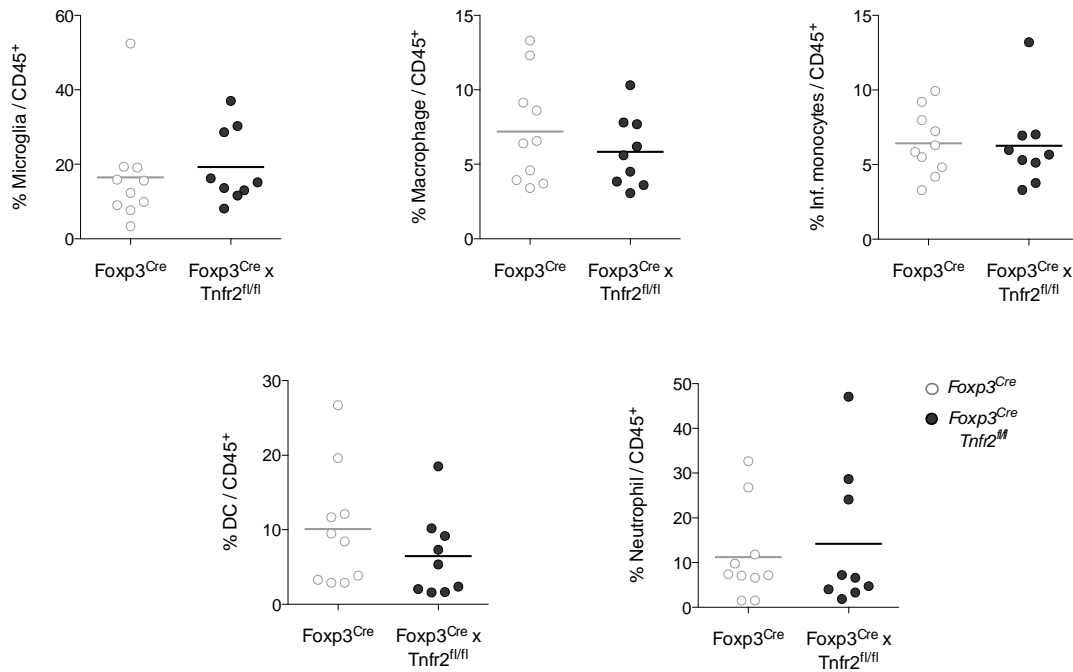
Supplementary Figure 6. Reduced proportions of Treg cells in *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice during EAE is restricted to the CNS at day 10. Proportion of Treg cells in the CNS and dLN at day 7, 10 and 15 after EAE induction. Each dot represents a mouse, collected from 2 (day 7), 4 (day 10) and 5 (day 15) independent experiments. At day 10, data are the same as shown in figure 4b.



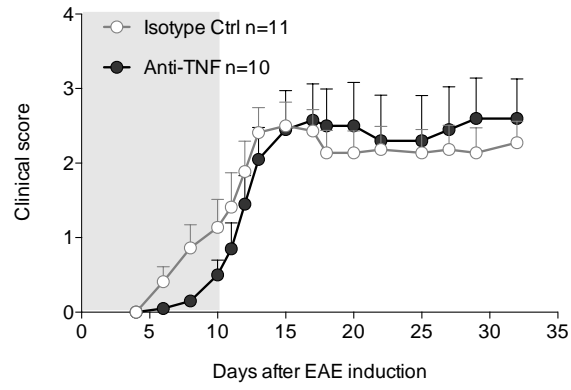
Supplementary Figure 7. Normal accumulation of leukocytes and CD4⁺ cells in the CNS of *Fxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice during EAE. Absolute number of leukocytes (left) and proportion of CD4⁺ cells (right) in the CNS at day 7, 10 and 15 after EAE induction. Each dot represents a mouse, collected from 2 (day 7), 4 (day 10) and 5 (day 15) independent experiments.



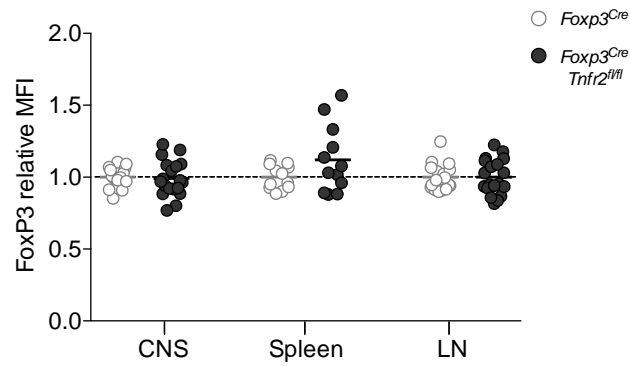
Supplementary Figure 8. Gating strategy to identify myeloid cell subsets in the CNS during EAE.



Supplementary Figure 9. Normal proportion of myeloid cells subsets in the CNS of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice during EAE. Proportion of the indicated myeloid cells subsets in the CNS at day 15 after EAE induction. Each dot represents a mouse, collected from 3 independent experiments.



Supplementary Figure 10. Early anti-TNF treatment did not induce EAE exacerbation. Active EAE was induced at day 0. Clinical score of EAE in WT mice treated with anti-TNF or with isotype mAbs at day 0-8. Mean from 2 independent experiments.



Supplementary Figure 11. Normal Foxp3 expression in Treg cells of *Foxp3^{Cre}Tnfr2^{fl/fl}* mice during EAE. Relative mean fluorescence intensity (MFI) of Foxp3 among Treg cells in the CNS, spleen and dLN at day 10 after EAE induction. The values correspond to each MFI divided by the mean MFI of *Foxp3^{Cre}* control mice. Each dot represents a mouse, collected from 4 independent experiments.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., Boehmer, H. von, Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298, 1395–1401.

Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* 3, 756–763.

Arnott, C.H., Scott, K.A., Moore, R.J., Robinson, S.C., Thompson, R.G., and Balkwill, F.R. (2003). Expression of both TNF- α receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* 23, 1902–1910.

Aronica, M.A., Mora, A.L., Mitchell, D.B., Finn, P.W., Johnson, J.E., Sheller, J.R., and Boothby, M.R. (1999). Preferential Role for NF- κ B/Rel Signaling in the Type 1 But Not Type 2 T Cell-Dependent Immune Response In Vivo. *J. Immunol.* 163, 5116–5124.

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.

Atibalentja, D.F., Murphy, K.M., and Unanue, E.R. (2011). Functional Redundancy between Thymic CD8 α^+ and Sirp α^+ Conventional Dendritic Cells in Presentation of Blood-Derived Lysozyme by MHC Class II Proteins. *J. Immunol.* 186, 1421–1431.

