



**HAL**  
open science

# Etude du métabolisme des lymphocytes T CD4+ Foxp3+ régulateurs à l'homéostasie et dans un contexte inflammatoire

Jordane Divoux

► **To cite this version:**

Jordane Divoux. Etude du métabolisme des lymphocytes T CD4+ Foxp3+ régulateurs à l'homéostasie et dans un contexte inflammatoire. Immunologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS075 . tel-03357694

**HAL Id: tel-03357694**

**<https://theses.hal.science/tel-03357694>**

Submitted on 29 Sep 2021

**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.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie physiopathologie (ED394)

Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (SU CR7 - Inserm U1135 - CNRS ERL  
8255) / Immunoregulation and therapies in autoimmunity and cancer (ITAC)

## **Etude du métabolisme des lymphocytes T CD4+ Foxp3+ régulateurs à l'homéostasie et dans un contexte inflammatoire**

Par Jordane Divoux

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Benoit Salomon

Présentée et soutenue publiquement le 27 septembre 2019

Devant un jury composé de :

**CREMER Isabelle** (*Professeur d'université, Sorbonne Université, CRC Paris*) : Présidente

**BROUARD Sophie** (*Directrice de recherche, CNRS, CRTI Nantes*) : Rapportrice

**ANDRIS Fabienne** (*Chercheur qualifié, FNRS, ULB Bruxelles*) : Rapportrice

**VIOLLET Benoit** (*Directeur de recherche, Inserm, Institut Cochin Paris*) : Examineur

**BOISSONNAS Alexandre** (*Chargé de recherche, Inserm, CIMI Paris*) : Examineur

**SALOMON Benoit** (*Directeur de recherche, Inserm, CIMI Paris*) : Directeur de thèse



*« Trouves toi un boulot qui te passionne et je peux te garantir que tu n'auras jamais à  
travailler de ta vie. »*

*Georges Besnard (1923-2019)*



## TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>3</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>12</b>
<b>PREFACE</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>20</b>
<b>1. Rôle du métabolisme dans la construction de la réponse T</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1. Ontogénèse T</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2. Métabolisme du lymphocyte T quiescent</b> .....	<b>25</b>
1.2.1. <i>Glycolyse</i> .....	<b>25</b>
1.2.2. <i>Cycle de Krebs</i> .....	<b>26</b>
1.2.3. <i>Métabolisme de la glutamine</i> .....	<b>27</b>
1.2.4. <i>Oxydations des acides gras</i> .....	<b>28</b>
<b>1.3. Activation du lymphocyte T et switch métabolique</b> .....	<b>29</b>
1.3.1. <i>Effet Warburg</i> .....	<b>29</b>
1.3.2. <i>Shunt du cycle de Krebs et activité de la chaîne respiratoire</i> .....	<b>31</b>
1.3.3. <i>Dépendance à la glutamine</i> .....	<b>33</b>
<b>1.4. Régulation intracellulaire et checkpoints métaboliques</b> .....	<b>35</b>
1.4.1. <i>Voie mTOR</i> .....	<b>35</b>
1.4.2. <i>Voie AMPK</i> .....	<b>38</b>
<b>1.5. Différenciation des lymphocytes T et évolution du métabolisme</b> .....	<b>42</b>
1.5.1. <i>Voie mTOR et fonction effectrice</i> .....	<b>42</b>
1.5.2. <i>Voie AMPK et fonction mémoire</i> .....	<b>44</b>
<b>1.6. Résumé du premier chapitre</b> .....	<b>47</b>
<b>2. Biologie des lymphocytes T régulateurs</b> .....	<b>50</b>
<b>2.1. Ontogénèse</b> .....	<b>51</b>
2.1.1. <i>Origine thymique</i> .....	<b>51</b>
2.1.2. <i>Origine périphérique</i> .....	<b>53</b>
2.1.3. <i>Plasticité et stabilité du phénotype régulateur</i> .....	<b>55</b>
<b>2.2. Fonction régulatrice</b> .....	<b>58</b>
2.2.1. <i>Cytokines inhibitrices</i> .....	<b>58</b>
2.2.2. <i>Cytolyse</i> .....	<b>59</b>
2.2.3. <i>Perturbation de l'environnement</i> .....	<b>61</b>
2.2.4. <i>Ciblage des cellules dendritiques</i> .....	<b>63</b>
2.2.5. <i>Interaction avec d'autres cellules régulatrices</i> .....	<b>64</b>
<b>1.1. Implication pathologique</b> .....	<b>66</b>
1.1.1. <i>Auto-immunité</i> .....	<b>66</b>
1.1.2. <i>Cancer</i> .....	<b>68</b>

