



HAL
open science

Influence des interactions avec le Soi sur le devenir des cellules T CD4 naïves en phase effectrice

Vincent Guichard

► **To cite this version:**

Vincent Guichard. Influence des interactions avec le Soi sur le devenir des cellules T CD4 naïves en phase effectrice. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP7021 . tel-02989713

HAL Id: tel-02989713

<https://theses.hal.science/tel-02989713>

Submitted on 5 Nov 2020

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 PARIS DIDEROT

ÉCOLE DOCTORALE BioSPC

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Immunologie

Présentée par

Vincent GUICHARD

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université Paris Diderot

**Influence des interactions avec le Soi sur le devenir des cellules T
CD4 naïves en phase effectrice**

Soutenue le 19 septembre 2019 devant le jury composé de :

Madame le Docteur Céline CHARVET

Rapporteur

Monsieur le Docteur Daniel OLIVE

Rapporteur

Madame le Docteur Clotilde RANDRIAMAMPITA

Examineur

Monsieur le Docteur Christophe COMBADIÈRE

Examineur

Monsieur le Docteur Oliver JOFFRE

Examineur

Monsieur le Docteur Cédric AUFFRAY

Directeur de thèse

Résumé

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD4 T_N) sont générés et éduqués dans le thymus. Cette éducation est basée sur leur capacité à reconnaître le Soi via l'interaction TCR-pCMH (peptide du Soi-CMHII) avec une affinité variable. En périphérie, les cellules CD4 T_N circulent entre les organes lymphoïdes secondaires, où elles continuent à interagir avec le Soi via des contacts fréquents et transitoires avec les cellules présentatrices d'antigènes (APCs). Plusieurs études montrent que ces contacts influencent l'homéostasie et la fonction des lymphocytes CD4 T_N. En se basant sur l'expression de la protéine Ly-6C, mon équipe a démontré que les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ interagissent plus fortement avec le Soi que leurs homologues Ly-6C⁺, et reçoivent ainsi un « Tonic Signaling » plus fort. De plus, ils ont montré que les interactions TCR-pCMH, en plus d'améliorer quantitativement leur réactivité lors d'une stimulation antigénique, augmentaient la capacité des lymphocytes CD4 T_N Ly-6C⁻ à se différencier en cellules T régulatrices périphériques (pTregs).

En utilisant un modèle de conversion *in vitro* des cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ en Ly-6C⁻, notre étude principale démontre que le Tonic Signaling influence, via la composante calcique de la signalisation TCR, le phénotype et la fonction des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. De façon intéressante, nous avons observé que la signalisation calcique, dépendante de la calcineurine, est en partie responsable de l'acquisition du phénotype des cellules CD4 T_N les plus auto-réactives (Ly-6C⁻). Une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium permet non seulement de convertir une cellule CD4 T_N Ly-6C⁺ en Ly-6C⁻, mais augmente aussi sa sensibilité aux signaux de différenciation en pTregs *in vitro* et *in vivo*. De plus, en utilisant un modèle de transfert adoptif de cellules T CD4⁺ TCR transgénique (AND), nous avons reproduit *in vivo* notre modèle de conversion. Le transfert de ces cellules dans une souris sauvage augmente leur possibilité d'interaction avec les APCs en diminuant la compétition pour le complexe pCMH. Ainsi nous observons une conversion phénotype et fonctionnelle des cellules AND similaire à celle observée lors de nos cultures *in vitro*.

Dans une seconde étude, nous avons comparé les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ aux CD4 T_N CD5^{Hi}. CD5 est un autre marqueur reflétant l'auto-réactivité des lymphocytes T dont l'expression est corrélée à la force du signal TCR reçu. Nous avons observé que malgré quelques différences phénotypiques et fonctionnelles, ces populations de CD4 T_N Ly-6C⁻ ou CD5^{Hi} sont plus sensibles aux signaux de polarisation en pTregs que leurs homologues respectifs Ly-6C⁺ et CD5^{Low}. Grâce à la comparaison des données de RNASeq issues de ces différentes sous

populations de CD4 T_N, nous avons identifié les facteurs de transcription associés aux phénotypes de celles-ci. Parmi ces facteurs, Foxo1 qui est régulé par la signalisation TCR est connu pour jouer un rôle dans la différenciation Treg. Nos expériences semblent prouver que le Tonic Signaling régule via Foxo1 la capacité des lymphocytes CD4 T_N à se différencier en pTregs.

Ainsi, au cours de ma thèse, nous avons pu approfondir nos connaissances sur les voies moléculaires induites par le Tonic Signaling ainsi que son influence sur le phénotype et la fonction des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.

Abstract

Naïve CD4 T cells (CD4 T_N) are generated and educated in the thymus. This education is based on their ability to recognize the Self via the TCR-pMHC (Self peptide-MHCII) interaction with a variable affinity. In the periphery, CD4 T_N cells circulate between the secondary lymphoid organs, where they still interact with the Self via frequent and transient contact with antigen presenting cells (APCs). Several studies have shown that these contacts influence homeostasis and function of CD4 T_N cells. Based on the expression of the Ly-6C protein, my team has shown that CD4 T_N Ly-6C⁻ cells interact more strongly with the Self than their Ly-6C⁺ cells counterparts, and that they receive a stronger "Tonic Signaling". In addition, they showed that TCR-pMHC interactions, increase quantitatively the responsiveness during antigenic stimulation, and the ability to differentiate into peripheral regulatory T cells (pTregs) of CD4 T_N Ly-6C⁻ cells.

Using an *in vitro* conversion model of CD4 T_N Ly-6C⁺ cells into Ly-6C⁻ cells, our main study has shown that the Tonic Signaling, via the calcium pathway of TCR signaling, influences the phenotype and function of naïve CD4 T cells. Interestingly, we have observed that calcineurin-dependent calcium signaling, is partly responsible for the phenotype acquisition of the most self-reactive CD4 T_N cells (Ly-6C⁻). An increase in the intracellular calcium concentration enables both the conversion of CD4 T_N Ly-6C⁺ cells into Ly-6C⁻ cell, and increases their sensitivity to pTregs differentiation signals *in vitro* and *in vivo*. In addition, using an adoptive transfer model of transgenic TCR CD4⁺ T cells (AND), we reproduced *in vivo* our conversion model. The transfer of these cells into a wildtype mouse increases their potential to interact with APCs by decreasing competition for the pMHC complex. Thus we observe a phenotype and functional conversion of AND cells similar to those observed during our *in vitro* cultures.

In a second study, we have compared CD4 T_N Ly-6C⁻ cells to CD4 T_N CD5^{Hi} cells. CD5 is another marker reflecting self-reactivity and its expression is correlated with the strength of the TCR signal received. We have observed, despite some phenotypic and functional differences, that these populations of CD4 T_N Ly-6C⁻ or CD5^{Hi} are more sensitive to pTregs polarization signals than their Ly-6C⁺ and CD5^{Low} respective counterparts. Through comparison of RNASeq data, from these different CD4 T_N cells populations, we have identified the transcription factors associated with their phenotypes. Among these factors, Foxo1- which is regulated by TCR

signaling- is known to play a role in Treg differentiation. Our experiments have proven that the Tonic Signaling regulates via Foxo1 the ability of CD4 T_N lymphocytes to differentiate into pTregs.

The work done during my Phd thesis has therefore allowed a deeper understanding of the molecular pathways induced by the Tonic Signaling as well as its influence on the phenotype and function of naive CD4⁺ T cells.

Mots clefs : Lymphocytes, CD4, auto-réactivité, Ly-6C, Treg, calcium

Mots clefs en anglais : Lymphocytes, CD4, self-reactivity, Ly-6C, Treg, calcium

Remerciements

Je tiens, pour commencer, à remercier les membres de mon Jury. Madame le **Docteur Charvet** et monsieur le **Docteur Olive**, merci d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie pour vos conseils, ainsi que pour le temps que vous avez consacré à lire ce travail. Merci également madame le **Docteur Randriamampita**, monsieur le **Docteur Combadière** et monsieur le **Docteur Joffre** pour avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse. C'est un grand honneur pour moi de tous vous compter parmi mon Jury.

Cédric, tant de choses à dire que je ne sais par où commencer. Ces quatre années à être ton « élève » ou plutôt devrais-je dire ton Padawan auront été riche d'apprentissage tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel. A mon arrivé dans l'équipe je n'avais que des connaissances générales en biologie moléculaire et cellulaire et je voulais découvrir l'immunologie. De par ton intelligence et tes connaissances, tu m'as tout appris dans ce domaine et j'ai réellement développé une passion pour l'étude du système immunitaire. Je ne pourrais dire que je suis spécialiste des lymphocytes T mais grâce à toi j'ai de solides bagages pour la suite de ma carrière et je t'en remercie. A tes côtés j'ai également pu développer une grande rigueur sur la manière de mener un projet, de travailler et d'analyser mes résultats. Je ferai attention cependant à refréner mes pulsions et ne pas me lancer dans une multitude de manips comme nous l'avons souvent fait au cours de ma thèse. Sur le plan personnel, de nombreuses choses se sont passé avec des hauts et des bas bien entendu mais je ne retiendrai que le meilleur et ce qui m'a permis de grandir. Avec moi comme premier thésard cela n'a pas dû être facile non plus pour toi, j'ai un caractère particulier et souvent difficile à cerner comme tu me l'as souvent dit, mais j'espère t'avoir apporté quelque chose aussi. Pour tout cela, pour ta patience et surtout pour la confiance que tu m'as accordé un Grand Merci.

Bruno, ou « Chef » je tiens à vous remercier également. Tout d'abord de m'avoir accueilli dans votre équipe. Finissant mon M2 en Australie et n'ayant que très peu de connaissances en immunologie vous m'avez tout de même accepté et accordé votre confiance au fil des années. Merci pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir, votre connaissance scientifique, votre ouverture d'esprit et votre vision des projets m'ont beaucoup aidé à murir.

Aurélie, Nelly je ne serais vous remercier assez les filles ! Ces quatre années passées dans le même bureau n'auront pas été des plus facile ... pour vous ou pour moi ... j'hésite encore ! Vraiment un grand merci pour tout le soutien que vous m'avez apporté que ce soit pour les manips, les discussions, les ragots ... et surtout cette dernière année qui fut difficile. Vous allez me manquer mais je vous promets de vous rendre visite de temps en temps.

Merci aux anciens membres de l'équipe comme **Alex**, qui aura été une co-thésarde parfaite et à qui je souhaite une belle carrière et plein de bonheur. **Matthieu** aussi je ne t'oublie pas, merci pour ces bons moments et ton humour sans filtre, j'emporte avec moi toute l'armada de grenouille pour conquérir l'Amérique ! Merci aux autres membres de l'équipe, **Arnaud** et **Bruno** pour nos discussions.

Merci aux autres personnes du 8^{ème} comme **Etienne**, je te souhaite plein de réussite et bon courage pour la fin de ta thèse. Mes Choux du 8^{ème}, **Llyod** et **Stéphane**, mes débuts de thèse n'auraient pas été pareils sans vous réellement !! J'ai hâte de vous retrouver de l'autre côté de l'Atlantique !

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de rencontrer au sein de l'institut et avec qui j'ai pu échanger. Merci aux plateformes, en particulier Cybio avec **Muriel**, **Karine** et **Emmanuelle** (qui a changé de ville depuis), je pense que grâce à moi vous devez avoir fait le tour de tous les problèmes qu'il est possible de rencontrer sur les trieurs. La plateforme de Génomique également, **Franck** et **Benjamin** se fut un grand plaisir de travailler avec vous et d'apprendre ainsi la bioinfo. Et pour finir merci à l'Animalerie, d'abord dirigé par **Agnès** et à présent par **Marcio**, ainsi qu'aux animaliers qui ont toujours été d'une grande aide.

Concernant les personnes que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours de ma thèse et de ces années à Paris et qui sont devenue de véritable amis à présent, je m'excuse d'avance si j'en oublie. Je commencerais par remercier **Jecco**, cette association qui m'a permis de croiser de nombreuses personnes, de décompresser autour de nombreuses bières et avec qui j'ai passé de formidable soirée, sans oublier les séjours au ski qui resteront des moments inoubliables.

Avant de parler des personnes rencontrées à Paris, **Charlotte** je tiens à te remercier vraiment. C'est avec toi que j'ai commencé mes études et tu m'as suivie et soutenue de nombreuses années. Nos routes se sont séparées avant la fin de ma thèse mais tu as toujours été et resteras une amie qui compte. Je te souhaite beaucoup de bonheurs pour la suite et je sais que tu réussiras.

Parmi les amis que j'ai rencontrés, **Robin**, **Cyril** merci pour tous les moments partagés (surtout les bières), aux concerts auxquels j'ai pu assister, bonne chance pour la suite et j'espère que le groupe des Lobsters ira loin. **Rozenn**, **Mariangela** merci pour ces moments de joie et de fêtes qu'on a pu avoir, Rozenn on se croisera sûrement à Boston.

Armelle ou comme je préfère t'appeler « ma tite chatte », merci pour ces bons moments partagés et en particulier ces séjours au ski. Je te souhaite que des bonnes choses pour la suite, et je suis sûr que le rythme Suisse te conviendra parfaitement.

Karina et Kevin merci pour tout, j'espère qu'on aura l'occasion de refaire de bons barbecues, ou même de refaire Noël ensemble. Ce fut à chaque fois un grand moment ! Je vous souhaite plein de bonheur et encore félicitation maintenant que la famille s'est agrandie.

Elodie, nos pauses clopes m'ont terriblement manqué pour cette fin de thèse mais tu as toujours été là quand même à d'autres moments et je t'en remercie. On se retrouvera que ce soit au Canada ou à New York.

Anaïs et Tanguy, vraiment mes loulous vous allez me manquer !! Merci pour votre joie de vivre au quotidien, surtout ne changés rien ! Toutes les soirées, les apéros les pics niques n'auraient pas été pareils sans vous. Anaïs je te dis bon courage pour la fin de ta thèse et pour la suite tu verras tout ira bien. Tanguy à toi aussi je souhaite plein de bonheur pour la suite et attention pas de Tour Eiffel sans moi !! Encore un grand merci à vous deux.

Camille, ma grande je crois que je te dois un Grand merci ! Bien évidemment pour avoir été la nounou Number One d'Izea. Tu peux maintenant te considérer comme sa tante. Mais je tiens aussi à te remercier pour tout le reste, nos discussions, nos soirées, ton caractère toujours joyeux ! Une petite pensée particulière pour m'avoir fait connaître de nombreux mangas... parfois très particuliers.

MA YONYON !!! Je ne sais pas comment je pourrais te remercier assez. Je pense qu'on a commencé à se connaître par l'intermédiaire de Lloyd, Stéphane et bien sûr Jecco dont tu as toujours été le cœur pour moi. Par la suite nous sommes devenus de véritables amis, toujours prêts à faire la fête et à entraîner les autres pour passer des soirées mémorables. Mais plus que ça tu es devenu une confidente et un réel soutien. On a partagé tellement de bons moments ensemble que ce soit à Paris, au ski ou en Bretagne et j'ai même pu découvrir une partie de l'Amérique avec toi. Malheureusement, j'ai bien peur qu'avec tout ça tu possèdes de nombreux dossiers sur moi qui j'espère ne verront jamais le jour... Je sais que mon départ n'ait qu'un simple au revoir et que tu viendras rapidement me rendre visite de l'autre côté de l'Atlantique. Je t'attends avec impatience et je te remercie une fois de plus pour la personne que tu es et l'amie que tu es devenue.

Ma belle, mon sucre d'orge, mon petit canari des îles, ma petite tulipe, ... ou Gabriel pour ceux qui ne te connaissent pas comme je te connais. Tu as été l'une de mes plus belles rencontres ! On a mis quelque temps à se découvrir, mais un séjour au ski à dormir dans un canapé lit, à peine assez grand pour nous, aura suffi à nous rapprocher. Réellement merci ma belle pour tout ce que tu as pu m'apporter, ton soutien, ton écoute, tes conseils. Merci également pour tout le reste comme nos bouffes ou nos soirées à deux à faire des chichas, boire des bières et discuter. Sans oublier nos légendaires pauses clopes (les mêmes qu'avec Elo) ... connues de toute l'institut je pense. Enfin pour tout ça et bien plus encore merci. Je sais que l'on restera de très bon ami même si je change de continent et j'ai hâte que tu viennes me visiter à New York.

Milica c'est toi que je voulais remercier en dernier (même si c'était la place de ma belle qui j'espère ne m'en voudra pas trop). Je me rappelle encore de nos premières soirées ensemble à discuter de tout et de rien avec simplement quelques bières et un peu de musique jusqu'à 3h. Et l'une des choses que j'aime avec toi c'est qu'au final rien à changer depuis, on partage toujours ces moments-là, même si le plus souvent c'est au téléphone. Ce n'est pas un secret, j'ai toujours voulu partir aux Etats Unis pour mon post-doc et j'ai finalement trouvé à New York. Je te remercie car, grâce à toi, non seulement je commencerai cette nouvelle étape dans une ville qui m'est presque autant familière que Paris, mais aussi car ça fait presque un an maintenant que je vis déjà sur le fuseau horaire américain. Je pense que tu as été la personne la plus au courant de l'évolution de ma thèse, surtout lors de l'écriture, et pour ça je te remercie vraiment de m'avoir écouté et soutenue tout du long. On a déjà partagé pas mal de chose ensemble, essentiellement les bières c'est vrai mais aussi les soirées, les sorties et je sais qu'on en partagera d'autres. Je te remercie aussi d'avoir adopté Izea et je sais à quel point tu l'aimes, même si tes projets pour elle me terrifient ! Mais comme promis je te la ramène à NY. Merci pour tout baby et je te retrouve à New York.

Pour finir je remercie **ma famille** pour tout le soutien qu'elle m'a apporté depuis le début de mes études. Pas loin de 11 ans de fait après le bac... j'imagine que ça a dû être long aussi pour vous. Maintenant, et grâce à vous, une page se tourne, un nouveau chapitre commence pour moi et je sais que je peux compter sur vous pour me soutenir dans cette nouvelle aventure.

Table des matières

| | |
|---|----|
| ABREVIATIONS | 9 |
| INTRODUCTION | 12 |
| Préambule..... | 13 |
| I. Le TCR..... | 15 |
| 1. Structure du TCR..... | 15 |
| 2. Le complexe TCR/CD3/CD4 | 16 |
| 3. Signalisation sous le TCR | 17 |
| a. Les premiers signaux..... | 17 |
| b. La voie calcique..... | 18 |
| c. La voie des MAPKs..... | 23 |
| d. La voie PI3K/Akt | 24 |
| 4. Les corécepteurs | 27 |
| II. Développement thymique des lymphocytes T..... | 29 |
| 1. Les premières étapes du développement thymique | 29 |
| 2. Première éducation thymique : la sélection positive | 30 |
| 3. Deuxième éducation thymique : la sélection négative | 32 |
| 4. La sélection agoniste | 35 |
| a. Découverte des lymphocytes T régulateurs..... | 35 |
| b. Développement des cellules T régulatrices thymiques..... | 36 |
| 5. Intensité du signal TCR et développement thymique des lymphocytes T..... | 38 |
| III. Homéostasie et fonctions des lymphocytes T CD4 ⁺ | 40 |
| 1. Les lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs..... | 41 |
| a. Fonction des lymphocytes CD4 T _N | 41 |
| b. Homéostasie des cellules CD4 T _N | 41 |
| 2. Les lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires..... | 44 |
| a. Fonction des lymphocytes CD4 T _{mem} | 44 |
| b. Homéostasie des cellules CD4 T _{mem} | 44 |
| 3. Les lymphocytes T CD4 ⁺ régulateurs..... | 45 |
| a. Fonctions des Tregs..... | 45 |
| ➤ Les mécanismes de suppression des Tregs..... | 45 |
| ➤ Les cibles des Tregs..... | 48 |
| b. L'homéostasie des Tregs | 49 |
| 4. La circulation des lymphocytes T CD4 ⁺ en périphérie..... | 51 |

| | | |
|------|--|-----|
| a. | Entrée des LTs par les HEVs..... | 51 |
| b. | Sorties des LTs | 53 |
| IV. | Différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs en effecteurs | 54 |
| 1. | Les lymphocytes Th1 / Th2 / Th9 / Th17 / Th22 / Tfh | 55 |
| a. | Fonctions | 55 |
| b. | Signaux de différenciation..... | 57 |
| 2. | Les lymphocytes pTregs..... | 60 |
| a. | Fonctions | 60 |
| b. | Signaux..... | 61 |
| c. | Régulation de l'expression de Foxp3 | 61 |
| ➤ | Régulation transcriptionnelle..... | 62 |
| ➤ | Régulation épigénétique | 64 |
| V. | Le Tonic Signaling | 68 |
| 1. | Le Tonic Signaling : les marqueurs de l'auto-réactivité..... | 68 |
| a. | Nur77..... | 68 |
| b. | CD5 | 69 |
| c. | Ly-6C..... | 71 |
| 2. | Le Tonic Signaling : effets fonctionnels | 72 |
| a. | Tonic Signaling et réponse des LTs naïfs face à l'antigène | 72 |
| b. | Tonic Signaling et fonction des Tregs..... | 75 |
| c. | Tonic Signaling et différenciation des CD4 T _N | 76 |
| | Problématique..... | 78 |
| | RESULTATS | 80 |
| I. | Article 1 | 81 |
| II. | Quelle(s) modification(s) induite(nt) par le Tonic Signaling augmente la capacité de différenciation des lymphocytes CD4 T _N en iTregs..... | 116 |
| 1. | Comparaison fonctionnelle des lymphocytes CD4 T _N Ly-6C ⁻ et CD5 ^{Hi} | 116 |
| 2. | Analyse du transcriptome des lymphocytes CD4 T _N Ly-6C ⁻ et CD5 ^{Hi} | 119 |
| 3. | Rôle de Foxo1, dans l'homéostasie et la polarisation en iTregs des lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs 124 | |
| III. | Un nouveau modèle pour étudier le Tonic Signaling ? | 127 |
| 1. | Modèle de conversion in vivo des CD4 T _N en cellules Ly-6C ⁻ | 127 |
| IV. | Matériel et méthodes | 131 |
| | DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 135 |

| | | |
|----------------------------|--|-----|
| I. | Etude du Tonic Signaling | 136 |
| 1. | Une signature transcriptionnelle spécifique du Tonic Signaling | 136 |
| 2. | La voie calcique, voie moléculaire dominante du Tonic Signaling..... | 137 |
| 3. | Vers un modèle de conversion in vivo..... | 139 |
| 4. | Perspectives | 139 |
| II. | Auto-réactivité et fonction des CD4 T _N | 141 |
| 1. | Similitudes entre les lymphocytes CD4 T _N Ly-6C ⁻ et CD5 ^{Hi} | 141 |
| 2. | Différences entre les lymphocytes CD4 T _N Ly-6C ⁻ et CD5 ^{Hi} | 142 |
| 3. | Perspectives | 142 |
| III. | Foxo1 dans l'homéostasie et la fonction des CD4 T _N | 143 |
| 1. | Rôle de Foxo1 dans la polarisation en iTreg | 143 |
| 2. | Foxo1 et le Tonic Signaling | 144 |
| 3. | Perspectives | 145 |
| CONCLUSION | | 147 |
| ANNEXES | | 149 |
| Article 2..... | | 150 |
| Article 3..... | | 170 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 185 |

Index des illustrations

| | |
|--|-----|
| Figure 1: Le complexe TCR/CD3 (pour un lymphocyte T CD4 ⁺). | 16 |
| Figure 2: Les premiers signaux de la signalisation TCR. | 18 |
| Figure 3: Les quatre étapes du réseau de la signalisation calcique. | 19 |
| Figure 4: La voie calcique. | 22 |
| Figure 5: La voie des MAPKs. | 24 |
| Figure 6: Voie PI3K/Akt. | 26 |
| Figure 7 : Schéma général du développement des lymphocytes T dans le thymus. | 31 |
| Figure 8 : Sélection thymique en fonction du signal TCR perçue par la cellule..... | 32 |
| Figure 9: Les cellules stromales au cours du développement thymique des lymphocytes T... 34 | |
| Figure 10 : Le développement des lymphocytes T CD4 ⁺ régulateurs thymiques en deux étapes. | 37 |
| Figure 11 : Populations de lymphocytes T CD4 ⁺ conventionnels en périphérie. | 41 |
| Figure 12: La survie des lymphocytes T nécessite à la fois une interaction TCR-pCMH et l'IL-7..... | 43 |
| Figure 13 : Mécanismes de suppression des Tregs. | 47 |
| Figure 14 : Hétérogénéité des cellules T régulatrices (Treg) et suppression de classes distinctes de la réponse immunitaire. | 49 |
| Figure 15: Entré d'un lymphocyte T dans un ganglion. | 52 |
| Figure 16 : La synapse immunologique. | 54 |
| Figure 17 : Différenciation les lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs en effecteurs. | 59 |
| Figure 18: Régulation de l'expression de Foxp3 dans les pTregs. | 64 |
| Figure 19 : L'expression de CD5 reflète l'auto-réactivité des cellules T CD4 ⁺ Tg. | 70 |
| Figure 20 : Expression de Ly-6C dans les lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs..... | 72 |
| Figure 21: Les cellules T LLO56 et LLO118 divergent dans leurs réponses à l'IL-2 à des stimuli spécifiques ou non spécifiques..... | 74 |
| Figure 22 : Polarisation plus efficace des cellules CD4 T _N Ly-6C ⁻ en iTreg. | 77 |
| Figure 23: Différenciation en iTregs des CD4 T _N en fonction de leur auto-réactivité. 116 | |
| Figure 24 : Effet de la rapamycine sur la différenciation en iTregs des CD4 T _N | 117 |
| Figure 25 : Test de sécrétion d'IL-2 des CD4 T _N | 118 |
| Figure 26 : Effet de l'IL-2 sur la polarisation iTreg des CD4 T _N | 119 |

| | |
|---|-----|
| Figure 27 : Profile transcriptionnel des lymphocytes CD4 T _N en fonction de leur auto-réactivité..... | 122 |
| Figure 28 : Analyse GSEA des facteurs de transcription régulés par le TCR. | 123 |
| Figure 29 : Distribution de Ly-6C parmi les CD4 T _N Foxo1 ^{TKO} et Foxo1 ^{Ctrl} | 124 |
| Figure 30 : Effet de Foxo1 sur la différenciation des CD4 T _N en iTregs. | 125 |
| Figure 31 : Foxo1 dans la polarisation des cellules CD4 T _N plus ou moins auto-réactives... | 126 |
| Figure 32 : Conversion in vivo de cellules CD4 T _N Ly-6C ⁺ en Ly-6C ⁻ | 128 |
| Figure 33 : La conversion in vivo de cellules CD4 T _N Ly-6C ⁺ en Ly-6C ⁻ est dépendante du CMHII. | 129 |
| Figure 34 : La conversion in vivo des CD4 T _N augmente leur potentiel de différenciation en iTregs..... | 130 |

ABREVIATIONS

Akt : protein kinase B
APC : Cellule Présentatrice d'Antigène (Antigen Presenting Cell)
Ca²⁺ : Calcium
CaM : CalModuline
CD : Cluster de Différenciation (Cluster of Differentiation)
CD4 T_{mem} : T CD4⁺ mémoire
CD4 T_N : T CD4⁺ naïve
cDC : Cellules Dendritiques conventionnelles (conventional Dendritic Cell)
CDR : Complementarity Determining Region
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CN : CalciNeurine
CNS : Conserved Noncoding DNA Sequence
CREB : Cyclic-AMP-Responsive-Element-Binding protein
CsA : Cyclosporine A
cTEC : Cellules Epithéliales corticales Thymiques (cortical thymic epithelial cell)
DAG : Diacylglycerol
DC : Cellules Dendritiques (Dendritic Cell)
DN : Double Négatif
DP : Double Positif
EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
Erk : Extracellular signal-regulated kinase
Foxo : Forkhead box de classe O
FTO : Fetal Thymic Organ Culture
Foxp3 : Forkhead box p3
GSK3 : Glycogène Syntase Kinase 3
HEV : High Endothelial Venules
IBD : Inflammatory Bowel Disease
IFN γ : InterFéron gamma
Ig : Immunoglobuline

IKK : IκB Kinase
IL : InterLeukine
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
iTreg : Lymphocyte T CD4⁺ régulateur induit in vitro
JNK : Jun kinase
LAT : Linker for Activation T cells
Lck : Leukocyte-specific tyrosine Kinase
LIP : Lymphopenia-Induced Proliferation
LT : Lymphocyte T
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
mTEC : Cellules Epithéliales médullaires Thymiques (medullary Thymic Epithelial Cell)
mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
p38 : Protein kinase of 38 kDa
pCMH : peptide du Soi-CMHII
pDC : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes (plasmacytoid Dendritic Cell)
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol BisPhosphate
PKC : Protéine Kinase C
PLCγ1 : Phospholipase C gamma 1
pTreg : Lymphocyte T CD4⁺ régulateur périphérique
RAG : Recombinason Activating Genes
RE : Réticulum Endoplasmique
Runx : Runt-related transcription factor
S1PR1 : Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1
SERCA : Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase
SH2 : Src-Homology-2
SLO : Organes Lymphoïdes Secondaires (Secondary Lymphoid Organ)
SP : Simple Positif
STAT : Signaling Transducer and Activator of Transcription
TCR : Récepteur aux Lymphocytes T (T Cell Receptor)
TCR_ζ : chaîne ζ du TCR

TEC : Cellules Epithéliales Thymiques (Thymic Epithelial Cell)

TF : Facteur de Transcription (Transcription Factor)

TGF β : Transforming Growth Factor beta

Th : Lymphocyte T auxiliaire (T helper)

TRA : Tissue Restricted Antigens

Treg : Lymphocyte T CD4⁺ régulateur

tTreg : Lymphocyte T CD4⁺ régulateur thymique

Zap70 : Zeta-Activated Protein of 70 kDa

INTRODUCTION

Préambule

La fonction du système immunitaire est de protéger l'organisme contre une grande variété d'éléments étrangers. Pour cela, de nombreuses stratégies défensives se sont développées au cours de l'évolution pour atteindre un niveau très complexe, en particulier chez les mammifères. L'une des particularités du système immunitaire est sa capacité à distinguer les antigènes provenant de l'organisme, « le Soi », ou de micro-organisme étrangers, « le non-soi ». Le Dr F.M. Burnet (Burnet, 1969) a été l'un des premiers immunologistes à définir ces termes à travers la théorie selon laquelle le système immunitaire réagit contre tout organisme étranger (le non-soi) mais ne déclenche pas de réponse contre toute entité qui lui est propre (le Soi). Cette théorie s'avère cependant incomplète puisqu'elle ne permet pas d'expliquer certains phénomènes immunitaires tels que l'auto-immunité ou encore la tolérance face aux bactéries commensales et foëto-maternelles. En 1994, Polly Matzinger (Matzinger, 1994) soumet une théorie basée sur la notion de danger. Elle propose que toute réponse immunitaire soit due à une réponse face aux signaux de danger émis par les cellules ou les tissus endommagés. Cette théorie semble plus en adéquation avec le système immunitaire mais reste également incomplète, sa définition du danger n'étant pas adaptée aux réponses contre les tumeurs par exemple. Ainsi, au cours du temps, plusieurs théories ont été élaborées pour définir les mécanismes mises en place lors d'une réponse immunitaire. Une meilleure compréhension des acteurs de cette réponse a permis de rendre ces théories de plus en plus précises.

Le système immunitaire comprend de nombreux acteurs qui, suivant leurs fonctions, font partie de l'immunité innée ou adaptative. L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme. Ces principaux acteurs, les cellules phagocytaires ou encore les cellules NK (Natural Killer), permettent de mettre en place une réponse rapide et efficace. L'immunité adaptative quant à elle intervient plus tardivement avec les lymphocytes B et T qui mettent en place une réponse immunitaire spécialisée. Ces cellules sont capables de reconnaître spécifiquement un antigène grâce à leurs récepteurs. Les lymphocytes B expriment le BCR (B Cell Receptor) tandis que les lymphocytes T expriment le TCR (T Cell Receptor). En plus de reconnaître un antigène spécifique, les lymphocytes T sont également éduqués à reconnaître le Soi au cours de leur développement dans le thymus. Cette reconnaissance se fait via l'interaction entre leur TCR et le complexe peptide du Soi-CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) exprimé par les cellules épithéliales thymiques et les cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi au cours du développement thymique, les sélections positives et négatives permettent de générer des lymphocytes T matures auto-réactifs possédant une

affinité réelle pour le Soi mais située sous le seuil entraînant leur activation. Une fois en périphérie, ces cellules T circulent entre les différents organes lymphoïdes secondaires où elles vont recevoir des signaux provenant également de cette reconnaissance du Soi. C'est ce que l'on appelle le « Tonic Signaling ». Ce dernier est maintenant connu pour jouer un rôle dans la survie et la fonction des lymphocytes T. Depuis plusieurs années, les travaux de recherche menés sur ce sujet s'efforcent de disséquer les voies moléculaires induites par le Tonic Signaling afin de mieux comprendre les différences observées entre les cellules T les plus et moins auto-réactives. Ainsi, je commencerai ce manuscrit en présentant la signalisation TCR. Je parlerai ensuite de l'éducation thymique des lymphocytes T et de leur homéostasie en périphérie. Pour finir, je reviendrai sur les connaissances actuelles du Tonic Signaling et ses effets avant d'exposer mes travaux.

I. Le TCR

Le récepteur aux lymphocytes T (TCR) fut découvert et isolé pour la première fois en 1983 (Haskins et al., 1983). Il permet aux lymphocytes T (LTs) de reconnaître le complexe formé par un peptide associé à une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), qui est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (APC). Cette interaction joue un rôle central au cours du développement thymique des LTs et est essentielle pour l'homéostasie et l'activation de ces cellules en périphérie. Du fait de la variabilité des chaînes α/β ou γ/δ qui composent le TCR, l'organisme possède un répertoire lymphocytaire très diverse. La diversité $\text{TCR}_{\alpha/\beta}$ est estimée à 2.10^6 clones chez la souris (Casrouge et al., 2000) et à 2.10^7 chez l'homme (Naylor et al., 2005), ce qui permet la reconnaissance d'une multitude d'antigènes. Chaque clone est représenté par 20 à 200 LTs qui expriment plusieurs milliers de copies du même TCR à leur surface (Moon et al., 2007). Les TCRs d'un clone sont spécifiques du même antigène et cette spécificité est assurée par la structure 3D du récepteur qui est due aux parties variables du TCR.

1. Structure du TCR

Le TCR est un hétérodimère composé d'une chaîne α et β pour 95% des cellules T ou d'une chaîne γ et δ pour les 5% restants. Ces chaînes appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Elles possèdent un domaine extracellulaire, avec une partie variable responsable en grande partie de la spécificité antigénique du récepteur et une partie constante, un domaine transmembranaire et enfin une portion cytoplasmique. La partie variable des chaînes α et δ est codée par des gènes associant des segments V (Variable) et J (Joining) tandis que celle des chaînes β et γ y associe un segment D (Diversity) supplémentaire. Lors de la recombinaison V(D)J, qui a lieu durant le développement thymique des LTs, l'arrangement des segments ainsi que l'addition ou délétion aléatoires de nucléotides au niveau des jonctions va engendrer une grande diversité de séquences à l'origine de l'extrême diversité du répertoire TCR.

Chaque chaîne possède également 3 boucles hypervariables appelées CDR (Complementarity Determining Region) qui sont nécessaires pour l'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH. Les CDR 1 et 2 sont impliqués dans la reconnaissance du CMH tandis que le CDR3, qui est le plus variable, est essentiel pour la reconnaissance du peptide présenté par le CMH.

Enfin, l'extrémité cytoplasmique du récepteur, étant très courte, elle ne peut à elle seule relayer la transduction du signal. C'est pourquoi le TCR forme un complexe avec le CD3 (Cluster de Différenciation 3) afin d'apporter ce signal au reste de la cellule.

2. Le complexe TCR/CD3/CD4

Le complexe TCR/CD3 est un complexe protéique octamérique composé du TCR, avec ses deux chaînes, et de trois dimères formés par les chaînes du CD3, CD3 δ/ϵ , CD3 γ/ϵ et CD3 ζ/ζ (ou CD247). Ces chaînes, qui font également partie de la superfamille des Igs, ont un domaine extracellulaire, une région transmembranaire chargée négativement s'associant au TCR dont la partie transmembranaire est chargée positivement et un domaine intracellulaire possédant un ou plusieurs motifs particuliers appelés ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Ces motifs sont essentiels pour la transduction du signal, les chaînes ϵ , δ , et γ contiennent un motif ITAM tandis que les chaînes ζ en ont trois. En plus de ce complexe les LTs expriment également un corécepteur CD4 ou CD8 qui se lie au CMH de classe II ou I respectivement. Ces corécepteurs participent à la transduction du signal, le renforcent et prolongent l'interaction entre lymphocyte T et APC (Zamoyska, 1998) (Figure 1).

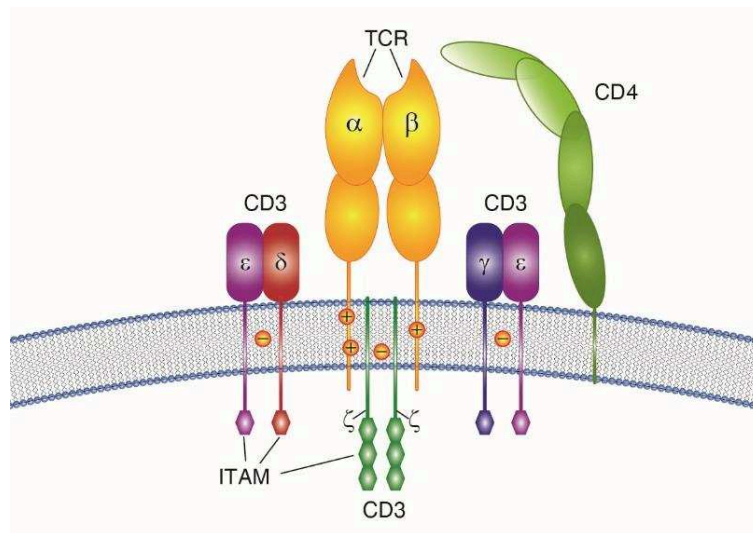


Figure 1: Le complexe TCR/CD3 (pour un lymphocyte T CD4⁺).

Le complexe du récepteur aux cellules T (TCR) est composé du TCR, un hétérodimère α/β ; deux chaînes ϵ du CD3, une qui dimérise avec une chaîne γ , une autre avec une chaîne δ ; et un homodimère CD3 ζ/ζ . La région transmembranaire des CD3 chargée négativement s'associe avec la partie transmembranaire du TCR qui est chargée positivement. Les motifs ITAMs des parties cytoplasmiques des CD3 assurent la transduction du signal lors de l'activation du TCR. Le corécepteur CD4 lui assure la liaison avec le CMHII et participe aussi à la transduction du signal.

3. Signalisation sous le TCR

a. Les premiers signaux

Lors d'une interaction entre une APC et un lymphocyte T, la reconnaissance du complexe peptide/CMH par le TCR va activer ce dernier. Cette activation va engendrer un changement de conformation du complexe TCR/CD3 pour faciliter la phosphorylation des chaînes du CD3 et le recrutement de protéines (Alarcón et al., 2003). Chaque motif ITAM contient 2 tyrosines qui sont phosphorylées par la protéine kinase Lck (Leukocyte-specific tyrosine Kinase). Cette protéine fait partie de la famille des tyrosines kinases Src et est associée au corécepteur CD4. Ainsi lors de l'interaction, le CD4 interagit avec le CMHII et permet le recrutement de Lck au niveau du complexe TCR/CD3. Les ITAMs phosphorylés vont à leur tour pouvoir recruter la protéine kinase Zap70 (Zeta-Activated Protein of 70 kDa), qui fait partie de la famille des kinases Syk, via son domaine SH2 (Src-Homology-2) (Kane et al., 2000). Une fois recrutée, Zap70 est activée par Lck et phosphoryle LAT (Linker for Activation T cells), une protéine adaptatrice associée à la membrane que l'on qualifie souvent de plateforme, car elle est à l'origine de plusieurs voies moléculaires (Malissen et al., 2014).

En effet, après activation LAT recrute des protéines adaptatrices comme GADs (Grb2-related ADapter protein2) et Grb2 (Growth-factor-receptor-bound protein 2) qui à leur tour permettent la liaison de SLP-76 (SH2-domain-containing Leukocyte Protein of 76 kDa) et SOS (exchange factor Son Of Sevenless) respectivement. La phospholipase C gamma 1 (PLC γ 1) peut ainsi lier directement LAT/SLP-76 et hydrolyser le PIP2 (Phosphatidylinositol BisPhosphate), un phospholipide associé à la membrane, pour produire du diacylglycerol (DAG), un lipide qui demeure inclus dans la membrane, et de l'inositol triphosphate (IP3), un second messager diffusible. IP3 active par la suite la voie calcique tandis que DAG intervient dans la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) via Ras et la voie NF κ b (figure 2). Ras peut aussi être activée via SOS, qui est recrutée grâce au complexe LAT/Grb2. De plus SLP76 lie directement ITK (Interleukin-2-inducible T-cell Kinase), de la famille des kinases Tec, qui est essentiel dans la phosphorylation et l'activation de PLC γ 1. Enfin SLP76 peut recruter Vav, un facteur d'échange nucléotidique de guanine (GEF), qui active les GTPases Rac et Cdc42 (Samelson, 2002).

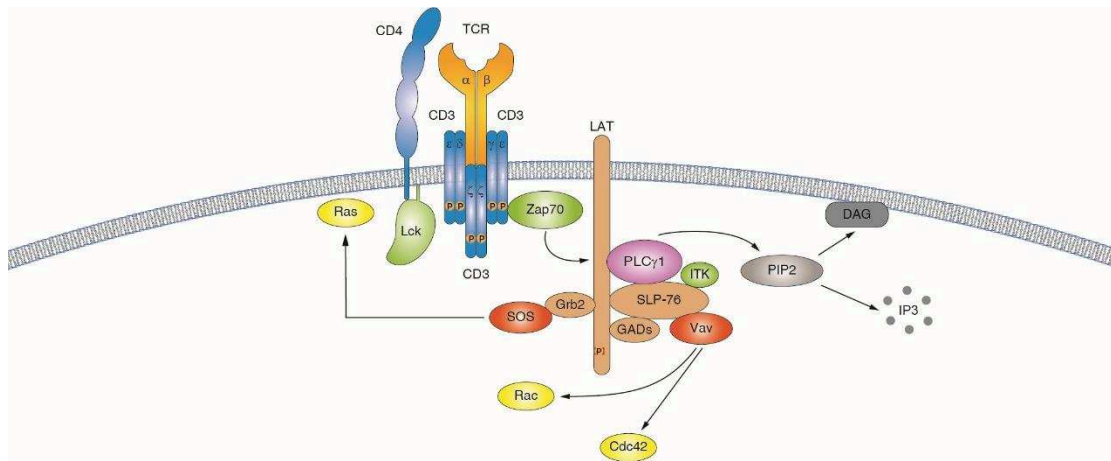


Figure 2: Les premiers signaux de la signalisation TCR.

Suite à l'activation du TCR, les motifs ITAMs des chaînes du CD3 sont phosphorylés par Lck, une kinase recrutée par le CD4. Zap70 se lie alors aux ITAMs, est phosphorylée et active la protéine adaptatrice LAT qui est le point de départ de plusieurs voies moléculaires. Une autre protéine adaptatrice, SLP-76, et le facteur d'échange SOS sont ensuite recrutés via GADs et Grb2 respectivement. La phospholipase PLC γ 1 peut ainsi se lier au complexe LAT/SLP-76 pour hydrolyser le PIP2. ITK, une kinase essentielle à la phosphorylation et l'action de la PLC γ 1, est aussi recruté via SLP-76. L'hydrolyse de PIP2 produit l'IP3, un second messager activant la voie calcique, et le DAG, un lipide membranaire impliqué dans la voie NF κ b et la voie des MAPK. Les GTPases Ras et Rac impliquées aussi dans la voie des MAPK sont activées via SOS et Vav respectivement. Cdc42, activé par Vav, est impliqué dans plusieurs processus tel que le cycle cellulaire.

b. La voie calcique

Le calcium (Ca^{2+}) est un signal ubiquitaire contrôlant de nombreux processus dans tous les types cellulaires. De manière générale la signalisation calcique peut être divisée en quatre étapes. Tout d'abord un stimulus va générer des signaux afin de mobiliser le Ca^{2+} . Dans un second temps, on observe une entrée massive de calcium dans le cytoplasme provenant des stocks ou du milieu extracellulaire. La concentration calcique augmente alors jusqu'au seuil d'activation. Puis le Ca^{2+} agit en tant que second messager pour activer plusieurs processus sensibles aux variations de concentration calcique. Pour finir le système revient à l'état basal grâce aux pompes et échangeurs présents sur les différentes membranes de la cellule, qui vont rétablir le niveau de calcium cytoplasmique basal (figure 3).

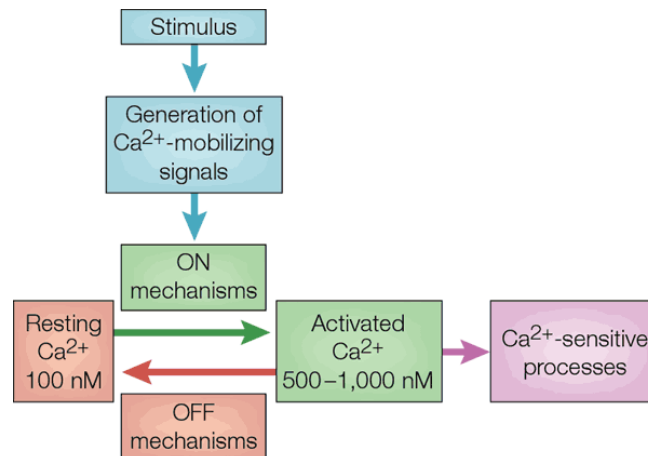


Figure 3: Les quatre étapes du réseau de la signalisation calcique.

Les stimuli agissent en générant des signaux mobilisateurs de Ca^{2+} . Ces signaux agissent à leur tour sur divers mécanismes ON pour déclencher une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . L'augmentation du niveau de Ca^{2+} stimule divers processus sensibles au Ca^{2+} pour déclencher de nombreuses voies cellulaires différentes. La réponse est terminée par des mécanismes OFF qui rétablissent le niveau de repos de Ca^{2+} . Issue de (Berridge et al., 2000).

Le calcium peut avoir plusieurs actions et être à l'origine de plusieurs voies moléculaires en fonction du type cellulaire que l'on étudie. Par exemple les cellules musculaires utilisent le calcium pour la contraction ou la glycolyse, qui permet la génération d'ATP. Les neurones l'utilisent pour l'exocytose, la transcription de gènes ou la potentialisation et la dépression à long terme, des processus impliqués dans l'apprentissage et la mémoire. Le pancréas aussi où le Ca^{2+} participe à la sécrétion de fluides et d'enzymes (Berridge et al., 2000). Pour les cellules du système immunitaire également, le calcium tient un rôle très important dans le développement, la différenciation, la mobilité ou la fonction. Le tableau 1 ci-dessous récapitule le rôle de la signalisation calcique dans les cellules du système immunitaire.

Du fait de son importance, le calcium est un second messager dont la concentration intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) est constamment régulée dans les lymphocytes T. Cette régulation se fait à plusieurs niveaux par des échanges à la fois entre les stocks intracellulaires (réticulum endoplasmique et mitochondries) et le cytoplasme et entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme. A l'état basal la cellule a une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 50-100 nM. Cette concentration est maintenue grâce à plusieurs pompes calciques telles que PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase), NCX (electrogenic Na^+ - Ca^{2+} eXchangers) et SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase). Lors de l'activation des lymphocytes ce niveau peut augmenter jusqu'à 500 nM provoquant une cascade de signalisation.

| Type cellulaire | Fonctions |
|------------------------------------|--|
| Lymphocyte T, Treg et cellules NKT | Développement, différenciation, activation, anergie, motilité, formation de la synapse immunologique, cytotoxicité |
| Lymphocytes B | Maturation, activation |
| Mastocytes | Dégranulation, sécrétion d'histamine |
| Cellules NK | Activité cytolytique en réponse à la reconnaissance de la cellule cible |
| Cellules Dendritiques | Maturation des DCs à partir de progéniteurs myéloïdes, expression du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation, migration des DCs immature dans les organes lymphoïdes secondaires |
| Macrophages | Expression de cytokines pro-inflammatoire, expression du TNF et d'iNOS, phagocytose |
| Neutrophiles | Phagocytose |

Tableau 1 : Rôle du calcium dans les cellules du système immunitaire.

Adapté de (Feske, 2007)

Suite aux premiers signaux d'activation du TCR, l'IP3 produit par la phospholipase C γ 1 va lier son récepteur IP3R situé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). IP3R est constitué de quatre sous-unités formant un tétramère qui, après liaison de l'IP3, change de conformation et provoque le relargage des stocks de Ca $^{2+}$ du RE dans le cytoplasme (Berridge, 2016) augmentant ainsi la [Ca $^{2+}$]_i. Cependant cette augmentation n'est pas suffisante et soutenue pour activer complètement les LTs, pour cela un apport depuis l'extérieur de la cellule est nécessaire. Les protéines STIM 1 et 2 que l'on trouve sur la membrane du RE sont les senseurs du Ca $^{2+}$ intra-réticulum (Liou et al., 2005). Lorsque les stocks du RE se vident, les protéines STIM forment des oligomères qui vont se déplacer sur la membrane jusqu'au site le plus proche de la membrane plasmique. Ici elles ouvrent les canaux CRAC (Calcium Release-Activated Calcium) composés de 4 protéines transmembranaires ORAI et qui permettent l'entrée du calcium depuis le milieu extracellulaire (Zhang et al., 2005). Cette fois-ci l'augmentation de [Ca $^{2+}$]_i qui en résulte active le senseur du calcium cytoplasmique, la calmoduline (CaM) (Chin and Means, 2000) qui à son tour active la calcineurine (CN). Cette phosphatase va alors dé-phosphoryler ces cibles dont le facteur de transcription (TF) NFAT.

NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), d'abord identifié pour son rôle dans l'expression de l'IL-2 (Shaw et al., 1988), est un TF clé dans la régulation des lymphocytes. La famille NFAT est composée de cinq membres. NFAT1 (ou NFATc2), NFAT2 (ou NFATc1), NFAT3 (ou NFATc4) et NFAT4 (ou NFATc3) sont localisés dans le cytoplasme à l'état basal et leur translocation nucléaire est régulée par le calcium via leur déphosphorylation par la calcineurine (Macian, 2005). NFAT5 quant à lui peut être détecté à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau en condition isotonique et son transport nucléocytoplasmique est régulé par les

changements de tonicité extracellulaire (Tong et al., 2006). Une fois dans le noyau NFAT régule l'expression de nombreux gènes. En effet, alors que 75% des gènes exprimés ou réprimés lors de l'activation du TCR sont dépend du calcium, l'utilisation d'inhibiteur de la calcineurine comme la cyclosporine A (CsA) et le FK506, empêchant la translocation de NFAT (Kiani et al., 2000; Timmerman et al., 1996), a permis de mettre en évidence la régulation d'une grande partie de ces gènes par NFAT (Feske et al., 2001). Cependant il n'assure pas seul cette régulation et a de nombreux partenaires dans le noyau. Sa liaison et coopération avec d'autres facteurs de transcription permettent l'intégration de différentes voies de signalisation afin d'activer des programmes spécifiques. Par exemple lors de la différenciation des lymphocytes T en effecteurs, NFAT interagit avec plusieurs TFs pour permettre l'expression de cytokines spécifiques (tableau 2). Les échanges de NFAT entre le noyau et le cytoplasme sont des processus régulés de façon très dynamique. L'arrêt du signal calcique engendre rapidement la phosphorylation de NFAT, par des kinases telles que GSK3 (Glycogène Syntase Kinase 3) ou CK1 (Casein Kinase 1), qui passe alors sous sa forme inactive et entraîne sa translocation vers le cytoplasme. Ainsi un signal calcique prolongé est nécessaire pour maintenir NFAT dans le noyau sous sa forme active.

| Partenaire de transcription | Site d'interaction | Effet |
|-----------------------------|---|----------------------------------|
| AP-1 (FOS, JUN) | Promoteurs de plusieurs de gènes de cytokines | Synergie positive |
| C/EBP | Promoteur de PPAR- γ | Synergie positive |
| MAF | Promoteur de l'Il-4 | Synergie positive |
| EGR1 et EGR4 | Promoteur du Tnf | Synergie positive |
| GATA3 | Enhancer 3' de l'Il-4 | Synergie positive |
| ICER | Promoteurs de plusieurs de gènes de cytokines | Inhibition de l'activité de NFAT |
| IRF4 | Promoteur de l'Il-4 | Synergie positive |
| MEF2 | Promoteur de NUR77 | Synergie positive |
| OCT | Enhancer de l'Il-3 | Synergie positive |
| p21 ^{SNFT} | Promoteur de l'Il-2 | Inhibition de l'activité de NFAT |
| PPAR- γ | Promoteur de l'Il-2 | Inhibition de l'activité de NFAT |
| T-bet | Enhancer 5' de l'Ifn- γ | Synergie positive |

Tableau 2 : Les partenaires de transcription de NFAT.

AP-1, activator protein 1; C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; EGR, early growth response; GATA3, GATA-binding protein 3; ICER, inducible cyclic AMP early repressor; Ifn- γ , interferon- γ ; Il, interleukin; IRF4, IFN-regulatory factor 4; MEF2, myocyte-enhancer factor 2; NFAT, nuclear factor of activated T cells; NUR77, orphan nuclear receptor 77; OCT, octamer-binding transcription factor; p21^{SNFT}, 21-kDa small nuclear factor isolated from T cells; PPAR- γ , peroxisome- proliferator-activated receptor- γ ; Tnf, tumour-necrosis factor. Adapté de (Macian, 2005).

L'effet de la calcineurine n'est cependant pas restreint à l'activation de NFAT. D'autres études ont montré son implication dans la voie NF- κ b, où elle synergise avec la protéine kinase C pour activer le complexe IKK permettant la translocation nucléaire de NF- κ b (Trushin et al., 1999). En plus de la CN, le complexe Ca^{2+} /calmoduline a d'autres cibles telles que les protéines kinases Ca^{2+} /calmoduline-dépendante CaMKII et CaMKIV. Elles permettent la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription tels que CREB (Cyclic-AMP-Responsive-Element-Binding protein) et MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) (Figure 4). Pour finir d'autres études ont montré que le calcium a un rôle important sur l'activité de Ras, une GTPase impliqué dans la signalisation des MAP kinases comme Erk ou JNK (Cullen and Lockyer, 2002).

Toutes ces voies sont donc sensibles aux changements de concentration intracellulaire de Ca^{2+} . De plus, leur l'activation est également dépendante de l'intensité et de la durée des flux calciques perçus par les lymphocytes T. En effet, alors que l'activité de NFAT nécessite un flux calcique prolongé avec de faibles pics calciques répétés, celle de NF- κ b ou JNK requiert un flux calcique court mais fort (Dolmetsch et al., 1997, 1998).

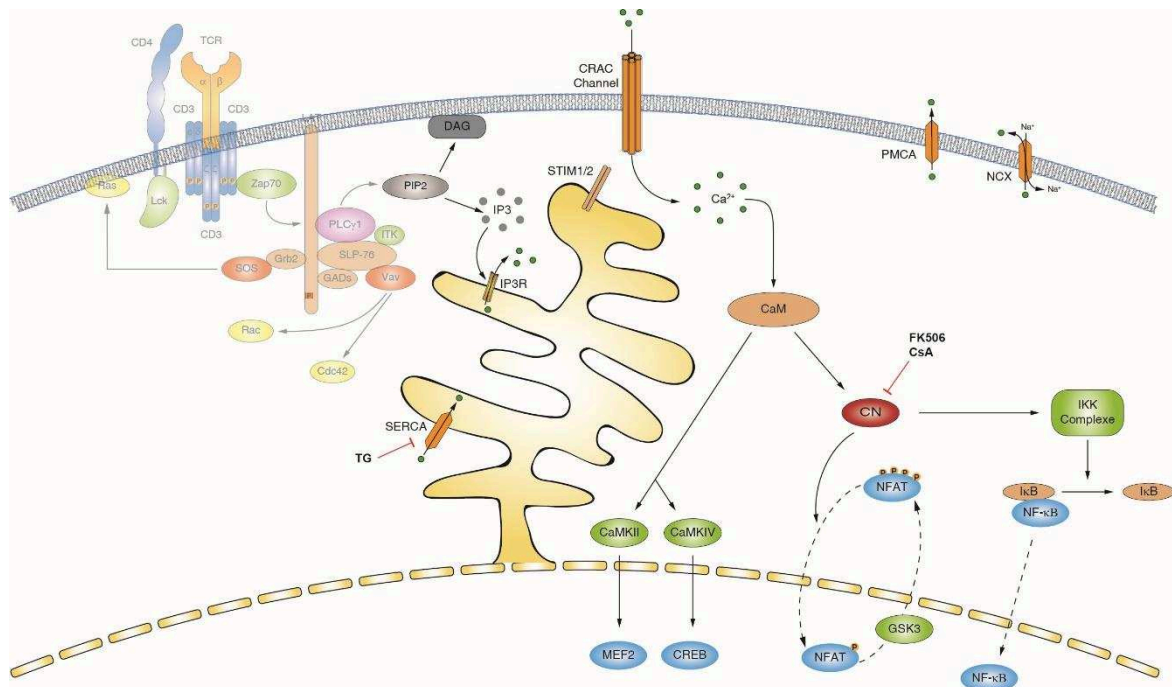


Figure 4: La voie calcique.

Suite à l'activation du TCR la PLC γ 1 hydrolyse le PIP2 pour produire du DAG et de l'inositol triphosphate (IP3). IP3 permet le relargage du calcium intra-réticulum (RE) en se liant à son récepteur IP3R. Lorsque les stocks calciques du RE diminuent, les protéines senseurs STIM 1 et 2 forment des oligomères, se déplacent sur la membrane du RE pour activer les canaux CRACs situés sur la membrane

plasmique. Cela engendre une entrée de Ca^{2+} dans le cytosol depuis le milieu extracellulaire. La concentration intracellulaire de calcium augmente alors entraînant l'activation de protéines sensibles au Ca^{2+} comme la calmoduline (CaM). CaM active à son tour la calcineurine (CN) qui va déphosphoryler NFAT et permettre sa translocation nucléaire. La CN joue également un rôle dans la voie NF- κ B par l'activation du complexe IKK. Le complexe Ca^{2+} /CaM active également les protéines CaMKs (Ca²⁺/calmoduline-dépendante Kinase), qui activent les facteurs de transcription CREB, MEF2. A l'état basal la concentration calcique est régulée constamment par des échanges entre le milieu extracellulaire, le cytosol et les stocks grâce à plusieurs pompes : PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase), NCX (electrogenic Na^+ - Ca^{2+} eXchangers) et SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase). Le FK506 et la cyclosporine A (CsA) permettent d'inhiber la calcineurine. La thapsigargine (TG) inhibe la pompe SERCA induisant une augmentation du calcium intracellulaire.

c. La voie des MAPKs

Le second produit de la PLC γ 1, le diacylglycerol, est en grande partie à l'origine de l'activation la voie des MAPKs qui sont impliquées dans plusieurs processus biologiques comme la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire. DAG recrute à la membrane les protéines kinases C- θ (PKC θ) et RasGRP (RAS Guanyl nucleotide-Releasing Protein).

PKC θ active un complexe protéique formé de CARMA1 (Caspase Recruitment domain-containing Membrane-Associated guanylate kinase protein 1), Bcl10 (B-Cell Lymphoma 10) et MALT1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation gene 1). Ce complexe avec l'aide de MEKK1 (MEK Kinase1) active un autre complexe, IKK (I κ B Kinase). IKK ubiquitine ensuite I κ B, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. I κ B séquestre NF- κ B dans le cytoplasme à l'état basal, l'activation de cette cascade de signalisation permet la libération de NF- κ B et sa translocation dans le noyau.

La protéine RasGRP quant à elle active Ras, une petite GTPase au centre de trois voies de signalisation MAPK. Une fois activée, Ras s'associe à des MAPK kinase kinases comme Raf pour l'une des voies ou MEKK1 pour les deux autres voies. L'association avec MEKK1 nécessite l'addition de Rac, une autre GTPase activée par Vav. Ces complexes protéiques activent ensuite des MAPK kinases ; ERK kinase (MEK) pour Raf, JNK kinase (JNKK) et MAPK kinase 3/6 (MKK3/6) pour MEKK1. Pour finir ces MAPK kinases vont activer les MAPK effectrices Erk (Extracellular signal-Regulated Kinase), JNK (Jun Kinase) et p38 (Protein kinase of 38 kDa) respectivement. Toutes les trois conduisent entre autre à l'activation par phosphorylation des TFs Fos et Jun qui par leur association forment le facteur de transcription AP-1 (Rincón et al., 2001) (figure 5).

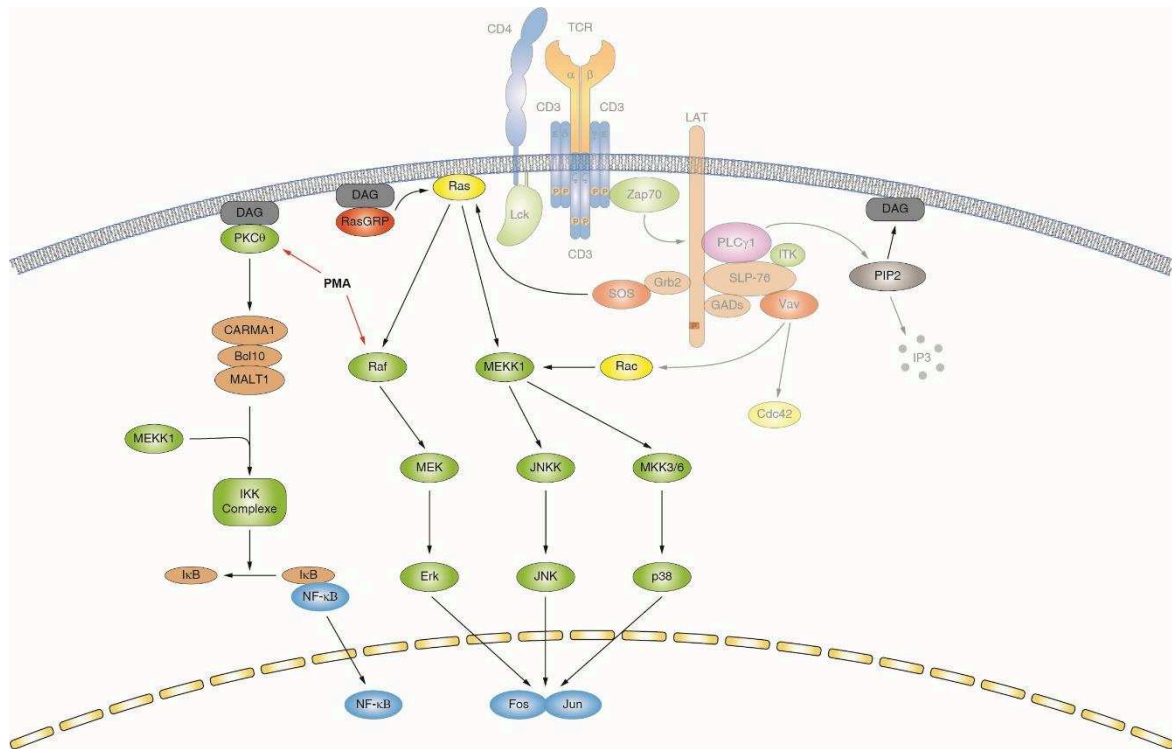


Figure 5: La voie des MAPKs.

Suite à l'activation du TCR la PLC γ 1 hydrolyse le PIP2 pour produire l'IP3 et le diacylglycerol (DAG). DAG recrute la PKC θ (Protein Kinase C- θ) à la membrane plasmique qui active un complexe formé de trois protéines : CARMA1/Bcl10/MALT1. Ce complexe et la protéine kinase MEKK1 (MEK Kinase 1) activent un autre complexe, IKK (I κ B Kinase) qui permet la dégradation par le protéasome d'I κ B. Une fois I κ B dégradé le facteur de transcription NF- κ B va pouvoir transloquer dans le noyau. DAG recrute également RasGRP (RAS Guanyl nucleotide-Releasing Protein) qui active la GTPase Ras. Ras est le point de départ de trois cascades de signalisation qui font intervenir les MAP kinases. L'association avec Raf active MEK puis Erk (Extracellular signal-Regulated Kinase). L'association avec MEKK1, qui nécessite Rac, active les kinases JNKK et MKK3/6 qui aboutissent à l'activation de JNK (Jun Kinase) et p38 (Protein kinase of 38kDa) respectivement. Les MAPK effectrices Erk, JNK et p38 phosphorylent et activent les TFs Fos et Jun qui en s'associant forme AP-1. Le Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) permet l'activation des voies NF- κ B et Erk.

d. La voie PI3K/Akt

Je terminerai cette description des voies de signalisation sous le TCR en évoquant la voie PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) / Akt (proteine kinase B) qui régule également plusieurs processus cellulaires importants. La PI3K peut être activée via le TCR par la protéine Ras ou par les récepteurs à tyrosine kinase comme les corécepteurs ou les récepteurs à interleukines (IL). Elle permet la production d'un second messager, le PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triPhosphate), qui recrute la kinase Akt aux abords de la membrane plasmique où elle peut être phosphorylée et activée par PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1). Akt peut alors activer ou

inhiber différentes cibles par phosphorylation. Je ne détaillerai que les principales, en rapport avec mes travaux.

La première cible est le complexe TSC1/2 (Tuberous Sclerosis Proteins 1/2), le répresseur principal de mTORC1. Akt inhibe ce complexe provoquant l'activation de la voie mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) qui se divise en deux complexes : mTORC1 où mTOR est associée à RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of mTOR) et mTORC2 où elle est associée à RICTOR (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR). Ils finissent par activer les protéines 4E-BP1 (eIF4E Binding Protein) / S6K (p70S6-Kinase) et PKC respectivement (Hay, 2004). De plus le complexe mTORC2 a également été décrit comme phosphorylant Akt sur la sérine 473, permettant son l'activation complète (Dan et al., 2016).

La seconde cible est GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), une kinase clé dans la production de cytokines pro et anti-inflammatoire. Elle peut phosphoryler et activer plusieurs facteurs de transcription comme CREB, JUN, NF- κ B ou encore les STATs 1,3 et 5 (Signaling Transducer and Activator of Transcription 1, 3 and 5) (Wang et al., 2011). Un autre de ses rôles est la phosphorylation de NFAT provoquant ainsi son export nucléaire. Ainsi en phosphorylant GSK3, Akt l'inhibe et favorise indirectement une activation plus soutenue de NFAT.

La dernière cible d'Akt que je présenterai est Foxo (Forkhead box de classe O), un facteur de transcription important dans l'activation des lymphocytes T (je reviendrai en détail sur ce TF dans la partie « Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en effecteurs »). De la même manière que les cibles précédentes Foxo est phosphorylé et inhibé par Akt. En effet, sous sa forme phosphorylé Foxo est exclu du noyau puis dégradé par le protéasome (Peng, 2008) (figure 6).

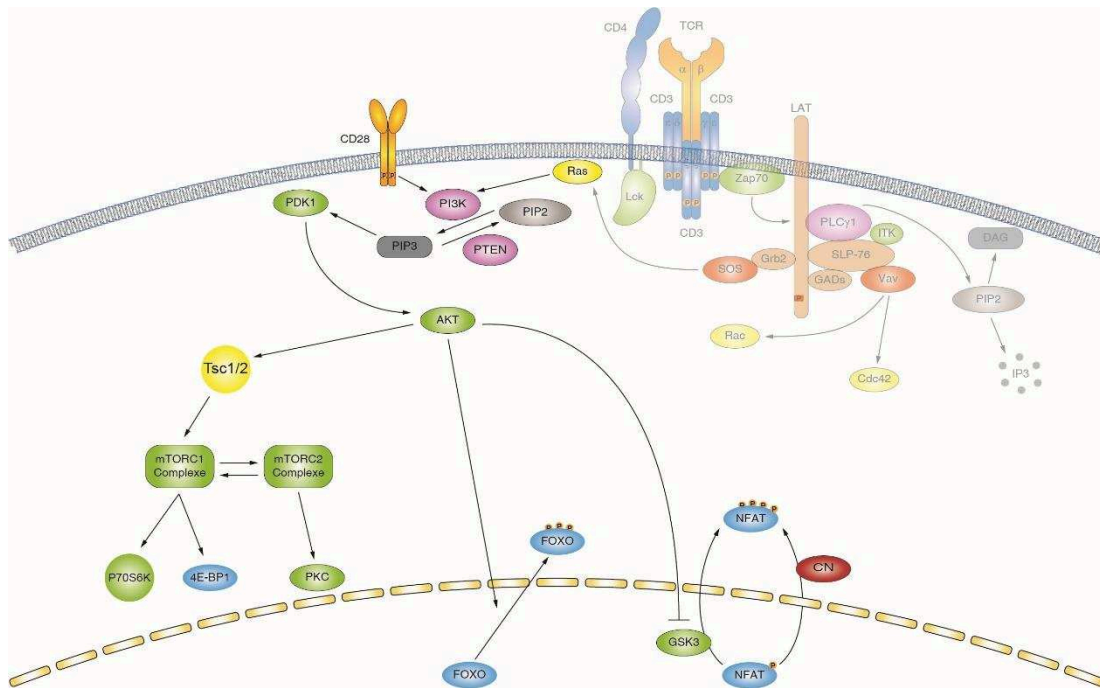


Figure 6: Voie PI3K/Akt.

La PI3K, activée via Ras ou les récepteurs à tyrosine kinase comme le CD28, permet la production de PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Ce dernier recrute Akt vers la membrane plasmique pour être phosphorylée et activée par PDK1. Akt active alors la voie mTor en inhibant le complexe Tsc1/2, un répresseur de mTORC1. Akt inhibe aussi GSK3, qui induit la phosphorylation de NFAT et sa sortie du noyau. Enfin Akt phosphoryle le TF Foxo, ce qui induit sa translocation vers le cytoplasme.

La signalisation TCR comme je l'ai décrite dans ce manuscrit aboutit donc principalement à l'activation ou à la répression des facteurs de transcriptions NFAT, NF- κ b, Fos/Jun (AP-1) et Foxo. D'autres TFs peuvent également être régulés via le TCR comme CREB et MEF2, que j'ai mentionné précédemment, mais aussi SP1 (Specificity Protein 1) ou encore la famille des TFs Runx (Runt-related transcription factor). Bien sûr tous ces facteurs ne sont pas les seuls à être régulés par le TCR mais j'ai focalisé mon attention sur ceux-ci durant ma thèse car ils sont impliqués dans l'expression de Foxp3, un point sur lequel je reviendrai un peu plus loin dans le manuscrit.

Pour finir sur cette partie TCR et signalisation, je parlerai des récepteurs corépresseurs et co-activateurs comme ceux de la famille de CD28 qui délivre un second signal. En effet lors de leur activation, les lymphocytes T ont besoin d'un second signal afin de recevoir une stimulation optimale, mais également de signaux pour atténuer cette signalisation et éviter une activation inadéquate.

4. Les corécepteurs

Dans les lymphocytes T CD4⁺, le CD4 joue un rôle important dans la liaison du TCR avec le CMH de classe II en renforçant et prolongeant cette interaction. Il permet aussi le recrutement de la protéine Lck au niveau du complexe TCR/CD3. Je ne reviendrais pas plus en détails sur le CD4, celui-ci étant développé dans la partie 3a.

Les co-stimulateurs de la famille des CD28 sont des récepteurs à tyrosine kinase exprimés par les LTs formant un dimère lorsqu'ils reconnaissent leur(s) ligand(s) exprimé(s) par les APCs. CD28 est le membre principal et ses ligands sont CD80 et CD86. L'interaction de CD28 avec ces ligands induit la phosphorylation des tyrosines situées sur la portion cytoplasmique du récepteur, ce qui permet le recrutement des protéines PI3K, Grb2, Vav et ITK. Comme nous l'avons vu ces protéines font également partie de la signalisation TCR, c'est pourquoi le signal CD28 est considéré comme permettant d'augmenter quantitativement cette signalisation (Acuto and Michel, 2003). Un autre co-stimulateur, ICOS (et son ligand ICOSL) permet aussi d'augmenter le signal TCR en recrutant la PI3K. Ces co-stimulateurs apportent donc un second signal positif qui contribue à l'activation, la différenciation et aux fonctions effectrices des lymphocytes T, mais seul CD28 joue un rôle dans leur prolifération.

PD1 (ligand : PDL-1) et CTLA4 (ligands : CD80/86) quant à eux régulent négativement la voie TCR. Chacun inhibe entre autre la voie Akt via des mécanismes distincts. CTLA4 active PP2A (Protein Phosphatase 2A) qui cible directement l'activation d'Akt, alors que PD1 bloque l'activation de la PI3K via CD28 (Chemnitz et al., 2004). PD1, qui a la particularité d'être monomérique, doit co-localiser avec le TCR/CD28 pour son inhibition. CTLA4 qui partage les mêmes ligands que CD28, mais avec une affinité plus forte, peut inhiber la signalisation TCR par compétition pour CD80/86. Pour finir ces corécepteurs ne sont pas présents sur les LTs naïfs mais sont exprimés rapidement après leur activation. Ils sont ainsi fréquemment utilisés comme cible lors d'immunothérapies visant à contrôler les réponses immunitaires des lymphocytes T (Sharpe and Pauken, 2017; Walker and Sansom, 2011).

Pour finir, un autre récepteur qui permet de moduler la signalisation TCR est le CD5. Son expression augmente suite à l'activation du TCR et est corrélée à la force du signal reçu, point sur lequel je reviendrai dans la suite de ce manuscrit. Il est admis que CD5 exerce un rôle négatif sur la signalisation initié par le TCR. SHP-1 (SH2-containing phosphotyrosine phosphatase) qui se lie à la partie cytoplasmique de CD5 (Perez-Villar et al., 1999) semble diminuer la phosphorylation de protéines telles que PLC γ 1, la chaîne ζ du TCR et Vav. Un article récent

montre cependant que CD5 peut inhiber la signalisation TCR de façon efficace même en absence SHP-1 (Dong et al., 2016). D'autres études indiquent que CD5 recrute des protéines, impliquées dans la régulation négative du TCR comme c-Cbl qui joue un rôle dans l'ubiquitination induite par le TCR (Voisinne et al., 2016) ou encore RasGAP impliqué dans la voie Ras (Burgueño-Bucio et al., 2019).

II. Développement thymique des lymphocytes T

Comme la grande majorité des cellules du système immunitaire, les lymphocytes T dérivent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces précurseurs des LTs (aussi appelés cellules lymphoïdes progénitrices) migrent dans le thymus pour se développer et passer la sélection thymique afin d'être éduqués en lymphocytes T matures qui reconnaissent un antigène étranger spécifique. Cependant cette éducation est basée sur la capacité des cellules à reconnaître le Soi. En effet, les sélections positive et négative, permettent de sélectionner les cellules capables de reconnaître un peptide du Soi associé au complexe majeur d'histocompatibilité (complexe pCMH). Mais cette reconnaissance ne doit pas être trop forte afin d'éviter l'activation des cellules en périphérie. Cette reconnaissance du Soi aussi appelée auto-réactivité est au centre du développement thymique des lymphocytes T et dépend de l'interaction TCR-pCMH. Le TCR est exprimé par les LTs comme nous avons pu le voir tandis que le complexe pCMH est exprimé par les cellules épithéliales thymiques (TECs), les cellules dendritiques (DCs) et les fibroblastes mésenchymateux qui composent le thymus. Via cette interaction les cellules recevront des signaux (survie, expression de récepteurs, prolifération, engagement dans une voie de différenciation, engagement dans l'apoptose) qui permettra leur sélection et leur maturation.

1. Les premières étapes du développement thymique

Les précurseurs des lymphocytes T entrent dans le thymus par la jonction cortico-médullaire et migrent dans le cortex. Arrivées dans la zone corticale, ces cellules sont appelées thymocytes (ou lymphocytes immatures) et sont au stade double négatif (DN), c'est-à-dire qu'ils n'expriment pas encore les corécepteurs CD4 et CD8. Au cours de leur progression jusqu'à la zone sous capsulaire les thymocytes vont passer par quatre stades de maturation, DN1 à DN4, pour aboutir à un stade appelé double positif (DP).

Brièvement, le passage au stade DN1, via la voie de signalisation Notch, signifie que les cellules s'engagent dans la différenciation en lymphocyte T (Maillard et al., 2005). Au stade DN2 les thymocytes commencent la recombinaison V(D)J au niveau des locus γ , δ ou β du TCR. Ce processus est assuré par les protéines RAGs (Recombinason Activating Genes) composées de RAG1 et RAG2 (Kraegel, 2009). Une fois la recombinaison terminée, les cellules sont passées au stade DN3 et expriment à leur surface un TCR préliminaire formé d'un dimère γ/δ ou d'un dimère $\beta/\text{pré-T}\alpha$ (une chaîne α invariante de substitution). Cela dictera le choix du lignage $\alpha\beta$

ou $\gamma\delta$. La sélection β qui entre en jeu à ce stade permet de sélectionner les thymocytes $\alpha\beta$ qui présentent un pré-TCR avec une chaîne β fonctionnelle. Elle permet également aux thymocytes $\gamma\delta$ de quitter la voie conventionnelle de développement (Carpenter and Bosselut, 2010). Les thymocytes $\alpha\beta$ vont alors proliférer et se différencier en DN4. Ils commencent ensuite la recombinaison V(D)J du locus α du TCR. Une fois la chaîne α exprimée, elle s'associe à la sous-unité β pour former un TCR $\alpha\beta$, les thymocytes passent alors au stade double positif où ils expriment les corécepteurs CD4 et CD8. Ainsi ils vont pouvoir continuer leur maturation au niveau du cortex thymique et passer la première étape de sélection thymique : la sélection positive.

2. Première éducation thymique : la sélection positive

La sélection positive est la première sélection basée sur l'auto-réactivité des lymphocytes T, c'est-à-dire leur capacité à reconnaître via leur TCR le complexe pCMH. En effet à ce stade les thymocytes DP expriment bien le TCR à leur surface mais ce dernier n'est pas nécessairement fonctionnel. Seules les cellules capables de reconnaître le Soi sont sélectionnées positivement au cours de cette étape. Cette interaction avec le Soi qui engage la signalisation TCR permet aux thymocytes de survivre, via entre autres l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-X_L, et de poursuivre leur développement au stade simple positif (SP). En revanche les cellules qui ne peuvent interagir ou qui reconnaissent le complexe pCMH avec une affinité trop faible ne reçoivent pas de signaux de survie et meurent par apoptose, ce que l'on appelle la mort par négligence. Les cellules épithéliales corticales thymiques (cTECs) qui expriment le complexe pCMH assure cette sélection. Le peptide du Soi qu'elles présentent à leur surface peut être associé à une molécule du CMH de classe I ou de classe II. Cela permet aux thymocytes sélectionnés de se diriger vers la lignée CD4 ou CD8 en fonction de leur affinité respective pour le CMH de classe II ou I. Suite à cette sélection environ 10% seulement des thymocytes parviennent au stade simple positif CD4⁺ ou CD8⁺. Ces lymphocytes T encore immatures vont poursuivre leur maturation et passer dans la zone médullaire du thymus, appelée médulla, afin de subir la seconde étape de sélection thymique : la sélection négative (figure 7).

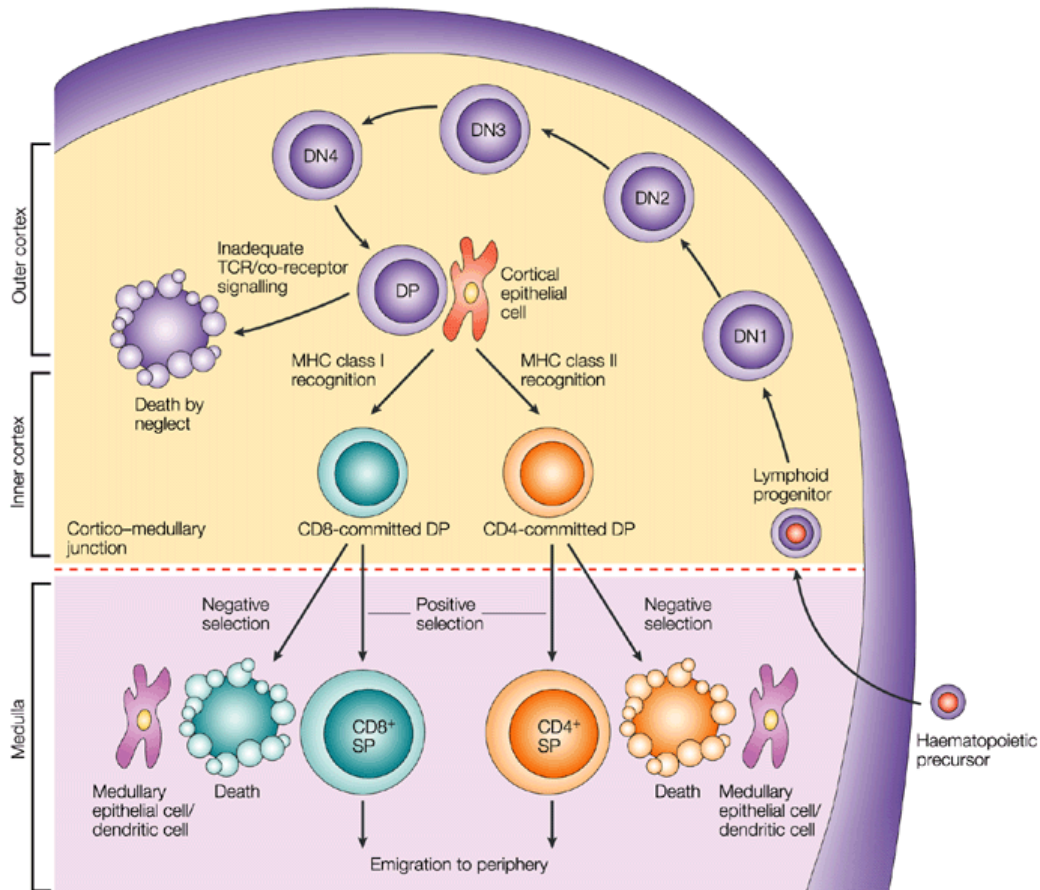


Figure 7 : Schéma général du développement des lymphocytes T dans le thymus.

Les progéniteurs lymphoïdes apparaissent dans la moelle osseuse et migrent vers le thymus. Les lymphocytes T engagés précocement n'expriment pas le récepteur des lymphocytes T (TCR), le CD4 et le CD8, et sont qualifiés de thymocytes doubles négatifs (DN; pas de CD4 ni de CD8). Les thymocytes DN peuvent être subdivisés en quatre étapes de différenciation (DN1, CD44⁺ CD25⁻; DN2, CD44⁺ CD25⁺; DN3, CD44⁻ CD25⁺; et DN4, CD44⁻ CD25⁻). Au fur et à mesure que les cellules progressent dans les stades DN2 à DN4, elles expriment le TCR, qui est composé de la chaîne pré-Tα non réarrangée et d'une chaîne β TCR réarrangée. La bonne expression du pré-TCR conduit à une prolifération cellulaire substantielle au cours de la transition DN4 à double positive (DP) et le remplacement de la chaîne α pré-TCR par une nouvelle chaîne α TCR réarrangée, ce qui donne un TCR αβ complet. Les thymocytes αβ TCR⁺ CD4⁺ CD8⁺ (DP) interagissent ensuite avec les cellules épithéliales corticales qui expriment une haute densité de molécules du CMH de classe I et de classe II associées avec un peptide du soi. Le lignage des thymocytes DP dépend de la signalisation qui est médiée par l'interaction du TCR avec ces ligands peptide du soi-CMH. Trop peu de signalisation entraîne l'apoptose retardée (mort par négligence). Trop de signalisation peut favoriser l'apoptose aiguë (sélection négative); ceci est plus commun dans la médulla lors de la rencontre avec des ligands du soi fortement activateurs sur des cellules hématopoïétiques, en particulier des cellules dendritiques. Un niveau approprié, c'est-à-dire intermédiaire de la signalisation TCR initie la maturation effective (sélection positive). Les thymocytes qui expriment les TCRs qui se lient aux CMH de classe I deviennent des cellules T CD8⁺, alors que ceux qui expriment des TCRs se lient CMH de classe II deviennent des cellules T CD4⁺; ces cellules sont alors prêtes à être exportées de la médulla vers les sites lymphoïdes périphériques. SP, simple positif. Issue de (Germain, 2002).