Bach, J.-F. (2002). The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 347, 911–920.

Bailey-Bucktrout, S.L., and Bluestone, J.A. (2011). Regulatory T cells: stability revisited. *Trends Immunol.* 32, 301–306.

Bailey-Bucktrout, S.L., Martinez-Llordella, M., Zhou, X., Anthony, B., Rosenthal, W., Luche, H., Fehling, H.J., and Bluestone, J.A. (2013). Self-antigen-Driven Activation Induces Instability of Regulatory T Cells during an Inflammatory Autoimmune Response. *Immunity* 39, 949–962.

- Balasubramani, A., Shibata, Y., Crawford, G.E., Baldwin, A.S., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2010). Modular Utilization of Distal cis-Regulatory Elements Controls Ifng Gene Expression in T Cells Activated by Distinct Stimuli. *Immunity* 33, 35–47.
- Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., Baumann, K., Grützkau, A., Dong, J., Thiel, A., Boeld, T.J., Hoffmann, P., Edinger, M., et al. (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 2378–2389.
- Beeston, T., Smith, T.R.F., Maricic, I., Tang, X., and Kumar, V. (2010). Involvement of IFN- γ and perforin, but not Fas/FasL interactions in regulatory T cell-mediated suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 229, 91–97.
- Beg, A.A., and Baltimore, D. (1996). An Essential Role for NF- κ B in Preventing TNF- α -Induced Cell Death. *Science* 274, 782–784.
- Bennett, C.L., Brunkow, M.E., Ramsdell, F., O'Briant, K.C., Zhu, Q., Fuleihan, R.L., Shigeoka, A.O., Ochs, H.D., and Chance, P.F. (2001). A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA→AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 53, 435–439.
- Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., and Noelle, R.J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med.* 204, 1765–1774.
- Bluestone, J.A., Trotta, E., and Xu, D. (2015). The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 19, 1091–1103.
- Bodor, J., Feigenbaum, L., Bodorova, J., Bare, C., Reitz, M.S., and Gress, R.E. (2001). Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J. Leukoc. Biol.* 69, 1053–1059.
- Bonadies, N., Neururer, C., Steege, A., Vallabhapurapu, S., Pabst, T., and Mueller, B.U. (2009). PU.1 is regulated by NF- κ B through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene* 29, 1062–1072.

Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Heßling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., et al. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1303–1310.

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Mitri, D.D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* *110*, 1225–1232.

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, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* *27*, 68–73.

Brusko, T.M., Putnam, A.L., and Bluestone, J.A. (2008). Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol. Rev.* *223*, 371–390.

Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 Receptor β -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *178*, 280–290.

Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconl, L.A., Olson, D., Tizard, R., Gate, R., and Lo, D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* *373*, 531–536.

Caamaño, J.H., Rizzo, C.A., Durham, S.K., Barton, D.S., Raventós-Suárez, C., Snapper, C.M., and Bravo, R. (1998). Nuclear Factor (NF)- κ B2 (p100/p52) Is Required for Normal Splenic Microarchitecture and B Cell-mediated Immune Responses. *J. Exp. Med.* *187*, 185–196.

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.

Carow, B., Gao, Y., Coquet, J., Reilly, M., and Rottenberg, M.E. (2016). Ick-Driven Cre Expression Alters T Cell Development in the Thymus and the Frequencies and Functions of Peripheral T Cell Subsets. *J. Immunol.* *197*, 2261–2268.

- Chang, H.-C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G.L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.-N., Han, L., et al. (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* *11*, 527–534.
- Chang, J.-H., Xiao, Y., Hu, H., Jin, J., Yu, J., Zhou, X., Wu, X., Johnson, H.M., Akira, S., Pasparakis, M., et al. (2012). Ubc13 maintains the suppressive function of regulatory T cells and prevents their conversion into effector-like T cells. *Nat. Immunol.* *13*, 481–490.
- Chang, J.-H., Hu, H., Jin, J., Puebla-Osorio, N., Xiao, Y., Gilbert, B.E., Brink, R., Ullrich, S.E., and Sun, S.-C. (2014). TRAF3 regulates the effector function of regulatory T cells and humoral immune responses. *J. Exp. Med.* *211*, 137–151.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4⁺ Regulatory T Cells Control T_H17 Responses in a Stat3-Dependent Manner. *Science* *326*, 986–991.
- Chen, G., and Goeddel, D.V. (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* *296*, 1634–1635.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Chen, X., Bäuml, M., Männel, D.N., Howard, O.M.Z., and Oppenheim, J.J. (2007). Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *179*, 154–161.
- Chen, X., Subleski, J.J., Kopf, H., Howard, O.M.Z., Männel, D.N., and Oppenheim, J.J. (2008). Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *180*, 6467–6471.
- Chen, X., Willette-Brown, J., Wu, X., Hu, Y., Howard, O.M.Z., Hu, Y., and Oppenheim, J.J. (2015). IKK α is required for the homeostasis of regulatory T cells and for the expansion of both regulatory and effector CD4 T cells. *FASEB J.* *29*, 443–454.

- 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.
- Chopra, M., Lang, I., Salzmann, S., Pachel, C., Kraus, S., Bäuerlein, C.A., Brede, C., Garrote, A.-L.J., Mattenheimer, K., Ritz, M., et al. (2013). Tumor Necrosis Factor Induces Tumor Promoting and Anti-Tumoral Effects on Pancreatic Cancer via TNFR1. *PLOS ONE* 8, e75737.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* 17, 983–988.
- Churlaud, G., Jimenez, V., Ruberte, J., Amadoudji Zin, M., Fourcade, G., Gottrand, G., Casana, E., Lambrecht, B., Bellier, B., Piaggio, E., et al. (2014). Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. *Clin. Immunol.* 151, 114–126.
- Churlaud, G., Pitoiset, F., Jebbawi, F., Lorenzon, R., Bellier, B., Rosenzweig, M., and Klatzmann, D. (2015). Human and Mouse CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front. Immunol.* 6.
- Cohen, P.L., and Eisenberg, R.A. (1991). Lpr and gld: Single Gene Models of Systemic Autoimmunity and Lymphoproliferative Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 243–269.
- 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.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.
- Coomes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764.
- Corn, R.A., Hunter, C., Liou, H.-C., Siebenlist, U., and Boothby, M.R. (2005). Opposing Roles for RelB and Bcl-3 in Regulation of T-Box Expressed in T Cells, GATA-3, and Th Effector Differentiation. *J. Immunol.* 175, 2102–2110.

- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β -Mediated Induction of Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *178*, 4022–4026.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1257–1265.
- Deenick, E.K., Elford, A.R., Pellegrini, M., Hall, H., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (2010). c-Rel but not NF- κ B1 is important for T regulatory cell development. *Eur. J. Immunol.* *40*, 677–681.
- Dejean, A.S., Beisner, D.R., Chen, I.L., Kerdiles, Y.M., Babour, A., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 504–513.
- Dhein, J., Walczak, H., Bäuml, C., Debatin, K.-M., and Krammer, P.H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* *373*, 438–441.
- Dinesh, R.K., Skaggs, B.J., La Cava, A., Hahn, B.H., and Singh, R.P. (2010). CD8⁺ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. *Autoimmun. Rev.* *9*, 560–568.
- Doi, T.S., Marino, M.W., Takahashi, T., Yoshida, T., Sakakura, T., Old, L.J., and Obata, Y. (1999). Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 2994–2999.
- Dragin, N., Bismuth, J., Cizeron-Clairac, G., Biferi, M.G., Berthault, C., Serraf, A., Nottin, R., Klatzmann, D., Cumano, A., Barkats, M., et al. (2016). Estrogen-mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune diseases. *J. Clin. Invest.* *126*, 1525–1537.
- Duarte, J.H., Zelenay, S., Bergman, M.-L., Martins, A.C., and Demengeot, J. (2009). Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* *39*, 948–955.

- Early, S.B., Huyett, P., Brown-Steinke, K., Borish, L., and Steinke, J.W. (2009). Functional analysis of $\Delta 351$ interleukin-9 promoter polymorphism reveals an activator controlled by NF- κ B. *Genes Immun.* *10*, 341–349.
- Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2004). Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4⁺CD25⁻ T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. *J. Immunol.* *172*, 5149–5153.
- Faustman, D.L.M., and Davis, M.P.D. (2013). TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine. *Front. Immunol.* *4*.
- Feuerer, M., Hill, J.A., Mathis, D., and Benoist, C. (2009). Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat. Immunol.* *10*, 689–695.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middelton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., and Puck, J.M. (1995). Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* *81*, 935–946.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.-D., Bopp, T., Schmitt, E., et al. (2007). Epigenetic Control of the foxp3 Locus in Regulatory T Cells. *PLOS Biol.* *5*, e38.
- 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.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005a). Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity* *22*, 329–341.
- Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005b). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J. Exp. Med.* *202*, 901–906.
- Franckaert, D., Dooley, J., Roos, E., Floess, S., Huehn, J., Luche, H., Fehling, H.J., Liston, A., Linterman, M.A., and Schlenner, S.M. (2015). Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3⁺ and Foxp3⁻ T cells. *Immunol. Cell Biol.* *93*, 417–423.

- Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L., Poljak, L., Shores, E.W., Brown, K.D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B.F., and Siebenlist, U. (1997). Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.* *11*, 3482–3496.
- Franzoso, G., Carlson, L., Poljak, L., Shores, E.W., Epstein, S., Leonardi, A., Grinberg, A., Tran, T., Scharon-Kersten, T., Anver, M., et al. (1998). Mice Deficient in Nuclear Factor (NF)- κ B/p52 Present with Defects in Humoral Responses, Germinal Center Reactions, and Splenic Microarchitecture. *J. Exp. Med.* *187*, 147–159.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J. Exp. Med.* *192*, 1027–1034.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central Tolerance to Tissue-specific Antigens Mediated by Direct and Indirect Antigen Presentation. *J. Exp. Med.* *200*, 1039–1049.
- Garín, M.I., Chu, C.-C., Golshayan, D., Cernuda-Morollón, E., Wait, R., and Lechler, R.I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood* *109*, 2058–2065.
- Gerondakis, S., and Siebenlist, U. (2010). Roles of the NF- κ B Pathway in Lymphocyte Development and Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.
- Gerondakis, S., Strasser, A., Metcalf, D., Grigoriadis, G., Scheerlinck, J.Y., and Grumont, R.J. (1996). Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 3405–3409.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723.
- Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., and Kaer, L.V. (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 231–237.
- Godfrey, V.L., Wilkinson, J.E., and Russell, L.B. (1991). X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am. J. Pathol.* *138*, 1379.

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.

Gondek, D.C., DeVries, V., Nowak, E.C., Lu, L.-F., Bennett, K.A., Scott, Z.A., and Noelle, R.J. (2008). Transplantation Survival Is Maintained by Granzyme B⁺ Regulatory Cells and Adaptive Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *181*, 4752–4760.

Gottschalk, R.A., Corse, E., and Allison, J.P. (2010). TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J. Exp. Med.* *207*, 1701–1711.

Goudeau, B., Huetz, F., Samson, S., Santo, J.P.D., Cumano, A., Beg, A., Israël, A., and Mémet, S. (2003). IκBα/IκBε deficiency reveals that a critical NF-κB dosage is required for lymphocyte survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 15800–15805.

Govindaraj, C., Scalzo-Inguanti, K., Madondo, M., Hallo, J., Flanagan, K., Quinn, M., and Plebanski, M. (2013). Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2⁺ Tregs within the tumor microenvironment. *Clin. Immunol.* *149*, 97–110.

Govindaraj, C., Tan, P., Walker, P., Wei, A., Spencer, A., and Plebanski, M. (2014). Reducing TNF Receptor 2⁺ Regulatory T Cells via the Combined Action of Azacitidine and the HDAC Inhibitor, Panobinostat for Clinical Benefit in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin. Cancer Res.* *20*, 724–735.

Grégoire, S., Terrada, C., Martin, G.H., Fourcade, G., Baeyens, A., Marodon, G., Fisson, S., Billiard, F., Lucas, B., Tadayoni, R., et al. (2016). Treatment of Uveitis by In Situ Administration of Ex Vivo-Activated Polyclonal Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *196*, 2109–2118.

Grigoriadis, G., Zhan, Y., Grumont, R.J., Metcalf, D., Handman, E., Cheers, C., and Gerondakis, S. (1996). The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *EMBO J.* *15*, 7099.

Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., Cagnard, N., Carpentier, W., Tang, Q., Bluestone, J., et al. (2010a). IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1871–1878.

Grinberg-Bleyer, Y., Saadoun, D., Baeyens, A., Billiard, F., Goldstein, J.D., Grégoire, S., Martin, G.H., Elhage, R., Derian, N., Carpentier, W., et al. (2010b). Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J. Clin. Invest.* *120*, 4558–4568.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4–Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 1097–1101.