1.2. Métabolisme.....	70
1.2.1. Lien entre métabolisme et potentiel inflammatoire .....	70
1.2.2. Les Treg, des cellules cataboliques utilisant peu mTOR ? .....	71
1.2.3. Théorie sur le métabolisme des Treg, une fausse route ? .....	75
2. Description du projet .....	78
<b>RESULTATS</b> .....	<b>80</b>
1. Métabolisme basal des Treg : rôle de la voie mTOR (article soumis) .....	82
2. Treg et environnement tumoral : importance de la voie AMPK (article en préparation) .....	108
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>138</b>
1. Rôle de mTOR dans l'homéostasie des Treg .....	140
1.1 mTOR est essentiel dans l'homéostasie des Treg à l'état basal .....	140
1.2 mTOR permet la migration du Treg vers les tissus non lymphoïdes .....	141
1.3 mTOR participe au maintien de l'expression de Foxp3 .....	143
1.4 Résumé des données actuelles et hypothèses .....	145
2. Rôle de l'AMPK dans l'adaptation à l'environnement tumoral.....	146
2.1 AMPK n'a pas un rôle primordial dans la biologie des Treg à l'état basal .	146
2.2 AMPK est un nœud de régulation du métabolisme des Treg .....	148
2.3 AMPK est impliqué dans l'activité pro-tumorale des Treg .....	151
2.4 Résumé et hypothèses .....	154
3. Nouveau modèle du métabolisme des Treg.....	155
4. Métabolisme des Treg : quels liens avec la famille des récepteurs au TNF $\alpha$ ?...	156
5. Modèle Cre-lox : ami ou ennemi ? .....	158
5.1 Un système de délétion spécifique in vivo .....	158
5.2 Un modèle avec ses limites .....	160
6. Pertinence de l'étude face à la situation chez l'homme .....	162
7. Traitement modulant le métabolisme, nouveaux espoirs .....	164
7.1 La rapamycine, un antimicrobien venu de l'île de pâque .....	164
7.2 La metformine, plus qu'un anti diabétique ? .....	166
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>170</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>172</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>190</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>258</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>260</b>



## REMERCIEMENTS

Certains disent que l'on peut juger la qualité d'une thèse à la lecture de ses remerciements. Cependant, comment évalue-t-on les remerciements d'une thèse ? Est-ce comme beaucoup d'autre chose ? La taille compte elle ? Le nombre de personnes présentes est-il important ? Les jeux de mot sont-ils à proscrire ? Pour ma part je ne sais pas encore si ma liste est longue et fournie d'anecdotes originales, mais je vous propose de la découvrir avec moi.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. J'espère qu'ils l'auront jugé pertinent et digne d'un diplôme de doctorat. Je voudrais plus particulièrement remercier mes deux rapportrices, les Dr Brouard et Andris, pour leurs corrections et leurs remarques qui, je pense, ont grandement contribué à rendre ce manuscrit meilleur. Je voudrais également remercier les Dr Viollet et Boissonnas pour leur participation à l'évaluation de ma soutenance orale, et surtout pour leur accompagnement et les conseils qu'ils m'ont donné tout au long de mon travail. J'ai eu grand plaisir à interagir scientifiquement avec eux et j'espère avoir l'occasion de le faire encore dans le futur. Pour finir, je voudrais remercier le Dr Cremer d'avoir tenu à la fois le rôle de présidente de jury et celui de professeur lors des cours d'immunologie que j'ai reçu au cours de ma licence et de mon master.

J'aimerais d'autre part remercier le Dr Combadière pour son implication en tant que directeur du centre de recherche dans lequel j'ai travaillé pendant 4 ans, merci d'avoir toujours fait en sorte de nous offrir les meilleures conditions de travail possible.