3. Deuxième éducation thymique : la sélection négative

La sélection négative, aussi appelée délétion clonale, dépend de l'auto-réactivité des lymphocytes T et de leur affinité pour le Soi à travers l'interaction TCR-pCMH. Les thymocytes SP issus de la sélection positive sont tous capables de reconnaître le Soi, mais possèdent une affinité variable pour celui-ci. Ainsi, cette étape permet de tester cette affinité et d'éliminer les cellules exprimant un TCR avec une trop forte affinité pour le Soi. En effet des lymphocytes T fortement auto-réactifs sont susceptibles de déclencher des maladies auto-immunes et s'avèrent néfastes pour l'organisme. Ils sont donc éliminés au cours de cette sélection par apoptose. Les autres cellules possédant une affinité suffisante pour le complexe pCMH pourront terminer leur développement et rejoindre la périphérie (figure 8).

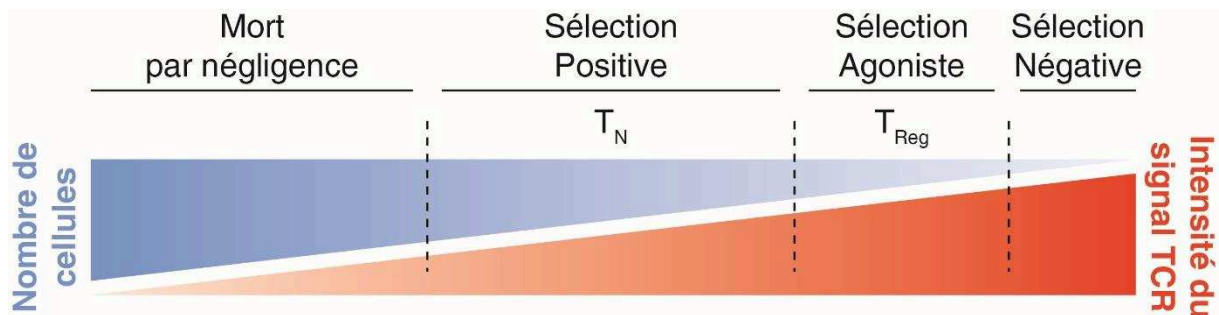


Figure 8 : Sélection thymique en fonction du signal TCR perçue par la cellule.

Dans la médulla cette sélection est assurée par les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTECs) et les cellules dendritiques. Ces cellules présentent, via une molécule du CMH, des antigènes du Soi qui sont également exprimés dans les tissus en périphérie. L'expression et la présentation de ces antigènes tissulaires périphériques, ou TRA (Tissue Restricted Antigens), permettent d'induire une tolérance (Derbinski et al., 2001). Le facteur de transcription AIRE (AutoImmune REgulator) exprimé dans les mTECs contrôle l'expression d'environ 40% de ces TRAs (St-Pierre et al., 2015). De plus il régule aussi le développement et la fonction des mTECs comme leur maturation (Nishikawa et al., 2014) ou l'expression de XCL1 qui permet l'accumulation de DCs dans la médulla (Lei et al., 2011). AIRE est donc indispensable pour induire une bonne tolérance. En effet, les souris déficientes pour Aire présentent une diminution d'expression de nombreux TRAs ainsi qu'un phénotype auto-immun, comme la production d'auto-anticorps et une infiltration de cellules inflammatoires dans plusieurs tissus (Anderson, 2002; Hubert et al., 2009). De plus chez l'homme la mutation de ce gène entraîne le

développement de l'APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidosis Ectodermal Dystrophy), une maladie auto-immune multi-organe. Les patients présentent, dans la plupart des cas, une candidose au niveau de la peau et des muqueuses, des endocrinopathies auto-immune comme l'hypoparathyroïdie ou l'insuffisance surrénale, mais aussi des anomalies dentaires et une dystrophie ectodermique. Chaque patient possède également un répertoire unique de réactivité d'auto-anticorps (Capalbo et al., 2012; Meyer et al., 2016; Nagamine et al., 1997). Ces symptômes suggèrent qu'une déficience en Aire entraîne une sélection anormale des lymphocytes T dans le thymus, qui vont ainsi réagir au Soi en périphérie, ainsi qu'une perte de la tolérance des cellules B induite par les cellules T.

D'autres cellules participent à la sélection négative en présentant des TRAs qu'elles ont capté, ce sont les cellules dendritiques. Plusieurs types de DCs colonisent le thymus : les DCs plasmacytoïdes (pDC) et les DCs conventionnelles (cDC) issue de la périphérie ou du thymus (Bonasio et al., 2006; Donskoy and Goldschneider, 2003; Li et al., 2009). Le rôle des pDCs dans cette sélection négative n'est pas encore totalement établi. Cependant certaines études montrent qu'elles sont capables de capter des antigènes en périphérie et de les transporter dans le thymus de manière dépendante du CCR9 (Hadeiba et al., 2012). De plus les pDCs CCR9⁺ semblent promouvoir la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en cellule régulatrice à la périphérie (Hadeiba et al., 2008). Cette sous population de pDC pourrait ainsi jouer un rôle dans la tolérance après leur recrutement dans le thymus. Les cDCs issues du thymus, qui résident dans la médulla, présentent à leur surface des antigènes capturés dans le microenvironnement thymique. En revanche, les cDCs migratrices issues de la périphérie, qui peuvent se localiser dans la médulla et le cortex, présentent essentiellement des antigènes captés à la périphérie ou véhiculés par le sang (Klein et al., 2014). La présence des cDCs au niveau du cortex suggère que la sélection négative n'est pas restreinte à la médulla. En effet, des études montrent qu'une délétion clonale des thymocytes au stade DN se produit dans le cortex (Daley et al., 2013a). Cette sélection négative étant principalement contrôlée par les DCs corticales (McCaughy et al., 2008).

Enfin la présence de cellules B dans le thymus a également été démontrée. Comparées aux cellules B conventionnelles retrouvées en périphérie, les cellules B thymiques expriment plus de CMHII et de molécules co-stimulatrices (Perera et al., 2013). Une partie de ces cellules expriment également le facteur de transcription AIRE (Yamano et al., 2015). Les cellules B thymiques semblent donc aptes à induire une tolérance. En effet, de récentes études ont montré

l'implication des cellules B dans la génération de cellules T régulatrices (Treg) dans le thymus (Walters et al., 2014).

Ainsi plusieurs populations cellulaires participent à l'éducation des lymphocytes T au cours de la différenciation thymique (figure 9). Cela permet de générer des lymphocytes T naïfs matures possédant une affinité suffisante pour le Soi, les plus auto-réactifs étant éliminés. Un fort signal TCR conduit généralement à la sélection négative. Cependant, sous certaines conditions ce signal conduit au développement de lignées de lymphocytes T non conventionnelles (Stritesky et al., 2012). Cette autre voie est appelée sélection agoniste.

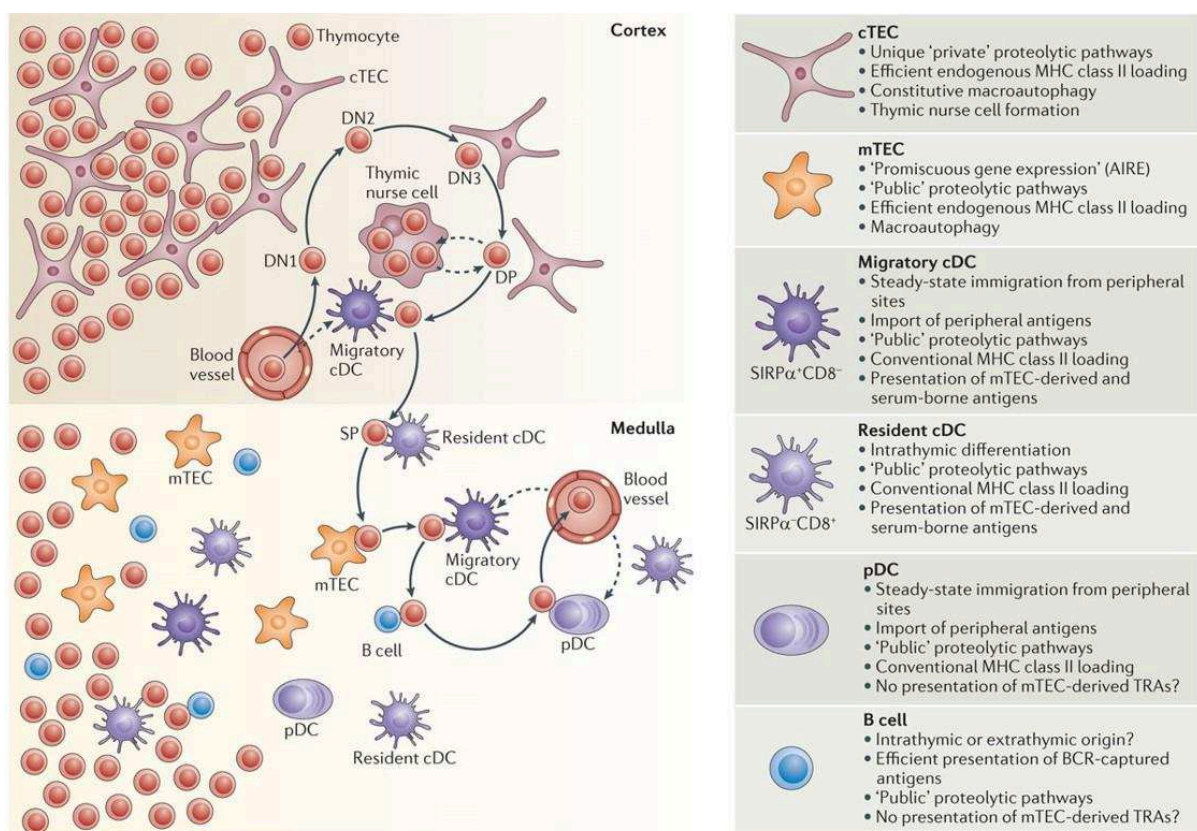


Figure 9: Les cellules stromales au cours du développement thymique des lymphocytes T.

Dans le cortex les cellules épithéliales corticales thymiques (cTEC) assurent le développement des lymphocytes T. Ce sont les partenaires des LTs durant la sélection positive. On retrouve également des cellules dendritiques conventionnelles (cDC) migratrices qui ont un rôle dans la sélection négative des thymocytes double négatif (DN). Une fois passé au stade simple positif (SP) les thymocytes migrent vers la médulla pour passer l'étape de sélection négative avant de se diriger dans la périphérie. Cette sélection négative à plusieurs actrices : les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTEC), les DCs plasmacytoïdes (pDC), les DCs conventionnelles résidentes ou migratrices ainsi que les cellules B. Issue de (Klein et al., 2014).

4. La sélection agoniste

Certains thymocytes qui expriment un TCR de forte affinité pour le Soi, plutôt que de se voir éliminés lors de l'étape de sélection négative, s'orientent vers la sélection agoniste. Voici une liste des différents types cellulaires générés par cette voie (je ne détaillerai ici que le développement des lymphocytes T régulateurs) :

- Les cellules nIEL (natural CD8^{αα+} IntraEpithelial Lymphocytes), qui résident principalement dans l'intestin, participent à l'immunité et la tolérance (Leishman et al., 2002).
- Les cellules nTh17 (natural T helper 17) qui luttent contre les bactéries extracellulaires (Marks et al., 2009).
- Les cellules iNKT (invariant Natural Killer T) qui peuvent à la fois augmenter ou inhiber la réponse immunitaire, en fonction des cytokines produites et de l'endroit où elles sont recrutées (Moran et al., 2011).
- Enfin les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs thymiques (tTreg) exprimant le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box p3). Ces cellules sont dites régulatrices car elles jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance immunitaire. Je reviendrai plus en détail sur leur fonction dans la partie « Homéostasie et fonctions des lymphocytes T CD4⁺ »

a. Découverte des lymphocytes T régulateurs

Depuis les années 70 il est établi que certains lymphocytes T dit suppresseurs sont capables de réguler la réponse immunitaire. En effet, les chercheurs Gershon et Kondo ont démontré que le transfert de cellules thymiques prévient l'immunisation, par des globules rouges de mouton, d'une souris thymectomisée, irradiée et reconstituée en moelle osseuse (Gershon and Kondo, 1970, 1971). En 1985 ces lymphocytes T suppresseurs sont d'abord caractérisés comme étant des LTs CD4⁺ CD5^{Hi} (Sakaguchi et al., 1985). Puis en 1995, S. Sakaguchi identifie le CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, comme étant le premier marqueur de ces lymphocytes T CD4 régulateurs (Tregs) (Sakaguchi et al., 1995). Par la suite, au début des années 2000, une similitude est observée entre les souris Scurfy, qui développent une maladie auto-immune due à une prolifération incontrôlée des lymphocytes T, et les patients atteints de l'IPEX (pour Immunodeficiency, Polyendocrinopathy, and Enteropathy, X-linked syndrome). Tous les deux présentent des mutations au niveau du gène de Foxp3 qui entraînent une dérégulation dans

l'homéostasie des cellules T (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001). C'est alors que Foxp3 est décrit comme étant le facteur de transcription spécifique des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003).

b. Développement des cellules T régulatrices thymiques

La sélection agoniste, comme mentionnée précédemment, résulte d'une forte affinité pour le Soi. L'utilisation de souris transgénique déficientes pour la protéine RAG1 (RAG1^{KO}), mais exprimant un TCR spécifique de la myéline, a permis de mettre en évidence l'importance de cette affinité pour la génération de tTregs. Ces souris développent des lésions inflammatoires au niveau du cerveau, ou encéphalites auto-immune (modèle de souris EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) car elles ne possèdent pas de Treg. Les souris RAG^{KO} ne peuvent en effet pas effectuer les réarrangements V(D)J nécessaires pour générer des TCRs de hautes affinités. Ainsi les souris TCR transgénique pour la myéline et exprimant RAG1 ne développent pas d'EAE car elles sont capables de produire des cellules T régulatrices (Olivares-Villagómez et al., 1998). En plus de cette forte affinité, les tTregs reçoivent un signal TCR fort lors de leur différenciation. En effet, grâce au modèle de souris transgénique Nur77eGFP, où l'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) est couplée à celle de Nur77 (un TF dont l'expression est corrélée à la force du signal TCR), une équipe a montré que les thymocytes Foxp3⁺ ont une expression plus forte de Nur77 (Moran et al., 2011). Une forte affinité pour le Soi couplé à un signal TCR fort est donc nécessaire pour la génération de tTregs.

Les signaux engendrés par les molécules de co-stimulations, comme le CD28 exprimé par les lymphocytes T, ont également un rôle important. Les souris déficientes pour l'expression de CD28 ont une très forte diminution des Tregs thymiques et périphériques (Salomon et al., 2000). Le CD28 permet d'augmenter le développement des thymocytes précurseurs des tTregs et joue un rôle dans la survie des Tregs (Lio et al., 2010; Tang et al., 2003). D'autres molécules de co-stimulations sont impliquées dans le développement des tTreg comme CD154, impliqué dans leur expansion au niveau de la médulla (Spence and Green, 2008), et CD27, impliqué dans leur survie en inhibant les voies apoptotiques mitochondriales (Coquet et al., 2013). Les voies de co-stimulations participent ainsi à différents niveaux à la génération des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs.

Enfin les derniers signaux essentiels au développement des tTregs sont apportés par les cytokines telles que l'interleukine 2 (IL-2) essentiellement mais aussi l'IL-7 et l'IL-15. Le récepteur de l'IL-2 est composé de trois chaînes : α , β , et γ c respectivement nommées CD25,

CD122 et CD132. Le CD132 étant commun aux récepteurs des trois cytokines, les souris déficientes pour l'expression de cette protéine (CD132^{KO}) ne possèdent plus de Tregs. Il semble cependant exister un rôle compensatoire entre ces cytokines. En effet, les souris déficientes pour l'IL-2 (IL-2^{KO}) ou le CD25 (CD25^{KO}) ont une diminution de 50% des tTregs, tandis que chez les souris IL-7^{KO} et IL-15^{KO} aucune perturbation dans la génération des tTregs n'est observée (Burchill et al., 2007; Fontenot et al., 2005; Vang et al., 2008). Ces résultats suggèrent un rôle prédominant de l'IL-2 dans la différenciation thymique des Tregs.

Pour résumer, la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs thymiques peut être décomposée en deux étapes comme le montrent plusieurs études. La première étape résulte d'un signal TCR fort, couplé à des signaux de co-stimulations, qui induisent l'expression de la chaîne α du récepteur de haute affinité à l'IL-2, le CD25. Les thymocytes, ou précurseurs des tTregs, ainsi générés sont caractérisés comme étant CD25^{Hi} Foxp3⁻ et deviennent sensibles à l'IL-2. La seconde étape permettant la génération des tTreg CD25^{Hi} Foxp3⁺ est induite par les cytokines, essentiellement l'IL-2 qui via STAT5 permet l'expression de Foxp3 (Hsieh et al., 2012; Lio and Hsieh, 2008) (figure 10).

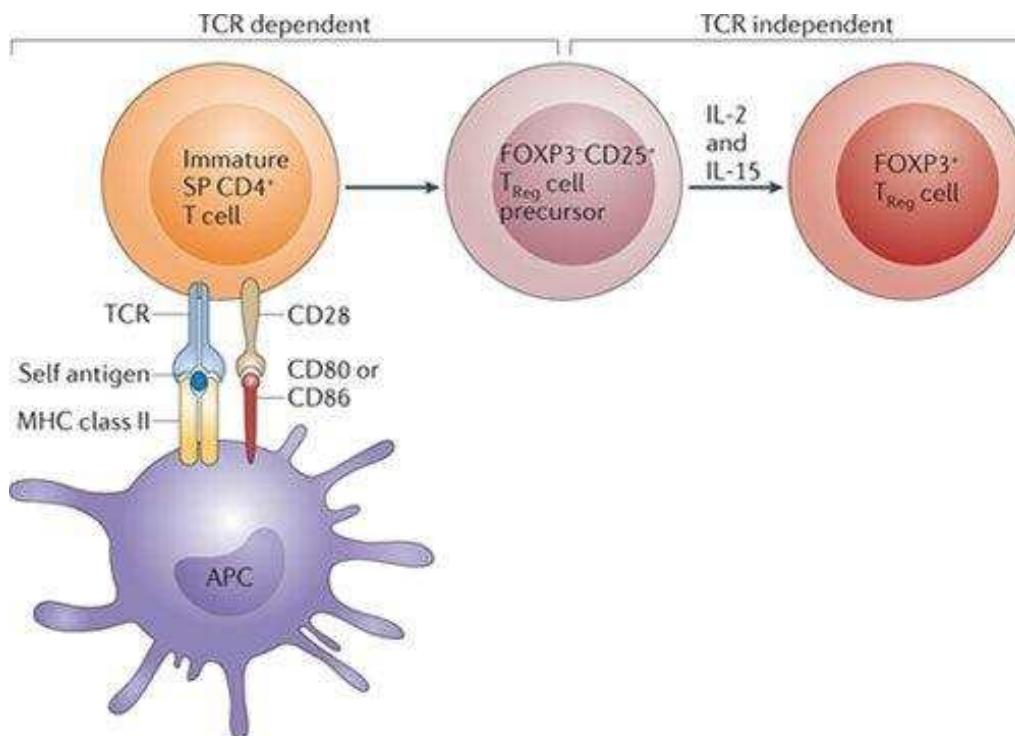


Figure 10 : Le développement des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs thymiques en deux étapes. Lorsque les thymocytes reconnaissent le complexe peptide du Soi-CMH de classe II en présence de molécules co-stimulatrice (telles que CD80 ou CD86) et avec une avidité suffisamment élevée pour la

sélection agoniste des cellules T régulatrices thymiques (tTreg), certaines de ces cellules sont sélectionnées en tant que précurseurs des Tregs Foxp3⁻ CD25⁺. Le signal reçu via le TCR conduit à l'activation de plusieurs voies moléculaires en aval, y compris la voie NF-κB, qui conduit au remodelage du locus de Foxp3, le rendant ainsi permissif à l'induction de son expression par la signalisation de l'IL-2. A ce stade, les précurseurs ne nécessitent pas de stimulation supplémentaire du TCR pour l'expression de Foxp3. Ils sont cependant sensibles aux cytokines telles que l'IL-2 essentiellement (et IL-15 dans une moindre mesure) qui facilitent l'expression de Foxp3 via STAT5 qui se fixe à son promoteur. APC, cellules présentatrice d'antigènes ; SP, simple positif. Issue de (Hsieh et al., 2012).

5. Intensité du signal TCR et développement thymique des lymphocytes T

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'affinité du TCR pour le complexe peptide du Soi-CMH joue un rôle essentiel dans le développement des lymphocytes T. En effet, la force du signal TCR, qui résulte de l'interaction TCR-pCMH, dicte le devenir des thymocytes au cours des différentes sélections thymiques. De nombreuses études ont été menées pour étudier la capacité d'un peptide donné à induire une sélection positive ou négative. La plupart de ces travaux utilisent la culture d'organe thymique de fœtus (FTOC : Fetal Thymic Organ Culture) issu de souris TCR transgénique restreint au CMH de classe I et déficient pour la protéine Tap1 (Antigen Peptide Transporter 1), Tap2 ou β₂-microglobuline. Chez ces souris le développement des thymocytes est arrêté au stade de la sélection positive. L'addition d'un mix de peptides, ou de peptides spécifiques, durant la FTOC permet d'induire une sélection positive ou négative. L'utilisation de ce modèle a permis de montrer que des ligands de faible affinité pour le TCR induisent une sélection positive, tandis que des ligands de forte affinité peuvent engendrer deux situations suivant leur concentration : à forte concentration ils induisent la sélection négative, alors qu'à faible concentration ils causent une sélection agoniste (Gascoigne et al., 2016). Ces travaux prouvent que la force du signal TCR perçue par les thymocytes oriente leur devenir. Bien que ce signal ait la même origine quel que soit la sélection, la signalisation TCR qui en suit engendre des changements biologiques différents. Les équipes d'E. Pamler et d'A. Hogquist ont étudié ces différences, se focalisant sur la voie Ras-Erk des MAP Kinases, en utilisant le modèle de FTOC. Ils ont montré qu'au cours de la sélection positive le signal TCR induit une phosphorylation transitoire de Erk, dans le cytoplasme et le noyau, suivie par une augmentation graduelle de ce signal. Au contraire lors de la sélection négative, le signal TCR induit une forte phosphorylation de Erk proche de la membrane plasmique mais qui n'est pas prolongé dans le temps (Daniels et al., 2006; McNeil et al., 2005). Ces travaux suggèrent également que les flux calciques suivent une cinétique similaire lors des sélections. Cependant le travail de HJ. Melichar, basé sur une technique de microscopie sur tranche de thymus, montre quelques différences. La sélection positive semble induire une série de faibles flux calciques,

tandis que la sélection négative induit un flux calcique fort et long (Melichar et al., 2013). Cette différence met en avant la relation qui existe entre la force du signal TCR et la motilité des thymocytes, un signal TCR fort étant relié à un arrêt de migration des thymocytes. En effet, la sélection positive provoque une augmentation progressive de la concentration intracellulaire de calcium dû à de courtes pauses de migration couplé à des flux calciques transitoires (Ross et al., 2014). La sélection négative provoque, quant à elle, un arrêt de migration et un fort flux calcique suivie de la mort des thymocytes quelques heures après (Dzhagalov et al., 2013).

Pour résumer, au cours du développement thymique on observe une corrélation entre l'affinité des thymocytes pour le Soi, leur motilité ainsi que la force du signal TCR reçu et la signalisation qui est induite. Lors de la sélection positive, les thymocytes capables de reconnaître le Soi vont avoir de courtes interactions avec les cTECs. Ces interactions de faibles affinités vont provoquer de faibles flux calciques, qui augmentent progressivement la concentration intracellulaire de calcium, ainsi que des activations transitoires de la voie Erk. Cela entraîne une activation légère et prolongé de la voie du TCR permettant la maturation des thymocytes au stade SP. Au cours de la sélection négative, dans les thymocytes qui ont une trop forte affinité pour le Soi, et donc une interaction forte avec les mTECs ou les DCs, on observe un arrêt de la migration. Cette forte interaction engendre un flux calcique important et une phosphorylation de Erk plus forte également qui dirigent les thymocytes dans la voie apoptotique.

Les lymphocytes T matures sortant du thymus, après avoir passés avec succès les étapes de sélection, conservent cette capacité d'interagir avec le Soi. Ainsi, en périphérie ils recevront un signal plus ou moins fort en fonction de leur affinité pour le Soi que l'on appelle « Tonic Signaling ». Ce signal influence, comme nous allons le voir, leur homéostasie et leurs fonctions.

III. Homéostasie et fonctions des lymphocytes T CD4⁺

Après avoir passé avec succès les étapes de sélections, les thymocytes simples positifs doivent encore subir quelques étapes de maturation avant de pouvoir sortir du thymus. Leur sortie dépend en partie de leur expression de S1PR1 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1), un récepteur couplé aux protéines G dont le ligand est S1P. Suite aux signaux TCR reçus lors de leur développement, les thymocytes SP immatures expriment la protéine de surface CD69, un marqueur rapidement exprimé suite à une stimulation TCR. CD69 a la capacité de lier et d'inhiber S1PR1, via un processus d'internalisation et de dégradation. Au cours des dernières étapes de maturation des thymocytes, l'arrêt de l'interaction TCR-pCMH induit une perte d'expression de CD69. Les thymocytes SP matures expriment alors à leur surface le récepteur S1PR1. Cela leur permet de suivre le gradient de S1P formé en partie par les péricytes et cellules dendritiques qui entourent les vaisseaux sanguins. Ainsi les cellules rejoignent la périphérie (James et al., 2018).

Une fois en périphérie les lymphocytes T matures circulent entre les différents organes lymphoïdes secondaires (SLOs) via le sang et le système lymphatique. Le passage dans les SLOs leur permet de scanner les APCs à la recherche de l'antigène dont ils sont spécifiques et qui est nécessaire à leur activation. Cependant, en absence d'infection, ces rencontres avec les APCs leur permettent également de recevoir des signaux provenant de l'interaction avec le Soi, capacité qu'ils ont acquis lors de la différenciation thymique. Ainsi en périphérie les lymphocytes T reçoivent ce que l'on appelle un « Tonic Signaling » dû à la reconnaissance du Soi. Ce Tonic Signaling joue un rôle dans la survie et la fonction des LTs, en particulier des cellules naïves comme nous allons le voir. Je me focaliserai dans cette partie sur l'homéostasie et la fonction des lymphocytes T CD4⁺, en particulier les cellules naïves et régulatrices, je serai très succinct sur les cellules mémoires.

Les LTs CD4⁺ dit conventionnels peuvent être subdivisés en trois populations principales que l'on distingue via l'expression de marqueurs spécifiques : les lymphocytes T CD4⁺ naïves (CD4 T_N), les lymphocytes T CD4⁺ mémoires (CD4 T_{mem}) et les Tregs (Figure 11).

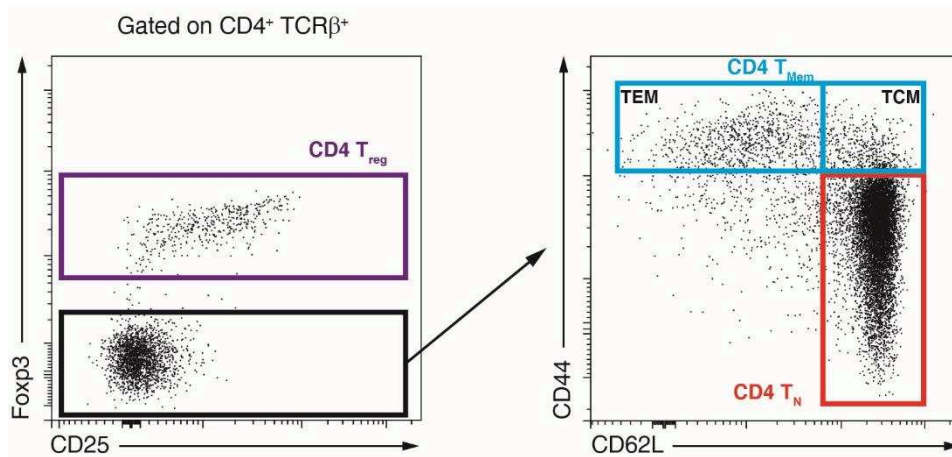


Figure 11 : Populations de lymphocytes T CD4⁺ conventionnels en périphérie.

CD4 T_N : lymphocytes T CD4⁺ naïfs ; Treg : lymphocytes T CD4⁺ régulateurs ; CD4 T_{mem} : lymphocytes T CD4⁺ mémoires ; TEM : cellules T mémoires effectrices ; TCM : cellules T mémoires centrales.

1. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs

a. Fonction des lymphocytes CD4 T_N

Chez une souris élevée en condition EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique), les lymphocytes T CD4⁺ naïfs représentent 80% de la population T CD4⁺ en périphérie. Ils expriment faiblement CD44, fortement CD62L et sont Foxp3⁻ et CD25⁻ (figure 11). Ces cellules multipotentes sont dites naïves car elles n'ont encore jamais rencontré l'antigène dont elles sont spécifiques, celui entraînant leur activation. Dès lors qu'elles rencontrent cet antigène, ces cellules ont la capacité de se différencier en effecteurs appelés lymphocytes T auxiliaires (T helper ou Th) ou cellules mémoires et de s'expandre afin de lutter contre les infections. Il existe plusieurs types de cellules effectrices dont les plus connues sont : Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh et pTreg. Le choix du lignage est très largement dicté par l'environnement cytokinique dans lequel se trouvent les lymphocytes T au moment de leur activation. Je reviendrais plus en détails dans la suite de ce manuscrit sur la biologie, le mode de différenciation et la fonction de ces effecteurs.

b. Homéostasie des cellules CD4 T_N

Comme nous avons pu le voir, les processus de sélection thymique permettent de générer des lymphocytes T matures possédant une faible affinité pour le Soi. Cette capacité à reconnaître le Soi, ou auto-réactivité, n'est généralement pas suffisante pour induire une auto-immunité mais

est essentielle à la survie des cellules CD4 T_N. Plusieurs études ont montré qu'en absence d'infection les lymphocytes T CD4⁺ naïfs meurent progressivement si on les prive d'interaction avec le complexe pCMH. Parmi ces études, deux équipes ont montré, par des approches génétiques, qu'inhiber l'expression du TCR (Labrecque et al., 2001) ou d'une partie du TCR (Polic et al., 2001) dans les lymphocytes T matures entraîne une réduction de leur durée de vie. De plus mon équipe a montré l'importance du CMH de classe II en utilisant des souris transgéniques déficientes pour les chaînes α et β des molécules I-A et I-E du CMH de classe II (souris CMHII ^{$\Delta\Delta$}). Ces souris n'expriment pas le CMHII et ont une diminution très importante des thymocytes simples positifs CD4⁺ dans le thymus et des cellules T CD4⁺ en périphérie (Madsen et al., 1999). Lors d'un transfert adoptif de cellules T CD4⁺ naïves dans une souris CMHII ^{$\Delta\Delta$} on observe une diminution de leur survie (Martin et al., 2006) (figure 12). Ainsi en périphérie l'interaction TCR-pCMH est essentielle à la survie des LTs CD4⁺ naïfs.

D'autres signaux apportés par les cytokines comme l'IL-7 essentiellement et l'IL-15 sont nécessaires à cette survie. Ces cytokines sont produites par les cellules stromales situées dans les zones T des SLOs (Link et al., 2007). Les cellules CD4 T_N privées de signalisation IL-7, par blocage du récepteur ou par transfert dans une souris déficiente pour l'IL-7 (IL-7^{KO}), voient leur survie diminuer (figure 12). Les cytokines telles que l'IL-7 et l'IL-15 favorisent la survie cellulaire en induisant l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 qui inhibent la voie mitochondriale de l'apoptose (Surh and Sprent, 2008).

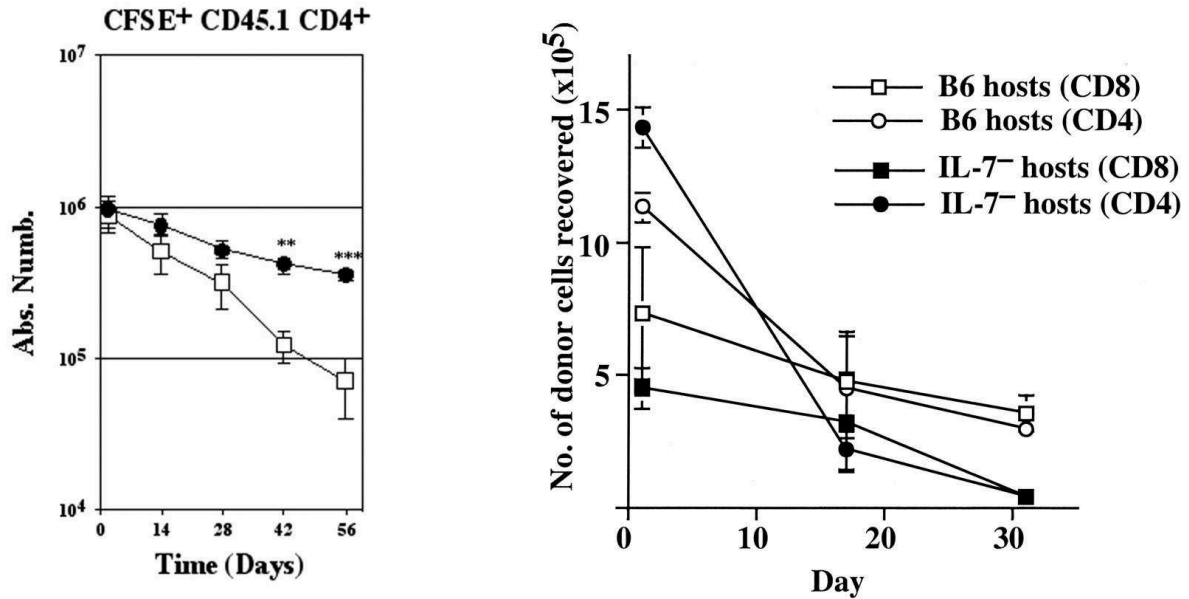


Figure 12: La survie des lymphocytes T nécessite à la fois une interaction TCR-pCMH et l'IL-7. Panel de gauche : Des cellules T CD4⁺ (5×10^6), issues de ganglions de souris C57BL/6 CD45.1, marquées au CFSE ont été injectées par intraveineuse dans des souris C57BL/6 CMHII $\Delta\Delta$ CD45.2. Le nombre absolu de cellules CD4⁺ CD45.1⁺ CFSE⁺ récupérées dans les ganglions et la rate des souris CMHII $\Delta\Delta$ (carré blanc) et C57BL/6 (cercle noir) est représenté en fonction du temps après transfert. Issue de (Martin et al., 2006).

Panel de droite : Des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ (15×10^6), issues de ganglions de souris C57BL/6 Ly5.1, marquées au CFSE ont été injectées par intraveineuse dans des souris C57BL/6 (blanc) ou C57BL/6 IL-7^{KO} (noir). Le nombre absolu de cellules CD4⁺ (cercle) ou CD8⁺ (carré) Ly5.1⁺ CFSE⁺ récupérées dans les ganglions et la rate des souris hôtes est représenté en fonction du temps après transfert. Issue de (Tan et al., 2001).

Sous certaines conditions, les signaux nécessaires à la survie des lymphocytes CD4 T_N peuvent entrainer leur prolifération. Ce phénomène appelé prolifération homéostatique ou encore LIP (Lymphopenia-Induced Proliferation) peut être observé lors d'un transfert de cellules CD4 T_N dans une souris lymphopénique. Ces souris, telles que les souris déficientes pour la protéine RAG ou le CD3, sont dépourvues de lymphocytes T. Ainsi lors du transfert de CD4 T_N dans ces souris, l'augmentation de la disponibilité de l'IL-7 et des complexes pCMH permet à une fraction des cellules de s'engager dans le processus de LIP (Fry and Mackall, 2005; Moses et al., 2003). Ces cellules vont alors proliférer et acquérir les caractéristiques des cellules T mémoires. Enfin la LIP, tout comme la survie, des cellules CD4 T_N est abolie en absence du CMHII (Martin et al., 2003) ou de l'IL-7 (Tan et al., 2001).

Pour conclure nous avons vu que l'homéostasie des lymphocytes T CD4⁺ naïfs nécessite des signaux provenant d'une interaction régulière avec le complexe pCMH ainsi que l'IL-7, et à

plus faible degré l'IL-15. Ces signaux permettent de maintenir les cellules dans un état de quiescence.

2. Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires

a. Fonction des lymphocytes CD4 Tmem

Lors d'une infection, par un virus ou une bactérie, d'un cancer, d'une maladie auto-immune ou d'une allergie par exemple, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont connus pour se différencier en effecteurs après avoir rencontré l'antigène dont elles sont spécifiques. Une fois le pathogène éliminé, la plupart des cellules effectrices meurent par apoptose au cours de la phase de contraction. Cependant, un pool de ces cellules survit et se différencie en cellules mémoires à longue durée de vie. Ces lymphocytes T CD4⁺ mémoires sont aussi Foxp3⁻, CD25⁻ mais expriment fortement le CD44 (CD44^{Hi}) comparé aux cellules naïves. Chez la souris EOPS, ces cellules représentent 5 à 10% de la population de T CD4⁺. Chez l'homme d'âge moyen, qui est soumis à une exposition antigénique permanente au cours de sa vie, on trouve environ 80% de cellules mémoire parmi les lymphocytes T CD4⁺.

Les lymphocytes CD4 Tmem permettent d'augmenter qualitativement et quantitativement la réponse immunitaire en cas de nouvelle rencontre avec le pathogène et sont divisés en deux populations (figure 11) :

- Les cellules T mémoires effectrices (TEMs) CD62L⁻ CCR7⁻. On les retrouve dans le sang et les tissus non lymphoïdes. Elles sont à l'origine d'une réponse effectrice immédiate et produisent rapidement des cytokines, c'est la mémoire protectrice.
- Les cellules T mémoires centrales (TCMs) CD62L⁺ CCR7⁺. L'expression de ces récepteurs leur permet de circuler entre les différents SLOs. Ces cellules sont de bonne productrice d'IL-2 et ont la capacité de proliférer rapidement et de se différencier en cellules effectrices (Sallusto et al., 2004).

b. Homéostasie des cellules CD4 Tmem

L'homéostasie des lymphocytes CD4 Tmem est maintenue par un mécanisme de turnover faible mais continu. Pour cela un signal TCR semble nécessaire pour maintenir les cellules dans un état apte à répondre aux cytokines (Bushar et al., 2010). Les cytokines telles l'IL-7 et l'IL-15, deux cytokines de la famille des γ c, permettent de maintenir ces cellules CD4 Tmem dans un état de prolifération faible mais continue (Surh and Sprent, 2008). C. Riou a démontré que les

voies de signalisation du TCR et des cytokines induisent une phosphorylation inhibitrice du facteur de transcription Foxo3a dans les CD4 Tmem. Foxo3a est alors exporté du noyau et ne peut activer la transcription de Bim et FasL, des molécules pro-apoptotiques (Riou et al., 2007).

3. Les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs

En périphérie on distingue deux types de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs en fonction de leur origine : les Tregs thymiques (tTregs) qui proviennent du thymus et les Tregs périphériques (pTregs) provenant de la différenciation des lymphocytes CD4 T_N. Nous avons vu précédemment (partie II.4.a et b) l'ontogénie des tTregs. Je ne détaillerai ici que l'homéostasie et la fonction des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs en général et je reviendrai plus tard sur l'ontogénie des pTregs.

a. Fonctions des Tregs

Les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs jouent un rôle prépondérant dans la régulation des réponses immunitaires. Pour cela ils utilisent plusieurs modes d'action comme la sécrétion de cytokines immunosuppressives, ils peuvent agir directement sur leurs cibles en activant ou inhibant plusieurs voies moléculaires, ou indirectement via les cellules présentatrices d'antigènes afin d'empêcher l'activation d'autres cellules effectrices (figure 13). Je détaillerai ici les fonctions de l'ensemble des Tregs (tTregs et pTregs).

➤ Les mécanismes de suppression des Tregs

L'IL-10, une molécule anti-inflammatoire sécrétée par plusieurs types cellulaires du système immunitaire, est la première cytokine découverte comme étant impliquée dans les fonctions suppressives des Tregs. En effet, l'IBD (Inflammatory Bowel Disease) induite par le transfert adoptif de cellules CD4 T_N dans un hôte immuno-déficient peut être contrôlé par un transfert de Tregs issue de souris sauvage. Le transfert de Tregs provenant de souris IL-10^{KO} quant à lui ne permet pas ce contrôle de la pathologie (Asseman et al., 1999). De plus les souris où les Tregs sont déficientes pour l'IL-10 développent une IBD, une hyper-sensibilité cutanée et une inflammation pulmonaire (Rubtsov et al., 2008). Ces souris ne développent cependant pas de maladie auto-immune aussi sévère que les souris Foxp3^{KO}, ce qui démontre l'implication d'autres mécanismes suppresseurs. Le TGFβ (Transforming Growth Factor beta) et l'IL-35 sont également importants pour la fonction des Tregs. En plus d'être impliqué dans l'induction de pTreg et le maintien de l'expression de Foxp3 (Chen et al., 2003; Li et al., 2006), le TGFβ joue

un rôle important dans la suppression de la prolifération des Tconvs (Marie et al., 2006; Nakamura et al., 2001). Les Tregs qui produisent de l'IL-35 agissent par contact avec leurs cibles, les transformant en cellules régulatrices qui n'expriment pas Foxp3 et que l'on appelle Tr35, qui possèdent des fonctions suppressives et sont de bonnes productrices d'IL-35 (Collison et al., 2009, 2010).

Les Tregs produisent également d'autres molécules suppressives pour entraîner la mort de leurs cibles. Le granzyme B (GrzmB) permet au Tregs, via la voie perforine/granzyme, de lyser les cellules cibles (Cao et al., 2007). Les protéines TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand), Fas-L (Fas Ligand) et la galectine-1 (Gal-1) induisent l'apoptose chez les cibles des Tregs (Garin et al., 2007; Ren et al., 2007; Strauss et al., 2009).

L'altération métabolique est un autre mécanisme suppresseur des Tregs qui inhibe l'activation et la prolifération des Tconvs. CD39 et CD73, exprimées à la surface des Tregs, transforment l'ATP en adénosine, qui a des propriétés inhibitrices sur les Tconvs (Deaglio et al., 2007). L'AMPc (Adénosine Mono-Phosphate cyclique), présente en grande quantité dans les Tregs, peut être transféré aux Tconvs par les jonctions GAP réduisant ainsi leur prolifération et synthèse d'IL-2 (Bopp et al., 2007). Les Tregs expriment fortement le CD25, comme vu précédemment, et sont donc de grandes consommatrices d'IL-2 pour assurer leur homéostasie. Cette consommation va priver les Tconvs de l'IL-2 environnante, les poussant à rentrer dans un programme d'apoptose (Pandiyani et al., 2007).

Pour finir avec les mécanismes de suppression, les Tregs peuvent agir sur d'autres cellules. Par exemple, ils inhibent le recrutement et la différenciation des monocytes Ly-6C⁺ (Pommier et al., 2013), ou encore induisent l'apoptose dans les cellules dendritiques (Boissonnas et al., 2010). De plus les Tregs peuvent moduler l'activité des DCs pour les empêcher d'activer d'autres effecteurs, en diminuant leurs capacités de co-stimulation (Wing et al., 2008). La protéine CTLA-4 qui est fortement exprimée dans les Tregs se lie à CD80 et CD86. Ainsi les Tregs sont capables d'arracher CD80 et CD86 par trans-endocytose, diminuant ainsi leur expression à la surface des DCs. Les capacités de co-stimulation des DCs sont alors diminuées (Qureshi et al., 2011). De plus, une fois activée les Tregs expriment les molécules LAG-3 (Lymphocyte-Activation Gene-3) et la neuropiline-1 (Nrp-1). LAG-3, un homologue du co-récepteur CD4, se fixe aux molécules du CMHII avec une forte affinité. Nrp-1 lui se fixe au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et aux sémaphorines de classe 3. Ainsi, LAG-3 et Nrp-1 permettent d'augmenter le temps d'interaction entre DC et Tregs, inhibant de ce fait la capacité des cellules dendritiques à présenter l'antigène (Liang et al., 2008; Sarris et al., 2008).

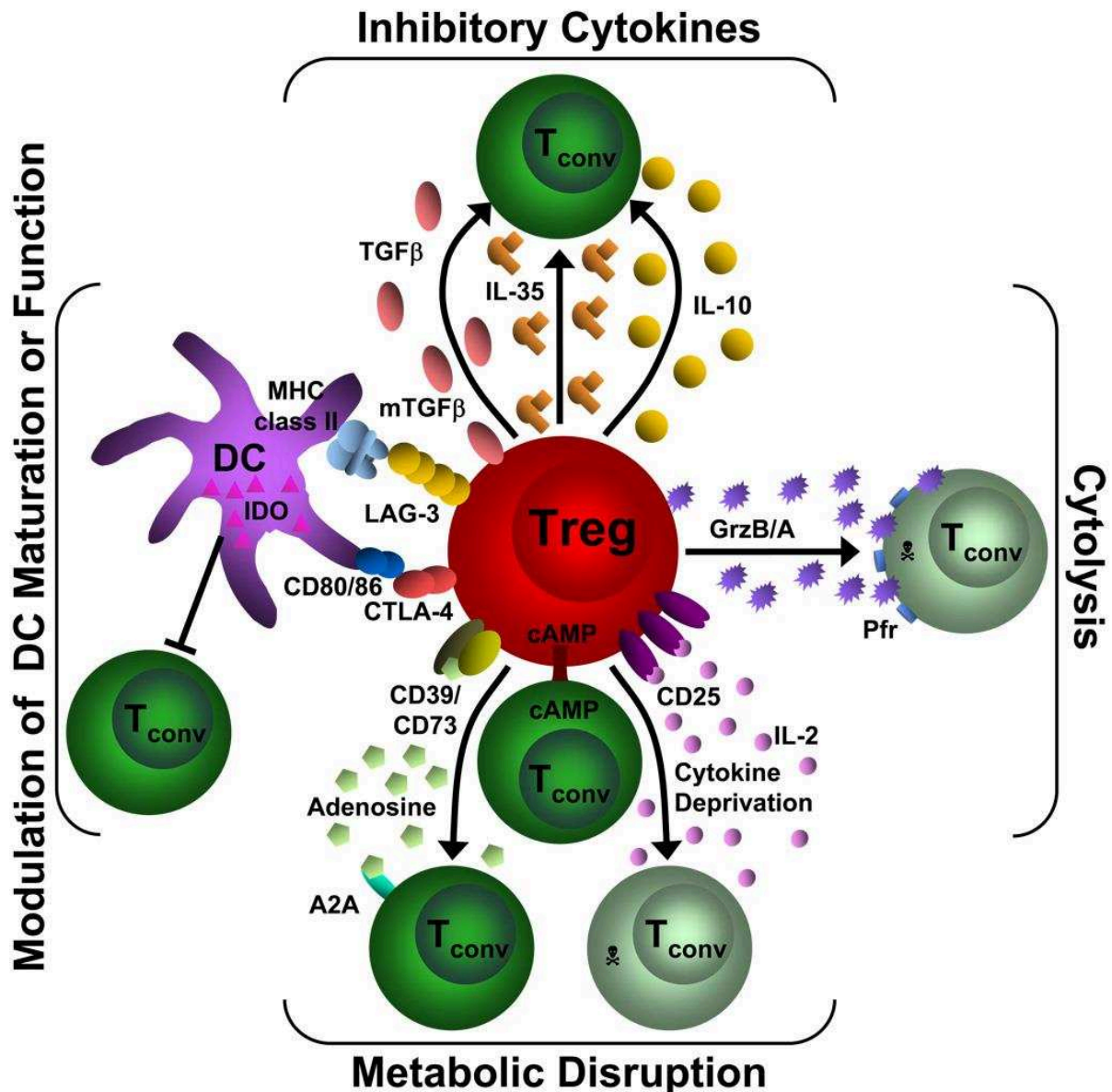


Figure 13 : Mécanismes de suppression des Tregs.

Ce diagramme décrit les quatre modes de suppression des Tregs. Un mode principal de suppression des Tregs est induit par les cytokines inhibitrices IL-10, IL-35 et TGFβ. Les Tregs induisent également une cytolysse par la granzyme A/B et la perforine. Ils peuvent perturber la fonction métabolique en se privant d'IL-2, ce qui entraîne une apoptose, via l'AMPc ou par une immunosuppression induite par A239, qui est généré par CD39/CD73. Les Tregs peuvent également moduler la maturation ou la fonction des DCs via une interaction CD80/86 et CTLA-4 ou via une interaction LAG-3 et CMH de classe II. En outre, ils peuvent induire une augmentation de l'expression d'IDO dans les DCs. Tconv : Cellule T conventionnelle, GrzB/A : granzyme B ou A, Pfr : perforine, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, A2A : récepteur d'adénosine adénine purinergique, IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase, DC : cellule dendritique. Issue de (Workman et al., 2009).

➤ Les cibles des Tregs

Les lymphocytes T régulateurs sont capables d'inhiber différentes populations du système immunitaire (tableau 3).

| Cibles cellulaires | Mécanismes d'action | Références |
|-----------------------|---------------------------------|---|
| Lymphocytes Tconv | Tous mécanismes | (Walker and Abbas, 2002) |
| Lymphocytes B | Perforine/granzyme | (Zhao et al., 2006) |
| Cellules NKs | TGFβ Consommation d'IL-2 | (Ghiringhelli et al., 2005) (Gasteiger et al., 2013) |
| Cellules NKTs | Contact cellulaire | (Azuma et al., 2003) |
| Macrophages | TGFβ | (Tonkin and Haskins, 2009) |
| Cellules dendritiques | Diminution de la co-stimulation | (Workman et al., 2009) |
| Monocytes | IL-10 | (Pommier et al., 2013) |

Tableau 3 : Cibles des Tregs et mécanismes d'action.

De manière intéressante les Tregs ont la capacité d'inhiber plusieurs types de réponses immunes en s'y adaptant. En effet, les lymphocytes CD4 T_N peuvent se différencier en différents effecteurs suivant l'environnement cytokinique dans lequel ils se trouvent. Ce même environnement permet aux Tregs de se spécialiser afin d'adapter au mieux leur réponse dans les organes lymphoïdes et les tissus. Ils peuvent ainsi exprimer Bcl6, GATA3, IRF4, STAT3 ou T-bet qui vont collaborer avec Foxp3 pour inhiber les réponses Th1, Th2, Th17 ou Tfh (figure 14). Cela a été mis en évidence grâce à l'utilisation de modèle de souris transgéniques où les cellules T CD4⁺ régulatrices sont déficientes pour l'un des facteurs de transcription. Par exemple, l'ablation d'IRF4 dans les Tregs conduit à une augmentation de la production de cytokines par les cellules Th2 (Zheng et al., 2009). De la même façon les Tregs déficientes pour GATA3 ne peuvent réguler les réponse Th2 (Wohlfert et al., 2011). L'expression de T-bet par les Tregs leur permet de migrer au site inflammatoire et de contrôler les réponses Th1 (Koch et al., 2009). De la même manière, l'absence de STAT3 dans les Tregs induit une colite auto-immune, dû à une réponse Th17 incontrôlée (Chaudhry et al., 2009). Enfin les Tregs ont besoin d'exprimer Bcl6 afin de contrôler les réponses T et B des centres germinatifs (Chung et al., 2011).

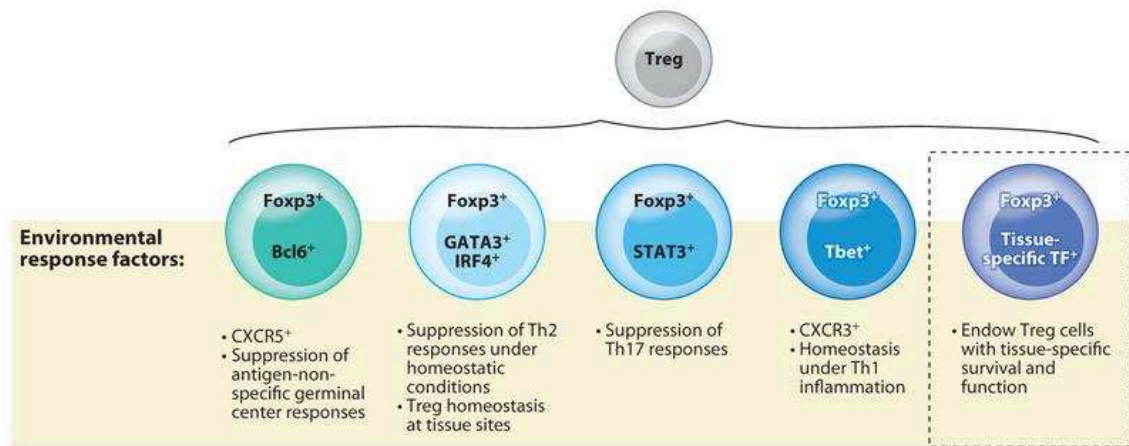


Figure 14 : Hétérogénéité des cellules T régulatrices (Treg) et suppression de classes distinctes de la réponse immunitaire.

Les cellules Tregs générées dans le thymus ou de manière extrathymique peuvent se spécialiser davantage par le biais d'une régulation à la hausse ou de l'activation de facteurs de transcription en réponse à différents stimuli environnementaux. Ces facteurs de réponse environnementaux peuvent coopérer avec Foxp3 pour conférer aux cellules Tregs un état cellulaire transitoire ou durable, leur permettant ainsi de fonctionner sur mesure dans des conditions environnementales ou inflammatoires particulières ; par exemple, l'activation de STAT3 en réponse à l'IL-10 entraîne la génération de cellules Tregs pSTAT3⁺ capables de supprimer les réponses Th17. L'activation de STAT1 en réponse à l'IFN- γ ou d'autres cytokines de la signalisation STAT1 conduit à la génération de cellules Tregs Tbet⁺. Dans un tissu donné, les cellules Tregs induisent, sur instruction de l'environnement tissulaire, l'expression de facteurs de transcription spécifiques au tissu dont la coopération avec Foxp3 permet d'obtenir une signature et une fonction de transcription distinctes des cellules Tregs, et soutient également l'homéostasie du sous-ensemble de cellules Tregs. Issue de (Josefowicz et al., 2012).

Les lymphocytes T régulateurs sont donc des cellules spécialisées dans la régulation des réponses immunes et agissent sur plusieurs populations cellulaires du système immunitaire. Ils jouent ainsi un rôle important dans l'organisme et sont impliqués dans de nombreuses pathologies. En fonction du contexte, ces cellules peuvent être bénéfiques, comme lors d'une réponse auto-immune où elles contrôlent l'inflammation, ou néfastes, comme lors d'un cancer où elles empêchent la mise en place d'une réponse anti-tumorale efficace. Une bonne connaissance de leur régulation est donc un enjeu pour les thérapies cellulaires.

b. L'homéostasie des Tregs

L'homéostasie des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs est en partie influencée, via leur TCR, par une interaction régulière avec le complexe pCMH. Les cellules Tregs possédant une auto-réactivité plus élevée que les CD4 T_N, le signal TCR perçu via leur interaction TCR-pCMH est plus fort. En effet, les travaux cités précédemment, sur la souris Nur77eGFP et le signal TCR fort reçu par les tTreg au cours de leur développement dans le thymus, montrent également qu'à

la périphérie les Tregs reçoivent un signal, dépendant du CMHII, plus fort que les CD4 T_N (Moran et al., 2011). Le maintien de cette interaction régulière avec le complexe pCMH est en grande partie dû aux cellules dendritiques. Il existe une boucle de rétrocontrôle entre les cellules Tregs et les DCs. La diminution du nombre de DCs conduit à la perte des cellules T CD4⁺ régulatrices et les cellules Tregs restantes ont une expression plus faible de Foxp3 (Darrasse-Jèze et al., 2009). De plus notre équipe a récemment démontré que les interactions TCR-pCMH, confèrent un « Tonic Signaling » au Tregs, qui est nécessaire pour leur survie et le maintien de leurs capacités suppressive (Delpoux et al., 2014).

Comme mentionné précédemment, les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs sont caractérisés par l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2, le CD25. Les souris IL-2^{KO} ou CD25^{KO} ont une forte diminution de la population Tregs. Chez la souris, l'injection d'un anticorps anti-IL-2 entraîne également une élimination de ces cellules en périphérie (Setoguchi et al., 2005). Les Tregs ne produisent pas d'IL-2, le facteur de transcription Foxp3 coopérant avec Runx1 et NFAT se lie au promoteur de l'IL-2 et arrête sa transcription. L'IL-2 est donc produite par les autres cellules activées (Ono et al., 2007; Wu et al., 2006). A l'état basal, la survie des cellules T CD4⁺ régulatrices est donc dépendante à la fois du taux de production et de consommation de l'IL-2. Cette cytokine permet en outre via la voie JAK3/STAT5 d'induire l'expression de Bcl-2 nécessaire à la survie des cellules. Les souris déficientes pour JAK3 ou STAT5 présentent un très faible nombre de Tregs thymiques et périphériques (Yao et al., 2007), tout comme les souris CD132^{KO}. Ces résultats comparés aux nombres de Tregs retrouvés chez les souris IL-2^{KO} ou CD25^{KO} suggèrent l'implication d'autres cytokines. L'IL-7 ainsi que l'IL-15 semblent pouvoir compensé en partie la perte de l'IL-2 (Smigiel et al., 2014).

Pour finir un rôle des co-stimulateurs tels que le CD28 ou ICOS a été mis en évidence dans l'homéostasie des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs. Les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels dépourvus de co-stimulation CD28 ne peuvent pas produire l'IL-2 nécessaire à la survie des Tregs (Tang et al., 2003). De plus, la perte du CD28 à la surface des Tregs limite leur prolifération in vitro (Zhang et al., 2013). Enfin, chez les souris déficientes pour ICOS, on observe une diminution des Tregs due à un défaut de leur homéostasie en périphérie (Burmeister et al., 2008).

4. La circulation des lymphocytes T CD4⁺ en périphérie

a. Entrée des LTs par les HEVs

En périphérie les lymphocytes T circulent entre les différents organes lymphoïdes secondaires : les ganglions périphériques, les ganglions mésentériques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) comme les Plaques de Peyer. L'entrée des LTs au sein de ces organes se fait via des structures capillaires de type HEVs (High Endothelial Venules), qui sont spécialisées dans le homing des lymphocytes T. Le phénotype et la fonction des HEVs sont régulés par les cellules dendritiques CD11c⁺. En leur absence les HEVs sont immatures et ne peuvent recruter les LTs (Girard et al., 2012). La migration des lymphocytes T dans les ganglions se déroule en quatre étapes (figure 15) :

- « Rolling » : les interactions entre les molécules d'adhésions exprimées par les LTs, la L-selectin (CD62L) et les motifs Lewis X des glycoprotéines exprimées par l'endothélium permettent aux LTs de ralentir leur course.
- « Sticking » : les HEVs expriment constitutivement CCL21, une chimiokine, qui est captée par le récepteur CCR7 à la surface des lymphocytes T. Cette interaction permet d'activer l'intégrine LFA-1 (Leukocyte Function-Associated antigen 1) exprimé par les LTs. La liaison de LFA-1 aux molécules d'adhésion des HEVs, ICAM1/2 (InterCellular Adhesion Molecule 1/2), induit l'arrêt des lymphocytes.
- « Crawling » : au cours de cette étape les LTs rampent à la surface des cellules endothéliales.
- « Transmigration » : les lymphocytes T passent entre deux cellules endothéliales pour entrer dans le ganglion. Cette étape est facilitée par les cellules fibroblastiques réticulaires (FRCs), qui s'écartent les unes des autres pour former des « rampes de sorties ».

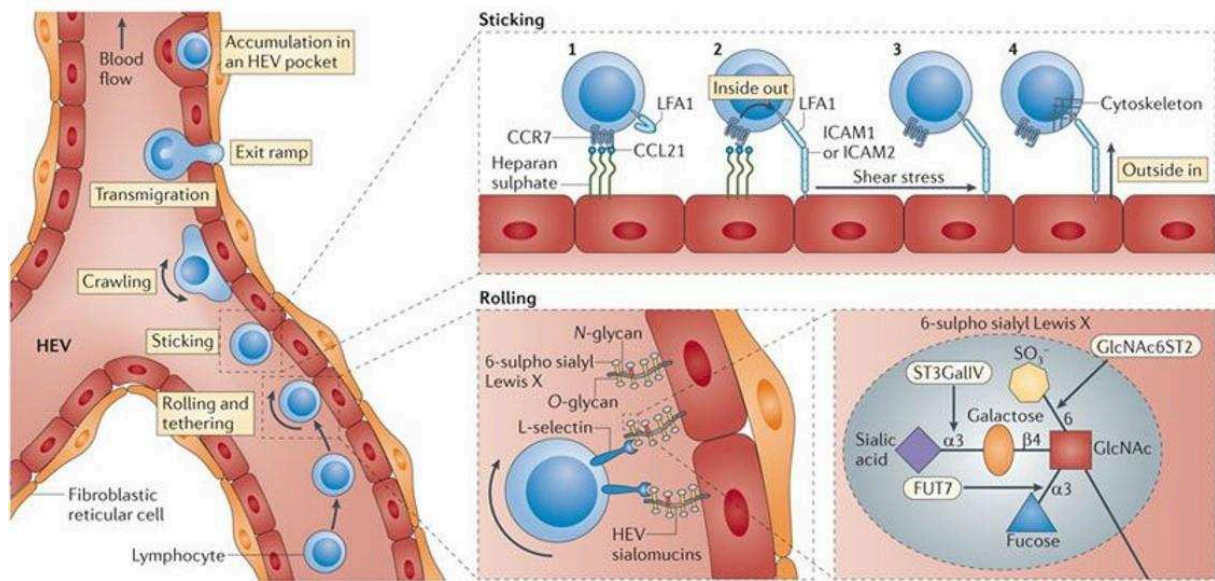


Figure 15: Entré d'un lymphocyte T dans un ganglion. Issue de (Girard et al., 2012).

Une fois l'endothélium traversé, les lymphocytes CD4⁺ T_N vont se localiser principalement dans la zone T du ganglion. Ici ils vont pouvoir scanner les cellules dendritiques et autres APCs (cellules B, macrophages) à la recherche de l'antigène dont ils sont spécifiques et de signaux de survie. Si les cellules ne rencontrent pas cet antigène, elles ne s'activeront pas et retourneront dans la circulation via les vaisseaux lymphatiques efférents et le canal thoracique (von Andrian and Mempel, 2003). L'équipe de RN. Germain a pu quantifier et estimer à 12h le temps de transit des LTs CD4⁺ dans un ganglion. De plus, par une technique de microscopie intra-vitale, ils ont également visualisé et quantifié le temps d'interaction entre les LTs et les DCs. Cette rencontre dure en moyenne 3 à 4 minutes avec des interactions brèves pour la plupart et certaines rares pouvant aller jusqu'à plus de 15 min. D'après ces résultats ils ont estimé que les lymphocytes T CD4⁺ analysent 160 à 200 cellules dendritiques à chaque passage dans les ganglions (Mandl et al., 2012). Lorsque ces interactions ne conduisent pas à l'activation des cellules, elles participent à leur survie. En effet cette rencontre TCR-CMHII permet aux LTs CD4⁺ de recevoir des signaux dus à la reconnaissance d'un peptide du Soi, appelé « Tonic Signaling ». Ce Tonic Signaling influence la survie, comme nous l'avons vu précédemment, mais également la fonction des lymphocytes T.

b. Sorties des LTs

De manière similaire à la sortie du thymus, les lymphocytes T utilisent principalement l'interaction en leur récepteur S1PR1 et la chimiokine S1P, présente en grande quantité dans la lymphe, pour sortir vers le vaisseau lymphatique efférent. Dans le ganglion, la migration des LTs est essentiellement régulée par l'axe CCR7-CCL19/21. CCR7 étant exprimé par les LTs et les chimiokines CCL19 et 21 par les FRCs. Le signal induit par cette interaction entre également en jeu dans la rétention des LTs à l'intérieur du ganglion. Ce signal peut être outrepassé par celui induit par S1P-S1PR, ce qui permet la sortie des lymphocytes T.

Plusieurs mécanismes régulent l'expression de S1PR1 à la surface des LTs. Comme nous l'avons vu, la protéine CD69 induite suite à un signal TCR régule négativement S1PR1. Au niveau transcriptionnelle, le facteur de transcription Klf2 (Krüppel-like factor 2) induit l'expression de S1PR1 (Skon et al., 2013). Klf2 étant sous le contrôle de Foxo1, un TF exclu du noyau suite à une stimulation TCR. Au cours de leur trajet dans le ganglion, les lymphocytes T expriment progressivement S1PR1 en réponse à une faible quantité de S1P dans le ganglion (Park et al., 2012). Cependant lors d'une interaction avec une APC, le signal TCR reçu par les lymphocytes T va induire l'expression de CD69 ainsi que l'exclusion nucléaire de Foxo1, inhibant l'expression de S1PR1. Une fois l'interaction terminée, l'entrée nucléaire de Foxo1, permettant l'expression de Klf2, plus la perte de CD69 vont induire l'expression de S1PR1 à la surface des LTs et permettre leur sortie.

IV. Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en effecteurs

Lors d'une stimulation antigénique les lymphocytes T CD4⁺ naïfs qui reconnaissent l'antigène, présenté par une APC, dont ils sont spécifiques vont pouvoir s'activer. L'interaction entre LT et APC forme un complexe que l'on appelle synapse immunologique (figure 16). Cette synapse, est aussi connue sous le nom de complexe supramoléculaire d'adhésion (SMAC) et a été découverte par A. Kupfer (Monks et al., 1998). Elle permet le maintien de la liaison TCR avec le complexe peptide/CMH-II afin d'obtenir une activation complète de la cellule T et permettre sa différenciation. Les cofacteurs comme CD28 et LFA1, exprimés par les LTs, et leurs ligands respectifs CD80/86 et ICAM1, exprimés par les APCs, consolident cette synapse et régulent l'activation des lymphocytes T.

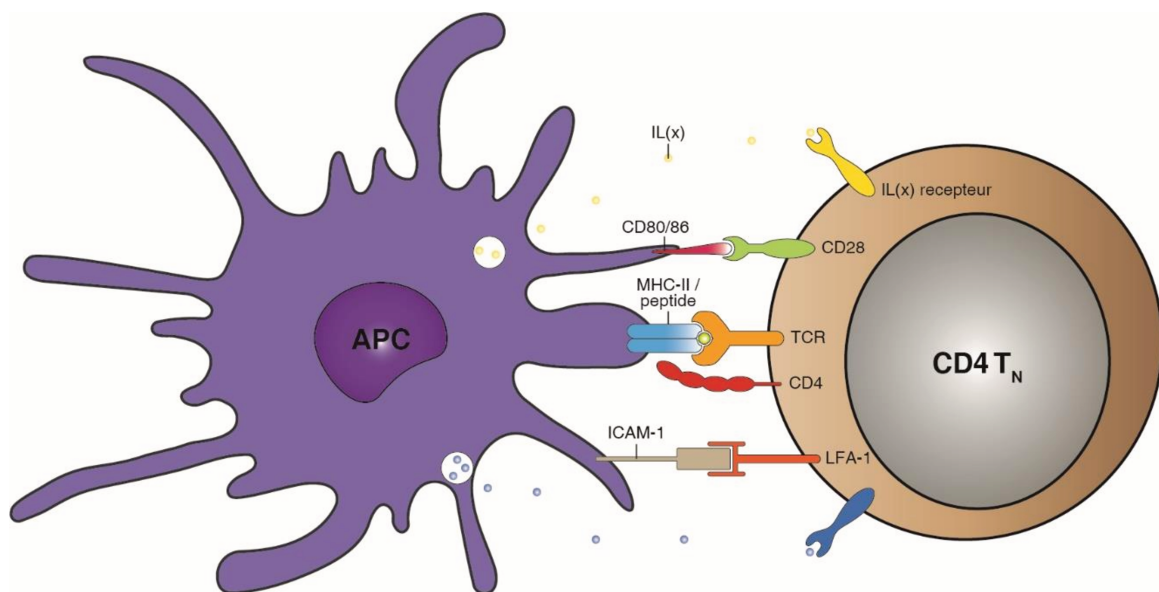


Figure 16 : La synapse immunologique.

Lors de son activation, le lymphocyte T CD4⁺ naïf (CD4 T_N) interagit avec une cellule présentatrice d'antigène (APC). Cette interaction entre le TCR, exprimé par le CD4 T_N, et le complexe peptide/CMH-II, exprimé par l'APC, forme un complexe supramoléculaire d'adhésion (SMAC) ou synapse immunologique. Les molécules comme CD4, CD28 et LFA-1 à la surface du CD4 T_N se lie au CMH-II, CD80/86 et ICAM-1 respectivement afin de consolider cette synapse et réguler l'activation du lymphocyte T CD4⁺ naïf.

L'autre élément clé de la différenciation des lymphocytes CD4 T_N est l'environnement cytokinique dans lequel ils se trouvent au moment de leur activation. Les interleukines activent les voies de signalisations STAT (Signaling Transducer and Activator of Transcription) par des modifications post-transcriptionnelles comme la phosphorylation de tyrosine et/ou

sérine/thréonine. L'activation de ces voies, en plus de la signalisation TCR, procure aux cellules effectrices la capacité de produire des cytokines spécifiques et joue un rôle important dans l'induction des facteurs de transcription majeurs qui caractérisent chaque population. De nombreuses études, basées sur l'utilisation de modèles de souris KO pour certains récepteurs aux cytokines, ont mis en évidence l'importance des interleukines et nous permettent aujourd'hui d'orienter in vitro la différenciation des LTs CD4⁺ naïfs.

Chaque type d'effecteur produit des cytokines spécifiques qui leur confèrent des caractéristiques propres et des rôles particuliers. C'est pourquoi, avec cette multitude d'effecteur possible, « les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle central dans la fonction du système immunitaire : Ils aident les cellules B à fabriquer des anticorps, augmentent et maintiennent les réponses des cellules T CD8⁺, régulent la fonction des macrophages, orchestrent les réponses immunes contre une large variété de micro-organismes pathogéniques *et régulent ou suppriment les réponses immunes à la fois pour contrôler l'auto-immunité et ajuster la magnitude et la persistance des réponses.* ». Issue de (Zhu et al., 2010).

1. Les lymphocytes Th1 / Th2 / Th9 / Th17 / Th22 / Tfh

Il est maintenant bien connu que, suite à leur activation, les LT CD4⁺ naïfs ont la capacité de se différencier en plusieurs types de cellules effectrices appelées lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires ou T helper (Th). Le premier modèle proposé par Mosmann et Coffman en 1986 (Mosmann et al., 1986) distinguait deux types d'effecteurs : Th1 et Th2. Depuis lors d'autres cellules effectrices ont été découvertes comme : Th9, Th17, Th22, pTreg et Tfh. En plus des cytokines nécessaires à leur activation et celles qu'elles produisent, chaque type de cellules effectrices est caractérisée par un facteur de transcription (figure 17).

a. Fonctions

En plus de l'IFN γ (InterFéroN gamma) les cellules Th1 sont de bonnes productrices d'IL-2 et de TNF- β (Tumor-Necrosis Factor). Ces cytokines leur confèrent un rôle dans la protection contre les pathogènes intracellulaires comme les virus et les bactéries, l'activation des macrophages pour les réponses dépendantes des phagocytes, l'immunité à médiation cellulaire (prolifération des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxique) et l'inflammation (Romagnani, 1999).

Les Th2 sont des cellules productrices d'IL-4, 5, 13 et aussi d'IL-10 (IL-6 et IL-9). Elles ont pour rôle de lutter contre les pathogènes extracellulaires tels que les bactéries ou les parasites

comme les nématodes. Elles sont impliquées dans la réponse immunitaire à médiation humorale (activation de la production d'anticorps par les lymphocytes B), l'activation des éosinophiles et l'inhibition de plusieurs fonctions des macrophages orientant la réponse immunitaire de façon phagocyte indépendante. De plus elle joue un rôle important dans l'allergie et l'asthme (Romagnani, 1999).

L'interleukine 9 est la cytokine majoritaire produite par les Th9. Ces cellules produisent aussi de l'IL-10 et IL-21, ce qui leur procure un rôle dans les allergies, l'asthme, l'auto-immunité et les réponses anti-tumorales (Kaplan, 2013).

Les Th17 sont principalement caractérisées par leur capacité à produire de l'IL-17, mais sont aussi des productrices d'IL-21 et IL-23. Elles sont impliquées dans la lutte contre les pathogènes extracellulaires tels que les champignons et les bactéries et jouent un rôle important dans l'inflammation pour le recrutement des neutrophiles et macrophages (Korn et al., 2009).

L'IL-22, produite par les cellules Th22, agit sur divers types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les hépatocytes, les cellules pancréatiques et les fibroblastes et est importante pour médier les défenses de l'hôte. (Jia and Wu, 2014).

Les lymphocytes T follicular helper ou Tfh sont nécessaires au développement du centre germinatif. Ils permettent la maturation, la survie, la prolifération et la commutation de classe des Igs des lymphocytes B. C'est pourquoi ils jouent un rôle important dans l'immunité contre les pathogènes (Crotty, 2014).

Les cellules effectrices possèdent des fonctions spécifiques dues aux cytokines qu'elles produisent. Ainsi lors d'une réponse immunitaire qui n'est pas régulé de façon efficace, chaque effecteur peut être associé à une pathologie en fonction de sa spécificité (tableau 4).

| Effecteurs | Stimulation | Facteurs de transcription | Cytokines produites | Rôle | Maladies associées |
|------------|--|---|--|--|---|
| Th1 | IL-12 IL-27 | T-bet STAT1 STAT4 Ets-1 Hxl Runx3 | IFN γ IL-2 TNF- β | Pathogènes intracellulaires (bactérie, virus) Immunité à médiation cellulaire Activation des macrophages Inflammation | Thyroïdite de Hashimoto Ophtalmopathie de Grave Sclérose en plaque Diabète de type 1 La maladie de Crohn La polyarthrite rhumatoïde Rejet aigu d'allogreffe Ulcère peptique induit par Helicobacter pylori Sarcoïdose |
| Th2 | IL-4 IL-2 | GATA-3 STAT6 STAT5 Gfi-1 IRF4 c-Maf | IL-4 IL-5 IL-13 IL-10 (IL-6) (IL-9) | Pathogènes extracellulaires (parasites, bactéries) Immunité à médiation humorale Allergie / Asthme | Syndrome d'Omenn Conjonctivite vernale Troubles atopiques Sclérose systémique progressive Alvéolite fibrosante cryptogène Parodontite chronique Progression vers le SIDA dans l'infection à VIH Progression de la tumeur |
| Th9 | IL-4 TGF- β | PU.1 STAT6 GATA-3 | IL-9 IL-10 IL-21 | Allergie / asthme Anti-tumoral | Polyarthrite rhumatoïde Sclérose en plaque Progression de la tumeur |
| Th17 | IL-6 TGF- β IL-21 IL-23 | RORγt STAT3 IRF4 Runx1 | IL-17 IL-21 IL-23 | Pathogènes extracellulaires (champignons, bactérie) Inflammation Recrutement des neutrophiles et macrophages | Polyarthrite rhumatoïde Sclérose en plaque Troubles inflammatoires de l'intestin |
| Th22 | IL-6 TNF- α | AHR | IL-22 | Pathogènes Augmente la réponse immunitaire innée | Inflammation de la peau Troubles inflammatoires de l'intestin Sclérose en plaque Tumeur |
| Tfh | IL-6 IL-21 | Bcl-6 IRF4 Batf c-Maf | IL-4 IL-21 | Développement du CG Maturation, survie, prolifération et commutation de classe des lymphocytes B | Chorioméningite lymphocytaire (LCMV) |

Tableau 4 : Les effecteurs Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et Tfh.

b. Signaux de différenciation

Lors de la rencontre avec une cellule présentatrice d'antigène, le premier signal reçu par les lymphocytes T est le signal TCR. Les voies moléculaires induites par la suite sont très dépendantes de la force de ce signal. Ainsi, de manière similaire à la sélection thymique, la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en cellules effectrices peut être dictée par la force du signal TCR reçu lors de leur activation. Les premières études qui révèlent l'importance de la force de ce signal ont utilisé un modèle de souris TCR transgénique, où le TCR α/β exprimé

par les lymphocytes T reconnaît spécifiquement le cytochrome C de pigeon (MCC). En stimulant les LTs CD4⁺ issus de ces souris avec des peptides MCC de différentes affinités, on observe qu'un faible signal TCR induit préférentiellement la différenciation Th2, tandis qu'un signal fort les orientes vers le lignage Th1 (Constant et al., 1995; Tao et al., 1997). Une faible stimulation TCR entraîne une activation faible et transitoire de Erk conduisant à l'expression de GATA3 et la production d'IL-2, qui sont en faveur de voie Th2 (Liao et al., 2008). A l'inverse, une activation forte et prolongée d'Erk, dû à un signal TCR fort, bloque l'expression de GATA3 et l'activation de STAT5 via l'IL-2 transitoirement. Ainsi la différenciation Th1 est favorisé (Jorritsma et al., 2003).

De manière similaire à la régulation Th1/Th2, la force du signal TCR est un facteur déterminant dans le choix du lignage Th17 ou iTreg (Tregs induites in vitro). Suite à un signal TCR faible, les cellules CD4 T_N ne parviennent pas à se différencier en Th17, même en présence des cytokines nécessaires, mais expriment Foxp3 (Turner et al., 2009). Une stimulation TCR forte, inhibant la voie iTreg, permet de bloquer également la voie IL-2/STAT5 (Molinero et al., 2011). Le blocage de cette voie semble favoriser la voie Th17. L'activation d'Erk, suite à un fort signal TCR, semble également bloquer la voie TGFβ nécessaire à l'induction de Treg (Matsuura et al., 2005).

En plus des signaux TCR et de co-stimulation reçus lors de la rencontre avec une APC, la différenciation vers un type d'effecteur est dictée par les cytokines présentes lors de l'activation. La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Th1 a d'abord été attribuée à l'interleukine 12 qui permet l'activation de la voie de signalisation STAT4 (Gazzinelli et al., 1993; Hsieh et al., 1993). Par la suite le rôle important de l'IFNγ, qui permet d'activer la voie STAT1, a été mis en évidence (Lighvani et al., 2001; O'Garra, 1998) tant pour son effet inhibiteur sur la différenciation Th2 que pour sa capacité à induire rapidement le facteur de transcription T-bet (T box expressed in T-cells). L'IL-27, qui active aussi la voie STAT1, semble également jouer un rôle dans les temps précoces de la différenciation (Owaki et al., 2005).

Pour la génération de Th2, caractérisé par le facteur de transcription GATA3, l'interleukine 4 est la cytokine essentielle (Swain et al., 1990) via l'activation de la voie STAT6. L'IL-2, qui active STAT5, est également important pour optimiser cette différenciation.

Au début des années 2000, alors que le modèle Th1 vs Th2 prédominait, un troisième type de cellule effectrice fut découvert et dont la génération fut attribuée à l'IL-23 (Aggarwal et al., 2003). Cette population, produisant de l'IL-17, fut désignée comme Th17 (Harrington et al.,

2005; Park et al., 2005). Par la suite l'IL-6, qui active STAT3, et le TGF- β , qui active la voie des SMADs, ont été décrite comme les cytokines essentiels à la différenciation Th17 et l'expression de ROR γ t (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). L'IL-23 quant à elle semble intervenir plus tardivement dans le maintien du phénotype des Th17. De plus l'IL-21 induite par l'IL-6 amplifie de façon autocrine la voie Th17 (Zhou et al., 2007).

Les cellules Th9 ont été l'une des dernières populations de cellules effectrices à être découverte. Leur différenciation est due à la présence de l'IL-4 et du TGF- β durant leur activation (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008).

Les cellules effectrices Th22, récemment découverte également, provienne de la différenciation des CD4 T_N en présence d'IL-6 et de TNF- α (Duhon et al., 2009).

Pour finir les Tfh ou T follicular helper sont des effecteurs tout comme les autres LT CD4⁺ auxiliaires, avec tout de même une particularité. Ces cellules accomplissent leur fonction à l'intérieur du centre germinatif des lymphocytes B (Vinuesa et al., 2005). Leur différenciation est due à l'IL-6 et l'IL-21, qui comme vue précédemment active la voie STAT3 (Nurieva et al., 2008).

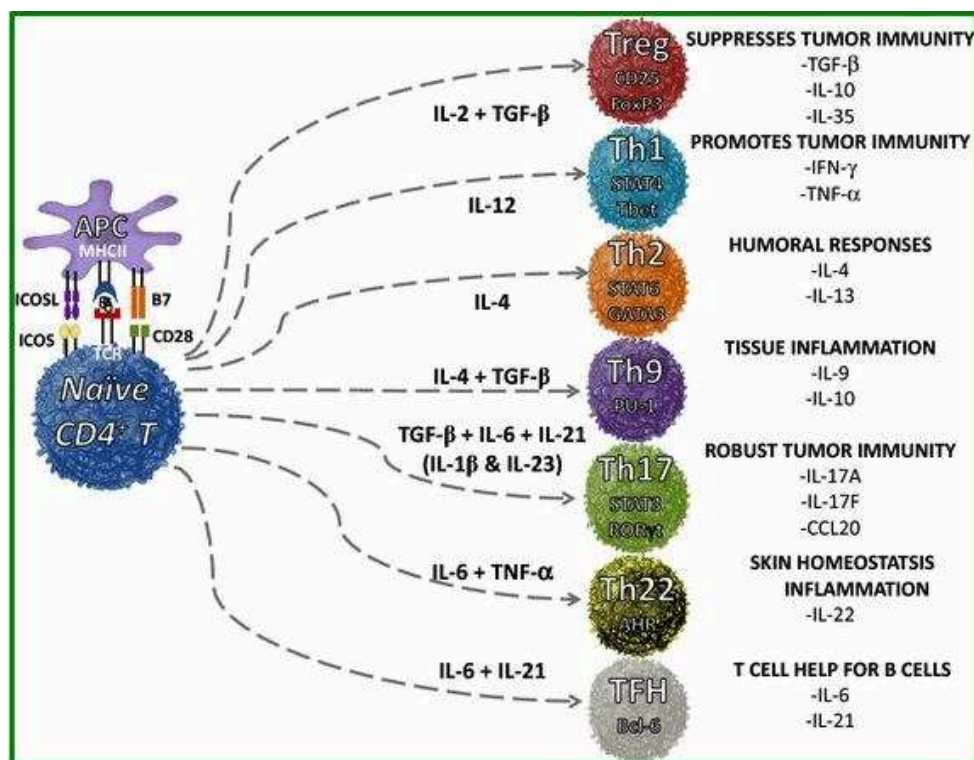


Figure 17 : Différenciation les lymphocytes T CD4⁺ naïfs en effecteurs.

Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, les cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh) et les cellules T régulatrices (Treg) sont induites via diverses cytokines et molécules co-stimulatrices produites par des cellules

présentatrices d'antigène (APC), telles que les cellules dendritiques et les macrophages. Ces sous-ensembles distincts régulent la réponse immunitaire aux antigènes étrangers, du Soi et de la tumeur. Issue de (Majchrzak et al., 2016).