Grossmann, M., Metcalf, D., Merryfull, J., Beg, A., Baltimore, D., and Gerondakis, S. (1999). The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 11848–11853.

Group, T.L.M.S.S.G. and T.U. of B.C.M.A. (1999). TNF neutralization in MS Results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* *53*, 457–457.

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.

Grumont, R.J., Rourke, I.J., O’Reilly, L.A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., and Gerondakis, S. (1998). B Lymphocytes Differentially Use the Rel and Nuclear Factor κ B1 (NF- κ B1) Transcription Factors to Regulate Cell Cycle Progression and Apoptosis in Quiescent and Mitogen-activated Cells. *J. Exp. Med.* *187*, 663–674.

Gückel, E., Frey, S., Zaiss, M.M., Schett, G., Ghosh, S., and Voll, R.E. (2011). Cell-Intrinsic NF- κ B Activation Is Critical for the Development of Natural Regulatory T Cells in Mice. *PLOS ONE* *6*, e20003.

Guo, J., and Zhou, X. (2015). Regulatory T cells turn pathogenic. *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 525–532.

- Hadeiba, H., Lahl, K., Edalati, A., Oderup, C., Habtezion, A., Pachynski, R., Nguyen, L., Ghodsi, A., Adler, S., and Butcher, E.C. (2012). Plasmacytoid Dendritic Cells Transport Peripheral Antigens to the Thymus to Promote Central Tolerance. *Immunity* 36, 438–450.
- Hammond, K.J.L., Poulton, L.D., Palmisano, L.J., Silveira, P.A., Godfrey, D.I., and Baxter, A.G. (1998). α/β -T Cell Receptor (TCR)⁺CD4⁻CD8⁻ (NKT) Thymocytes Prevent Insulin-dependent Diabetes Mellitus in Nonobese Diabetic (NOD)/Lt Mice by the Influence of Interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J. Exp. Med.* 187, 1047–1056.
- Hartemann, A., Bensimon, G., Payan, C.A., Jacqueminet, S., Bourron, O., Nicolas, N., Fonfrede, M., Rosenzweig, M., Bernard, C., and Klatzmann, D. (2013). Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 1, 295–305.
- Haxhinasto, S., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The AKT–mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells. *J. Exp. Med.* 205, 565–574.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132, 344–362.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 21, 223–244.
- Hettmann, T., and Leiden, J.M. (2000). NF- κ B Is Required for the Positive Selection of CD8⁺ Thymocytes. *J. Immunol.* 165, 5004–5010.
- Hilliard, B.A., Mason, N., Xu, L., Sun, J., Lamhamedi-Cherradi, S.-E., Liou, H.-C., Hunter, C., and Chen, Y.H. (2002). Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 110, 843–850.
- Hoffmann, P., Boeld, T.J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wiczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R., and Edinger, M. (2009). Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur. J. Immunol.* 39, 1088–1097.
- Hori, S. (2014). Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 259, 159–172.

- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Horwitz, B.H., Scott, M.L., Cherry, S.R., Bronson, R.T., and Baltimore, D. (1997). Failure of Lymphopoiesis after Adoptive Transfer of NF- κ B-Deficient Fetal Liver Cells. *Immunity* 6, 765–772.
- Horwitz, D.A., Zheng, S.G., Wang, J., and Gray, J.D. (2008). Critical role of IL-2 and TGF- β in generation, function and stabilization of Foxp3⁺CD4⁺ Treg. *Eur. J. Immunol.* 38, 912–915.
- Hsieh, C.-S., Lee, H.-M., and Lio, C.-W.J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 157–167.
- Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* 21, 503–513.
- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor Jr., W., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., et al. (2011). Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ Regulatory CD4⁺ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. *Immunity* 34, 554–565.
- Huehn, J., Polansky, J.K., and Hamann, A. (2009). Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat. Rev. Immunol.* 9, 83–89.
- Iotsova, V., Caamaño, J., Loy, J., Yang, Y., Lewin, A., and Bravo, R. (1997). Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat. Med.* 3, 1285–1289.
- Isomura, I., Palmer, S., Grumont, R.J., Bunting, K., Hoyne, G., Wilkinson, N., Banerjee, A., Proietto, A., Gugasyan, R., Wu, L., et al. (2009). c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206, 3001–3014.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and Autoimmunity: Production of CD25⁺CD4⁺ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance. *J. Immunol.* 162, 5317–5326.

- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (2009). Pillars Article: Antigen Presentation by Chemically Modified Splenocytes Induces Antigen-Specific T Cell Unresponsiveness In Vitro and In Vivo. *J. Exp. Med.* 197. 165: 302–319. *J. Immunol.* 183, 4150–4167.
- Jimi, E., Strickland, I., Voll, R.E., Long, M., and Ghosh, S. (2008). Differential Role of the Transcription Factor NF- κ B in Selection and Survival of CD4⁺ and CD8⁺ Thymocytes. *Immunity* 29, 523–537.
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Hohenbeck, 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.
- Kaplan, M.H., Hufford, M.M., and Olson, M.R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 295–307.
- Kapp, J.A., Kapp, L.M., and McKenna, K.C. (2004). $\gamma\delta$ T cells play an essential role in several forms of tolerance. *Immunol. Res.* 29, 93–102.
- Kappler, J.W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273–280.
- Khatti, R., Cox, T., Yasayko, S.-A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4, 337–342.
- Kim, H.-P., and Leonard, W.J. (2007). CREB/ATF-dependent T cell receptor–induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J. Exp. Med.* 204, 1543–1551.
- Kim, J., Lahl, K., Hori, S., Loddenkemper, C., Chaudhry, A., deRoos, P., Rudensky, A., and Sparwasser, T. (2009). Cutting Edge: Depletion of Foxp3⁺ Cells Leads to Induction of Autoimmunity by Specific Ablation of Regulatory T Cells in Genetically Targeted Mice. *J. Immunol.* 183, 7631–7634.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., and Rudensky, A.Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* 8, 191–197.
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., Kidani, Y., Vandenbon, A., Hirota, K., Kawakami, R., Yasuda, K., Motooka, D., Nakamura, S., Kondo, M., et al. (2017). Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* 18, 173–183.

- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 833–844.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 377–391.
- Kobie, J.J., Shah, P.R., Yang, L., Rebhahn, J.A., Fowell, D.J., and Mosmann, T.R. (2006). T Regulatory and Primed Uncommitted CD4 T Cells Express CD73, Which Suppresses Effector CD4 T Cells by Converting 5'-Adenosine Monophosphate to Adenosine. *J. Immunol.* *177*, 6780–6786.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* *10*, 595–602.
- 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.* *106*, 1903–1908.
- Köntgen, F., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and Gerondakis, S. (1995). Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* *9*, 1965–1977.
- 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.
- Kubach, J., Lutter, P., Bopp, T., Stoll, S., Becker, C., Huter, E., Richter, C., Weingarten, P., Warger, T., Knop, J., et al. (2007). Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* *110*, 1550–1558.
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* *75*, 263–274.

Kurobe, H., Liu, C., Ueno, T., Saito, F., Ohigashi, I., Seach, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Kitagawa, T., Lipp, M., et al. (2006). CCR7-Dependent Cortex-to-Medulla Migration of Positively Selected Thymocytes Is Essential for Establishing Central Tolerance. *Immunity* 24, 165–177.

Kurts, C., Sutherland, R.M., Davey, G., Li, M., Lew, A.M., Blanas, E., Carbone, F.R., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1999). CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 12703–12707.

La Rocca, C., Carbone, F., Longobardi, S., and Matarese, G. (2014). The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol. Lett.* 162, 41–48.

Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* 204, 57–63.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity* 26, 371–381.

Lee, Y.-H., Ishida, Y., Rifa'i, M., Shi, Z., Isobe, K., and Suzuki, H. (2008). Essential Role of CD8⁺CD122⁺ Regulatory T Cells in the Recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 180, 825–832.

Lehuen, A., Lantz, O., Beaudoin, L., Laloux, V., Carnaud, C., Bendelac, A., Bach, J.-F., and Monteiro, R.C. (1998). Overexpression of Natural Killer T Cells Protects *Vα14-Jα281* Transgenic Nonobese Diabetic Mice against Diabetes. *J. Exp. Med.* 188, 1831–1839.

Lerner, A., Jeremias, P., and Matthias, T. (2015). The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *Int. J. Celiac Dis.* 3, 151–155.

Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T Cell-Produced Transforming Growth Factor-β1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity* 26, 579–591.

- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J. Immunol.* *180*, 5916–5926.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* *17*, 975–982.
- Lio, C.-W.J., and Hsieh, C.-S. (2008). A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* *28*, 100–111.
- Li-Weber, M., Giaisi, M., Baumann, S., Pálfi, K., and Krammer, P.H. (2004). NF- κ B synergizes with NF-AT and NF-IL6 in activation of the IL-4 gene in T cells. *Eur. J. Immunol.* *34*, 1111–1118.
- Long, M., Park, S.-G., Strickland, I., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2009). Nuclear Factor- κ B Modulates Regulatory T Cell Development by Directly Regulating Expression of Foxp3 Transcription Factor. *Immunity* *31*, 921–931.
- Lyon, M.F., Peters, J., Glenister, P.H., Ball, S., and Wright, E. (1990). The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 2433.
- Mandal, M., Borowski, C., Palomero, T., Ferrando, A.A., Oberdoerffer, P., Meng, F., Ruiz-Vela, A., Ciofani, M., Zuniga-Pflucker, J.-C., Screpanti, I., et al. (2005). The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J. Exp. Med.* *201*, 603–614.
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *201*, 1061–1067.
- Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G.M., Jacobsen, E.S., Polansky, J.K., MacIsaac, K.D., Levine, S.S., Fraenkel, E., von Boehmer, H., and Young, R.A. (2007). Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* *445*, 931–935.

- Martin, B., Auffray, C., Delpoux, A., Pommier, A., Durand, A., Charvet, C., Yakonowsky, P., Boysson, H. de, Bonilla, N., Audemard, A., et al. (2013). Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat. Commun.* *4*, ncomms3209.
- Martinez, R.J., Zhang, N., Thomas, S.R., Nandiwada, S.L., Jenkins, M.K., Binstadt, B.A., and Mueller, D.L. (2012). Arthritogenic Self-Reactive CD4⁺ T Cells Acquire an FR4^{hi}CD73^{hi} Anergic State in the Presence of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *188*, 170–181.
- McClymont, S.A., Putnam, A.L., Lee, M.R., Esensten, J.H., Liu, W., Hulme, M.A., Hoffmüller, U., Baron, U., Olek, S., Bluestone, J.A., et al. (2011). Plasticity of Human Regulatory T Cells in Healthy Subjects and Patients with Type 1 Diabetes. *J. Immunol.* *186*, 3918–3926.
- MÉnager–Marcq, I., PomiÉ, Cé., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2006). CD8⁺CD28[–] Regulatory T Lymphocytes Prevent Experimental Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Gastroenterology* *131*, 1775–1785.
- Messina, N., Fulford, T., O'Reilly, L., Loh, W.X., Motyer, J.M., Ellis, D., McLean, C., Naeem, H., Lin, A., Gugasyan, R., et al. (2016). The NF-κB transcription factor RelA is required for the tolerogenic function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Autoimmun.* *70*, 52–62.
- 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 T_{reg} and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* *208*, 1279–1289.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 331–341.
- Müller, M.R., and Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 645–656.
- Müller, M., Carter, S.L., Hofer, M.J., Manders, P., Getts, D.R., Getts, M.T., Dreykluft, A., Lu, B., Gerard, C., King, N.J.C., et al. (2007). CXCR3 Signaling Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Controlling the Parenchymal Distribution of Effector and Regulatory T Cells in the Central Nervous System. *J. Immunol.* *179*, 2774–2786.

Murray, S.E., Polesso, F., Rowe, A.M., Basak, S., Koguchi, Y., Toren, K.G., Hoffmann, A., and Parker, D.C. (2011). NF- κ B-inducing kinase plays an essential T cell-intrinsic role in graft-versus-host disease and lethal autoimmunity in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 4775–4786.

Muto, G., Kotani, H., Kondo, T., Morita, R., Tsuruta, S., Kobayashi, T., Luche, H., Fehling, H.J., Walsh, M., Choi, Y., et al. (2013). TRAF6 Is Essential for Maintenance of Regulatory T Cells That Suppress Th2 Type Autoimmunity. *PLoS ONE* *8*.

Nagar, M., Jacob-Hirsch, J., Vernitsky, H., Berkun, Y., Ben-Horin, S., Amariglio, N., Bank, I., Kloog, Y., Rechavi, G., and Goldstein, I. (2010). TNF Activates a NF- κ B-Regulated Cellular Program in Human CD45RA-Regulatory T Cells that Modulates Their Suppressive Function. *J. Immunol.* *184*, 3570–3581.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell Contact-Dependent Immunosuppression by Cd4⁺Cd25⁺Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-Bound Transforming Growth Factor β . *J. Exp. Med.* *194*, 629–644.

Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* *127*, 759–767.

Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969). Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice. *Science* *166*, 753–755.

Noval Rivas, M., and Chatila, T.A. (2016). Regulatory T cells in allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* *138*, 639–652.

Ober, B.T., Hu, Q., Opferman, J.T., Hagevik, S., Chiu, N., Wang, C.R., and Ashton-Rickardt, P.G. (2000). Affinity of thymic self-peptides for the TCR determines the selection of CD8(+) T lymphocytes in the thymus. *Int. Immunol.* *12*, 1353–1363.

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* *12*, 695–708.

Okamoto, K., Iwai, Y., Oh-hora, M., Yamamoto, M., Morio, T., Aoki, K., Ohya, K., Jetten, A.M., Akira, S., Muta, T., et al. (2010). I κ B ζ regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* *464*, 1381–1385.

- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and 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.* *105*, 10113–10118.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999a). Tumor Rejection by *in Vivo* Administration of Anti-CD25 (Interleukin-2 Receptor α) Monoclonal Antibody. *Cancer Res.* *59*, 3128–3133.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999b). Tumor Rejection by *in Vivo* Administration of Anti-CD25 (Interleukin-2 Receptor α) Monoclonal Antibody. *Cancer Res.* *59*, 3128–3133.
- 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.
- van Oosten, B.W., Barkhof, F., Truyen, L., Boringa, J.B., Bertelsmann, F.W., von Blomberg, B.M., Woody, J.N., Hartung, H.P., and Polman, C.H. (1996). Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* *47*, 1531–1534.
- Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Biccato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.* *12*, 870–878.
- Pandiyani, 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.
- Peggs, K.S., Quezada, S.A., Chambers, C.A., Korman, A.J., and Allison, J.P. (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.* *206*, 1717–1725.
- Peng, S.L., Madaio, M.P., Hayday, A.C., and Craft, J. (1996). Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells. *J. Immunol.* *157*, 5689–5698.

- Penhale, W.J., Farmer, A., Mckenna, R.P., and Irvine, W.J. (1973). Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin. Exp. Immunol.* *15*, 225.
- Penhale, W.J., Irvine, W.J., Inglis, J.R., and Farmer, A. (1976). Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin. Exp. Immunol.* *25*, 6–16.
- Peterman, G.M., Spencer, C., Sperling, A.I., and Bluestone, J.A. (1993). Role of gamma delta T cells in murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* *151*, 6546–6558.
- Picca, C.C., Simons, D.M., Oh, S., Aitken, M., Perng, O.A., Mergenthaler, C., Kropf, E., Erikson, J., and Caton, A.J. (2011). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell formation requires more specific recognition of a self-peptide than thymocyte deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 14890–14895.
- Piconese, S., Valzasina, B., and Colombo, M.P. (2008). OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J. Exp. Med.* *205*, 825–839.
- Pohl, T., Gugasyan, R., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Tarlinton, D., Sha, W., Baltimore, D., and Gerondakis, S. (2002). The combined absence of NF- κ B1 and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 4514–4519.
- Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1654–1663.
- Polansky, J.K., Schreiber, L., Thelemann, C., Ludwig, L., Krüger, M., Baumgrass, R., Cording, S., Floess, S., Hamann, A., and Huehn, J. (2010). Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *J. Mol. Med.* *88*, 1029–1040.
- Pomié, C., Ménager-Marcq, I., and van Meerwijk, J.P.M. (2008). Murine CD8⁺ regulatory T lymphocytes: The new era. *Hum. Immunol.* *69*, 708–714.

- Powolny-Budnicka, I., Riemann, M., Tänzer, S., Schmid, R.M., Hehlgans, T., and Weih, F. (2011). RelA and RelB Transcription Factors in Distinct Thymocyte Populations Control Lymphotoxin-Dependent Interleukin-17 Production in $\gamma\delta$ T Cells. *Immunity* 34, 364–374.
- Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset. *J. Exp. Med.* 172, 1701–1708.
- Price, S., Shaw, P.A., Seitz, A., Joshi, G., Davis, J., Niemela, J.E., Perkins, K., Hornung, R.L., Folio, L., Rosenberg, P.S., et al. (2014). Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with *FAS* gene mutations. *Blood* 123, 1989–1999.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science* 332, 600–603.
- Rauert, H., Wicovsky, A., Müller, N., Siegmund, D., Spindler, V., Waschke, J., Kneitz, C., and Wajant, H. (2010). Membrane Tumor Necrosis Factor (TNF) Induces p100 Processing via TNF Receptor-2 (TNFR2). *J. Biol. Chem.* 285, 7394–7404.
- Ruan, Q., Kameswaran, V., Tone, Y., Li, L., Liou, H.-C., Greene, M.I., Tone, M., and Chen, Y.H. (2009). Development of Foxp3⁺ Regulatory T Cells Is Driven by the c-Rel Enhanceosome. *Immunity* 31, 932–940.
- Ruan, Q., Kameswaran, V., Zhang, Y., Zheng, S., Sun, J., Wang, J., DeVigiliis, J., Liou, H.-C., Beg, A.A., and Chen, Y.H. (2011). The Th17 immune response is controlled by the Rel–ROR γ –ROR γ T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* 208, 2321–2333.
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson Jr., W.R., et al. (2008). Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* 28, 546–558.
- Rubtsov, Y.P., Niec, R.E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., and Rudensky, A.Y. (2010). Stability of the Regulatory T Cell Lineage in Vivo. *Science* 329, 1667–1671.

Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., and Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-Cell Responses to Low-Dose Interleukin-2 in HCV-Induced Vasculitis. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2067–2077.

Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C., and Horak, I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* *75*, 253–261.

Safinia, N., Leech, J., Hernandez-Fuentes, M., Lechler, R., and Lombardi, G. (2013). Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy. *Clin. Exp. Immunol.* *172*, 158–168.

Sakaguchi, S., Takahashi, T., and Nishizuka, Y. (1982). Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J. Exp. Med.* *156*, 1577–1586.

Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* *161*, 72–87.

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., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* *212*, 8–27.

Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes. *Immunity* *12*, 431–440.

Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity* *28*, 402–413.

Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., et al. (2008). T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 7797–7802.

Schmidt-Supprian, M., Courtois, G., Tian, J., Coyle, A.J., Israël, A., Rajewsky, K., and Pasparakis, M. (2003). Mature T Cells Depend on Signaling through the IKK Complex. *Immunity* *19*, 377–389.