Viens maintenant le tour de mon directeur de thèse. Par où commencer ? Merci de m'avoir élevé scientifiquement. Merci d'avoir été mon mentor. Merci de m'avoir inculqué le raisonnement et la rigueur scientifique. Je ne suis pas sûr de pouvoir résumer tout ce que je te dois en un seul paragraphe. Ça a été 4 années intenses pour moi, je t'avoue n'avoir jamais autant travaillé que durant cette thèse (même si je prenais un peu trop de vacance à ton gout, ce qui n'était peut-être pas complètement faux). Merci d'avoir été une personne ouverte et de m'avoir toujours laissé m'exprimer, que ce soit scientifiquement ou pour le reste. Merci de m'avoir toujours poussé à la réflexion et de m'avoir emmené en congrès, j'en garde de super souvenirs, notamment celui de notre retour du Temple Bar de Dublin (Romain pourra en témoigner). Merci d'avoir pris le temps de m'écouter quand je te faisais part de mes doutes sur mon avenir. Merci

de m'avoir laissé partir en avance pour que je puisse saisir ma chance dans le monde de la recherche clinique. Tu as été un bon directeur de thèse pour moi et je suis sûr que tu le seras avec Morgane, vous formez déjà un bon duo je trouve.

En voilà un autre, ce n'est peut-être pas mon directeur de thèse, mais il a fortement contribué à faire de moi le scientifique que je suis (en bien ou en mal, ça c'est à vous de voir). Je parle évidemment de mon encadrant de stage de Master 2, le fameux Romain Vallion. Je pense que le premier truc pour lequel je peux te remercier, c'est d'avoir supporté un stagiaire comme moi, personnellement je ne sais pas si j'en aurai été capable. La deuxième chose, c'est pour le côté technique. Merci de m'avoir appris à me servir de mes deux mains gauches (et je suis droitier), je te dois ma capacité à produire des données de qualités, et ce n'est pas rien je pense pour un jeune chercheur. Ne changes pas, je me suis habitué à ton caractère de cochon et à ta tête de mule (le parfait mélange).

Il faut que je fasse attention, je suis déjà à une page et demi. Il ne faut pas que j'écrive un roman, ça ferait moyen si mes remerciements étaient plus long que ma thèse ...

A qui le tour ? Emilie ? C'est dommage, je ne pense pas que tu pourras lire mes remerciements depuis San Francisco, d'ailleurs tu n'assisteras pas ma thèse non plus, tu mérites vraiment que je te remercie ? Pas besoin d'y réfléchir très longtemps ... Merci de m'avoir accueilli au labo et de t'être occupé de moi au tout départ, tu as un peu été ma seconde maman pendant cette période. Merci de m'avoir ouvert les portes du métier de chercheur et d'avoir été un filet de sécurité pour moi de nombreuses fois. Merci pour nos longues discussions entre deux marquages et tes conseils, plus que précieux. Merci pour nos karaokés, toujours entre deux marquages, par contre il faudrait que tu travail un peu tes gammes, tu chantes faux ma vieille.

Tu te demandais quand ton tour arriverai ma c\*\*\*lle ? Et bien voilà c'est pour toi ! Merci d'avoir été mon binôme de labo, mon compère de café, mon dépanneur de X-20, mon prêteur de perceuse et mon pote dans la vie de tous les jours. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé garder ton chat, Fanny était ravie. Plus sérieusement merci d'avoir rendu mes semaines de travail toujours plus joyeuses et déconnantes, ça a rendu mes années de thèses plus qu'agréables. Pas besoin de te citer, je pense que tu te reconnaîtras (et que les lecteurs de ces remerciements aussi). J'espère que tout se passe bien pour toi à San Diego, désolé pour la colloque mais j'ai eu d'autres plans entre temps.