2. Les lymphocytes pTregs

Les pTregs ou iTregs (pour Tregs induit in vitro) ont été mise en évidence au début des années 2000 par l'équipe de J. Lafaille dans un modèle d'EAE (Furtado et al., 2002). L'une des différences majeures avec les tTregs, qui sont produites dans le thymus via la reconnaissance du Soi seulement, est que les pTreg peuvent être générées par la reconnaissance d'antigènes du non-Soi (Kretschmer et al., 2005). Les modèles de tolérance orale par administration de faibles doses d'antigène en sont de bons exemples (Coombes et al., 2007; Mucida et al., 2005). La rencontre avec la flore commensale également, qui aboutit à la génération de cellules T régulatrices plutôt que d'effecteurs pathogènes (Lathrop et al., 2011). Ces travaux montrent aussi l'importance d'une éducation du système immunitaire aux antigènes étrangers en périphérie. En plus d'être générées en condition non inflammatoire, les pTregs peuvent également se différencier à partir des CD4 T_N lors d'une inflammation, comme l'asthme par exemple (Curotto de Lafaille et al., 2008), lors d'une greffe (Cobbold et al., 2004), lors d'une infection (Finney et al., 2007) ou encore dans un contexte tumoral (Sharma et al., 2005).

a. Fonctions

Les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs générés à la périphérie ont des fonctions équivalentes à ceux générés dans le thymus (voir partie III. 3.a). Bien que leur origine soit différente, l'analyse de leurs profils d'expression génique montre une grande similitude. Cependant, cela n'exclut pas la possibilité que chaque population soit plus apte à utiliser certains mécanismes de suppression. L'analyse transcriptomique, par exemple, montre un ratio de 2,2 pour l'IL-10 en faveur des pTregs. De plus les pTreg ont une expression accrue de PD-1 tandis que les tTregs expriment plus fortement le granzyme B (Haribhai et al., 2011). Dans ces travaux, D. Haribhai démontre également que les pTregs et les tTregs ont des rôles complémentaires. Pour cela il utilise un modèle de souris déficiente pour la protéine Foxp3, qui développe rapidement une maladie autoimmune lymphoproliférative. Le transfert de Tregs permet de contrôler la pathologie. Cependant le co-transfert de tTregs et de Tconv est plus efficace qu'un transfert de tTregs seul. En effet, lors du co-transfert il démontre qu'un nombre important de pTregs est

général. Résultat qu'il a également observé dans le modèle de l'IBD (Haribhai et al., 2009). Ainsi, agissant de concert, les tTregs et les pTregs contrôlent mieux la maladie.

b. Signaux

Le signal TCR, comme pour les autres effecteurs, joue un rôle important dans l'induction de pTregs. Ainsi l'affinité du TCR pour son ligand est essentielle. En effet, le groupe de J. Allison a montré, par l'utilisation de peptides antigéniques de faible ou forte affinité pour un même TCR, que les peptides de hautes affinités permettent de générer plus efficacement des pTregs par rapport à ceux de faible affinité (Gottschalk et al., 2010). En plus de ce signal TCR, une co-stimulation sous optimale semble être en faveur de l'induction de Foxp3. CTLA4, qui est dispensable pour la différenciation de Treg dans le thymus, est nécessaire à l'induction de Foxp3 (médiée par le TGF β) (Zheng et al., 2006), alors que CD28 semble diminuer cette expression (Kim and Rudensky, 2006).

Les cytokines telles que le TGF β et l'IL-2 sont également essentielles. Le TGF β facilite via Smad2/3 l'expression de Foxp3 dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs en périphérie (Chen et al., 2003; Selvaraj and Geiger, 2007; Zheng et al., 2004). L'IL-2 augmente l'expression de Foxp3 in vitro (Davidson et al., 2007), la survie et la prolifération des pTregs via STAT5 (Laurence et al., 2007) et inhibe la différenciation en Th17 en présence de TGF β . De plus le TGF β permet la répression de Gfi-1, un facteur de transcription qui inhibe l'induction de Th17 et de pTregs à partir de CD4 T_N (Zhu et al., 2009). L'acide rétinoïque aussi est impliqué dans la génération de pTregs (Sun et al., 2007). Cette molécule augmente l'expression de Foxp3 via RAR (Retinoid Acid Receptor) et RXR (Retinoid X Receptor) (Xu et al., 2010).

c. Régulation de l'expression de Foxp3

Foxp3 est le facteur de transcription essentiel au développement et à la fonction des Tregs (Hori et al., 2003; Tonkin and Haskins, 2009). Le gène Foxp3 maintenant bien caractérisé est composé d'un promoteur et de trois enhancers appelés CNS1, CNS2 et CNS3 (Conserved Noncoding DNA Sequences). Le CNS1 contient des éléments de réponse au TGF β et est indispensable pour l'induction de pTreg. Le CNS2 est l'enhancer sensible aux voies du TCR et de l'IL-2. Il contient une région bien conservée au cours de l'évolution appelé TSDR (Treg-Specific Demethylated Region) regroupant plusieurs îlots CpG. Le CNS3 quant à lui est responsable de l'initiation de l'expression de Foxp3 (Zheng et al., 2010). Récemment, une région en amont du promoteur a également été décrite comme jouant un rôle dans l'expression

de Foxp3. Le CNS0 où se lie Satb-1 (Kitagawa et al., 2017). De nombreux facteurs issus de la signalisation TCR, TGF β et IL-2 peuvent se lier aux différents éléments de Foxp3 et sont impliqués dans son expression (figure 18).

➤ Régulation transcriptionnelle

Le facteur de transcription c-Rel, membre de la famille NF κ B, est essentiel au développement des lymphocytes T régulateurs thymiques (Isomura et al., 2009). Il peut directement réguler l'expression de Foxp3. En effet, la différenciation des cellules T déficientes pour c-Rel en cellules Tregs est très diminuée alors qu'une activation constitutive de l'inhibiteur I κ B kinase 2 est suffisante pour induire l'expression de Foxp3 dans les CD4⁺ SP (Long et al., 2009). De plus c-Rel semble initier l'expression de Foxp3 en se liant au CNS3. Il permet ainsi la formation d'un complexe appelé enhanceosome, qui consiste au recrutement de plusieurs facteurs de transcription au niveau du promoteur de Foxp3 (Ruan et al., 2009). Les membres de la famille Nr4a, induits par l'activation du TCR, se fixent également au promoteur pour induire son expression. Leurs délétions dans les cellules T conduisent à une perte des tTregs et une auto-immunité systémique dans plusieurs organes (Sekiya et al., 2011, 2013). Ces TFs, en aval de l'activation TCR, qui semblent essentiels au développement des tTregs sont aussi liés à l'induction des Tregs en périphérie.

D'autres facteurs issus du signal TCR, comme NFAT et AP-1, peuvent se fixer au promoteur. In vitro, ils sont nécessaires à l'expression de Foxp3 (Mantel et al., 2006). De plus la délétion combinée de NFAT1/NFAT2 engendre une diminution du développement des Tregs dans le thymus (Oh-hora et al., 2013). NFAT et AP-1 possèdent également un site de fixation au CNS1 (Xu et al., 2010). Ils coopèrent avec Smad2/3 et sont des facteurs essentiels pour l'expression de Foxp3 induite par le TGF β (Takaki et al., 2008; Tone et al., 2008). L'acide rétinoïque qui permet d'augmenter l'induction de pTreg agit au niveau du CNS1. La liaison de RAR-RXR au niveau du CNS1 augmente l'acétylation des histones au site de fixation de Smad3, facilitant ainsi sa fixation (Takaki et al., 2008; Xu et al., 2010).

L'IL-2, comme vu précédemment, est essentielle à la génération de Tregs dans le thymus. En périphérie cependant son rôle est d'augmenter et de maintenir l'expression de Foxp3. En effet STAT5, en plus de se lier au promoteur, va permettre la stabilité d'expression de Foxp3 en se fixant au CNS2 (Chen et al., 2011; Yao et al., 2007). D'autres facteurs comme CREB et le complexe Runx/Cfb- β sont impliqués dans l'expression et la stabilité de Foxp3 via leur site de fixation au CNS2 (Kim and Leonard, 2007; Rudra et al., 2009).

La dernière famille de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de Foxp3 dont je parlerai est Foxo. Trois membres sur quatre (Foxo1, Foxo3 et Foxo4) sont régulés à la fois par le TCR et les signaux de co-stimulation via la voie PI3K/Akt. Akt phosphoryle les protéines Foxo, induisant leur exclusion du noyau. Ces facteurs semblent jouer un rôle important dans la génération de tTreg et pTreg. En effet les souris Foxo1/Foxo3 double KO ont une diminution importante du pourcentage de Tregs et les Tregs restantes ont des capacités suppressives diminuées (Ouyang et al., 2010). De plus chez les souris exprimant une forme constitutivement active d'Akt, l'expression de Foxp3 est inhibé dans le thymus ainsi que l'induction d'iTreg médié par le TGF β (Haxhinasto et al., 2008). Dans le thymus, les cellules T CD4⁺ régulatrices sont générées en deux étapes (Hsieh et al., 2012). Cela suggère que l'exclusion de Foxo du noyau, dû au fort signal reçu via le TCR/CD28, participe à l'induction des tTregs. La phase de contact fini, le retour de Foxo dans le noyau serait nécessaire pour leur maturation. En périphérie, cependant le rôle de Foxo dans l'induction de Foxp3 semble controversé. En effet contrairement au tTregs, l'induction pTregs est favorisée par une faible stimulation antigénique. Une forte co-stimulation via CD28 bloque la génération de pTregs (Benson et al., 2007) tandis que CTLA-4 la favorise (Zheng et al., 2006). Donc une diminution ou inhibition de la voie PI3K/Akt, qui favorise l'état nucléaire de Foxo, semble augmenter l'expression de Foxp3 induit par le TGF β . Cependant, l'effet observé via le blocage de la voie Akt peut également être attribué à l'inhibition de la voie mTOR, une voie activée par Akt. En effet Sauer et al. ont proposés que l'axe PI3K-Akt-mTOR régule négativement l'expression de Foxp3 (Sauer et al., 2008). A l'inverse, lorsque Akt est activé constitutivement, l'induction d'iTreg médiée par le TGF β est inhibé. L'activation d'Akt permettant l'export de Foxo vers le cytoplasme, l'effet observé pourrait être attribué au fait que Foxo n'est plus nucléaire. Mais là encore les auteurs soulignent l'implication de la voie Akt-mTOR. Une autre explication serait que cette activation soutenue d'Akt favorise l'export de NFAT, qui est localisé dans le noyau suite à une stimulation TCR, via GSK3. NFAT étant impliqué dans l'induction de Foxp3 médiée par le TGF β . Tous ces travaux mènent à penser que l'exclusion de Foxo favorise donc l'induction de Foxp3 lors de la différenciation des pTregs, mais certains points restent encore à être élucidés.

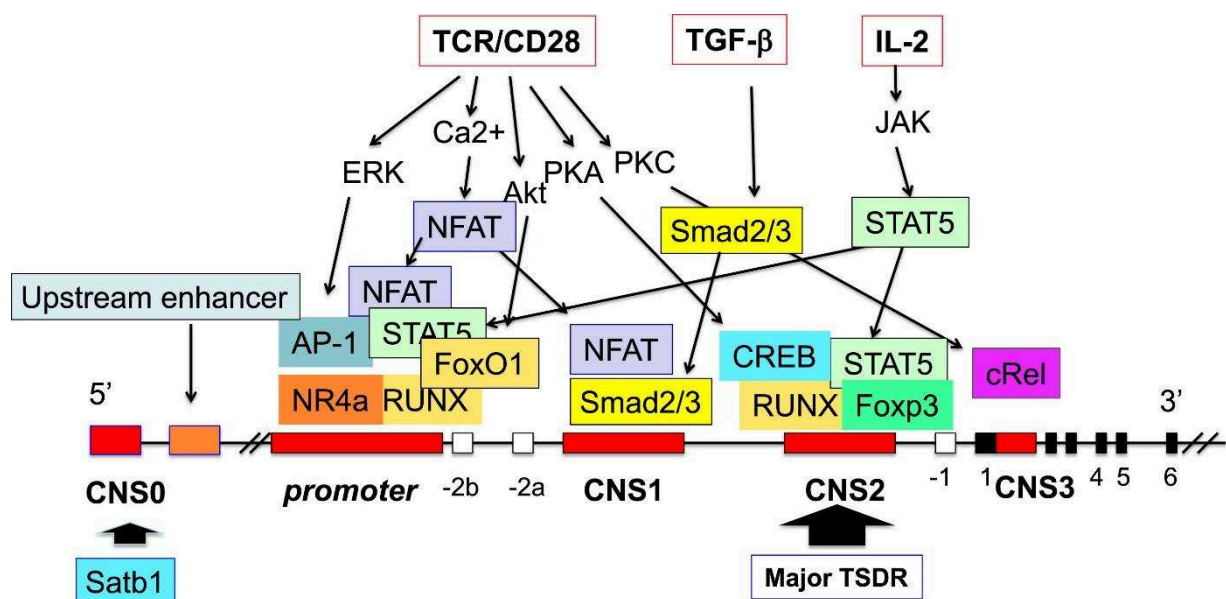


Figure 18: Régulation de l'expression de Foxp3 dans les pTregs.

Les facteurs de transcription et de signaux impliqués dans l'induction et l'expression stable de Foxp3 dans les pTregs. L'activation des facteurs de transcription (TFs) Smad2 et Smad3 est essentielle pour l'induction de Foxp3 dans les pTregs et les Smads sont recrutés dans la région du CNS1 (conserved non-coding sequence 1). La région du CNS2 sert d'amplificateur pour la transcription de Foxp3 et est liée par des facteurs de transcription tels que Foxp3, STAT5 et la protéine de liaison aux éléments de réponse de cAMP (CREB). Dans les tTreg, les îlots CpG de cette région sont hypo-méthylés et sont appelés TSDR (Treg specific demethylated regions). Le CNS2 est le principal TSDR. Le CNS3 où peut se lier cRel initie l'expression de Foxp3 et permet la formation de l'enhanceosome, le recrutement de plusieurs TFs au niveau du promoteur. CNS0 est également hypométhylé dans les Treg et il s'est avéré qu'il était un site de liaison important pour Satb1. Issue de (Iizuka-Koga et al., 2017)

Lors d'une activation, l'expression de Foxp3 est donc régulée par de nombreux facteurs de transcription qui se fixent au promoteur et aux enhancers. En plus de cela il existe un autre niveau de régulation qui fait intervenir des modifications épigénétiques, régulant l'accessibilité de la chromatine.

➤ Régulation épigénétique

Les modifications épigénétiques sont connues pour jouer un rôle important dans la régulation des gènes au cours du développement. La méthylation de l'ADN et les modifications d'histones qui sont les deux mécanismes épigénétiques majeurs, permettent d'établir et de maintenir la structure de la chromatine afin de rendre ou non l'ADN accessible aux facteurs de transcriptions (Bannister and Kouzarides, 2011; Jaenisch and Bird, 2003). Lors de la différenciation cellulaire, il existe une balance entre les modifications épigénétiques permissives, au locus des gènes associés au lignage, et les modifications épigénétiques répressives, au locus des gènes liés aux

autres lignages. Par exemple, lors de la différenciation des progéniteurs multipotents en progéniteurs lymphoïdes, on peut observer une déméthylation de l'ADN dans les gènes spécifiques à la lignée lymphoïde, ainsi qu'une méthylation de l'ADN au niveau des gènes spécifiques à la lignée myéloïde (Bock et al., 2012). Ce concept est également applicable aux Tregs qui lors de leur différenciation établissent un profil de méthylation de l'ADN et des modifications d'histones caractéristiques afin d'établir une conformation ouverte de la chromatine au locus de *Foxp3*, permettant ainsi son expression (Ohkura et al., 2012).

Au niveau du promoteur de *Foxp3*, les cellules T CD4⁺ naïves ont un profil relativement méthylé comparé aux cellules T régulatrices où cette région est complètement déméthylée. C'est lors de l'activation pour générer des Tregs que l'on observe une déméthylation du promoteur dans les CD4 T_N (Janson et al., 2008; Kim and Leonard, 2007). La protéine PIAS1 (Sumo E3 ligase Protein Inhibitor of STAT1) régule négativement le développement des Tregs en recrutant les protéines DNMT3a et 3b (DNA MethylTransferase) et HP1 (Heterochromatin Protein 1) au niveau du promoteur de *Foxp3*, le maintenant dans un état épigénétique répressif. Une fois la signalisation TCR activée, cet état est levé et rend le promoteur accessible aux facteurs de transcription pour initier l'expression de *Foxp3* (Liu et al., 2010). Pour ce qui est du maintien de l'expression de *Foxp3*, l'état de méthylation du CNS2 est très important. En effet cet enhancer contient de nombreux sites CpG qui forment ensemble le TSDR. Dans les Tregs matures cette région est complètement déméthylée, permettant l'accès aux TFs tels que Runx1 et Cbf- β . Avec *Foxp3*, ils forment un complexe se liant au CNS2 déméthylé pour établir une boucle de retro-activation et maintenir l'expression de *Foxp3* (Rudra et al., 2009). Il faut également noter que l'expression de *Foxp3* dans les iTregs, induit via le TGF β in vitro, n'est pas stable, leur CNS2 n'étant pas déméthylé. In vivo cependant, les pTregs générées à la périphérie grâce également au TGF β présentent un profil de méthylation similaire aux Tregs matures et ont une expression stable de *Foxp3* (Ohkura et al., 2012; Polansky et al., 2008). Le TGF β ne semble donc pas être lié au maintien de l'expression de *Foxp3*, mais de récentes études ont montré que NFAT et NF κ b, issus de la signalisation TCR, ainsi que STAT5, issu de la voie IL-2, se fixent au CNS2 pour empêcher la perte de *Foxp3* (Feng et al., 2014; Li et al., 2014). Ainsi la déméthylation du CNS2 représente une marque épigénétique déterminante pour la stabilité de *Foxp3* et l'identité des Tregs (Miyao et al., 2012).

Au niveau de la chromatine, les histones sont assemblés en octamère avec deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4. Avec l'ADN qui est enroulé autour de ce complexe, ils forment une structure appelée nucléosome qui permet de moduler l'état ouvert ou fermé de la

chromatine. Les modifications épigénétiques sur les histones sont donc très importantes pour la régulation de la transcription car elles peuvent réguler l'accessibilité des TFs aux régions génomiques spécifiques. Il existe une variété de modifications, permissives ou répressives qui affecte la transcription. Les plus étudiées sont les mono, di ou triméthylations de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1, H3K4me2 et H3K4me3 respectivement), la triméthylation et l'acétylation de H3K27 et l'acétylation de H3K9. Par exemple, les modifications H3K4me3 et H3K9ac trouvées au niveau d'un promoteur décrivent un promoteur actif. Au niveau d'un enhancer, H3K27ac montre un enhancer actif tandis que H3K4me1 représente un enhancer prêt à être activé. La lecture des modifications d'histones peut ainsi révéler le statut du locus d'un gène (Bannister and Kouzarides, 2011). Ainsi ces marques épigénétiques ont été étudiées dans les cellules T régulatrices au niveau de Foxp3.

En accord avec la déméthylation du promoteur dans les Tregs, des marques permissives telles que H3K9ac, H3K4me3 et H3K4me2 sont présentes au niveau du promoteur de Foxp3. Dans les CD4 T_N ces marques ne sont pas retrouvées, au contraire on note la présence de H3K27me3, une modification répressive (Xiong et al., 2012; Zheng et al., 2010). Ezh2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), qui fait partie du complexe PCR2 (Polycomb Repressor Complex 2), est recruté au niveau du promoteur de Foxp3 et catalyse la triméthylation de H3K27. Ce complexe est remplacé par PCAF (p300-CREB-binding protein-Associated Factor) dans les Tregs, une histone acétyltransférase qui induit des modifications permissives au promoteur de Foxp3 (Xiong et al., 2012). Le CNS1, qui ne contient pas d'ilôt CpG, possède également des modifications permissives dans les Tregs qui ne sont pas présentes dans les CD4 T_N (Zheng et al., 2010). Il a été montré que l'acide rétinoïque, qui favorise la différenciation Tregs, permet d'augmenter l'acétylation des histones au niveau du CNS1, favorisant le recrutement des TFs (Xu et al., 2010). Le CNS2, où la méthylation de l'ADN est très régulée, présente une augmentation de la méthylation de H3K4 et de l'acétylation de H3 et H4 lorsqu'il complètement déméthylé dans les Tregs (Sekiya et al., 2011). Ce qui suggère que la déméthylation de l'ADN et les marques d'histones permissives permettent l'ouverture de la chromatine au niveau du CNS2, ce qui promue la stabilité de Foxp3. Enfin le CNS3, l'élément crucial pour l'initiation de l'expression de Foxp3, est riche en mono et diméthylation sur H3K4 dans les Tregs mais également dans les CD4 T_N. Ces marques permissives montrent que le CNS3 facilite l'ouverture du locus de Foxp3 déjà dans les précurseurs des cellules Tregs (Huehn and Beyer, 2015).

La régulation épigénétique du locus de Foxp3, lors de la différenciation en cellules T régulatrice, semble ainsi définir un modèle de déméthylation graduelle du promoteur et du

CNS2 de Foxp3 associé à l'acquisition de modifications d'histones permissives dans tous les éléments de régulation du locus. Tout cela dans le but de supporter l'expression et la stabilité de Foxp3 en favorisant l'accès des facteurs de transcriptions aux régions génomiques.

V. Le Tonic Signaling

Comme nous l'avons vu, la reconnaissance du Soi, à travers l'interaction TCR-pCMH, permet le développement thymique de lymphocytes T qui ont une affinité plus ou moins forte pour le Soi. En périphérie, cette reconnaissance, qui est nécessaire à la survie des LTs, permet aux cellules de recevoir un signal appelé Tonic Signaling. Ce signal de Tonic Signaling peut être plus ou moins fort en fonction de l'affinité de la cellule pour le Soi, mais reste cependant en dessous du seuil d'activation. Les Tregs, par exemple, reçoivent un signal TCR plus fort en périphérie que les CD4 T_N du fait de leur forte auto-réactivité. Cette différence d'affinité envers le Soi est donc observable entre les différentes populations de LTs CD4⁺ mais également au sein d'une même population de lymphocytes T. En effet, le compartiment naïf de cellules T est composé de lymphocytes T exprimant un TCR avec une spécificité et une affinité variable pour le Soi.

1. Le Tonic Signaling : les marqueurs de l'auto-réactivité

Depuis plusieurs années, l'étude du Tonic Signaling et de son influence sur l'homéostasie et la fonction des lymphocytes T a pu se développer. Cela, notamment grâce à l'utilisation de marqueurs comme Nur77, CD5 et Ly-6C qui reflètent l'auto-réactivité des cellules. En effet l'expression de ces marqueurs est dépendante de l'affinité des LTs pour le Soi.

a. Nur77

Nur77 (ou Nr4a1) est un facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires Nr4a. La famille des Nr4a est composée de trois membres, Nur7 (Nr4a1), Nurr1 (Nr4a2) et Nor1 (Nr4a3) qui régulent de nombreux gènes et participent à divers processus cellulaires tels que l'inflammation, la prolifération, la différenciation et la survie. Leur expression a pu être observée dans plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales, les cellules myéloïdes et les lymphocytes (Zhao and Bruemmer, 2010). Nur77 est rapidement exprimé dans les lymphocytes T et B suite à une stimulation via leur récepteur (Liu et al., 1994; Mittelstadt and DeFranco, 1993). Ces travaux suggèrent également que Nur77 est impliqué dans la mort cellulaire par apoptose dans les lymphocytes T. Lors de la différenciation thymique, les thymocytes en cours d'apoptose médiée par le TCR (sélection négative) expriment un niveau élevé de Nur77. Dans un modèle de souris transgénique exprimant une forme négative/dominante de la protéine Nur77 on observe une forte diminution

de l'apoptose dans les thymocytes DP. De plus la délétion clonale des cellules T auto-réactives est abolie (Calnan et al., 1995; Zhou et al., 1996). Au contraire, la surexpression de Nur77 dans thymus provoque une apoptose massive des thymocytes (Cheng et al., 1997). Ces résultats semblent démontrer le rôle de Nur77 dans la sélection négative des thymocytes. Cependant, les souris déficientes pour la protéine Nur77 ne montrent pas de défaut de la sélection thymique. Un effet compensatoire de Nor1 permet de rétablir la sélection négative (Lee et al., 1995).

Nur77 peut également être utilisé comme marqueur pour étudier la force du signal reçu par les cellules T. Deux groupes ont généré les souris Nur77-eGFP BAC où l'expression de la GFP est sous le contrôle de la région régulatrice de Nr4a1 (Moran et al., 2011; Zikherman et al., 2012). Dans ces modèles le niveau d'expression de la GFP est proportionnel au niveau du signal TCR ou BCR reçu *in vitro* et *in vivo*. On observe également une forte expression de Nur77 par les thymocytes en cours d'apoptose, lors de la sélection négative, ainsi que les tTregs en cours de développement. Cette expression de Nur77 est due au signal TCR fort reçu par les cellules. Enfin en périphérie, chez les souris Nur77-eGFP, les Tregs, qui reçoivent un Tonic Signaling plus fort du fait de leur forte auto-réactivité, expriment un niveau de Nur77 plus élevé que les CD4 T_N. Ces travaux démontrent la corrélation qu'il existe entre l'expression de Nur77 et la force du signal TCR reçu par la cellule. On distingue ainsi les différences de Tonic Signaling reçu entre les Tregs et les CD4 T_N. Cependant ce marqueur n'est que peu utilisé pour comparer les différences qu'il existe au sein de la population de lymphocytes T CD4⁺ naïfs. En effet, la sensibilité de ce marqueur au Tonic Signaling reçu par les cellules naïves n'est pas suffisante pour bien distinguer les cellules plus ou moins auto-réactives.

b. CD5

CD5 est une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules B-1, des thymocytes et des lymphocytes. Ces ligands putatifs CD72 (Lyb2), une protéine de surface des cellules B, et CD5L, exprimé par les splénocytes et les cellules B, suggèrent que CD5 joue un rôle dans les interactions entre cellules immunitaires (Biancone et al., 1996; Van de Velde et al., 1991). Plusieurs études montrent que CD5 régule négativement la voie TCR. Les thymocytes d'une souris déficiente pour la protéine CD5 par exemple ont une hyper réactivité face à une stimulation TCR *in vitro* (Tarakhovsky et al., 1995). Son rôle de frein a également été démontré dans la voie BCR des cellules B (Bikah et al., 1996). Par la suite l'expression de CD5 à la surface des lymphocytes T fut corrélée à la force du signal TCR reçu par les cellules. Au cours du développement thymique des LTs, les thymocytes doubles négatifs n'expriment que

faiblement le CD5. Au stade double positif, on observe un niveau intermédiaire de CD5 qui est maintenu par des interactions TCR-pCMH de faible affinité. Enfin la forte expression de CD5 dans les DP et les simples positifs CD4⁺ et CD8⁺ est corrélée à l'avidité du TCR pour le Soi. De plus le maintien du niveau élevé de CD5 sur les thymocytes ainsi que sur lymphocytes T en périphérie est dépendant d'une interaction avec le complexe peptide du Soi-CMH (Azzam et al., 1998). De récentes études ont confirmé que l'expression de CD5 à la surface des lymphocytes T en périphérie permet de distinguer les cellules en fonction de leur auto-réactivité. Les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} ont un niveau de phosphorylation de la chaîne ζ du TCR (TCR_ζ) plus élevé, tout comme celui des kinases S6 et ERK, comparé à leurs homologues CD5^{Low} (Daley et al., 2013b; Mandl et al., 2013).

De nombreuses études du Tonic Signaling sont maintenant basées sur l'expression de CD5. De façon élégante l'une d'entre elles a comparé l'expression de CD5 ainsi que la phosphorylation de TCR_ζ dans les cellules T CD4⁺ naïves issues de 8 modèles de souris TCR transgénique Rag1^{-/-} ou Rag2^{-/-} différents (figure 19). On observe une très belle corrélation entre l'expression de CD5 et la phosphorylation de TCR_ζ, qui suggère que l'expression de CD5 reflète bien l'auto-réactivité lymphocytes T CD4⁺ (Mandl et al., 2013).

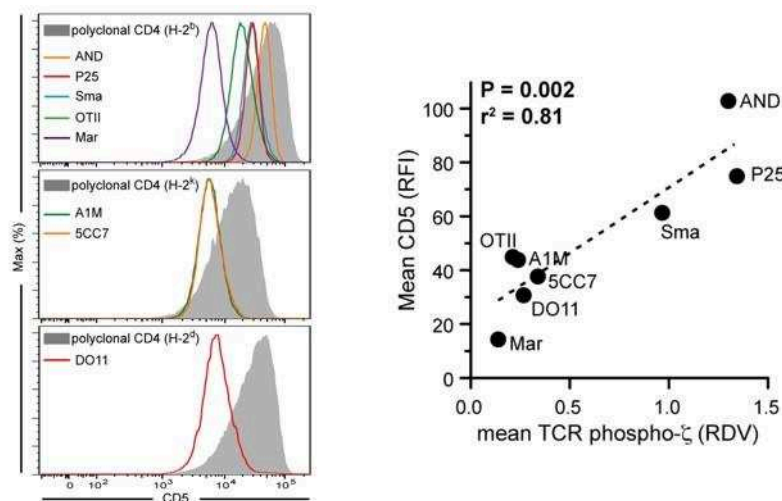


Figure 19 : L'expression de CD5 reflète l'auto-réactivité des cellules T CD4⁺ Tg.

Gauche. Histogramme de l'expression de CD5 sur des lymphocytes CD4 T_N périphériques de souris TCR Tg par rapport à des lymphocytes CD4 T_N périphériques polyclonaux de souris du fond respectif. Droite. Corrélation entre la moyenne de RFI (relative fluorescent intensity) de CD5 et le RDV moyen de la chaîne pζ du TCR pour chaque souche TCR Tg. Issue de (Mandl et al., 2013)

c. Ly-6C

Ly-6C est une protéine à ancre GPI localisée au niveau des rafts lipidiques. Aucun homologue n'a encore été découvert chez l'homme. Chez la souris Ly-6C permet de distinguer deux populations de monocytes circulant possédant des fonctions distinctes. Les monocytes Ly-6C^{Hi} (analogues aux monocytes humains CD14^{Hi} CD16^{Low}) sont rapidement recrutés aux sites inflammatoires et sont considérés comme pro-inflammatoire. Les monocytes Ly-6C^{Low} (analogues aux monocytes humains CD14^{Low} CD16^{Hi}) sont considérés comme des cellules en patrouilles qui peuvent reconstituer les macrophages tissulaires résidents (Gordon and Taylor, 2005; Ingersoll et al., 2010). Ly-6C est également utilisée pour identifier certaines populations de macrophages dans les pathologies (Karlmark et al., 2009; Movahedi et al., 2010).

Les premières études sur ce marqueur, dans les lymphocytes T, montrent que les cellules T CD4⁺ mature n'expriment pas Ly-6C dans le thymus mais qu'une partie l'acquiert rapidement en périphérie. En effet, environ 70% des CD4 T_N sont Ly-6C⁺ dans les différents organes lymphoïdes secondaires. Les cellules T CD4⁺ mémoire sont quant à elle Ly-6C⁻. De manière intéressante l'expression de ce marqueur est proportionnellement inversée dans les lymphocytes T CD8⁺. En effet, la plupart des LTs CD8⁺ naïfs sont Ly-6C⁻, tout comme les cellules CD8⁺ mémoire qui sont Ly-6C⁺ et une partie des thymocytes SP CD8⁺ exprime déjà Ly-6C dans le thymus (Schlueter et al., 1997). Contrairement aux autres marqueurs d'auto-réactivités, ce n'est pas l'expression mais la répression de Ly-6C qui est liée au TCR, les cellules devenant Ly-6C⁻ suite à une stimulation TCR (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2004). Une récente étude a montré que l'IL-27 et l'IFN γ induisent son expression de manière dépendante de STAT1 (DeLong et al., 2018). En 2013, mon équipe a montré que l'inhibition de Ly-6C et le maintien des 30% de CD4 T_N Ly-6C⁻ en périphérie est bien dépendante du TCR et plus précisément d'une interaction continue avec le Soi. Ainsi ils ont pu définir que les cellules T CD4⁺ naïfs Ly-6C⁻ sont plus auto-réactives que leur homologue Ly-6C⁺. En effet, en accord avec les autres marqueurs, les CD4 T_N Ly-6C⁻ expriment plus fortement le CD5 et leur TCR ζ est plus phosphorylé que les CD4 T_N Ly-6C⁺ (Martin et al., 2013). Dans les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs on observe que 70% des cellules sont Ly-6C⁻. De façon intéressante les Tregs Ly-6C⁺ disparaissent progressivement avec l'âge, suggérant que la survie des Tregs en périphérie est liée à leur forte affinité pour le Soi et aux Tonic Signaling qu'elles reçoivent (Delpoux et al., 2014).

Ainsi en périphérie l'expression de Ly-6C à la surface des lymphocytes T CD4⁺ naïfs permet de dichotomiser les cellules en fonction de leur auto-réactivité. Les cellules les plus auto-réactives, recevant un Tonic Signaling plus fort, sont Ly-6C⁻. En effet, l'expression de Ly-6C dans les CD4 T_N est inversement proportionnelle à l'affinité pour le Soi (figure 20).

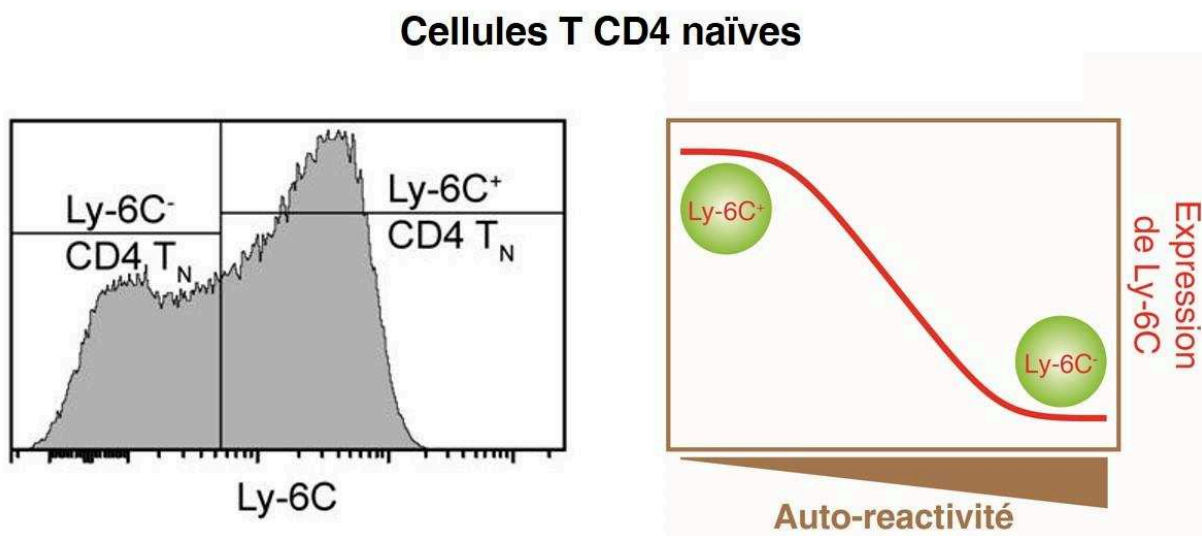


Figure 20 : Expression de Ly-6C dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs

2. Le Tonic Signaling : effets fonctionnels

Basé sur l'expression de ces marqueurs, CD5 et Ly-6C surtout, plusieurs équipes ont pu démontrer le rôle physiologique du Tonic Signaling sur la fonction des lymphocytes T.

a. Tonic Signaling et réponse des LTs naïfs face à l'antigène

En périphérie les lymphocytes T CD4⁺ naïfs reçoivent un Tonic Signaling provenant de leur interaction TCR-pCMH. Cette interaction entre le TCR et le complexe peptide du Soi-CMHII permet aux cellules de recevoir des signaux qui, en plus d'être nécessaire à leur survie, augmente leur réponse face à l'antigène dont elles sont spécifiques. Dans les années 2000, Stefanová et al. ont montré que lorsque les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont privés d'interactions avec le CMH de classe II, la réponse face à leur antigène est diminuée. Pour cela ils ont utilisé plusieurs modèles de souris déficientes pour la protéine Rag2 (Rag2^{-/-}) et exprimant un TCR transgénique spécifique à un antigène. Par exemple le modèle AND, une souris Rag2^{-/-} qui exprime un TCR reconnaissant le cytochrome C de pigeon. Les lymphocytes T de ces souris

sont majoritairement des CD4⁺ naïfs et il n'y a pas de LTs CD8⁺. Grâce à ces modèles, ils ont montré que les lymphocytes T dépourvus d'interaction avec le CMHII ont une phosphorylation de la TCR ζ ou de Zap70 plus faible, une prolifération qui est très diminuée et une quasi-absence de production d'IL-2 suite à une stimulation antigénique. De plus, ils ont observé qu'une interaction répétée avec le CMHII permet aux TCRs exprimés à la surface des LTs d'être concentrés à un pôle de la cellule. En absence de cette interaction, la distribution des TCRs sur la membrane est modifiée, on les retrouve de façon homogène tout autour de la cellule. Il semble donc que l'auto-réactivité en périphérie, ou le Tonic Signaling, permette de maintenir les lymphocytes CD4 T_N dans un état de sensibilité accrue pour pouvoir engendrer une réponse même face à de faibles doses d'antigène. (Stefanová et al., 2002).

En périphérie les lymphocytes T CD4⁺ naïfs ne sont pas tous égaux en termes d'auto-réactivité. Comme nous l'avons les cellules CD5^{Hi} sont plus auto-réactives que leur homologue CD5^{Low} et reçoivent de ce fait un Tonic Signaling plus élevé. Afin d'étudier au niveau clonal l'effet du Tonic Signaling sur la réponse des LTs CD4⁺, l'équipe de PM. Allen a comparé les lymphocytes T de souris RAG1^{-/-} TCR Tg LLO56 et LLO118. Les cellules T CD4⁺ issues de ces souris reconnaissent le même épitope du facteur de virulence de la *Listeria monocytogenes*, la listeriolysin O (LLO). La différence majeure vient de leur expression de CD5, la lignée LLO56 est plus auto-réactive car elle présente un niveau de CD5 plus élevé que son homologue LLO118. Leurs premières expériences ne révèlent pas de différence quant à l'expression des marqueurs d'activation comme CD25 et CD69 suite à une stimulation au peptide ou à l'anti CD3/CD28 et leur affinité pour le peptide LLO (190-205) est similaire. Cependant, ils ont observé que les cellules LLO56 produisent plus d'IL-2 suite à ces mêmes stimulations (figure 21).

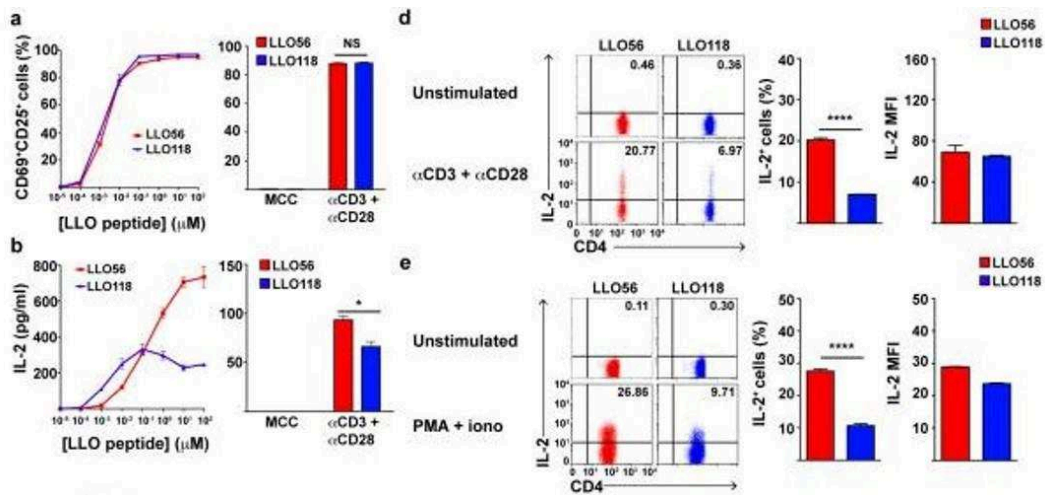


Figure 21: Les cellules T LLO56 et LLO118 divergent dans leurs réponses à l'IL-2 à des stimuli spécifiques ou non spécifiques.

a, b) Pourcentage de cellules CD69⁺ et CD25⁺ (a) et dosage par ELISA de l'IL-2 produite (b) dans les cellules T LLO56 et LLO118 traitées avec les quantités indiquées de peptide LLO (190-205), 100 μM de peptide MCC (83-101) ou 10 μg/mL d'αCD3 + αCD28. (d) Quantification (par capture assay) de la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T LLO56 et LLO118 CD4⁺ stimulés avec 10 μg/mL d'αCD3 + αCD28. (e) Expression d'IL-2 intracellulaires des lymphocytes T LLO56 et LLO118 CD4⁺ stimulés par PMA + ionomycine. Issue de (Persaud et al., 2014).

Cela n'est pas généralisé à toutes les cytokines car elles produisent des niveaux similaires d'IFN-γ et de TNF-α. De plus cette propriété semble intrinsèque. En effet si on outrepassé le TCR en stimulant les cellules avec PMA et ionomycine, activant les voies sous le TCR, les LTs CD4⁺ LLO56 conservent leur avantage. Cette meilleure production d'IL-2 est associée à une phosphorylation plus forte de TCRζ à l'état basal et la kinase Erk lors de l'activation. Toutes ces différences sont maintenues par une interaction continue avec le Soi et retrouvées entre les lymphocytes T CD4⁺ CD5^{Hi} et CD5^{Low} polyclonaux issue de souris B6 (Persaud et al., 2014). Dans une précédente étude, cette équipe a également montré une différence de réponse entre les cellules LLO56 et LLO118 suite à une infection par la *Listeria monocytogenes*. Les cellules LLO118 répondent mieux suite à une première infection tandis que les cellules LLO56 ont une réponse CD4 plus forte lors d'une seconde infection. En effet les cellules LLO118 permettent de générer plus efficacement des CD8⁺, qui répondront mieux lors d'une seconde infection. Les cellules LLO56 quant à elles semblent se différencier plus efficacement en CD4⁺ mémoires (Weber et al., 2012). Tous ces travaux montrent ainsi l'influence du Tonic Signaling sur la fonction et la capacité de réponse des lymphocytes T CD4⁺ naïfs lors d'une infection. Ainsi, en fonction de leur auto-réactivité, les CD4 T_N sont spécialisés dans la réponse primaire ou secondaire lors d'une infection.

L'effet du Tonic Signaling observé sur les lymphocytes T CD4⁺ naïfs peut également être transposé aux cellules T CD8⁺ naïves. En se basant aussi sur l'expression de CD5, les cellules CD8 T_N CD5^{Hi} ont des caractéristiques phénotypiques différentes de leur homologue CD5^{Low}, indiquant des interactions avec le Soi plus fréquentes ou plus intense. De plus l'analyse d'expression génique suggère que les CD8 T_N CD5^{Hi} sont mieux préparées pour répondre à une activation. En effet, ces cellules ont un recrutement et une expansion clonale plus efficace, ainsi qu'une réactivité accrue aux signaux inflammatoires lors de la reconnaissance de leur antigène étranger (Fulton et al., 2015).

b. Tonic Signaling et fonction des Tregs

Les études présentées précédemment parlent toutes de l'effet du Tonic Signaling sur les lymphocytes T naïfs. Cependant nous avons vu que l'interaction TCR-pCMH est aussi importante pour l'homéostasie d'autres cellules telles que les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs. En plus de son importance pour l'homéostasie, cette interaction joue un rôle dans le maintien des fonctions suppressives des Tregs. En périphérie, lorsque les Tregs sont transférées dans une souris CMHII^{Δ/Δ} leurs fonctions suppressives diminuent. Elles sont incapables d'inhiber la prolifération des Tconvs par exemple ou encore de produire efficacement de l'IL-10. De plus, le phénotype et le profil d'expression génique des Tregs dépourvue d'interaction avec le complexe pCMH sont similaires aux Tconvs (Delpoux et al., 2012). De manière intéressante, l'expression de Foxp3 n'est pas affectée par la privation de reconnaissance du Soi. Ce qui suggère que l'interaction TCR-pCMH permet le maintien d'une signature spécifique des Tregs qui est indépendante de l'expression de Foxp3. En effet, l'équipe de M. Schmidt-Supprian a pu démontrer cela en utilisant un modèle de souris transgénique Mx1-cre Tcr^{F/F}. L'injection de poly(I:C) chez ces souris permet l'ablation de la chaîne α du TCR, qui conduit à la perte d'expression de la chaîne β et du CD3 à la surface des cellules après 10 jours. Ainsi les lymphocytes T sont dépourvus de TCR et ne peuvent interagir avec le complexe pCMH. Les cellules Tregs issues de ce souris (après injection de poly(I:C)) ont des capacités suppressives très diminuées. De plus la comparaison entre ces Tregs et des Tregs issue de souris Tcr^{F/F} (où l'injection de poly(I:C) n'engendre pas de perte du TCR) montre qu'en périphérie le signal TCR procure au Tregs une signature génique spécifique (impliqué dans les fonctions suppressives des Tregs) qui est indépendante de Foxp3 (Vahl et al., 2014). Ainsi les Tregs ont besoin d'une interaction répétée avec le pCMH pour recevoir un Tonic Signaling qui est essentielle non seulement pour leur homéostasie, mais aussi pour leurs fonctions suppressives.

Pour aller plus loin, mon équipe s'est donc également intéressée à l'effet du Tonic Signaling sur la fonction des Tregs. En se basant sur l'expression de Ly-6C, les Tregs peuvent être dichotomisés en deux sous population avec environ 30% des cellules qui sont Ly-6C⁺ à la périphérie. Ainsi au sein des Tregs, qui sont plus auto-réactives que les CD4 T_N, on observe également une hétérogénéité en termes d'auto-réactivités. On peut voir que 70% des cellules sont Ly-6C⁻ et sont plus auto-réactif que leur homologue Ly-6C⁺, avec une expression de CD5 plus forte et une TCRζ plus phosphorylé. L'équipe a montré que cette population de Tregs Ly-6C⁻ a des capacités suppressives plus efficace pour contrôler la prolifération des CD4 T_N in vitro et la pathologie dans un modèle d'IBD. De plus ces cellules expriment une plus grande quantité de molécules immunosuppressives (Delpoux et al., 2014).

c. Tonic Signaling et différenciation des CD4 T_N

L'une des capacités des lymphocytes T CD4⁺ naïfs est de pouvoir se différencier en plusieurs types d'effecteurs. En se basant sur l'expression de Ly-6C pour distinguer les CD4 T_N les plus auto-réactifs (Ly-6C⁻) des moins auto-réactifs (Ly-6C⁺), mon équipe c'est intéressé au rôle du Tonic Signaling dans la différenciation de ces cellules. L'une de leurs premières observations montre que les cellules les plus auto-réactives sont plus pathogéniques. En effet dans un modèle de souris IBD, maladie déclenchée par le transfert adoptif de CD4 T_N dans un hôte immuno-déficient (souris CD3ε^{-/-}), les souris injectées avec des lymphocytes CD4 T_N Ly-6C⁻ développent une maladie plus sévère que celles injectées avec leur homologue Ly-6C⁺. De façon surprenante, chez les souris injectées avec les cellules Ly-6C⁻ ils retrouvent plus de cellules T régulatrices (Foxp3⁺) et de Th17 (IL-17⁺) que chez les souris injectées avec les cellules Ly-6C⁺. Lors du co-transfert de cellules Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ dans les souris CD3ε^{-/-}, les cellules Ly-6C⁻ génèrent plus de Tregs. La génération de Th17 en co-transfert est cependant équivalente entre les deux populations et similaire au pourcentage observé lors du transfert de cellules Ly-6C⁻ seulement. Ces résultats suggèrent que les cellules T CD4⁺ naïfs Ly-6C⁻ se différencient plus efficacement en pTregs qui, dans ce modèle expérimental, promu la génération de cellules Th17. Ils ont également confirmé cela par des expériences de polarisation in vitro. Alors que ces deux sous populations de cellules T CD4⁺ naïves se différencient de manière équivalente en Th1 et Th17, les cellules les plus auto-réactives Ly-6C⁻ ont une meilleure capacité à se différencier en iTreg (figure 22). Cette différence de différenciation en iTreg est aussi observable lors de la comparaison de lymphocytes T CD4⁺ issus de souris TCR tg AND ou Marylin RAG2^{-/-}. Les cellules Marylin étant, avec une forte expression de Ly-6C,

moins auto-réactives que les AND, elles se polarisent plus faiblement en iTreg. Dans cet article l'équipe montre que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs les plus auto-réactifs, qui sont Ly-6C⁻, ont une capacité de différenciation en pTreg accrue. Cette capacité étant maintenue par une interaction continue avec le Soi. Après un transfert de trois semaine dans une souris CMHII^{Δ/Δ}, les CD4 T_N Ly-6C⁻ ont une capacité de polarisation en iTreg plus faible. De façon intéressante, comparées aux cellules CD4 T_N CD5^{Hi}, qui produisent plus d'IL-2 que les CD5^{Low}, les cellules Ly-6C⁻ produisent autant d'IL-2 que les Ly-6C⁺. Ainsi, il semble que les populations de LTs CD4⁺ naïfs définies par CD5 et Ly-6C ne soient identiques en termes d'auto-réactivité et de capacité induite par celle-ci. (Martin et al., 2013)

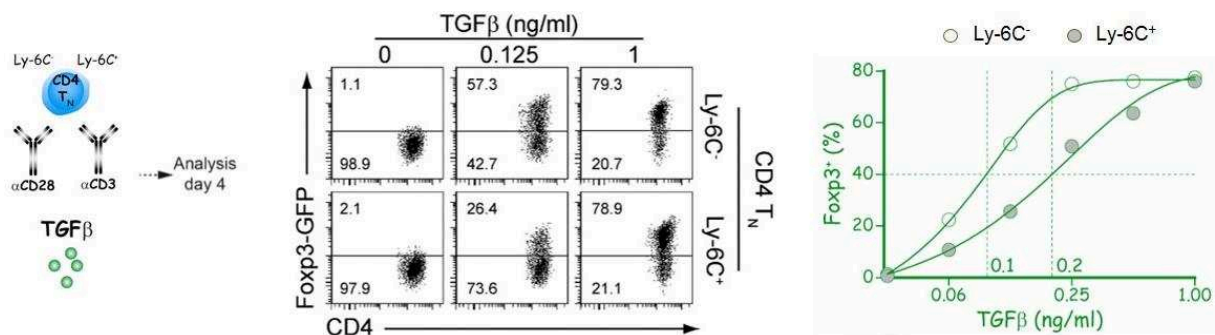


Figure 22 : Polarisation plus efficace des cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ en iTreg.

Les cellules T CD4⁺ naïves Ly-6C⁻ ou Ly-6C⁺ ont été purifiées à partir de souris Foxp3-GFP et stimulées pendant 4 jours avec des anticorps αCD3 et αCD28 et en présence de concentration croissante de TGFβ1. Gauche, schéma expérimental. Dot-plots représentatifs CD4/Foxp3-GFP des cellules T CD4⁺ (milieu) et proportion de cellules Foxp3⁺ parmi les cellules CD4⁺ (droite) en fonction de la concentration de TGFβ1. Issue de (Martin et al., 2013).

Problématique

Plusieurs études ont établi que la reconnaissance du Soi en périphérie, à travers l'interaction TCR-pCMH, maintient un Tonic Signaling dans les lymphocytes T leur permettant de répondre plus efficacement face à l'antigène dont ils sont spécifiques. Cependant tous les LTs ne sont pas égaux en terme d'affinité pour le Soi et donc d'intensité du Tonic Signaling reçu. Au sein des sous-populations de LTs il est possible de distinguer, via l'expression de marqueurs de surface tel que CD5, les cellules les plus auto-réactives ($CD5^{Hi}$) des cellules moins auto-réactives ($CD5^{Low}$). Cette différence d'auto-réactivité engendre dans les lymphocytes T des différences phénotypiques et fonctionnelles (Myers et al., 2017).

Récemment notre équipe a mis en évidence un nouveau marqueur d'auto-réactivité, Ly-6C, une protéine à ancre GPI exprimée au niveau des rafts lipidiques de la cellule. Contrairement aux autres marqueurs d'auto-réactivité, son expression est inversement corrélée au Tonic Signaling reçu par les lymphocytes T $CD4^+$. De ce fait les cellules $CD4^+ T_N Ly-6C^-$ sont plus auto-réactives que leurs homologues $Ly-6C^+$. En plus des différences phénotypiques, notre équipe a montré que les cellules T $CD4^+$ naïves possédant une plus grande avidité pour le Soi se différencient plus efficacement en cellules T régulatrices (Martin et al., 2013).

Le Tonic Signaling engendré par l'interaction TCR-pCMH induit l'activation des voies moléculaires sous-jacentes au TCR. Ainsi, j'ai tout d'abord cherché à savoir qu'elle(s) voie(s) nous permettrait de convertir les $CD4^+ T_N$ les moins auto-réactives ($Ly-6C^+$) en cellules plus auto-réactives ($Ly-6C^-$). Afin de valider fonctionnellement cette conversion, nous disposons d'un modèle de souris transgénique OT-II où les lymphocytes T $CD4^+$ expriment un TCR spécifique reconnaissant l'ovalbumine. Couplé à un modèle expérimental de tolérance orale nous avons pu observer la capacité des cellules T à générer des pTregs.

La seconde partie de mes travaux de thèse a porté sur les mécanismes impliqués dans la différenciation des $CD4^+ T_N$ en cellules T régulatrices $Foxp3^+$. Je me suis attaché à étudier dans un premier temps les similitudes et différences qu'il existe entre les cellules $CD4^+ T_N$ les plus auto-réactives définies soit par $Ly-6C^-$ soit par $CD5^{Hi}$. Tirant avantage de la différence entre les cellules $CD4^+ T_N Ly-6C^-$ et $Ly-6C^+$, j'ai étudié les mécanismes permettant de moduler la polarisation de ces cellules en iTregs.

Ainsi au cours de ma thèse je me suis intéressé aux voies moléculaires induites par le Tonic Signaling permettant aux lymphocytes T CD4⁺ les plus auto-réactifs d'acquérir un phénotype et des fonctions particulières.

RESULTATS

I. Article 1

Calcium-mediated shaping of naive CD4 T-cell phenotype and function.

eLife 2017;6:e27215.

Vincent Guichard, Nelly Bonilla, Aurélie Durand, Alexandra Audemard-Verger, Thomas Guilbert, Bruno Martin, Bruno Lucas, Cédric Auffray.

Un contact régulier avec le complexe majeur d'histocompatibilité associé à un peptide du Soi, à l'origine d'une signalisation « tonique » du TCR aussi appelé « Tonic Signaling », est essentiel à la survie des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Nous avons précédemment montré que la signalisation TCR résultant du Tonic Signaling influençait également leur devenir lors de l'activation en augmentant leur capacité à se différencier en lymphocytes T régulateurs induits ou périphériques. Pour déchiffrer les mécanismes moléculaires régissant ce processus, nous nous intéressons ici à la cascade de signalisation du TCR et démontrons qu'une augmentation du taux de calcium intracellulaire est suffisante pour moduler le phénotype des cellules T CD4⁺ naïves de souris et pour augmenter leur sensibilité aux signaux de polarisation en cellules T régulatrices, les deux processus reposant sur l'activation de la calcineurine. En conséquence, l'inhibition in vivo de la calcineurine amène les lymphocytes T CD4⁺ naïfs les plus autoréactifs à adopter le phénotype de leurs homologues moins autoréactifs. Ensemble, nos résultats démontrent que l'activation de la voie de la calcineurine médiée par le calcium agit comme un rhéostat pour façonner à la fois le phénotype et le potentiel effecteur des lymphocytes T CD4⁺ naïfs à l'état basal.

Calcium-mediated shaping of naive CD4 T-cell phenotype and function

Vincent Guichard^{1,2}, Nelly Bonilla¹, Aurélie Durand¹,
Alexandra Audemard-Verger¹, Thomas Guilbert¹, Bruno Martin¹, Bruno Lucas^{1†},
Cédric Auffray^{1†*}

¹Institut Cochin, Paris Descartes Université, CNRS UMR8104, INSERM U1016, Paris, France; ²Paris Diderot Université, Paris, France

Abstract Continuous contact with self-major histocompatibility complex ligands is essential for the survival of naive CD4 T cells. We have previously shown that the resulting tonic TCR signaling also influences their fate upon activation by increasing their ability to differentiate into induced/peripheral regulatory T cells. To decipher the molecular mechanisms governing this process, we here focus on the TCR signaling cascade and demonstrate that a rise in intracellular calcium levels is sufficient to modulate the phenotype of mouse naive CD4 T cells and to increase their sensitivity to regulatory T-cell polarization signals, both processes relying on calcineurin activation. Accordingly, in vivo calcineurin inhibition leads the most self-reactive naive CD4 T cells to adopt the phenotype of their less self-reactive cell-counterparts. Collectively, our findings demonstrate that calcium-mediated activation of the calcineurin pathway acts as a rheostat to shape both the phenotype and effector potential of naive CD4 T cells in the steady-state.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.001>

***For correspondence:**

cedric.auffray@inserm.fr

†These authors contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 22

Received: 27 March 2017

Accepted: 23 November 2017

Published: 14 December 2017

Reviewing editor: Michael L Dustin, University of Oxford, United Kingdom

© Copyright Guichard et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

T-cell precursors originate in the bone-marrow and are educated in the thymus through processes called positive and negative selections, which result in MHC-restriction and self-tolerance, respectively (*Stritesky et al., 2012*). Only those T cells that bear an $\alpha\beta$ T-cell receptor (TCR) recognizing self-MHC with a relatively low affinity will differentiate and exit into the systemic circulation as self-MHC restricted T cells. T cells carrying an $\alpha\beta$ TCR that reacts with self-MHC with very low affinity die by neglect, whereas those recognizing self-MHC with high affinity are mostly deleted by apoptosis or differentiate into regulatory T cells called 'natural' or thymically derived (tTreg) in order to prevent autoimmunity (*Bautista et al., 2009; Leung et al., 2009*). Therefore, self-MHC and the associated self-reactivity of T cells influence both T-cell production and phenotype in the thymus.

In the periphery, the pre-immune repertoire of T cells is composed of almost 70% of naive T cells. The remaining 30% are divided between recent thymic emigrants with a comparable phenotype, regulatory T cells (Foxp3⁺) and cells with an activated/memory phenotype. Naive T cells are kept alive through continuous TCR interactions with MHC molecules complexed with various self-peptides. Such TCR/MHC interactions plus contacts with IL-7 cause low-level signaling, which promotes long-term survival of naive T cells in interphase through the synthesis of anti-apoptotic molecules such as Bcl-2 (*Martin et al., 2006; Takada and Jameson, 2009*).

The degree of TCR self-reactivity of a given T-cell clone has been correlated with its expression of CD5 and Nur77 (*Azzam et al., 1998; Moran et al., 2011*). We have recently identified the cell surface GPI-anchored protein, Ly-6C, as an additional and complementary sensor of T-cell self-reactivity (*Martin et al., 2013*). Indeed, we have shown that, in contrast to CD5 and Nur77 which expression directly correlates with self-reactivity, the expression of Ly-6C by peripheral naive CD4 T cells (CD4

eLife digest To help protect the body from disease, small immune cells called T lymphocytes move rapidly, searching for signs of infection. These signs are antigens – processed pieces of proteins from invading microbes – that are displayed on the surface of so-called antigen-presenting cells. Before it encounters its specific antigen, a T cell is called naive. After encountering its antigen, the naive T cell activates and then develops into a variety of immune cells, each with a specific activity. These immune cells include so-called peripherally induced regulatory T cells (or “pTreg cells” for short), which, as the name suggests, help to regulate the immune response.

In addition to foreign antigens from microbes, antigen-presenting cells display fragments of the body's own proteins too. All naive T cells recognize some “Self-antigens”, but not as strongly as they recognize foreign antigens. As a naive T cell travels around the body, it repeatedly interacts with antigen-presenting cells that display Self-antigens, which triggers a low level of signaling in the T cell. While this background signaling was known to help the T cell survive, in 2013, researchers reported that: it also makes the T cell more responsive to foreign antigens; and it shapes how these cells will respond when activated. For example, the naive T cells that respond the most to Self-antigens were seen to be much more likely to become pTreg cells when activated than other T cells.

Guichard et al. – who include several of the researchers involved in the 2013 work – set out to understand why the most Self-reactive T cells show this bias toward becoming pTreg cells. The experiments used a range of approaches with T cells both in the laboratory and in mice. By looking at which genes were active in the most Self-reactive T cells, Guichard et al. narrowed in on a signaling pathway that involves calcium ions and an enzyme called Calcineurin. Blocking this pathway caused the most Self-reactive T cells to lose their bias, and instead develop in the same way as the least Self-reactive T cells.

Guichard et al. propose that the continuous interactions with Self-antigens trigger waves of calcium ions in a naive T cell that shapes its behavior and future development. In a related study, Dong, Othy et al. also conclude that contact with antigen-presenting cells causes calcium signals that shape how the T cells behave.

In addition to providing more detail about the inner workings of immune cells, these findings may also have implications in a clinical setting. Calcineurin inhibitors are often used to suppress the immune system in transplant patients to prevent rejection of the transplanted organ. However, it has proved difficult to safely interrupt these therapies even after many years. These new findings may provide a possible explanation for this, by suggesting that the inhibitors may also interfere with the generation of pTreg cells. Without these cells' regulatory influence, the immune system is unlikely to ever become tolerant of the transplant.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.002>

T_N cells) inversely correlates with their ability to interact with self-MHC (*Martin et al., 2013*). Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were therefore identified as more self-reactive than their Ly-6C⁺-cell counterparts.

In the absence of foreign antigen, peripheral naive T cells continuously recirculate between lymphoid organs (*Gowans, 1959*), in which they migrate along the fibroblastic reticular cells network (*Bajénoff et al., 2006*) and interact frequently and briefly with dendritic cells (DC) (*Bajénoff et al., 2006; Mempel et al., 2004*). It is generally accepted that these frequent DC-T-cell interactions increase the probability of contacts between very rare antigen-specific naive T cells and the few DCs presenting their cognate antigen during the initial course of an infection. Experimental evidences indicate that self-MHC recognition in the periphery is also required to maintain T cells in a state of responsiveness toward foreign antigen (*Persaud et al., 2014; Stefanová et al., 2002; Wülfiging et al., 2002*), suggesting a crucial role for self-MHC mediated ‘education’ and TCR self-reactivity in determining the intrinsic functional attributes of CD4 T_N cells. Altogether, this steady-state tonic TCR signaling was shown to influence CD4 T_N -cell effector fate by increasing the magnitude of their response toward their cognate antigens.

Following activation by antigen-presenting cells (APCs) in the periphery, the bulk of CD4 T_N cells can differentiate into a variety of well documented T-helper (T_H) cell subsets, such as T_H1 , T_H2 , T_H17 or peripherally induced regulatory T cells (pTreg cells), characterized by their cytokine production

profiles, specific effector functions and lineage-specific transcription factors (T-bet for T_H1 cells, GATA-3 for T_H2 cells, ROR γ t/ROR α for T_H17 cells and Foxp3 for pTreg cells) (Abbas *et al.*, 1996; Bilate and Lafaille, 2012; Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2006; Mosmann *et al.*, 1986; Szabo *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2001; Zheng and Flavell, 1997). Among these effector CD4 T cells, pTreg cells produce TGF- β and share phenotypic and functional characteristics with tTreg cells (Bilate and Lafaille, 2012). The immunological context in which CD4 T_N cells are immersed at the time of their activation is known to drive lineage commitment. The strength of the activating TCR signals received by a CD4 T_N cell also influences its subsequent polarization toward particular differentiation pathways (Corse *et al.*, 2011). Indeed, in weakly polarizing conditions, low TCR signals favor T_H2 - and pTreg-cell differentiation, whereas T_H1 - and T_{FH} -cell differentiation arises from stronger signals (Gottschalk *et al.*, 2010; Rogers and Croft, 1999; Turner *et al.*, 2009). Most of these data were obtained in vitro by modulating signal strength with graded dose of peptide-MHC ligands of varying potency. However, only relatively high-affinity TCR-MHC interactions were shown to facilitate the induction of persistent Foxp3 $^+$ T cells in vivo (Gottschalk *et al.*, 2010).

Our recent work has reinforced the link between the tonic TCR signaling received by CD4 T_N cells in the steady-state and their fate in the effector phase. Indeed, we have demonstrated that TCR/self-MHC interactions not only increase quantitatively but also shape qualitatively the response of CD4 T_N cells to their cognate antigens in the effector phase (Martin *et al.*, 2013). More precisely, by taking advantage of our data showing that Ly-6C expression can be considered as a new sensor of CD4 T_N -cell self-reactivity, we have demonstrated that CD4 T_N cells with the highest avidity for self-MHC (Ly-6C $^-$) have a biased commitment toward the iTreg/pTreg-cell lineage (Martin *et al.*, 2013).

The binding of antigen/MHC complexes to the TCR triggers the recruitment of a series of signaling molecules and adaptors to the TCR/CD3 complex that ultimately results in the phosphorylation and activation of phospholipase C- γ (PLC γ). PLC γ then cleaves the phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP $_2$) in the plasma membrane to generate diacylglycerol, which activates protein kinase C (PKC) and Ras-dependent pathways, as well as 1,4,5-inositol trisphosphate (IP $_3$), which induces the release of calcium (Ca $^{2+}$) from intracellular stores (the endoplasmic reticulum (ER)). This Ca $^{2+}$ store release only transiently elevates intracellular Ca $^{2+}$ concentrations but this transient rise induces in turn a massive and sustained Ca $^{2+}$ entry from the extracellular space (Hogan *et al.*, 2010).

With the aim of deciphering the molecular mechanisms involved in the tonic TCR-signaling-mediated shaping of the CD4 T_N -cell compartment, we have focused on the TCR signaling cascade. By using transcriptomic and phenotypic approaches as well as in vitro and in vivo assays, we have identified the Ca $^{2+}$ signaling pathway as key for the acquisition of both the phenotype of the most self-reactive CD4 T_N cells and their enhanced cell-intrinsic ability to commit into regulatory T cells upon activation in vitro (iTreg) and in vivo (pTreg).

Results

Cell-intrinsic enhanced ability of Ly-6C $^-$ CD4 T_N cells to commit into iTreg cells

We have recently shown that CD4 T_N cells with the highest avidity for self-MHC (Ly-6C $^-$ CD4 T_N cells) have a biased commitment toward the iTreg/pTreg-cell lineage (Martin *et al.*, 2013). As T_H1 - and T_H2 -cell-derived cytokines are known to inhibit iTreg-cell induction in vitro (Henderson *et al.*, 2015), we first wondered whether Ly-6C $^-$ and Ly-6C $^+$ CD4 T_N cells had the same ability to produce such cytokines after stimulation. Ly-6C $^-$ and Ly-6C $^+$ CD4 T_N cells were thus stimulated with α CD3- and α CD28-coated antibodies in the presence or absence of TGF β . Interferon-gamma (IFN- γ) and interleukins (IL) -4, -17 and -10 were assayed in the supernatants collected 24 hr after the beginning of the culture. We found that, whatever the presence or absence of TGF β in the culture medium, Ly-6C $^-$ and Ly-6C $^+$ CD4 T_N cells produced similar amounts of these cytokines (Figure 1—figure supplement 1A,B). To further characterize the enhanced ability of Ly-6C $^-$ CD4 T_N cells to commit into iTregs in vitro, we asked whether this feature was cell-intrinsic. To this end, Ly-6C $^-$ and Ly-6C $^+$ CD4 T_N cells were isolated from peripheral LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice by flow cytometry sorting, barcoded with CTv or CTv and CTfr proliferation dyes, and stimulated with α CD3- and α CD28-

coated antibodies in the presence of graded doses of TGF β . These cells were cultured separately or together (**Figure 1A,B**). The percentages of Foxp3⁺ cells among the progeny of both naive cell-subsets were assessed on day 4. For suboptimal doses of exogenous TGF β , Ly-6C⁻ CD4 T_N cells gave rise to a twofold higher proportion of iTreg cells than their Ly-6C⁺-cell counterparts in both culture conditions (**Figure 1C,D**). The concentration of TGF β needed to obtain 50% of the maximal percentage of iTreg cells (effective concentration, EC50) was calculated by fitting the dose-response curves of both CD4 T_N-cell subsets in the different culture conditions (**Figure 1D,E**). EC50 values for TGF β were statistically different between the 2 CD4 T_N-cell subsets whether they were cultured separately or together. Of note, and in line with their similar ability to produce T_H1- and T_H2-cell-derived cytokines, blocking IFN- γ and IL-4 during in vitro iTreg-cell polarization did not abolish the difference in the ability of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells to differentiate into iTreg cells. (**Figure 1—figure supplement 1C–E**). These results suggest strongly that the greater sensibility of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to iTreg-cell polarization signals is cell-intrinsic.

Ly-6C⁻ CD4 T_N-cell transcriptomic signature reveals both their TCR signaling activity and their bias toward iTreg-cell polarization

To further compare Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells, we obtained Affymetrix gene expression profiles from both CD4 T_N-cell subsets directly isolated from peripheral LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice by flow cytometry sorting (**Figure 2**). Only few genes were significantly differentially expressed between the two types of CD4 T_N cells (at a 1.3-fold cutoff, 167 genes over-expressed and 164 under-expressed in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells when compared to Ly-6C⁺ CD4 T_N cells; **Figure 2A**). This set of differentially expressed genes between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells was compiled into a comprehensive signature that we named 6CSign (**Figure 2B,C**). The differential expression of several genes by Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells was then validated at the protein level by flow-cytometry (**Figure 2—figure supplement 1**). In line with our microarray analysis, Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were expressing higher amounts of CD5, CD73, CD122, CD200, Irf3 and Irf4 and lower levels of Sca-1 and IL18R α than their Ly-6C⁺ CD4 T_N-cell counterparts (**Figure 2—figure supplement 1A,B**).

We have previously shown that Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were more self-reactive than Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (**Martin et al., 2013**). Accordingly, among the 6CSign, several genes such as *Ctla4*, *Cd5*, *Tnfrsf4*, *Tnfrsf9* and *Nr4a1* were previously shown to belong to activation-induced or -repressed gene families (**Figure 2C**; [**Wakamatsu et al., 2013**]). We thus compared more precisely our signature, the 6CSign, with several public Geo Datasets comparing various 'activated' CD4 T_N cells to their non-activated cell counterparts (**Figure 3A,B**). CD5 expression levels on CD4 T_N cells are actively maintained by interactions with self-MHC and rapidly decline in their absence (for example in the blood, [**Stefanová et al., 2002**]). In agreement with a greater self-reactivity of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells, the 6CSign correlated significantly with the CD5^{hi} versus CD5^{lo} CD4 T_N-cell signature (**Richards et al., 2015**). Interestingly, whereas the 6CSign genes also correlated with the transcriptional signature of α CD3-activated CD4 T_N cells (compared to unstimulated cells) (**Wakamatsu et al., 2013**), there was no significant correlation with the signature of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)-activated CD4 T_N cells (**Bevington et al., 2016**).

Interestingly, the 6CSign contained several genes characteristically expressed in Treg cells such as *Ctla4*, *Irf4*, *Cd200*, *Lag3* or *Il2rb*. All these genes were upregulated in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells when compared to Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (**Figure 2C**). By comparing CD4 T-cell effectors with naive CD4 T cells, Wei et al. (2009) have recently defined the transcriptional signature of the main CD4 T_H-cell subsets such as in-vitro-induced Treg cells, T_H1, T_H2 and T_H17 cells. Comparison of the 6CSign with these cell signatures revealed that the differences in gene expression observed between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells correlated significantly with the in-vitro-induced Treg-cell signature, and to a lesser extent with the T_H17 one but not with the T_H1 or T_H2 transcriptional signatures (**Figure 3C**).

Similarities were also observed between the transcriptional profiles of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells and ex vivo purified peripheral Treg cells (**Figure 3C**) (**Wei et al., 2009**). One common characteristic shared by Ly-6C⁻ CD4 T_N cells and CD4 Treg cells is their high degree of self-reactivity. Recent studies have highlighted a continuous requirement of self-MHC recognition and of the associated TCR-mediated signaling for maintaining both the function and transcriptional signature of CD4 Treg cells (**Delpoux et al., 2012**; **Levine et al., 2014**; **Vahl et al., 2014**). Whereas self-deprivation or TCR-ablation did not impair the expression of the transcription factor Foxp3, they induced major transcriptional changes (**Delpoux et al., 2012**; **Levine et al., 2014**; **Vahl et al., 2014**). Interestingly, 6CSign

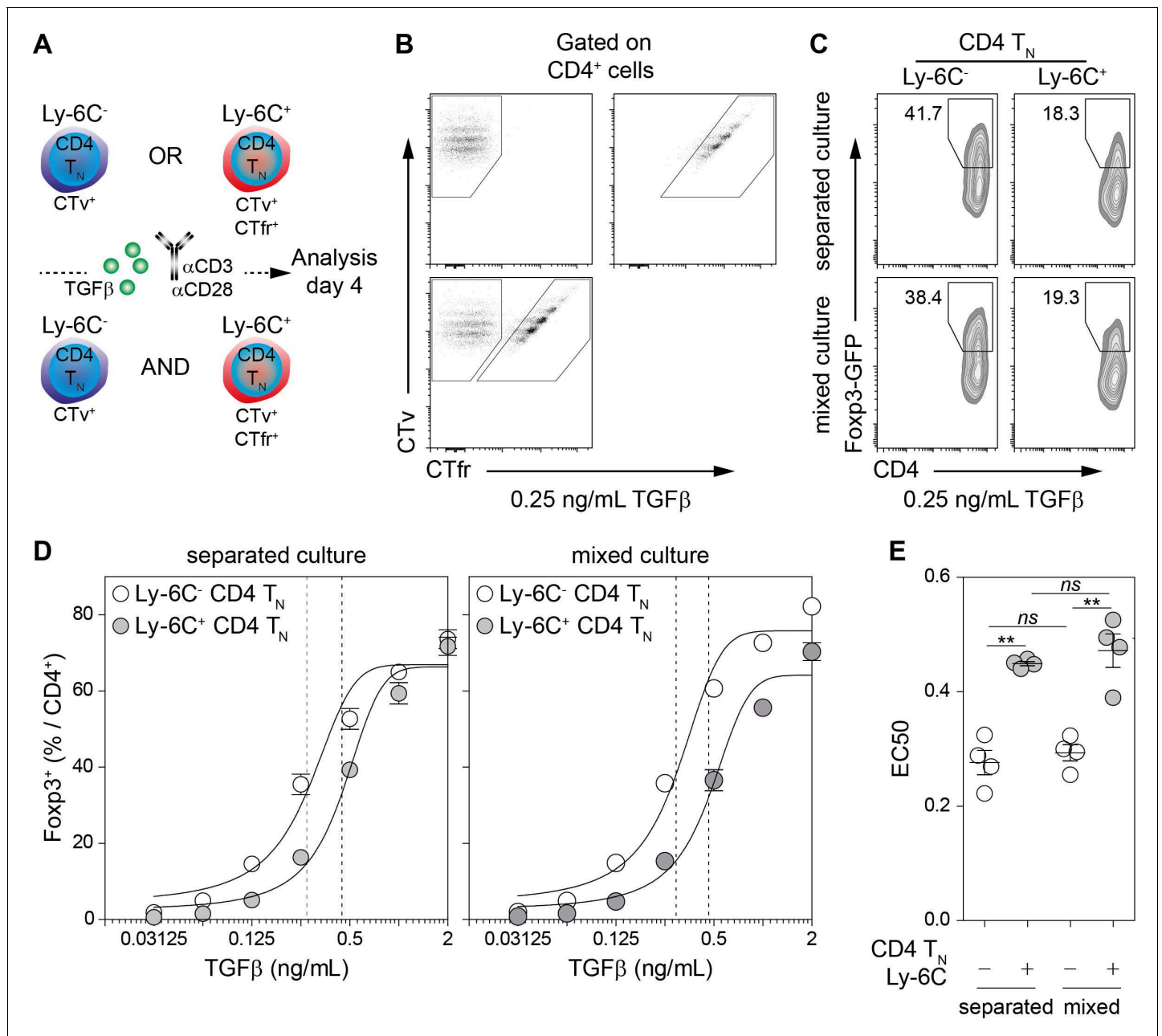


Figure 1. Cell-intrinsic enhanced ability of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to commit into iTreg cells. (A–E) Flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Fcpx3-GFP mice were stained with CTv (Ly-6C⁻) or CTv and CTfr (Ly-6C⁺) and stimulated separately or together for 4 days with coated αCD3 and αCD28 Abs (4 μg/mL), in the presence of graded doses of TGFβ1. (A) Diagram illustrating the experimental protocol. (B) Representative CTv/CTfr dot-plots for gated CD4⁺ cells recovered after 4 days of culture. Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were either cultured separately (top left and right panels, respectively) or together (bottom panel) (C) Representative Fcpx3/CD4 contour-plots and proportions of Fcpx3⁺ cells for gated CD4⁺ cells are shown at a dose of 0.25 ng/mL TGFβ1. (D) Proportions of Fcpx3⁺ cells among CD4⁺ cells are shown as a function of TGFβ1 concentration. Mean ± s.e.m. of four independent experiments are shown. (E) Concentrations of TGFβ1 needed to obtain 50% of the maximal percentages of iTreg-cell polarization (EC50) were calculated for each CD4 T_N cell subset in separated or mixed cultures. Each dot represents an independent experiment. Significance of differences were assessed using a two-tailed paired Student’s t-test. Values of p<0.05 were considered as statistically significant (**p<0.01; ns, not significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.003>

The following figure supplement is available for figure 1:

Figure supplement 1. Cytokine-independent enhanced ability of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to commit into iTreg cells.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.004>

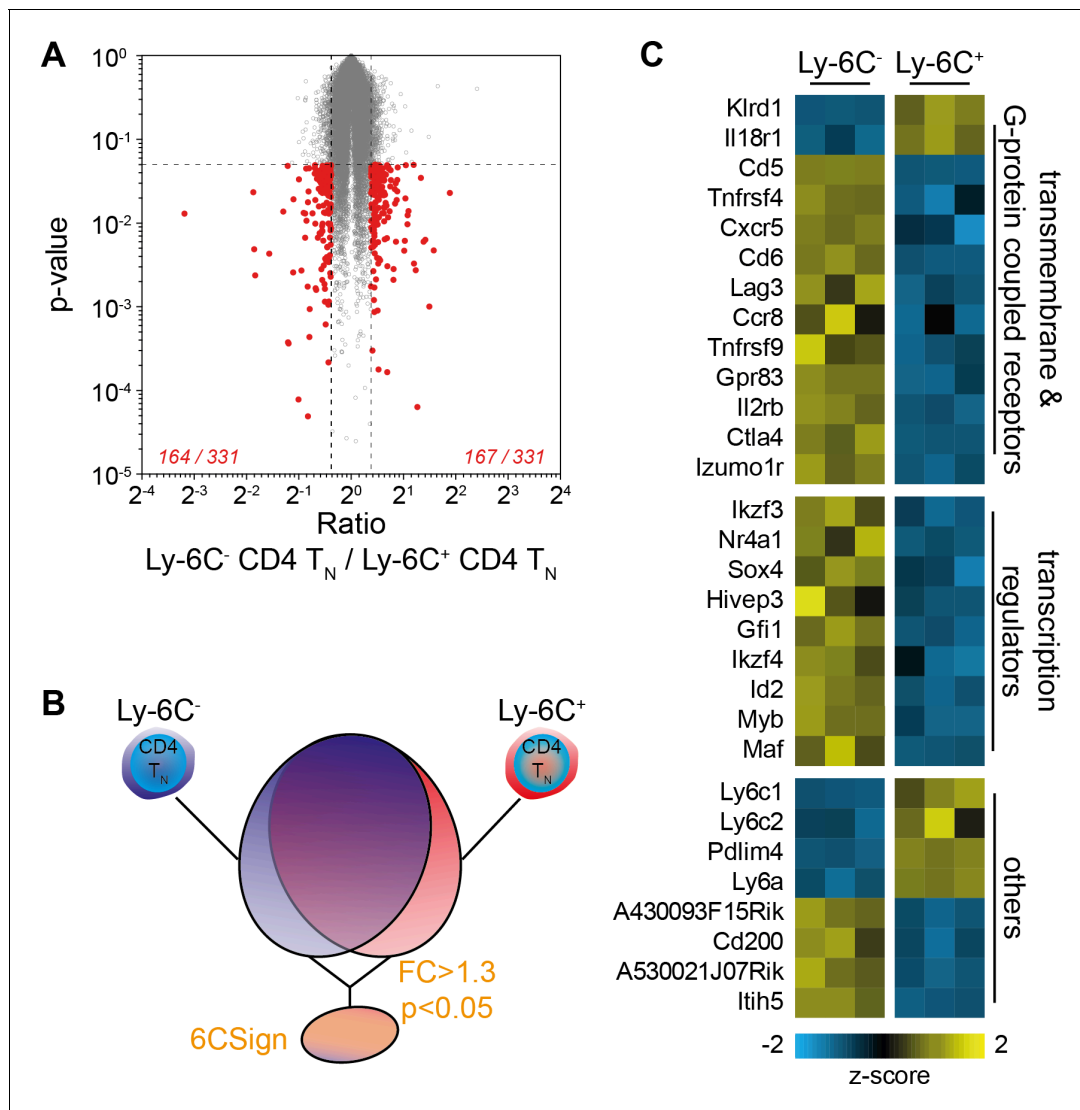


Figure 2. Transcriptional profiling identifies a set of differentially regulated genes between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N-cell subsets. (A–E) Microarray analysis was performed on Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells sorted from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice. (A) ‘Volcano plot’ representation (Log₂ (ratio) versus Log₁₀ (t test p-value)). Genes expressed >1.3 fold higher or lower in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells compared to Ly-6C⁺ CD4 T_N cells with a p-value of <0.05 are highlighted in red. The number of genes up- or down-regulated (1.3-fold cut-off) for each comparison is indicated. (B) Scheme depicting the selection of genes that were included in the 6CSign (list of the genes differentially expressed between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells, at a 1.3-fold cut-off). (C) Heat map of selected differentially expressed genes between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. The scaled expression of each replicate, denoted as the row z-score, is plotted in yellow-blue color scale with yellow indicating high expression and blue indicating low expression.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.005>

The following figure supplement is available for figure 2:

Figure supplement 1. Validation of the 6CSign at the protein level.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.006>

genes strongly correlated with the transcriptional signature of TCR⁺ CD4 Treg cells (compared to TCR⁻ CD4 Treg cells, **Figure 3D**) (Vahl *et al.*, 2014). More precisely, most genes upregulated in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells when compared to their Ly-6C⁺-cell counterparts were positively regulated by steady-state TCR signaling in CD4 Treg cells (such as *Cd5*, *Cd200*, *Il2rb*, *Itih5*, *Maf* and *Myb*; **Figure 3E**). Conversely, an important proportion of the genes downregulated in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were also down-regulated by steady-state interactions with self-MHC in CD4 Treg cells (**Figure 3E**). Altogether, these data point to a role for the TCR signaling pathway in the installation and maintenance of the 6CSign.