Schmidt-Supprian, M., Tian, J., Grant, E.P., Pasparakis, M., Maehr, R., Ovaa, H., Ploegh, H.L., Coyle, A.J., and Rajewsky, K. (2004). Differential dependence of CD4⁺CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF- κ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4566–4571.

Schuster, M., Plaza-Sirvent, C., Matthies, A.-M., Heise, U., Jeron, A., Bruder, D., Visekruna, A., Huehn, J., and Schmitz, I. (2017). c-REL and I κ B_{NS} Govern Common and Independent Steps of Regulatory T Cell Development from Novel CD122-Expressing Pre-Precursors. *J. Immunol.* [ji1600877](https://doi.org/10.1093/immk/djz160).

Schwartz, R.H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* *248*, 1349–1356.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* *46*, 705–716.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* *201*, 723–735.

Sha, W.C., Liou, H.-C., Tuomanen, E.I., and Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* *80*, 321–330.

Shechter, R., London, A., and Schwartz, M. (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 206–218.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* *3*, 135–142.

Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowskr, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvint, D., et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* *359*, 693.

Singer, G.G., and Abbas, A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* *1*, 365–371.

Smigielski, K.S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K.R., Dudda, J.C., Klonowski, K.D., and Campbell, D.J. (2014). CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.* *211*, 121–136.

Snapper, C.M., Zelazowski, P., Rosas, F.R., Kehry, M.R., Tian, M., Baltimore, D., and Sha, W.C. (1996). B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. *J. Immunol.* *156*, 183–191.

Sriskantharajah, S., Belich, M.P., Papoutsopoulou, S., Janzen, J., Tybulewicz, V., Seddon, B., and Ley, S.C. (2009). Proteolysis of NF- κ B1 p105 is essential for T cell antigen receptor–induced proliferation. *Nat. Immunol.* *10*, 38–47.

Steinbrink, K., Wöfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* *159*, 4772–4780.

Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.* *6*, 152–162.

Takahashi, R., Nishimoto, S., Muto, G., Sekiya, T., Tamiya, T., Kimura, A., Morita, R., Asakawa, M., Chinen, T., and Yoshimura, A. (2011). SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *J. Exp. Med.* *208*, 2055–2067.

- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 412–426.
- Teft, W.A., Kirchhof, M.G., and Madrenas, J. (2006). A Molecular Perspective of Ctla-4 Function. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 65–97.
- Thiault, N., Darrigues, J., Adoue, V., Gros, M., Binet, B., Perals, C., Leobon, B., Fazilleau, N., Joffre, O.P., Robey, E.A., et al. (2015). Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.* *16*, 628–634.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J. Exp. Med.* *188*, 287–296.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential Generation of Follicular B Helper T Cells from Foxp3⁺ T Cells in Gut Peyer's Patches. *Science* *323*, 1488–1492.
- Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and Function of NF-κB Transcription Factors in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 693–733.
- van der Veeke, J., Gonzalez, A.J., Cho, H., Arvey, A., Hemmers, S., Leslie, C.S., and Rudensky, A.Y. (2016). Memory of Inflammation in Regulatory T Cells. *Cell* *166*, 977–990.
- Vassalli, P. (1992). The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 411–452.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 523–532.
- Voll, R.E., Jimi, E., Phillips, R.J., Barber, D.F., Rincon, M., Hayday, A.C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2000). NF-κB Activation by the Pre-T Cell Receptor Serves as a Selective Survival Signal in T Lymphocyte Development. *Immunity* *13*, 677–689.
- Voo, K.S., Wang, Y.-H., Santori, F.R., Boggiano, C., Wang, Y.-H., Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., et al. (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 4793–4798.

- Wajant, H., and Scheurich, P. (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS J.* 278, 862–876.
- Walker, L.S.K., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 11–19.
- Walunas, T.L., Bakker, C.Y., and Bluestone, J.A. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J. Exp. Med.* 183, 2541–2550.
- Wan, Y.Y., Chi, H., Xie, M., Schneider, M.D., and Flavell, R.A. (2006). The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat. Immunol.* 7, 851–858.
- Wang, R., Han, G., Song, L., Wang, J., Chen, G., Xu, R., Yu, M., Qian, J., Shen, B., and Li, Y. (2009). CD8⁺ regulatory T cells are responsible for GAD-IgG gene-transferred tolerance induction in NOD mice. *Immunology* 126, 123–131.
- Ware, C.F. (2005). NETWORK COMMUNICATIONS: Lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 787–819.
- Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.-Y., Watford, W.T., et al. (2009). Global Mapping of H3K4me3 and H3K27me3 Reveals Specificity and Plasticity in Lineage Fate Determination of Differentiating CD4⁺ T Cells. *Immunity* 30, 155–167.
- Weih, F., and Caamaño, J. (2003). Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor- κ B signal transduction pathway. *Immunol. Rev.* 195, 91–105.
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., Ryseck, R.-P., Lira, S.A., and Bravo, R. (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family. *Cell* 80, 331–340.
- Weih, F., Durham, S.K., Barton, D.S., Sha, W.C., Baltimore, D., and Bravo, R. (1997). p50–NF- κ B Complexes Partially Compensate for the Absence of RelB: Severely Increased Pathology in p50^{-/-}relB^{-/-}Double-knockout Mice. *J. Exp. Med.* 185, 1359–1370.
- Weil, R., and Israël, A. (2006). Deciphering the pathway from the TCR to NF- κ B. *Cell Death Differ.* 13, 826–833.

- Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F.W. (1995). Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521–530.
- 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.
- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB Is Essential for the Development of Myeloid-Related CD8 α ⁻ Dendritic Cells but Not of Lymphoid-Related CD8 α ⁺ Dendritic Cells. *Immunity* 9, 839–847.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., et al. (2006). FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375–387.
- 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 TH9 cells and airway inflammation. *Nat. Immunol.* 13, 981–990.
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. (2007). Cutting Edge: Regulatory T Cells Induce CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T Cells or Are Self-Induced to Become Th17 Cells in the Absence of Exogenous TGF- β . *J. Immunol.* 178, 6725–6729.
- Yamazaki, T., Yang, X.O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H.S., Ma, L., Panopoulos, A.D., et al. (2008). CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 181, 8391–8401.
- Yan, F., Du, R., Wei, F., Zhao, H., Yu, J., Wang, C., Zhan, Z., Ding, T., Ren, X., Chen, X., et al. (2015). Expression of TNFR2 by regulatory T cells in peripheral blood is correlated with clinical pathology of lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 64, 1475–1485.
- 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., et al. (2008). Molecular Antagonism and Plasticity of Regulatory and Inflammatory T Cell Programs. *Immunity* 29, 44–56.