Pendant qu'on y est, je vais en profiter pour remercier les autres membres du fameux 3C. Merci à vous tous, Pauline, Jessica, Pilou, Camille, Marie, Raphael, Mathias, Lisa. Vous avez été des collègues de pause (et de boisson) formidables, et je pèse mes mots. Camille merci pour tes plaintes incessantes et ton discours bien tranché sur les « zadistes de nuit debout », changes pas je t'adore, je t'emmènerai peut être en « festoche » un de ces jours. Mathias, merci pour tes discussions philosophiques sur la sexualité des homards, je pense qu'elles nous ont bien occupés une dizaine de pauses. Raphael merci pour ton calme et la sérénité que tu dégages, c'est quand tu veux pour un petit tour en voilier. Lisa, merci pour ta bonne humeur et ton côté positif, promis la prochaine soirée à la Clairière je serai là. Marie ? Non, je vais te faire un paragraphe pour toi tiens.

Madame Laviron donc. C'est pas toi qui devrais me remercier d'ailleurs ? Je t'ai quand même tout appris... Bon ok, je l'admets, ça a été un plaisir de travailler avec toi. Tu as été ma première stagiaire et maintenant c'est toi qui m'apprends des choses. Merci d'être resté au CIMI en thèse, ça m'a permis de continuer à interagir avec toi, et du coup de continuer d'apprendre, tu feras une super scientifique j'en suis sûr.

A défaut de faire un bon scientifique, j'espère que tu feras un bon DJ pour ma soirée de thèse. Oui c'est de toi dont je parle Denis, au passage, j'espère que tu manies mieux la platine que le gel d'électrophorèse vu la tête de tes western blot. Bon courage pour les prochaines années de médecine et oublies pas de revenir faire une thèse de science à l'occasion.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des personnes de mon équipe, Gilles, Odile, Sylvie, Salome, Maryam, Martina, Pukar, Nicolas et Morgane, certains sont partis, d'autres sont arrivés, je vous souhaite le meilleur pour la suite. Gilles, merci pour nos discussions sur les statistiques et la programmation, la prochaine fois on peut se faire ça autour d'une bière, ça nous inspirera. Odile merci pour tes conseils en termes de culture cellulaire et de western blot (même s'ils n'ont pas été suffisants pour faire fonctionner ceux de Denis). Sylvie, merci pour ta bonne humeur et ton franc parlé. Merci pour ton aide au cour de mes manips, c'est toujours utile d'avoir une ingénieure avec de « l'expérience » dans son équipe... Salomé, merci pour ton humour et pour tes anecdotes de nana de gauche, ça va me manquer dans le monde de la pharma je crois ! Maryam, I hope you will enjoy France as long as possible ! Martina, merci pour les tuyaux que tu m'as donné pour trouver des pistes supplémentaires à une carrière de chercheur dans l'académique, j'espère que tout se passe bien pour toi à Londres. Pukar, mon collègue de JED, si tu cherches un comité organisateur pour ta soutenance de thèse, hésites pas à reformer

les Men in Black ! Nicolas et Morgane, bon courage pour vos thèses, ça peut paraître une montagne à gravir comme ça, mais en fait c'est juste une grosse colline qui se monte progressivement.

J'aimerais aussi remercier tous les étudiants (et jeune ingénieurs) du CIMI pour les soirées mémorables à l'intermède et les happy burger. Mon foie s'en rappellera à jamais. Merci aussi à tous les anciens du CERVI que j'ai pu côtoyer au cour de mes premier pas au laboratoire et que je vois encore sur les terrains de foot pour certain. Merci à Fabien, Thomas, Charlotte, Pax, Benjamin, Bubu, BrunoZ, Chuchu et tous les autres.

Merci à mes deux copains de comptoirs. Merci à Clément et Arthur pour le sas de décompression autour d'une bière après le labo. La rue de la Gaité portait bien son nom.

J'ai sûrement du oublier beaucoup de monde mais je voudrais dire un grand merci à toutes ces personnes qui m'ont aidé et donné le sourire et qui, de près ou de loin, ont participé à la réussite de cette thèse. Je pense maintenant que la plupart du labo a été remercié. Lecteur du CIMI, tu peux dès à présent t'arrêter là, tu auras déjà fait un bel effort. Néanmoins, si tu en as le courage (ou si tu n'as rien de mieux à faire), tu peux te plonger dans les remerciements accordés à mes proches.