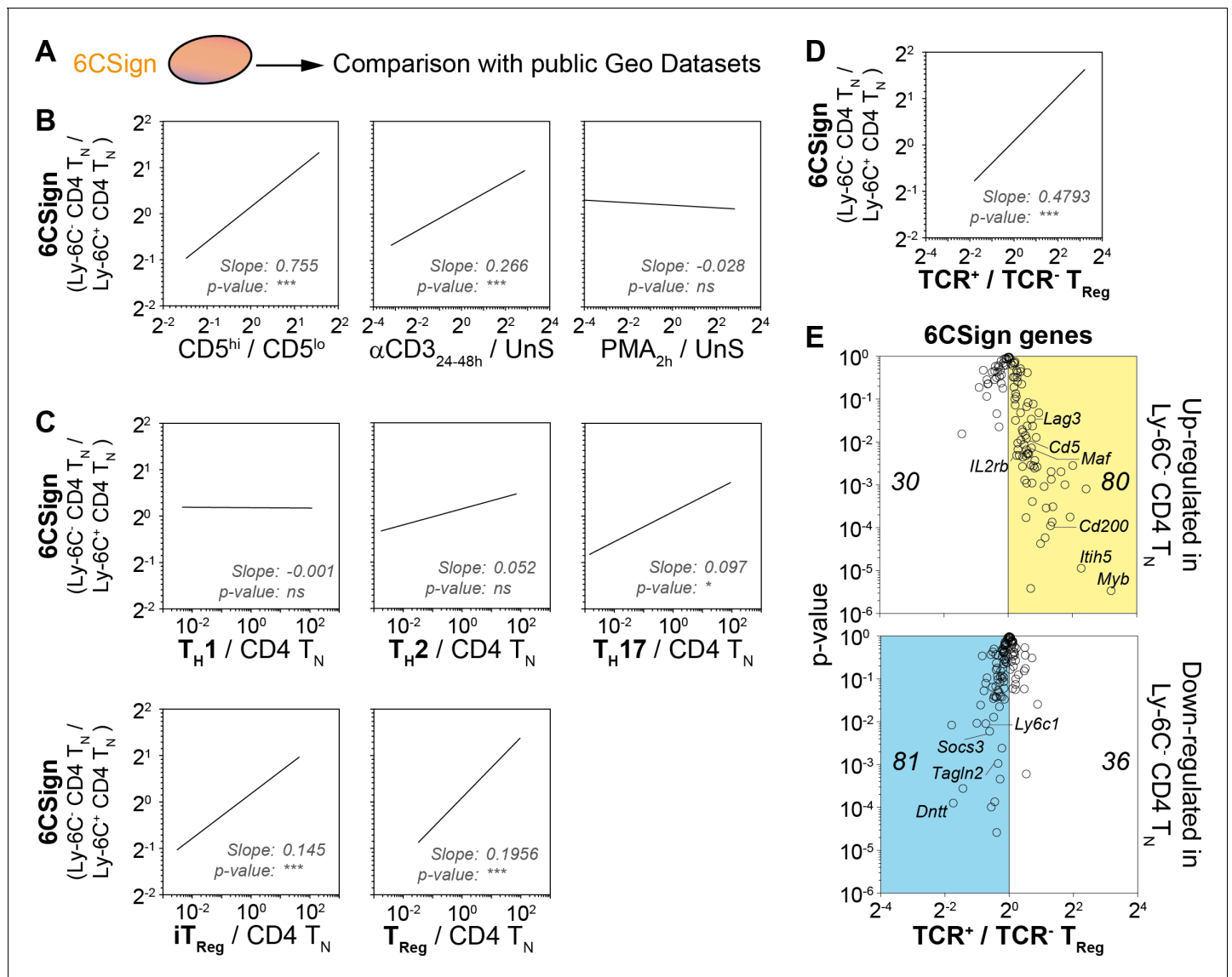


Figure 3. Transcriptomic signature of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells reveals both their active TCR signaling and their bias toward iTreg-cell polarization. (A–E) 6CSign was compared to several public Geo Datasets. (A) Diagram illustrating the analysis protocol. (B) Ratio vs ratio representation comparing gene expression ratio between Ly-6C⁻ CD4 T_N cells and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (6CSign) with either CD5^{hi/visio} cell signature (Richards et al., 2015) (ratio of CD5^{hi} CD4 T_N cells to CD5^{lo} CD4 T_N cells, left panel), anti-CD3 activated CD4 T_N-cell signature (Wakamatsu et al., 2013) (ratio of CD4 T_N cells stimulated for 24–48 hr with anti-CD3 coated Ab to unstimulated CD4 T_N cells, middle panel) and PMA-activated CD4 T_N-cell signature (Bevington et al., 2016) (ratio of CD4 T_N cells stimulated for 2 hr with PMA to unstimulated CD4 T_N cells, right panel). (C) Ratio vs ratio representation comparing gene expression ratio between Ly-6C⁻ CD4 T_N cells and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (6CSign) with in-vitro-induced T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, iTreg and ex vivo purified Treg cell signatures that have been identified by Wei et al. (2009) (ratio of CD4 T_H-cell subsets to CD4 T_N cells). (D) Ratio vs ratio representation comparing gene expression ratio between Ly-6C⁻ CD4 T_N cells and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (6CSign) with TCR-signaling-dependent CD4-Treg-specific signature (Vahl et al., 2014) (ratio between TCR⁺ Treg cells and TCR-obliterated (TCR⁻) Treg cells). (B–D) Correlation analyses were performed using Pearson’s correlation test. (E) ‘Volcano plot’ representation (Log₂ (ratio) versus Log₁₀ (t-test p-value)) between TCR⁺ Treg cells and TCR-obliterated (TCR⁻) Treg cells (Vahl et al., 2014), for 6CSign genes upregulated (upper panel) or downregulated (lower panel) in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells. (B–E) Datasets were filtered to common probes between the two arrays.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.007>

Ly-6C⁻ CD4 T_N-cell phenotype relies on the Ca²⁺ signaling pathway in vitro

The transcriptional signature of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells revealed some similarities between these cells and αCD3-stimulated CD4 T_N cells. We therefore decided to analyze the effect of TCR signaling on

Ly-6C expression. Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were isolated from peripheral LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice by flow cytometry sorting and incubated with various stimulating agents mimicking all or part of TCR-induced signals (**Figure 4A**). As expected from our transcriptomic analysis and previous work (**Martin et al., 2013**), Ly-6C expression was clearly downregulated when cells were stimulated with α CD3 and α CD28-coated antibodies for 5 days (**Figure 4A,B**). To decipher which TCR-induced signals led to Ly-6C down-regulation, we roughly dichotomized the TCR signaling cascade into its two main components, for example the Ca²⁺ signaling pathway that can be elicited by Thapsigargin (TG) and the PKC and ERK signaling pathways activated by PMA. When combined, PMA and TG, induced complete Ly-6C down-regulation, whereas, when separated, each drug had an opposite effect on Ly-6C expression. Indeed, whereas PMA alone upregulated Ly-6C expression, TG alone induced a near-complete disappearance of Ly-6C protein at the surface of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. Interestingly, while in all other conditions, CD4 T_N cells were proliferating, this phenotypic conversion of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells into Ly-6C⁻ CD4 T_N cells induced by TG alone occurred without any proliferation (**Figure 4A,B**). Importantly, to avoid TG-induced cell death, a sub-optimal dose (4 nM) was used in these culture conditions. 4 nM TG induced a reproducible increase in intracellular calcium levels, although to a lesser extent than the classical dose of 200 nM (**Figure 4C**). Accordingly, by analyzing basal Ca²⁺ contents at the end of the culture period (5 days), we observed that 4 nM TG treated Ly-6C⁺ CD4 T_N cells exhibited higher cytoplasmic Ca²⁺ levels than control cells cultured in IL-7 alone (**Figure 4D,E**). To further characterize the long-term effect of this low-dose TG, subcellular localization of the nuclear factor of activated T-cell protein 1 (NFAT1) was assessed in Ly-6C⁺ CD4 T_N cells in the presence or absence of 4 nM TG at various time points along the culture. Indeed, increases in intracellular Ca²⁺ levels result in the activation of calcineurin that dephosphorylates members of the NFAT family, leading to their translocation into the nucleus. NFAT1 localization was quantified by high-resolution imaging flow-cytometry using the ImageStreamX technology (**Figure 4F**). In line with the Ca²⁺ increase induced by 4 nM TG treatment, NFAT was translocated into the nucleus of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells in the presence of TG while it remained cytoplasmic in its absence. NFAT translocation into the nucleus peaked on day 1 and remained significantly higher in TG-treated cells than in control cells throughout the culture.

Finally, in agreement with their resting status, Ly-6C⁺ CD4 T_N cells cultured in TG alone for 5 days maintained a naive phenotype according to their low forward scatter profile and expression of CD44 and CD62L (**Figure 4—figure supplement 1**). We then studied the kinetic aspect of the TG-mediated conversion of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells into Ly-6C⁻ CD4 T_N cells and found that it occurred in 3–4 days of culture (**Figure 4G**).

Altogether, our results suggest that the Ca²⁺ signaling pathway is sufficient to induce Ly-6C down-regulation on CD4 T_N cells in vitro. We therefore hypothesized that the Ca²⁺ signaling pathway might be involved as part of the self-mediated tonic TCR signaling in the generation/maintenance of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells in the periphery of a normal mouse in the steady-state. To evaluate the activation status of the Ca²⁺ signaling pathway within Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells in vivo in the steady-state, we analyzed NFAT1 subcellular localization in both cell types. To this aim, LN cells were directly fixed after recovery and NFAT1 or NFAT2 localization was imaged by confocal microscopy (**Figure 4H**) and quantified by high-resolution imaging flow-cytometry using the ImageStreamX technology (**Figure 4I** and **Figure 4—figure supplement 2**). In line with our hypothesis, NFAT localization is more nuclear in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells than in their Ly-6C⁺-cell counterparts. As a control, CD4 T_N cells were rested in vitro for 30 min before fixation and staining. As expected, differences in NFAT localization between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were abolished in these conditions. 200 nM TG treatment induced the nuclear translocation of NFAT in both CD4 T_N-cell subsets. Of note, in this latter condition, differences in the localization of NFAT1 and NFAT2 between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were diminished but not completely abolished (**Figure 4I** and **Figure 4—figure supplement 2**).

Altogether, our data demonstrate that increasing in vitro intracellular Ca²⁺ levels is sufficient to down-modulate Ly-6C expression at the cell surface of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells without inducing any significant proliferation or activation. Accordingly, the greater nuclear-cytoplasmic ratio of NFAT proteins observed in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells, when compared to their Ly-6C⁺ CD4 T_N-cell counterparts, might reflect differences in the intensity of the Ca²⁺/Calcineurin signaling induced in vivo in these cells. Such differences could result from the differential ability of these cells to regularly interact with self-MHC/self-peptide complexes in the steady-state.

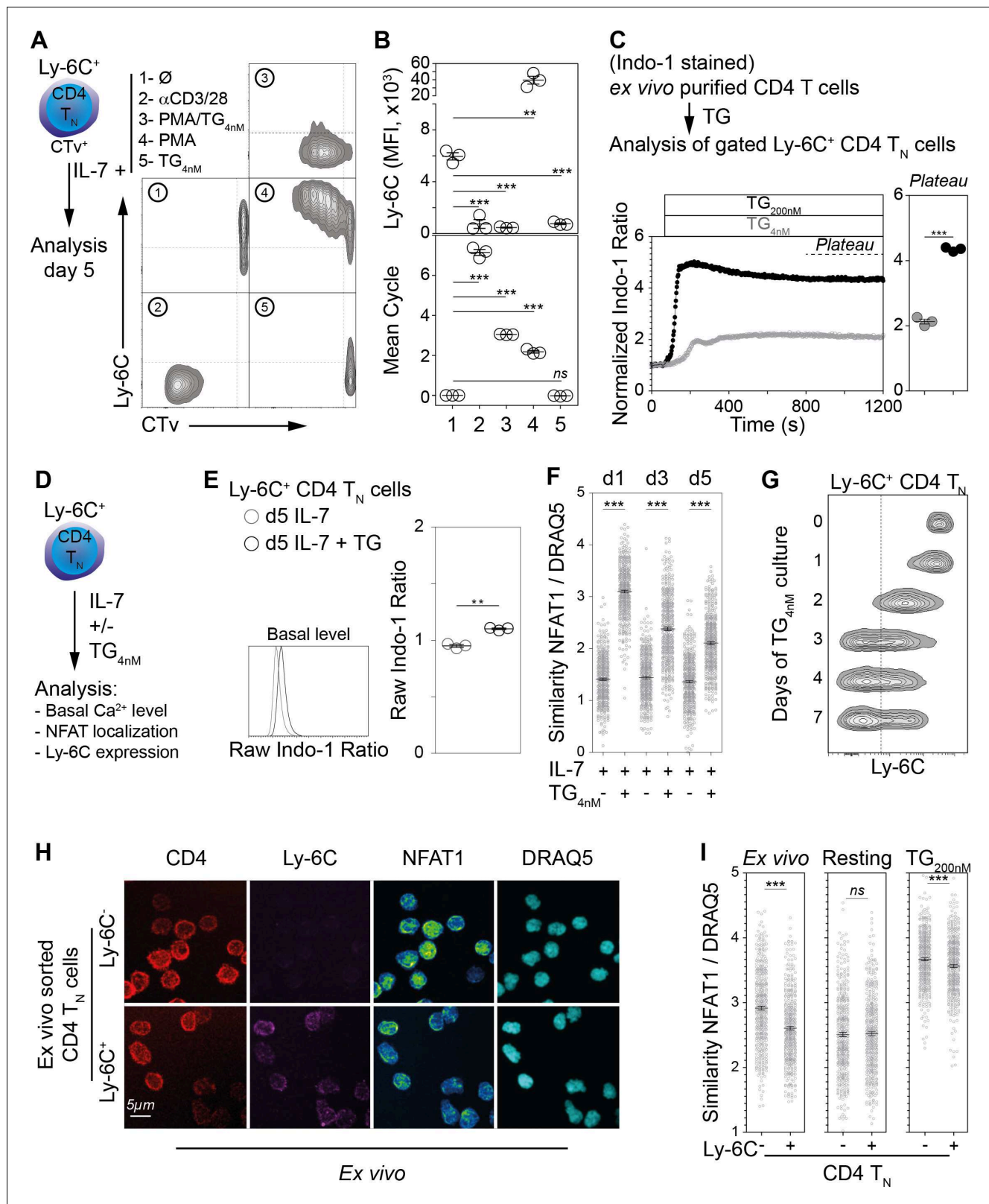


Figure 4. Ly-6C⁻ CD4 T_N-cell phenotype relies upon calcium signaling pathway in vitro. (A–B) Flow-cytometry sorted Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were labelled with CTv and cultured in IL-7 (10 ng/ml) in the presence of either coated αCD3/28 (4μg/ml), PMA and TG (1.25 ng/ml and 4 nM, respectively), PMA alone (1.25 ng/ml) or TG (4 nM). Cells were recovered and analyzed after 5 days of culture. (A) Representative Ly-6C/CTv contour-plots are shown. (B) Ly-6C Mean fluorescence intensities (MFIs), for gated CD4⁺ TCR⁺ cells, are shown as means ± s.e.m. for a representative

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

experiment with three mice per group (upper panel). Mean cell cycle numbers were calculated (lower panel). (C) Ex-vivo-purified CD4 T cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were stained with Indo-1 and cell surface molecules CD44, Ly-6C and lineage markers (CD11c, CD11b, CD8 β , CD25, TCR $\gamma\delta$ and NK1.1). Intracellular calcium concentration was assessed before and after stimulation with 4 or 200 nM TG to the extracellular medium and monitored by flow cytometry for 20 min; results are presented as normalized ratio of Indo-1 emission at 405 nm to that at 510 nm (405/510) for gated Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (Lineage⁻ Foxp3-GFP⁺ CD44^{lo} Ly-6C⁺ cells). Normalized Indo-1 ratio at the Plateau are shown as means \pm s.e.m. for a representative experiment (out of two independent experiments) with three mice per group (Each dot represents an individual mouse). (D–G) Flow-cytometry sorted Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were cultured in the presence of IL-7 (10 ng/mL) with TG (4 nM) or not. (D) Diagram illustrating the experimental protocol. (E) Basal intracellular calcium concentration was assessed, as in C, after 5 days of culture. Raw Indo-1 ratio are shown as means \pm s.e.m. for a representative experiment (out of two independent experiments) with three mice per group (each dot represents an individual mouse). (F) After 1, 3 and 5 days of culture, cells were analyzed by imaging flow cytometry. NFAT1 nuclear localization was calculated as similarity score between NFAT1 and DRAQ5 intensities. Data are representative of one of two independent experiments. (G) Cells were analyzed after 0, 1, 2, 3, 4 and 7 days of culture. Representative Ly-6C contour plots are shown for gated CD4 T_N cells (CD4⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP⁺) are shown. (H, I) LN cells were isolated from C57BL/6 mice and fixed in 4% paraformaldehyde immediately (Ex vivo) or after 30 min of culture in the presence of 200 nM of TG (TG) or not (Resting). Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (CD4⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3⁻) were sorted by flow cytometry and stained for NFAT1, and DNA (DRAQ5). (H) Cells were analyzed by confocal microscopy; CD4 (Red), Ly-6C (Magenta), NFAT1 (pseudocolor) and DNA (DRAQ5, cyan) fluorescence are shown for 'ex vivo' purified Ly-6C⁻ (upper panel) and Ly-6C⁺ (lower panel) CD4 T_N cells. Original magnification \times 63. (I) Cells were analyzed by imaging flow cytometry and NFAT1 nuclear localization assessed as in F. Data are representative of one of three independent experiments. (B, C, E, F, I) Significance of differences were assessed using a two-tailed unpaired Student's t-test. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, not significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.008>

The following figure supplements are available for figure 4:

Figure supplement 1. 'Ca²⁺-converted' Ly-6C⁺CD4 T_N cells keep a naive phenotype.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.009>

Figure supplement 2. NFAT2 localization is more nuclear in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells than in their Ly-6C⁺-cell counterparts.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.010>

The Ca²⁺-calcineurin signaling pathway shapes the phenotype of the CD4 T_N-cell compartment

We have identified several proteins differentially expressed between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (**Figure 2—figure supplement 1**) and have showed that TG induced Ly-6C downregulation at the cell surface of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. We next studied whether proteins of the 6CSign other than Ly-6C, were also modulated by an increase in intracellular Ca²⁺. To go further, we examined in parallel the involvement of the calcineurin phosphatase in these processes. To this aim, Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were isolated from peripheral LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice by flow cytometry sorting and cultured with IL-7 in the presence or absence of TG and calcineurin-inhibitors (Cyclosporin A, CsA and Tacrolimus, FK506, FK). Ly-6C⁻ CD4 T_N cells cultured in IL-7 were added as control. After 5 days of culture in these conditions, the expression of Ly-6C, CD5, CD73, CD122, CD200 and Izumo1r was analyzed by flow-cytometry (**Figure 5A**). For all these proteins, TG induced changes in their expression at the cell surface of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. More precisely, their level of expression reached those observed in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells. Blocking calcineurin activation with either CsA or FK506 led to the complete inhibition of this phenotypic conversion of Ly-6C⁺ (CD5^{lo}, CD73^{int}, CD122^{lo}, CD200^{lo}, Izumo1r^{lo}) CD4 T_N cells into Ly-6C⁻ (CD5^{hi}, CD73^{hi}, CD122^{int}, CD200^{int}, Izumo1r^{hi}) CD4 T_N cells. This Ca²⁺-induced phenotypic conversion thus depends on the activity of the canonical Ca²⁺-calcineurin signaling pathway.

We then investigated whether this in vitro observation could be mimicked in vivo. We first confirmed that the Ca²⁺-calcineurin signaling cascade was active in vivo in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells by showing that blocking calcineurin activation for 18 hr with FK506 was sufficient to abrogate the nuclear localization of NFAT in these cells (**Figure 5—figure supplement 1**). We then wondered whether a longer treatment with this calcineurin inhibitor would affect the phenotype of CD4 T_N cells in vivo. To this aim, C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected daily with FK506 or PBS for 2 weeks (**Figure 5B**). After 14 days, CD4 T_N cells from peripheral LNs and the spleen were analyzed for their expression of Ly-6C, Izumo1r and CD200. In line with our in vitro experiments, both the percentage of Ly-6C⁺ cells among CD4 T_N cells and the MFI of Ly-6C at the cell surface of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells increased in treated mice when compared to control mice (**Figure 5C–E**). Moreover, FK506 induced significant decreases of Izumo1r and CD200 surface levels in CD4 T_N cells (**Figure 5C,F**). Such changes in the

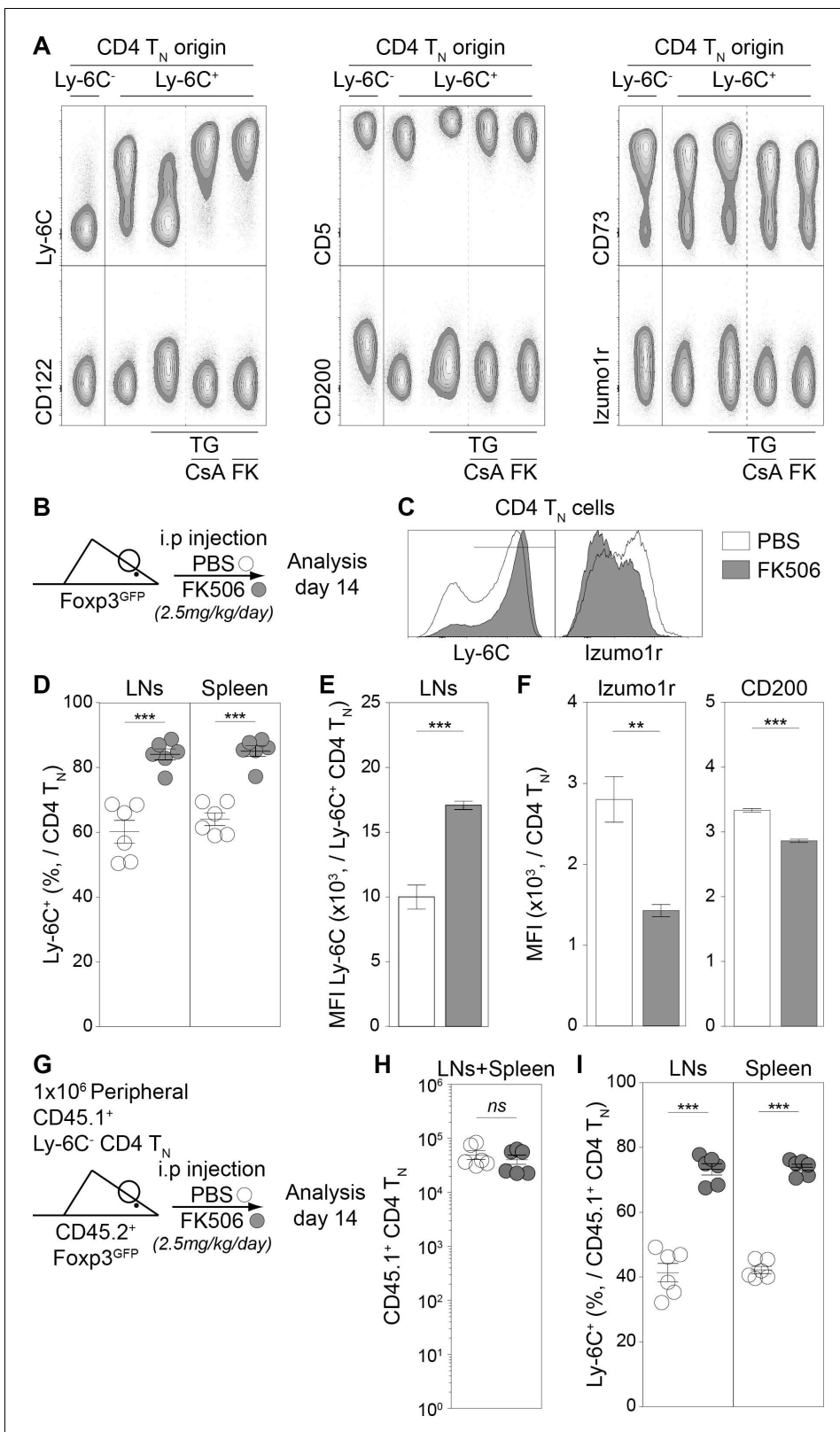


Figure 5. The calcium-calcineurin pathway shapes the phenotype of the CD4 T_N-cell compartment in vivo. (A) Flow-cytometry sorted Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 FcγR3-GFP mice were cultured in IL-7 (10 ng/mL) alone or in the presence of either TG (4 nM), TG and Cyclosporin A (CsA; 50 nM) or TG and FK506 (FK; 200 nM). Flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ CD4 T_N cells rested in IL-7 were used as control. After 5 days, cells were analyzed for their expression of Ly-6C, CD5, CD73, CD122, CD200 and Izumo1r. Representative contour-plots of cell surface markers are shown for gated CD4 T_N cells. Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

(CD4⁺ TCRβ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP) as a function of culture condition. (B–F) C57BL/6 Foxp3-GFP mice were daily injected intraperitoneally with Prograf (FK506; 2.5 mg/kg) or diluent (PBS). Two weeks after treatment LNs (pooled pLNs and mLNs) and spleen were recovered and CD4 T cells were analyzed. (B) Diagram illustrating the experimental procedure. (C) Ly-6C and Izm1r fluorescence histograms for gated CD4 T_N cells (CD4⁺ TCRβ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP) recovered from LNs of PBS (white) and FK506 (grey) treated mice. (D) Percentage of Ly-6C⁺ cells among CD4 T_N (CD4⁺ TCRβ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP) cells are shown for LNs and spleens of PBS (white) and FK506 (grey) treated mice. (E) Ly-6C Mean fluorescence intensities (MFIs), for gated Ly-6C⁺ CD4 T_N (Ly-6C⁺ CD4⁺ TCRβ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP) cells recovered from LNs of PBS (white) and FK506 (grey) treated mice, are shown as means ± s.e.m. for two independent experiments with three mice per group. (F) Izm1r and CD200 mean fluorescence intensities (MFIs), for gated Ly-6C⁺ CD4 T_N (Ly-6C⁺ CD4⁺ TCRβ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP) cells recovered from LNs of PBS (white) and FK506 (grey) treated mice, are shown as means ± s.e.m. for a representative experiment with three mice per group. (G–I) 1 × 10⁶ flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ CD4 T_N cells from CD45.1⁺ C57BL/6 Foxp3-GFP mice were adoptively transferred into sex-matched CD45.2⁺ C57BL/6 Foxp3-GFP recipient mice daily injected intraperitoneally with Prograf (FK506; 2.5 mg/kg) or diluent (PBS). Two weeks after transfer and treatment, LNs (pooled pLNs and mLNs) and spleen were recovered and donor-derived CD45.1⁺ CD4 T cells were analyzed. (G) Diagram illustrating the experimental model. (H) Absolute numbers of donor-derived CD4 T_N (CD45.1⁺ CD45.2⁻ CD4⁺ TCRβ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP) cells recovered from LNs and spleen of recipient mice are shown as means ± s.e.m. for two independent experiments with three mice per group. (I) Percentage of Ly-6C⁺ among donor-derived CD4 T_N (CD45.1⁺ CD45.2⁻ CD4⁺ TCRβ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP) cells recovered from LNs and spleen of recipient mice are shown as means ± s.e.m. for two independent experiments with three mice per group. (D, H, I) Each dot represents an individual mouse. (D–F; H, I) Significance of differences were assessed using a two-tailed unpaired Student's t-test. Values of p < 0.05 were considered as statistically significant (**p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.011>

The following figure supplement is available for figure 5:

Figure supplement 1. The calcium-calcineurin cascade drives NFAT nuclear translocation in CD4 T_N cells in vivo.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.012>

phenotype of the bulk of CD4 T_N cells could result from either the conversion of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells into Ly-6C⁺ CD4 T_N cells or the disappearance of the Ly-6C⁻ cell subset. We therefore decided to compare the behavior of adoptively transferred Ly-6C⁻ CD4 T_N cells in FK506 or PBS-treated mice (**Figure 5G**). 10⁶ Ly-6C⁻ CD4 T_N cells purified from LNs of CD45.1⁺ Foxp3-GFP donor mice were adoptively transferred into CD45.2⁺ Foxp3-GFP-recipient mice. Host mice were then daily injected with FK506 or PBS for 2 weeks (**Figure 5G**). After 14 days, donor-derived CD4 T_N cells from peripheral LNs and the spleen were analyzed. Although similar numbers of donor-derived CD4 T_N cells were recovered from both FK506 and PBS-treated mice (**Figure 5H**), these cells were still greatly enriched in Ly-6C-expressing cells in FK506-treated recipients (**Figure 5I**).

Altogether, our data demonstrate that the activation of the Ca²⁺-calcineurin signaling pathway drives the phenotypic conversion of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells into Ly-6C⁻ CD4 T_N cells both in vitro and in vivo.

Ca²⁺-mediated shaping of the CD4 T_N-cell iTreg-cell differentiation potential

As a rise in intracellular Ca²⁺ level converts phenotypically Ly-6C⁺ CD4 T_N cells into Ly-6C⁻ CD4 T_N cells, we then tested whether the in vitro iTreg-cell polarization potential of these ex-Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (referred thereafter as 'Ca²⁺-converted' Ly-6C⁺ CD4 T_N cells) was also modified. Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were recovered from C57BL/6 Foxp3-GFP mice and cultured in vitro with or without TG. After 5 days of culture, viable cells were FACS-sorted and stimulated with αCD3- and αCD28-coated antibodies in the presence of graded doses of TGFβ for 4 days (**Figure 6A**). Of note, even after 5 days of resting in the presence of IL-7, Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were keeping a greater sensitivity to iTreg-cell polarization signals, than Ly-6C⁺ CD4 T_N cells cultured in the same conditions. Importantly, the iTreg-cell polarization potential of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells rose up when these cells were pre-incubated in the presence of TG and became similar to the one observed for Ly-6C⁻ CD4 T_N cells (**Figure 6B,C**). In agreement with the fact that calcineurin inhibitors blocked the TG-mediated phenotypic conversion of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells into Ly-6C⁻ CD4 T_N cells (**Figure 5A**), adding CsA at the time of TG pre-incubation also abrogated the sensitization of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells to iTreg-cell polarization signals (**Figure 6B**). EC50 values for TGFβ were calculated in these conditions and were statistically different between the 2 CD4 T_N-cell subsets when cells were pre-incubated in IL-7 alone but dropped to similar levels when TG was added in the pre-culture medium (**Figure 6C**). Of note, pre-incubating Ly-6C⁺ CD4 T_N cells with TG and CsA further limit their ability to commit

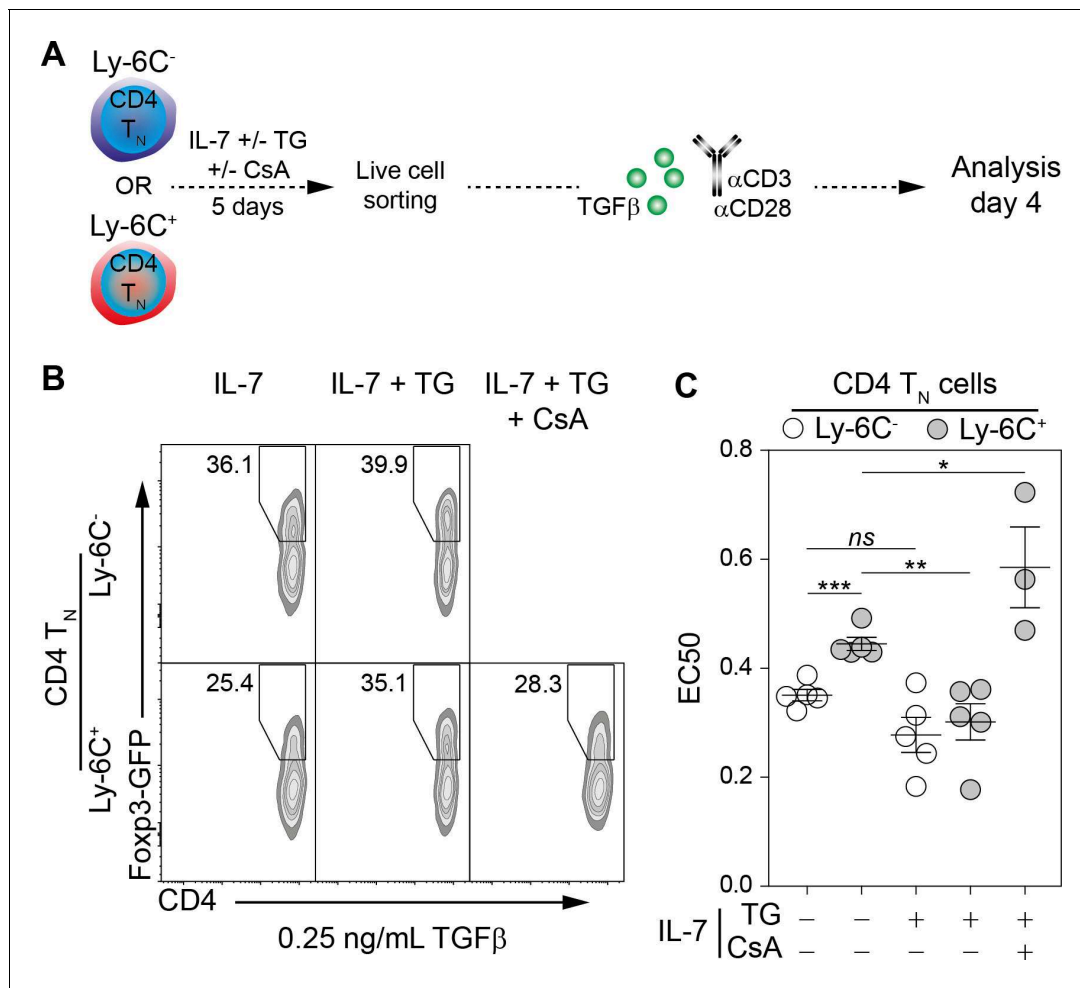


Figure 6. Ly-6C⁻ CD4 T_N-cell sensitization to iTreg-cell polarization signals relies upon calcium signaling pathway in vitro. Flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Fopx3-GFP mice were cultured in IL-7 (10 ng/mL) with or without TG (4 nM) and CsA (50 nM). After 5 days, live cells were flow-cytometry sorted and stimulated with coated αCD3 and αCD28 Abs (4 μg/ml) in the presence of graded doses of TGFβ1. Cells were analyzed after 4 days of stimulation. (A) Diagram illustrating the experimental procedure. (B) Representative Fopx3/CD4 contour-plots and proportions of Fopx3⁺ cells for gated CD4⁺ cells are shown at a dose of 0.25 ng/mL TGFβ1, as a function of pre-culture condition. (C) Concentrations of TGFβ1 needed to obtain 50% of the maximal percentage of iTreg-cell polarization (EC50) were calculated for each CD4 T_N-cell subset and each pre-culture condition. Each dot represents an independent experiment. Significance of differences were assessed using a two-tailed paired Student's t-test. Values of p<0.05 were considered as statistically significant (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ns, not significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.013>

into iTreg cells as reflected by a significant increase in EC50 (Figure 6C). Altogether, our data demonstrate that an increase in intracellular Ca²⁺ levels not only shapes the phenotype of the CD4 T_N-cell compartment but also sensitizes in vitro these cells to iTreg-cell polarization signals, both processes occurring through a calcineurin-dependent pathway.

To confirm these data in vivo, we used the well-known model of antigen-specific pTreg-cell development induced by oral tolerance (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007). This protocol studies the behavior of CD4 T_N cells from ovalbumin-specific TCR transgenic OT-II mice adoptively transferred into wild-type mice fed with ovalbumin (OVA). Indeed, in these conditions, a significant proportion of OT-II cells rapidly differentiate into pTreg cells in the mesenteric lymph nodes and Peyer Patches of recipient mice. Most OT-II CD4 T_N cells expressed Ly-6C ex vivo (Figure 7—figure supplement 1A). FACS-sorted CD45.1/2⁺ OT-II CD4 T_N cells were first cultured in IL-7 in the presence or absence of TG (Figure 7A). After 5 days of culture, TG led to a marked downregulation of Ly-6C (Figure 7—figure supplement 1B). Living cells were then FACS-sorted and 0.5–1.10⁶ cells were adoptively transferred into CD45.1 Fopx3-GFP mice. Finally, recipient mice were fed or not for 7

days with OVA in their drinking water. As expected, OVA administration led to the activation of OT-II cells, as reflected by a significant CD44 upregulation at their cell surface (**Figure 7—figure supplement 1C**). Similar numbers of OT-II CD4 T cells were recovered from the secondary lymphoid organs of OVA-fed mice whether they were initially injected with 'Ca²⁺-converted' or not OT-II CD4 T_N cells (**Figure 7B**). In all secondary lymphoid organs, Ca²⁺-converted OT-II CD4 T_N cells gave rise to greater proportions and absolute numbers of Foxp3-expressing cells than OT-II CD4 T_N cells cultured with IL-7 alone prior to injection (**Figure 7C–E**). Specifically, a total of $1.16 \pm 0.22 \times 10^4$ pTreg (Foxp3-expressing) cells were recovered from the whole periphery of recipient mice injected with Ly-6C⁺ OT-II CD4 T_N cells compared to $2.26 \pm 0.32 \times 10^4$ pTreg cells when mice were injected with Ca²⁺-converted OT-II CD4 T_N cells ($p < 0.05$).

These latter results were confirmed by using a second protocol of oral administration of OVA. In this setting, 'Ca²⁺-converted' OT-II CD4 T_N cells were co-transferred with OT-II CD4 T_N cells cultured in IL-7 alone in order to compare their ability to convert into pTreg in the same recipient mice. FACS-sorted CD45.2⁺ and CD45.1/2⁺ OT-II CD4 T_N cells were first cultured in IL-7 in the absence or presence of TG, respectively (**Figure 7—figure supplement 1A**). After 5 days of culture, living cells were FACS-sorted, mixed at a 1:1 ratio and 1.10^6 cells were adoptively transferred into CD45.1 Foxp3-GFP mice. Finally, recipient mice were fed with OVA by gavage (4 and 24 hr after the transfer of OT-II cells). Nine days later, secondary lymphoid organs were recovered and the phenotype of donor-derived OT-II T cells was analyzed. In this setting, 'Ca²⁺-converted' OT-II CD4 T_N cells were also giving rise to greater absolute numbers of Foxp3-expressing cells than OT-II CD4 T_N cells cultured with IL-7 alone prior to injection (**Figure 7—figure supplement 1B,C**). More precisely, more than three quarters of the Foxp3⁺ OT-II cells arising in these conditions derived from 'Ca²⁺-converted' cells (**Figure 7—figure supplement 1D**).

These latter results validate our in vitro data showing that a rise in intracellular Ca²⁺ leads to an enhanced sensitivity of CD4 T_N cells to iTreg-cell polarization signals.

Discussion

In the steady-state, naive T cells continually recirculate between the blood, lymph and secondary lymphoid organs, scanning dendritic cells (DCs) for the presence of foreign antigens. In the course of their journey, naive T cells also make weak, but functional, interactions with self-peptides presented by self-MHC molecules (self-MHC). Such contacts with self-MHC are required for the long-term survival of peripheral naive T cells (*Martin et al., 2006, 2003; Stritesky et al., 2012; Tanchot et al., 1997*). The signals derived from the recognition of self-MHC by TCRs also allow maintaining naive T cells in a state of greater sensitivity for responses to foreign antigens (*Dorfman et al., 2000; Stefanová et al., 2002*). The seminal work of *Štefanová et al.* showed a rapid decline in the ability of CD4 T_N cells to respond to their cognate antigen once contacts with self-MHC were disrupted (*Štefanová et al., 2002*). These findings were confirmed by several groups using various elegant experimental models (*Hochweller et al., 2010; Lo et al., 2009; Mandl et al., 2013; Persaud et al., 2014*). Beside these works, we have recently demonstrated that CD4 T_N-cell self-reactivity not only increases quantitatively but also shapes qualitatively their response toward their cognate antigens in the effector phase by increasing their ability to commit toward the iTreg/pTreg-cell lineage (*Martin et al., 2013*). In the present paper, we first wondered whether the enhanced ability of the most self-reactive CD4 T_N cells to convert into iTreg/pTreg cells upon appropriate stimulation was a cell-intrinsic property. The unchanged ability of both Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells to polarize into Foxp3-expressing iTreg cells in vitro whether they were cultured together or separately demonstrate that the biased commitment of the most self-reactive CD4 T_N cells toward the iTreg-cell lineage is cell-intrinsic.

We have recently described the cell surface GPI-anchored protein, Ly-6C, as an additional and complementary sensor of T-cell self-reactivity (*Martin et al., 2013*). However, significant differences may be noticed between CD5 and Ly-6C. First, whereas CD5 surface levels directly correlate with self-reactivity, Ly-6C expression by peripheral CD4 T_N cells inversely correlates with their ability to interact with self-MHC. Second, in contrast to CD5, Ly-6C expression at the cell surface of CD4 T_N cells is stable over time in homeostatic conditions as its up-regulation after self-MHC deprivation takes several days (*Martin et al., 2013*). Notwithstanding these differences, Ly-6C⁻ CD4 T_N cells express higher protein and mRNA levels of CD5 than their Ly-6C⁺-cell counterparts. Two recent

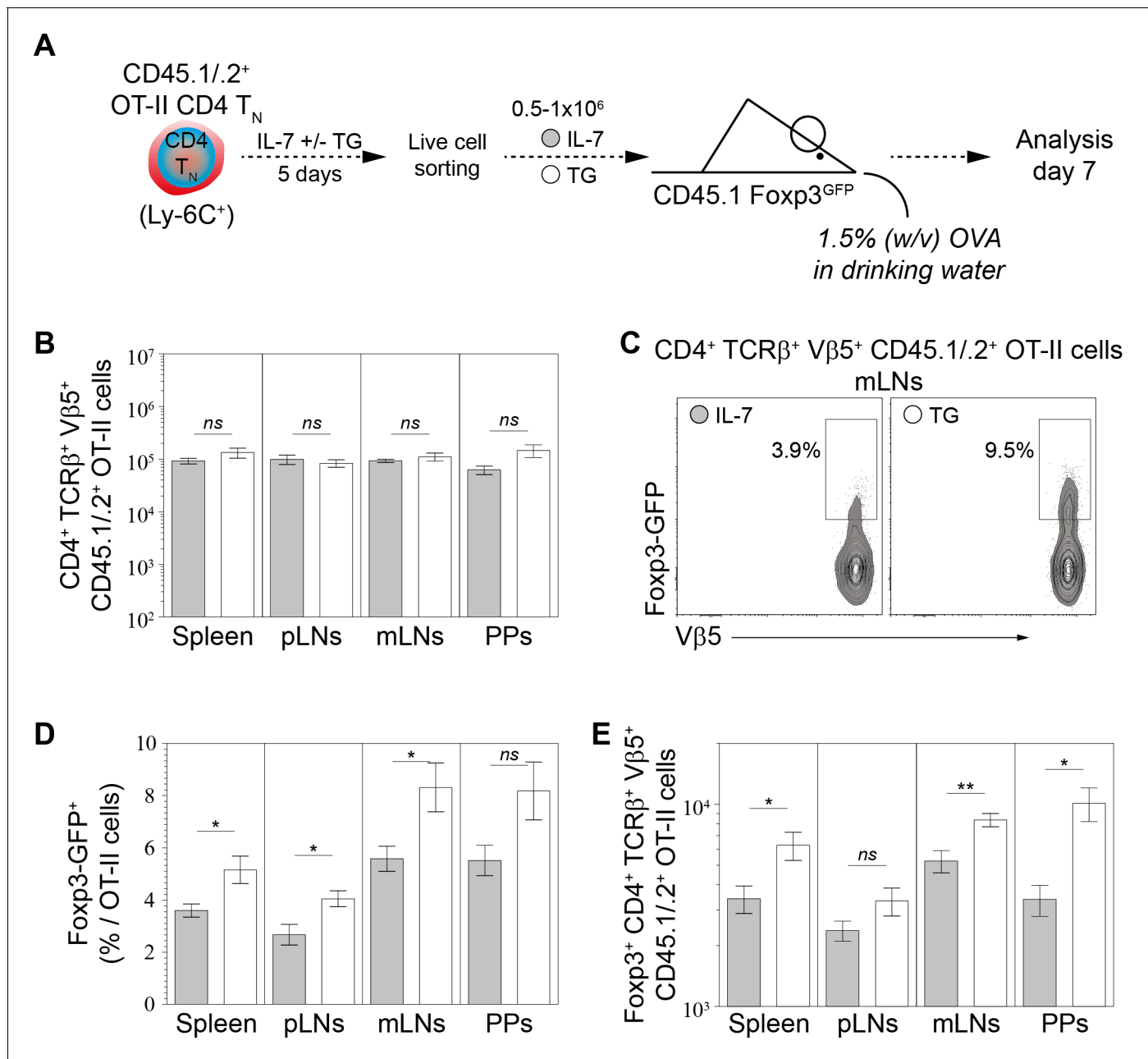


Figure 7. Calcium-mediated shaping of the CD4 T_N-cell pTreg-cell differentiation potential in vivo. Purified CD4 T cells from CD45.1/2⁺ C57BL/6 Fopx3-GFP OT-II mice were cultured in IL-7 (10 ng/ml) with or without TG (4 nM). After 5 days live CD4 T_N (CD44^{lo} CD25^{lo} CD8β⁻ CD11b⁻ CD11c⁻ NK1.1⁻ TCRγδ⁻ Fopx3-GFP⁻) cells were flow-cytometry sorted and injected intravenously (0.5–1 × 10⁶ cells) into sex-matched CD45.1⁺ C57BL/6 Fopx3-GFP recipient mice fed with Ovalbumin (OVA; 1.5% w/v) in the drinking water. One week after transfer, peripheral and mesenteric LNs (pLNs and mLNs, respectively), Peyer’s Patches (PPs) and spleen were recovered separately and donor-derived CD4 T cells were analyzed. (A) Diagram illustrating the experimental model. (B) Absolute numbers of donor-derived OT-II CD4 T (CD45.1⁺ CD45.2⁺ CD4⁺ TCRβ⁺ Vβ5⁺) cells recovered from pLNs, mLNs, PPs and spleen of recipient mice are shown as means ± s.e.m. for three independent experiments with two or three mice per group. (C) Representative Fopx3/Vβ5 contour-plots and proportions of Fopx3-GFP⁺ cells for gated donor-derived OT-II CD4 T (CD45.1⁺ CD45.2⁺ CD4⁺ TCRβ⁺ Vβ5⁺) cells recovered from mLNs are shown. (D–E) Percentages (D) and absolute numbers (E) of Fopx3-GFP⁺ among donor-derived OT-II CD4 T (CD45.1⁺ CD45.2⁺ CD4⁺ TCRβ⁺ Vβ5⁺) cells recovered from pLNs, mLNs, PPs and spleen of recipient mice are shown as means ± s.e.m. for three independent experiments with two or three mice per group. (B, D, E) Significance of differences were assessed using a two-tailed unpaired Student’s t-test. Values of p<0.05 were considered as statistically significant (*p<0.05; ns, not significant). FIGURE SUPPLEMENT LEGENDS.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.014>

The following figure supplements are available for figure 7:

Figure 7 continued on next page

Figure 7 continued

Figure supplement 1. OT-II CD4 T_N cells are Ly-6C⁺ and can be Ca²⁺-converted and tested for their ability to convert into pTreg cells in vivo.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.015>

Figure supplement 2. Calcium-mediated shaping of the CD4 T_N-cell phenotype increases the pTreg-cell differentiation potential of OT-II CD4 T_N cells in vivo.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.016>

papers by the group of Daniel Hawiger have highlighted a crucial role of CD5 in promoting the conversion of CD4 T_N cells into iTreg/pTreg cells (*Henderson et al., 2015; Jones et al., 2016*). CD5 would block the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and would allow activated CD4 T_N cells to resist to the inhibition of iTreg-cell induction induced by T_H1- and T_H2-cell-derived cytokines. Accordingly, in the absence of effector-differentiating cytokines, CD5^{hi} and CD5^{lo} CD4 T_N cells were shown to differentiate with a similar efficiency into iTreg/pTreg cells (*Henderson et al., 2015*). Such a phenomenon is unlikely to account for the greater ability of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to commit to the iTreg/pTreg-cell lineage. Indeed, Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells produced similar amounts of these cytokines after stimulation and Ly-6C⁻ CD4 T_N cells still differentiated more efficiently than their Ly-6C⁺-cell counterparts into iTreg cells in vitro in the presence of anti-cytokine (IL-4 and IFN- γ) blocking antibodies (**Figure 1—figure supplement 1C–E**). Moreover, whereas rapamycin drastically diminished the difference in the ability of CD5^{hi} and CD5^{lo} CD4 T_N cells to convert to iTreg/pTreg cells in the presence of cytokines known as restraining this effector fate (*Henderson et al., 2015*), this mTOR inhibitor similarly enhanced the generation of iTreg cells from both Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells and thus preserved the difference between these two cell subsets (data not shown).

In the present study, we have identified the Ca²⁺ signaling pathway as sufficient to induce Ly-6C down-regulation at the cell surface of CD4 T_N cells in vitro. Indeed, incubation of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells with the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase inhibitor, thapsigargin, led to multiple phenotypic changes including not only Ly-6C down-regulation but also variations in the expression of many other genes of the 6CSign (such as CD5, CD73, CD122, CD200 and *Izumo1r*). This phenotypic conversion of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells into Ly-6C⁻ CD4 T_N cells takes four days to occur in vitro and relies on the activity of Calcineurin, as shown by its complete blocking in the presence of Cyclosporin A or FK506. Interestingly, calcium- and PKC/Ras-dependent signaling pathways had divergent effects on the expression of Ly-6C. Indeed, whereas TG induced Ly-6C down-regulation, PMA led to its upregulation (**Figure 4A**). In line with this observation, the 6CSign does not correlate with the changes in gene expression induced by PMA (**Figure 3B**). These opposite effects of TG and PMA may reflect the well-documented and complex interplay between the PKC and Ca²⁺ signaling pathways. For example, PKC translocation to the plasma membrane is strictly Ca²⁺ dependent (*Reither et al., 2006*) and calcineurin is phosphorylated and inhibited by PKC (*Hashimoto and Soderling, 1989*). Altogether, our results suggest that interactions with self-MHC in the steady-state result in a dominant Ca²⁺ signaling (when compared to PKC and Ras-dependent pathways) leading to down-regulation of Ly-6C expression. This hypothesis is consistent with our results showing that in vivo Calcineurin inhibition leads to an increase in Ly-6C expression at even higher levels than those observed at the cell surface of Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from untreated mice. This hypothesis is reinforced by the work of Dong et al. (Dong TX et al., co-published with the present article) showing that Ca²⁺ fluxes can be measured in mouse total lymph node T cells in the steady-state and that anti-MHC blocking antibodies significantly reduced their frequency. Continuous interactions with self-MHC in the steady-state may thus induce calcium waves that shape both the phenotype of CD4 T_N cells and their behavior in the effector phase by favoring their differentiation into pTreg cells.

tTreg and pTreg cells have complementary roles in immune-mediated tolerance (*Haribhai et al., 2011*). An attractive hypothesis would be that tTreg cells would be responsible for tolerance to self-antigens, whereas pTreg cells would be in charge of restraining deleterious immune responses to non-self-antigens. In particular, pTreg cells are involved in the control of the responses to non-self-antigens leading to allergy and asthma (*Josefowicz et al., 2012*) as well as to commensal organism- (*Lathrop et al., 2011*) and food-derived antigens (*Mucida et al., 2005*) in the gut. Fetus-derived and allograft-derived antigens represent other obvious examples of acute exposure to non-self-antigens arising in the adults and requiring the establishment of a tolerance. In both cases, pTreg cells

are generated against non-self antigens (either conceptus-male-derived [[Samstein et al., 2012](#)] or allograft-derived [[Francis et al., 2011](#); [Wood et al., 2012](#)]). These cells are needed to establish an efficient tolerance toward the foetus ([Samstein et al., 2012](#)). However, there is still a lack of evidence to definitely implicate pTreg cells in the induction of an efficient tolerance toward allograft, in part because of the difficulties to achieve such a state. We have previously demonstrated that self-reactivity in the steady-state increases the ability of CD4 T_N cells to differentiate into iTreg/pTreg cells ([Martin et al., 2013](#)). Accordingly, the most self-reactive CD4 T_N cells (i.e. Ly-6C⁻ CD4 T_N cells) should contribute predominantly to the pTreg-cell pool generated under physiologic and pathologic conditions. In the present study, our data suggest strongly that this tonic TCR-signaling-mediated shaping of the CD4 T_N-cell compartment is calcineurin-dependent. In particular, chronic treatment with a calcineurin inhibitor leads to the disappearance of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells. Cyclosporin A and Tacrolimus treatments could thus interfere with the neoconversion of CD4 T_N cells into pTreg cells and limit the development of tolerance in transplant patients. This may explain the difficulty to safely interrupt these immunosuppressive therapies even after years. Thus, besides their obvious clinical utility, calcineurin inhibitors may have potentially harmful side effects that should be studied to better assess and adapt their use.

Materials and methods

Key resources table

| Reagent type (species) or resource | Designation | Source or reference | Identifiers |
|---|---|--|---|
| Strain, strain background (<i>Mus musculus</i>) | B6.Cg-Foxp3tm1Mal/J | Wang et al. (2008) (PMID: 18209052) | IMSR Cat# JAX:018628, RRID: IMSR_JAX:018628 |
| Strain, strain background (<i>Mus musculus</i>) | B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J | Barnden et al., 1998 (PMID: 9553774) | IMSR Cat# JAX:004194, RRID: IMSR_JAX:004194 |
| Antibody | Alexa Fluor 700-conjugated anti CD45.2 (104) | BD Biosciences | Cat# 560693 |
| Antibody | Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD25 (PC61) | BD Biosciences | Cat# 561048 |
| Antibody | Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD44 (IM7) | BD Biosciences | Cat# 561862 |
| Antibody | Brilliant Violet (BV) 421-conjugated anti Ly-6C (AL-21) | BD Biosciences | Cat# 562727 |
| Antibody | BV 510-conjugated anti-CD4 (RM4-5) | BD Biosciences | Cat# 563106 |
| Antibody | BV 786-conjugated anti-CD25 (PC61) | BD Biosciences | Cat# 564023 |
| Antibody | Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD25 (PC61) | BD Biosciences | Cat# 561065 |
| Antibody | Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD69 (H1.2F3) | BD Biosciences | Cat# 553237 |
| Antibody | Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Izumo1r (TH6) | BD Biosciences | Cat# 560320 |
| Antibody | Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-TCRgd (GL3) | BD Biosciences | Cat# 553178 |
| Antibody | Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Vb5.1/5.2 (MR9-4) | BD Biosciences | Cat# 553190 |
| Antibody | PE-Cy7-conjugated anti-CD44 (IM7) | BD Biosciences | Cat# 560569 |
| Antibody | PE-Cy7-conjugated anti-CD45.1 (A20) | BD Biosciences | Cat# 560578 |
| Antibody | Biotinylated anti-CD5 (53-7,3) | BD Biosciences | Cat# 553019 |
| Antibody | Biotinylated anti-CD62L (MEL14) | BD Biosciences | Cat# 553149 |
| Antibody | Biotinylated anti-Ly-6C (AL-21) | BD Biosciences | Cat# 557359 |

Continued on next page

Continued

| Reagent type (species) or resource | Designation | Source or reference | Identifiers |
|------------------------------------|--|---|---|
| Antibody | Biotinylated anti-Sca1 (E13-161.7) | BD Biosciences | Cat# 553334 |
| Antibody | Alexa Fluor 647-conjugated anti-IL18ra (BG/IL18ra) | BioLegend | Cat# 132903 |
| Antibody | APC-conjugated streptavidin | BioLegend | Cat# 405207 |
| Antibody | BV 421-conjugated anti-Ly-6C (HK1.4) | BioLegend | Cat# 128032 |
| Antibody | PE-conjugated anti-Ly-6C (HK1.4) | BioLegend | Cat# 128008 |
| Antibody | Alexa 448-conjugated anti-NFAT2 (7A6) | BioLegend | Cat# 649603 |
| Antibody | Alexa 448-conjugated anti-NFAT1 (D43B1) | Cell Signaling | Cat# 14324 |
| Antibody | PE-conjugated anti-CD200 (OX-90) | eBioscience | Cat# 12-5200-82 |
| Antibody | PE-conjugated anti-Ikzf3 (8B2) | eBioscience | Cat# 12-5789-80 |
| Antibody | PE-conjugated anti-Nur77 (12.14) | eBioscience | Cat# 12-5965-82 |
| Antibody | PerCP-Cy5.5-conjugated anti-TCRb (H57-597) | eBioscience | Cat# 45-5961-82 |
| Antibody | Biotinylated anti-CD73 (eBioTY/11.8) | eBioscience | Cat# 14-0731-82 |
| Antibody | APC-conjugated anti-Foxp3 (FJK-165) | eBioscience | Cat# 12-5773-82 |
| Antibody | PE-conjugated anti-Foxp3 (FJK-165) | eBioscience | Cat# 17-5773-82 |
| Antibody | Pacific Blue-conjugated streptavidin | Invitrogen | Cat# S11222 |
| Antibody | APC-Vio770-conjugated anti-CD8a (53-6.7) | Miltenyi Biotec | Cat# 130-102-305 |
| Antibody | PE-conjugated anti-CD122 (TM-b1) | Miltenyi Biotec | Cat# 130-102-569 |
| Chemical compound, drug | Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) | Calbiochem | CAS 16561-29-8 |
| Chemical compound, drug | FK506 (tacrolimus) | Sigma Aldrich | CAS 109581-93-3 |
| Chemical compound, drug | CellTrace Violet | Invitrogen | Cat# C34557 |
| Chemical compound, drug | CellTrace Far Red | Invitrogen | Cat# C34564 |
| Chemical compound, drug | Recombinant Mouse IL-7 | R and D Systems | Cat# 407 ML-025 |
| Chemical compound, drug | Thapsigargin | Calbiochem | CAS 67526-95-8 |
| Chemical compound, drug | TGFβ1 | Invitrogen | Cat# PHG9204 |
| Chemical compound, drug | DRAQ5 | Cell Signaling | Cat# 4084 |
| Chemical compound, drug | Indo-1, AM | Invitrogen | Cat# I1223 |
| Software, algorithm | Illustrator CS5 | Adobe Systems Inc. | http://www.graphpad.com |
| Software, algorithm | GeneChip Scanner 3000 7G | Affymetrix | N/A |
| Software, algorithm | Expression Console | Affymetrix | https://imagej.nih.gov/ij/ |
| Software, algorithm | DIVA8.0.1 | BD Biosciences | N/A |
| Software, algorithm | R | Bioconductor | N/A |
| Software, algorithm | Prism 7 | GraphPad | N/A |
| Software, algorithm | ImageJ | NIH | https://www.bioconductor.org/ |
| Software, algorithm | Partek Genomics Suite | Partek | N/A |
| Deposited data | GSE14308 | Wei et al. (2009) , PMID: 19144320 | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE14308 |

Continued on next page

Continued

| Reagent type (species) or resource | Designation | Source or reference | Identifiers |
|------------------------------------|-------------|---|---|
| Deposited data | GSE42276 | <i>Wakamatsu et al. (2013)</i> , PMID: 23277554 | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE42276 |
| Deposited data | GSE67464 | <i>Bevington et al., 2016</i> , PMID: 26796577 | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE67464 |
| Deposited data | GSE70154 | <i>Richards et al. (2015)</i> , PMID: 26195815 | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70154 |
| Deposited data | GSE62532 | <i>Vahl et al. (2014)</i> , PMID: 25464853 | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE62532 |
| Deposited data | GSE97477 | This paper | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE97477 |

Mice

C57BL/6 mice (CD45.2) were obtained from Charles River Laboratories. C57BL/6 CD45.1 mice were maintained in our own animal facilities, under specific pathogen-free conditions. C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice (*Wang et al., 2008*), initially obtained from Dr Bernard Malissen, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, France, were crossed with C57BL/6 CD45.1 mice to generate C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 and CD45.1/.2 mice. C57BL/6 OT-II mice were obtained from Charles River Laboratories and crossed with C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 (or CD45.2) mice to generate C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1/.2 (or CD45.2) OT-II mice. Four- to 12-week-old mice were used for all experiments. Experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department. All procedures performed were approved by the Paris-Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation (decision CEEA34.CA.080.12). Sample sizes were chosen to ensure the reproducibility of the experiments and according to the 3Rs of animal ethics regulation.

Cell suspensions

Peripheral Lymph Nodes (pLNs), mesenteric Lymph Nodes (mLNs), Peyer's patches, spleen and thymus were homogenized and passed through a nylon cell strainer (BD Falcon) in PBS supplemented with 10% FCS (Biochrom) for adoptive transfer or cell culture (LNs only), or in 5% FCS and 0.1% Na₃N (Merck-Sigma-Aldrich, Lyon, France) in PBS for flow cytometry.

Adoptive transfer of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells

CD4 T cells were purified from LNs (pooled superficial cervical, axillary, brachial, inguinal and mLNs) of C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice by incubating cell suspensions on ice for 15 min with a mixture of anti-CD8 (53–6.7), anti-CD19 (1D3) and anti-Ter-119 antibodies (Abs) obtained from hybridoma supernatants, and then with magnetic beads coupled to anti-rat immunoglobulins (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were sorted as Foxp3-GFP⁻ Lineage (CD25, TCRγδ, CD8β, CD11b, CD11c)-PE⁻ CD44^{-/lo} Ly-6C⁻ cells using a FACS-ARIA3 flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and injected intravenously into sex-matched recipient mice whose then were injected intraperitoneally every day for two weeks with 2.5 mg/kg of Prograf (Tacrolimus; Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan).

Adoptive transfer of OT-II CD4 T_N cells

CD4 T cells were purified from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP OT-II CD45.2 or CD45.1/.2 mice by using Dynabeads Untouched Mouse CD4 Cells Kit (Invitrogen) and cultivated with recombinant mouse IL-7 (10 ng/ml; R and D Systems, Minneapolis, MN) with or without Thapsigargin (4 nM; Merck-Sigma-Aldrich) into 96-well round-bottom treated cell culture microplate (Corning; 1 × 10⁵ cells per well). After 5 days of culture, cells were recovered and labelled with PE-conjugated anti-TCRγδ (GL3), anti-CD8.b2 (53–5.8), anti-NK-1.1 (PK136) and APC-conjugated anti-CD44 (IM7), all from BD Biosciences. OT-II CD4 T_N cells were sorted as GFP⁻ Lineage-PE⁻ CD44^{-/lo} cells using a FACS-ARIA3 flow cytometer (BD Biosciences) and 0.5 to 1 × 10⁶ cells were injected intravenously into sex-matched C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice. Recipient mice were then continuously fed with Albumin from chicken egg white (OVA; 1.5% w/v; Merck-Sigma-Aldrich) in the drinking water or not. LNs and spleens were

collected at day seven and CD45.2⁺ CD4 T cells analyzed. In a second protocol, sorted CD4 T_N cells from CD45.2⁺ and CD45.1/2⁺ C57BL/6 Foxp3-GFP OT-II mice were cultured in IL-7 (10 ng/ml) with or without TG (4 nM), respectively. After 5 days live CD4 T_N (CD44^{lo} CD25^{lo} CD8^β⁻ CD11b⁻ CD11c⁻ NK1.1⁻ TCRγδ⁻ Foxp3-GFP⁺) cells were flow-cytometry sorted, mixed at a 1:1 ratio and injected intravenously (0.5–1 × 10⁶ cells) into sex-matched CD45.1⁺ C57BL/6 Foxp3-GFP recipient mice gavaged with Ovalbumin (OVA; 50 mg) 4 and 24 hr later. LNs and spleens were collected at day 10 and donor-derived CD4 T cells were analyzed.

Cell surface staining and flow cytometry

Cell suspensions were collected and dispensed into 96-well round-bottom microtiter plates (Greiner Bioscience; 6 × 10⁶ cells per well). Surface staining was performed by incubating the cells on ice, for 15 min per step, with Abs in 5% FCS and 0.1% NaN₃ in PBS. Each cell-staining reaction was preceded by a 15 min incubation with a purified anti-mouse CD16/32 Abs (FcγRII/III block; 2.4G2) obtained from hybridoma supernatants.

Alexa Fluor 700-conjugated anti CD45.2 (104), Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD25 (PC61) and anti-CD44 (IM7), Brilliant Violet (BV) 421-conjugated anti Ly-6C (AL-21), BV 510-conjugated anti-CD4 (RM4-5), BV 786-conjugated anti-CD25 (PC61), Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD25 (PC61), anti-CD69 (H1.2F3), anti-Izumo1r (TH6), anti-TCRγδ (GL3) and anti-Vβ5.1/5.2 (MR9-4), PE-Cy7-conjugated anti-CD44 (IM7) and anti-CD45.1 (A20), biotinylated anti-CD5 (53–7.3), anti-CD62L (MEL14), anti-Ly-6C (AL-21) and anti-Sca1 (E13-161.7) were obtained from BD Biosciences. Alexa Fluor 647-conjugated anti-IL18α (BG/IL18α), APC-conjugated streptavidin, BV 421-conjugated anti-Ly-6C (HK1.4) and PE-conjugated anti-Ly-6C (HK1.4) were obtained from BioLegend (London, United Kingdom). PE-conjugated anti-CD200 (OX-90), anti-Ikzf3 (8B2) and anti-Nur77 (12.14), PerCP-Cy5.5-conjugated anti-TCRβ (H57-597) and biotinylated anti-CD73 (eBioTY/11.8) were obtained from eBioscience (Montrouge, France). Pacific Blue-conjugated streptavidin was obtained from Invitrogen. APC-Vio770-conjugated anti-CD8α (53–6.7) and PE-conjugated anti-CD122 (TM-β1) were obtained from Miltenyi Biotec.

Multi-colour immunofluorescence was analyzed using BD-LSR2 and BD-FORTESSA (BD Biosciences) flow-cytometers. List-mode data files were analyzed using Diva software (BD Biosciences). Data acquisition and cell sorting were performed on the Cochin Immunobiology facility.

Intracellular calcium measurement

Ex vivo purified CD4 T cells or cells recovered after 5 days of culture were loaded for 30 min at 37°C with the membrane-permeable fluorescent Ca²⁺ indicator dye Indo-1 AM (Invitrogen) at a concentration of 1 μM. Cells were stained either in HBSS (for ex-vivo-purified CD4 T cells) or directly in the culture medium (cultured cells). Thereafter, ex-vivo-purified CD4 T cells were stained for surface markers and kept on ice. Before acquisition, cell aliquots were allowed to equilibrate to 37°C for 5 min and then were analyzed by flow cytometry. After acquisition of background intracellular Ca²⁺ concentrations for 2 min, cells were stimulated with Thapsigargin (at a concentration of 4 or 200 nM).

Cell culture and in vitro polarization assays

Flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were stained with CellTrace Violet (CTv; 5 μM; Life Technologies) and cultured with IL-7 (10 ng/ml) alone or in combination with Thapsigargin (TG; 4 nM), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 1.25 ng/ml), PMA +TG (1.25 ng/ml and 4 nM, respectively) and immobilized anti-CD3 (clone 145.2C11; 4 μg/ml; obtained from hybridoma supernatants) and anti-CD28 (clone 37.51; eBioscience; 4 μg/ml) Abs. For in vitro polarization assays Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were additionally stained with CellTrace Far Red (CTfr; 1.25 μM; Life Technologies). Cells were then stimulated separately or together for 4 days with coated anti-CD3 and anti-CD28 Abs, in the presence of graded concentrations of exogenous recombinant human TGFβ1 (Invitrogen). In some experiments, anti-IFN-γ (clone R4-6A2; 10 μg/ml) and anti-IL-4 (clone 11B11; 10 μg/ml) blocking antibodies were added in the culture.

The concentration of TGFβ needed to obtain 50% of the maximal percentage of iTreg cells (Effective Concentration, EC50) was calculated by fitting the dose-response curves of CD4 T_N-cell subsets in the different culture conditions. To this end, the means of 3 to 5 independent experiments were

used to build dose response curves using nonlinear least-squares regression to the Hill equation. The model used for this function was $Y = [B + (T - B)] / [1 + 10^{(LogEC50 - X) * HillSlope}]$, where 'Y' represents Foxp3⁺ cells as a percentage among CD4⁺ cells, 'T' and 'B' represent the plateaus at the beginning and end of the curve, respectively, and 'X' represents the concentration of TGFβ added at the beginning of the culture. The absolute EC50 was calculated to interpolate X at 50% with 95% confidence intervals.

Cytokine multiplex assay

Flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were stimulated as described above with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence or absence of exogenous recombinant human TGFβ1 (Invitrogen, 4 μg/mL). Supernatants were recovered 24 hr later and cytokines were quantified by MSD multi-array U-PLEX assays (IFN-γ, IL-4, IL-17A/F and IL-10; Meso Scale Discovery, Rockville, MD) according to the manufacturer's instructions.

Imaging flow cytometry

LNs cells of C57BL/6 mice were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde, immediately or after 30 min of resting or stimulation with 200 nM of Thapsigargin in RPMI 1640 Glutamax (Gibco). Cells were washed in 1% FCS and 0.1% NaN₃ in PBS and incubated in glycine (0.1M) for 10 min. Cell surface was stained with biotinylated anti-Ly-6C (AL-21), BV 510-conjugated anti-CD4 (RM4-5), PE-conjugated anti-CD25 (PC61), anti-TCRγδ (GL3), anti-CD8.β2 (53–5.8), anti-NK-1.1 (PK136), anti-CD11b (M1/70), PE-Cy7-conjugated anti-CD44 (IM7) and PerCp-Cy5.5-conjugated streptavidin, all from BD Biosciences. Intracellular stainings were performed using Foxp3 Staining kit (eBioscience) and Alexa 448-conjugated anti-NFAT1 (D43B1; Cell Signaling, Leiden, The Netherlands) or anti-NFAT2 (7A6; BioLegend) and APC-conjugated anti-Foxp3 (FJK-165; eBioscience) Abs were used. Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were sorted as CD4-BV510⁺ Lineage-PE⁻ CD44^{-/lo} Foxp3-APC⁻ Ly-6C^{+/-} cells using a FACS-ARIA3 flow cytometer (BD Biosciences). After sort, DRAQ5 (Cell Signaling) was used to stain nuclei. Cells were acquired with ImageStreamX (Amnis; EMD Millipore) and analyzed with IDEAS software. NFAT1 and NFAT2 nuclear localization was calculated as the similarity score between NFAT and DRAQ5 intensities.

Microarray

CD4 T cells from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were enriched as described above. Then, Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were flow-cytometry sorted as CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺ GFP⁻ CD25⁻ CD44^{-/lo} cells using a FACS-ARIA3 flow cytometer. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). RNA quality was validated with Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit). Experimental and analytical part of the microarray analysis was performed according to the MIAME standards. Amplified, fragmented and biotinylated sense-strand DNA targets were synthesized from 50 ng total RNA according to the manufacturer's protocol (Ovation PicoSL WTA System V2 and Encore Biotin Module kit (Nugen, Leek, The Netherlands)) and hybridized to a mouse gene 2.0 ST array (Affymetrix, Paris, France). The stained chips were read and analysed with a GeneChip Scanner 3000 7G and Expression Console software (Affymetrix). Raw data (.cel files) were then processed and normalized using the quantile normalization method in RMA with R package (Bioconductor). Statistical analysis was then performed with Partek Genomics Suite software (Partek). Gene expression was z-transformed, for visualization, using the following formula: $z = (X - \mu) / \tau$, with X = normalized intensity, μ = mean of the normalized intensity across replicates and τ = s.d. of mean of the normalized intensity across replicates. Experimental and analytical part of the microarray was performed on the Cochin Genomic facility. Raw and processed data microarray data are provided in the Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE97477.

Comparison with public GEO datasets

Normalized microarray datasets (GSE14308, GSE42276, GSE67464, GSE70154 and GSE62532) were recovered from NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). For each datasets the values mean of Probeset with the same Gene-id was performed to generate a file (.xlsx) with a unique value per Gene-id for each sample. These files were then statistical analyzed as described above. The newly created public GEO Datasets were then aligned with our microarray

data by keeping only the commons Gene-id. Finally, these alignment files were filtered on our data for a p-value < 0.05 and a fold change > 1.3 and the differential expression of genes was compared between our and public GEO microarray.

Acknowledgements

We greatly acknowledge E Maillard, K Labroquère and M Andrieu from the Cochin Cytometry and Immunobiology (CYBIO) facility, S Jacques and F Letourneur from the Cochin Genomic (GENOM'IC) facility and P Bourdoncle and B Durel from the Cochin Imaging (IMAG'IC) facility. This work was supported by grants from the 'Fondation pour la Recherche Médicale' (FRM team), the 'Ligue contre le Cancer', the 'Association pour la Recherche sur le Cancer' and the 'Agence nationale de la recherche' (grant number ANR-15-CE15-0009-01). V Guichard was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of National Education, Research, and Technology. A Audemard-Verger was supported by a PhD fellowship from the 'Ligue contre le Cancer' and from INSERM. We would like to thank B Salomon, A Boissonnas, C Combadière, C Randriamanpita, A Trautmann, G Bismuth, E Donnadiou and G Eberl for providing tools and/or advices.

Additional information

Funding

| Funder | Grant reference number | Author |
|---|------------------------|--|
| Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale | | Nelly Bonilla Alexandra Audemard-Verger Thomas Guilbert Bruno Martin Bruno Lucas Cédric Auffray |
| Agence Nationale de la Recherche | ANR-15-CE15-0009-01 | Cédric Auffray |
| Fondation pour la Recherche Médicale | | Bruno Lucas |
| Ligue Contre le Cancer | | Alexandra Audemard-Verger |

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Vincent Guichard, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft, Writing—review and editing; Nelly Bonilla, Aurélie Durand, Alexandra Audemard-Verger, Investigation, Methodology; Thomas Guilbert, Software, Investigation; Bruno Martin, Funding acquisition, Validation, Investigation; Bruno Lucas, Conceptualization, Data curation, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing—review and editing; Cédric Auffray, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

Author ORCIDs

Vincent Guichard  <http://orcid.org/0000-0003-0206-4924>

Cédric Auffray  <http://orcid.org/0000-0002-1012-0132>

Ethics

Animal experimentation: Experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department. All procedures performed were approved by the Paris-Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation (decision CEEA34.CA.080.12). Sample sizes were chosen to ensure the reproducibility of the experiments and according to the 3Rs of animal ethics regulation.