- Yokosuka, T., Kobayashi, W., Takamatsu, M., Sakata-Sogawa, K., Zeng, H., Hashimoto-Tane, A., Yagita, H., Tokunaga, M., and Saito, T. (2010). Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. *Immunity* 33, 326–339.
- Zanin-Zhorov, A., Ding, Y., Kumari, S., Attur, M., Hippen, K.L., Brown, M., Blazar, B.R., Abramson, S.B., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2010). Protein Kinase C- θ Mediates Negative Feedback on Regulatory T Cell Function. *Science* 328, 372–376.
- Zeng, D., Lewis, D., Dejbakhsh-Jones, S., Lan, F., García-Ojeda, M., Sibley, R., and Strober, S. (1999). Bone Marrow NK1.1⁻ and NK1.1⁺ T Cells Reciprocally Regulate Acute Graft versus Host Disease. *J. Exp. Med.* 189, 1073–1081.
- Zhao, D.-M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J., and Shevach, E.M. (2006). Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107, 3925–3932.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2006). TGF- β Requires CTLA-4 Early after T Cell Activation to Induce FoxP3 and Generate Adaptive CD4⁺CD25⁺ Regulatory Cells. *J. Immunol.* 176, 3321–3329.
- Zheng, S.G., Wang, J., and Horwitz, D.A. (2008). Cutting Edge: Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Induced by IL-2 and TGF- β Are Resistant to Th17 Conversion by IL-6. *J. Immunol.* 180, 7112–7116.
- Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.-T., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936–940.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.-T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature* 458, 351–356.
- 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, D., Mattner, J., Cantu, C., Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y.-P., Yamashita, T., et al. (2004). Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells. *Science* 306, 1786–1789.

Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M.W., Ivanov, I.I., Min, R., Victora, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., et al. (2008). TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature* 453, 236–240.

Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J.A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 10, 1000–1007.

Zorn, E., Nelson, E.A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E., Canning, C., Soiffer, R.J., et al. (2006). IL-2 regulates *FOXP3* expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108, 1571–1579.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Etapes thymiques de formation des lymphocytes T	7
Figure 2 : Sélection thymique des lymphocytes T en fonction du niveau d'affinité de leur TCR	8
Figure 3 : Différentiation d'un lymphocyte T CD4 ⁺ naïf en fonction de l'environnement cytokinique	10
Figure 4 : Mécanismes intrinsèques de régulation périphérique des lymphocytes T	11
Figure 5 : Développement des Tregs thymiques	19
Figure 6 : Mécanismes de régulation du système immunitaire utilisés par les Tregs	26
Figure 7 : Voies de signalisation de NF-κB	32
Figure 8 : Représentation des différentes IκB kinases (IKK) : IKKα, IKKβ et NEMO (IKKγ)	34
Figure 9 : Représentation des différentes protéines inhibitrices de NF-κB : IκBα, IκBβ et IκBε, IκBγ, Bcl-3 et IκBζ	35
Figure 10 : Représentation des différentes sous-unités de NF-κB : NF-κB1 (p105/50), RelA (p65), c-Rel, NF-κB2 (p100/52) et RelB	36
Figure 11 : Suivi clinique des souris Foxp3 ^{Cre} Relb ^{lox}	92
Figure 12 : Analyse des compartiments lymphocytaires T et B des souris Foxp3 ^{Cre} Relb ^{lox} ..	94
Figure 13 : Analyse des cellules myéloïdes et NK des souris Foxp3 ^{Cre} Relb ^{lox}	95
Figure 14 : Analyse des Tregs des souris Foxp3 ^{Cre} Relb ^{lox}	97
Figure 15 : Evaluation du phénotype et de la capacité suppressive des Tregs déficients pour RelB in vitro	99
Figure 16 : Schéma hypothétique de la physiopathologie des souris Foxp3 ^{Cre} Relb ^{lox}	109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Marqueurs murins et humains des Tregs	16
Tableau 2 : Comparaison des signaux impliqués dans le développement des tTregs et pTregs	20
Tableau 3 : Phénotypes des souris déficientes pour une ou plusieurs sous-unités de NF- κ B	37-38

RESUME

Les lymphocytes T CD4⁺FoxP3⁺ régulateurs (Tregs) jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du système immunitaire et la prévention des maladies auto-immunes en régulant les réponses immunitaires. Aussi bien chez la souris que chez l'homme, il est établi que des mutations de *Foxp3* entraînent une déficience en Tregs qui induit un syndrome auto-immun conduisant à la mort. Bien que *Foxp3* soit essentiel à la différenciation, la fonction et la stabilité des Tregs, ce n'est pas le seul facteur de transcription impliqué dans ces processus. De plus en plus d'études suggèrent notamment un rôle important de NF- κ B dans le développement et la fonction des Tregs mais celui-ci reste mal défini. Nous avons donc généré des souris ayant une délétion spécifique des sous-unités RelA ou RelB de NF- κ B dans les Tregs. L'inactivation de RelA dans les Tregs conduit au développement d'un syndrome auto-immun sévère qui s'explique par un défaut fonctionnel et de stabilité des Tregs. L'inactivation de RelB dans les Tregs semble, quant à elle, augmenter leur fonction suppressive. Nous montrons ainsi un rôle majeur de NF- κ B dans la fonction des Tregs ouvrant la voie à de nouveaux traitements qui stimuleraient ou inhiberaient les Tregs en modulant l'activation de NF- κ B.

Role of NF- κ B in regulatory T cells biology

CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) play a critical role in immune homeostasis and in the prevention of autoimmune diseases by regulating immune responses. In humans and mice, it is well established that *Foxp3* deficiency conducts to the development of an autoimmune syndrome leading to early death. Although *Foxp3* plays a critical role in differentiation, suppressive function and stability of Tregs, other transcription factors are also involved in different aspects of their biology. Even though increasing evidence shows an important role of NF- κ B transcription factors in Treg cells development and function, their role is still poorly defined. To address this question we have generated conditional knock-out mice for RelA or RelB subunits of NF- κ B only in Tregs. We show that the deficiency of RelA in Tregs leads to the development of a spontaneous severe autoimmune syndrome that could be explained by a defect in Tregs activation and stability. However, the deficiency of RelB seems to increase their suppressive function. Altogether, our data show a major role of NF- κ B in Treg biology. This work could lead to new treatments that would stimulate or inhibit Tregs through the modulation of NF- κ B activation.