Il est évident que les premières personnes à remercier dans cette partie sont mes parents. Merci à eux de m'avoir porté, au sens propre comme au figuré, depuis tout petit vers les envies que j'ai eu, et celle que j'ai encore. Maman, merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir transmis ta bonne humeur et ton enthousiasme. Divoux, merci de m'avoir fait découvrir le labo tout petit, je pense que tu es un peu pour quelques choses dans tout ça. Merci à mes deux frères qui se sont toujours intéressés à ce que je faisais et m'ont accompagné tout au long de la thèse, et même avant.

Merci à Max, Bastien et Arthur, mon noyau dur. Merci d'avoir été là, bien avant la thèse, je sais que vous serai là encore bien après.

Merci à tous mes proches, famille ou non, Roxane, Sandra, Céline, Chloé, Lucie, Foifoï, Gromit, Sven, Martine, Chantal et tous les autres qui ont été autant de bouffés d'oxygène pendant mes weekend en Normandie ou dans les Alpes.

Bien que la Normandie soit une des plus belles régions de France, il en est une assez similaire, quoique plus pauvre en terme de paysage et de culture. Néanmoins, cette région reste un lieu

où j'ai pu rencontrer de belles personnes. Merci à tous les Roscovites, vous n'êtes peut être pas directement impliqués dans ma thèse mais c'est mes remerciements, je fais ce que je veux. Merci à Gilles, Tanguy, Alex, Aurélien, Ula, Clio, Brice, Mathilde. Merci pour les belles années que vous m'avez offertes à Roscoff et pour les suivantes que nous vivrons je l'espère, on se retrouve en juin pour l'anniversaire de la licence. Merci à tous les autres Bretons au passage, Isa et Pierre en tête.

Chose promise, chose due. Le dernier paragraphe est pour toi. Toi qui m'accompagne depuis un petit moment déjà. Je pourrais te remercier pour tant de chose en plus de la thèse. Merci de m'avoir choisi et de m'avoir accepté dans ta vie. Merci de m'avoir fait sortir la tête du labo et de m'avoir changé d'air quand il le fallait. Merci de supporter mon obstination et mes habitudes de vieux maniaque. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Tu es la plus belle trouvaille qu'il m'ait été donné de chercher.





## LISTE DES ABREVIATIONS

3PG : 3-phosphoglycérate  
ACC : acétyl CoA carboxylase  
AICAR : AICA ribonucleotide  
AIRE : de l'anglais « autoimmune regulator »  
AMP : adénosine mono phosphate  
AMPK : de l'anglais « AMP activated kinase »  
Atg : de l'anglais « autophagy related gene »  
ATP : adénosine triphosphate  
Breg : lymphocytes B régulateurs  
CamKK : de l'anglais « calmodulin dependent protein kinase kinase »  
CCR7 : de l'anglais « C-C chemokine receptor type 7 »  
CD : cluster de différenciation  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CoA : coenzyme A  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
CPT : carnitine palmitoyl transférase  
CTL : lymphocytes T cytotoxiques, de l'anglais « cytotoxic T lymphocyte »  
DC : cellules dendritiques, de l'anglais « dendritic cells »  
DEPTOR : de l'anglais « DEP domain containing mTOR interacting protein »  
EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale  
Ebi3 : de l'anglais « Epstein-Barr virus induced gene 3 »  
Eomes : de l'anglais « eomesodermin »  
ETC : chaîne respiratoire, de l'anglais « electron transport chain »  
F6P : fructose 6-phosphate  
FADH : flavine adénine dinucléotide réduit  
FAO : oxydation des acides gras, de l'anglais « fatty acid oxydation »  
FAS : synthèse de lipides, de l'anglais « fatty acid synthesis »  
FOXO1/3 : de l'anglais « forkhead box protein O1/3 »  
Foxp3 : de l'anglais « forkhead box P3 »  
G3P : Glycéraldéhyde 3-phosphate  
G6P : glucose 6-phosphate  
G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase  
GARP : de l'anglais « glycoprotein A repetitions predominant »  
GATA-3 : de l'anglais « Trans-acting T-cell-specific transcription factor »  
GlucN6P : glucosamine 6-phosphate  
GLUT : transporteur du glucose, de l'anglais « glucose transporter »  
GVH : maladie du greffon contre l'hôte, de l'anglais « graft versus host disease »  
HIF-1 $\alpha$  : de l'anglais « hypoxia inducible factor »  
HMG-R : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase  
ICER : de l'anglais « inducible cAMP early repressor »  
IFN $\gamma$  : interféron gamma  
IL : interleukine