Decision letter and Author responseDecision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.031>Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.032>**Additional files****Supplementary files**

- Transparent reporting form

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.017>**Major datasets**

The following dataset was generated:

| Author(s) | Year | Dataset title | Dataset URL | Database, license, and accessibility information |
|--|------|---|---|---|
| Guichard V, Bonilla N, Durand A, Audemard-Verger A, Guilbert T, Martin B, Lucas B, Auffray C | 2017 | Calcium-mediated shaping of naive CD4 T cell phenotype and function | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE97477 | Publicly available at the NCBI Gene Expression Omnibus (accession no. GSE97477) |

The following previously published datasets were used:

| Author(s) | Year | Dataset title | Dataset URL | Database, license, and accessibility information |
|--|------|--|---|---|
| Wei L, Wei G, Zhu J, Hu-Li J, O'Shea JJ, Zhao K | 2009 | Epigenetic Mechanisms Underlie T Cell Plasticity | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE14308 | Publicly available at the NCBI Gene Expression Omnibus (accession no. GSE14308) |
| Wakamatsu E, Mathis D, Benoist C | 2012 | Gene expression profile of conventional T cells (Tconv) and regulatory T cells (Treg) stimulated with anti-costimulatory molecule antibodies | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE42276 | Publicly available at the NCBI Gene Expression Omnibus (accession no. GSE42276) |
| Bevington S, Cauchy P, Jason P, Elizabeth B, Naveen L, Ott S, Bonifer C, Cockerill P | 2016 | Defining the molecular mechanisms underlying immunological memory in T cells (expression) | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE67464 | Publicly available at the NCBI Gene Expression Omnibus (accession no. GSE67464) |
| Richards DM, Hofer A, Feuerer M | 2015 | The contained self-reactive peripheral T cell repertoire: size, diversity and cellular composition | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70154 | Publicly available at the NCBI Gene Expression Omnibus (accession no. GSE70154) |
| Vahl JC, Schallenberg S, Buch T, Kretschmer K, Schmidt-Supprian M | 2014 | Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE62532 | GSE62532 |

References

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**:787–793. DOI: <https://doi.org/10.1038/383787a0>, PMID: 8893001
- Azzam HS, Grinberg A, Lui K, Shen H, Shores EW, Love PE. 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of Experimental Medicine* **188**:2301–2311. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2301>, PMID: 9858516
- Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN. 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* **25**:989–1001. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.011>, PMID: 17112751

- Barnden MJ**, Allison J, Heath WR, Carbone FR. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and Cell Biology* **76**:34–40. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1998.00709.x>, PMID: 9553774
- Bautista JL**, Lio CW, Lathrop SK, Forbush K, Liang Y, Luo J, Rudensky AY, Hsieh CS. 2009. Intraclonal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. *Nature Immunology* **10**:610–617. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.1739>, PMID: 19430476
- Bevington SL**, Cauchy P, Piper J, Bertrand E, Lalli N, Jarvis RC, Gilding LN, Ott S, Bonifer C, Cockerill PN. 2016. Inducible chromatin priming is associated with the establishment of immunological memory in T cells. *The EMBO Journal* **35**:515–535. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.201592534>, PMID: 26796577
- Bilate AM**, Lafaille JJ. 2012. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual review of immunology* **30**:733–758. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075043>, PMID: 22224762
- Coombes JL**, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine* **204**:1757–1764. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20070590>, PMID: 17620361
- Corse E**, Gottschalk RA, Allison JP. 2011. Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses. *The Journal of Immunology* **186**:5039–5045. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003650>, PMID: 21505216
- Delpoux A**, Poitrasson-Rivière M, Le Campion A, Pommier A, Yakonowsky P, Jacques S, Letourneur F, Randriamampita C, Lucas B, Auffray C. 2012. Foxp3-independent loss of regulatory CD4+ T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation. *European Journal of Immunology* **42**:1237–1249. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201142148>, PMID: 22539296
- Dorfman JR**, Stefanová I, Yasutomo K, Germain RN. 2000. CD4+ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nature Immunology* **1**:329–335. DOI: <https://doi.org/10.1038/79783>, PMID: 11017105
- Fontenot JD**, Gavin MA, Rudensky AY. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* **4**:330–336. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni904>, PMID: 12612578
- Francis RS**, Feng G, Tha-In T, Lyons IS, Wood KJ, Bushell A. 2011. Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells. *European Journal of Immunology* **41**:726–738. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201040509>, PMID: 21243638
- Gottschalk RA**, Corse E, Allison JP. 2010. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **207**:1701–1711. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20091999>, PMID: 20660617
- Gowans JL**. 1959. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *The Journal of Physiology* **146**:54–69. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006177>, PMID: 13655215
- Haribhai D**, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, Ziegelbauer J, Yassai M, Li SH, Relland LM, Wise PM, Chen A, Zheng YQ, Simpson PM, Gorski J, Salzman NH, Hessner MJ, Chatila TA, Williams CB. 2011. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* **35**:109–122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.029>, PMID: 21723159
- Hashimoto Y**, Soderling TR. 1989. Regulation of calcineurin by phosphorylation. Identification of the regulatory site phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry* **264**:16524–16529. PMID: 2550447
- Henderson JG**, Opejin A, Jones A, Gross C, Hawiger D. 2015. CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity* **42**:471–483. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.010>, PMID: 25786177
- Hochweller K**, Wabnitz GH, Samstag Y, Suffner J, Hämmerling GJ, Garbi N. 2010. Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *PNAS* **107**:5931–5936. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0911877107>, PMID: 20231464
- Hogan PG**, Lewis RS, Rao A. 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual Review of Immunology* **28**:491–533. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132550>, PMID: 20307213
- Hori S**, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**:1057–1061. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1079490>, PMID: 12522256
- Ivanov II**, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. 2006. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**:1121–1133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>, PMID: 16990136
- Jones A**, Bourque J, Kuehm L, Opejin A, Teague RM, Gross C, Hawiger D. 2016. Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity* **45**:1066–1077. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.008>, PMID: 27793593
- Josefowicz SZ**, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, Umetsu DT, Rudensky AY. 2012. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* **482**:395–399. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10772>, PMID: 22318520
- Lathrop SK**, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, Peterson DA, Stappenbeck TS, Hsieh CS. 2011. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* **478**:250–254. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10434>, PMID: 21937990

- Leung MW**, Shen S, Lafaille JJ. 2009. TCR-dependent differentiation of thymic Foxp3+ cells is limited to small clonal sizes. *The Journal of Experimental Medicine* **206**:2121–2130. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20091033>, PMID: 19737865
- Levine AG**, Arvey A, Jin W, Rudensky AY. 2014. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nature Immunology* **15**:1070–1078. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.3004>, PMID: 25263123
- Liang SC**, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of Experimental Medicine* **203**:2271–2279. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20061308>, PMID: 16982811
- Lo WL**, Felix NJ, Walters JJ, Rohrs H, Gross ML, Allen PM. 2009. An endogenous peptide positively selects and augments the activation and survival of peripheral CD4+ T cells. *Nature Immunology* **10**:1155–1161. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.1796>, PMID: 19801984
- Mandl JN**, Monteiro JP, Vrsekooop N, Germain RN. 2013. T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* **38**:263–274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.011>, PMID: 23290521
- Martin B**, Auffray C, Delpoux A, Pommier A, Durand A, Charvet C, Yakonowsky P, de Boysson H, Bonilla N, Audemard A, Sparwasser T, Salomon BL, Malissen B, Lucas B. 2013. Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nature Communications* **4**:2209. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms3209>, PMID: 23900386
- Martin B**, Bourgeois C, Dautigny N, Lucas B. 2003. On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4+ T cells. *PNAS* **100**:6021–6026. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1037754100>, PMID: 12719530
- Martin B**, Bécourt C, Bienvenu B, Lucas B. 2006. Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* **108**:270–277. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0017>, PMID: 16527889
- Mempel TR**, Henrickson SE, Von Andrian UH. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**:154–159. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02238>, PMID: 14712275
- Moran AE**, Holzapfel KL, Xing Y, Cunningham NR, Maltzman JS, Punt J, Hogquist KA. 2011. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *The Journal of Experimental Medicine* **208**:1279–1289. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20110308>, PMID: 21606508
- Mosmann TR**, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* **136**:2348–2357. PMID: 2419430
- Mucida D**, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *Journal of Clinical Investigation* **115**:1923–1933. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI24487>, PMID: 15937545
- Persaud SP**, Parker CR, Lo WL, Weber KS, Allen PM. 2014. Intrinsic CD4+ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nature Immunology* **15**:266–274. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2822>, PMID: 24487322
- Reither G**, Schaefer M, Lipp P. 2006. PKC α : a versatile key for decoding the cellular calcium toolkit. *The Journal of Cell Biology* **174**:521–533. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200604033>, PMID: 16893971
- Richards DM**, Ruggiero E, Hofer AC, Sefrin JP, Schmidt M, von Kalle C, Feuerer M. 2015. The Contained self-reactive peripheral t cell repertoire: Size, diversity, and cellular composition. *The Journal of Immunology* **195**:2067–2079. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500880>, PMID: 26195815
- Rogers PR**, Croft M. 1999. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *Journal of Immunology* **163**:1205–1213. PMID: 121328
- Samstein RM**, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY. 2012. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* **150**:29–38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.031>, PMID: 22770213
- Stefanová I**, Dorfman JR, Germain RN. 2002. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* **420**:429–434. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature01146>, PMID: 12459785
- Stritesky GL**, Jameson SC, Hogquist KA. 2012. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annual Review of Immunology* **30**:95–114. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075035>, PMID: 22149933
- Sun CM**, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of Experimental Medicine* **204**:1775–1785. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20070602>, PMID: 17620362
- Szabo SJ**, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**:655–669. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3), PMID: 10761931
- Takada K**, Jameson SC. 2009. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nature Reviews Immunology* **9**:823–832. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri2657>, PMID: 19935802
- Tanchot C**, Lemonnier FA, Pérarnau B, Freitas AA, Rocha B. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* **276**:2057–2062. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2057>, PMID: 9197272

- Turner MS**, Kane LP, Morel PA. 2009. Dominant role of antigen dose in CD4+Foxp3+ regulatory T cell induction and expansion. *The Journal of Immunology* **183**:4895–4903. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901459>, PMID: 19801514
- Vahl JC**, Drees C, Heger K, Heink S, Fischer JC, Nedjic J, Ohkura N, Morikawa H, Poeck H, Schallenberg S, Rieß D, Hein MY, Buch T, Polic B, Schönle A, Zeiser R, Schmitt-Gräff A, Kretschmer K, Klein L, Korn T, et al. 2014. Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool. *Immunity* **41**:722–736. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.012>, PMID: 25464853
- Wakamatsu E**, Mathis D, Benoist C. 2013. Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells. *PNAS* **110**:1023–1028. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1220688110>, PMID: 23277554
- Wang Y**, Kissenpfennig A, Mingueneau M, Richelme S, Perrin P, Chevrier S, Genton C, Lucas B, DiSanto JP, Acha-Orbea H, Malissen B, Malissen M. 2008. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* **180**:1565–1575. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1565>, PMID: 18209052
- Wei G**, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, Cui K, Kanno Y, Roh TY, Watford WT, Schones DE, Peng W, Sun HW, Paul WE, O'Shea JJ, Zhao K. 2009. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* **30**:155–167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.12.009>, PMID: 19144320
- Wood KJ**, Bushell A, Hester J. 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nature Reviews Immunology* **12**:417–430. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3227>, PMID: 22627860
- Wülfing C**, Sumen C, Sjaastad MD, Wu LC, Dustin ML, Davis MM. 2002. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nature Immunology* **3**:42–47. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni741>, PMID: 11731799
- Ye P**, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of Experimental Medicine* **194**:519–528. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.194.4.519>, PMID: 11514607
- Zheng W**, Flavell RA. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**:587–596. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80240-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80240-8), PMID: 9160750



Figures and figure supplements

Calcium-mediated shaping of naive CD4 T-cell phenotype and function

Vincent Guichard *et al*

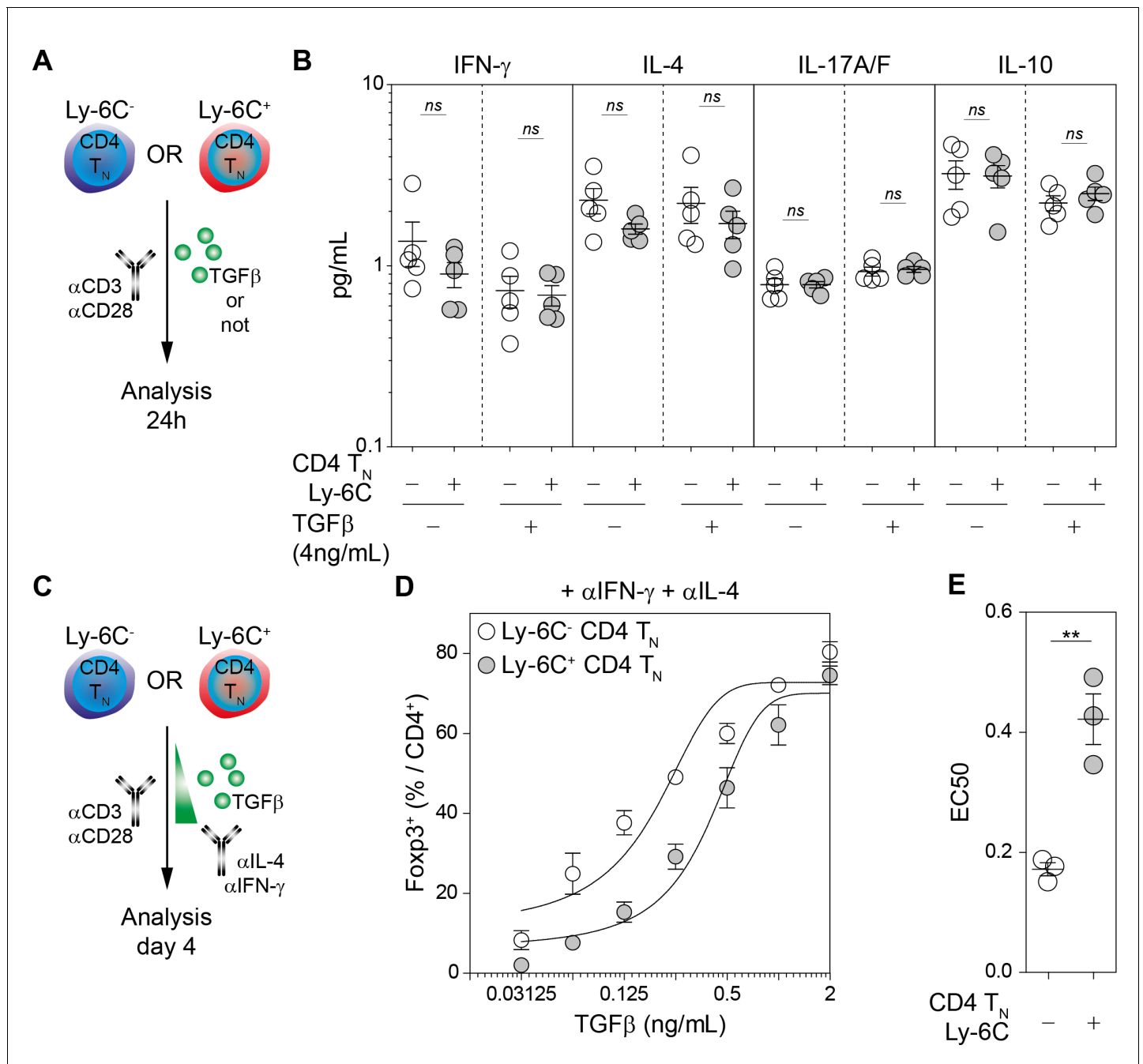


Figure 1—figure supplement 1. Cytokine-independent enhanced ability of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to commit into iTreg cells. (A–B) Flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were stimulated separately with coated αCD3 and αCD28 Abs (4 μg/mL), in the presence of TGFβ1 (4 ng/mL) or not. 24 hr later, culture supernatants were collected and analyzed for the presence of interferon-gamma (IFN-γ) and interleukins (IL) –4, –17A/F and –10. (A) Diagram illustrating the experimental protocol. (B) IFN-γ, IL-4, IL-17A/F and IL-10 concentrations in the culture supernatants of both Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells after 24 hr culture are shown. (C–E) Flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 mice were stimulated separately with coated αCD3 and αCD28 Abs (4 μg/mL), in the presence of αIFN-γ and αIL-4 blocking antibodies and graded doses of TGFβ1. (C) Diagram illustrating the experimental protocol. (D) Proportions of Foxp3⁺ cells among CD4⁺ cells are shown as a function of TGFβ1 concentration. Mean ± s.e.m. of two independent experiments are shown. (E) Concentrations of TGFβ1 needed to obtain 50% of the maximal percentages of iTreg-cell polarization (EC50) were calculated for each CD4 T_N-cell subset in separated or mixed cultures. Each dot represents an independent experiment. Significance of differences were assessed using a two-tailed paired Student's t-test. Values of p<0.05 were considered as statistically significant (**p<0.01; ns, not significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.004>

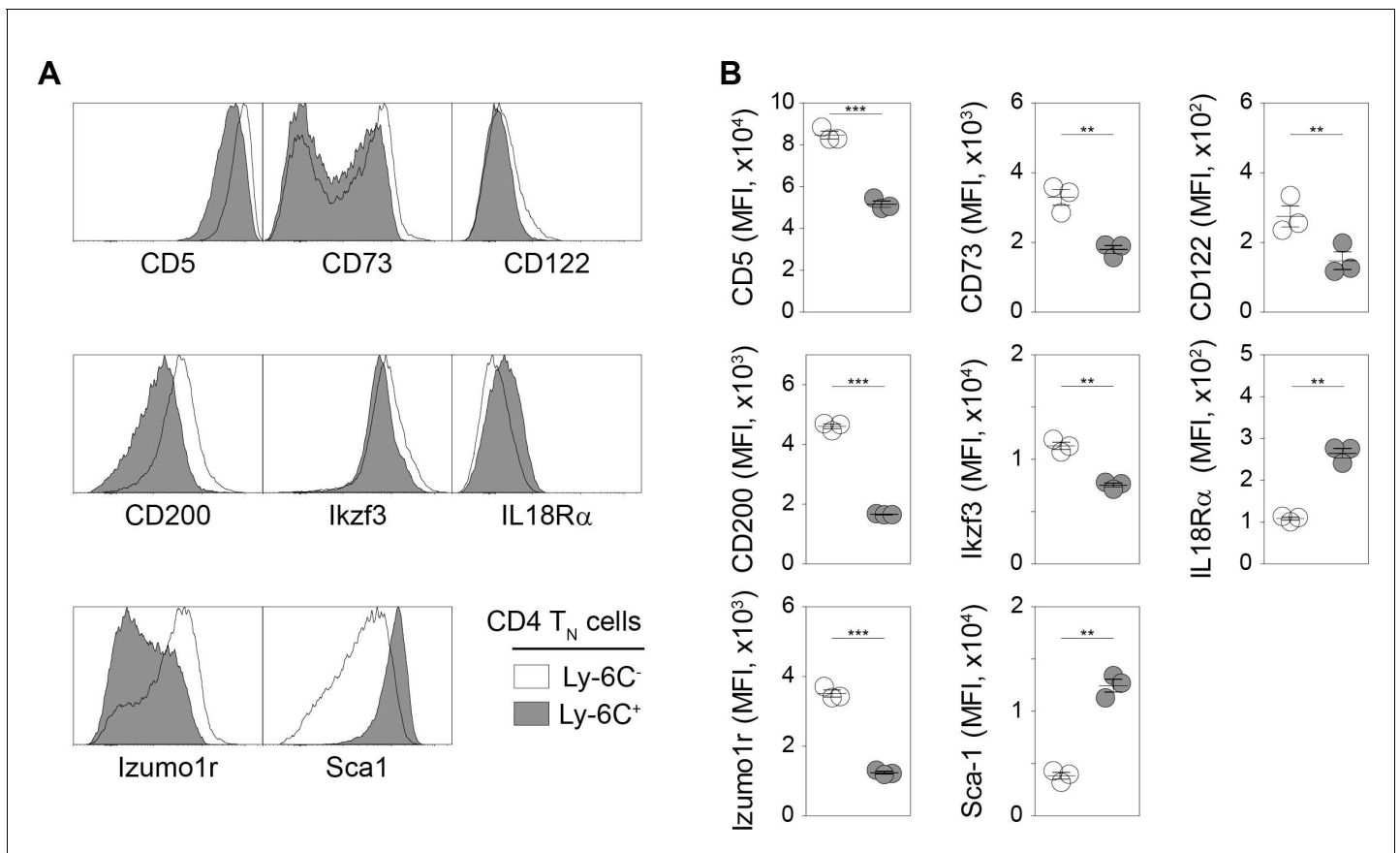


Figure 2—figure supplement 1. Validation of the 6CSign at the protein level. (A–B) CD5, CD73, CD122, CD200, Ikzf3, IL18R α , Izumo1r and Sca-1 expression at the cell surface of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells was analysed by FACS. (A) Fluorescence histograms of gated Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N (CD4⁺ CD8 α ⁻ TCR β ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP) cells recovered from pLNs are shown for a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. (B) Mean fluorescence intensities (MFIs) are shown as means \pm s.e.m. for a representative experiment. Each dot represents an individual mouse.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.006>

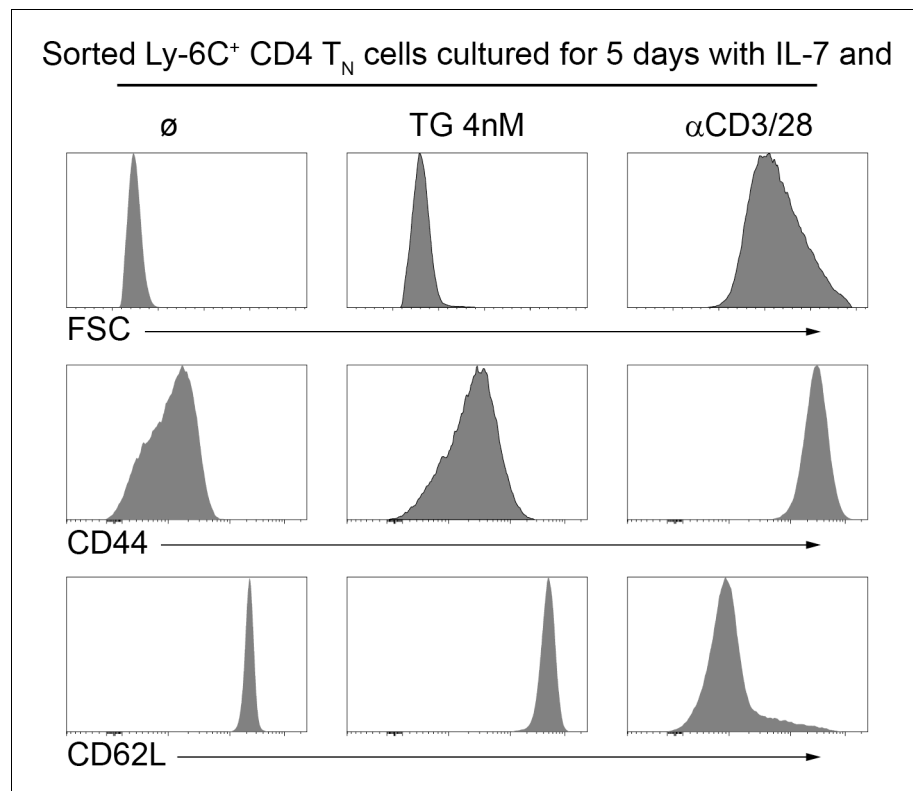


Figure 4—figure supplement 1. 'Ca²⁺-converted' Ly-6C⁺CD4 T_N cells keep a naive phenotype. Flow-cytometry sorted Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were cultured in IL-7 (10 ng/mL) alone or in the presence of TG (4 nM) or αCD3 and αCD28 coated antibodies (4 μg/mL). After 5 days, cells were analyzed for their forward scatter profile (FSC) and their expression of CD44 and CD62L.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.009>

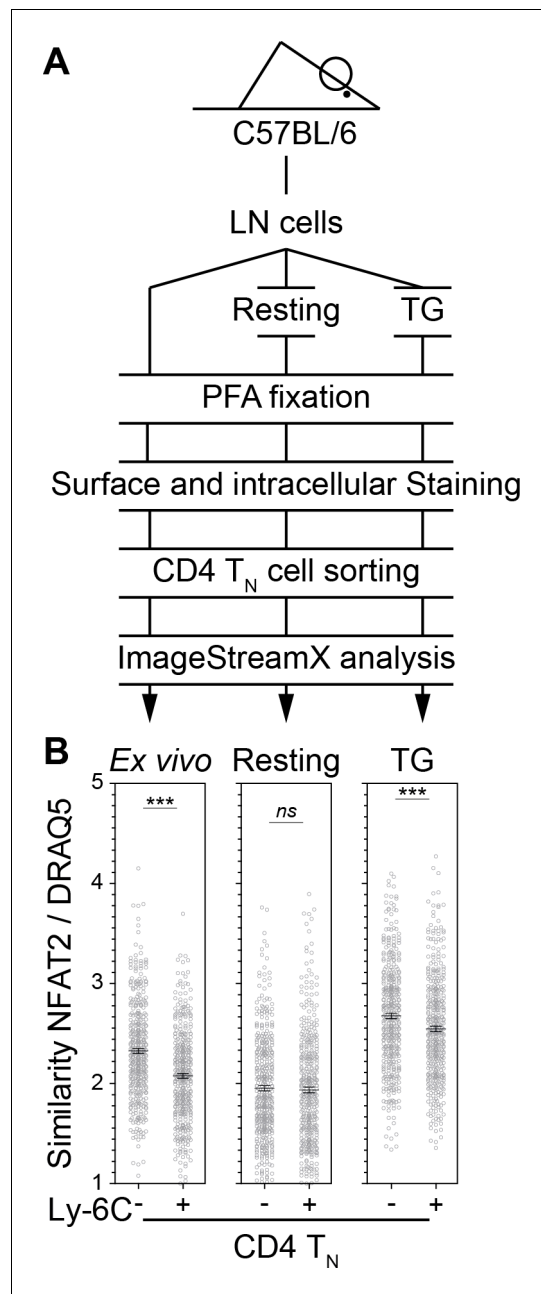


Figure 4—figure supplement 2. NFAT2 localization is more nuclear in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells than in their Ly-6C⁺-cell counterparts. LN cells were isolated from C57BL/6 mice and fixed in 4% paraformaldehyde immediately (Ex vivo) or after 30 min of culture alone (Resting) or in the presence of 200 nM of TG (TG). Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (CD4⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3⁺) were sorted by flow cytometry and stained for NFAT2, and DNA (DRAQ5). Cells were then analyzed by imaging flow cytometry. **(A)** Scheme depicting the experimental procedure. **(B)** NFAT2 nuclear localization was calculated as similarity score between NFAT2 and DRAQ5 intensities. Data are representative of one of three independent experiments.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.010>

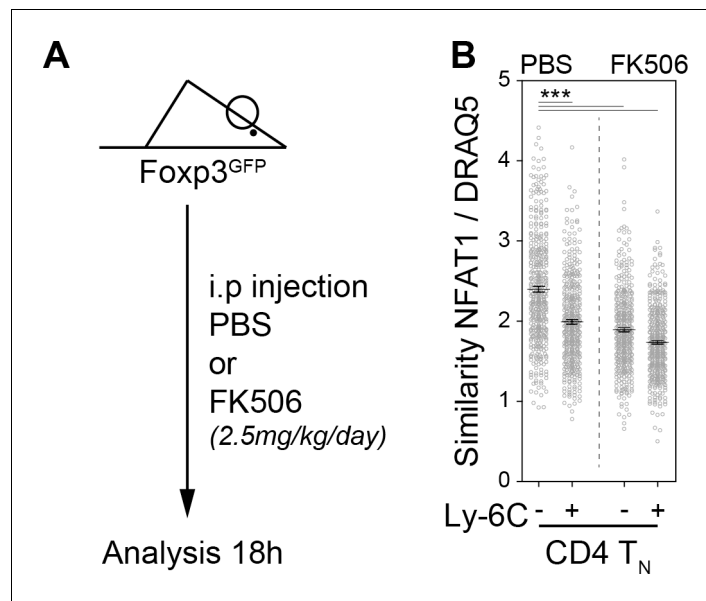


Figure 5—figure supplement 1. The calcium-calcineurin cascade drives NFAT nuclear translocation in CD4 T_N cells in vivo. (A) C57BL/6 $\text{Foxp3}^{\text{GFP}}$ mice were injected intraperitoneally with Prograf (FK506; 2.5 mg/kg; two times) or diluent (PBS). 18 hr later LN cells were isolated from C57BL/6 mice and fixed in 4% paraformaldehyde immediately. CD4 T_N cells ($\text{CD4}^+ \text{CD44}^{\text{lo}} \text{CD25}^{\text{lo}} \text{Foxp3}^+$) were sorted by flow cytometry and stained for Ly-6C, NFAT1, and DNA (DRAQ5). Cells were then analyzed by imaging flow cytometry. (A) Scheme depicting the experimental procedure. (B) NFAT1 nuclear localization was calculated as similarity score between NFAT1 and DRAQ5 intensities. Data are representative of one of two independent experiments.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.012>

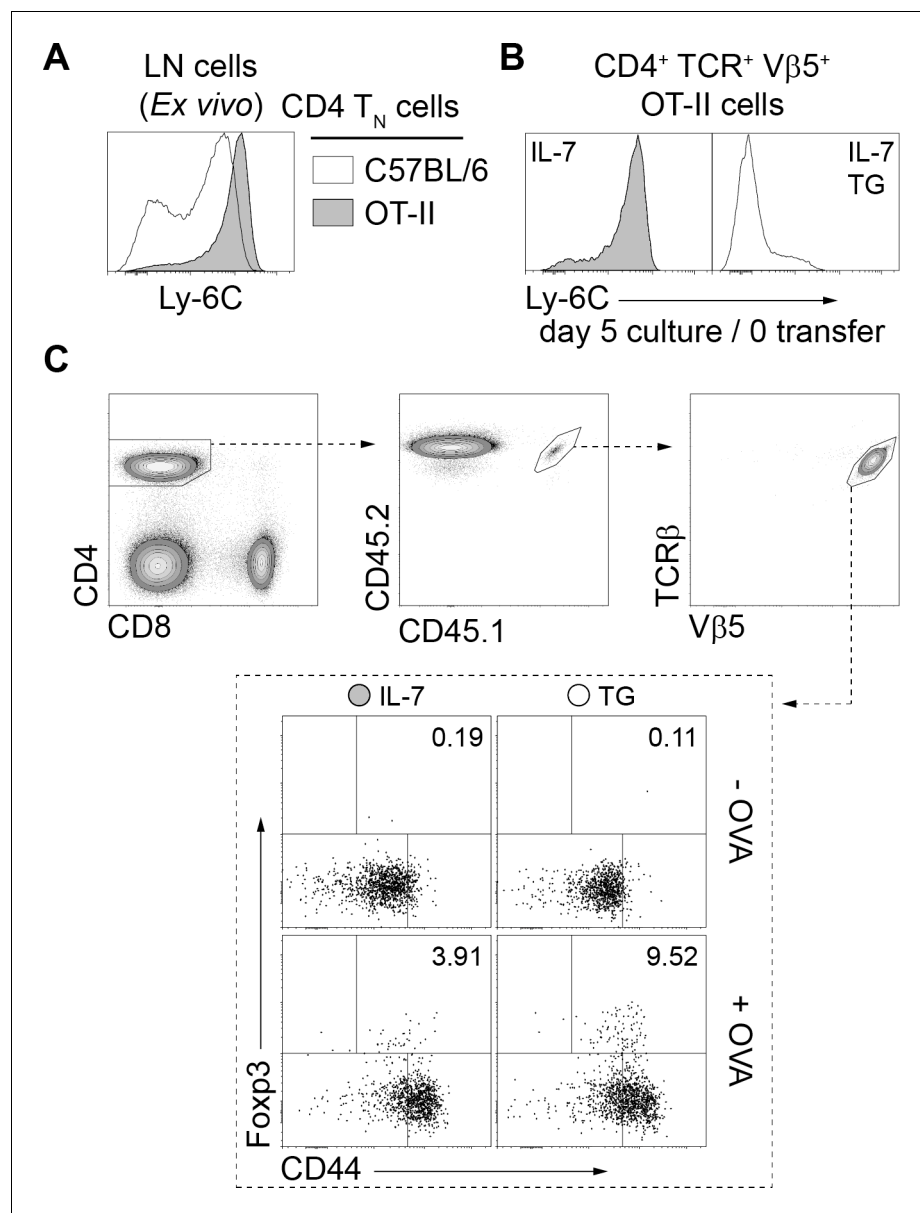


Figure 7—figure supplement 1. OT-II CD4 T_N cells are Ly-6C⁺ and can be Ca²⁺-converted and tested for their ability to convert into pTreg cells in vivo. (A) Ly-6C fluorescence histograms of gated CD4 T_N (CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺ CD44^{lo} CD25^{lo} Foxp3-GFP⁻) cells recovered from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP and C57BL/6 Foxp3-GFP OT-II mice are shown. (B, C) Purified CD4 T cells from CD45.1/2⁺ C57BL/6 Foxp3-GFP OT-II mice were cultured in IL-7 (10 ng/ml) with or without TG (4 nM). After 5 days, live CD4 T_N (CD44^{lo} CD25^{lo} CD8β⁻ CD11b⁻ CD11c⁻ NK1.1⁻ TCRγδ⁻ Foxp3-GFP⁻) cells were flow-cytometry sorted, analyzed for their cell surface expression of Ly-6C (B) and injected intravenously (0.5–1 × 10⁶ cells) into sex-matched CD45.2⁺ C57BL/6 Foxp3-GFP recipient mice fed with Ovalbumin (+OVA; 1.5% w/v) or not (-OVA) in the drinking water (C). One week after transfer, mesenteric LNs (mLNs) were recovered and donor-derived CD4 T cells were analyzed. (C) Gating strategy and representative CD44/Foxp3 dot-plots for gated donor-derived OT-II CD4 T (CD45.1⁺ CD45.2⁺ CD4⁺ TCRβ⁺ Vβ5⁺) cells recovered from mLNs are shown. Percentages of Foxp3-GFP⁺ cells are indicated.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.015>

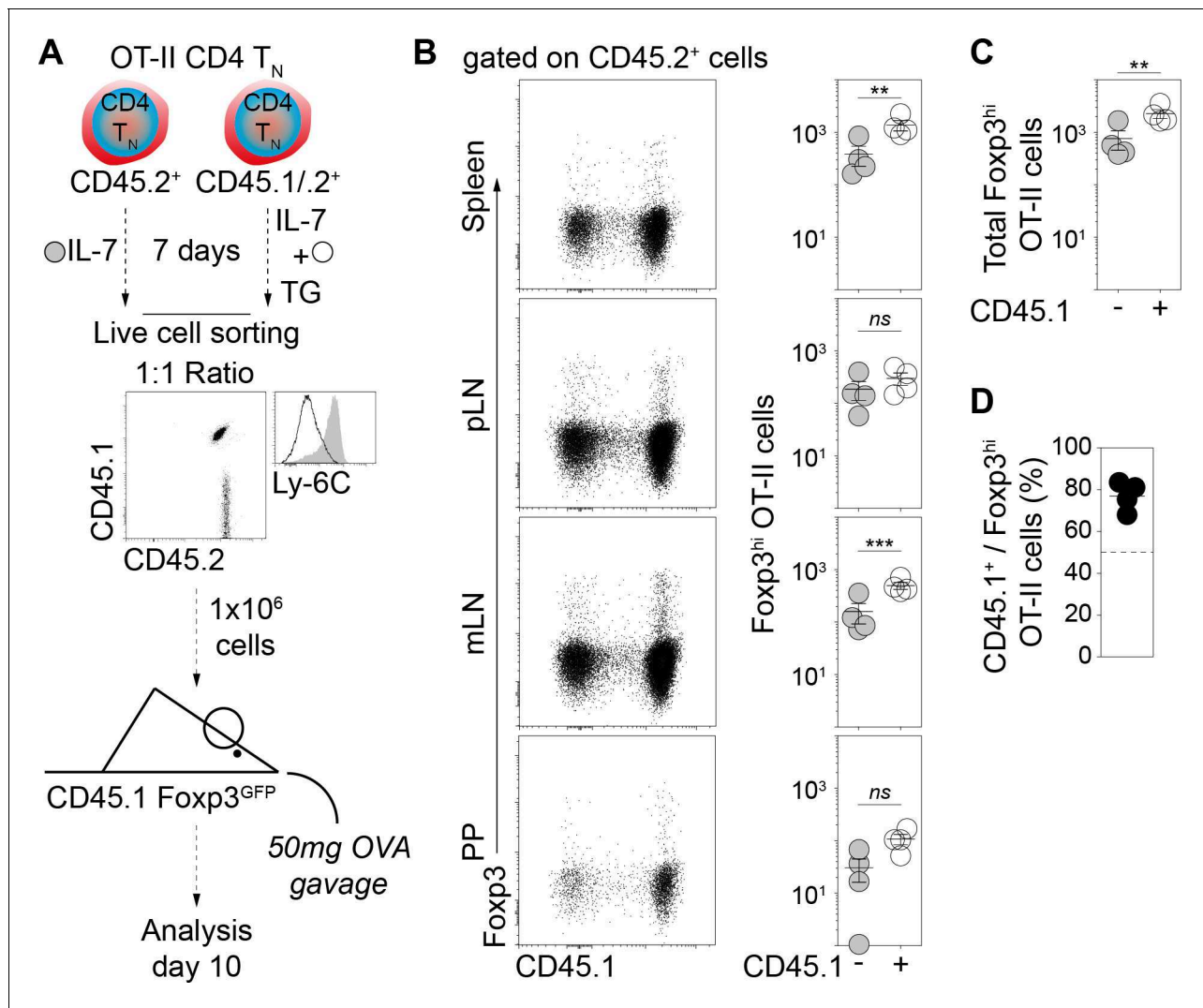


Figure 7—figure supplement 2. Calcium-mediated shaping of the CD4 T_N-cell phenotype increases the pTreg-cell differentiation potential of OT-II CD4 T_N cells in vivo. Purified CD4 T cells from CD45.2⁺ and CD45.1/2⁺ C57BL/6 Foxp3-GFP OT-II mice were cultured in IL-7 (10 ng/ml) without or with TG (4 nM), respectively. After 5 days live CD4 T_N (CD44^{lo} CD25^{lo} CD8β⁻ CD11b⁻ CD11c⁻ NK1.1⁻ TCRγδ⁻ Foxp3-GFP⁻) cells were flow-cytometry sorted, mixed at a 1:1 ratio and injected intravenously (0.5–1 × 10⁶ cells) into sex-matched CD45.1⁺ C57BL/6 Foxp3-GFP-recipient mice gavaged with Ovalbumin (OVA; 50 mg) 4 and 24 hr later. 10 days after transfer, peripheral and mesenteric LNs (pLNs and mLNs, respectively), Peyer's Patches (PPs) and spleen were recovered separately and donor-derived CD4 T cells were analyzed. (A) Diagram illustrating the experimental model and Ly-6C surface expression of transferred cells. (B) Representative CD45.1/Foxp3 dot-plots for gated donor-derived OT-II CD4 T (CD45.2⁺ CD4⁺ TCRβ⁺) cells recovered from Spleen, pLNs, mLNs and PP of recipient mice are shown. Absolute numbers of donor-derived Foxp3-GFP⁺ OT-II CD4 T cells recovered from pLNs, mLNs, PPs and spleen of recipient mice are shown as means ± s.e.m. for a representative experiment with four mice per group. (C) Total (pool of Spleen, pLNs, mLNs and PPs cells) absolute numbers of Foxp3-GFP⁺ OT-II CD4 T cells recovered from recipient mice are shown as means ± s.e.m. (D) Percentages of CD45.1⁺ cells among donor-derived Foxp3-GFP⁺ OT-II CD4 T (CD45.2⁺ CD4⁺ TCRβ⁺) cells recovered from pLNs, mLNs, PPs and spleen of recipient mice are shown as means ± s.e.m. (B, C) Significance of differences were assessed using a two-tailed paired Student's t-test. Values of p<0.05 were considered as statistically significant (**p<0.01; ***p<0.001; ns, not significant).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27215.016>

II. Quelle(s) modification(s) induite(nt) par le Tonic Signaling augmente la capacité de différenciation des lymphocytes CD4 T_N en iTregs.

1. Comparaison fonctionnelle des lymphocytes CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi}.

La majorité de nos expériences, pour étudier le rôle du Tonic Signaling dans l'homéostasie et la fonction des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, sont basées sur l'expression de Ly-6C pour séparer les cellules les plus auto-réactives (Ly-6C⁻) des moins auto-réactives (Ly-6C⁺). Cependant d'autres marqueurs d'auto-réactivités existent tel que CD5 pour identifier, les CD4 T_N fortement auto-réactifs qui sont CD5^{Hi}. L'équipe de D. Hawiger a montré que lors d'une polarisation iTreg en présence de faible quantité d'IL-4, d'IL-6 ou d'IFN γ , des cytokines inhibitrices de la différenciation Treg, les CD4 T_N CD5^{Hi} se polarisent plus efficacement en cellules régulatrices induites Foxp3⁺ que leur homologue CD5^{Low} (Henderson et al., 2015). De manière intéressante, nous avons observé que, dans nos conditions de polarisation en iTregs (sans cytokines inhibitrices), les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} se polarisent également plus efficacement que leur homologue CD5^{Low}. Ces résultats sont similaires à ceux que l'on observe en comparant la capacité de différenciation en iTregs des CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ (figure 23).

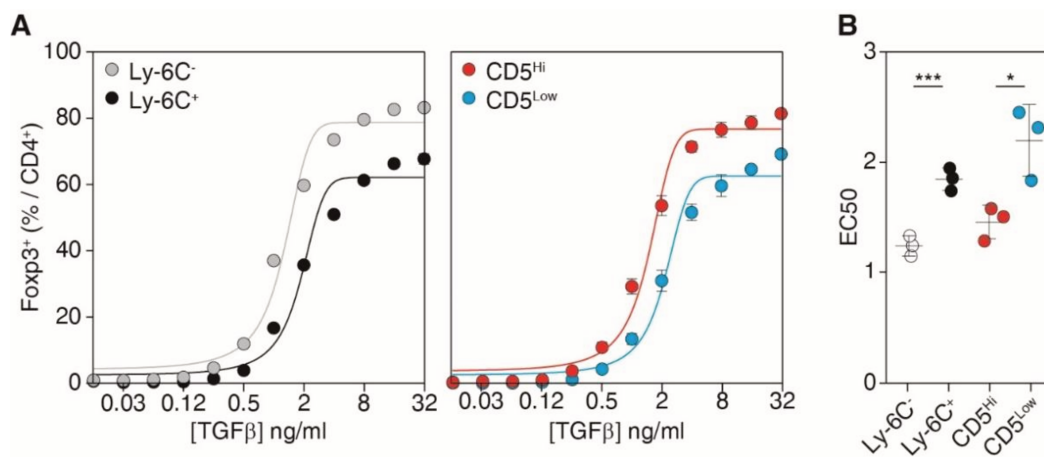


Figure 23: Différenciation en iTregs des CD4 T_N en fonction de leur auto-réactivité.

Les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻, Ly-6C⁺, CD5^{Hi} ou CD5^{Low} triées par cytométrie en flux à partir de souris C57BL/6 Foxp3-GFP ont été stimulées pendant 4 jours avec α CD3/ α CD28 (4 μ g/ml) et en présence de doses croissantes de TGF β 1. (A) Les proportions de cellules Foxp3⁺ parmi les cellules CD4⁺ sont représentées en fonction de la concentration de TGF β 1. Les moyennes \pm s.e.m de trois expériences indépendantes sont montrées. (B) Les concentrations nécessaires pour obtenir 50% du pourcentage maximum de cellules polarisées en iTregs (EC50) ont été calculées pour chaque sous-groupe de cellules CD4 T_N. Chaque point représente une expérience indépendante. Les différences ont été évaluées par un t-test de Student apparié. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatif (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Ainsi les lymphocytes CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi} partagent cette capacité accrue à se différencier en iTreg par rapport à leurs homologues respectifs Ly-6C⁺ et CD5^{Low}. Les travaux de Henderson et al. indiquent que lors de la différenciation iTregs en présence d'IL-4, d'IL-6 ou d'IFN γ , l'avantage des cellules CD5^{Hi} vient d'une meilleure résistance à l'inhibition induite par ces cytokines, en bloquant l'activation de la voie mTOR. L'ajout de rapamycine, un inhibiteur de mTORC1 connue pour augmenter l'expression de Foxp3 lors de la différenciation en Tregs in vitro, double la capacité de différenciation des CD4 T_N CD5^{Low} en iTregs, en présence des cytokines inhibitrices. Cependant, le blocage de mTOR semble n'avoir aucun effet sur la différence entre CD5^{Hi} et CD5^{Low} en absence de ces cytokines (Henderson et al., 2015). De la même manière, une polarisation en iTregs en présence de rapamycine ne permet pas d'inhiber la différence entre les CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ (figure 24).

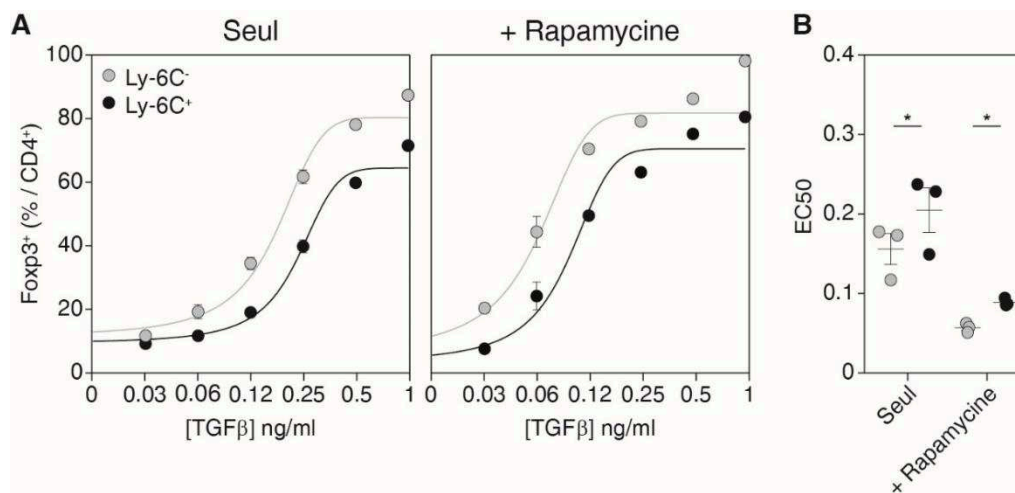


Figure 24 : Effet de la rapamycine sur la différenciation en iTregs des CD4 T_N.

Les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻, Ly-6C⁺ triées par cytométrie en flux à partir de souris C57BL/6 Foxp3-GFP ont été stimulées pendant 4 jours avec α CD3/ α CD28 (4 μ g/ml) en présence de doses croissantes de TGF β 1 \pm rapamycine (10nM). (A) Les proportions de cellules Foxp3⁺ parmi les cellules CD4⁺ sont représentées en fonction de la concentration de TGF β 1. Les moyennes \pm s.e.m de trois expériences indépendantes sont montrées. (B) Les concentrations nécessaires pour obtenir 50% du pourcentage maximum de cellules polarisées en iTregs (EC50) ont été calculées pour chaque sous-groupe de cellules CD4 T_N dans les différentes conditions de culture. Chaque point représente une expérience indépendante. Les différences ont été évaluées par un t-test de Student apparié. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatif (* $p < 0,05$).

Une autre différence fonctionnelle entre les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} et CD5^{Low} est leur capacité à produire de l'IL-2, une cytokine impliquée dans l'induction et le maintien de l'expression de Foxp3. Les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} en produisent deux fois plus que leurs homologues CD5^{Low} suite à une stimulation TCR. Étonnamment, alors que les cellules exprimant le plus fortement

CD5 sont incluses dans la population de CD4 T_N Ly-6C⁻, nous n'avons observé aucune différence dans la production d'IL-2 entre les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ (figure 25).

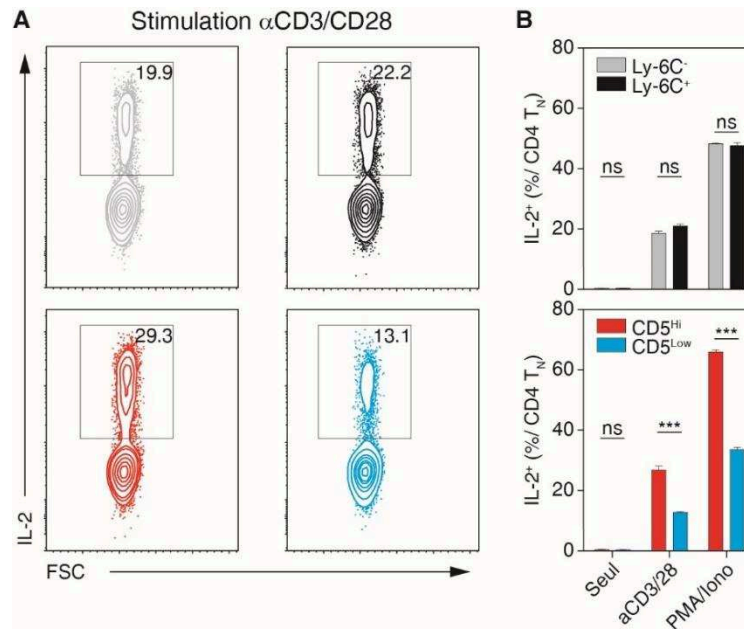


Figure 25 : Test de sécrétion d'IL-2 des CD4 T_N.

Les cellules issues des ganglions et de la rate de souris C57BL/6 Foxp3-GFP ont été mélangées, puis 2×10^6 des cellules ont été stimulées avec de l' α CD3 + α CD28 (10 μ g/ml) ou PMA + Ionomycine (0,5 μ g/ml) pendant 4h. Un test de capture de l'IL-2 a ensuite été réalisé. (A) Contours-plots représentatifs IL-2/FSC des cellules T CD4⁺ naïves (CD4⁺, Foxp3⁻, CD25⁻, CD44^{Low}) Ly-6C⁻ (gris), Ly-6C⁺ (noir), CD5^{Hi} (rouge) et CD5^{Low} (bleue). Le pourcentage d'IL-2 produit par chaque population est noté. (B) Quantification de la sécrétion d'IL-2 pour chaque population en fonction de la condition de stimulation. Les moyennes \pm s.e.m de trois expériences indépendantes sont montrées. Les différences ont été évaluées par un t-test de Student apparié. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatif (***) $p < 0,001$; ns, non significatif).

De façon intéressante les cellules T CD4⁺ naïves CD5^{Hi} sont les meilleures productrices d'IL-2 avec 27% d'IL-2⁺ suite à une stimulation avec α CD3/ α CD28 (et 65% avec une stimulation PMA/Iono). Les cellules CD4 T_N CD5^{Low} sont quant à elles les plus faibles productrices avec 13% d'IL-2⁺ (33% pour une stimulation PMA/Iono). Enfin, les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ se situent entre ces deux sous populations avec une production d'IL-2 de 20% après une stimulation α CD3/ α CD28 (48% par stimulation PMA/Iono). Cela semble indiquer que la dichotomie des lymphocytes T CD4⁺ naïfs par CD5 ou Ly-6C reflète des Tonic Signaling différents qui, malgré certaines similitudes, confèrent aux cellules des fonctions différentes.

Nous n'avons pas de données indiquant si cette différence de production d'IL-2 joue un rôle dans la polarisation iTregs des lymphocytes CD4 T_N CD5^{Hi}. En revanche, l'IL-2 se semble pas expliquer la différence entre les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺. Bien qu'elles produisent la même quantité d'IL-2, l'analyse des microarrays, comparant ces deux sous populations, semble indiquer que les cellules Ly-6C⁻ sont plus sensibles à cette cytokine. En effet, les CD4 T_N Ly-6C⁻ expriment plus fortement CD122, la chaîne β du récepteur à l'IL-2. Néanmoins, l'ajout d'IL-2 dans la culture n'inhibe pas la différence d'efficacité de polarisation en iTregs entre les cellules T CD4⁺ naïves Ly-6C⁻ et leurs homologues Ly-6C⁺ (figure 26). Nous avons observé des résultats similaires avec l'ajout d'anticorps bloquants anti-CD122 (données non montrées).

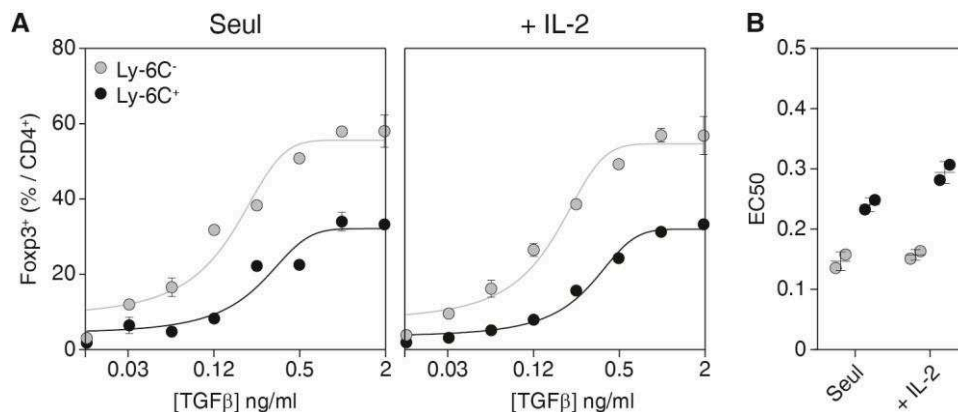


Figure 26 : Effet de l'IL-2 sur la polarisation iTreg des CD4 T_N.

Les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻, Ly-6C⁺ triées par cytométrie en flux à partir de souris C57BL/6 Fcpx3-GFP ont été stimulées pendant 4 jours avec αCD3/αCD28 (4 μg/ml) et en présence de doses croissantes de TGFβ1 ± IL-2 (13ng/ml). (A) Les proportions de cellules Fcpx3⁺ parmi les cellules CD4⁺ sont représentées en fonction de la concentration de TGFβ1. Les moyennes ± s.e.m de deux expériences indépendantes sont montrées. (B) Les concentrations nécessaires pour obtenir 50% du pourcentage maximum de cellules polarisées en iTregs (EC50) ont été calculées pour chaque sous-groupe de cellules CD4 T_N dans les différentes conditions de cultures. Chaque point représente une expérience indépendante.

2. Analyse du transcriptome des lymphocytes CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi}.

Après avoir étudié les fonctions des différentes populations de CD4 T_N, nous nous sommes intéressés à leur expression génique. Nous avons ainsi réalisé une série de séquençages d'ARNs des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD4⁺, Fcpx3⁻, CD25⁻, CD44^{Low/-}) Ly-6C⁻, Ly-6C⁺, CD5^{Hi} ou CD5^{Low}. L'analyse différentielle d'expression génique montre une signature spécifique, pour une p-value < 0,05 et un FC (Fold Change) > 1,5, de 197 gènes pour les CD4 T_N Ly-6C⁻ (comparées aux CD4 T_N Ly-6C⁺) et de 364 gènes pour les CD4 T_N CD5^{Hi} (comparées aux CD4

T_N CD5^{Low}). En accord avec nos résultats précédents sur leur capacité à se différencier en iTregs, la signature transcriptionnelle des CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi} comporte de nombreuses similitudes. On observe que les 128 gènes communs aux deux signatures sont régulés de la même manière. En effet, parmi ces gènes, les 93 qui sont surexprimés et les 35 sous exprimés dans les CD4 T_N Ly-6C⁻ le sont également dans les CD4 T_N CD5^{Hi} (figure 27). Ainsi les gènes communs aux deux signatures semblent être de bon candidats pour expliquer la différence de polarisation en iTregs entre les cellules les plus ou moins auto-réactives.

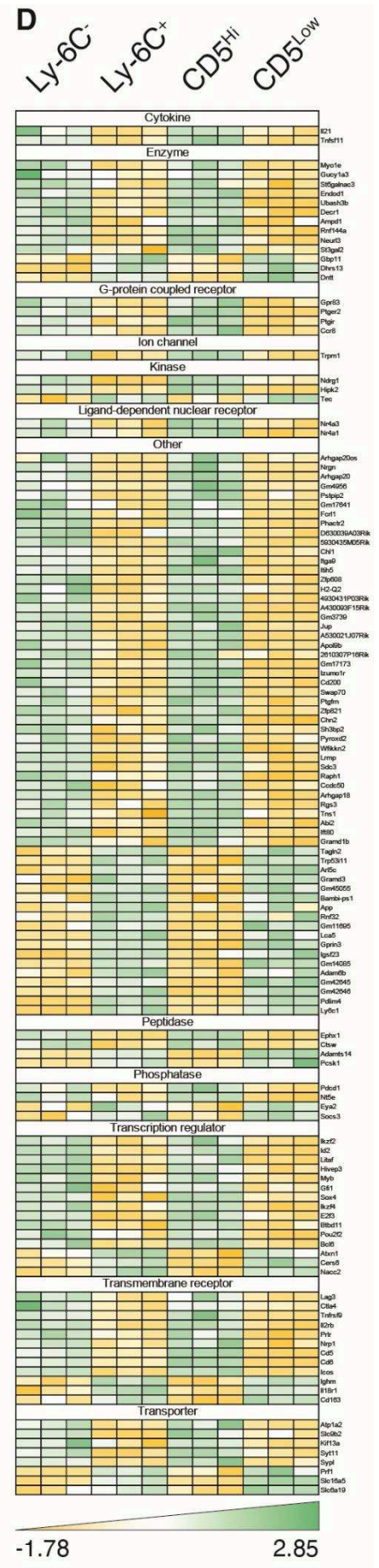
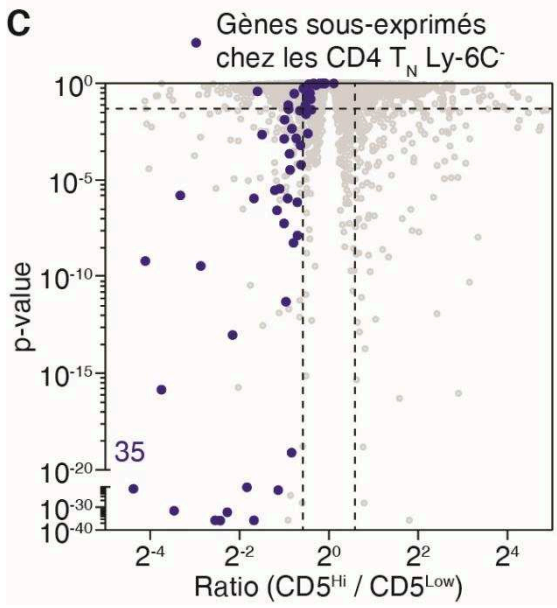
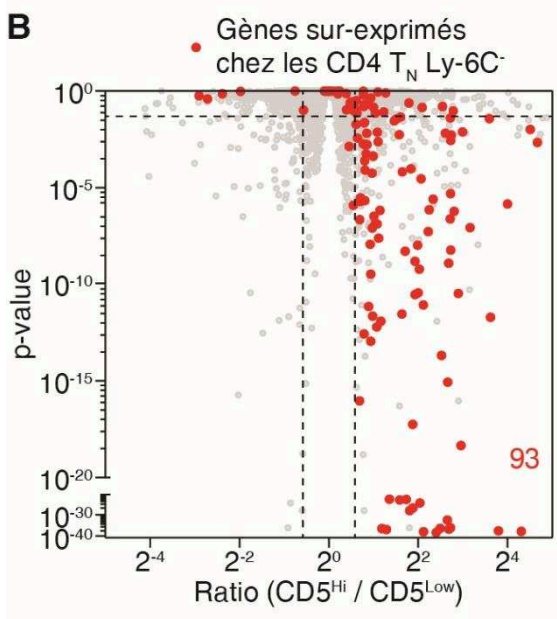
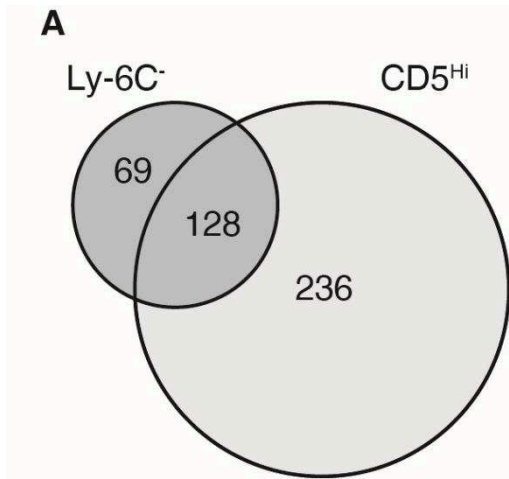


Figure 27 : Profil transcriptionnel des lymphocytes CD4 T_N en fonction de leur auto-réactivité.

Les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻, Ly-6C⁺, CD5^{Hi} ou CD5^{Low} ont été triées par cytométrie en flux à partir de souris C57BL/6 Foxp3-GFP. Leurs ARNs ont ensuite été extraits et séquencés. (A) Comparaison des sets de gènes différentiellement exprimés, pour une p-value < 0,05 et un fold change > 1,5, entre les CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi} et leurs homologues respectifs Ly-6C⁺ et CD5^{Low}. (B, C) Représentation en « Volcano plot » (Log2 (ratio) contre Log10 (p-value)) entre les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} et CD5^{Low}. Les gènes différentiellement surexprimés (B) ou sous exprimé (C) dans les CD4 T_N Ly-6C⁻, sont surlignés en rouge et bleue respectivement. Parmi ces gènes, le nombre de gènes également différentiellement surexprimés (B) ou sous-exprimé (C) dans les CD4 T_N CD5^{Hi} sont notés. (D) Heat map des 127 gènes différentiellement exprimés (pour une p-value < 0,05 et un ratio > 1,5) et en commun entre les CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi} et leurs homologues respectifs Ly-6C⁺ et CD5^{Low}.

Pour aller plus loin dans l'analyse des signatures transcriptionnelles des cellules T CD4⁺ naïves Ly-6C⁻ et CD5^{Hi}, nous avons réalisé une série d'analyses par GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) en utilisant les genes sets des différents facteurs de transcription (TF) régulés par la signalisation TCR. Le gene set d'un facteur de transcription représente l'ensemble des gènes comportant un motif de fixation pour ce facteur dans leur locus. Malgré de nombreuses similitudes d'expression génique entre les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi}, l'analyse par GSEA révèle quelques différences. Parmi les 10 premiers TFs (top 10 de l'analyse GSEA) qui semblent réguler chaque signature, on observe seulement 50% de similitude entre ces deux sous populations : MEF2_02, Foxo3_01, CREBP1_01, EGR3_01 et NFAT_Q4_01 au rang 1, 3, 4, 5 et 8 respectivement pour les CD4 T_N Ly-6C⁻ et au rang 4, 6, 10, 1 et 5 respectivement pour les CD4 T_N CD5^{Hi}. De façon intéressante, 4 TFs faisant partie de la famille AP-1 sont dans le top 10 de l'analyse GSEA des cellules CD4 T_N CD5^{Hi}, alors qu'ils sont absents de cette liste lorsque les cellules Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ sont comparées (figure 28). AP-1 se forme par l'association des facteurs de transcription Fos et Jun qui sont régulés par la voie des MAPKs. La phosphorylation plus importante de Erk dans les cellules CD4 T_N CD5^{Hi}, après stimulation TCR (Persaud et al., 2014), confirme en effet que cette signalisation pourrait être plus active dans les CD5^{Hi}. Une signalisation MAPK plus intense est d'autre part en accord avec la sécrétion plus importante d'IL-2 observée dans les CD4 T_N CD5^{Hi}, AP-1 étant un facteur impliqué dans la régulation de l'expression de l'IL-2.

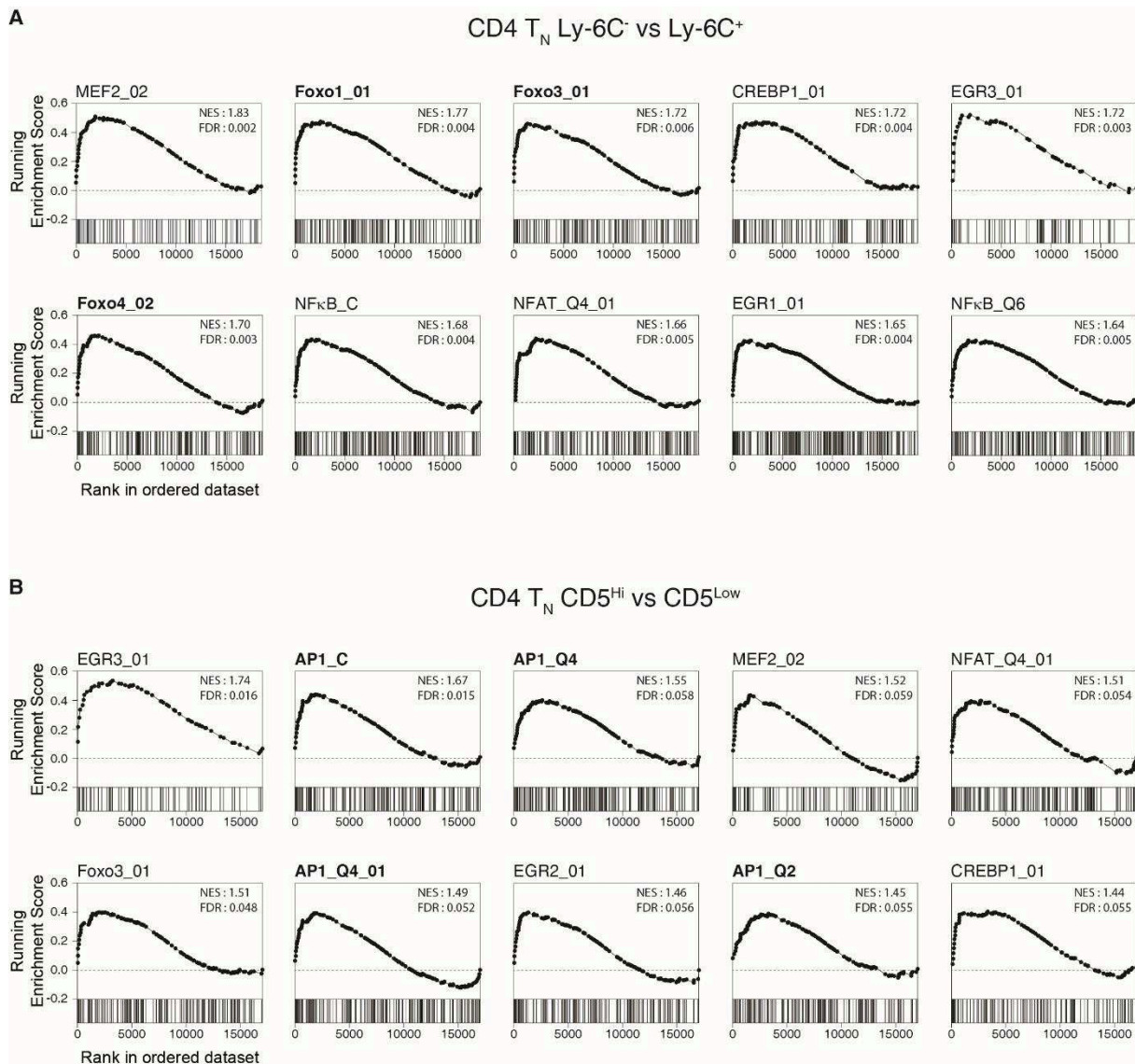


Figure 28 : Analyse GSEA des facteurs de transcription régulés par le TCR.

Gene set enrichment analyses des données d'expression génique comparant les CD4 T_N Ly-6C⁻ (A) et CD5^{Hi} (B) à leurs homologues respectifs Ly-6C⁺ et CD5^{Low}. Les analyses GSEA ont été réalisées en utilisant 46 genes sets, reliés à la signalisation TCR, de la collection C3 transcription factor targets (TFT v6.2). Le top 10 des genes sets est représenté pour chaque analyse. Pour chaque gene set, le running enrichment score de chaque gène en fonction de son rang (attribué par l'analyse GSEA) dans l'ensemble de données est représenté. Le NES (Normalized Enrichment Score) ainsi que le FDR (False Discovery Rate) sont indiqués.

Une autre observation intéressante de cette analyse GSEA, est la famille des facteurs de transcription Foxo présent dans le top 10 des cellules CD4 T_N Ly-6C⁻. En effet, on retrouve Foxo1_01, Foxo3_01 et Foxo4_02 au rang 2, 3 et 6 respectivement, alors que seul Foxo3_01 est présent au rang 6 lorsque les cellules CD5^{Hi} et CD5^{Low} sont comparées. Ainsi, la famille des TFs Foxo semble plus impliquée dans la régulation d'une partie des gènes différentiellement exprimés entre les lymphocytes T CD4⁺ naïfs Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺. Ce résultat nous a amené à nous intéresser au rôle de Foxo1 dans l'homéostasie des CD4 T_N et leur fonction.

3. Rôle de Foxo1, dans l'homéostasie et la polarisation en iTregs des lymphocytes T CD4⁺ naïfs

Foxo1 est un facteur de transcription dont l'activité est régulée par la voie PI3K/Akt. Suite à son activation, Akt phosphoryle Foxo1 et induit son export du noyau (Tzivion et al., 2011). Afin d'approfondir nos connaissances sur l'effet de Foxo1 dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, nous avons utilisé un modèle de souris transgénique Foxp3-GFP CD4^{Cre} Foxo1^{ff} (Foxo1^{TKO}). Chez ces souris, où l'expression de Foxp3 est couplée à celle de la GFP, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont déficients pour l'expression de la protéine Foxo1. Comparés aux souris contrôles Foxp3-GFP Foxo1^{ff} (Foxo1^{Ctrl}), nos premières observations montrent une diminution des cellules CD4 T_N, en faveur de cellules mémoires effectrices, chez les souris Foxo1^{TKO} (données non montrées). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par l'équipe S.M. Hedrick (Kerdiles et al., 2009). Les résultats de l'analyse GSEA de la signature 6CSign nous a amené à étudier l'expression de Ly-6C à la surface des lymphocytes T CD4⁺ naïfs des souris Foxo1^{TKO} et contrôles. De façon intéressante, alors que 30% des cellules CD4 T_N sont Ly-6C⁻ dans une souris contrôle, on trouve environ 70% de cellules Ly-6C⁻ parmi les cellules T CD4⁺ naïves des souris Foxo1^{TKO} (figure 29). Ces résultats suggèrent que Foxo1 est impliqué dans le Tonic Signaling des CD4 T_N.

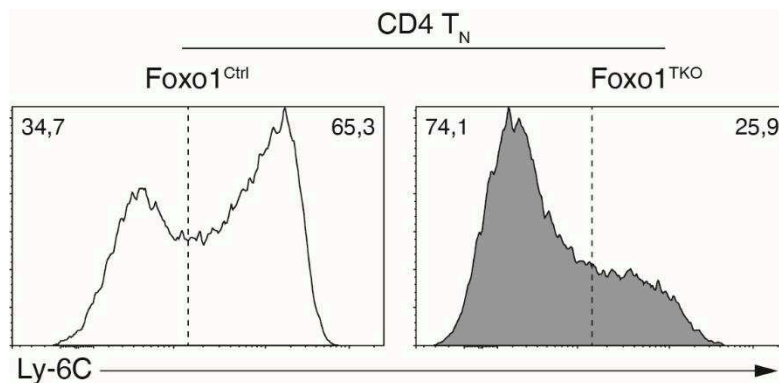


Figure 29 : Distribution de Ly-6C parmi les CD4 T_N Foxo1^{TKO} et Foxo1^{Ctrl}.

Par la suite nous nous sommes intéressés au rôle de Foxo1 dans la différenciation des CD4 T_N en cellules T régulatrices. Foxo1 est connu pour jouer un rôle dans l'expression de Foxp3, en particulier lors de la génération de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs thymiques. En revanche, en périphérie son rôle est encore controversé (voir Introduction : partie IV.2.c Régulation transcriptionnelle de Foxp3). Nous avons donc testé dans un premier temps la capacité de différenciation en iTregs des cellules CD4 T_N Foxo1 déficientes et compétentes. Comme cela

avait été montré dans la littérature (Kerdiles et al., 2010), nous avons confirmé que lors d'une polarisation en iTregs, avec α CD3/ α CD28 et en présence de TGF β 1 seulement, les cellules CD4 T_N Foxo1^{TKO} se polarisent difficilement en cellules Foxp3⁺ par rapport au CD4 T_N Foxo1^{Ctrl}. Même à forte dose de TGF β 1, seul 20% des CD4 T_N Foxo1^{TKO} sont devenue Foxp3⁺ contre 65% dans les CD4 T_N Foxo1^{Ctrl} (figure 30). Cependant, nous avons observé que suite à une stimulation TCR, via α CD3/ α CD28, les cellules T CD4⁺ naïves issue de souris Foxo1^{TKO} produisent rapidement de l'IL-4 et de l'IFN γ , des cytokines inhibitrices de la différenciation Treg (données non montrées). Pour nous affranchir de ce frein, nous avons ajouté des anticorps bloquants α -IL-4 et α -IFN γ lors de la polarisation en iTregs. Dans ces conditions, les cellules CD4 T_N Foxo1^{TKO} ont une bonne capacité de différenciation et semble même se polariser plus efficacement en iTregs que les CD4 T_N Foxo1^{Ctrl} (figure 30).

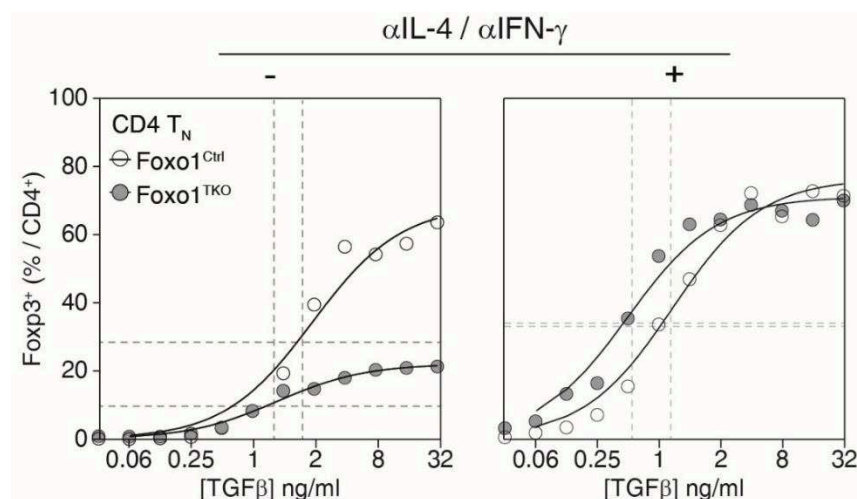


Figure 30 : Effet de Foxo1 sur la différenciation des CD4 T_N en iTregs.

Les cellules CD4 T_N triées par cytométrie en flux à partir de souris C57BL/6 Foxp3-GFP CD4^{Cre} Foxo1^{fl/fl} (Foxo1^{TKO}) ou souris CD57BL/6 Foxp3-GFP Foxo1^{fl/fl} (Foxo1^{Ctrl}) ont été stimulées pendant 4 jours avec α CD3/ α CD28 (4 μ g/ml) et en présence de doses croissantes de TGF β 1 \pm les anticorps bloquants α IL-4 / α IFN- γ . Les proportions de cellules Foxp3⁺ parmi les cellules CD4⁺ sont représentées en fonction de la concentration de TGF β 1. Les concentrations nécessaires pour obtenir 50% du pourcentage maximum de cellules polarisé en iTregs (EC50) ont été calculées pour chaque sous-groupe de cellules CD4 T_N (lignes en pointillé). Les moyennes \pm s.e.m de trois expériences indépendantes sont montrées.

Dans le but d'évaluer le rôle de Foxo1 dans la différence de polarisation en iTregs entre les lymphocytes T CD4⁺ naïfs Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺, nous avons comparé la capacité de ces sous populations à se polariser en cellules Foxp3⁺ en fonction de leur expression ou non de Foxo1. Chez les souris contrôles la différence de polarisation est maintenue entre les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺. L'absence de Foxo1 inhibe cette différence. En effet les CD4 T_N Foxo1^{TKO}

Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ se polarisent de manière équivalente en cellules Foxp3⁺. De plus, au regard des EC50, il semble que les CD4 T_N Foxo1^{TKO} se polarisent avec une efficacité comparable à celles des cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ issues de souris contrôle (figure 31).

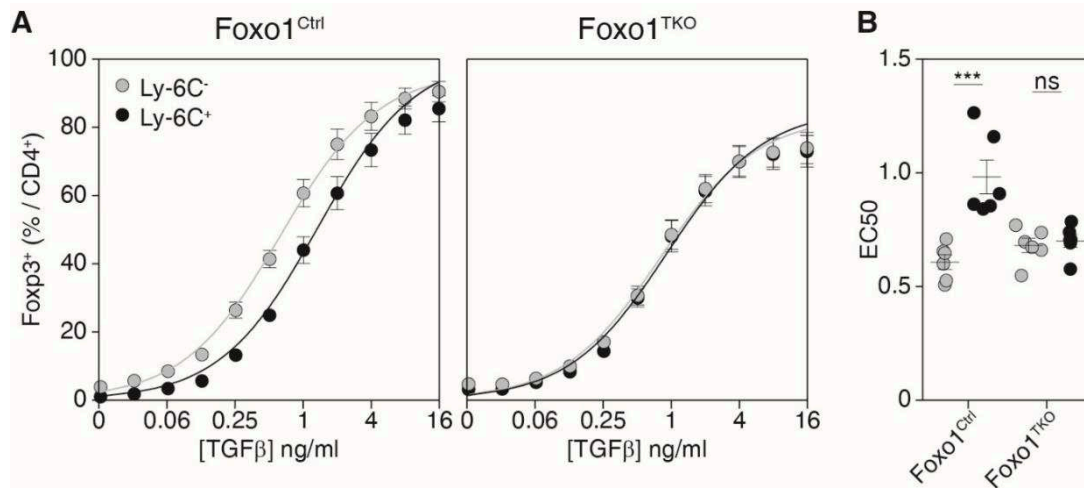


Figure 31 : Foxo1 dans la polarisation des cellules CD4 T_N plus ou moins auto-réactives.

Les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻, Ly-6C⁺ triées par cytométrie en flux à partir de souris C57BL/6 Foxp3-GFP CD4^{Cre} Foxo1^{fl/fl} (Foxo1^{TKO}) ou souris CD57BL/6 Foxp3-GFP Foxo1^{fl/fl} (Foxo1^{Ctrl}) ont été stimulées pendant 4 jours avec αCD3/αCD28 (4 μg/ml) et en présence de doses croissantes de TGFβ1 + les anticorps bloquants αIL-4 / αIFN-γ. (A) Les proportions de cellules Foxp3⁺ parmi les cellules CD4⁺ sont représentées en fonction de la concentration de TGFβ1. Les moyennes ± s.e.m de trois expériences indépendantes avec 2 souris de chaque génotype sont montrées. (B) Les concentrations nécessaires pour obtenir 50% du pourcentage maximum de cellules polarisées en iTregs (EC50) ont été calculées pour chaque sous-groupe de cellules CD4 T_N. Chaque point représente une souris indépendante. Les différences ont été évaluées par un t-test de Student apparié. Les valeurs de p<0,05 ont été considérées comme statistiquement significatif (***)p<0,001 ; ns, non significatif).

III. Un nouveau modèle pour étudier le Tonic Signaling ?

1. Modèle de conversion in vivo des CD4 T_N en cellules Ly-6C⁻

L'équipe de O. Kanagawa a montré de façon intéressante qu'à la suite d'un transfert de faibles nombres de cellules T CD4⁺ exprimant un TCR transgénique spécifique de l'ovalbumine, issue de souris DO11.10 TCR-Tg Rag2^{-/-}, dans une souris sauvage BALB/c, la quasi-totalité des cellules transférées expriment rapidement CD69 en réponse à une interaction avec le CMH de classe II. Du fait de la diminution de la compétition, par rapport à leur hôte d'origine, les cellules transférées peuvent en effet rencontrer plus facilement l'antigène du Soi dont elles sont spécifiques (Tomura et al., 2010). CD69 est une molécule rapidement exprimée à la surface des lymphocytes T suite à une activation du TCR. Les cellules transférées ont donc reçu une stimulation du TCR suite à la reconnaissance du complexe peptide du Soi-CMHII, mais qui reste cependant en dessous du seuil d'activation, les cellules restant naïves. Il semble que les cellules ont ainsi reçu ce que l'on appelle un Tonic Signaling. Nous avons donc décidé de reprendre ce modèle en transférant des lymphocytes T CD4⁺ issue de souris TCR-Tg Rag2^{-/-} (exprimant un TCR Tg spécifique du cytochrome C de pigeon), que l'on appelle aussi AND, dans des souris sauvage C57BL/6 (B6). Comme attendue, après 1 jour de transfert la quasi-totalité des cellules transférées expriment CD69, avec 80% de CD69⁺ dans les ganglions et 90% dans la rate. De manière intéressante, le pourcentage de cellules CD69⁺ diminue ensuite avec le temps jusqu'à retomber au niveau que l'on observe à l'état d'équilibre dans une souris AND. Une autre observation intéressante de cette expérience est la diminution du pourcentage de cellules Ly-6C⁺ parmi les cellules transférées. En effet, le pourcentage de cellules Ly-6C⁺, qui est de 80-90% à J1, diminue progressivement au cours du temps pour atteindre 30-40% à J8 (figure 32).

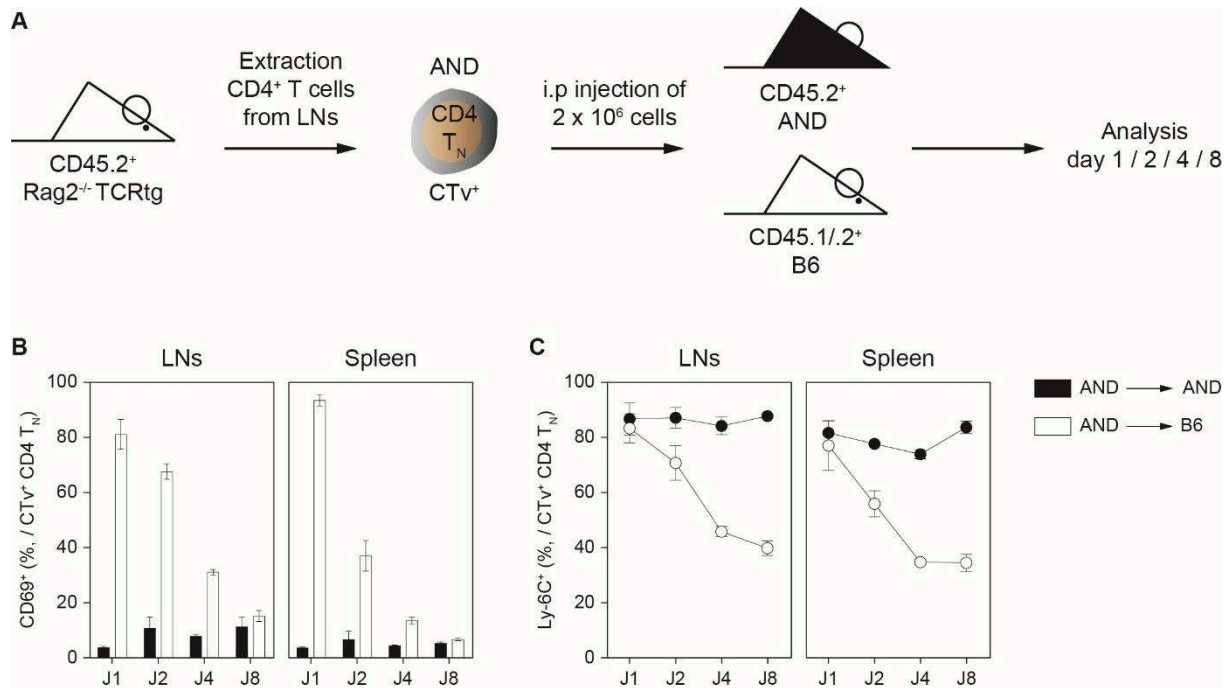


Figure 32 : Conversion in vivo de cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ en Ly-6C⁻.

2 x 10⁶ cellules T CD4⁺ issue de souris TCR Tg Rag2^{-/-} (AND) ont été marquées au CTv (Cell Trace Violet) puis injectées par intraveineuse dans des souris C57BL/6 (B6) et AND. (A) Schéma expérimental. (B, C) Le pourcentage de cellules CD69⁺ (B) ou Ly-6C⁺ (C), parmi les cellules transférées recueillies dans les ganglions et la rate, est représenté à jour 1, 2, 4 et 8 après transfert dans une souris B6 (blanc) ou AND (noir). Les moyennes ± s.e.m de deux expériences indépendantes avec 2 souris de chaque génotype sont montrées.

Par conséquent, une partie des lymphocytes T CD4⁺ AND transférés, qui est Ly-6C⁺, a reçu une stimulation TCR induisant leur conversion en cellules Ly-6C⁻. Afin de confirmer que cette expression de CD69 ainsi que la conversion des cellules en CD4 T_N Ly-6C⁻ sont dues à l'interaction entre les cellules T et le complexe pCMHII, nous avons réalisé le même transfert dans des souris déficientes pour le CMH de classe II (CMHII^{Δ/Δ}). On observe qu'à J1, ou J8, après transfert en souris CMHII^{Δ/Δ} les cellules n'expriment pas CD69. Il n'y a donc eu aucune stimulation TCR. De plus après 8 jours de transfert en CMHII^{Δ/Δ} les cellules AND, qui sont majoritairement Ly-6C⁺, sont devenues homogènes et expriment plus fortement Ly-6C, tandis que les cellules transférées en souris B6 sont devenues majoritairement Ly-6C⁻ (figure 33).

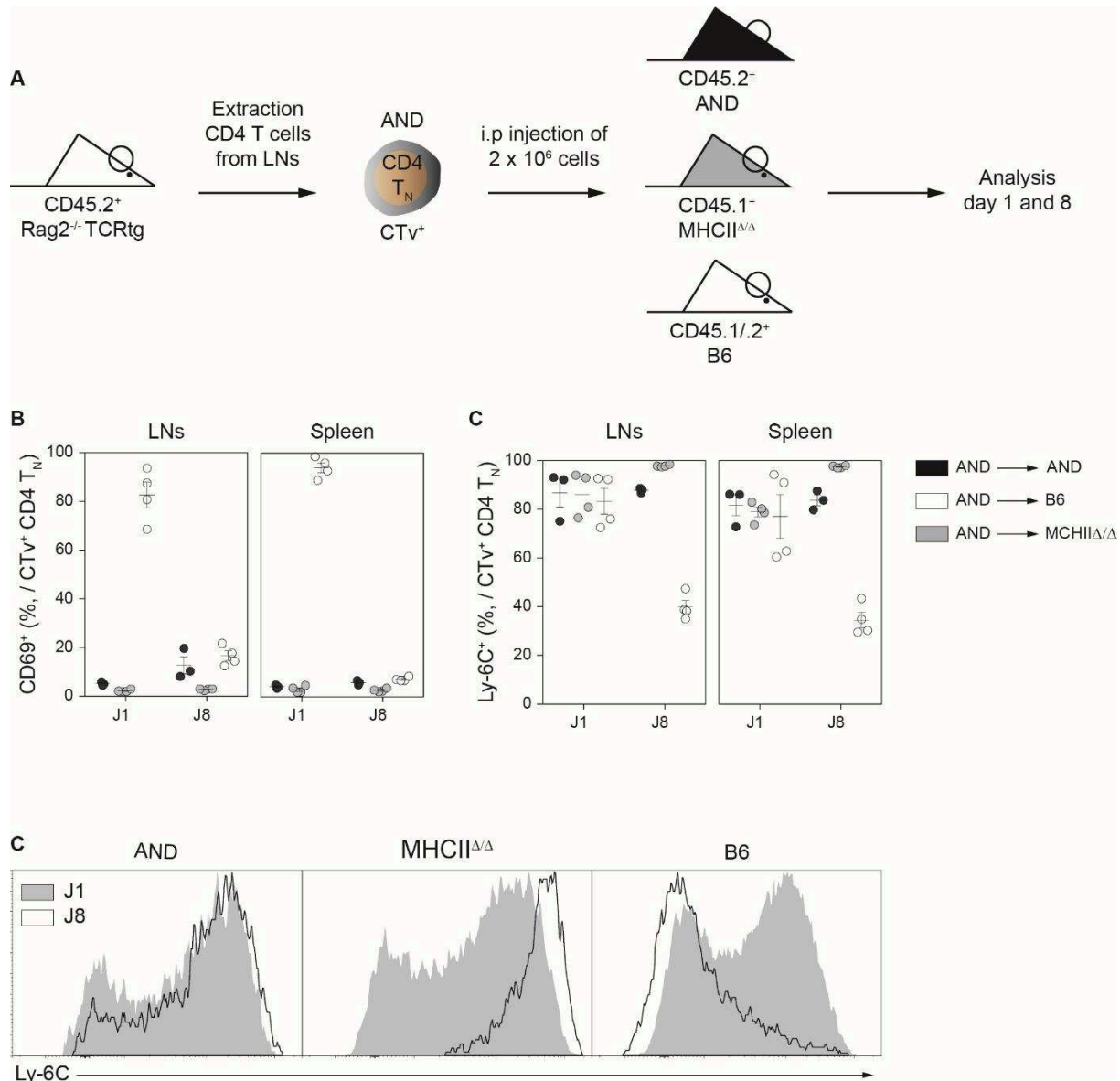


Figure 33 : La conversion in vivo de cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ en Ly-6C⁻ est dépendante du CMHII. 2 x 10⁶ cellules T CD4⁺ issue de souris TCR Tg Rag2^{-/-} (AND) ont été marquées au CTV (Cell Trace Violet) puis injectées par intraveineuse dans des souris C57BL/6 (B6), déficiente pour le CMHII (CMHII^{ΔΔ}) et AND. (A) Schéma expérimental. (B, C) Le pourcentage de cellules CD69⁺ (B) ou Ly-6C⁺ (C), parmi les cellules transférées recueillies dans les ganglions et la rate, est représenté à jour 1 et 8 après transfert dans une souris B6 (blanc), CMHII^{ΔΔ} (gris) ou AND (noir). Les moyennes ± s.e.m de deux expériences indépendantes avec 2 souris de chaque génotype sont montrées. (D) Histogramme représentatif de l'expression de Ly-6C parmi les cellules CD4 T_N transférées et recueillies dans les ganglions à jour 1 (gris) et jour 8 (contour noir) chez chaque hôte.

Ainsi la conversion des cellules T CD4⁺ AND, en cellules Ly-6C⁻, après leur transfert dans une souris C57BL/6 est due au Tonic Signaling qu'elles reçoivent lors de leur interaction avec le Soi via le CMH de classe II. Ce modèle de conversion in vivo semble bien récapituler ce que l'on observe in vitro lors de la conversion des cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ en Ly-6C⁻ grâce à la thapsigargine. Comme présentée dans nos précédents travaux, cette conversion in vitro par la TG permet d'augmenter le potentiel de différenciation en Treg des lymphocytes CD4 T_N. Dans

une première expérience, les cellules T CD4⁺ AND converties après 8 jours de transfert voient leur capacité de polarisation en iTreg augmenter par rapport aux cellules récupérées le lendemain de l'injection (figure 34). Ainsi ce modèle de conversion in vivo des lymphocytes T CD4⁺ naïfs pourrait s'avérer être un outil intéressant pour l'étude du Tonic Signaling et de ses effets sur la fonction des CD4 T_N.

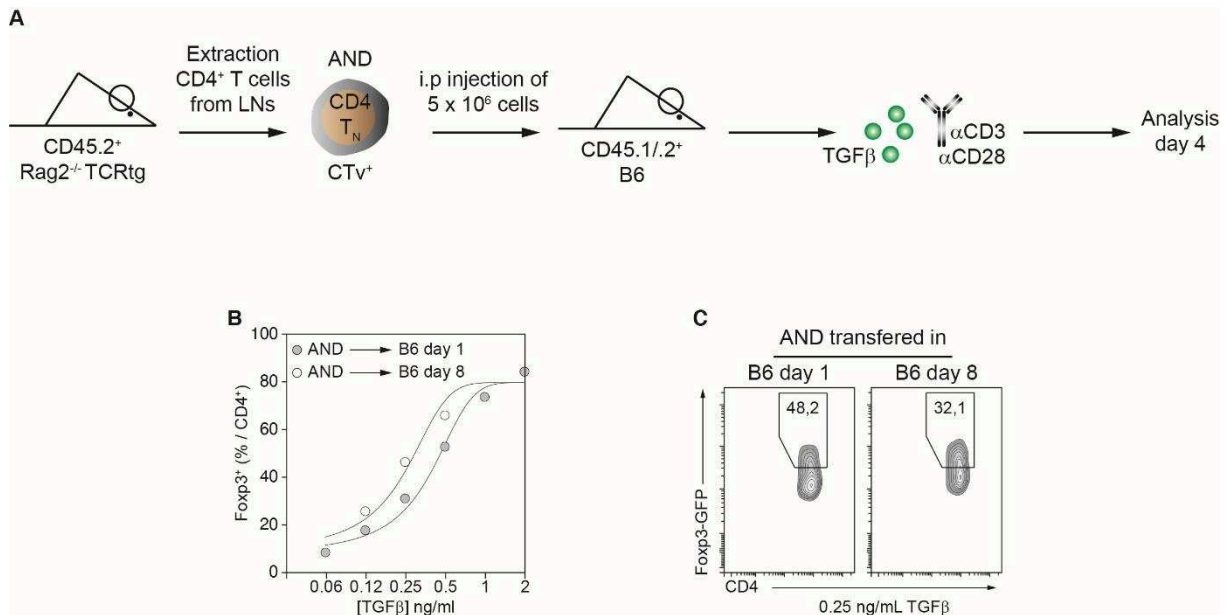


Figure 34 : La conversion in vivo des CD4 T_N augmente leur potentiel de différenciation en iTregs. 5 x 10⁶ cellules T CD4⁺ issue de souris TCR Tg Rag2^{-/-} (AND) ont été marquées au CTv (Cell Trace Violet) puis injectées par intraveineuse dans des souris C57BL/6 (B6). A jour 1 et 8, les cellules transférées ont été triées puis stimulées pendant 4 jours avec αCD3/αCD28 (4 μg/ml) et en présence de doses croissantes de TGFβ1 (A) Schéma expérimental. (B) Les proportions de cellules FoXP3⁺ parmi les cellules CD4⁺ sont représentées en fonction de la concentration de TGFβ1. (C) Contours-plots représentatifs FoXP3/CD4 des cellules T CD4⁺ en condition de polarisation iTregs pour une concentration de 0,25 ng/ml de TGFβ.

IV. Matériel et méthodes

Souris

Les souris C57BL/6 (CD45.2) ont été obtenues des laboratoires Charles River. Les souris C57BL/6 CD45.1, C57BL/6 AND TCR transgénique Rag2^{-/-}, C57BL/6 MHCII^{Δ/Δ} CD45.1 et C57BL/6 CD4^{Cre} ont été maintenues dans notre propre animalerie sous condition spécifique EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique). Les souris Foxp3-GFP CD45.2 (Wang et al., 2008), obtenues initialement du Dr Bernard Malissen, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, France, ont été croisées avec des souris C57BL/6 CD45.1 pour générer des souris C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 et CD45.1/.2. Les souris C57BL/6 Foxo1^{ff}, obtenues initialement du Dr SM. Hedrick, Université de Californie de San Diego, USA, ont été croisées avec des souris C57BL/6 CD4^{Cre} et Foxp3-GFP pour générer des souris C57BL/6 Foxp3-GFP CD4^{Cre} Foxo1^{ff}. Des souris de 8 à 12 semaines ont été utilisées pour toutes les expériences. Les souris donneuses et receveuses ont été appariées entre mâle et femelle. Les expériences ont été effectuées conformément aux directives du département vétérinaire français. Toutes les procédures effectuées ont été approuvées par le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale de Paris-Descartes (décision CEEA34.CA.080.12).

Préparation des cellules

Les ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques (LNs) ainsi que la rate (spleen) ont été homogénéisés et filtrés, à travers un filtre cellulaire en nylon (BD Falcon), dans du PBS supplémenté avec 10% FCS (Biochrom) pour les transferts adoptifs et les cultures cellulaires (LNs seulement), ou dans du PBS supplémenté avec 5% de FCS et 0,1% de NaN₃ (Merck-Sigma-Aldrich, Lyon, France) pour la cytométrie en flux.

Transfert adoptif de cellules T CD4⁺ AND

Les cellules T CD4⁺ ont été purifiées à partir des LNs (regroupement des ganglions superficiels cervicaux, axillaires, brachiaux, inguinaux et mésentériques) de souris C57BL/6 AND TCR transgénique Rag2^{-/-}, marquées au CTv (CellTrace Violet; 5 mM; Life Technologies) puis injectées par intraveineuse dans des souris receveuses de même sexe.

Marquage cellulaire de surface et cytométrie en flux

Les suspensions cellulaires ont été collectées et distribuées dans des plaques 96 puits à fond rond de microtitration (Greiner Bioscience; 6 x 10⁶ cellules par puits). Les marquages de surface ont

été réalisés en incubant les cellules sur la glace, 15 minutes par étapes, avec les anticorps dans du PBS supplémenté avec 5% de FCS et 0,1% de NaN_3 . Chaque réaction de marquage cellulaire a été précédé avec une incubation de 15 minute avec un anticorps purifié anti CD16/32 de souris (FcγRII/III block; 2.4G2) obtenu à partir de surnageant d'hybridomes. Alexa Fluor 700-conjugated anti CD45.2 (104), Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD25 (PC61) et anti-CD44 (IM7), Brilliant Violet (BV) 421-conjugated anti Ly-6C (AL-21), BV 510-conjugated anti-CD4 (RM4-5), BV 650-conjugated anti-CD62L (MEL-14), BV 786-conjugated anti-CD25 (PC61), Brilliant UltraViolet (BUV) 395-conjugated anti-CD5 (53-7.3), Phycoerythrin (PE)-conjugated antiCD25 (PC61), PE-Cy7-conjugated anti-CD44 (IM7), anti-CD45.1 (A20) et anti-CD69 (H1.2F3), Biotinylated anti-CD45.1 (A20) et anti-Ly-6C (AL-21) ont été obtenus de BD Biosciences. BV 421-conjugated anti-Ly-6C (HK1.4) et PE-conjugated anti-Ly-6C (HK1.4) ont été obtenus de BioLegend (London, United Kingdom). PerCP-Cy5.5-conjugated anti-TCRβ (H57-597) a été obtenu de eBioscience (Montrouge, France). Pacific Blue-conjugated streptavidin a été obtenu de Invitrogen. APC-Vio770-conjugated anti-CD8a (53-6.7) a été obtenu de Miltenyi Biotec. L'immunofluorescence multi-couleurs a été analysé en utilisant les cytomètres en flux BD-LSR2 et BD-FORTESSA (BD Biosciences). Les fichiers de données en mode liste ont été analysés à l'aide du logiciel Diva (BD Biosciences). L'acquisition des données et le tri des cellules ont été effectués dans les installations d'immunobiologie de Cochin.

Test de polarisation iTreg in vitro

Les cellules T CD4⁺ ont été purifiées à partir des LNs de souris C57BL/6 Foxp3-GFP, C57BL/6 Foxp3-GFP CD4^{Cre} ou C57BL/6 Foxp3-GFP CD4^{Cre} Foxo1^{fl/fl} en incubant les suspensions cellulaires 15 minutes sur la glace avec un mix d'anticorps anti-CD8 (53-6.7), anti-CD19 (1D3) et anti-Ter119 obtenus à partir de surnageant d'hybridomes, puis avec des billes magnétiques couplées aux immunoglobines anti-rat ((Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ ou CD4 T_N ont ensuite été triées comme cellules Foxp3-GFP⁻ Lignée (CD25, TCRγδ, CD8β, CD11b, CD11c)-PE⁻ CD44^{-/lo} en utilisant un cytomètre en flux FACS-ARIA3 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Puis les cellules ont été marquées au Ctv (CellTrace Violet; 5 mM; Life Technologies). Elles ont ensuite été cultivées pendant quatre jours en plaque 96 puits à fond plat recouvert d'anticorps anti-CD3 (clone 145.2C11; 4 mg/ml; obtenu à partir de surnageant d'hybridomes) et anti-CD28 (clone 37.51; eBioscience; 4 mg/ml) en présence de dose croissante de TGFβ1 humain exogène et recombinant (Invitrogen). Dans certaines expériences, des anticorps anti-IFN-γ (clone R4-6A2; 10 mg / mL) et anti-IL-4 (clone 11B11; 10 mg / mL) ont été ajoutés à la culture. La concentration de TGFβ nécessaire pour

obtenir 50% du pourcentage maximal de cellules iTreg (Concentration effective, EC50) a été calculée en ajustant les courbes dose-réponse de chaque sous-ensemble de lymphocytes T CD4⁺ dans les différentes conditions de culture. À cette fin, les moyennes de 3 expériences indépendantes ont été utilisées pour établir des courbes dose-réponse en utilisant la régression non linéaire des moindres carrés de l'équation de Hill. Le modèle utilisé pour cette fonction était $Y = [B+(T-B)]/[1+10([\text{LogEC50}-X]*\text{HillSlope})]$, où "Y" représente le nombre de cellules Foxp3⁺ en pourcentage entre les cellules CD4⁺, "T" et "B" représentent les plateaux au début et à la fin de la courbe respectivement, et "X" représente la concentration de TGFβ ajoutée au début de la culture. L'EC50 absolue a été calculée pour interpoler X à 50% avec des intervalles de confiance de 95%.

Test de sécrétion d'IL-2 in vitro

Les suspensions cellulaires issues des ganglions et de la rate de souris C57BL/6 Foxp3-GFP ont été mélangées, puis 2×10^6 des cellules ont été stimulées avec de l'αCD3 + αCD28 (10 μg/ml) ou PMA + Ionomycine (0,5 μg/ml) pendant 4h. Un test de capture de l'IL-2 a ensuite été réalisé en utilisant le kit Mouse IL-2 Secretion Assay Detection Kit (Miltenyi Biotec). Après stimulation les cellules sont lavées puis incubées 5 minutes dans la glace avec le Mouse IL-2 Catch Reagent. Après ajout de milieu les cellules sont incubées 45 minutes à 37°C. Après arrêt de la réaction, les cellules sont lavées puis incubées 15 minutes dans la glace avec le mix d'anticorps pour le marquage de surface cellulaire et l'anticorps Mouse IL-2 Detection Antibody (PE).

Séquençage d'ARNs

Les cellules T CD4⁺ ont été purifiées à partir des LNs de souris C57BL/6 Foxp3-GFP comme mentionné au-dessus. Puis les cellules CD4⁺ T_N Ly-6C⁻, Ly-6C⁺, CD5^{Hi} ou CD5^{Low} comme cellules CD4⁺ CD8a⁻ TCRβ⁺ GFP⁻ CD25⁻ CD44^{Lo} en utilisant un cytomètre en flux FACS-ARIA3. L'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNeasy Mini (QIAGEN, Courtaboeuf, France). La qualité de l'ARN a été validée par Bioanalyzer 2100 (à l'aide du kit Agilent RNA6000 nano chip). Pour construire les bibliothèques, 20 ng d'ARNs de haute qualité de chaque échantillon ont été traités à l'aide du kit Ovation Solo RNA-seq (Nugen) conformément aux instructions du fabricant. Elles ont ensuite été quantifiées avec le test Qubit HS ADN (Life Technologies, Grand Island, New York, États-Unis) et le profil des bibliothèques ont été évalués à l'aide du kit DNA High Sensitivity LabChip sur un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo

Alto, Californie, États-Unis). Finalement, les librairies ont été séquencées sur un Illumina Nextseq 500 en utilisant 75 base-lengths read V2 chemistry en mode paired-end.

Analyse séquençage d'ARNs

Après séquençage, une analyse primaire basée sur le logiciel AOZAN (ENS, Paris) a été appliquée pour démultiplexer et contrôler la qualité des données brutes (sur la base des modules FastQC / version 0.11.5). Les fichiers fastq obtenus ont ensuite été alignés à l'aide de l'algorithme STAR (version 2.5.2b). Les lectures ont ensuite été comptées à l'aide de RSEM (v1.2.28) et les analyses statistiques sur les comptages de lecture ont été effectuées avec le logiciel R DESeq2 (v1.22.1) afin de déterminer la proportion de gènes exprimés de manière différentielle entre deux conditions.

Analyse GSEA

Les données de comptage normalisé ont été extraites de l'analyse avec R DESeq2 et utilisées pour l'analyse GSEA. Les 46 genes sets utilisés ont été sélectionnés à partir de la collection C3 transcription factor targets (TFT v6.2). Les analyses GSEA ont ensuite été réalisées à l'aide du logiciel GSEA v3.0 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp>) en utilisant les paramètres recommandés.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Etude du Tonic Signaling

A l'état basal, en périphérie, les lymphocytes T naïfs circulent continuellement entre le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires à la recherche de l'antigène dont ils sont spécifiques. Pour cela ils scannent les différentes cellules présentatrices d'antigènes, en particulier les cellules dendritiques, lors de leurs passages dans les SLOs. Les cellules T naïves établissent ainsi de faibles, mais fonctionnelles, interactions avec le Soi lorsque leurs TCRs reconnaissent le complexe peptide du Soi-CMH. Cette capacité, acquise lors du développement thymique, est nécessaire pour la survie au long terme des lymphocytes T naïfs (Martin et al., 2003, 2006; Stritesky et al., 2012; Tanchot et al., 1997). Les signaux issus de cette reconnaissance du Soi, qui induisent ce que l'on appelle un Tonic Signaling, ont également un rôle sur la fonction des cellules T naïves. Ils permettent de maintenir les cellules dans un état de sensibilité accru afin de mieux répondre aux antigènes étrangers. L'équipe de R. Germain a été l'une des premières à montrer que la capacité des cellules CD4 T_N à répondre à leur antigène spécifique diminuait rapidement lorsque les cellules avaient été au préalable privées de contact avec le CMHII (Stefanová et al., 2002). D'autres équipes ont par la suite confirmé ces résultats à l'aide de divers modèles expérimentaux (Hochweller et al., 2010; Lo et al., 2009; Mandl et al., 2013; Persaud et al., 2014). En parallèle de ces travaux, notre équipe a récemment décrit Ly-6C, une protéine à ancre GPI exprimée à la surface des cellules T, comme permettant de distinguer les lymphocytes T CD4⁺ naïfs les plus auto-réactifs (Ly-6C⁻) des moins auto-réactifs (Ly-6C⁺). Nous avons ainsi pu démontrer que l'auto-réactivité non seulement augmente quantitativement la réponse des cellules CD4 T_N, mais aussi façonne qualitativement leur réponse au cours de la phase effectrice en augmentant leur capacité à se différencier en cellules régulatrices périphériques (Martin et al., 2013).

1. Une signature transcriptionnelle spécifique du Tonic Signaling

Dans la continuité de ces travaux, nous avons tout d'abord montré que la sensibilité accrue des CD4 T_N Ly-6C⁻ aux signaux de différenciation en iTreg était une capacité cellulaire intrinsèque. En effet lors d'une polarisation en iTregs, les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ conservent leur capacité respective à se différencier en cellules régulatrices Foxp3⁺ qu'elles soient cultivées ensemble ou séparément (Article : Figure 1). Les cellules T CD4⁺ naïves Ly-6C⁻ étant plus auto-réactives, cette capacité intrinsèque semble provenir de changements moléculaires spécifiques induits par le Tonic Signaling qu'elles reçoivent en périphérie. On peut ainsi supposer qu'il y a une « maturation périphérique » des CD4 T_N dépendante de l'auto-réactivité. L'analyse

transcriptomique de ces deux sous populations de lymphocytes T CD4⁺ naïfs révèle en effet que les CD4 T_N Ly-6C⁻ expriment différemment 331 gènes (pour une p-value < 0,05 et un fold change de 1,3) par rapport à leurs homologues Ly-6C⁺ (Article : Figure 2). En accord avec nos résultats, la comparaison de cette signature (6C Sign) avec les signatures transcriptomiques des différentes cellules effectrices, issues de (Wei et al., 2009), confirme le biais des cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ à se diriger vers le lignage iTreg (Article : Figure 3C).

Lors d'une stimulation, la signalisation TCR induit plusieurs voies moléculaires responsables de nombreuses fonctions au sein des cellules T. Lors de tests *in vitro*, une stimulation α CD3/ α CD28 est utilisée pour reproduire la stimulation TCR/CD28 induite lors d'une activation *in vivo* des lymphocytes T. De manière générale, cette signalisation est régulièrement dichotomisée en deux grandes voies : la voie calcique et la voie des MAP Kinases. Ainsi le Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), activant les MAPKs, et la ionomycine, un ionophore activant la voie calcique, sont utilisés *in vitro* pour mimer une stimulation TCR totale ou partielle. De façon intéressante, la comparaison de la signature 6C Sign avec la signature transcriptomique de cellules activées par α CD3, issue de (Wakamatsu et al., 2013), montre qu'une partie de la signature des cellules les plus auto-réactives est semblable à celle de cellules activées via le TCR (Article : Figure 3.A). Ainsi, nous avons cherché à distinguer quelle partie de la signalisation TCR est responsable à la fois du phénotype et de la fonction des cellules T CD4⁺ naïves les plus auto-réactives.

2. La voie calcique, voie moléculaire dominante du Tonic Signaling

Notre étude a permis d'identifier la voie calcique comme suffisante pour diminuer l'expression de Ly-6C à la surface des CD4 T_N *in vitro*. En effet, l'incubation de cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ avec la thapsigargine (TG), qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, conduit à de nombreux changements phénotypiques incluant non seulement la baisse d'expression de Ly-6C mais aussi la variation d'autres gènes de la signature 6C Sign tels que CD5, CD73, CD122, CD200 et Izumo1r (Article : Figure 4A et 5A). La TG est un inhibiteur de la pompe calcique SERCA qui permet l'entrée du calcium cytoplasmique dans le réticulum endoplasmique (RE) afin d'y être stocké. Habituellement utilisée à une concentration entre 0,1 à 1 μ M, la TG est souvent utilisée en recherche pour étudier le stress du réticulum endoplasmique, qui conduit à l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE (Oslowski and Urano, 2011). Dans nos expériences, nous utilisons la TG à une concentration bien plus faible, de 4 nM, qui est toutefois suffisante pour induire une faible augmentation du

calcium intracellulaire. Celle-ci reste fonctionnelle tout au long de la culture puisque 5 jours après culture, NFAT est toujours plus nucléaire dans les cellules traitées à la thapsigargine que celles cultivées avec de l'IL-7 seulement (Article : Figure 4C et F). De plus après 5 jours de culture avec la TG les cellules conservent, de manière similaire aux cellules cultivées en IL-7 seulement, un phénotype de cellules naïves.

La conversion phénotypique des cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ en cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ met quatre jours à s'installer *in vitro* et dépend de l'activité de la calcineurine (CN). En effet, l'ajout d'inhibiteurs de la CN tels que la cyclosporine A ou le FK506 bloquent complètement la conversion (Article : Figure 5A). De manière intéressante, les voies dépendantes du calcium et de PKC/Ras ont des effets opposés sur la régulation de Ly-6C. Tandis que la TG diminue l'expression de Ly-6C, la PMA entraîne sa sur expression (Article : Figure 4A.). En accord avec cette observation, la signature 6CSign n'a pas de corrélation avec les changements d'expression génique induits par la PMA (Article : Figure 3.B). Les effets opposés de la TG et de la PMA peuvent être le reflet d'une interaction complexe entre les voies calciques et de la PKC. Par exemple, la translocation de PKC au niveau de la membrane plasmique est strictement dépendante du Ca²⁺ (Reither et al., 2006) et la calcineurine peut être phosphorylée et inhibée par la PKC (Hashimoto and Soderling, 1989). Il serait intéressant de pouvoir ainsi évaluer l'action/activation de la voie PKC au cours de la conversion *in vitro* des CD4 T_N par la TG.

De manière générale, l'ensemble des résultats de cet article suggèrent que les interactions avec le Soi à l'état basal entraînent un Tonic Signaling, où la signalisation calcique est dominante (par rapport aux voies dépendantes de la PKC et Ras), qui conduit à la diminution de l'expression de Ly-6C et la variation d'expression d'autres gènes. Cette hypothèse est en accord avec nos résultats *in vivo*, où l'inhibition de la calcineurine (par traitement au FK506) entraîne une augmentation de Ly-6C dans les CD4 T_N et cela à des niveaux plus élevés que ceux observés à la surface des cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ chez les souris non traitées (Article : Figure 5). Cette hypothèse est également renforcée par le travail de Dong et al. (Dong et al., 2017) montrant que des flux calciques peuvent être mesurés dans les cellules T des ganglions lymphatiques de la souris à l'état basal et que le blocage des molécules du CMHII réduit significativement la fréquence de ces flux. La reconnaissance du Soi à l'état basal peut ainsi induire des vagues calciques qui façonnent à la fois le phénotype des cellules CD4 T_N et leur comportement dans la phase effectrice en favorisant leur différenciation en cellules pTreg.

3. Vers un modèle de conversion in vivo

Les principaux résultats de notre article sont basés sur un modèle de conversion in vitro des cellules CD4 T_N. De façon intéressante, nous avons récemment trouvé un modèle de conversion in vivo qui récapitule les observations phénotypiques et fonctionnelles mesurées lors de la conversion in vitro. En effet, le transfert adoptif de lymphocytes CD4 T_N issus d'une souris C57BL/6 AND TCR transgénique Rag2^{-/-} chez une souris sauvage C57BL/6 conduit à leur conversion en cellules CD4 T_N Ly-6C⁻. Après un jour de transfert, la quasi-totalité des cellules transférées exprime CD69, un marqueur précoce d'activation du TCR, qui reflète l'interaction de ces cellules avec le Soi. Cette interaction induit un Tonic Signaling, plus important que celui qu'elles reçoivent dans leur hôte d'origine, entraînant leur conversion en cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ en 8 jours (Figure 32). En accord avec ces résultats, après un transfert de cellules T CD4⁺ naïves AND dans une souris déficiente pour le CMH de classe II, aucune expression de CD69 n'est observée à jour 1 et les cellules ne diminuent pas leur expression de Ly-6C après 8 jours de transfert (Figure 33). Comme la montré Tomura et al., cette interaction des cellules AND transférées avec le Soi est due à une diminution de la compétition pour le complexe p-CMH dont elles sont spécifiques (Tomura et al., 2010). En plus de cette diminution de compétition, les cellules semblent avoir une avidité plus forte pour le Soi, qui leur est spécifique. En effet, un transfert de CD4 T_N issues de souris OT-II (exprimant un TCR spécifique de l'ovalbumine) dans une souris sauvage ne nous permet pas de reproduire ces résultats (données non montrées). Les cellules CD4T_N OT-II ont donc une avidité pour le Soi plus faible que les cellules AND. Enfin, de manière similaire à notre modèle de conversion in vitro, les cellules CD4 T_N AND converties in vivo voient leur capacité à se différencier en iTreg augmentée (Figure 34, résultats préliminaires à confirmer).

4. Perspectives

Les résultats que nous avons obtenus concernant les voies moléculaires induites par le Tonic Signaling soulèvent plusieurs questions.

- Quelle est la dynamique des flux calciques reçus par les CD4 T_N lors du Tonic Signaling ?

Les variations de [Ca²⁺] intracellulaire, en plus d'être étroitement régulées via de nombreuses pompes calciques, sont dépendantes de l'intensité et de la durée des flux calciques perçus par la cellule. Les voies moléculaires qui en résulte dépendent également de ces flux (Dolmetsch et

al., 1997, 1998). Ainsi, l'analyse de la dynamique des flux calciques au cours du Tonic Signaling pourrait apporter des précisions sur les voies induites par celui-ci. Cependant les techniques courantes utilisées pour mesurer les flux calciques in vitro, avec les colorants calciques, ne sont pas adaptées aux observations in vivo. Récemment deux équipes ont mis au point des outils innovant pour pallier ce problème. Ils ont généré des souris transgéniques capables d'exprimer un senseur du calcium couplé à une protéine fluorescente, qui est inductible par la doxycycline (Le Borgne et al., 2016) ou exprimé spécifiquement dans les cellules T CD4⁺ (Dong et al., 2017). Nous pourrions adapter ces outils à notre modèle de conversion in vivo afin d'imager en temps réelle, et durant les 8 jours nécessaires à la conversion, les flux calciques induits par le Tonic Signaling au niveau cellulaire.

- Quelles sont les voies moléculaires qui résultent du Tonic Signaling ?

Une première approche serait de réaliser une analyse phosphoprotéomique des cellules CD4 T_N AND transférées en souris C57BL/6 à jour 1 afin de connaître l'état d'activation des différentes voies moléculaires. Hatano et al. ont récemment réalisé ce type d'analyse sur des cellules T stimulées en présence d' α CD3 ou de ionomycine +/- CsA (Hatano et al., 2016). La comparaison avec ces données nous informerait sur l'effet de la composante calcique, dépendante ou non de la calcineurine, dans le Tonic Signaling. De plus nous pourrions étudier plus précisément la limite du seuil qu'il existe entre le Tonic Signaling reçu par les lymphocytes T en périphérie, qui induit un signal TCR sans activation, et le signal TCR qui conduit à leur activation.

Une seconde approche serait d'analyser et comparer l'expression génique des cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ cultivées sous diverses conditions. Pour cela nous avons récemment obtenu le transcriptome de ces sous populations de CD4 T_N cultivées en présence d'IL-7 avec ou sans TG et +/- l'inhibiteur de la calcineurine, la CsA. La condition contrôle avec l'IL-7 seulement va nous permettre également d'étudier l'effet d'une absence d'interaction avec le complexe pCMHII. Nous pourrions analyser l'effet d'une augmentation progressive de calcium intracellulaire grâce à la thapsigargine. Enfin la condition avec la cyclosporine A nous permettra de connaître les gènes dépendant de la calcineurine, donc dépendant en grande partie de NFAT. Une première analyse nous a permis de confirmer nos résultats précédents sur la variation de Ly-6C et d'autres marqueurs qui sont influencés par le calcium et sont calcineurine dépendant. De plus nous avons identifié cinq clusters de gènes, dont la variation d'expression est similaire entre les différentes conditions de cultures. Des analyses supplémentaires nous permettront d'approfondir nos connaissances sur les voies moléculaires induites par le Tonic Signaling.

II. Auto-réactivité et fonction des CD4 T_N

L'auto-réactivité des cellules T est connue pour jouer un rôle sur leurs fonctions. Dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs on utilise les marqueurs de surface CD5 et Ly-6C pour distinguer les cellules CD4 T_N les plus auto-réactives (Ly-6C⁻ ou CD5^{Hi}) des cellules CD4 T_N les moins auto-réactives (Ly-6C⁺ ou CD5^{Low}). L'expression de ces marqueurs est dépendante de la force du signal TCR reçu lors de leur interaction avec le Soi mais leur stabilité semble différente. En effet, l'expression de CD5 à la surface des cellules T CD4⁺ naïves semble diminuée lorsque les cellules retournent dans le sang alors que l'expression de Ly-6C reste similaire entre les cellules des ganglions et celles du sang. De même, lorsque les cellules CD4 T_N sont transférées dans une souris CHMII^{Δ/Δ} l'expression de CD5 diminue rapidement alors que l'expression de Ly-6C à la surface des cellules (du fait de l'absence d'interaction avec le Soi) est visible à partir d'une semaine. Ainsi le Tonic Signaling reflété par ces marqueurs semble différent. CD5 pourrait refléter le Tonic Signaling que les cellules viennent de recevoir lorsqu'elles sont dans les ganglions tandis que Ly-6C refléterait un Tonic Signaling sur le long terme, c'est-à-dire la proportion de cellules qui interagissent de manière régulière, et avec une certaine affinité, avec le Soi. Cette hypothèse est en accord avec le fait que l'on observe à la fois des similitudes sur la fonction des CD4 T_N les plus auto-réactives Ly-6C⁻ ou CD5^{Hi} mais également des différences.

1. Similitudes entre les lymphocytes CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi}

De façon générale, nous avons observé que les cellules CD4T_N les plus auto-réactifs Ly-6C⁻ ou CD5^{Hi} ont une capacité plus élevée à se différencier en cellules iTregs que leurs homologues respectifs Ly-6C⁺ ou CD5^{Low} (Figure 23). De manière intéressante ce résultat sur la comparaison des cellules CD5^{Hi} et CD5^{Low}, semble différent de celui de Henderson et al. (Henderson et al., 2015). Ils ont montré que les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} se différenciaient effectivement mieux en iTregs que leur homologue CD5^{Low}, mais cela seulement en présence de cytokine inhibitrice (pour la différenciation Tregs) telle que l'IL-4, l'IL-6 et l'IFN γ . Dans leurs conditions et en absence de ces cytokines inhibitrices, ils n'ont observé aucune différence de polarisation en iTreg entre les CD4 T_N CD5^{Hi} et CD5^{Low}. Cette différence entre nos résultats et les leurs pourrait venir du fait que nous n'utilisons pas les mêmes conditions de culture pour la différenciation en iTreg. Ils utilisent un α CD28 soluble alors que nous "coatons" cette anticorps au fond de la plaque. Ceci pourrait jouer un rôle sur la force du signal de co-stimulation reçue par les cellules. De plus, ils ajoutent également de l'IL-2 dans leur culture. Les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} produisent plus d'IL2, suite à une stimulation du TCR, que les

cellules CD4 T_N CD5^{Low}. L'ajout d'IL-2 lors de la polarisation en iTreg pourrait ainsi avoir un effet bénéfique plus important sur les cellules CD5^{Low} que les cellules CD5^{Hi}. Enfin, lors la différenciation en iTreg nous utilisons une gamme de concentrations de TGFβ1 plus étalée, ce qui nous permet d'identifier les différences plus précisément. L'analyse transcriptomique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs montre également une certaine similitude entre les cellules Ly-6C⁻ et CD5^{Hi}. Elles partagent une partie de leur signature (figure 27), ce qui est en accord avec leur sensibilité commune aux signaux de différenciation en cellules régulatrices induites. L'analyse GSEA révèle aussi que la composante NFAT semble intervenir dans la régulation d'expression génique des lymphocytes T les plus auto-réactifs Ly-6C⁻ ou CD5^{Hi}. Cela est en accord avec nos résultats de l'article, où l'expression de CD5 à la surface des cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ est augmenté par la TG et bloqué par l'ajout d'un inhibiteur de la calcineurine.

2. Différences entre les lymphocytes CD4 T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi}

Nous avons également observé plusieurs différences fonctionnelles entre les cellules CD4 T_N les plus auto-réactives Ly-6C⁻ ou CD5^{Hi}. Par exemple, la différence observée entre les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} et CD5^{Low} pour la production d'IL-2 n'est pas observable si l'on dichotomise les cellules T CD4⁺ naïves par Ly-6C (Figure 25). L'inhibition de la voie mTOR semble jouer un rôle sur la différence entre les cellules CD5^{Hi} et CD5^{Low} (Henderson et al., 2015) tandis que l'ajout de rapamycine n'affecte pas la différence de polarisation en iTregs entre les CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ (Figure 24). De plus l'analyse transcriptomique révèle aussi des différences entre ces sous populations de lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Bien que 128 gènes soient régulés de la même manière entre les cellules CD4T_N Ly-6C⁻ et CD5^{Hi} (après comparaison avec leurs homologues respectifs Ly-6C⁺ et CD5^{Low}), 69 gènes sont différentiellement exprimés seulement entre les cellules Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ et 236 gènes seulement entre les cellules CD5^{Hi} et CD5^{Low} (Figure 27). L'analyse GSEA apporte également son lot de différences. En plus des autres facteurs de transcription régulés par le TCR, la famille de TFs Foxo semble jouer un rôle important dans la signature transcriptionnelle des cellules CD4 T_N Ly-6C⁻. Dans les CD4 T_N CD5^{Hi}, la composante AP1 est très représenté (Figure 28), ce qui est en accord avec la voie Erk plus active dans les cellules CD5^{Hi} que les CD5^{Low} et leur différence de production d'IL-2.

3. Perspectives

- CD5 et Ly-6C reflètent-ils un Tonic Signaling équivalent ?

Au vu des analyses transcriptomiques des cellules T CD4⁺ naïves plus ou moins auto-réactives, le Tonic Signaling reflété par les marqueurs CD5 et Ly-6C comporte des différences. Une analyse supplémentaire des gènes différentiellement exprimés uniquement dans les cellules CD4 T_N CD5^{Hi} est à réaliser afin d'étudier leur implication dans la voie Erk, l'expression de l'IL-2 ou encore la régulation de la voie mTOR.

Sur le plan fonctionnel, la différence de prolifération ou de sécrétion d'IL2 entre les CD4T_N CD5^{Hi} et CD5^{Low} ne sont pas retrouvées entre les cellules Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺. Selon notre hypothèse CD5 refléterait un Tonic Signaling récent tandis que Ly-6C serait le reflet de la chronicité. Il serait donc intéressant de tester les différentes fonctions entre les cellules CD4T_N Ly-6C⁻, Ly-6C⁺ et CD5^{Hi}, CD5^{Low} issues soit des ganglions lymphatiques soit du sang, où les cellules n'ont pas d'interaction avec le complexe pCMH. De plus nous avons démontré qu'après cinq jours de culture in vitro en IL-7, donc en absence d'interaction avec le Soi, les cellules Ly-6C⁻ se différenciaient toujours plus efficacement en iTregs que leurs homologues Ly-6C⁺. Nous pourrions réaliser cette même expérience en comparant les cellules CD5^{Hi} et CD5^{Low}. Pour aller plus loin, il serait intéressant de transférer ces sous population de lymphocytes T CD4⁺ naïfs dans des souris déficientes pour l'expression du CMH de classe II. Ainsi, nous pourrions étudier leurs fonctions après avoir été privé d'interaction avec le complexe pCMHII à plusieurs temps.

III. Foxo1 dans l'homéostasie et la fonction des CD4 T_N

1. Rôle de Foxo1 dans la polarisation en iTreg

Les facteurs de transcription de la famille Foxo, en particulier Foxo1 et Foxo3, sont maintenant connus pour jouer un rôle important dans la régulation du développement et de l'homéostasie du système immunitaire adaptatif (Dejean et al., 2011; Hedrick, 2009). Dans les lymphocytes T, Foxo1 est impliqué dans la survie des cellules naïves via la régulation de l'expression de la chaîne α du récepteur à IL-7, ou encore dans la migration et le homing en régulant l'expression de CD62L et CCR7 (Kerdiles et al., 2009). En effet, chez la souris CD4^{Cre} Foxo1^{ff} on observe une diminution importante des cellules CD4 T_N, en faveur de cellules mémoires effectrices (Kerdiles et al., 2010). D'un point de vue fonctionnelle il a récemment été démontré que Foxo1 inhibe le programme de différenciation en Th17, en se liant directement à ROR γ t (Lainé et al., 2015). Concernant la différenciation iTreg, l'équipe de SM. Hedrick a montré que les CD4 T_N dépourvues de Foxo1 sont incapables de se différencier en iTregs (Kerdiles et al., 2010). De manière similaire, nous observons que les CD4 T_N issues de souris Foxp3-GFP CD4^{Cre} Foxo1^{ff}

(Foxo1^{TKO}), se polarisent difficilement en iTreg suite à une stimulation TCR en présence de TGFβ seulement (Figure 30). Cependant nous avons observé, tout comme Kerdiles et al., que les cellules CD4 T_N déficientes pour Foxo1 produisent de grandes quantités d'IL-4 et d'IFNγ suite à une stimulation du TCR. Ces cytokines sont impliquées dans la différenciation Th2 et Th1 respectivement, mais inhibent également la différenciation Treg. L'ajout d'anticorps bloquant ces interleukines non seulement restaure leur capacité à se différencier en iTregs mais montre aussi une efficacité accrue des cellules déficientes pour Foxo1 à s'orienter vers ce lignage par rapport aux CD4 T_N Foxo1^{Ctrl} (Figure 30). La présence de Foxo1 au cours de la différenciation iTreg en présence des anticorps bloquant ne semble donc pas nécessaire à l'expression de Foxp3. Des études ont montré que le TGFβ inhibe le développement Th1 en inhibant l'induction de T-bet via l'IFNγ (Lin et al., 2005; Neurath et al., 2002). D'autres études menées sur des cellules non lymphoïdes indiquent que les TFs Foxo interagissent directement avec SMAD3 et 4 et régulent une partie de la voie TGFβ (Gomis et al., 2006; Seoane et al., 2004). De plus, dans leur étude Kerdiles et al. montrent que l'inhibition de T-bet par le TGFβ dans les cellules T CD4⁺ est dépendante de Foxo1 (Kerdiles et al., 2010). Ainsi, au cours de la différenciation iTreg des CD4 T_N de souris Foxo1^{TKO} et en accord avec nos résultats, Foxo1 semble requis pour inhiber l'effet de l'IL-4 et l'IFNγ.

2. Foxo1 et le Tonic Signaling

De manière intéressante, chez les souris Foxo1^{TKO} la proportion de Ly-6C⁻ parmi les cellules T CD4⁺ naïves est deux fois plus élevée que chez les souris Foxo1^{Ctrl} (Figure 29). Cela est en accord avec le fait que le pool de CD4 T_N issu de souris Foxo1^{TKO}, comportant 70% de cellules Ly-6C⁻, se polarise mieux en iTregs que le pool de CD4 T_N contrôle (en présence des anticorps αIL-4 et αIFNγ). De plus les CD4 T_N déficient pour Foxo1 ont un phénotype similaire aux cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ d'une souris sauvage (données non montrées). Cela est en accord avec l'analyse GSEA réalisée sur les CD4T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ révélant qu'une partie de leurs gènes est régulée par les facteurs de transcription Foxo (Figure 28). Foxo1 joue donc un rôle important dans la maturation périphérique des cellules T CD4⁺ naïves. Son absence totale ou encore une activité nucléaire constitutive sont cependant relativement néfastes. Les souris Foxo1^{TKO} ont une diminution du nombre de cellules naïves et récemment une étude a montré qu'une forme constitutivement active de Foxo1 entraîne une dérégulation dans l'homéostasie des CD4 T_N conventionnelles (Newton et al., 2018). Ainsi il semble qu'une activité oscillatoire de Foxo1 soit nécessaire pour l'homéostasie des CD4 T_N. Les cellules T CD4⁺ naïves les plus auto-

réactives (Ly-6C⁻) reçoivent un Tonic Signaling plus élevé que leurs homologues Ly-6C⁺. Une hypothèse serait que les cellules recevant un Tonic Signaling plus important ont un export nucléaire de Foxo1 plus fréquent, leur permettant d'acquérir une partie de leur phénotype.

Finalement nous nous sommes intéressés aux capacités de différenciation en iTreg des cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ déficientes pour l'expression de la protéine Foxo1. Chez la souris contrôle, les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ se polarisent plus efficacement en cellules Foxp3⁺ que leurs homologues Ly-6C⁺, comme nous l'avons précédemment montré. De façon inattendue, chez la souris Foxo1^{TKO} aucune différence n'est retrouvée entre les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺. De plus l'EC50 des cellules Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ Foxo1^{TKO} semble similaire à celui des cellules Ly-6C⁻ Foxo1^{Ctrl} (Figure 31). La différence entre les cellules issues de souris contrôles pourrait être attribuée un effet de Foxo1, envers les cytokines inhibitrices IL-4 et IFN γ (discuté au-dessus), plus important dans les CD4 T_N Ly-6C⁻. Cependant cette hypothèse a été rejetée car la différence entre les cellules Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ persiste en présence des anticorps bloquants α -IL-4 et α -IFN γ . Plusieurs hypothèses sont donc envisageables pour expliquer cette absence de différence entre les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ déficientes pour Foxo1. D'une part les CD4 T_N Foxo1^{TKO} ont un phénotype similaire au CD4 T_N Ly-6C⁻ Foxo1^{Ctrl} et nous avons vu que Foxo1 est impliqué dans l'homéostasie des lymphocytes T CD4⁺ naïfs et donc dans leur « maturation périphérique ». Ainsi, en périphérie les cellules CD4 T_N Ly-6C⁺ Foxo1^{TKO} pourraient exprimer une molécule, déjà présente dans leur homologue Ly-6C⁻, leur permettant de mieux répondre aux signaux de polarisation en iTreg. Une autre hypothèse serait que Foxo1 soit impliqué dans la régulation épigénétique de Foxp3, en induisant des modifications inhibitrices. Un Tonic Signaling plus important et plus fréquent dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs Ly-6C⁻, permettrait une sortie nucléaire plus importante de Foxo1 et ainsi une diminution de modifications épigénétiques inhibitrices au locus de Foxp3. Enfin la dernière hypothèse serait que Foxo1 est également un rôle inhibiteur, sur l'expression de Foxp3, au cours de la polarisation iTreg. Foxo1 serait alors exclu plus facilement dans les CD4 T_N Ly-6C⁻ leur permettant de mieux se différencier en cellules Foxp3⁺.

3. Perspectives

- L'effet de Foxo1 dans la « maturation périphérique » des CD4 T_N

Nous avons récemment réalisé une analyse de l'expression génique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs issus de souris Foxo1^{TKO} et Foxo1^{Ctrl}. La comparaison de ces données avec notre signature 6CSign nous donnera l'implication de Foxo1 sur l'expression des gènes induits par le Tonic

Signaling. De plus il serait intéressant d'obtenir le transcriptome des cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ déficientes pour Foxo1 pour affiner l'étude du Tonic Signaling. Ces données pourraient également nous renseigner sur la ou les cible(s) de Foxo1 impliquée(s) dans la différenciation en iTregs.

- Foxo1 et différenciation iTreg

Les régulations épigénétiques, méthylation de l'ADN et modifications d'histones, jouent un rôle important dans la régulation de Foxp3. Une étude a montré qu'Ezh2, qui fait partie du complexe PCR2, est recruté au niveau du promoteur de Foxp3 et induit la triméthylation de l'histone H3K27, une marque d'histone inhibitrice (Xiong et al., 2012). De plus, Foxo1 a récemment été décrit comme pouvant interagir avec Ezh2. La différence observée, sur la différenciation iTreg, entre les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺, pourrait être due à une régulation épigénétique de Foxp3 différente. Les cellules Ly-6C⁻, avec un Tonic Signaling plus fort, pourraient exporter plus facilement et fréquemment Foxo1 du noyau, inhibant l'effet d'Ezh2. L'analyse de la méthylation de l'ADN et des marques d'histones au niveau du locus de Foxp3 dans les CD4 T_N plus ou moins auto-réactives pourrait nous apporter une réponse.

L'autre hypothèse étant que Foxo1 joue un rôle inhibiteur sur Foxp3 au cours de la différenciation iTreg, plusieurs expériences sont à envisager. Tout d'abord, un test de polarisation des CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ en présence d'un inhibiteur de Foxo1 pour valider l'implication de ce dernier dans l'expression de Foxp3. Dans l'idée également de supprimer Foxo1 dans les CD4 T_N pour étudier son effet lors de la différenciation, nous pourrions utiliser une technique innovante récemment mis au point par A. Seki et S. Rutz. Basé sur la technologie CRISPR/Cas9 cette technique permet d'éteindre l'expression d'un gène dans les cellules T primaires sans activation préalable et avec une efficacité importante (Seki and Rutz, 2018). Appliquer cette technique sur les CD4 T_N Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ pour éteindre Foxo1 et tester ensuite leur capacité de différenciation en iTregs peut être une alternative très intéressante.

Foxo1 semblant jouer un rôle majeur dans les phénomènes que nous étudions, il serait important d'en documenter précisément la régulation, la phosphorylation et la localisation, dans nos sous populations d'intérêt, à la fois à l'état basal mais aussi au cours de la polarisation en iTregs.

CONCLUSION

En périphérie, la chronicité des rencontres avec le complexe pCMHII permet aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs de recevoir un Tonic Signaling nécessaire à leur survie et à leurs fonctions. Les cellules CD4 T_N Ly-6C⁻ étant plus auto-réactives bénéficient d'un Tonic Signaling, différent de leurs homologues Ly-6C⁺, leur permettant d'être plus sensibles aux signaux de différenciation en cellules T régulatrices. Parmi les signaux induits par le Tonic Signaling, nos résultats montrent l'importance de la voie calcique, en particulier celle dépendante de la calcineurine, dans l'acquisition du phénotype et des fonctions des cellules T CD4⁺ naïves.

De plus, nous avons mis en évidence le rôle majeur du facteur de transcription Foxo1 dans les phénomènes que nous étudions et en particulier au cours de la polarisation des CD4 T_N en iTregs.

ANNEXES

Article 2

Profiling the lymphoid-resident T cell pool reveals modulation by age and microbiota.

Nature Communications volume 9, Article number: 68 (2018).

Aurélie Durand, Alexandra Audemard-Verger, Vincent Guichard, Raphaël Mattiuz, Arnaud Delpoux, Pauline Hamon, Nelly Bonilla, Matthieu Rivière, Jérôme Delon, Bruno Martin, Cédric Auffray, Alexandre Boissonnas & Bruno Lucas.


En dépit de leur implication dans les tissus non lymphoïdes, les lymphocytes T non-circulants peuvent également exister dans les organes lymphoïdes secondaires (SLO). Cependant, une caractérisation détaillée de ce pool de lymphocytes T lymphoïdes résidants n'a pas encore été effectuée. Nous montrons ici qu'une proportion importante de cellules CD4 régulatrices (Treg) et mémoires (Tmem) établit une résidence à long terme dans les SLOs de souris exemptes d'organismes pathogènes spécifiques. Parmi ces SLOs, seule la résidence des cellules T dans les plaques de Peyer est affectée par le microbiote. Les cellules CD4 Tregs et CD4 Tmems résidentes des ganglions lymphatiques et des tissus non lymphoïdes partagent de nombreuses caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles. Le pourcentage de lymphocytes T résidants dans les SLOs augmente considérablement avec l'âge, la diminution de S1PR1 pouvant contribuer à cette altération de l'homéostasie. Nos résultats montrent ainsi que la résidence des lymphocytes T n'est pas seulement une caractéristique des tissus non lymphoïdes, elle peut également être étendue aux organes lymphoïdes secondaires.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-02458-4

OPEN

Profiling the lymphoid-resident T cell pool reveals modulation by age and microbiota

Aurélie Durand¹, Alexandra Audemard-Verger¹, Vincent Guichard^{1,2}, Raphaël Mattiuz¹, Arnaud Delpoux ¹, Pauline Hamon³, Nelly Bonilla¹, Matthieu Rivière¹, Jérôme Delon¹, Bruno Martin¹, Cédric Auffray¹, Alexandre Boissonnas³ & Bruno Lucas¹

Despite being implicated in non-lymphoid tissues, non-recirculating T cells may also exist in secondary lymphoid organs (SLO). However, a detailed characterization of this lymphoid-resident T cell pool has not yet been done. Here we show that a substantial proportion of CD4 regulatory (Treg) and memory (Tmem) cells establish long-term residence in the SLOs of specific pathogen-free mice. Of these SLOs, only T cell residence within Peyer's patches is affected by microbiota. Resident CD4 Treg and CD4 Tmem cells from lymph nodes and non-lymphoid tissues share many phenotypic and functional characteristics. The percentage of resident T cells in SLOs increases considerably with age, with S1PR1 downregulation possibly contributing to this altered homeostasis. Our results thus show that T cell residence is not only a hallmark of non-lymphoid tissues, but can be extended to secondary lymphoid organs.

¹Paris Descartes Université, Sorbonne Paris Cité, Institut Cochin CNRS UMR8104, INSERM U1016, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

²Paris Diderot Université Sorbonne Paris Cité, 75013 Paris, France. ³Pierre et Marie Curie Université (UPMC), Sorbonne Universités, INSERM U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Aurélie Durand and Alexandra Audemard-Verger contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.L. (email: bruno.lucas@inserm.fr)

It has been hypothesized that peripheral T cells recirculate continuously between lymphoid organs to scan antigen presenting cells (APC) for the presence of foreign antigens. Such a model has been challenged in the last decade by numerous reports demonstrating the existence of T cells residing in non-lymphoid tissues, mostly memory CD8 T cells (CD8 Tmem cells)¹. Indeed, results from tissue graft and parabiosis experiments have demonstrated the resident nature of a substantial proportion of CD8 Tmem cells found in several tissues, including skin, intestine, brain, lungs and salivary glands¹. A study showed that, for a given specificity, memory T cells residing in non-lymphoid tissues outnumber their circulating cell-counterparts². Although the existence of tissue-resident memory T cells is best documented for CD8 T cells, non-recirculating subsets of CD4 memory T (CD4 Tmem) cells have also been described³. Finally, tissue-resident regulatory CD4 T (CD4 Treg) cells have been found in multiple tissues, including the skin, muscle, lungs, adipose tissue, and intestine^{4,5}. Resident memory T cells may represent a first line defense against pathogens at sites of infection, whereas resident CD4 Treg cells may ensure tissue integrity by dampening T cell responses to self antigens and commensal bacteria antigens, and by controlling crosstalks between immune and non-immune cells^{6–8}; for example, skin resident CD4 Treg cells crosstalk with hair follicle stem to modulate skin wound healing and hair regeneration^{9,10}.

Resident T cells have been extensively studied within non-lymphoid tissues. However, there is now evidence that resident T cells might also exist within secondary lymphoid organs (SLO)⁸. In humans, it was shown that, in spleen, lymph nodes (LN), and tonsils, a significant fraction of CD4 and CD8 Tmem cells phenotypically resembles resident T cells within non-lymphoid tissues, and that, at least for CD8 T cells, they included cells with defined specificity for EBV and CMV^{11–13}. The existence of a subset of effector CD4 Tmem cells retained in mouse SLOs that accumulated after immunization or in response to chronic antigen exposure has been suggested using photoconvertible fluorescence reporters^{14–17}, with the implicated resident T cell subsets including follicular helper CD4 T cells^{15,17} and populations of innate-like $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells expressing CCR6 and high surface levels of CD127¹⁶. Retention of CD8 Tmem cells within draining mediastinal LNs after lung infections and within spleen and LNs after LCMV acute infection in mice has also been shown^{18,19}.

We and others have recently shown that interactions between TCR and self peptides/self MHC class II complexes help retain, at least temporarily, CD4 T cells in mouse LNs^{20–22}. Using two different experimental approaches, here we show the long-term residence of a substantial proportion of CD4 Treg and CD4 Tmem cells in the SLOs of specific pathogen-free (SPF) mice. By contrast, CD8 Tmem cells are retained only in Peyer's patches. Microbiota has important function in T cell residence in Peyer's patches, but only a minor one, if any, in LNs. LN-resident CD4 Treg and CD4 Tmem cells share many phenotypic and functional characteristics, including a core transcriptional profile, with their counterparts from non-lymphoid tissues. In particular, S1PR1 downregulation may represent the main mechanism accounting for T cell residency within SLOs. Strikingly, T cell residence increases with age, with the majority of CD4 Treg and Tmem cells in the LNs being resident but not circulating T cells in old mice.

Results

A proportion of T cells is retained in the SLOs of SPF mice. To study T cell residence within SLOs, we first generated CD45.1/CD45.2 parabiotic mice and analyzed them 4 weeks after surgery (Fig. 1a). Throughout this study, CD4 Treg cells were defined as Foxp3⁺CD4⁺CD8 α [–]TCR β ⁺ cells, CD4 Tmem cells as

CD44^{hi}Foxp3[–]CD4⁺CD8 α [–]TCR β ⁺ cells, and naive CD4 T cells as CD44^{–/low}Foxp3[–]CD4⁺CD8 α [–]TCR β ⁺ cells (Fig. 1b). CD44 expression was also used to discriminate between naive and memory CD8 T cells (Fig. 1b). Interestingly, unlike naive CD4 and CD8 T cells, CD45.1⁺ and CD45.2⁺ CD4 Tmem and CD4 Treg cells were not equally distributed in all studied SLOs (including Peyer's patches and the spleen) with a consistent enrichment in host-derived cells (CD45.1⁺ cells in the CD45.1 parabiont and CD45.2⁺ cells in the CD45.2 parabiont, Fig. 1c–e). Such a phenomenon was observed for CD8 Tmem cells only in Peyer's patches. Similar results were found when parabiotic mice were studied 2 months after surgery (Supplementary Fig. 1a). We have recently shown that Ly-6C expression allows to discriminate between memory and naive CD4 Treg cells with Ly-6C[–] cells corresponding to memory CD4 Treg cells²². Using this marker, we then tested whether the unequal redistribution of CD4 Treg cells between the two parabionts was differential between the naive and memory subpopulations. Interestingly, we found that among CD4 Treg cells, only Ly-6C[–] CD4 Treg cells were enriched in cells deriving from their host in all SLOs tested (Fig. 1f). Similar results were obtained by using, as proposed by Smigiel et al.²³, the expression level of CD44 to discriminate between naive (CD44^{low}) and memory (CD44^{high}) CD4 Treg cells (Supplementary Fig. 1b). Altogether, these results suggest that a significant proportion of memory regulatory and conventional T cells are residing for at least several weeks within the SLOs of SPF mice.

To confirm our hypothesis, we then blocked T cell entry into LNs and Peyer's patches through the i.p. injection of mAbs specific to VLA-4 and LFA-1 as previously described²⁰, and first studied the cells remaining in these SLOs 24 h after initiating the treatment (Fig. 2a). At this time-point, most CD4 and CD8 T cells have exited the LNs and accumulated in the spleen (Supplementary Fig. 2a, b). Interestingly, CD4 Treg and CD4 Tmem cells were greatly enriched in the remaining LN CD4 T cells (Fig. 2b). Consistent with the results obtained in parabiotic mice, 24 h after mAb injection, enrichment in CD8 Tmem cells was clearly observed within Peyer's patches (Fig. 2c). We then blocked T cell entry into LNs for 7 days by repeating the mAb treatment every 2 days (Fig. 2d). This protocol led to a gradual increase of the proportion of CD4 Treg and CD4 Tmem cells within the CD4 T cells remaining in LNs, and a concomitant decrease of the percentage of naive CD4 T cells (Fig. 2e). More precisely, whereas naive T cells pursued exiting LNs at least until day 4, the absolute numbers of LN CD4 Treg and Tmem cells remained almost stable (Fig. 2f and Supplementary Fig. 2c).

Thus, using two different experimental approaches, we obtained data suggesting strongly that a substantial proportion of CD4 Treg cells and of CD4 Tmem cells are not continuously recirculating through the SLOs of SPF mice, but rather reside for long periods of time in them. This unexpected result seems to apply to CD8 Tmem cells, in Peyer's patches only.

The proportion of LN-resident CD4 T cells increases with age.

Surprisingly, whereas the proportions of CD4 Treg cells and Tmem cells strongly increase with age in SLOs, the composition of the blood remains quite unchanged (Fig. 3a). This led us to suggest that the qualitative changes with age of the CD4 T cell pool in SLOs may reflect an increase with age in the proportion of resident CD4 Treg cells and CD4 Tmem cells. To test this hypothesis, we applied the mAb treatment described above to young and old mice and analyzed the results as a function of their age (Fig. 3b). Two days after treatment, whereas the CD4 Treg and Tmem cells remaining in LNs represent <25% of the corresponding pools in 4-week-old animals, these proportions rise to

50–75% in 1-year-old mice. For each experiment, we then calculated the proportion of circulating CD4 Treg cells and of CD4 Tmem cells among LN CD4 T cells by subtracting the numbers of cells recovered 2 days after treatment from the total number of

these cells recovered from LNs (Fig. 3c, d; see Experimental procedures). Interestingly, by doing so, we observed that the corrected proportion of circulating CD4 Treg cells did not vary with age in LNs as observed in the blood. The increase in the

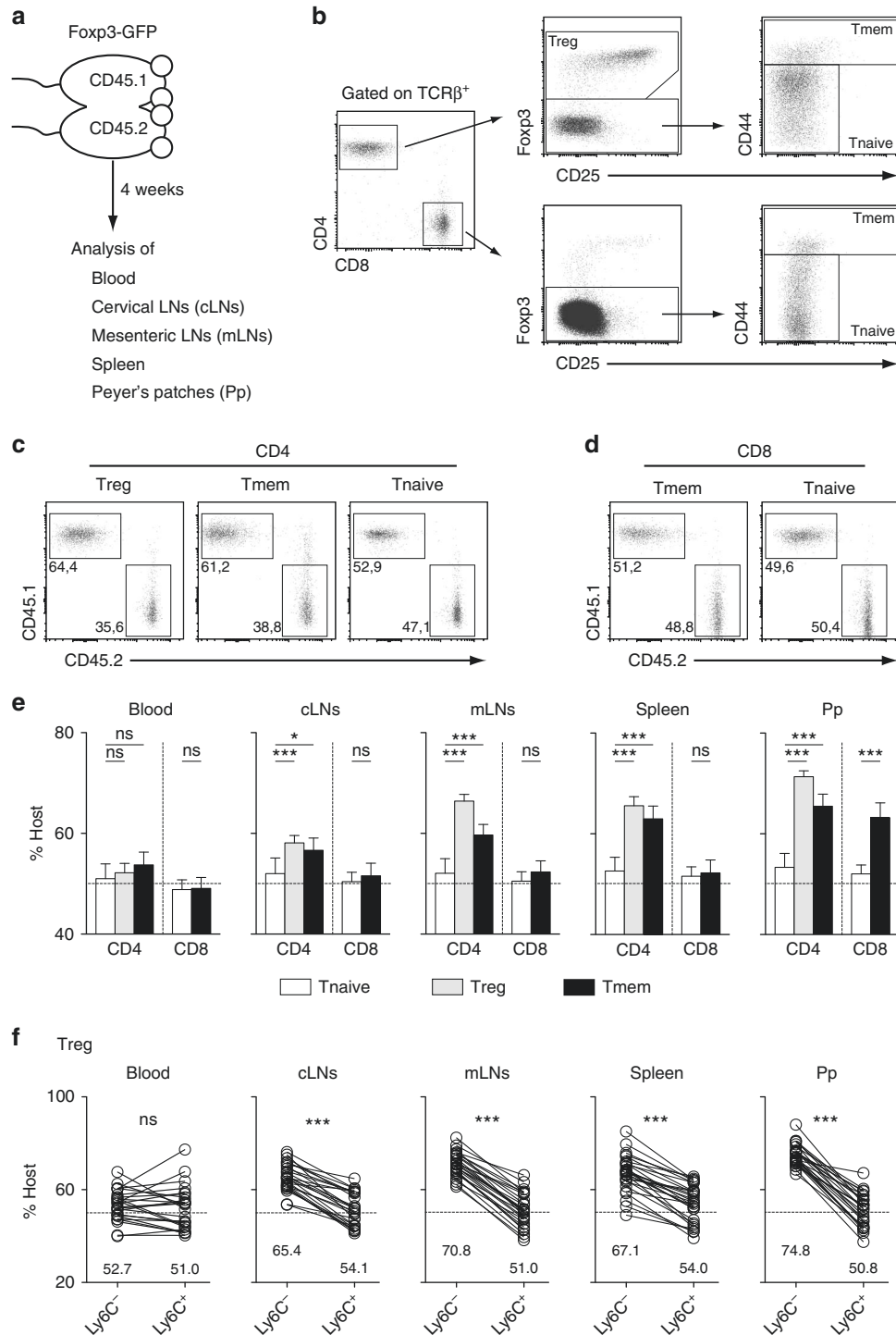


Fig. 1 Analysis of mouse parabionts reveals the long-term residence of T cell populations in SLOs. Four weeks after parabiosis surgery, blood, cervical LNs (cLNs), mesenteric LNs (mLNs), spleen, and Peyer's patches (Pp) were recovered and analyzed. **a** Diagram illustrating the experimental model. **b** Gating strategy to define naïve (Tnaive), memory (Tmem) and regulatory (Treg) CD4 and CD8 T cells. **c** CD45.1/CD45.2 dot-plots are shown for mLN CD4 Treg, Tmem and Tnaive cells from a representative CD45.1 parabiont. **d** CD45.1/CD45.2 dot-plots are shown for mLN CD8 Tmem and Tnaive cells from a representative CD45.1 parabiont. **e** Proportions of host cells (CD45.1⁺ for the CD45.1 parabiont and CD45.2⁺ for the CD45.2 parabiont) among the indicated CD4 T cell and CD8 T cell subsets recovered from blood, cLNs, mLNs, Spleen, and Pp are shown for at least ten parabiotic pairs from three independent experiments (mean ± SEM; paired t-test). **f** Proportions of host cells among Ly6C⁻ and Ly6C⁺ CD4 Treg cells. Each pair of dots represents an individual mouse (paired t-test). *p < 0.05, ***p < 0.001. ns not significant

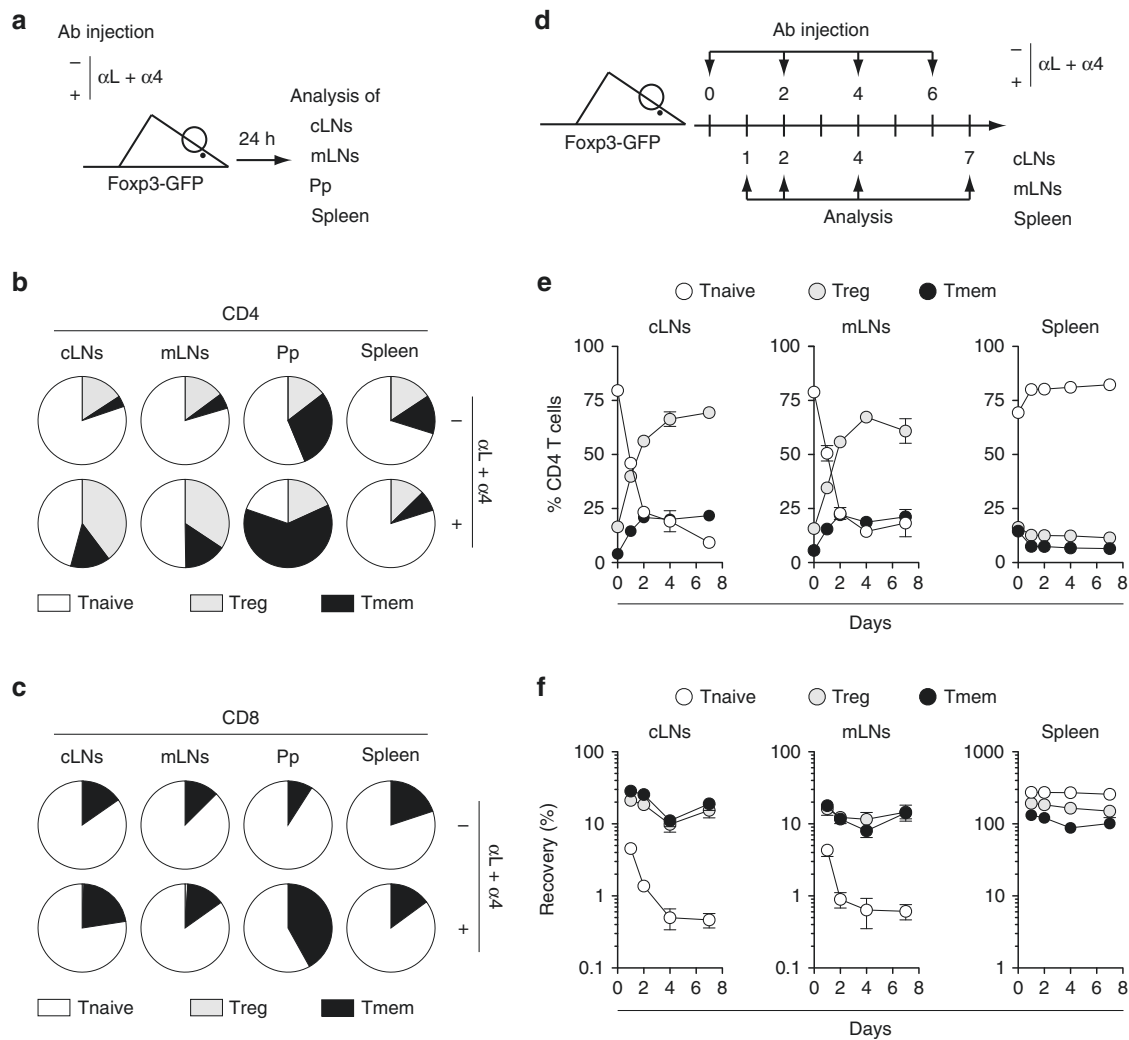


Fig. 2 Analysis of residual T cells after blocking T cell entry into LNs and Peyer's Patches. **a–c** 6–12-week-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs. Twenty-four hours later, cLNs, mLNs, Pp, and spleen were harvested and analyzed. **a** Diagram illustrating the experimental model. **b** Distribution of Treg, Tmem, and Tnaive cells among CD4 T cells in the indicated SLOs of treated or untreated mice. **c** Distribution of Treg, Tmem, and Tnaive cells among CD8 T cells in the indicated SLOs of treated or untreated mice. **d, e** 6–12-week-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs every 2 days from day 0 to day 6 and SLOs were recovered for analysis at various time-points. **d** Experimental model. **e** Percentages of Treg, Tmem, and Tnaive cells among CD4 T cells are shown as means \pm SEM for the indicated SLOs. **f** Relative absolute numbers of CD4 Treg, Tmem, and Tnaive cells in cLNs, mLNs, and spleen are shown. The percentage of recovery was calculated by dividing the absolute numbers in treated mice by the mean absolute number obtained in untreated animals. Data are means \pm SEM for at least three independent experiments. Mouse clip arts were generated in ref. ²¹

proportion of LN CD4 Tmem cells was also reduced when the correction factor was applied. Thus, the proportion of LN-resident CD4 Treg and Tmem cells increases with age to represent the majority of these cells in old mice.

LN-resident CD4 T cells exhibit an effector phenotype. We then analyzed the phenotype of CD4 T cells remaining within LNs 2 days after anti-VLA-4 and anti-LFA-1 mAb injection in 6–12-week-old mice. For simplicity's sake, we will refer to these cells as “day 2 CD4 T cells”. Day 2 CD4 Treg and CD4 Tmem cells exhibited decreased expression of CD62L, CD127, and CCR7 when compared to their counterparts from untreated mice in both peripheral LNs (pLN; Fig. 4a) and mesenteric LNs (mLN; Supplementary Fig. 3a). In line with this effector phenotype, day 2 CD4 Treg cells from both pLNs and mLNs contained a higher proportion of cycling cells (as assessed by Ki-67 staining) than CD4 Treg cells from untreated mice (Fig. 4b and Supplementary Fig. 3b). A weak increase in the percentage of Ki-67-expressing

cells was observed for CD4 Tmem cells in mLNs only. Upon a 2 h re-stimulation with PMA and ionomycin, about three times more day 2 LN CD4 Treg cells were able to produce IL-10 than LN CD4 Treg cells from untreated animals (Fig. 4c and Supplementary Fig. 3c). Similarly, day 2 LN CD4 Tmem cells were enriched in cytokine-producing cells (especially IL-17) when compared to control LN CD4 Tmem cells. We then divided the absolute number of day 2 CD4 T cells producing a given cytokine by the number of CD4 T cells from untreated mice producing the same cytokine. Interestingly, the results obtained suggest that nearly all IL-10⁺ CD4 Treg cells and almost all IL-17⁺ CD4 Tmem cells are in fact LN-resident T cells (Fig. 4d and Supplementary Fig. 3d). Of note, integrin engagement by monoclonal antibodies prior to re-stimulation with PMA and ionomycin does not potentiate the ex vivo ability of T cells to produce cytokines (Supplementary Fig. 4).

Finally, we studied more extensively the phenotype of day 2 CD4 Treg cells (Supplementary Fig. 5). We first confirmed the

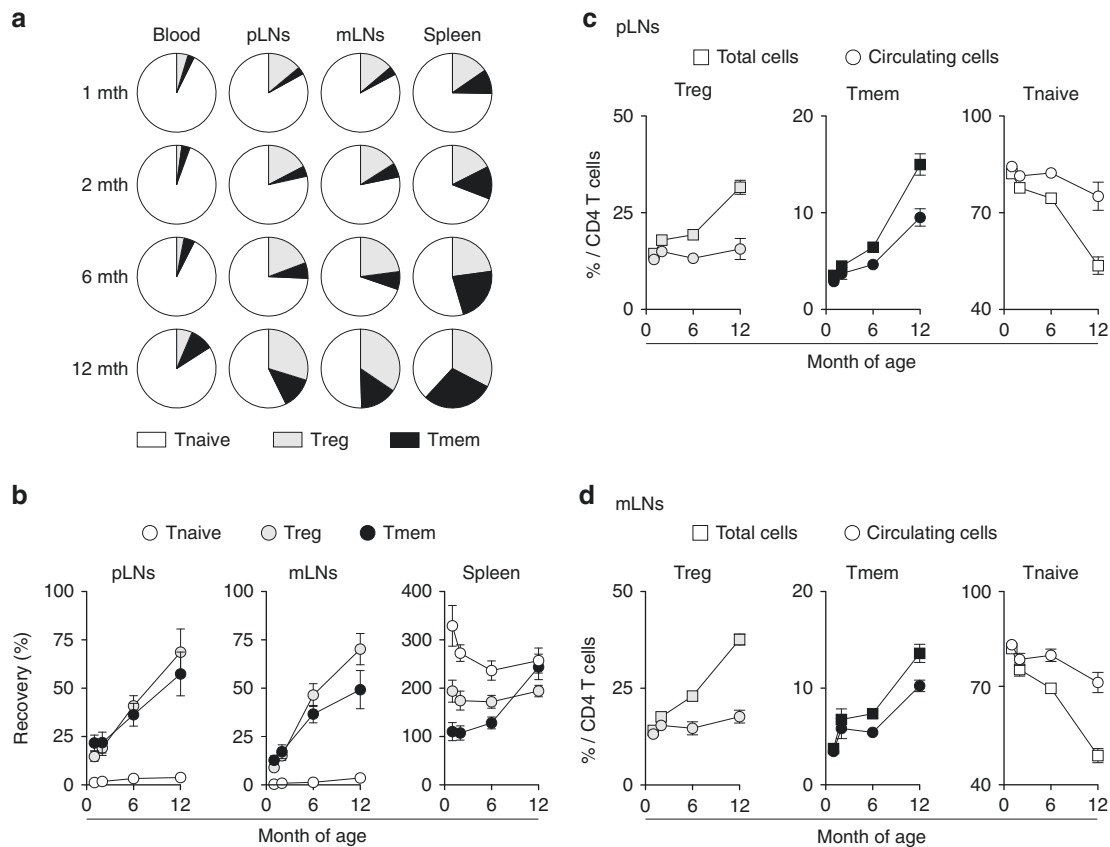


Fig. 3 T cell residence in SLOs increases with age in SPF mice. **a** Distribution of Treg, Tmem, and Tnaive cells among CD4 T cells in blood, pLNs (pooled superficial cervical, axillary, brachial, and inguinal LNs), mLN, and spleen of 1–12-month-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice. **b** C57BL/6 Foxp3-GFP mice of various ages were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs. Forty-eight hours later, blood, pLNs, mLN, and spleen were harvested and analyzed. Relative absolute numbers (recovery) of CD4 Treg, Tmem, and Tnaive cells in the indicated SLOs are shown as means \pm SEM as a function of mouse age. **c, d** Percentages of Treg, Tmem, and Tnaive cells among total or “circulating” CD4 T cells are shown as means \pm SEM for the indicated SLOs (see the experimental procedures for calculations)

memory phenotype of these cells as they were expressing high surface amounts of CD44 and were not expressing Ly-6C^{22,23}. We then examined the expression of molecules known to play a role in the suppressive capacities of CD4 Treg cells. All tested molecules, except CD25, were found to be upregulated in day 2 LN CD4 Treg cells when compared to LN CD4 Treg cells from control mice (Supplementary Fig. 5).

Altogether, our results show that day 2 LN CD4 Treg and Tmem cells have an effector phenotype that correlates with their increased ability to produce cytokines upon re-stimulation.

Microbiota affects T cell residence in Peyer’s patches. We hypothesized that CD4 T cells residing in SLOs would be receiving more TCR signals than the bulk of CD4 T cells and that these signals might convert/maintain them in an effector state. The lack of Ly-6C expression of day 2 CD4 Treg cells fits with this hypothesis (Supplementary Fig. 5). Indeed, we have recently shown that Ly-6C downregulation by peripheral memory/effector CD4 Treg cells resulted from interactions with self MHC class II molecules²². To go further, we studied the expression of CD5 and Nur77, two molecules whose levels of expression have been shown to reflect TCR engagement^{24–26}. Both molecules were found to be upregulated in day 2 CD4 Treg and CD4 Tmem cells in both pLNs and mLN (Fig. 5a, b and Supplementary Fig. 6a, b). Collectively, these results strongly suggest that day 2 CD4 Treg and Tmem cells interact more strongly with MHC class II-expressing cells in SLOs than their circulating counterparts.

To determine the relative contribution of microbiota- and self antigen-derived peptides in the retention of T cells within SLOs, we first studied germ free mice (Fig. 5c). The total cell numbers in pLNs and mLN were comparable between Germ free and SPF mice whereas the cellularity of Peyer’s patches was strongly reduced in germ free mice when compared to SPF mice (Fig. 5d). In agreement, the recovery of day 2 CD4 Treg and Tmem cells was only slightly reduced in pLNs and not affected in mLN (Fig. 5e). By contrast, 2 days after mAb injection, cell recovery was strongly diminished in the Peyer’s patches of germ free mice when compared to control mice for both CD4 and CD8 Tmem cells (Fig. 5f). Although not significant, a similar tendency seems to apply to CD4 Treg cells. These results were largely confirmed in mice treated with a combination of antibiotics for 4 weeks before blocking T cell entry into LNs and Peyer’s patches (Supplementary Fig. 6c–f). In this setting, although the total cellularity as well as the absolute numbers of CD4 Treg and Tmem cells were slightly reduced in the pLNs of antibiotic treated mice, the absolute numbers of day 2 CD4 Treg and Tmem cells were not affected by the antibiotic treatment in both pLNs and mLN. Two days after mAb injection, cell recovery was strongly diminished in Peyer’s patches for CD4 Treg cells and for both CD4 and CD8 Tmem cells (Supplementary Fig. 6f). Microbiota thus seems to have an important impact on T cell residence in Peyer’s patches but only a small or no role in LNs.

Transcriptional signature of LN-resident CD4 T cells. We then decided to compare the transcriptome of day 2 LN CD4 Treg and

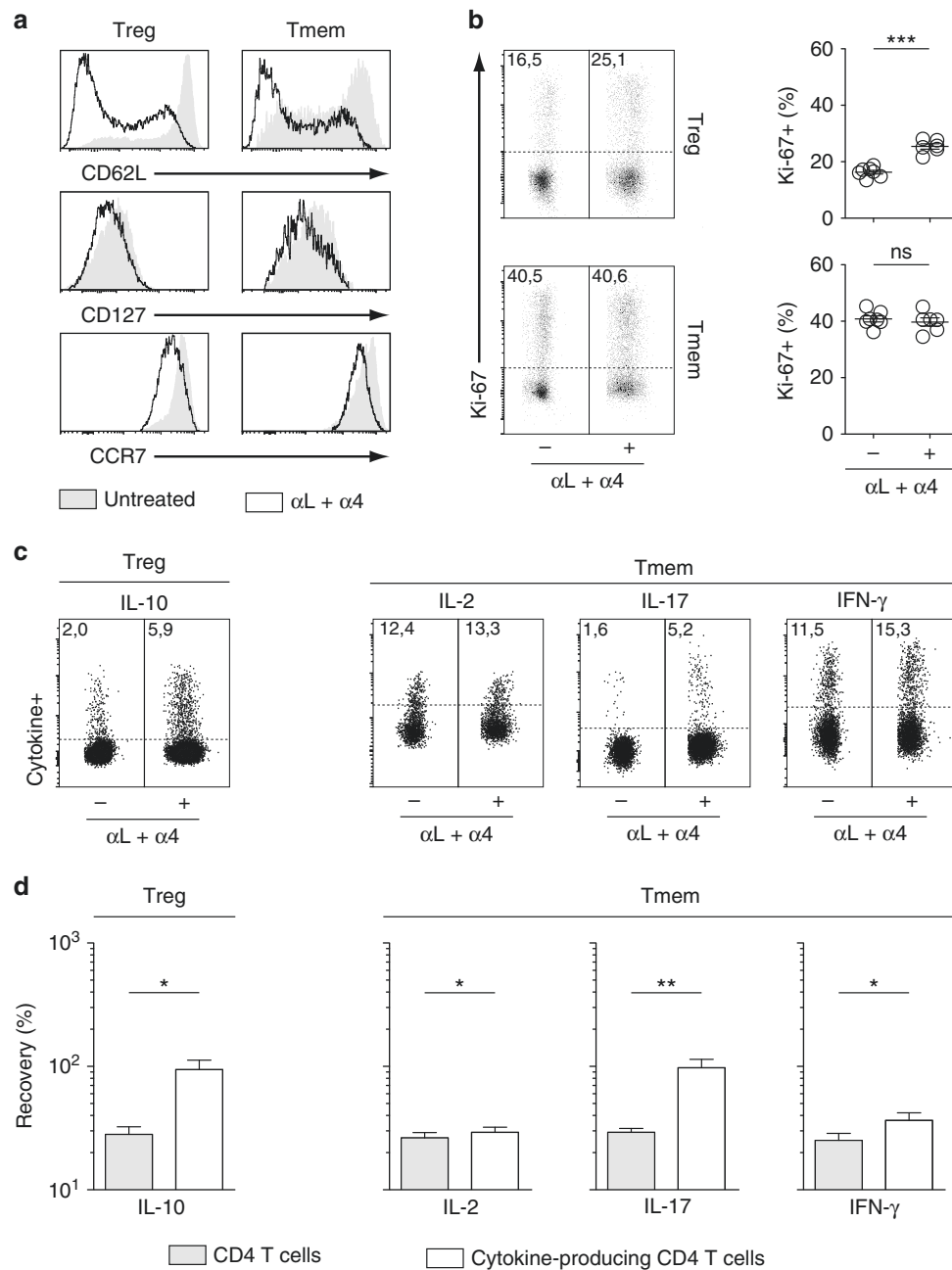


Fig. 4 pLN-resident CD4 T cells exhibit an effector phenotype. 6–12-week-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs. Forty-eight hours later, pLNs were harvested and analyzed. **a** CD62L, CD127, and CCR7 fluorescence histograms of CD4 Treg and CD4 Tmem cells from a representative treated and a representative control C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. **b** Representative Ki-67 expression by CD4 Treg and CD4 Tmem cells from treated and control mice. Quantification is shown on the right side of the panel (unpaired *t*-test). Each dot represents an individual mouse. **c** Representative IL-10 expression by CD4 Treg cells and representative IL-2, IL-17, and IFN- γ expression by CD4 Tmem cells from treated and control mice. **d** Quantification of cytokine production by CD4 Treg and Tmem cells is shown as means \pm SEM with paired *t*-test. The percentage of recovery for a given cytokine was calculated by dividing the absolute numbers of cells expressing this cytokine in treated mice by the mean absolute number of cells expressing this same cytokine in untreated animals (white bars). The gray bars correspond to the recovery of total CD4 Treg or CD4 Tmem cells in the same samples. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. ns not significant

Tmem cells to the transcriptome of the corresponding CD4 T cells from unmanipulated animals. With a fold change cut-off of ≥ 1.5 and a *p*-value cut-off of ≤ 0.05 , we found that 398 genes were differentially expressed in day 2 CD4 Treg cells and 381 in day 2 CD4 Tmem cells, when compared to their cell-counterparts from control mice (Supplementary Fig. 7a).

We then further compared our transcriptomic signatures to transcriptomic signatures from the literature characterizing CD4

Treg and Tmem cells residing in non-lymphoid tissues as done recently by Haskett et al.²⁷. Data sets were filtered to common probes. Interestingly, day 2 LN CD4 Treg and Tmem cells shared the expression of many genes specific to resident CD4 Treg and Tmem cells from non-lymphoid tissues, such as muscle²⁸, (Fig. 6a, b) and visceral adipose tissue (VAT)²⁹, (Supplementary Fig. 7b, c). Indeed, most genes overexpressed in CD4 Treg cells from muscle and VAT were found to be upregulated in day 2 LN CD4

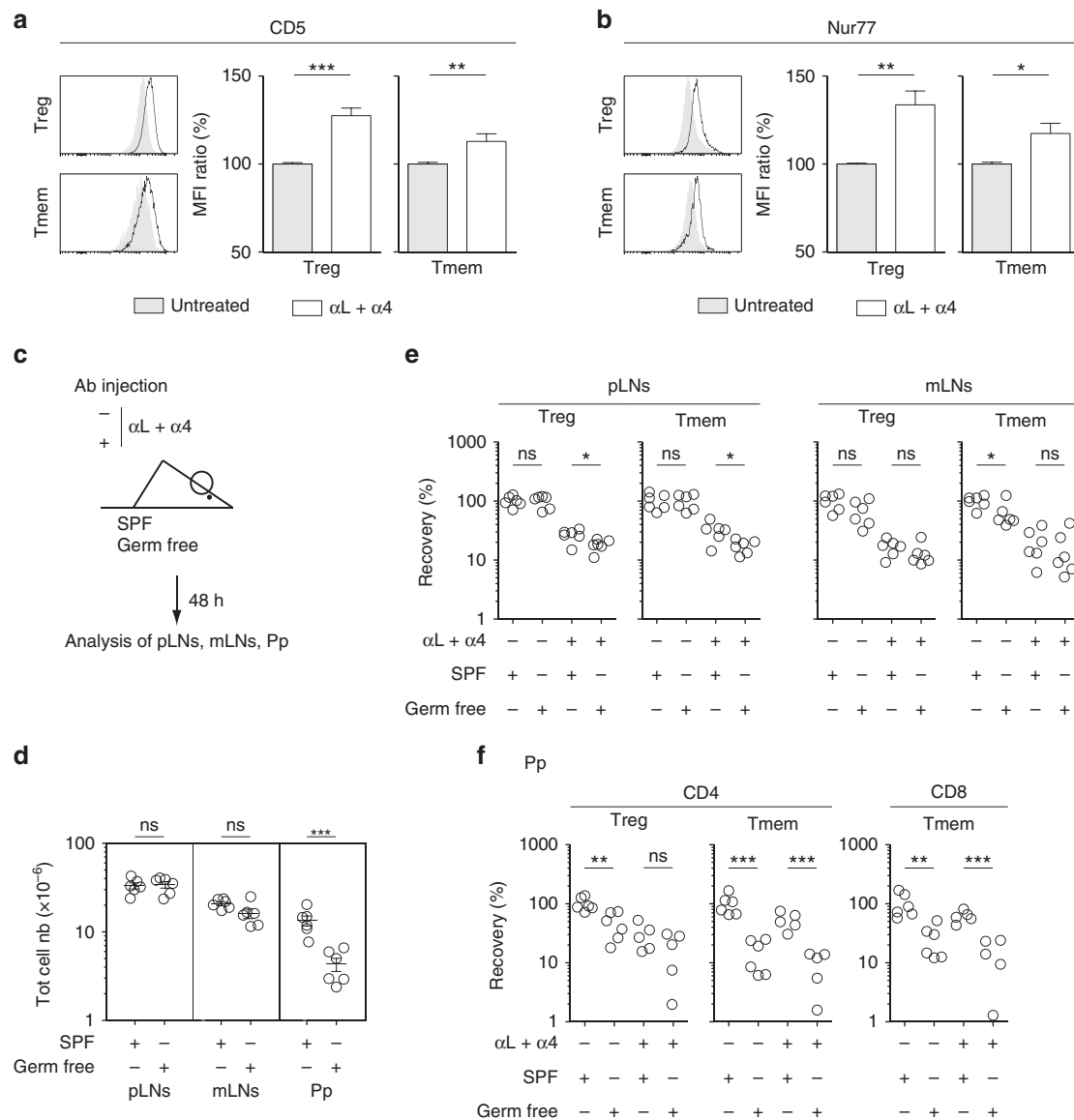


Fig. 5 Assessing the relative role of self antigens and microbiota in T cell residence in SLOs. **a–c** 6–12-week-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (αL) and anti-VLA-4 ($\alpha 4$) Abs. Forty-eight hours later, peripheral lymph nodes (pLN) were harvested and analyzed. CD5 (**a**) and Nur77 (**b**) fluorescence histograms of CD4 Treg and CD4 Tmem cells from the pLNs of a representative treated and a representative control C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. Quantification is shown as means \pm SEM with unpaired *t*-test on the right part of these panels. **c–f** 6–8-week-old SPF or germ-free C57BL/6 mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (αL) and anti-VLA-4 ($\alpha 4$) Abs. Forty-eight hours later, SLOs were harvested and analyzed. **c** Diagram illustrating the experimental model. **d** Total cell numbers recovered from pLNs, mLN, and Peyer’s patches (Pp) of SPF or germ-free mice. **e** Recovery of CD4 Treg and CD4 Tmem cells in pLNs and mLN. **f** Recovery of CD4 Treg, CD4 Tmem and CD8 Tmem cells in Peyer’s patches (Pp). Each dot represents an individual mouse (unpaired *t*-test). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. ns not significant. Mouse clip arts were generated in (21)

Treg cells. Similarly, genes downregulated in CD4 Treg cells from muscle and VAT were mostly less expressed in day 2 LN CD4 Treg cells than in LN CD4 Treg cells from control mice (Fig. 6a and Supplementary Fig. 6b). Similar results were obtained with CD4 Tmem cells (Fig. 6b and Supplementary Fig. 7c).

Out of 327 genes, 109 were differentially expressed between day 2 and control LN CD4 Treg cells, and 53 out of 308 genes for CD4 Tmem cells (for this comparison, data sets were filtered to common probes and a fold change cut-off of ≥ 1.5 was used) were also part of the transcriptomic profiles of muscle and VAT CD4 Treg and CD4 Tmem cells respectively (Fig. 6c, d). Thus, 33% and 17% of differentially expressed genes in day 2 LN CD4 Treg and Tmem cells respectively, were also part of the transcriptional profile of their muscle and VAT cell-counterparts. Overall, those transcripts distinguished resident CD4 T cells from their

circulating cell-counterparts, and thus represented the core transcriptional signature of resident CD4 Treg and Tmem cells, whatever the tissue (lymphoid or non-lymphoid) they originated from. Among these common genes, several chemokine and cytokine receptor genes were found, including *S1pr1*, *Ccr2*, and *Ccr8* for CD4 Treg cells and *Ccr2*, *Il10ra*, *Il18r1*, and *Il2rb* for CD4 Tmem cells (Fig. 6e, f).

S1PR1 downregulation accounts for T cell residence in SLOs.