IL-33R : récepteurs à l'IL-33  
IONO : ionomycine  
IRF4 : de l'anglais « interferon regulator factor 4 »  
LAG-3 : de l'anglais « lymphocyte activation gene 3 »  
LDH : lactate déshydrogénase  
LFA1 : de l'anglais « leukocyte function associated antigen 1 »  
LKB1 : de l'anglais « liver kinase B1 »  
mLST8 : de l'anglais « mammalian lethal with sec13 protein 8 »  
mSIN1 : de l'anglais « mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1 »  
mTOR : de l'anglais « mammalian target of rapamycin »  
mTORC : de l'anglais « mTOR complexe »  
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NFAT : de l'anglais « nuclear factor of activated T-cells »  
NF- $\kappa$ B : de l'anglais « nuclear factor-kappa B »  
OAA : oxaloacétate  
OCR : taux de consommation en oxygène, de l'anglais « oxygen consumption rate »  
OXPHOS : oxydation phosphorylative  
P53 : protéine 53  
PD-1 : de l'anglais « programmed cell death 1 »  
PDH : complexe pyruvate déshydrogénase  
PDHK1 : PDH kinase 1  
PDK1 : de l'anglais « phosphoinositide-dependent kinase-1 »  
PD-L1 : de l'anglais « programmed cell death ligand-1 »  
PEP : phosphoénolpyruvate  
PGC1 $\alpha$  : de l'anglais « peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  co-activator 1  $\alpha$  »  
PI3K : de l'anglais « phosphoinositide 3-kinase »  
PKM : pyruvate kinase  
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate  
PP2A : de l'anglais « protein phosphatase 2 »  
PPAR $\gamma$  : de l'anglais « peroxisome proliferator-activated receptor gamma »  
PRAS40 : de l'anglais « proline rich Akt substrat 40kDa »  
PROTOR : de l'anglais « protein observed with RICTOR »  
PTEN : de l'anglais « phosphatase and tensin homolog »  
pTreg : Treg induit à la périphérie  
RAG : de l'anglais « recombinaison activated gene »  
RAPTOR : de l'anglais « regulatory associated protein of mTOR »  
RICTOR : de l'anglais « rapamycin insensitive companion of mTOR »  
ROR $\gamma$ t : de l'anglais « RAR-related orphan receptor gamma »  
ROS : espèces réactives de l'oxygène, de l'anglais « oxygen reactive species »  
S1P1 : de l'anglais « Sphingosine-1-phosphate receptor 1 »  
SLC : transporteur d'acide aminé, de l'anglais « sodium-coupled neutral amino acid transporter »  
SLE : lupus érythémateux systémique, de l'anglais « systemic lupus erythematosus »  
Smad3 : de l'anglais « mothers against decapentaplegic homolog 3 »

SOCS : de l'anglais « suppressor of cytokine signaling »  
SREBP1 : de l'anglais « sterol regulatory element binding protein 1 »  
Stab1 : de l'anglais « special AT-rich sequence-binding protein-1 »  
TAK1 : de l'anglais « transforming growth factor  $\beta$  activated kinase 1 »  
TAV: tissu adipeux viscéral  
T-bet : de l'anglais « T box transcription factor TBX21 »  
Tconv : lymphocytes T conventionnels  
TCR : récepteur T, de l'anglais « T cell receptor »  
TET (de l'anglais « Ten-eleven translocation »)  
TGF $\beta$  : de l'anglais « transforming growth factor  $\beta$  »  
Th : lymphocytes T helper, de l'anglais « T helper cell »  
TNF $\alpha$  : de l'anglais « tumor necrosis facteur  $\alpha$  »  
TRAF6 : de l'anglais « tumour necrosis factor receptor-associated factor 6 »  
Treg : lymphocytes T régulateurs  
TSC : de l'anglais « tumor sclerosis complexe »  
tTreg : Treg d'origine thymique  
UDP : l'uridine di-phosphate  
ULK : de l'anglais « Unc-51 like autophagy activating kinase »