One of the transcripts with a difference in expression between day 2 LN CD4 Treg cells and their cell-counterparts from untreated mice, encodes the receptor S1PR1, which controls the entry of T cells into the lymphatics and thus their exit from SLOs³⁰. We therefore decided to analyze its involvement in CD4 T cell

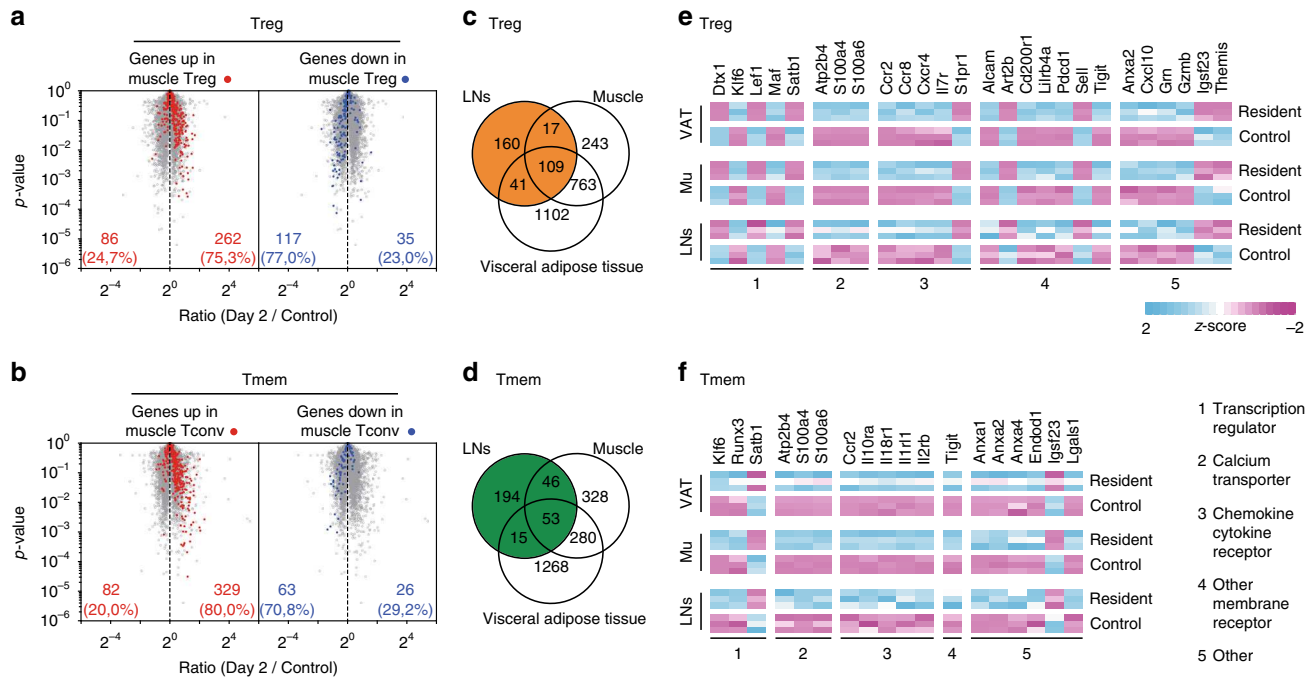


Fig. 6 Gene expression profiling of LN-resident CD4 Treg and Tmem cells. **a** “Volcano plot” representation (\log_2 (ratio) versus \log_{10} (*t* test *p* value)) between day 2 and control LN CD4 Treg cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice. Among the 500 genes the most differentially expressed between muscle and control CD4 Treg cells with a *P* value of <0.05 , upregulated and downregulated genes are highlighted in red and blue respectively. Data sets were filtered to common probes between the two arrays. **b** Same as in **a** for CD4 Tmem cells. **c** Comparison of the sets of genes differentially expressed between day 2 LN, Muscle and VAT CD4 Tregs cells and their respective control cells. Data sets were filtered to common probes between the three arrays. **d** Same as in **c** for CD4 Tmem cells. **e** Expression pattern of chosen genes differentially expressed (± 1.5 fold change, with a *p* value of <0.05) between day 2 LN, Muscle and VAT CD4 Tregs cells and their respective control cells. **f** Same as in **e** for CD4 Tmem cells

retention in SLOs. It should be noted that S1PR1 expression was also found to be downregulated in day 2 LN CD4 Tmem cells when compared to control CD4 Tmem cells (day2/control = 0.80, $p = 0.006$ in the transcriptome analysis shown in Fig. 6) although to a lesser extent than observed for CD4 Treg cells (day2/control = 0.49, $p = 0.0001$).

In our hands, detection of S1PR1 surface expression required a two-step staining that could not be used with cells from VLA-4 and LFA-1 mAb-treated mice, as both S1PR1 and LFA-1 mAbs are rat IgG_{2A} mAbs. We therefore returned to parabiosis experiments. Based on the expression of S1PR1 and CD69, one can define three subpopulations among CD4 Treg and Tmem cells in SLOs: CD69⁺S1PR1⁺, CD69⁺S1PR1⁻, and CD69⁻S1PR1⁻ cells (Fig. 7a). Enrichment in host cells was clearly observed in CD69⁺S1PR1⁻ CD4 Treg cells for all SLOs studied, demonstrating a limited exchange of such cells between the two parabionts. The proportion of host cells among CD69⁺S1PR1⁻ cells was also increased, but to a lesser extent, than in CD69⁺S1PR1⁻ cells, whereas full chimerism was almost reached for CD69⁺S1PR1⁺ cells (Fig. 7b). Results were more complex for CD4 Tmem cells as a similar clear enrichment in host cells among CD69⁺S1PR1⁻ CD4 Tmem cells was only observed in the spleen and in Peyer’s patches (Fig. 7b).

As described above, the proportion of resident CD4 Treg and Tmem cells within SLOs increased with age (Fig. 3). In accordance with the preferential retention of CD69⁺S1PR1⁻ CD4 Treg cells, we found that CD4 Treg cells from old mice contained far more CD69⁺S1PR1⁻ cells than CD4 Treg cells from young mice (Fig. 7c). A significant increase with age of the proportion of CD69⁺S1PR1⁻ cells among CD4 Tmem cells was also found in the spleen and Peyer’s patches (Fig. 7c). Altogether, these results suggest that S1PR1 downregulation is the main mechanism involved in Treg cell residence within SLOs. Other

mechanisms may be involved in the retention of CD4 Tmem cells especially in LNs.

Discussion

Whereas naive T cells recirculate continuously between SLOs through lymph and blood, it has become clear that a subset of CD8 Tmem cells, named resident memory T cells, do not recirculate through the body, but remain trapped in non-lymphoid tissues in which they provide protection against local secondary infections¹. These resident memory T cells derived from precursors that entered tissues during the effector phase of immune responses and remained positioned within this compartment. More recently, resident CD4 Tmem cells have been identified in non-lymphoid tissues in which they are also implicated in immune protection against a variety of tissue-tropic pathogens³. Finally, resident CD4 Treg cells were found to colonize multiple non-lymphoid tissues, including the gut, skin, lung, VAT, and muscle in which they control inflammatory cells in the vicinity, preventing the organism from incommensurate sterile inflammatory responses³¹. In this paper, our data demonstrate the existence of CD4 Treg and Tmem cells residing in the SLOs of SPF mice. Indeed, parabiosis experiments clearly demonstrated that full chimerism in SLOs between the two parabionts was still not obtained for CD4 Treg and Tmem cells 2 months after surgery (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1). Secondly, CD4 Treg and Tmem cells remained trapped in the LNs and Peyer’s patches for several days after blocking the entry of blood T cells into SLOs (Fig. 2). Finally, these “SLO-resident T cells” share a core transcriptional signature with their cell-counterparts from non-lymphoid tissues (Fig. 6). Altogether, our results show that T cell long-term residency is not a particular feature of non-lymphoid tissues, as it also applies to SLOs. Interestingly,

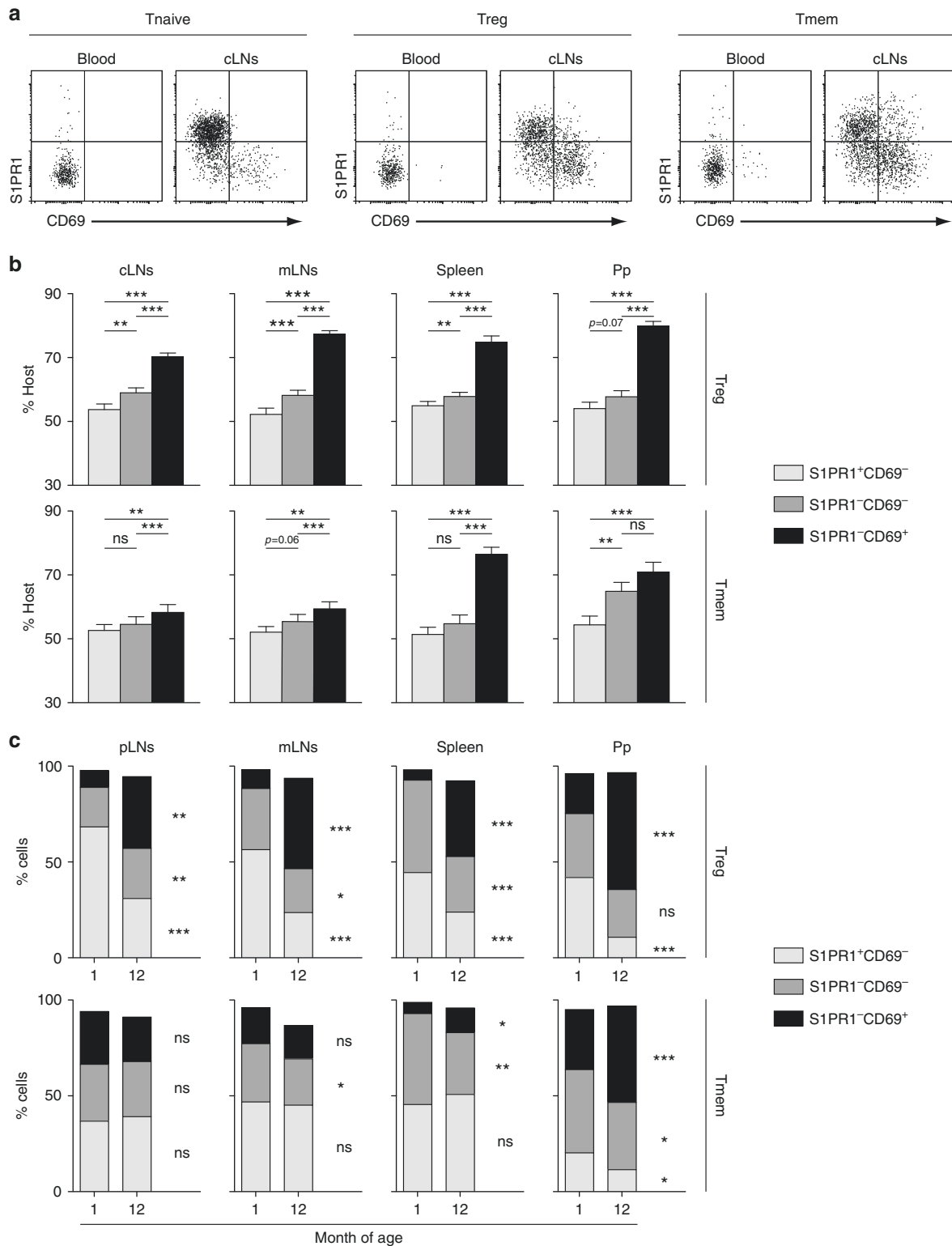


Fig. 7 S1PR1 downregulation account for T cell residence in SLOs. **a, b** Four weeks after parabiosis surgery, blood, cervical LNs (cLNs), mesenteric LNs (mLNs), spleen, and Peyer’s patches (Pp) were recovered and analyzed. **a** S1PR1/CD69 representative dot-plots are shown for blood and cLN CD4 Treg, Tmem, and Tnaive cells from a representative parabiont. **b** Proportions of host cells (CD45.1⁺ for the CD45.1 parabiont and CD45.2⁺ for the CD45.2 parabiont) among the indicated CD4 Treg (upper panel) and Tmem (lower panel) cell-subsets recovered from cLNs, mLNs, spleen, and Peyer’s patches (Pp) are shown as means ± SEM with paired *t*-test for six parabiotic pairs from three independent experiments. **c** pLNs, mLNs, spleen, and Peyer’s patches (Pp) of 1- and 12-month-old mice were recovered and analyzed. Proportion of the indicated CD4 Treg (upper panel) and CD4 Tmem (lower panel) cell-subpopulations are shown as means with unpaired *t*-test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. ns not significant

although well documented in numerous non-lymphoid tissues, resident CD8 Tmem cells were absent from the spleen and LNs of SPF mice.

In non-lymphoid tissues, the generation of resident T cells occurs predominantly after primary infections⁸. Indeed, resident memory CD8 T cells in non-lymphoid tissues are enriched in cells specific for a given pathogen, several months after primary infection. Similarly, pathogen-specific T cells have also been described in SLOs^{11–13}. We thus first supposed that microbiota-derived antigens may play a crucial role in the generation of resident T cells within the SLOs of SPF mice. Antibiotic treatments and the study of germ-free mice revealed that, with the exception of Peyer's patches, microbiota does not play a major role in establishing and maintaining T cell residency within the SLOs of SPF mice. Thus, in LNs, either T cell residency is not relying on T cell specificity or it involves recognition of self-derived peptides. The phenotype of LN-resident CD4 Treg and Tmem cells with respect to markers whose expression correlates positively (CD5, Nur77) or negatively (Ly-6C) with the ability of a T cell to interact with self antigens, would support the second hypothesis. The existence of self antigen-specific resident CD4 Treg cells within the LNs of SPF and germ-free mice makes sense, since such cells would protect the drained organs from efficient priming of conventional self-reactive T cells, thus preventing autoimmunity. This model corroborates with the results showing the prominent role of CD4 Treg cells from a given draining LN in the prevention of autoimmune diseases, targeting the related organs such as oophoritis, prostatitis and dacryoadenitis^{32–34}. Our results also agree with data showing an antigen- and dendritic cell-dependent accumulation of prostate-specific CD4 Treg cells in prostate-draining LNs, an accumulation that can be abrogated upon castration^{35,36}.

The existence of self antigen-specific resident CD4 Tmem cells in the SLOs of SPF mice is somehow more puzzling. Indeed, in response to infections, naive T cells are primed in SLOs in which they differentiate into effector cells. During this step, they are induced to express chemokine receptors. Then, they migrate to the infected tissues in response to chemokine gradients to fight the pathogens. Finally, once the pathogen is cleared, some of these cells remain in the tissue as tissue resident CD4 Tmem cells and would represent a first line of defense preventing re-infection. In the SLOs of SPF mice, we hypothesize that resident CD4 Tmem cells are generated in response to microbiota and self antigens. In these conditions, the nature of either APC or of the cytokines in their environment may cause differences in their differentiation, particularly in terms of chemokine receptors and that could participate to their trapping in SLOs. In fact, self antigen-specific effector CD4 Tmem cells represent a potential danger for organs. Trapping them in SLOs may prevent them reaching the drained organs, and initiating autoimmunity. CD4 Tmem cell-residence within SLOs may thus correspond to an active tolerance mechanism which prevents the migration of potentially harmful T cells into non-lymphoid tissues. Co-clustering of self antigen-specific CD4 Treg and CD4 Tmem cells has been recently described in LNs by Liu et al.³⁷ and these cells may correspond to the subsets of SLO resident CD4 Treg and Tmem cells we are describing in this paper.

The membrane receptor S1PR1, by allowing T cells to respond to the sphingolipid S1P present within efferent lymph, is the central mediator of lymphocyte egress from SLOs^{30,38,39}. Inhibiting S1P responsiveness, through either downregulation of *S1pr1* transcription or CD69-dependent internalization and degradation of membrane S1PR1, appears also to be required for establishing and maintaining T cell residence within non-lymphoid tissues^{8,40,41}. Our parabiosis experiments show that among CD4 Treg cells, CD69⁺S1PR1⁻ cells are strongly enriched

in resident cells in all SLOs (Fig. 7). This is not the case for CD69⁻S1PR1⁻ cells, perhaps because these cells correspond mostly to cells that have just entered SLOs from the blood. Similar results were found for CD4 Tmem cells in the spleen and Peyer's patches of parabionts, but enrichment was quite moderate in LN CD69⁺S1PR1⁻ CD4 Tmem cells. Thus, for CD4 Treg cells in all SLOs studied, as well as for CD4 Tmem cells from the spleen and Peyer's patches, disrupting the ability of T cells to respond to S1P gradients may be the main mechanism of T cell retention. Other mechanisms may participate in CD4 Tmem cell retention within LNs. Recently, Zhang et al. and Audemard-Verger et al. suggested that a subset of innate-like $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells, defined as CCR6⁺CD127^{hi} cells, are trapped within pLNs for long periods of time, and that this retention involves CCR6-dependent migration of these cells to the subcapsular sinus of the LNs and CD169, a sialic acid-binding lectin expressed by subcapsular macrophages^{16,42}. Day 2 CD4 Tmem cells from pLNs almost all express low surface levels of CD127 (Fig. 4). Thus, retention of innate-like TCR $\alpha\beta$ ⁺ T cells and of conventional CD4 Tmem cells within pLNs certainly relies on different mechanisms.

A constant proportion of Treg cells among CD4 T cells in the blood have been documented in mice and a marginal increase, if any, has been reported in humans whereas the frequency of CD4 Treg cells increases considerably in SLOs (Fig. 3a,^{43–46}). Here, we show that the proportion of resident T cells within the CD4 Treg- and Tmem-cell compartments in LNs increases considerably with age (Fig. 3). This observation may help to explain why blood-cell composition in mice poorly reflects the increases with age of the frequencies of CD4 Treg and Tmem cells observed in SLOs. Moreover, an increase with age of resident CD4 Treg cells in SLOs may play an important role in the lower vaccine-induced immune responses and the reactivation of chronic infectious diseases observed in the elderly^{43,47}.

Methods

Mice. Six to twelve-week-old mice were used for experiments unless otherwise indicated. C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 or CD45.2 mice^{22,48} were maintained in our own animal facilities, under SPF conditions. C57BL/6 germ-free (GF) mice and the related control C57BL/6 SPF mice were obtained from CDTA Orléans (TAAM CNRS UPS44). All procedures were approved by the French animal experimentation and ethics committees of Paris Descartes and Pierre and Marie Curie universities and validated by "Service Protection et Santé Animales, Environnement" with the numbers C-75-562 and A-75-1315. Sample sizes were chosen to assure reproducibility of the experiments in accordance with the replacement, reduction and refinement principles of animal ethics regulation.

Parabiosis. Female host parabionts were generated with 8–12-week-old C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice and C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice. The percentage of host cells in a given T cell subset corresponds to the percentage of CD45.1⁺ cells for the CD45.1 parabiont and the percentage of CD45.2⁺ cells for the CD45.2 parabiont.

Blocking T cell entry into LNs and Pp. C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (clone M17/4) and anti-VLA-4 (clone PS/2) Abs (BioXcell) to block T cell entry into LNs and Peyer's patches as previously described²².

Antibiotic treatment. For ablation of commensal microbiota, an antibiotic cocktail of 1 g/l each of Ampicillin (sodium salt, Teva), Neomycin sulfate (Sigma), Metronidazole (Sanofi), and 0.5 g/l Vancomycin hydrochloride (Fisher) was used⁴⁹. Antibiotics were added to the drinking water on a weekly basis for 4 weeks.

Cell surface staining and flow cytometry. SLOs were homogenized and passed through a nylon cell strainer (BD Falcon) in 5% FCS, 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in phosphate saline buffer saline (PBS). Cell suspensions were then dispensed into 96-well round-bottom microtiter plates. Surface staining was performed as previously described^{50,51}. For determination of intracellular cytokine production, cells were stimulated with 0.5 μ g/ml PMA, 0.5 μ g/ml ionomycin, and 10 μ g/ml brefeldin A (all from Sigma-Aldrich) for 2 h at 37 °C. Cells were then stained for surface markers, fixed in 2% paraformaldehyde in PBS, and permeabilized with 0.5% saponin, followed by labeling with specific cytokine Abs. This fixation and

permeabilization protocol was also used to determine intra+extracellular expression of CCR7. The Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) was used for Foxp3, Nur77, CTLA-4, and Ki-67 intracellular staining. S1PR1 was detected with a rat monoclonal antibody (clone 713412, R&D Systems). Briefly, cells were first incubated for 90 min with the anti-S1PR1 rat mAb (50 µg/ml) in PBS containing 0.5% FCS, 1 mM EDTA, 0.05% azide, and 2% normal mouse serum. After washing, the cells were then incubated with donkey biotinylated anti-rat IgG polyclonal Abs (Jackson ImmunoResearch) for 30 min in the above medium followed by streptavidin-APC (BioLegend). Multi-color immunofluorescence was analyzed using a BD-LSR2 or a BD-Fortessa cytometer (BD Biosciences). Data acquisition and cell sorting were performed at the Cochin Immunobiology facility.

Microarray. CD4 T cells from LNs (pooled peripheral and mesenteric LNs) of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were enriched as previously described²². Then, CD4 Treg and Tmem cells were flow-cytometry sorted as defined in the gating strategy shown in Fig. 1b using a FACS-ARIA3 flow cytometer. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Cat. No./ID: 74104, QIAGEN). RNA quality was validated with Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit). Experimental and analytical parts of the microarray analysis were performed according to the MIAME standards. Amplified, fragmented and biotinylated sense-strand DNA targets were synthesized from 100 ng total RNA according to the manufacturer's protocol (Genechip Whole transcript (WT) Sense Target labeling assay kit (Affymetrix)) and hybridized to a mouse gene 1.0 ST array (Affymetrix). The stained chips were read and analyzed with a GeneChip Scanner 3000 7G and Expression Console software (Affymetrix). Raw data (.cel files) were then processed and normalized using the quantile normalization method in RMA with R package (Bioconductor). Statistical analysis was then performed with MEV software (TIGR). Microarrays were performed at the Cochin Genomic facility.

Calculations. For Fig. 3c, d, calculations were done as follows: for one given experiment, % circulating Treg cells among CD4 T cells = 100×(absolute number of CD4 Treg cells in control mice–absolute number of day 2 CD4 Treg cells)/(absolute number of total CD4 T cells in control mice–absolute number of day 2 CD4 Treg and Tmem cells); % circulating Tmem cells among CD4 T cells = 100×(absolute number of CD4 Tmem cells in control mice–absolute number of day 2 CD4 Tmem cells)/(absolute number of total CD4 T cells in control mice–absolute number of day 2 CD4 Treg and Tmem cells); % circulating naive cells among CD4 T cells = 100–% circulating Treg and Tmem cells.

Statistics. Data are expressed as mean ± SEM, and the significance of differences between two series of results was assessed using the Student's unpaired or paired *t* test. Values of *p* < 0.05 were considered as statistically significant (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

Data availability. The original data discussed in this publication have been deposited in the Gene Expression Omnibus at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (accession number GSE104011). The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary information files, or are available upon reasonable requests to the authors.

Received: 19 May 2017 Accepted: 1 December 2017

Published online: 04 January 2018

References

- Mueller, S. N. & Mackay, L. K. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 79–89 (2016).
- Steinert, E. M. et al. Quantifying memory CD8 T cells reveals regionalization of immunosurveillance. *Cell* **161**, 737–749 (2015).
- Turner, D. L. & Farber, D. L. Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology. *Front. Immunol.* **5**, 331 (2014).
- Burzyn, D., Benoist, C. & Mathis, D. Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nat. Immunol.* **14**, 1007–1013 (2013).
- Gratz, I. K. & Campbell, D. J. Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance. *Front. Immunol.* **5**, 333 (2014).
- Bollrath, J. & Powrie, F. M. Controlling the frontier: regulatory T-cells and intestinal homeostasis. *Semin. Immunol.* **25**, 352–357 (2013).
- Schenkel, J. M. et al. T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* **346**, 98–101 (2014).
- Schenkel, J. M. & Masopust, D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity* **41**, 886–897 (2014).
- Nosbaum, A. et al. Cutting edge: regulatory T cells facilitate cutaneous wound healing. *J. Immunol.* **196**, 2010–2014 (2016).
- Ali, N. et al. Regulatory T cells in skin facilitate epithelial stem cell differentiation. *Cell* **169**, 1119–1129 e1111 (2017).
- Sathaliyawa, T. et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* **38**, 187–197 (2013).
- Turner, D. L. et al. Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol.* **7**, 501–510 (2014).
- Woon, H. G. et al. Compartmentalization of total and virus-specific tissue-resident memory CD8⁺ T cells in human lymphoid organs. *PLoS Pathog.* **12**, e1005799 (2016).
- Tomura, M., Itoh, K. & Kanagawa, O. Naive CD4⁺ T lymphocytes circulate through lymphoid organs to interact with endogenous antigens and upregulate their function. *J. Immunol.* **184**, 4646–4653 (2010).
- Ugur, M., Schulz, O., Menon, M. B., Krueger, A. & Pabst, O. Resident CD4⁺ T cells accumulate in lymphoid organs after prolonged antigen exposure. *Nat. Commun.* **5**, 4821 (2014).
- Zhang, Y. et al. Migratory and adhesive cues controlling innate-like lymphocyte surveillance of the pathogen-exposed surface of the lymph node. *Elife* **5**, e18156 (2016).
- Marriott, C. L., Dutton, E. E., Tomura, M. & Withers, D. R. Retention of Ag-specific memory CD4⁺ T cells in the draining lymph node indicates lymphoid tissue resident memory populations. *Eur. J. Immunol.* **47**, 860–871 (2017).
- Takamura, S. et al. The route of priming influences the ability of respiratory virus-specific memory CD8⁺ T cells to be activated by residual antigen. *J. Exp. Med.* **207**, 1153–1160 (2010).
- Schenkel, J. M., Fraser, K. A. & Masopust, D. Cutting edge: resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* **192**, 2961–2964 (2014).
- Mandl, J. N. et al. Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 18036–18041 (2012).
- Martin, B. et al. Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat. Commun.* **4**, 2209 (2013).
- Delpoux, A. et al. TCR signaling events are required for maintaining CD4 regulatory T cell numbers and suppressive capacities in the periphery. *J. Immunol.* **193**, 5914–5923 (2014).
- Smigielski, 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).
- Azzam, H. S. et al. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* **188**, 2301–2311 (1998).
- Moran, A. E. et al. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279–1289 (2011).
- Mandl, J. N., Monteiro, J. P., Vrisekoop, N. & Germain, R. N. T Cell positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* **38**, 263–274 (2013).
- Haskett, S. et al. Identification of novel CD4⁺ T cell subsets in the target tissue of Sjogren's syndrome and their differential regulation by the lymphotoxin/LIGHT signaling axis. *J. Immunol.* **197**, 3806–3819 (2016).
- Burzyn, D. et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* **155**, 1282–1295 (2013).
- Cipolletta, D. et al. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* **486**, 549–553 (2012).
- Cyster, J. G. & Schwab, S. R. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 69–94 (2012).
- Panduro, M., Benoist, C. & Mathis, D. Tissue tregs. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 609–633 (2016).
- Samy, E. T., Parker, L. A., Sharp, C. P. & Tung, K. S. Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the regional lymph node. *J. Exp. Med.* **202**, 771–781 (2005).
- Setiady, Y. Y. et al. Physiologic self antigens rapidly capacitate autoimmune disease-specific polyclonal CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Blood* **107**, 1056–1062 (2006).
- Wheeler, K. M., Samy, E. T. & Tung, K. S. Cutting edge: normal regional lymph node enrichment of antigen-specific regulatory T cells with autoimmune disease-suppressive capacity. *J. Immunol.* **183**, 7635–7638 (2009).
- Malchow, S. et al. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science* **339**, 1219–1224 (2013).
- Leventhal, D. S. et al. Dendritic cells coordinate the development and homeostasis of organ-specific regulatory T cells. *Immunity* **44**, 847–859 (2016).
- Liu, Z. et al. Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. *Nature* **528**, 225–230 (2015).
- Matloubian, M. et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
- Bankovich, A. J., Shiwo, L. R. & Cyster, J. G. CD69 suppresses sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J. Biol. Chem.* **285**, 22328–22337 (2010).
- Skon, C. N. et al. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 1285–1293 (2013).

41. Mackay, L. K. et al. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J. Immunol.* **194**, 2059–2063 (2015).
42. Audemard-Verger, A. et al. Macrophages induce long-term trapping of gammadelta T cells with innate-like properties within secondary lymphoid organs in the steady state. *J. Immunol.* **199**, 1998–2007 (2017).
43. Lages, C. S. et al. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J. Immunol.* **181**, 1835–1848 (2008).
44. Santner-Nanan, B. et al. Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype. *Int. Immunol.* **20**, 375–383 (2008).
45. Hwang, K. A., Kim, H. R. & Kang, I. Aging and human CD4(+) regulatory T cells. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 509–517 (2009).
46. Raynor, J., Lages, C. S., Shehata, H., Hildeman, D. A. & Chougnet, C. A. Homeostasis and function of regulatory T cells in aging. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 482–487 (2012).
47. Pinti, M. et al. Aging of the immune system: focus on inflammation and vaccination. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2286–2301 (2016).
48. Wang, Y. et al. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **180**, 1565–1575 (2008).
49. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229–241 (2004).
50. Le Campion, A. et al. IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4⁺ T cell compartments during peripheral T cell reconstitution. *J. Immunol.* **189**, 3339–3346 (2012).
51. Lombes, A. et al. Adaptive immune-like gamma/delta T lymphocytes share many common features with their alpha/beta T cell counterparts. *J. Immunol.* **195**, 1449–1458 (2015).

Acknowledgements

We greatly acknowledge E. Maillard, K. Labroquère and M. Andrieu from the Cochin Immunobiology facility, S. Jacques and F. Letourneur from the Cochin Genomic facility. This work was supported by grants from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM team), the “Ligue contre le Cancer” (from the Ile de France committee), the “Association pour la Recherche sur le Cancer” and the “French National Research Agency

(grant ANR-15-CE15-0009-01). A. Delpoux was supported by a Ph.D. fellowship from the “Association pour la Recherche sur le Cancer”. A. Audemard and P. Hamon were supported by a Ph.D. fellowship from the “Ligue contre le Cancer” and from INSERM.

Author contributions

A.D., A.A.-V., and B.L. designed experiments. A.D., A.A.-V., V.G., R.M., A.D., P.H., N.B., M.R., J.D., B.M., C.A., and A.B. did the experiments. A.D. and A.A.-V. analyzed the flow cytometry data. V.G. and C.A. analyzed the transcriptomic data. A.D., V.G., and C.A. made the figures. B.L. wrote the paper.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02458-4>.

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

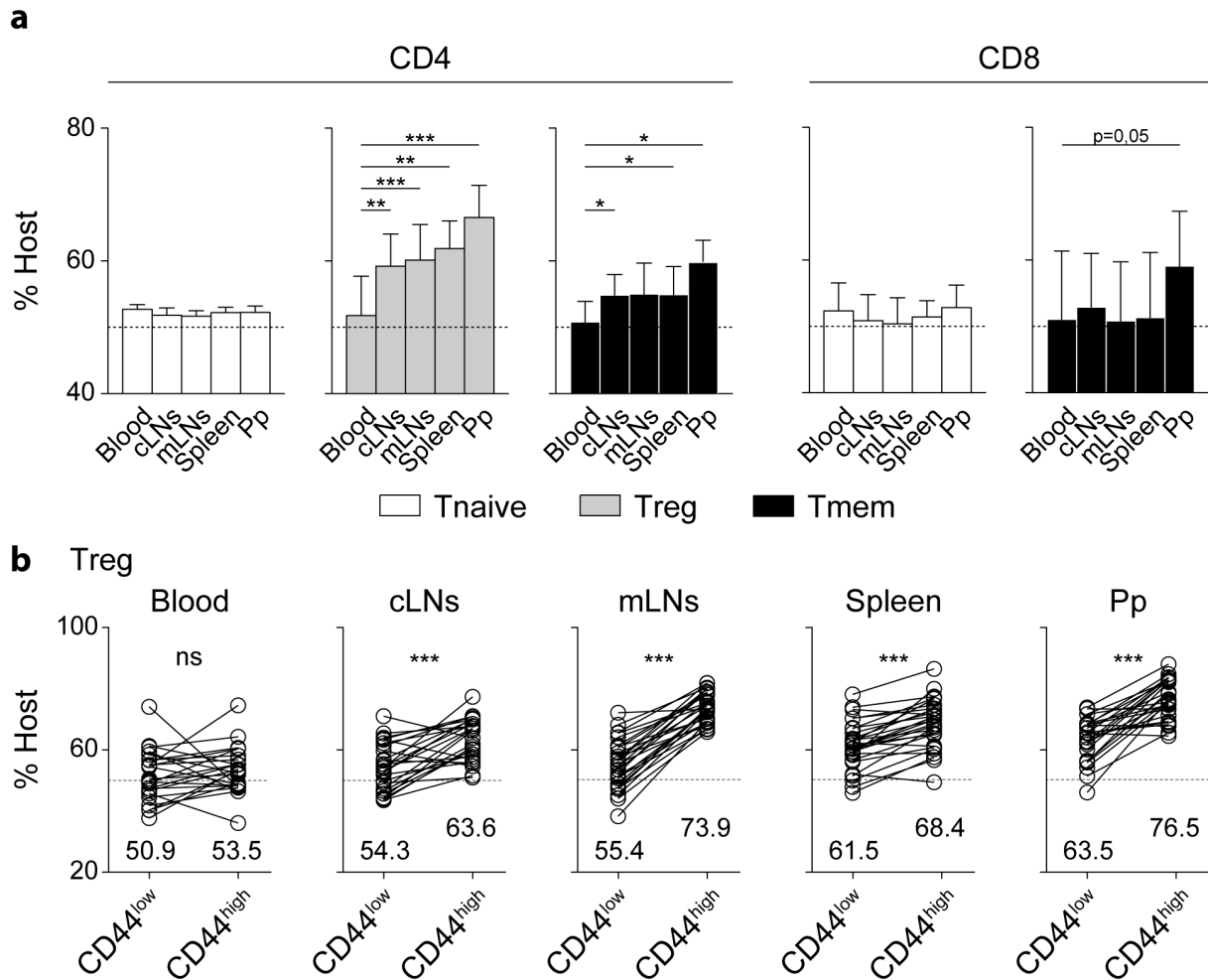
Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



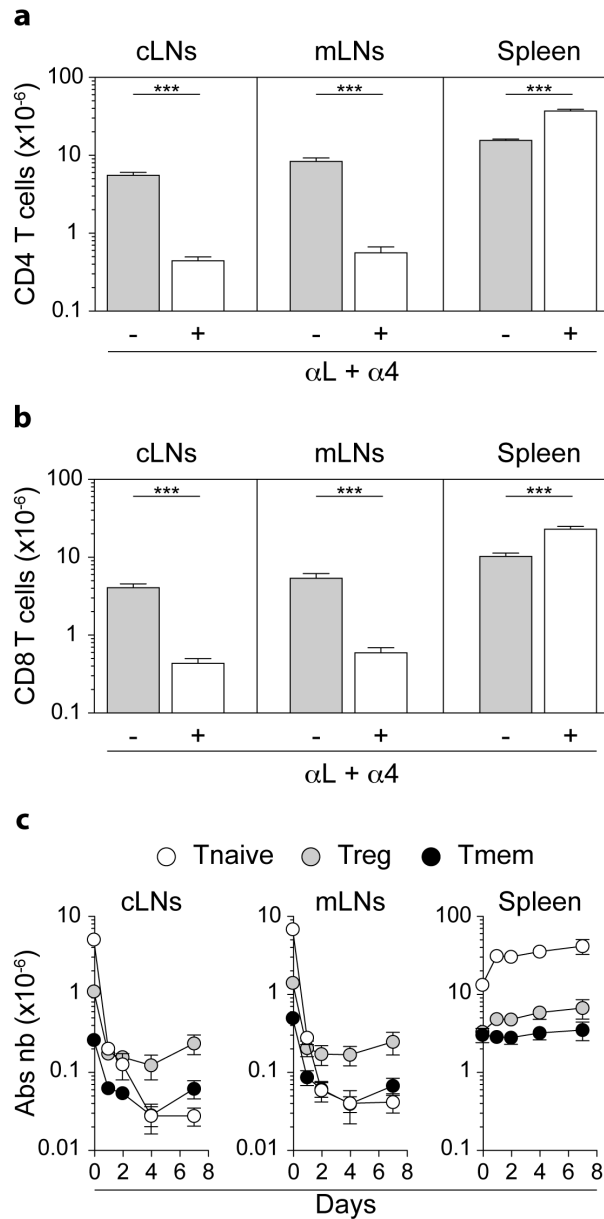
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

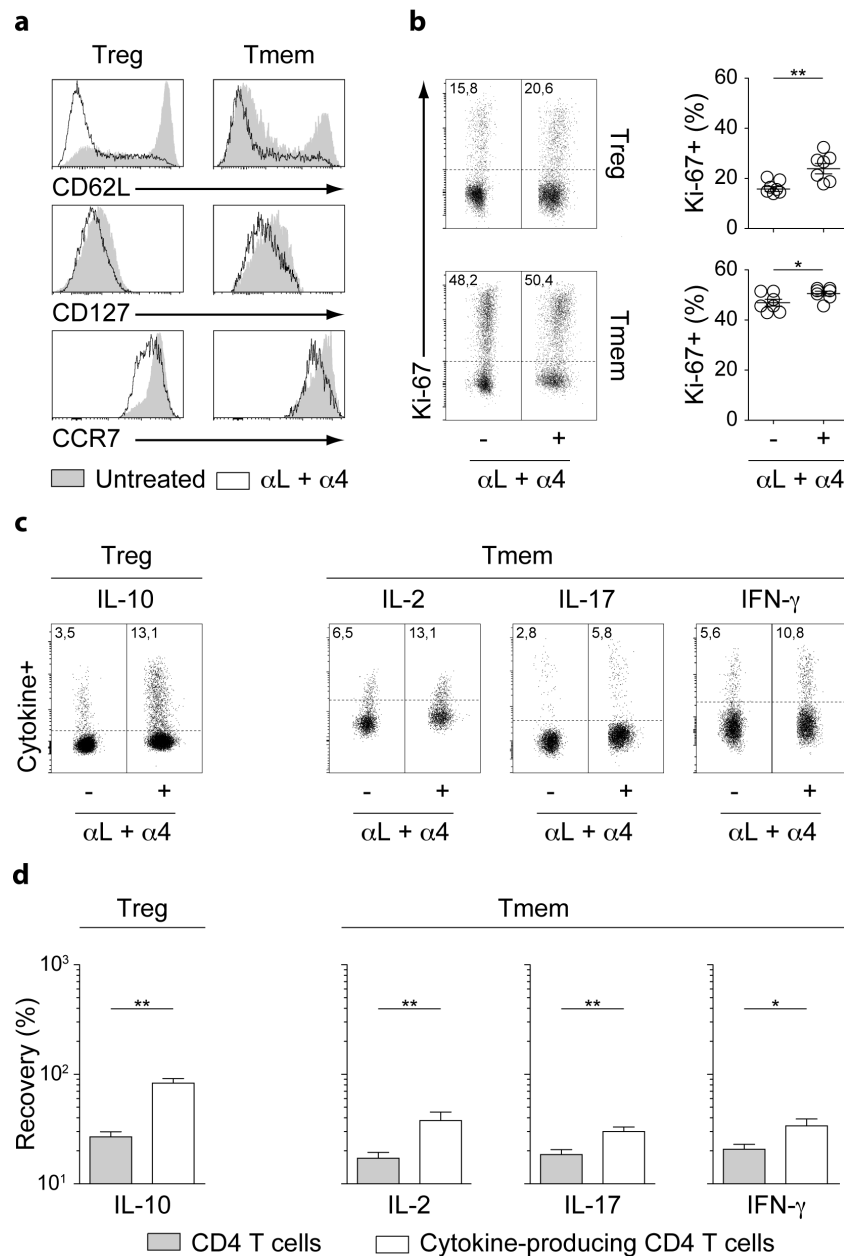
SUPPLEMENTARY INFORMATION



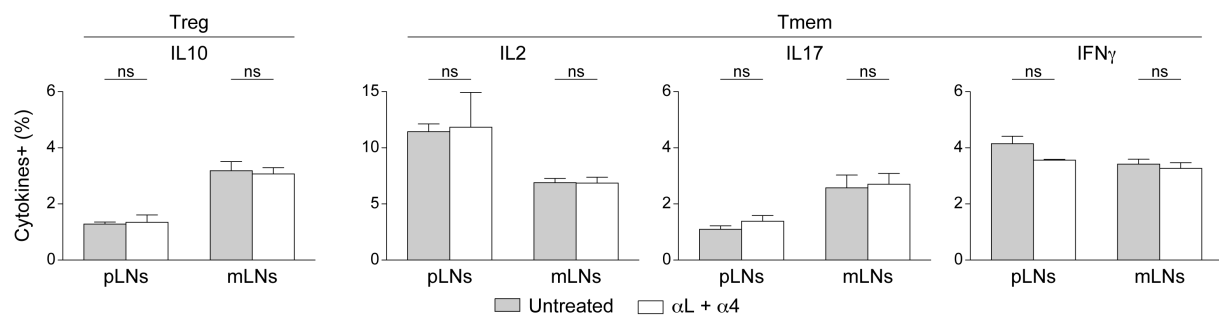
Supplementary Figure 1: Analysis of mouse parabionts reveals the long-term residence of regulatory and memory T cell populations in SLOs. (a) Eight weeks after parabiosis surgery, blood, cervical LNs (cLNs), mesenteric LNs (mLNs), spleen and Peyer's patches (Pp) were recovered and analyzed. Proportions of host cells (CD45.1⁺ for the CD45.1 parabiont and CD45.2⁺ for the CD45.2 parabiont) among the indicated CD4 T cell and CD8 T cell subsets recovered from blood, cLNs, mLNs, Spleen and Pp are shown as means \pm SEM. (b) Four weeks after parabiosis surgery, proportions of host cells among CD44^{low} and CD44^{high} CD4 Treg cells. Each pair of dots represents an individual mouse. Significant differences are indicated by asterisks (paired t-test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).



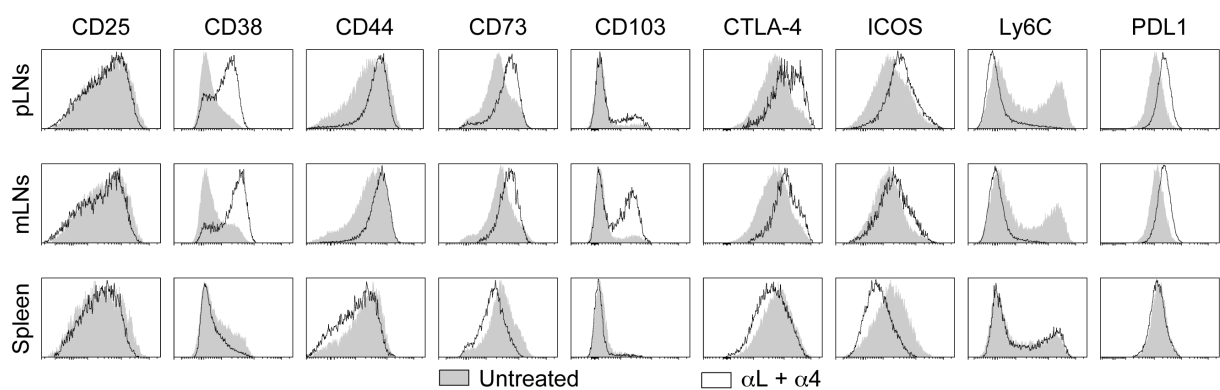
Supplementary Figure 2: Analysis of residual T cells after blocking T cell entry into LNs. 6-12 week-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs. Twenty-four hours later, cLNs, mLNs and spleen were harvested and analyzed. **(a)** Absolute numbers of CD4 T cells in the indicated SLOs of treated or untreated mice are shown as means \pm SEM with unpaired *t*-test or at least three independent experiments **(b)** Same than in **(a)** for CD8 T cells. **(c)** C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs every 2 days from day 0 to day 6 and SLOs were recovered for analysis at various time-points. Absolute numbers of CD4 Treg, Tmem and Tnaive cells in cLNs, mLNs, and spleen are shown. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. ns, not significant.



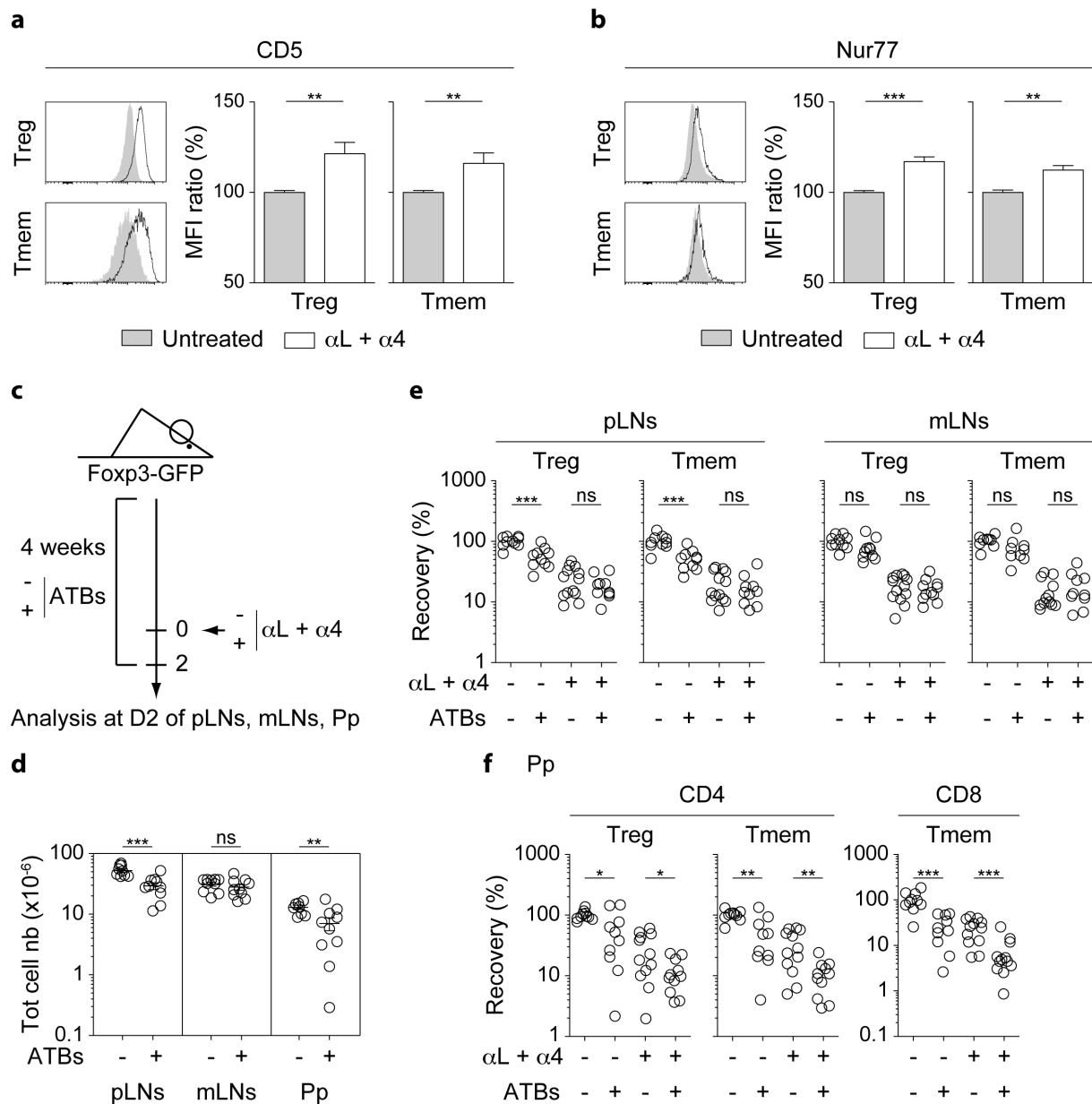
Supplementary Figure 3: mLN-resident CD4 T cells exhibit an effector phenotype. 6-12 week-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs. Forty-eight hours later, mLNs were harvested and analyzed. **(a)** CD62L, CD127 and CCR7 fluorescence histograms of CD4 Treg and CD4 Tmem cells from a representative treated and a representative control C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. **(b)** Representative Ki-67 expression by CD4 Treg and CD4 Tmem cells from treated and control mice. Quantification is shown on the right part of the panel. Each dot represents an individual mouse (unpaired *t*-test). **(c)** Representative IL-10 expression by CD4 Treg cells and representative IL-2, IL-17 and IFN- γ expression by CD4 Tmem cells from treated and control mice. **(d)** Quantification of cytokine production by CD4 Treg and Tmem cells is shown as means \pm SEM with paired *t*-test. The percentage of recovery for a given cytokine was calculated by dividing the absolute numbers of cells expressing this cytokine in treated mice by the mean absolute number of cells expressing this same cytokine in untreated animals (white bars). The grey bars correspond to the recovery of total CD4 Treg or CD4 Tmem cells in the same samples. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. ns, not significant.



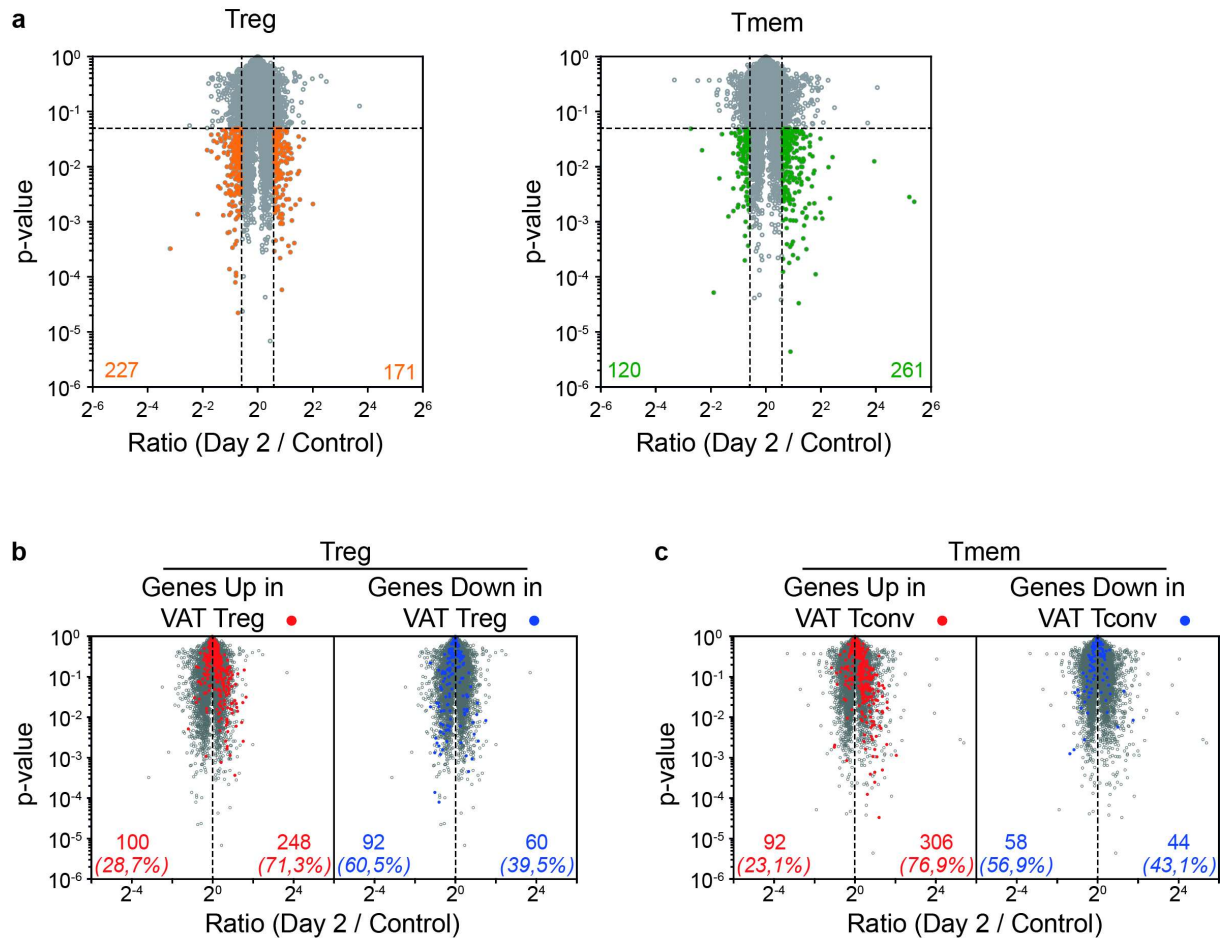
Supplementary Figure 4: Integrin engagement does not potentiate T cell ability to produce cytokines. pLNs and mLNs from 6-12 week-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice were harvested. Cells from pLNs and mLNs were preincubated or not with anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs (50 μ g/ml) for 30 minutes at 4°C. They were then stimulated with 0.5 mg/ml PMA, 0.5 mg/ml ionomycin, and 10 mg/ml brefeldin A (all from Sigma-Aldrich) for 2 h at 37°C. Cells were then stained for surface markers, fixed in 2% paraformaldehyde in PBS, and permeabilized with 0.5% saponin, followed by labeling with specific cytokine Abs. The percentage of CD4 Treg cells producing IL-10 and the percentages of CD4 Tmem cells producing IL-2, IL-17 or IFN- γ were determined and are shown as means \pm SEM with paired *t*-test.



Supplementary Figure 5: Analysis of the LN-resident CD4 Treg cell phenotype. 6-12 week-old C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (α L) and anti-VLA-4 (α 4) Abs. Forty-eight hours later, pLNs, mLNs and spleen were harvested and analyzed. CD25, CD38, CD44, CD73, CD103, CTLA-4, ICOS, Ly-6C and PDL1 fluorescence histograms of CD4 Treg cells from a representative treated and a representative control C57BL/6 Foxp3-GFP mouse.



Supplementary Figure 6: Assessing the relative role of self-antigens and microbiota in T cell residence in SLOs. (a-b) 6-12 week-old C57BL/6 Fc γ 3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (αL) and anti-VLA-4 ($\alpha 4$) Abs. Forty-eight hours later, mesenteric LN (mLN) were harvested and analyzed. CD5 (a) and Nur77 (b) fluorescence histograms of CD4 Treg and CD4 Tmem cells from the mLN of a representative treated and a representative control C57BL/6 Fc γ 3-GFP mouse. Quantification is shown as means \pm SEM with unpaired *t*-test on the right part of these panels. (c-f) 6-8 week-old C57BL/6 Fc γ 3-GFP mice were treated with antibiotics (ATB) for 4 weeks. Then, ATB treated or untreated mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti-LFA-1 (αL) and anti-VLA-4 ($\alpha 4$) Abs. Forty-eight hours later, SLOs were harvested and analyzed. (c) Diagram illustrating the experimental model. (d) Total cell numbers recovered from pLNs, mLN and Pp of antibiotic treated or untreated mice (e) Recovery of CD4 Treg and CD4 Tmem cells in pLNs and mLN. (f) Recovery of CD4 Treg, CD4 Tmem and CD8 Tmem cells in Pp. Each dot represents an individual mouse (unpaired *t*-test). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. ns, not significant. Mouse clip arts were generated in (21).



Supplementary Figure 7: Transcriptional profiling of LN- and VAT-resident CD4 Treg and Tmem cells. (a) “Volcano plot” representation ($\text{Log}_2(\text{ratio})$ versus $\text{Log}_{10}(\text{t test p value})$) between day 2 and control LN CD4 Treg (left) or CD4 Tmem (right) cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice. Genes expressed >1.5-fold higher or lower in day 2 LN CD4 cells compared to control LN CD4 cells with a P value of <0.05 are highlighted in orange (CD4 Treg cells) or green (CD4 Tmem cells). The number of genes up- or down-regulated (1.5-fold cutoff) for each comparison is indicated. (b) Among the 500 genes the most differentially expressed between VAT and control CD4 Treg cells with a P value of <0.05, up-regulated and down-regulated genes are highlighted in red and blue respectively. Datasets were filtered to common probes between the 2 arrays. (c) Same than in (b) for CD4 Tmem cells.

Article 3

Macrophages Induce Long-Term Trapping of $\gamma\delta$ T Cells with Innate-like Properties within Secondary Lymphoid Organs in the Steady State.

J Immunol September 15, 2017, 199 (6) 1998-2007.

Alexandra Audemard-Verger, Matthieu Rivière, Aurélie Durand, Elisa Peranzoni, Vincent Guichard, Pauline Hamon, Nelly Bonilla, Thomas Guilbert, Alexandre Boissonnas, Cédric Auffray, Gérard Eberl, Bruno Lucas and Bruno Martin.

Jusqu'à présent, les cellules T périphériques ont principalement été décrites comme circulantes entre le sang, les organes lymphoïdes secondaires (SLO) et la lymphe à l'état basal. Cette existence nomade leur permettrait d'accomplir leur tâche de recherche pour des antigènes étrangers et des signaux de survie. Bien qu'il soit maintenant bien établi que les cellules T $\gamma\delta$ peuvent être rapidement recrutées dans les sites inflammatoires ou dans certains micro-environnements tumoraux, les propriétés de trafic des cellules T $\gamma\delta$ périphériques ont été peu étudiées à l'état basal. Dans la présente étude, nous mettons en évidence l'existence de cellules T $\gamma\delta$ résidentes dans les SLOs de souris exemptes d'organismes pathogènes spécifiques. En effet, en utilisant plusieurs approches expérimentales telles que l'injection d'anticorps neutralisant les intégrines qui inhibent l'entrée des lymphocytes circulants dans les ganglions lymphatiques et les expériences de parabiose à long terme, nous avons constaté que, contrairement aux cellules T $\gamma\delta$ Ly-6C^{+/+} CD44^{lo} et Ly-6C⁺ CD44^{hi}, une proportion importante de cellules T $\gamma\delta$ Ly-6C⁻ CD44^{hi} sont piégées pendant de longues périodes dans les ganglions lymphatiques et dans la rate à l'état basal. Des stratégies de déplétion cellulaire spécifique in vivo nous ont permis de démontrer que les macrophages sont les principaux acteurs impliqués dans cette rétention à long terme des cellules T $\gamma\delta$ Ly-6C⁻ CD44^{hi} dans les SLOs.

Macrophages Induce Long-Term Trapping of $\gamma\delta$ T Cells with Innate-like Properties within Secondary Lymphoid Organs in the Steady State

Alexandra Audemard-Verger,^{*,1} Matthieu Rivière,^{*,1} Aurélie Durand,^{*,1} Elisa Peranzoni,^{*} Vincent Guichard,^{*,†} Pauline Hamon,[‡] Nelly Bonilla,^{*} Thomas Guilbert,^{*} Alexandre Boissonnas,[‡] Cédric Auffray,^{*} Gérard Eberl,^{§,¶} Bruno Lucas,^{*,2} and Bruno Martin^{*,2}

So far, peripheral T cells have mostly been described to circulate between blood, secondary lymphoid organs (SLOs), and lymph in the steady state. This nomadic existence would allow them to accomplish their surveying task for both foreign Ags and survival signals. Although it is now well established that $\gamma\delta$ T cells can be rapidly recruited to inflammatory sites or in certain tumor microenvironments, the trafficking properties of peripheral $\gamma\delta$ T cells have been poorly studied in the steady state. In the present study, we highlight the existence of resident $\gamma\delta$ T cells in the SLOs of specific pathogen-free mice. Indeed, using several experimental approaches such as the injection of integrin-neutralizing Abs that inhibit the entry of circulating lymphocytes into lymph nodes and long-term parabiosis experiments, we have found that, contrary to $Ly-6C^{-/+}CD44^{lo}$ and $Ly-6C^{+}CD44^{hi}$ $\gamma\delta$ T cells, a significant proportion of $Ly-6C^{-}CD44^{hi}$ $\gamma\delta$ T cells are trapped for long periods of time within lymph nodes and the spleen in the steady state. Specific *in vivo* cell depletion strategies have allowed us to demonstrate that macrophages are the main actors involved in this long-term retention of $Ly-6C^{-}CD44^{hi}$ $\gamma\delta$ T cells in SLOs. *The Journal of Immunology*, 2017, 199: 1998–2007.

The $\gamma\delta$ T cells are unique and distinct from other lymphocyte subsets, such as NK cells, B cells, and $\alpha\beta$ T cells, in that they combine adaptive features with rapid, innate-like responses that allow them to play an important role in all phases of an immune response. $\gamma\delta$ T cells are crucially involved in host immune defense against infections (1) but are also known to have a strong clinical association with various autoimmune diseases such as inflammatory bowel disease (2, 3), rheumatoid arthritis (or collagen-induced arthritis, the murine model of rheumatoid arthritis) (4, 5), and multiple sclerosis (or experimental autoimmune encephalomyelitis, the murine model of multiple sclerosis) (6, 7).

Additionally, there is compelling evidence to indicate that $\gamma\delta$ T cells play an important role in immunity to cancer by sensing and reacting to cellular stress. This has been clearly demonstrated in murine models of spontaneous (8), chemically induced (9), transgenic (10), and transplantable tumors (11, 12). However, it seems that the activity of $\gamma\delta$ T cells in response to tumors can differ radically according to the tumor type or environment (13, 14). These data may actually reflect the high diversity of the $\gamma\delta$ T cell compartment.

In this regard, we have recently shown that within murine secondary lymphoid organs (SLOs), $\gamma\delta$ T cells can be subdivided into four subsets according to CD44 and Ly-6C expression. More precisely, we have characterized the functional heterogeneity of the peripheral $\gamma\delta$ T cell compartment that comprises $Ly-6C^{-}CD44^{hi}$ $\gamma\delta$ T cells exhibiting innate-like features and naive and memory adaptive-like $\gamma\delta$ T cells ($Ly-6C^{-/+}CD44^{lo}$ $\gamma\delta$ T cells and $Ly-6C^{+}CD44^{hi}$ $\gamma\delta$ T cells, respectively) (15).

This phenotypic and functional heterogeneity of the peripheral $\gamma\delta$ T cell compartment may be also associated with differential T cell trafficking dynamic properties. So far, peripheral T cells are mostly described to circulate between blood, SLOs, and lymph in the steady state. This nomadic existence would allow them to accomplish their surveying task for both foreign Ags and survival signals (16, 17). In line with this concept, Mandl et al. (18) have shown in a recent study that the mean transit time for $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ $\alpha\beta$ T cells in peripheral lymph nodes (pLNs) were 12 and 18 h, respectively. Concerning $\gamma\delta$ T cells, it is now well established that $\gamma\delta$ T cells can be rapidly recruited to inflammatory sites or to certain tumor microenvironments (19, 20). These $\gamma\delta$ T cell infiltrations are notably orchestrated by inflammatory cytokines such as IL-1 β or IL-23 or chemokine axes such as CCL2/CCR2 (12, 21–23). However, the T cell trafficking dynamics of peripheral $\gamma\delta$ T cell subsets in the steady state have still been poorly studied.

In this study, using several experimental approaches such as the injection of integrin-neutralizing Abs that inhibit the entry of

^{*}Institut Cochin, CNRS UMR8104, INSERM U1016, Paris Descartes Université, 75014 Paris, France; [†]Paris Diderot Université, 75013 Paris, France; [‡]Université Paris 6, INSERM U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, 75013 Paris, France; [§]Unité Microenvironnement and Immunity, Institut Pasteur, 75724 Paris, France; and [¶]INSERM U1224, 75724 Paris, France

¹A.A.-V., M.R., and A.D. contributed equally to this work.

²B.L. and B.M. contributed equally to this work.

ORCID: 0000-0002-7770-7210 (A.B.); 0000-0002-0322-3977 (B.L.).

Received for publication March 24, 2017. Accepted for publication July 10, 2017.

This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer, the Association pour la Recherche contre le Cancer, and the Fondation pour la Recherche Médicale. M.R. was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. A.A.-V. and P.H. were supported by a Ph.D. fellowship from the Ligue contre le Cancer and from INSERM. V.G. was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministry of National Education, Research, and Technology. E.P. was supported by a fellowship from the Fondation de France.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Bruno Martin, Cochin Institute, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. E-mail address: bruno.martin@inserm.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: DC, dendritic cell; DT, diphtheria toxin; LN, lymph node; mLN, mesenteric LN; pLN, peripheral LN; ROR, retinoic acid–related orphan receptor; SLO, secondary lymphoid organ.

Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$35.00

circulating lymphocytes into LNs and long-term parabiosis experiments, we have found that contrary to Ly-6C⁺ CD44^{hi} and CD44^{lo} $\gamma\delta$ T cell subsets, which are circulating cells, an important proportion of Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells is residing within SLOs in the steady state. Moreover, specific *in vivo* cell depletion strategies have allowed us to demonstrate that macrophages are the main actors involved in this long-term trapping of Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells in SLOs in the steady state.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 CD45.1 mice, C57BL/6 CD45.2 mice, C57BL/6 μ MT mice, and C57BL/6 CD11c.DTR mice (24) were maintained in our own animal facilities, under specific pathogen-free conditions. C57BL/6 retinoic acid-related orphan receptor (ROR) γ t-GFP mice were initially obtained from Dr. G. Eberl (Institut Pasteur, Paris, France) (25). Six- to 12-wk-old mice were used for experiments. Animal housing, care, and research were carried out in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department. All procedures were approved by the French Animal Experimentation and Ethics Committee and validated by the Service Protection et Santé Animales, Environnement (numbers C-75-562 and A-75-1315). Sample sizes were chosen to assure reproducibility of the experiments and in accordance with the 3Rs of animal ethics regulation (i.e., replacement, reduction, and refinement).

Cell suspensions

pLNs (pooled cervical, axillary, brachial, and inguinal LNs), mesenteric LNs (mLNs), cervical LNs, and spleen were homogenized and passed through a nylon cell strainer (BD Falcon) in RPMI 1640 GlutaMAX (Life Technologies) supplemented with 10% FCS (Biochrom) for adoptive transfer and cell culture (LNs only), or in 5% FCS, 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in PBS for flow cytometry.

To verify the efficiency of dendritic cell (DC) or macrophage *in vivo* depletion, LNs and spleens were disrupted in RPMI 1640 medium containing 5% FCS, 1 mg of collagenase from *Clostridium histolyticum* type II and type IV (Sigma-Aldrich), and 0.5 mg of DNase I (Sigma-Aldrich) and incubated for 20 min at 37°C.

Fluorescence staining and flow cytometry

Cell suspensions were collected and dispensed into 96-well round-bottom microtiter plates (6 × 10⁶ cells per well; Greiner Bioscience). Surface staining was performed as previously described (26, 27). Briefly, cells were incubated on ice, for 15 min per step, with Abs in 5% FCS (Biochrom), 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in PBS. Each cell-staining reaction was preceded by a 15-min incubation with a purified anti-mouse CD16/32 Ab (Fc γ RII/III block; 2.4G2) obtained from hybridoma supernatants. For determination of intracellular cytokine production, cells were stimulated with 0.5 μ g/ml PMA (Sigma-Aldrich), 0.5 μ g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich), and 10 μ g/ml brefeldin A (Sigma-Aldrich) for 2 h at 37°C. Cells were then stained for surface markers, fixed in 2% paraformaldehyde in PBS, and permeabilized with 0.5% saponin, followed by labeling with specific cytokine Abs.

S1PR1 was detected with a rat mAb (R&D Systems). Briefly, cells were first incubated for 90 min with the anti-S1PR1 rat mAb (50 μ g/ml) in PBS containing 0.5% FCS, 1 mM EDTA, 0.05% azide, and 2% normal mouse serum. After washing, cells were then incubated with donkey biotinylated anti-rat IgG polyclonal Abs (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 30 min in the above medium followed by streptavidin-allophycocyanin (BioLegend).

Multicolor immunofluorescence was analyzed using BD LSR II and BD LSRIIFortessa cytometers (BD Biosciences). List mode data files were analyzed using FACSDiva software (BD Biosciences). Data acquisition was performed in the Cochin Cytometry and Immunobiology facility.

Parabiosis

Female host parabionts were generated with 8- to 12-wk-old C57BL/6 CD45.1 mice and C57BL/6 CD45.2 mice. The percentage of host cells in a given T cell subset corresponds to the percentage of CD45.1⁺ cells for the CD45.1 parabiont and the percentage of CD45.2⁺ cells for the CD45.2 parabiont.

Blocking T cell entry into LNs

Purified anti-VLA-4 (clone PS/2) and anti-LFA-1 (clone M17/4) Abs were obtained from Bio X Cell. For short-term treatment, mice were injected *i.p.*

one time with 200 μ g of both Abs and then analyzed 48 h later. For long-term treatment, mice were injected *i.p.* every 2 d during 6 d (four injections) with 200 μ g of both Abs and analyzed 24 h later.

In vivo cell depletions

For DC depletion, C57BL/6 CD11c.DTR mice (referred to as CD11c DOG mice) were injected *i.p.* every 2 d during 6 d (four injections) with 250 ng of diphtheria toxin (DT).

The CSFIR inhibitor PLX3397 incorporated into rodent chow at 290 ppm (delivering daily doses of ~45 mg/kg) was provided along with control chow from Plexxikon (Berkeley, CA). For macrophage *in vivo* depletion, C57BL/6 mice were fed with PLX3397 or control chow during 7 d.

FTY720 treatment

Mice were injected *i.p.* daily with FTY720 (Cayman Chemical) in saline at a dose of ~1 μ g/g during 7 d.

Immunofluorescence microscopy

Inguinal, axillary, brachial, and maxillary mouse LNs were initially fixed overnight in 0.1 M phosphate buffer containing 75 mM L-lysine, 10 mM NaIO₄, and 1% paraformaldehyde (PLP fixative buffer). These organs were then embedded in 5% low-gelling-temperature agarose (type VII-A; Sigma-Aldrich) prepared in PBS. LN slices (230 μ m) were cut with a vibratome (VT 1000S; Leica) in a bath of ice-cold PBS. Slices were then incubated at 37°C, for 20 min per step, with Abs in PBS. Stained slices were photographed on an upright Leica stand with a confocal spinning disk Yokogawa head with a \times 25/0.95 Leica objective. Acquisitions were made with a Flash 4 LT Hamamatsu camera. Analysis was performed using ImageJ software. Data acquisition was performed on the Cochin imaging photonic (IMAG'IC) facility.

In vivo LPS challenge

C57BL/6 ROR γ t-GFP mice were injected *i.v.* with 100 μ g of LPS (from *Escherichia coli* 0111:B4; Sigma-Aldrich). Three hours after LPS challenge, cells recovered from pLNs, mLNs, and the spleen were incubated with 10 μ g/ml brefeldin A (Sigma-Aldrich) for 2 h at 37°C for determination of intracellular cytokine production.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM, and the significance of differences between two series of results was assessed using the Student paired or unpaired *t* test. A *p* value <0.05 was considered significant (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001).

Results

An important proportion of Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes are trapped in LNs in the steady state

According to Ly-6C and CD44 expression, we have recently characterized the heterogeneity of the peripheral $\gamma\delta$ T cell compartment by showing that it comprises Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells exhibiting innate-like features and naive and memory adaptive-like $\gamma\delta$ T cells (Ly-6C^{-/+} CD44^{lo} $\gamma\delta$ T cells and Ly-6C⁺ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells, respectively) (15). To go further, we decided to study the T cell trafficking dynamics of these subsets. We first inhibited the entry of circulating lymphocytes into LNs through the injection of integrin-neutralizing Abs (18, 28, 29). More precisely, C57BL/6 mice were injected *i.p.* with anti-LFA-1 and anti-VLA-4 Abs (Fig. 1A). We first verified that all $\gamma\delta$ T cells from pLNs, mLNs, and the spleen were expressing both LFA-1 and VLA-4 integrins (Supplemental Fig. 1). The phenotype of $\gamma\delta$ T cells remaining within LNs was analyzed 48 h after initiating the treatment (Fig. 1A). Interestingly, at that time point, Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells were greatly enriched within the $\gamma\delta$ T cells remaining within pLNs (Fig. 1B, 1C). This resulted from the fact that the great majority of Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells (~75%) remained trapped within pLNs whereas almost all of the other $\gamma\delta$ T cells had egressed from them (Fig. 1D). Such a phenomenon could also be observed, to a lower extent, in mLNs, as ~15% of the Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells were still present within this SLO 48 h after the injection of

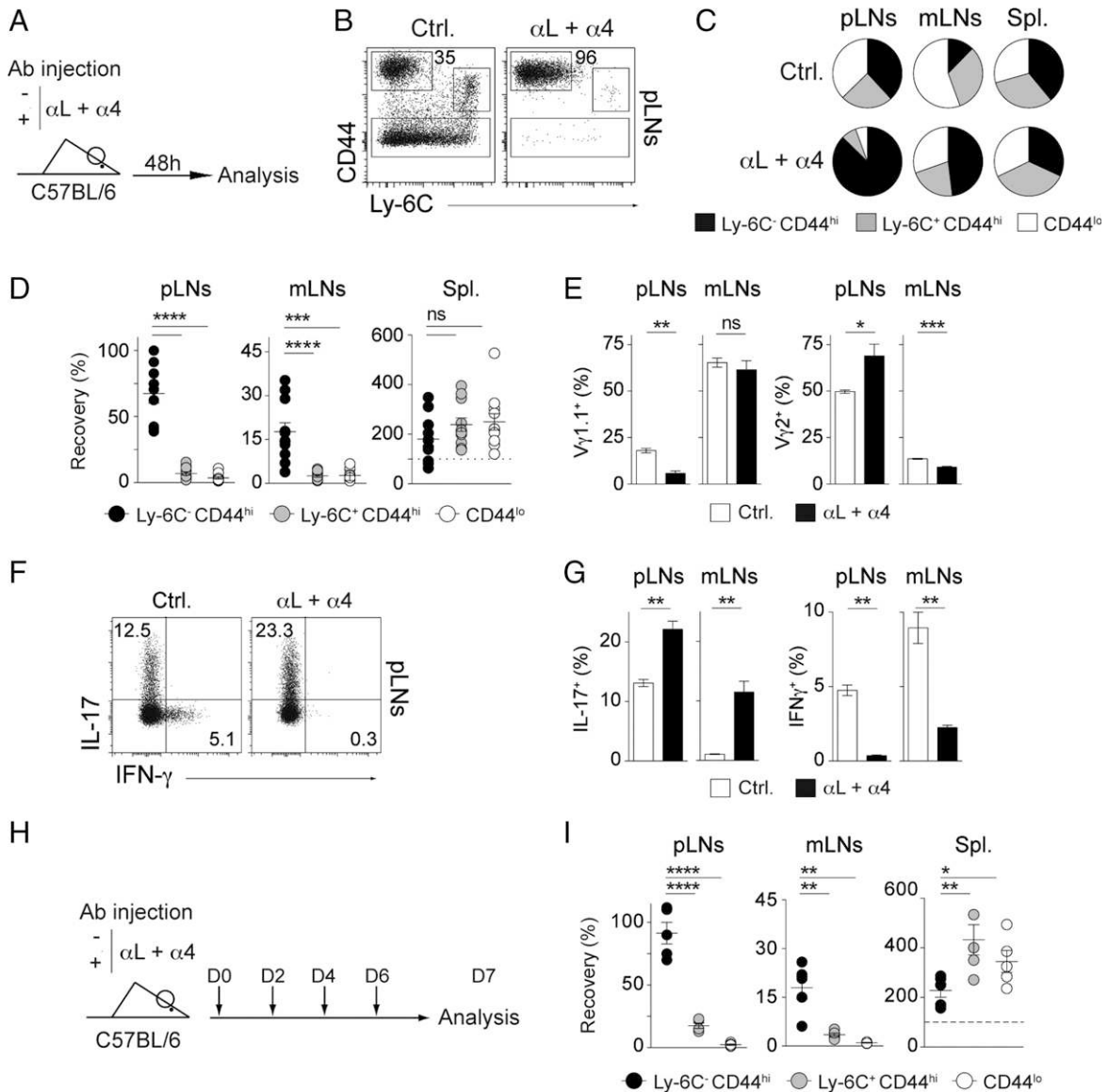


FIGURE 1. An important proportion of $\text{Ly-6C}^- \text{CD44}^{\text{hi}}$ $\gamma\delta$ T lymphocytes is trapped in LNs in the steady state. C57BL/6 mice have been injected i.p. with integrin-neutralizing anti-LFA-1 and anti-VLA-4 Abs. Two days after treatment, pLNs, mLNs, and spleen were recovered separately. (A) Diagram illustrating the experimental model. (B) CD44/Ly-6C dot plots for gated $\text{TCR}\gamma\delta^+$ cells recovered from pLNs of representative control and treated mice. Numbers on FACS dot plots indicate the percentage of $\text{Ly-6C}^- \text{CD44}^{\text{hi}}$ $\gamma\delta$ T cells among the $\gamma\delta$ T lymphocyte compartment. (C) Pie charts illustrating the proportions of $\gamma\delta$ T cell subsets recovered from pLNs, mLNs, and spleen of control and treated mice. (D) Percentage of $\gamma\delta$ T cell subset recovery within pLNs, mLNs, and spleen of anti-LFA-1- and anti-VLA-4-treated mice. The percentage of recovery was calculated by dividing the absolute numbers in treated mice by the mean absolute number obtained in untreated animals. (E) Percentage of $\text{V}\gamma 1.1^+$ and $\text{V}\gamma 2^+$ cells among $\text{Ly-6C}^- \text{CD44}^{\text{hi}}$ $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs and mLNs of control and anti-LFA-1- and anti-VLA-4-treated mice. (F) IL-17/IFN- γ dot plots for gated $\text{TCR}\gamma\delta^+$ cells recovered from pLNs of representative control and treated mice. (G) Proportion of IL-17- and IFN- γ -producing $\text{TCR}\gamma\delta^+$ cells recovered from pLNs and mLNs of control and treated mice. (H and I) C57BL/6 mice have been injected i.p. every 2 d during 6 d with 200 μg of both integrin-neutralizing Abs and analyzed 24 h later. (H) Diagram illustrating the experimental model. (I) Percentage of $\gamma\delta$ T cell subset recovery within pLNs, mLNs, and spleen of 6 d treated mice. For (C)–(E), (G), and (I), results are shown as mean \pm SEM for at least two mice per group per experiment, from at least three independent experiments, and each point indicates an individual mouse. Significance of differences between two series of results was assessed using a two-tailed paired (D and H) or unpaired (C and F) Student *t* test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. $\alpha 4$, anti-VLA-4; Ctrl., control; αL , anti-LFA-1; Spl., spleen.

integrin-neutralizing Abs (Fig. 1C, 1D). Of note, in this model, we observed a strong increase in the absolute numbers of all the different $\gamma\delta$ T cell subsets in the spleen (Fig. 1D). This phenomenon could result from the accumulation in the spleen of T lymphocytes egressing from LNs.

Narayan et al. (30) have previously shown that distinct cell types in the $\gamma\delta$ T cell lineage could be identified on the basis of their TCR repertoire usage. Therefore, we then analyzed the V γ -chain repertoire of $\text{Ly-6C}^- \text{CD44}^{\text{hi}}$ $\gamma\delta$ T cells remaining within pLNs and

mLNs after the injection of integrin-neutralizing Abs (Fig. 1E). Although we noticed a decreased proportion of V $\gamma 1.1$ -expressing cells associated with an enrichment of V $\gamma 2$ -expressing cells within pLNs following treatment, such a discrepancy was not observed within mLNs, indicating that V γ -chain usage does not allow precise identification of LN-trapped $\gamma\delta$ T lymphocytes.

Consistent with the fact that $\text{Ly-6C}^- \text{CD44}^{\text{hi}}$ $\gamma\delta$ T lymphocytes are the only $\gamma\delta$ T cells able to produce IL-17 in response to stimulation (15), we observed that, after treatment, within both

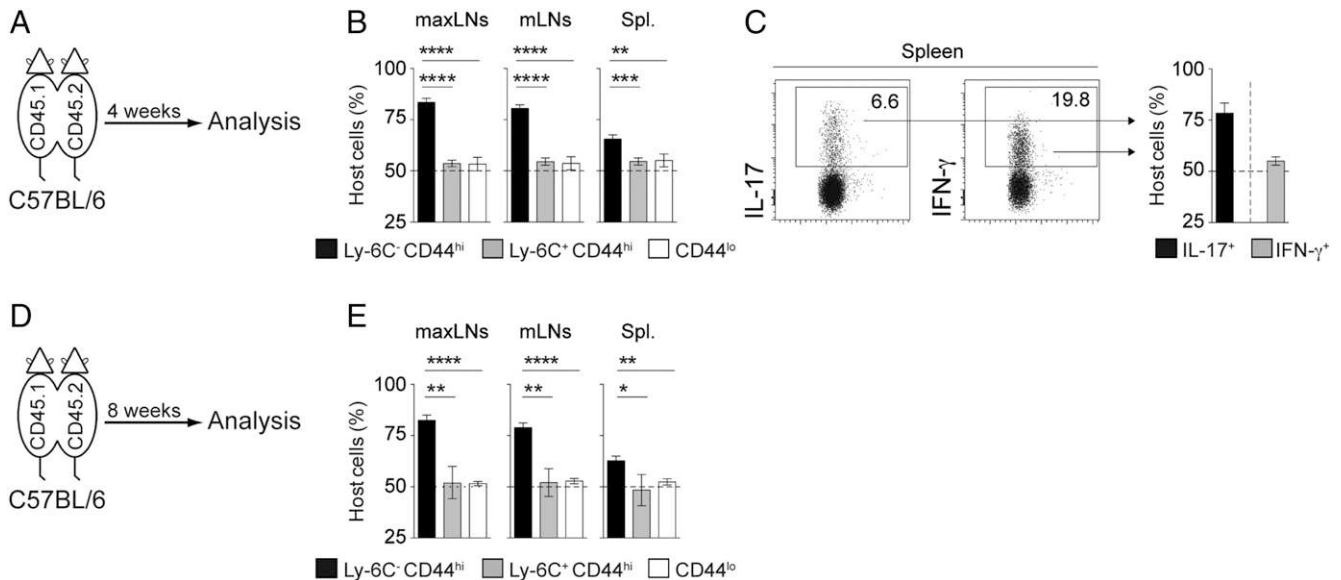


FIGURE 2. Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes are largely long-term SLO-resident cells in the steady state. Parabolic mice were established between CD45.1 and CD45.2 C57BL/6 mice. Four weeks after surgery, parabolic pairs were analyzed. (A) Diagram illustrating the experimental model. (B) Proportions of host cells, CD45.1⁺ for the CD45.1 parabolic and CD45.2⁺ for the CD45.2 parabolic, among the indicated $\gamma\delta$ T cell subsets recovered from pLNs, mLNs, and spleen from parabolic pairs. (C) IL-17 and IFN- γ dot plots for gated TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells recovered from spleen of representative parabolic mice and percentage of host cells among these IL-17⁻ and IFN- γ -producing $\gamma\delta$ T cells. (D and E) Parabolic mice were established between CD45.1 and CD45.2 C57BL/6 mice and analyzed 8 wk after surgery. (D) Diagram illustrating the experimental model. (E) Proportions of host cells among the indicated $\gamma\delta$ T cell subsets recovered from pLNs, mLNs, and spleen from parabolic pairs. Results are shown as mean \pm SEM for at least three mice per group per experiment, from at least three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. Spl., spleen.

pLNs and mLNs, a clear and significant increase in the proportion of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells correlated with a diminished ability of the remaining $\gamma\delta$ T cells to produce IFN- γ (Fig. 1F, G).

Because circulatory dynamics could differ between $\gamma\delta$ T cell subsets (i.e., Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells could need more time to exit LNs than Ly-6C⁺CD44^{hi} and CD44^{lo} $\gamma\delta$ T cells), we then decided to extend to 7 d the duration of the treatment blocking T cell entry into LNs from the blood (Fig. 1H). In this setting, we still observed that whereas almost all Ly-6C⁺CD44^{hi} and CD44^{lo} $\gamma\delta$ T cells have left LNs, the great majority of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells were still trapped in pLNs and to a lesser extent in mLNs (Fig. 1I). Taken together, our data suggest that contrary to the other $\gamma\delta$ T cell subsets, Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes from LNs are in part noncirculating cells.

A significant proportion of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes is long-term SLO-resident cells in the steady state

To explain the results presented above, one may argue that Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells could enter into LNs in an LFA-1- and VLA-4-independent manner. To address this issue, we then examined the cell exchange rate of the various $\gamma\delta$ T cell subsets from SLOs (using CD45.1 and CD45.2 congenic markers) that occurred between parabolic pairs (Fig. 2A). Four weeks following surgery, although both Ly-6C⁺CD44^{hi} and CD44^{lo} $\gamma\delta$ T cells have achieved full chimerism in all studied SLOs, Ly-6C⁻CD44^{hi} lymphocytes showed only limited exchange between the parabionts (Fig. 2B). In line with a weak circulatory dynamic of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells, we also observed a limited exchange of splenic IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells between parabolic mice (Fig. 2C). To examine whether these results were stable over time, we performed longer term parabiosis experiments (Fig. 2D). Eight weeks after surgery, in all studied SLOs, Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes still showed limited exchange between the paired mice (Fig. 2E). Collectively, these findings strongly suggest that an important proportion of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes corresponds to long-term SLO-resident cells in the steady state.

Macrophages are responsible for the long-term trapping of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes within SLOs in the steady state

We then attempted to identify the cellular actors involved in the retention of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells within SLOs. We first studied the potential involvement of B cells in this process. B cell-deficient or -proficient C57BL/6 mice were treated or not with integrin-neutralizing Abs and analyzed 48 h later (Fig. 3A). The retention rate (recovery) of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells in pLNs and mLNs was comparable in both mouse strains, 48 h after blocking T cell entry (Fig. 3B). Thus, B lymphocytes do not seem to be involved in the trapping of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells within LNs.

We next assessed whether DCs played a role in the retention of this $\gamma\delta$ T cell subset in LNs. For this purpose, C57BL/6 CD11c.DTR mice (designated CD11c.DOG), which allow, following DT injections, a continuous in vivo depletion of DCs, were injected or not with anti-LFA-1 and anti-VLA-4 Abs (Fig. 3C). We first assessed the depletion efficiency of such a protocol (Supplemental Fig. 2A, 2B). Depletion was quite efficient for plasmacytoid DCs in all LNs and better for the other DC subsets in mLNs than in pLNs. The recovery of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells in both pLNs and mLNs 48 h after blocking T cell entry into LNs was not diminished by DC depletion (Fig. 3D), suggesting that these latter cells are not crucially involved in the retention of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells within SLOs.

Finally, we examined whether macrophages could contribute to Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cell retention within SLOs. To test this hypothesis, C57BL/6 mice were fed with mouse chow containing an inhibitor of CSF1R (PLX3397; provided by Plexxikon) for 7 d (Fig. 3E). We first assessed the depletion efficiency of such a protocol (Supplemental Fig. 1C). This protocol led to the depletion of most subcapsular (F4/80⁺CD169⁺) and medullary (F4/80⁺CD169⁻) sinus macrophages in both pLNs and mLNs, whereas F4/80⁺CD169⁻ macrophages were only poorly affected, especially

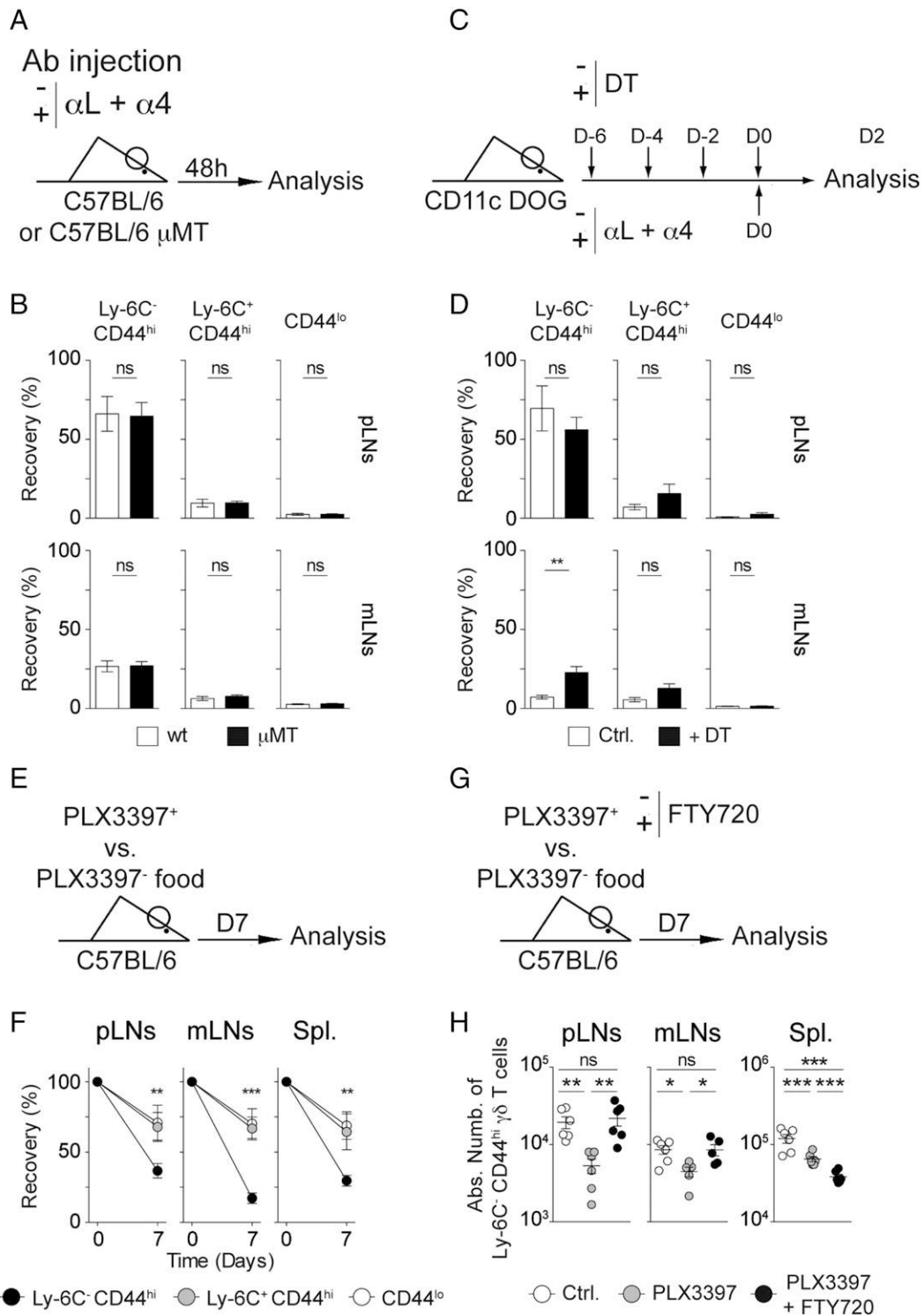
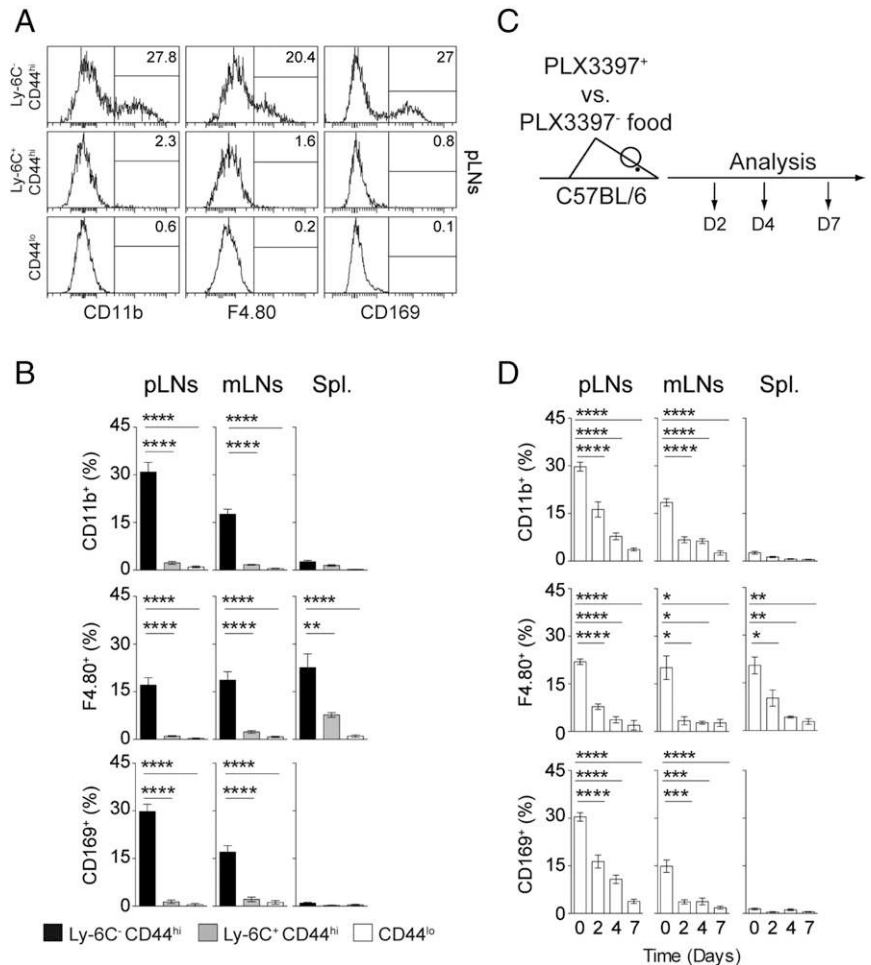


FIGURE 3. Macrophages are responsible for the long-term trapping of Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes within SLOs in the steady state. (**A** and **B**) C57BL/6 and C57BL/6 μ MT mice were treated or not with integrin-neutralizing Abs and analyzed 48 h later. (A) Diagram illustrating the experimental model. (B) Percentage of $\gamma\delta$ T cell subset recovery (calculated as in Fig. 1D) within pLNs and mLNs of anti-LFA-1- and anti-VLA-4-treated C57BL/6 and C57BL/6 μ MT mice. (**C** and **D**) C57BL/6 CD11c.DTR mice (designated CD11c.DOG) were injected or not with integrin-neutralizing Abs and DT. (C) Diagram illustrating the experimental model. (D) Percentage of $\gamma\delta$ T cell subset recovery within pLNs and mLNs of anti-LFA-1- and anti-VLA-4-treated control and DT-injected mice. (**E** and **F**) C57BL/6 mice were fed with mouse chow containing or not an inhibitor of CSF1R (PLX3397). Seven days after PLX3397 feeding, pLNs, mLNs, and spleen were recovered separately. (E) Diagram illustrating the experimental model. (F) Percentage of $\gamma\delta$ T cell subset recovery within pLNs, mLNs, and spleen of PLX3397 fed mice. (**G** and **H**) C57BL/6 mice were fed with mouse chow containing or not PLX3397 and daily injected or not with FTY720. Seven days after PLX3397 and FTY treatments, pLNs, mLNs, and spleen were recovered separately. (G) Diagram illustrating the experimental model. (H) Absolute numbers of Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs, mLNs, and spleen of control (Ctrl.), PLX3397-, and PLX3397 plus FTY720-treated mice. For (B), (D), (F), and (H), results are shown as mean \pm SEM for at least three mice per group per experiment, from at least two independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. α 4, anti-VLA-4; Ctrl., control; α L, anti-LFA-1; Spl., spleen.

FIGURE 4. Membrane blebs reveal the close intimacy between Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes and macrophage subsets in SLOs. **(A)** CD11b, F4/80, and CD169 fluorescence histograms of $\gamma\delta$ T cell subsets recovered from pLNs are shown for a representative C57BL/6 mouse. Numbers in each histogram represent the percentage of CD11b⁺ F4/80⁺, or CD169⁺ cells among $\gamma\delta$ T cell subsets. **(B)** The proportions of CD11b⁺, F4/80⁺, or CD169⁺ cells among $\gamma\delta$ T cell subsets recovered from pLNs, mLNs, and spleen of C57BL/6 mice were calculated. **(C)** and **(D)** C57BL/6 mice were fed with mouse chow containing or not an inhibitor of CSF1R (PLX3397). Two, 4, and 7 days after PLX3397 feeding, pLNs, mLNs, and spleen were recovered separately. **(C)** Diagram illustrating the experimental model. **(D)** The proportions of CD11b⁺, F4/80⁺, or CD169⁺ cells among Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs, mLNs, and spleen of C57BL/6 mice were calculated. Results are shown as mean \pm SEM for at least three mice per group per experiment, from at least three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. Spl., spleen.



in pLNs. We found that the absolute numbers of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells in pLNs, mLNs, and the spleen dropped dramatically in mice fed 7 d with PLX3397 chow (Fig. 3F). Although the absolute numbers of the other $\gamma\delta$ T cell subsets were also affected, the observed decreases were far less pronounced (Fig. 3F).

We hypothesized that macrophages would be required for Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cell retention within SLOs. In such a model, macrophage depletion would lead to the egress of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells from SLOs and that would account for the significant drop in absolute numbers observed in mice treated 7 d with PLX3397. The membrane receptor S1PR1, by allowing T cells to respond to the sphingolipid S1P present within efferent lymph, is the central mediator of lymphocyte egress from SLOs (31, 32). First, we studied S1PR1 expression by $\gamma\delta$ T cell subsets recovered from pLNs, mLNs, and the spleen (Supplemental Fig. 3). We found that Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells from pLNs and mLNs exhibited higher S1PR1 surface levels than did the other $\gamma\delta$ T cell subsets. Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells should be thus highly sensitive to S1P gradients. Then, C57BL/6 mice were fed with PLX3397 chow and daily injected or not for 7 d with FTY720 (Fig. 3G). Interestingly, FTY720 injections fully abrogated the strong decrease in Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cell absolute numbers provoked by the PLX3397 treatment in both pLNs and mLNs (Fig. 3H). These results suggest that CSF1R inhibitor administration is not toxic to $\gamma\delta$ T cells but rather allows them to egress from LNs through an S1PR1-dependent mechanism. Of note, FTY720 administration did not abolish the effect of the PLX3397 treatment in the spleen but rather accentuated the observed decrease of the absolute number of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$

T cells (Fig. 3G). This result could be explained by the duration of the S1PR1 agonist treatment. More precisely, it has already been described that whereas a single injection of FTY720 induces T cell sequestration in the spleen (33, 34), a prolonged FTY720 treatment rather leads, in this SLO, to a decrease in the absolute numbers of T lymphocytes (34–36).

Taken together, these last results suggest that macrophages play a crucial role in the long-term trapping of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes within SLOs.

Membrane blebs reveal the close intimacy between Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes and macrophages in SLOs

It has recently been shown that an important fraction of IL-17–committed T lymphocytes from pLNs could acquire membrane blebs from subcapsular sinus macrophages, reflecting the intimacy of the crosstalk between these two cell types (37). We thus examined the proportion of Ly-6C⁻CD44^{hi}, Ly-6C⁺CD44^{hi}, and Ly-6C⁺CD44^{lo} $\gamma\delta$ T lymphocytes expressing macrophage markers such as CD11b, F4/80, and CD169 (Fig. 4A, 4B). Expression of these three molecules was solely detected on the cell surface of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells. Interestingly, the surface expression of CD11b, F4/80, and CD169 by Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes seemed to vary depending on the location of these cells (pLNs versus mLNs versus the spleen; Fig. 4B), suggesting the ability of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes to initiate intimate crosstalk with various macrophage subsets such as subcapsular sinus macrophages (CD11b⁺F4/80⁻CD169⁺), medullary sinus macrophages (CD11b⁺F4/80⁺CD169⁺), or spleen red pulp macrophages (CD11b⁻F4/80⁺CD169⁻) (38–40). More precisely, the observed

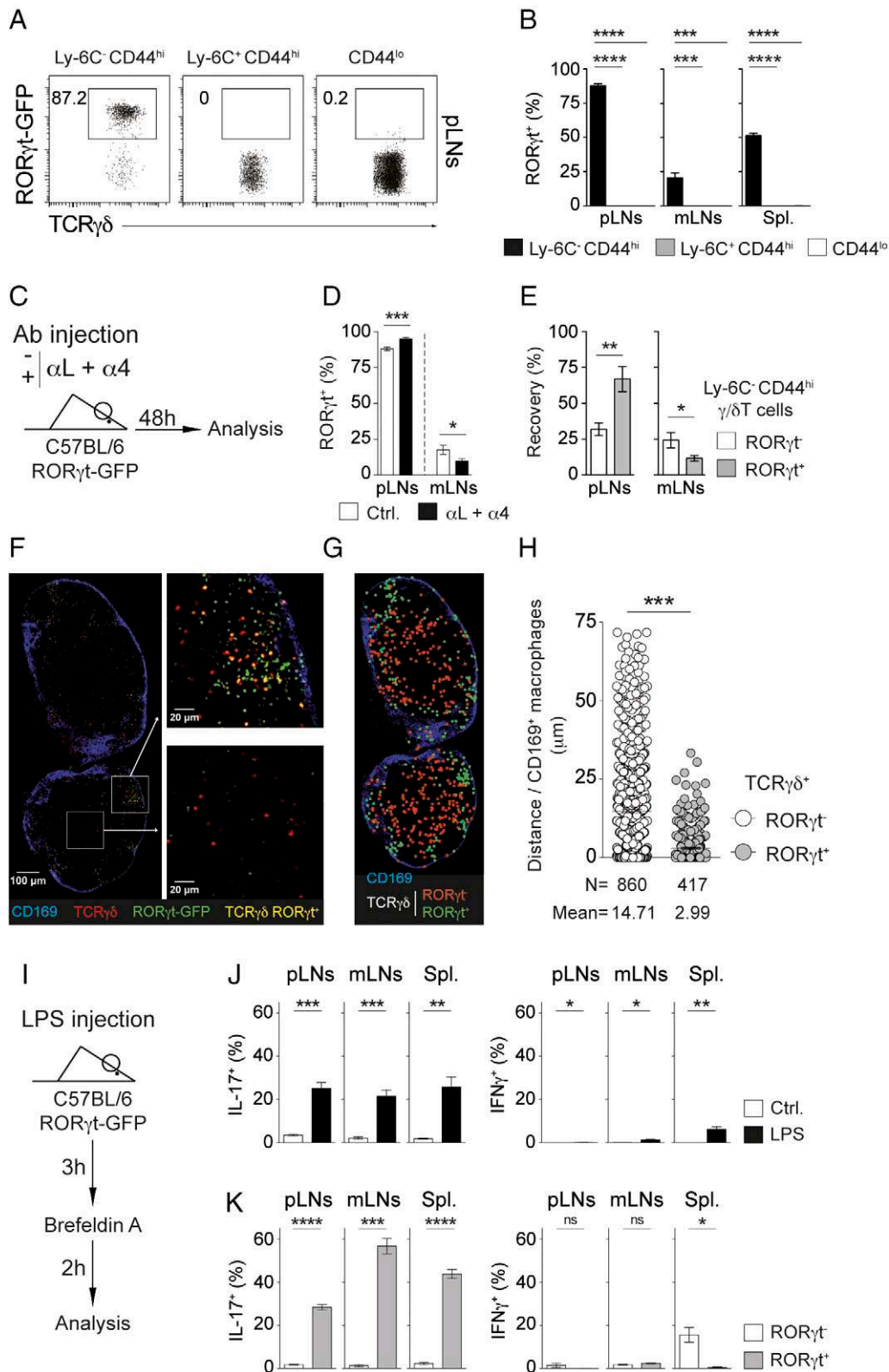


FIGURE 5. ROR γ t expression allows determination of the location of resident $\gamma\delta$ T cells within pLNs. **(A)** ROR γ t/TCR $\gamma\delta$ dot plots for gated $\gamma\delta$ T cell subsets recovered from pLNs of a representative C57BL/6 ROR γ t-GFP mouse. **(B)** The proportions of ROR γ t⁺ cells among $\gamma\delta$ T cell subsets recovered from pLNs, mLNs, and spleen of C57BL/6 ROR γ t-GFP mice were calculated. **(C–E)** C57BL/6 ROR γ t-GFP mice have been injected i.p. with integrin-neutralizing anti-LFA-1 and anti-VLA-4 Abs. Two days after treatment, pLNs and mLN were recovered separately. **(C)** Diagram illustrating the experimental model. **(D)** The proportions of ROR γ t⁺ cells among Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs and mLN of treated or untreated mice were calculated. **(E)** Percentage of ROR γ t⁺ and ROR γ t⁻ Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cell recovery (calculated as in Fig. 1) within pLNs and mLN of anti-LFA-1- and anti-VLA-4-treated mice. Results are shown as mean \pm SEM for at least three mice per group per experiment, from at least three independent experiments. **(F–H)** Location of ROR γ t⁻ and ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T cells within pLNs from C57BL/6 ROR γ t-GFP mice was examined. **(F)** Representative immunofluorescence TCR $\gamma\delta$, CD169, and ROR γ t-GFP staining of fixed pLN slices (maxillary LN is shown here). ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T cells appear in (Figure legend continues)

proportions of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells acquiring CD11b, F4/80, and CD169 expression suggest that these cells interact preferentially with subcapsular and medullary sinus macrophages within pLNs (30% of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells from pLNs expressed CD11b and CD169 whereas only 15% expressed F4/80), with medullary sinus macrophages in mLNs [equal proportions (15%) of cells from mLNs expressing CD11b, F4/80, and CD169] and with red pulp macrophages in the spleen (Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells only expressed F4/80) (Fig. 4B, Supplemental Fig. 4).

Using the PLX3397⁺ feeding strategy, we then studied the consequences of macrophage depletion on the expression of macrophage markers by Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes (Fig. 4C). Following PLX3397 treatment, there was a gradual decrease with time in the proportion of SLO Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells expressing CD11b, F4/80, or CD169 (Fig. 4D). These latter results confirm that the expression of CD11b, F4/80, and CD169 by this $\gamma\delta$ T cell subset results from the transfer of membrane blebs from macrophages to $\gamma\delta$ T cells.

Collectively, our results suggest that Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes initiate strong adhesive interactions with macrophages that may lead to their long-term retention within SLOs.

ROR γ t expression allows determination of the localization of resident $\gamma\delta$ T cells within pLNs

We have described above a clear enrichment in IL-17-producing cells among $\gamma\delta$ T cells in LNs, 48 h after blocking T cell entry into these SLOs (Fig. 1E, 1F). We thus hypothesized that the expression of the transcription factor ROR γ t may allow a precise identification of resident $\gamma\delta$ T cells in SLOs. We first evaluated the proportion of Ly-6C⁻CD44^{hi}, Ly-6C⁺CD44^{hi}, and Ly-6C⁺CD44^{lo} $\gamma\delta$ T lymphocytes expressing ROR γ t in SLOs by using ROR γ t-GFP transgenic mice (Fig. 5A, 5B). In agreement with the fact that only Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes are able to produce IL-17 (15), we found that ROR γ t expression was restricted to these cells. Surprisingly, the proportion of ROR γ t⁺ cells within Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells differed considerably depending on the organ studied. Indeed, whereas the vast majority (~80%) of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes recovered from pLNs expressed ROR γ t, this proportion was quite lower in mLNs and the spleen (Fig. 5B). We then examined the expression of ROR γ t by LN-resident $\gamma\delta$ T lymphocytes 48 h after blocking T cell entry (Fig. 5C–E). In pLNs, after treatment, the proportion of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells expressing ROR γ t was significantly higher than in pLNs from control mice (Fig. 5D). Accordingly, 48 h after blocking T cell entry, the recovery of ROR γ t⁺Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells was far better than the recovery observed for their ROR γ t⁻ cell counterparts (Fig. 5E). This was not the case for mLNs, as in this SLO, ROR γ t⁺Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells were more efficiently retained after treatment than ROR γ t⁺Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells (Fig. 5D, 5E).

Altogether, these results suggest that the expression of ROR γ t can be considered as a reliable marker to identify resident $\gamma\delta$ T cells within pLNs (but not in mLNs). Thus, to study the location of resident $\gamma\delta$ T cells in pLNs, we imaged pLN slices recovered from

ROR γ t-GFP mice by immunofluorescence microscopy (Fig. 5F–H). In line with the capacity of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes to acquire membrane blebs from subcapsular and medullary sinus macrophages, we clearly observed that ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T cells (most of which are resident cells within pLNs) were localized close to CD169⁺ sinus macrophages (Fig. 5F, 5G). Quantification of the distance between ROR γ t⁻ or ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T cells and CD169⁺ cells confirmed that ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T cells were very significantly far closer to CD169⁺ cells than their ROR γ t⁻ cell counterparts (Fig. 5H). Such a close vicinity may help explain the capacity of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells to acquire macrophage-related surface markers, and such interactions may lead to the long-term retention of these cells within SLOs.

Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes from SLOs respond rapidly in vivo to LPS challenge

As described above, our results suggest that Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes initiate strong adhesive interactions with macrophages that may lead to their long-term retention within SLOs. Additionally, we observed that resident ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T cells were localized close to CD169⁺ sinus macrophages within pLNs. We thus hypothesized that SLO-resident $\gamma\delta$ T cells could represent sentinels surveying the pathogen-exposed surface of SLOs.

To address this issue, ROR γ t-GFP transgenic mice were injected i.v. with LPS. IL-17 and IFN- γ productions by Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs, mLNs, and the spleen were then analyzed 3 h later (Fig. 5I). We observed that, in all SLOs, ~20% of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells were already producing IL-17 in response to LPS challenge at this early time point (Fig. 5J). Additionally, we noticed that IL-17 production was restricted to ROR γ t-expressing cells (Fig. 5K). Of note, in the same setting, we detected a small proportion of IFN- γ -producing Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells in the spleen, and this IFN- γ production was restricted to ROR γ t⁻ cells (Fig. 5J, 5K). The capacity of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells to rapidly produce IL-17 upon LPS challenge strongly suggests that these SLO-resident $\gamma\delta$ T cells could play a crucial surveying role to protect these organs from infections.

Discussion

To achieve their surveying task for foreign Ags and survival signals, peripheral T cells have been described as having a nomadic existence between blood, SLOs, and lymph in the steady state (16, 17). Transit times within SLOs should be 1) not too long, as T cells must continuously scan APCs from different LNs to find where the next pathogen will cross the epithelial barrier, but also 2) not too rapid to avoid missing the rare APCs presenting their specific Ag in SLOs in the early phases of an infection. However, in parallel to that model, recent findings highlight the existence of T cells residing for long periods of time within nonlymphoid tissues (41). More precisely, subsets of CD8⁺ and CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells but also subsets of NK cells, NKT cells, and $\gamma\delta$ T cells have been shown to reside within nonlymphoid tissues such as the skin, gut, lungs, or adipose tissue, providing rapid and efficient protection

yellow. Squares indicate zoomed areas presented on the figure. (G) Location modeling of ROR γ t⁻ and ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes within pLNs (maxillary LN is shown here). Coordinates of all ROR γ t⁻ and ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T cells were calculated from immunofluorescence staining shown in (F) and were then reapplied on CD169-stained LN slice. (H) Distance between ROR γ t⁻ and ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes and CD169⁺ cells were calculated. (I–K) C57BL/6 ROR γ t-GFP mice were injected i.v. with LPS. Three hours later, cells recovered from pLNs, mLNs, and spleen were incubated during 2 h with brefeldin A for determination of intracellular cytokine production. (l) Diagram illustrating the experimental model. (J) Percentage of IL-17- and IFN- γ -producing cells among Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs, mLNs, and spleen of control and LPS-treated mice. (K) Percentage of IL-17- and IFN- γ -producing cells among ROR γ t⁻ and ROR γ t⁺ Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs, mLNs, and spleen of LPS-treated mice. Results are shown as mean \pm SEM for at least three different LN slices from three different mice. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. α L, anti-VLA-4; Ctrl., control; α L, anti-LFA-1; Spl., spleen.

against reinfection by tissue-tropic pathogens but also promoting the repair of damaged tissues (42–47).

In the present study, using injection of integrin-neutralizing Abs and parabiosis strategies, we highlight the existence of $\gamma\delta$ T cells residing in the steady state in the SLOs of specific pathogen-free mice. In line with our results, Zhang et al. (32) have recently shown that innate-like T cells defined as expressing high surface levels of CD127 and CCR6, among which about one fourth corresponds to $\gamma\delta$ T cells, accumulated near the subcapsular sinus in pLNs. In this study, we confirm and extend these observations. First, whereas Zhang et al. (32) examined the amount of cell exchange 2 wk after surgery in parabiotic mice or 2 d after T cell photoconversion in photoconvertible fluorescence protein Kaede transgenic mice, our parabiosis experiments clearly showed that full chimerism between the two parabionts was still not reached in pLNs for Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells at least up to 2 mo after surgery (Fig. 2). Thus, in this study we demonstrate the long-term residency of these cells within pLNs. Second, we showed that the long-term retention of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells was not a peculiar feature of pLNs, as it also applies to mLNs and the spleen. Third, although we confirmed that in pLNs, innate-like Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T lymphocytes were located close to subcapsular sinus macrophages and were able to acquire, from this vicinity, the apparent expression of CD11b and CD169, our results strongly suggest that other subsets of macrophages are involved in the retention of these cells within SLOs (see below). Finally, we have also studied the behavior of the other $\gamma\delta$ T cell subsets (i.e., Ly-6C⁺CD44^{hi} and Ly-6C^{-/+}CD44^{lo} $\gamma\delta$ T cells) in SLOs and showed that whatever their naive-like or memory-like phenotype, they corresponded to circulating cells.

In addition to the CD11b and CD169 markers, about half of CD11b-expressing innate-like $\gamma\delta$ T cells in pLNs and all of them in mLNs were also acquiring F4/80 expression (Fig. 4B). Similar to CD11b and CD169, F4/80 surface expression by $\gamma\delta$ T cells decreased gradually following *in vivo* macrophage depletion, suggesting that innate-like $\gamma\delta$ T cells are not only interacting with subcapsular (CD11b⁺F4/80⁻CD169⁺) sinus macrophages but also with medullary (CD11b⁺F4/80⁺CD169⁺) sinus macrophages. Finally, our parabiosis experiments show that a fraction of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells are also residing for long periods of time in the spleen. In this SLO, only F4/80 was detected at the cell surface of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells. This latter result suggests that resident $\gamma\delta$ T lymphocytes are interacting with splenic red pulp (CD11b⁻F4/80⁺CD169⁻) macrophages. Such a hypothesis would be in agreement with previous studies that have observed a preferential localization of human and mice $\gamma\delta$ T lymphocytes within the red pulp of the spleen (48, 49). Interactions between tissue-resident $\gamma\delta$ T cells and F4/80⁺ macrophages have been reported in the lungs in mice (50). Indeed, it has been shown that pulmonary-resident $\gamma\delta$ T cells had an intrinsic preference to interact with F4/80⁺ macrophages (51). These continuous interactions would be important for their protective role as sentinels of airways and lung tissues.

Collectively, our data suggest that the precise nature of resident $\gamma\delta$ T cells but also of the macrophages involved in their retention varies according to the SLOs analyzed (pLNs versus mLNs versus the spleen). Indeed, whereas in pLNs, the residence of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells was mostly restricted to ROR γ t⁺ cells, ROR γ t⁻ cells were more efficiently trapped in mLNs than their ROR γ t⁺ cell counterparts. Furthermore, whereas both subcapsular and medullary sinus macrophages would be involved in the retention of Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells in pLNs, the role of subcapsular sinus macrophages would be less crucial in mLNs and the spleen. Indeed, medullary sinus and red pulp macrophages appear as the main actors implied in the retention of $\gamma\delta$ T cells in mLNs and the spleen,

respectively. Sinus and red pulp macrophages have a propensity to capture particulate material arriving in the lymph and the blood (52–54). Thus, we hypothesize that resident Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells could play a critical surveillance role in protecting SLOs from infections. In our previous study, we showed that Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells possessed innate-like properties such as the ability to respond directly to TLR ligands *in vitro* (15). In this study, we found that Ly-6C⁻CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells from SLOs were rapidly able to produce IL-17 *in vivo* in response to LPS challenge. In this setting, LPS may activate them directly or indirectly through the induction of IL-23 and IL-1 β production by neighboring macrophages, as it has been described that ROR γ t⁺ $\gamma\delta$ T cells express IL-23R and produce IL-17 in response to IL-1 β and IL-23, without TCR engagement (6). We are thus proposing that resident $\gamma\delta$ T cells and macrophages could have complementary roles and may represent a major barrier blocking the systemic spread of pathogens within SLOs by providing rapid innate responses.

Acknowledgments

We are grateful to Plexxikon for providing the PLX3397 inhibitor. We thank the Cochin Cytometry and Immunobiology (CIBIO), Cochin Imaging Photonic (IMAG'IC), and Cochin Animal Core facilities for their technological support.

Disclosures

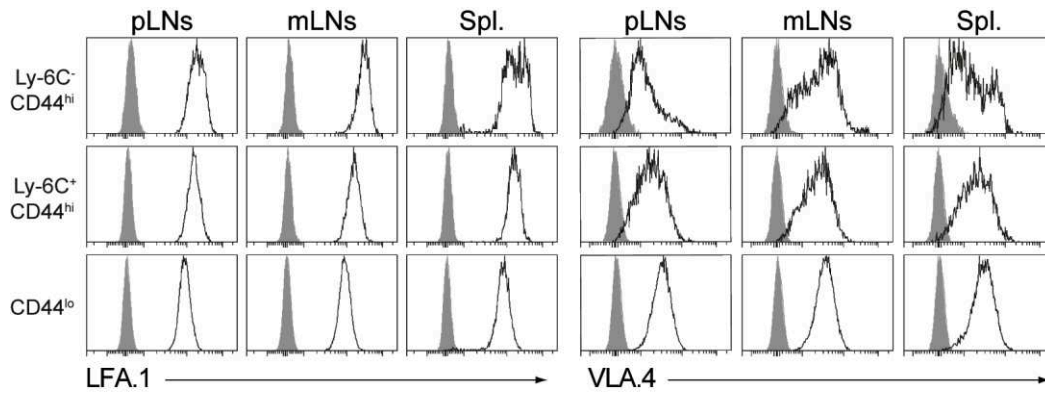
The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Chien, Y. H., C. Meyer, and M. Bonneville. 2014. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 32: 121–155.
- Nanno, M., Y. Kanari, T. Naito, N. Inoue, T. Hisamatsu, H. Chinen, K. Sugimoto, Y. Shimomura, H. Yamagishi, T. Shiohara, et al. 2008. Exacerbating role of $\gamma\delta$ T cells in chronic colitis of T-cell receptor α mutant mice. *Gastroenterology* 134: 481–490.
- Mombaerts, P., E. Mizoguchi, M. J. Grusby, L. H. Glimcher, A. K. Bhan, and S. Tonegawa. 1993. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 75: 274–282.
- Roark, C. L., J. D. French, M. A. Taylor, A. M. Bendele, W. K. Born, and R. L. O'Brien. 2007. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *J. Immunol.* 179: 5576–5583.
- Keystone, E. C., C. Rittershaus, N. Wood, K. M. Snow, J. Flatow, J. C. Purvis, L. Poplonski, and P. C. Kung. 1991. Elevation of a $\gamma\delta$ T cell subset in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 84: 78–82.
- Sutton, C. E., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, C. F. Brereton, E. C. Lavelle, and K. H. Mills. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31: 331–341.
- Wucherpfennig, K. W., P. Höllsberg, J. H. Richardson, D. Benjamin, and D. A. Hafler. 1992. T-cell activation by autologous human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2110–2114.
- Street, S. E., Y. Hayakawa, Y. Zhan, A. M. Lew, D. MacGregor, A. M. Jamieson, A. Diefenbach, H. Yagita, D. I. Godfrey, and M. J. Smyth. 2004. Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and $\gamma\delta$ T cells. *J. Exp. Med.* 199: 879–884.
- Girardi, M., D. E. Oppenheim, C. R. Steele, J. M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R. E. Tigelaar, and A. C. Hayday. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. *Science* 294: 605–609.
- Liu, Z., I. E. Eltoun, B. Guo, B. H. Beck, G. A. Cloud, and R. D. Lopez. 2008. Protective immunosurveillance and therapeutic antitumor activity of $\gamma\delta$ T cells demonstrated in a mouse model of prostate cancer. *J. Immunol.* 180: 6044–6053.
- Gao, Y., W. Yang, M. Pan, E. Scully, M. Girardi, L. H. Augenlicht, J. Craft, and Z. Yin. 2003. $\gamma\delta$ T cells provide an early source of interferon γ in tumor immunity. *J. Exp. Med.* 198: 433–442.
- Lança, T., M. F. Costa, N. Gonçalves-Sousa, M. Rei, A. R. Grosso, C. Penido, and B. Silva-Santos. 2013. Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic $\gamma\delta$ T lymphocytes to tumor beds. *J. Immunol.* 190: 6673–6680.
- Lafont, V., F. Sanchez, E. Laprevotte, H. A. Michaud, L. Gros, J. F. Eliaou, and N. Bonnefoy. 2014. Plasticity of $\gamma\delta$ T cells: impact on the anti-tumor response. *Front. Immunol.* 5: 622.
- Coffelt, S. B., K. Kersten, C. W. Doornebal, J. Weiden, K. Vrijland, C. S. Hau, N. J. Versteegen, M. Ciampicotti, L. J. Hawinkels, J. Jonkers, and K. E. de Visser. 2015. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 522: 345–348.
- Lombes, A., A. Durand, C. Charvet, M. Rivière, N. Bonilla, C. Auffray, B. Lucas, and B. Martin. 2015. Adaptive immune-like $\gamma\delta$ T lymphocytes share

- many common features with their α/β T cell counterparts. *J. Immunol.* 195: 1449–1458.
16. von Andrian, U. H., and T. R. Mempel. 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 867–878.
 17. Gowans, J. L., and E. J. Knight. 1964. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 159: 257–282.
 18. Mandl, J. N., R. Liou, F. Klauschen, N. Vrisekoop, J. P. Monteiro, A. J. Yates, A. Y. Huang, and R. N. Germain. 2012. Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 18036–18041.
 19. Vantourout, P., and A. Hayday. 2013. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 88–100.
 20. Silva-Santos, B., K. Serre, and H. Norell. 2015. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 683–691.
 21. Akitsu, A., H. Ishigame, S. Kakuta, S. H. Chung, S. Ikeda, K. Shimizu, S. Kubo, Y. Liu, M. Umemura, G. Matsuzaki, et al. 2015. IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2⁺V γ 6⁺ $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Commun.* 6: 7464.
 22. Ramírez-Valle, F., E. E. Gray, and J. G. Cyster. 2015. Inflammation induces dermal V γ 4⁺ $\gamma\delta$ T17 memory-like cells that travel to distant skin and accelerate secondary IL-17–driven responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 8046–8051.
 23. Penido, C., M. F. Costa, M. C. Souza, K. A. Costa, A. L. Candéa, C. F. Benjamim, and Md. Henriques. 2008. Involvement of CC chemokines in $\gamma\delta$ T lymphocyte trafficking during allergic inflammation: the role of CCL2/CCR2 pathway. *Int. Immunol.* 20: 129–139.
 24. Hochweller, K., J. Striegler, G. J. Hämmerling, and N. Garbi. 2008. A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 38: 2776–2783.
 25. Lochner, M., L. Peduto, M. Cherrier, S. Sawa, F. Langa, R. Varona, D. Riethmacher, M. Si-Tahar, J. P. Di Santo, and G. Eberl. 2008. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17⁺ and regulatory IL-10⁺ Foxp3⁺ ROR γ t⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 205: 1381–1393.
 26. Le Champion, A., A. Pommier, A. Delpoux, L. Stouvenel, C. Auffray, B. Martin, and B. Lucas. 2012. IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4⁺ T cell compartments during peripheral T cell reconstitution. *J. Immunol.* 189: 3339–3346.
 27. Pommier, A., A. Audemard, A. Durand, R. Lengagne, A. Delpoux, B. Martin, L. Douguet, A. Le Champion, M. Kato, M. F. Avril, et al. 2013. Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 13085–13090.
 28. Delpoux, A., P. Yakonowsky, A. Durand, C. Charvet, M. Valente, A. Pommier, N. Bonilla, B. Martin, C. Auffray, and B. Lucas. 2014. TCR signaling events are required for maintaining CD4 regulatory T cell numbers and suppressive capacities in the periphery. *J. Immunol.* 193: 5914–5923.
 29. Martin, B., C. Auffray, A. Delpoux, A. Pommier, A. Durand, C. Charvet, P. Yakonowsky, H. de Boysson, N. Bonilla, A. Audemard, et al. 2013. Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat. Commun.* 4: 2209.
 30. Narayan, K., K. E. Sylvia, N. Malhotra, C. C. Yin, G. Martens, T. Vallerskog, H. Kornfeld, N. Xiong, N. R. Cohen, M. B. Brenner, et al; Immunological Genome Project Consortium. 2012. Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct $\gamma\delta$ T cell subtypes. *Nat. Immunol.* 13: 511–518.
 31. Cyster, J. G., and S. R. Schwab. 2012. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 69–94.
 32. Zhang, Y., T. L. Roth, E. E. Gray, H. Chen, L. B. Rodda, Y. Liang, P. Ventura, S. Villeda, P. R. Crocker, and J. G. Cyster. 2016. Migratory and adhesive cues controlling innate-like lymphocyte surveillance of the pathogen-exposed surface of the lymph node. *eLife* 5: e18156.
 33. Mandala, S., R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G. J. Shei, D. Card, C. Keohane, et al. 2002. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296: 346–349.
 34. Morris, M. A., D. R. Gibb, F. Picard, V. Brinkmann, M. Straume, and K. Ley. 2005. Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720. *Eur. J. Immunol.* 35: 3570–3580.
 35. Hofmann, M., V. Brinkmann, and H. G. Zerwes. 2006. FTY720 preferentially depletes naive T cells from peripheral and lymphoid organs. *Int. Immunopharmacol.* 6: 1902–1910.
 36. Schwab, S. R., and J. G. Cyster. 2007. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* 8: 1295–1301.
 37. Gray, E. E., S. Friend, K. Suzuki, T. G. Phan, and J. G. Cyster. 2012. Subcapsular sinus macrophage fragmentation and CD169⁺ bleb acquisition by closely associated IL-17-committed innate-like lymphocytes. *PLoS One* 7: e38258.
 38. Gray, E. E., and J. G. Cyster. 2012. Lymph node macrophages. *J. Innate Immun.* 4: 424–436.
 39. Franken, L., M. Schiwon, and C. Kurts. 2016. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cell. Microbiol.* 18: 475–487.
 40. Franken, L., M. Klein, M. Spasova, A. Elskova, U. Wiedwald, M. Welz, P. Knolle, M. Farle, A. Limmer, and C. Kurts. 2015. Splenic red pulp macrophages are intrinsically superparamagnetic and contaminate magnetic cell isolates. *Sci. Rep.* 5: 12940.
 41. Mueller, S. N., and L. K. Mackay. 2016. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 16: 79–89.
 42. Turner, D. L., and D. L. Farber. 2014. Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology. *Front. Immunol.* 5: 331.
 43. Panduro, M., C. Benoist, and D. Mathis. 2016. Tissue Tregs. *Annu. Rev. Immunol.* 34: 609–633.
 44. Peng, H., X. Jiang, Y. Chen, D. K. Sojka, H. Wei, X. Gao, R. Sun, W. M. Yokoyama, and Z. Tian. 2013. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J. Clin. Invest.* 123: 1444–1456.
 45. Lynch, L., X. Michelet, S. Zhang, P. J. Brennan, A. Moseman, C. Lester, G. Besra, E. E. Vomhof-Dekrey, M. Tighe, H. F. Koay, et al. 2015. Regulatory γ NKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T_{reg} cells and macrophages in adipose tissue. *Nat. Immunol.* 16: 85–95.
 46. Di Marco Barros, R., N. A. Roberts, R. J. Dart, P. Vantourout, A. Jandke, O. Nussbaumer, L. Deban, S. Cipolat, R. Hart, M. L. Iannitto, et al. 2016. Epithelia use butyrophilin-like molecules to shape organ-specific $\gamma\delta$ T cell compartments. *Cell.* 167: 203–218.e17.
 47. O'Brien, R. L., and W. K. Born. 2015. Dermal $\gamma\delta$ T cells—what have we learned? *Cell. Immunol.* 296: 62–69.
 48. Bordessoule, D., P. Gaulard, and D. Y. Mason. 1990. Preferential localisation of human lymphocytes bearing gamma delta T cell receptors to the red pulp of the spleen. *J. Clin. Pathol.* 43: 461–464.
 49. Nolte, M. A., E. N. Hoen, A. van Stijn, G. Kraal, and R. E. Mebius. 2000. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. *Eur. J. Immunol.* 30: 626–634.
 50. Nanno, M., T. Shiohara, H. Yamamoto, K. Kawakami, and H. Ishikawa. 2007. $\gamma\delta$ T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol. Rev.* 215: 103–113.
 51. Wands, J. M., C. L. Roark, M. K. Aydintug, N. Jin, Y. S. Hahn, L. Cook, X. Yin, J. Dal Porto, M. Lahn, D. M. Hyde, et al. 2005. Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *J. Leukoc. Biol.* 78: 1086–1096.
 52. Carrasco, Y. R., and F. D. Batista. 2007. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27: 160–171.
 53. Cinamon, G., M. A. Zachariah, O. M. Lam, F. W. Foss, Jr., and J. G. Cyster. 2008. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat. Immunol.* 9: 54–62.
 54. Junt, T., E. A. Moseman, M. Iannacone, S. Massberg, P. A. Lang, M. Boes, K. Fink, S. E. Henrickson, D. M. Shayakhmetov, N. C. Di Paolo, et al. 2007. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450: 110–114.

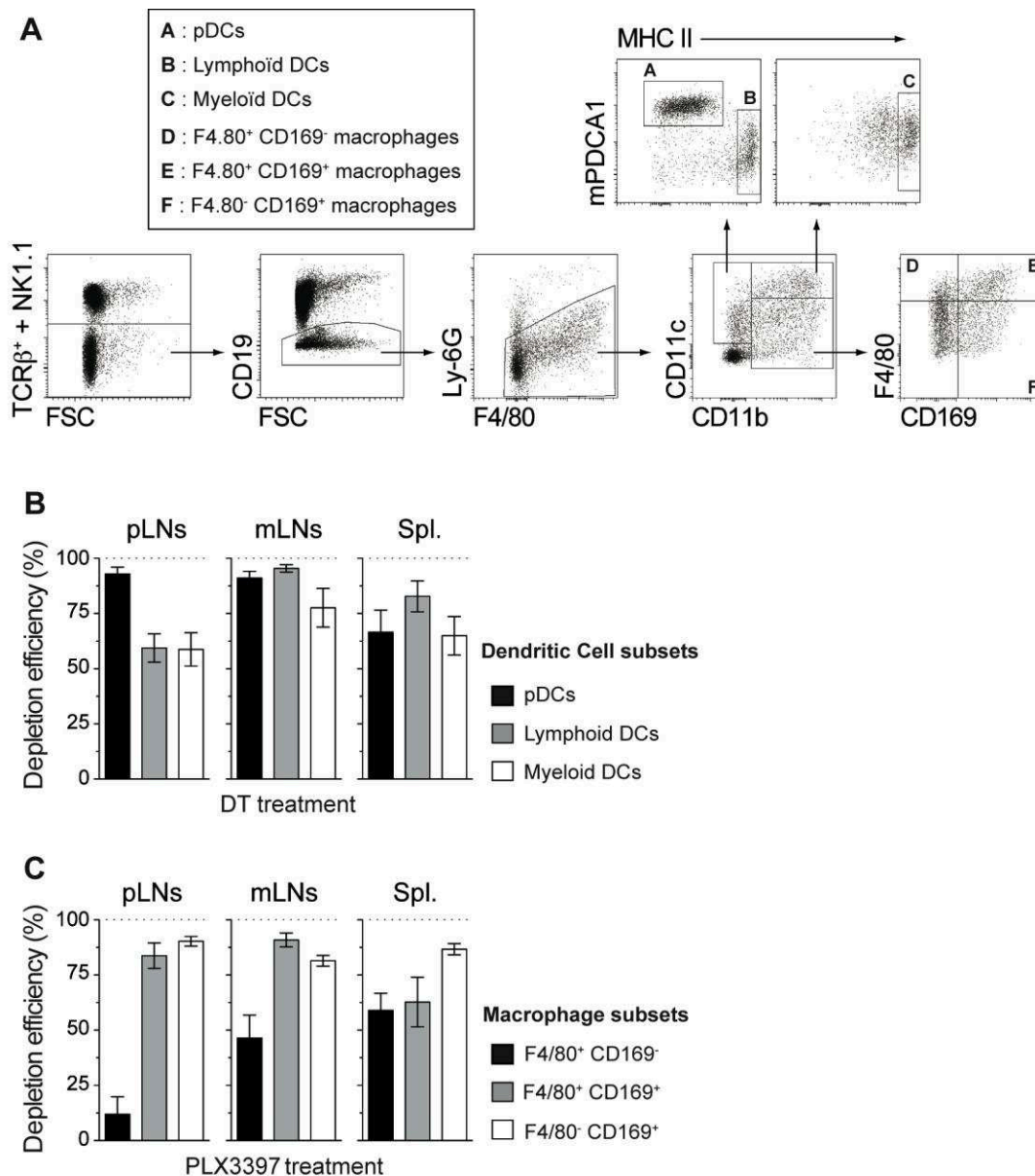
SUPPLEMENTAL INFORMATION



Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 1: LFA.1 and VLA.4 expressions by $\gamma\delta$ T-cell subsets recovered from SLOs

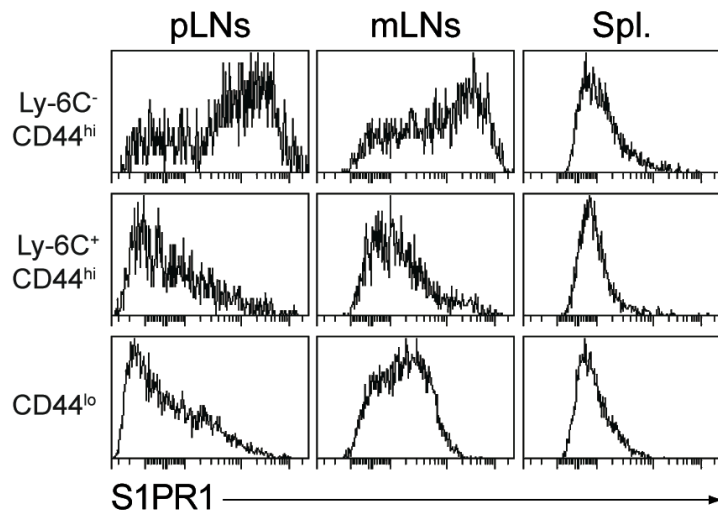
LFA.1 and VLA.4 fluorescence histograms of Ly-6C⁻ CD44^{hi}, Ly-6C⁺ CD44^{hi} and CD44^{lo} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs, mLNs and spleen (Spl.) are shown for a representative C57BL/6 mouse. Unstained cells are shown (grey histograms).



Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2: Gating strategy and *in vivo* cell depletions assessment

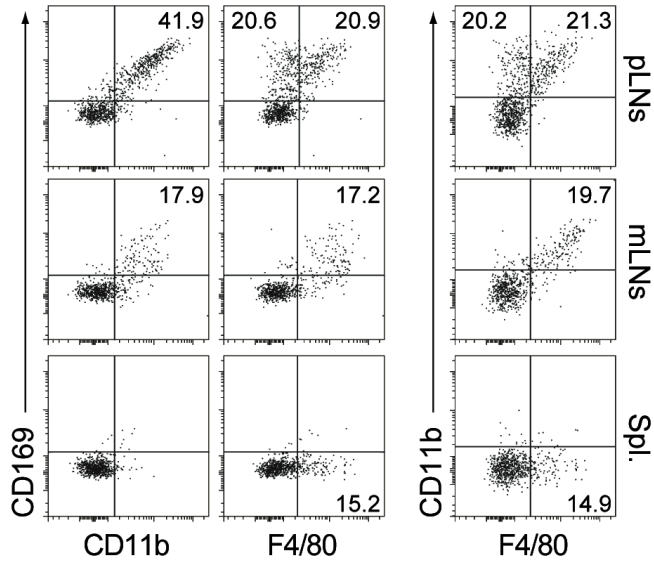
(A) Dot plots illustrating the gating strategy used to define peripheral myeloid subsets. Cells recovered from pLNs are shown here. (B) C57BL/6 CD11c.DTR mice (designated CD11c.DOG) have been injected with Diphtheria Toxin (DT) every 2 days during 6 days (as shown on Fig. 3C). pLNs, mLNs and spleen were then recovered to analyze the depletion efficiency of DT treatment on the different dendritic cell subsets. (C) C57BL/6 mice were fed with mouse chow containing or not an inhibitor of CSF1R (PLX3397). Seven days after PLX3397 feeding, pLNs, mLNs and spleen were recovered separately to analyze the depletion efficiency of macrophage subsets.



Supplementary Figure 3

Supplementary Figure 3: S1PR1 expression by $\gamma\delta$ T-cell subsets recovered from SLOs

S1PR1 fluorescence histograms of Ly-6C⁻ CD44^{hi}, Ly-6C⁺ CD44^{hi} and CD44^{lo} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs, mLNs and spleen (Spl.) are shown for a representative C57BL/6 mouse.



Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 4: Macrophage blebs expression by innate-like $\gamma\delta$ T cells within SLOs

CD169/CD11b, CD169/F4/80 and CD11b/F4/80 dot-plots for gated Ly-6C⁻ CD44^{hi} $\gamma\delta$ T cells recovered from pLNs, mLNs and spleen of a representative C57BL/6 mouse.

BIBLIOGRAPHIE

- Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology* 3, 939–951.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278, 1910–1914.
- Alarcón, B., Gil, D., Delgado, P., and Schamel, W.W.A. (2003). Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol. Rev.* 191, 38–46.
- Anderson, M.S. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the Aire Protein. *Science* 298, 1395–1401.
- von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 867–878.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190, 995–1004.
- Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T., and Hirai, H. (2003). Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res.* 63, 4516–4520.
- Azzam, H.S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E.W., and Love, P.E. (1998). CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* 188, 2301–2311.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* 21, 381–395.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21.
- 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. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1765–1774.
- Berridge, M.J. (2016). The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological Reviews* 96, 1261–1296.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11–21.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.

- Biancone, L., Bowen, M.A., Lim, A., Aruffo, A., Andres, G., and Stamenkovic, I. (1996). Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184, 811–819.
- Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J.R., Tarakhovsky, A., and Bondada, S. (1996). CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 274, 1906–1909.
- Bock, C., Beerman, I., Lien, W.-H., Smith, Z.D., Gu, H., Boyle, P., Gnirke, A., Fuchs, E., Rossi, D.J., and Meissner, A. (2012). DNA Methylation Dynamics during In Vivo Differentiation of Blood and Skin Stem Cells. *Molecular Cell* 47, 633–647.
- Boissonnas, A., Scholer-Dahirel, A., Simon-Blancal, V., Pace, L., Valet, F., Kissenpfennig, A., Sparwasser, T., Malissen, B., Fetler, L., and Amigorena, S. (2010). Foxp3⁺ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32, 266–278.
- Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* 7, 1092–1100.
- 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. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1303–1310.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepers, 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.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 Receptor -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 178, 280–290.
- Burgueño-Bucio, E., Mier-Aguilar, C.A., and Soldevila, G. (2019). The multiple faces of CD5. *Journal of Leukocyte Biology*.
- Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A.C., Mages, H.W., Lam, K.-P., Coyle, A.J., Kroczeck, R.A., and Hutloff, A. (2008). ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J. Immunol.* 180, 774–782.
- Burnet, F.M. (1969). Self and Not-self.
- Bushar, N.D., Corbo, E., Schmidt, M., Maltzman, J.S., and Farber, D.L. (2010). Ablation of SLP-76 signaling after T cell priming generates memory CD4 T cells impaired in steady-state and cytokine-driven homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 827–831.
- Calnan, B.J., Szychowski, S., Chan, F.K., Cado, D., and Winoto, A. (1995). A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3, 273–282.

- 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.
- Capalbo, D., De Martino, L., Giardino, G., Di Mase, R., Di Donato, I., Parenti, G., Vajro, P., Pignata, C., and Salerno, M. (2012). Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy: Insights into genotype-phenotype correlation. *International Journal of Endocrinology* 2012, 1–9.
- Carpenter, A.C., and Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology* 11, 666–673.
- Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (2000). Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J. Immunol.* 164, 5782–5787.
- 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.
- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* 173, 945–954.
- Chen, Q., Kim, Y.C., Laurence, A., Punkosdy, G.A., and Shevach, E.M. (2011). IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-induced Foxp3⁺ T cells in vivo. *The Journal of Immunology* 186, 6329–6337.
- 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. *The Journal of Experimental Medicine* 198, 1875–1886.
- Cheng, L.E., Chan, F.K., Cado, D., and Winoto, A. (1997). Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* 16, 1865–1875.
- Chin, D., and Means, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology* 10, 322–328.
- 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.
- Cobbold, S.P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., and Waldmann, H. (2004). Induction of Foxp3⁺ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *The Journal of Immunology* 172, 6003–6010.
- Collison, L.W., Pillai, M.R., Chaturvedi, V., and Vignali, D.A.A. (2009). Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *The Journal of Immunology* 182, 6121–6128.

- Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., et al. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature Immunology* 11, 1093–1101.
- Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., and Bottomly, K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 182, 1591–1596.
- 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. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1757–1764.
- Coquet, J.M., Ribot, J.C., Bąbała, N., Middendorp, S., van der Horst, G., Xiao, Y., Neves, J.F., Fonseca-Pereira, D., Jacobs, H., Pennington, D.J., et al. (2013). Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27–CD70 pathway. *J Exp Med* 210, 715–728.
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41, 529–542.
- Cullen, P.J., and Lockyer, P.J. (2002). Integration of calcium and Ras signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 339–348.
- Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., and Lafaille, J.J. (2008). Adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29, 114–126.
- Daley, S.R., Hu, D.Y., and Goodnow, C.C. (2013a). Helios marks strongly autoreactive CD4⁺ T cells in two major waves of thymic deletion distinguished by induction of PD-1 or NF- κ B. *J Exp Med* 210, 269–285.
- Daley, S.R., Coakley, K.M., Hu, D.Y., Randall, K.L., Jenne, C.N., Limnander, A., Myers, D.R., Polakos, N.K., Enders, A., Roots, C., et al. (2013b). Rasgrp1 mutation increases naïve T-cell CD44 expression and drives mTOR-dependent accumulation of Helios⁺ T cells and autoantibodies. *ELife* 2, e01020.
- Dan, H.C., Antonia, R.J., and Baldwin, A.S. (2016). PI3K/Akt promotes feedforward mTORC2 activation through IKK α . *Oncotarget* 7, 21064–21075.
- Daniels, M.A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Holländer, G.A., Gascoigne, N.R.J., and Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444, 724–729.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.-C., et al. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁽⁻⁾ effector T cells. *Nat. Immunol.* 9, 1347–1355.
- Darrasse-Jèze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of

regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 1853–1862.

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. *The Journal of Immunology* 178, 4022–4026.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1257–1265.

Dejean, A.S., Hedrick, S.M., and Kerdiles, Y.M. (2011). Highly specialized role of forkhead box O transcription factors in the immune system. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 663–674.

DeLong, J.H., Hall, A.O., Konradt, C., Coppock, G.M., Park, J., Harms Pritchard, G., and Hunter, C.A. (2018). Cytokine- and TCR-mediated regulation of T cell expression of Ly6C and Sca-1. *J. Immunol.* 200, 1761–1770.

Delpoux, A., Poitrasson-Rivière, M., Le Campion, A., Pommier, A., Yakonowsky, P., Jacques, S., Letourneur, F., Randriamampita, C., Lucas, B., and Auffray, C. (2012). Foxp3-independent loss of regulatory CD4⁺ T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* 42, 1237–1249.

Delpoux, A., Yakonowsky, P., Durand, A., Charvet, C., Valente, M., Pommier, A., Bonilla, N., Martin, B., Auffray, C., and Lucas, B. (2014). TCR signaling events are required for maintaining CD4 regulatory T cell numbers and suppressive capacities in the periphery. *The Journal of Immunology* 193, 5914–5923.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2, 1032–1039.

Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386, 855–858.

Dolmetsch, R.E., Xu, K., and Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933–936.

Dong, B., Somani, A.-K., Love, P.E., Zheng, X., Chen, X., and Zhang, J. (2016). CD5-mediated inhibition of TCR signaling proceeds normally in the absence of SHP-1. *Int. J. Mol. Med.* 38, 45–56.

Dong, T.X., Othy, S., Greenberg, M.L., Jairaman, A., Akunwafo, C., Leverrier, S., Yu, Y., Parker, I., Dynes, J.L., and Cahalan, M.D. (2017). Intermittent Ca²⁺ signals mediated by Orai1 regulate basal T cell motility. *ELife* 6, e27827.

Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2003). Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J. Immunol.* 170, 3514–3521.

- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857–863.
- Dzhagalov, I.L., Chen, K.G., Herzmark, P., and Robey, E.A. (2013). Elimination of self-reactive T cells in the thymus: a timeline for negative selection. *PLoS Biol.* 11, e1001566.
- 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.
- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology* 7, 690–702.
- Feske, S., Giltmane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L.M., and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature Immunology* 2, 316–324.
- Finney, C.A.M., Taylor, M.D., Wilson, M.S., and Maizels, R.M. (2007). Expansion and activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *European Journal of Immunology* 37, 1874–1886.
- 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., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in *Foxp3*-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6, 1142–1151.
- Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2005). The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J. Immunol.* 174, 6571–6576.
- Fulton, R.B., Hamilton, S.E., Xing, Y., Best, J.A., Goldrath, A.W., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2015). The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8⁽⁺⁾ T cells to respond to foreign antigens. *Nat. Immunol.* 16, 107–117.
- Furtado, G.C., de Lafaille, M.A.C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. (2002). Interleukin 2 signaling is required for CD4⁺ regulatory T cell function. *The Journal of Experimental Medicine* 196, 851–857.
- Garin, M.I., Chu, C.-C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, 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.
- Gascoigne, N.R.J., Rybakin, V., Acuto, O., and Brzostek, J. (2016). TCR signal strength and T cell development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 32, 327–348.
- Gasteiger, G., Hemmers, S., Firth, M.A., Le Floch, A., Huse, M., Sun, J.C., and Rudensky, A.Y. (2013). IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 210, 1167–1178.
- Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., and Sher, A. (1993). Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular

parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6115–6119.

Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology* 2, 309–322.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723–737.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903–914.

Ghiringhelli, F., Ménard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., et al. (2005). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* 202, 1075–1085.

Girard, J.-P., Moussion, C., and Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 762–773.

Gomis, R.R., Alarcón, C., He, W., Wang, Q., Seoane, J., Lash, A., and Massagué, J. (2006). A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12747–12752.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.

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

Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 9, 1253–1260.

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.

Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N.H., Carlson, M.R., Li, S.-H., Simpson, P.M., Chatila, T.A., and Williams, C.B. (2009). A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J. Immunol.* 182, 3461–3468.

Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.-H., Relland, L.M., et al. (2011). A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35, 109–122.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17–producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6, 1123–1132.

- Hashimoto, Y., and Soderling, T.R. (1989). Regulation of calcineurin by phosphorylation. Identification of the regulatory site phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264, 16524–16529.
- Haskins, K., Kubo, R., White, J., Pigeon, M., Kappler, J., and Marrack, P. (1983). The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 157, 1149–1169.
- Hatano, A., Matsumoto, M., and Nakayama, K.I. (2016). Phosphoproteomics analyses show subnetwork systems in T-cell receptor signaling. *Genes Cells* 21, 1095–1112.
- 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.
- Hay, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* 18, 1926–1945.
- Hedrick, S.M. (2009). The cunning little vixen: Foxo and the cycle of life and death. *Nat. Immunol.* 10, 1057–1063.
- Henderson, J.G., Opejin, A., Jones, A., Gross, C., and Hawiger, D. (2015). CD5 instructs extrathymic regulatory T cell development in response to self and tolerizing antigens. *Immunity* 42, 471–483.
- Hochweller, K., Wabnitz, G.H., Samstag, Y., Suffner, J., Hammerling, G.J., and Garbi, N. (2010). Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 5931–5936.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O’Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547–549.
- 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.
- Hubert, F.-X., Kinkel, S.A., Crewther, P.E., Cannon, P.Z.F., Webster, K.E., Link, M., Uibo, R., O’Bryan, M.K., Meager, A., Forehan, S.P., et al. (2009). Aire-deficient C57BL/6 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only a mild autoimmune phenotype. *The Journal of Immunology* 182, 3902–3918.
- Huehn, J., and Beyer, M. (2015). Epigenetic and transcriptional control of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Seminars in Immunology* 27, 10–18.
- Iizuka-Koga, M., Nakatsukasa, H., Ito, M., Akanuma, T., Lu, Q., and Yoshimura, A. (2017). Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *Journal of Autoimmunity* 83, 113–121.
- Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., et al. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10–e19.

- 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. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 3001–3014.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33 Suppl, 245–254.
- James, K.D., Jenkinson, W.E., and Anderson, G. (2018). T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go? *J Leukoc Biol* 104, 275–284.
- Janson, P.C.J., Winerdal, M.E., Marits, P., Thörn, M., Ohlsson, R., and Winqvist, O. (2008). Foxp3 promoter demethylation reveals the committed treg population in humans. *PLoS ONE* 3, e1612.
- Jia, L., and Wu, C. (2014). The biology and functions of Th22 cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 841, 209–230.
- Jorritsma, P.J., Brogdon, J.L., and Bottomly, K. (2003). Role of TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the regulation of early IL-4 expression in naive CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 170, 2427–2434.
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564.
- Kane, L.P., Lin, J., and Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 242–249.
- Kaplan, M.H. (2013). Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev* 252, 104–115.
- Karlmark, K.R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H.W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2009). Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 50, 261–274.
- Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* 10, 176–184.
- Kerdiles, Y.M., Stone, E.L., Beisner, D.L., McGargill, M.A., Ch'en, I.L., Stockmann, C., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (2010). Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 33, 890–904.
- Kiani, A., Rao, A., and Aramburu, J. (2000). Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 12, 359–372.
- Kim, H.-P., and Leonard, W.J. (2007). CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1543–1551.
- Kim, J.M., and Rudensky, A. (2006). The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunological Reviews* 212, 86–98.

- Kitagawa, Y., Ohkura, N., Kidani, Y., Vandenberg, 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., 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.
- 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.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.
- Krangel, M.S. (2009). Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Current Opinion in Immunology* 21, 133–139.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 6, 1219–1227.
- Labrecque, N., Whitfield, L.S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15, 71–82.
- Lainé, A., Martin, B., Luka, M., Mir, L., Auffray, C., Lucas, B., Bismuth, G., and Charvet, C. (2015). Foxo1 is a T cell-intrinsic inhibitor of the ROR γ t-Th17 program. *J. Immunol.* 195, 1791–1803.
- Lathrop, S.K., Bloom, S.M., Rao, S.M., Nutsch, K., Lio, C.-W., Santacruz, N., Peterson, D.A., Stappenbeck, T.S., and Hsieh, C.-S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478, 250–254.
- 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.
- Le Borgne, M., Raju, S., Zinselmeyer, B.H., Le, V.T., Li, J., Wang, Y., Miller, M.J., and Shaw, A.S. (2016). Real-time analysis of calcium signals during the early phase of T cell activation using a genetically encoded calcium biosensor. *J.I.* 196, 1471–1479.
- Lee, S.L., Wesselschmidt, R.L., Linette, G.P., Kanagawa, O., Russell, J.H., and Milbrandt, J. (1995). Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science* 269, 532–535.
- Lei, Y., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L.T., Bösl, M.R., Holländer, G.A., Hayashi, Y., de Waal Malefyt, R., et al. (2011). Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* 208, 383–394.
- Leishman, A.J., Gapin, L., Capone, M., Palmer, E., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2002). Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted

CD8 $\alpha\alpha$ T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides. *Immunity* 16, 355–364.

Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* 206, 607–622.

Li, M.O., Sanjabi, S., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25, 455–471.

Li, X., Liang, Y., LeBlanc, M., Benner, C., and Zheng, Y. (2014). Function of a Foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity. *Cell* 158, 734–748.

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.

Liao, W., Schones, D.E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T.-Y., Zhao, K., and Leonard, W.J. (2008). Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat. Immunol.* 9, 1288–1296.

Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., et al. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 15137–15142.

Lin, J.T., Martin, S.L., Xia, L., and Gorham, J.D. (2005). TGF- β 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN- γ expression in CD4⁺ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. *J. Immunol* 174, 5950–5958.

Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature Immunology* 8, 1255–1265.

Lio, C.-W.J., and Hsieh, C.-S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100–111.

Lio, C.W.J., Dodson, L.F., Deppong, C.M., Hsieh, C.S., and Green, J.M. (2010). CD28 Facilitates the generation of Foxp3- cytokine responsive regulatory T cell precursors. *The Journal of Immunology* 184, 6007–6013.

Liou, J., Kim, M.L., Do Heo, W., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology* 15, 1235–1241.

Liu, B., Tahk, S., Yee, K.M., Fan, G., and Shuai, K. (2010). The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. *Science* 330, 521–525.

Liu, Z.G., Smith, S.W., McLaughlin, K.A., Schwartz, L.M., and Osborne, B.A. (1994). Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur77*. *Nature* 367, 281–284.

- Lo, W.-L., Felix, N.J., Walters, J.J., Rohrs, H., Gross, M.L., and Allen, P.M. (2009). An endogenous peptide positively selects and augments the activation and survival of peripheral CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 10, 1155–1161.
- 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.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology* 5, 472–484.
- Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D., and Fugger, L. (1999). Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 10338–10343.
- Maillard, I., Fang, T., and Pear, W.S. (2005). Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 945–974.
- Majchrzak, K., Nelson, M.H., Bailey, S.R., Bowers, J.S., Yu, X.-Z., Rubinstein, M.P., Himes, R.A., and Paulos, C.M. (2016). Exploiting IL-17-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells to improve cancer immunotherapy in the clinic. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 247–259.
- Malissen, B., Grégoire, C., Malissen, M., and Roncagalli, R. (2014). Integrative biology of T cell activation. *Nature Immunology* 15, 790–797.
- Mandl, J.N., Liou, R., Klauschen, F., Vriskoop, N., Monteiro, J.P., Yates, A.J., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2012). Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 18036–18041.
- Mandl, J.N., Monteiro, J.P., Vriskoop, N., and Germain, R.N. (2013). T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* 38, 263–274.
- Mantel, P.-Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Molecular mechanisms underlying Foxp3 induction in human T cells. *The Journal of Immunology* 176, 3593–3602.
- Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor. *Immunity* 25, 441–454.
- Marks, B.R., Nowyhed, H.N., Choi, J.-Y., Poholek, A.C., Odegard, J.M., Flavell, R.A., and Craft, J. (2009). Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat. Immunol.* 10, 1125–1132.
- Martin, B., Bourgeois, C., Dautigny, N., and Lucas, B. (2003). On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 6021–6026.

- Martin, B., Bécourt, C., Bienvenu, B., and Lucas, B. (2006). Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4⁺ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* 108, 270–277.
- Martin, B., Auffray, C., Delpoux, A., Pommier, A., Durand, A., Charvet, C., Yakonowsky, P., de Boysson, H., Bonilla, N., Audemard, A., et al. (2013). Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nature Communications* 4, 2209.
- Matsuura, I., Wang, G., He, D., and Liu, F. (2005). Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry* 44, 12546–12553.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045.
- McCaughy, T.M., Baldwin, T.A., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2008). Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med* 205, 2575–2584.
- McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2004). Developmentally distinct Th cells control plasma cell production in vivo. *Immunity* 20, 231–242.
- McNeil, L.K., Starr, T.K., and Hogquist, K.A. (2005). A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 13574–13579.
- Melichar, H.J., Ross, J.O., Herzmark, P., Hogquist, K.A., and Robey, E.A. (2013). Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ. *Sci Signal* 6, ra92.
- Meyer, S., Woodward, M., Hertel, C., Vlaicu, P., Haque, Y., Kärner, J., Macagno, A., Onuoha, S.C., Fishman, D., Peterson, H., et al. (2016). Aire-deficient patients harbor unique high-affinity disease-ameliorating autoantibodies. *Cell* 166, 582–595.
- Mittelstadt, P.R., and DeFranco, A.L. (1993). Induction of early response genes by cross-linking membrane Ig on B lymphocytes. *J. Immunol.* 150, 4822–4832.
- Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H.J., Waldmann, H., Huehn, J., and Hori, S. (2012). Plasticity of Foxp3⁺ T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36, 262–275.
- Molinero, L.L., Miller, M.L., Evaristo, C., and Alegre, M.-L. (2011). High TCR stimuli prevent induced regulatory T cell differentiation in a NF-κB-dependent manner. *J. Immunol.* 186, 4609–4617.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82–86.
- Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kiedl, R.M., and Jenkins, M.K. (2007). Naive CD4⁺ T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27, 203–213.

- 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. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 1279–1289.
- Moses, C.T., Thorstenson, K.M., Jameson, S.C., and Khoruts, A. (2003). Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1185–1190.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348–2357.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stange, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., et al. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Research* 70, 5728–5739.
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* 115, 1923–1933.
- Myers, D.R., Zikherman, J., and Roose, J.P. (2017). Tonic Signals: Why do lymphocytes bother? *Trends Immunol.* 38, 844–857.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J.E., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., et al. (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nature Genetics* 17, 393–398.
- 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 beta. *J. Exp. Med.* 194, 629–644.
- Naylor, K., Li, G., Vallejo, A.N., Lee, W.-W., Koetz, K., Bryl, E., Witkowski, J., Fulbright, J., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2005). The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J. Immunol.* 174, 7446–7452.
- Neurath, M.F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, P.R., et al. (2002). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J. Exp. Med.* 195, 1129–1143.
- Newton, R.H., Shrestha, S., Sullivan, J.M., Yates, K.B., Compeer, E.B., Ron-Harel, N., Blazar, B.R., Bensinger, S.J., Haining, W.N., Dustin, M.L., et al. (2018). Maintenance of CD4 T cell fitness through regulation of Foxo1. *Nat Immunol* 19, 838–848.
- Nishikawa, Y., Nishijima, H., Matsumoto, M., Morimoto, J., Hirota, F., Takahashi, S., Luche, H., Fehling, H.J., Mouri, Y., and Matsumoto, M. (2014). Temporal lineage tracing of Aire-expressing cells reveals a requirement for Aire in their maturation program. *The Journal of Immunology* 192, 2585–2592.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138–149.

O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8, 275–283.

Oh-hora, M., Komatsu, N., Pishyareh, M., Feske, S., Hori, S., Taniguchi, M., Rao, A., and Takayanagi, H. (2013). Agonist-selected T cell development requires strong T cell receptor signaling and store-operated calcium entry. *Immunity* 38, 881–895.

Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., et al. (2012). T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 37, 785–799.

Olivares-Villagómez, D., Wang, Y., and Lafaille, J.J. (1998). Regulatory CD4⁺ T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine* 188, 1883–1894.

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.

Osowski, C.M., and Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 71–92.

Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J., DePinho, R.A., and Li, M.O. (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology* 11, 618–627.

Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Hata, K., Fukai, F., Matsui, M., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2005). A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *The Journal of Immunology* 175, 2191–2200.

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. *Nature Immunology* 8, 1353–1362.

Park, C., Hwang, I.-Y., Sinha, R.K., Kamenyeva, O., Davis, M.D., and Kehrl, J.H. (2012). Lymph node B lymphocyte trafficking is constrained by anatomy and highly dependent upon chemoattractant desensitization. *Blood* 119, 978–989.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology* 6, 1133–1141.

Peng, S.L. (2008). Foxo in the immune system. *Oncogene* 27, 2337–2344.

- Perera, J., Meng, L., Meng, F., and Huang, H. (2013). Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 17011–17016.
- Perez-Villar, J.J., Whitney, G.S., Bowen, M.A., Hewgill, D.H., Aruffo, A.A., and Kanner, S.B. (1999). CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2903–2912.
- Persaud, S.P., Parker, C.R., Lo, W.-L., Weber, K.S., and Allen, P.M. (2014). Intrinsic CD4⁺ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nature Immunology* 15, 266–274.
- 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. *European Journal of Immunology* 38, 1654–1663.
- Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., and Rajewsky, K. (2001). How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8744–8749.
- Pommier, A., Audemard, A., Durand, A., Lengagne, R., Delpoux, A., Martin, B., Douguet, L., Le Campion, A., Kato, M., Avril, M.-F., et al. (2013). Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 13085–13090.
- 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.
- Reither, G., Schaefer, M., and Lipp, P. (2006). PKC α : a versatile key for decoding the cellular calcium toolkit. *J Cell Biol* 174, 521–533.
- Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., and Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Cell Death & Differentiation* 14, 2076–2084.
- Rincón, M., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2001). Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene* 20, 2490–2497.
- Riou, C., Yassine-Diab, B., Van grevenynghe, J., Somogyi, R., Greller, L.D., Gagnon, D., Gimmig, S., Wilkinson, P., Shi, Y., Cameron, M.J., et al. (2007). Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4⁺ central memory T cells. *J Exp Med* 204, 79–91.
- Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 Cells: Inflammatory Bowel Diseases 5, 285–294.
- Ross, J.O., Melichar, H.J., Au-Yeung, B.B., Herzmark, P., Weiss, A., and Robey, E.A. (2014). Distinct phases in the positive selection of CD8⁺ T cells distinguished by intrathymic migration and T-cell receptor signaling patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E2550–2558.

- 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.
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., et al. (2008). Regulatory T Cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28, 546–558.
- Rudra, D., Egawa, T., Chong, M.M.W., Treuting, P., Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2009). Runx-CBF β complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nature Immunology* 10, 1170–1177.
- 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.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745–763.
- 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.
- Samelson, L.E. (2002). Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 371–394.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 7797–7802.
- Schlueter, A.J., Malek, T.R., Hostetler, C.N., Smith, P.A., deVries, P., and Waldschmidt, T.J. (1997). Distribution of Ly-6C on lymphocyte subsets: I. Influence of allotype on T lymphocyte expression. *J. Immunol.* 158, 4211–4222.
- Seki, A., and Rutz, S. (2018). Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. *J. Exp. Med.* 215, 985–997.
- Sekiya, T., Kashiwagi, I., Inoue, N., Morita, R., Hori, S., Waldmann, H., Rudensky, A.Y., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., et al. (2011). The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *Nature Communications* 2, 269.

- Sekiya, T., Kashiwagi, I., Yoshida, R., Fukaya, T., Morita, R., Kimura, A., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., and Yoshimura, A. (2013). Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nature Immunology* 14, 230–237.
- Selvaraj, R.K., and Geiger, T.L. (2007). A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J. Immunol.* 178, 7667–7677.
- Seoane, J., Le, H.-V., Shen, L., Anderson, S.A., and Massagué, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211–223.
- 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.
- Sharma, S., Yang, S.-C., Zhu, L., Reckamp, K., Gardner, B., Baratelli, F., Huang, M., Batra, R.K., and Dubinett, S.M. (2005). Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of Foxp3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.* 65, 5211–5220.
- Sharpe, A.H., and Pauken, K.E. (2017). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology* 18, 153–167.
- Shaw, J., Utz, P., Durand, D., Toole, J., Emmel, E., and Crabtree, G. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241, 202–205.
- Skon, C.N., Lee, J.-Y., Anderson, K.G., Masopust, D., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2013). Transcriptional downregulation of *S1pr1* is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 14, 1285–1293.
- Smigielski, K.S., Srivastava, S., Stolley, J.M., and Campbell, D.J. (2014). Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunological Reviews* 259, 40–59.
- Spence, P.J., and Green, E.A. (2008). Foxp3⁺ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 973–978.
- Stefanová, I., Dorfman, J.R., and Germain, R.N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420, 429–434.
- St-Pierre, C., Trofimov, A., Brochu, S., Lemieux, S., and Perreault, C. (2015). Differential features of Aire-induced and Aire-independent promiscuous gene expression in thymic epithelial cells. *J.I.* 195, 498–506.
- Strauss, L., Bergmann, C., and Whiteside, T.L. (2009). Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 182, 1469–1480.
- Stritesky, G.L., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2012). Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 95–114.

- Sun, C.-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1775–1785.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2008). Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29, 848–862.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145, 3796–3806.
- Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A., and Kobayashi, T. (2008). STAT6 inhibits TGF- β 1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *Journal of Biological Chemistry* 283, 14955–14962.
- Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 8732–8737.
- Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Pérarnau, B., Freitas, A.A., and Rocha, B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* 276, 2057–2062.
- Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Bluestone, J.A. (2003). Cutting Edge: CD28 Controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 171, 3348–3352.
- Tao, X., Grant, C., Constant, S., and Bottomly, K. (1997). Induction of IL-4-producing CD4⁺ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J. Immunol.* 158, 4237–4244.
- Tarakhovskiy, A., Kanner, S.B., Hombach, J., Ledbetter, J.A., Müller, W., Killeen, N., and Rajewsky, K. (1995). A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 269, 535–537.
- Timmerman, L.A., Clipstone, N.A., Ho, S.N., Northrop, J.P., and Crabtree, G.R. (1996). Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* 383, 837–840.
- Tomura, M., Itoh, K., and Kanagawa, O. (2010). Naive CD4⁺ T lymphocytes circulate through lymphoid organs to interact with endogenous antigens and upregulate their function. *The Journal of Immunology* 184, 4646–4653.
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature Immunology* 9, 194–202.
- Tong, E.H.Y., Guo, J.-J., Huang, A.-L., Liu, H., Hu, C.-D., Chung, S.S.M., and Ko, B.C.B. (2006). Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of transcription factor OREBP/TonEBP/NFAT5. *Journal of Biological Chemistry* 281, 23870–23879.

- Tonkin, D.R., and Haskins, K. (2009). Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 39, 1313–1322.
- Trushin, S.A., Pennington, K.N., Algeciras-Schimmich, A., and Paya, C.V. (1999). Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 22923–22931.
- Turner, M.S., Kane, L.P., and Morel, P.A. (2009). Dominant role of antigen dose in CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell induction and expansion. *J. Immunol.* 183, 4895–4903.
- Tzivion, G., Dobson, M., and Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1938–1945.
- Vahl, J.C., Drees, C., Heger, K., Heink, S., Fischer, J.C., Nedjic, J., Ohkura, N., Morikawa, H., Poeck, H., Schallenberg, S., et al. (2014). Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool. *Immunity* 41, 722–736.
- Van de Velde, H., von Hoegen, I., Luo, W., Parnes, J.R., and Thielemans, K. (1991). The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 351, 662–665.
- Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development. *The Journal of Immunology* 181, 3285–3290.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179–189.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 9, 1341–1346.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 853–865.
- Voisinne, G., García-Blesa, A., Chaoui, K., Fiore, F., Bergot, E., Girard, L., Malissen, M., Burlet-Schiltz, O., Gonzalez de Peredo, A., Malissen, B., et al. (2016). Co-recruitment analysis of the CBL and CBLB signalosomes in primary T cells identifies CD5 as a key regulator of TCR-induced ubiquitylation. *Mol. Syst. Biol.* 12, 876.
- Wakamatsu, E., Mathis, D., and Benoist, C. (2013). Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 1023–1028.
- 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.
- Walker, L.S.K., and Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nature Reviews Immunology* 11, 852–863.

- Walters, S.N., Webster, K.E., Daley, S., and Grey, S.T. (2014). A role for intrathymic B cells in the generation of natural regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 193, 170–176.
- Wang, H., Brown, J., and Martin, M. (2011). Glycogen synthase kinase 3: A point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine* 53, 130–140.
- Weber, K.S., Li, Q.-J., Persaud, S.P., Campbell, J.D., Davis, M.M., and Allen, P.M. (2012). Distinct CD4⁺ helper T cells involved in primary and secondary responses to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 9511–9516.
- 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.
- 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.
- Wohlfert, E.A., Grainger, J.R., Bouladoux, N., Konkol, 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.
- Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L., Collison, L.W., Pillai, M.R., and Vignali, D.A.A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 2603–2622.
- 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.
- Xiong, Y., Khanna, S., Grzenda, A.L., Sarmiento, O.F., Svingen, P.A., Lomber, G.A., Urrutia, R.A., and Faubion, W.A. (2012). Polycomb antagonizes p300/CREB-binding protein-associated factor to silence Foxp3 in a Kruppel-like factor-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 287, 34372–34385.
- Xu, L., Kitani, A., Stuelten, C., McGrady, G., Fuss, I., and Strober, W. (2010). Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity* 33, 313–325.
- Yamano, T., Nedjic, J., Hinterberger, M., Steinert, M., Koser, S., Pinto, S., Gerdes, N., Lutgens, E., Ishimaru, N., Busslinger, M., et al. (2015). Thymic B cells are licensed to present self antigens for central T cell tolerance induction. *Immunity* 42, 1048–1061.
- Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Moriggl, R., et al. (2007). Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109, 4368–4375.
- Zamoyska, R. (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr. Opin. Immunol.* 10, 82–87.

- Zhang, R., Huynh, A., Witcher, G., Chang, J., Maltzman, J.S., and Turka, L.A. (2013). An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *Journal of Clinical Investigation*.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902–905.
- Zhao, Y., and Bruemmer, D. (2010). NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *ATVB* 30, 1535–1541.
- 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., Gray, J.D., Soucier, H., and Horwitz, D.A. (2004). Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J. Immunol.* 172, 5213–5221.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2006). TGF- requires CTLA-4 early after T cell activation to induce Foxp3 and generate adaptive CD4⁺CD25⁺ regulatory cells. *The Journal of Immunology* 176, 3321–3329.
- 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 T(H)2 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, L., Ivanov, I.I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 8, 967–974.
- Zhou, T., Cheng, J., Yang, P., Wang, Z., Liu, C., Su, X., Bluethmann, H., and Mountz, J.D. (1996). Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J. Exp. Med.* 183, 1879–1892.
- Zhu, J., Davidson, T.S., Wei, G., Jankovic, D., Cui, K., Schones, D.E., Guo, L., Zhao, K., Shevach, E.M., and Paul, W.E. (2009). Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-β is important for differentiation of Th17 and CD103⁺ inducible regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 329–341.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell Populations. *Annual Review of Immunology* 28, 445–489.
- Zikherman, J., Parameswaran, R., and Weiss, A. (2012). Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. *Nature* 489, 160–164.