## PREFACE

J'ai entendu parler d'immuno-métabolisme pour la première fois en octobre 2014, lors de mon entretien pour un stage de master 2. Mon directeur de stage potentiel, qui allait devenir par la suite mon directeur de thèse, m'expliquait le rôle critique qu'avait le métabolisme dans la régulation de la réponse immunitaire. Il m'exposait la particularité métabolique des lymphocytes T régulateurs et m'indiquait que le laboratoire avait récemment généré les outils qui permettraient de percer à jour les zones d'ombres existant encore sur le sujet. Je dois avouer que ce sujet ne m'interpelait pas plus que ça. Bien que j'éprouvais un réel intérêt pour les lymphocytes T régulateurs, je ne voyais pas l'utilité de me plonger dans l'étude de leur métabolisme, qui d'ailleurs me ramenait aux souvenirs douloureux de mes cours de biochimie de licence.

Je me suis néanmoins laissé convaincre et ai commencé à travailler sur le sujet. Bien m'en a pris car j'ai découvert une littérature scientifique riche et pleine d'idées neuves sur la conception même que l'on a du système immunitaire. Des auteurs tels que Jones, Pearce, Rathmell ou Powell m'ont apporté une vision globale où le système immunitaire n'était plus considéré comme un compartiment clos, uniquement voué à repousser les attaques des pathogènes, mais retrouvait une place intégrée au sein de l'organisme avec des interactions forte envers les composantes du corps humain. J'ai ainsi appris l'impact que pouvait avoir le statu nutritionnel et la quantité de nutriments disponibles dans le milieu sur l'activité des cellules immunitaires. J'ai également été fasciné par la diversité des changements métaboliques ayant lieu au sein du lymphocyte lors de son activation. Le fait que la plupart de ces propriétés métaboliques soient détournées par les cellules tumorales pour proliférer de manière anarchique m'a également captivé et m'a fait prendre conscience du potentiel thérapeutique immense offert par ce domaine d'étude.

Comme une cerise sur ce gâteau de connaissances déjà acquises, les lymphocytes T régulateurs représentaient un des derniers mystères à élucider étant donné que plusieurs observations avaient suggéré que ces cellules semblaient posséder un métabolisme différents des autres lymphocytes T conventionnels. L'implication des lymphocytes T régulateurs dans de nombreuses pathologies encourageait également le chercheur en herbe que j'étais à comprendre au maximum le fonctionnement de ces cellules afin d'un jour, peut-être, être capable de les manipuler au mieux lors de thérapies ciblant les maladies auto-immunes ou le cancer.

J'ai tenté ici d'apporter ma pierre à cet immense édifice. J'espère que la lecture des pages suivantes vous apportera le même enthousiasme que j'ai eu il y a 5 ans de cela, et que j'ai encore aujourd'hui, concernant le champ de l'immuno-métabolisme.







## **INTRODUCTION**

---



## **1. Rôle du métabolisme dans la construction de la réponse T**

Une réponse immune est généralement initiée par l'intrusion d'un agent extérieur à notre organisme. Elle correspond à une activation des cellules du système immunitaire conduisant à une inflammation qui doit permettre l'élimination du pathogène.

Des études fondatrices ont permis la décomposition de la réponse immune en deux types de réponse se déroulant de manière successive. La réponse innée, précoce, suit de la réponse adaptative, plus tardive et marquée par l'établissement d'une mémoire immunitaire à long terme.

La réponse T est une composante centrale de ce versant adaptatif de la réponse immune et implique les lymphocytes T. De nombreux travaux s'intéressent aux différents aspects contrôlant cette réponse et il existe aujourd'hui un intérêt croissant concernant l'évolution du métabolisme cellulaire au cours des différentes étapes de la réponse T.

Le métabolisme cellulaire correspond à l'ensemble des réactions biochimiques permettant à la cellule de produire son énergie et d'alimenter les processus biologiques nécessaires à sa survie et ses fonctions. On distingue deux versants du métabolisme. Le catabolisme, qui consiste en la dégradation des macromolécules afin de produire de l'énergie, principalement sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) et l'anabolisme qui permet la synthèse de nouvelles molécules pour produire de la biomasse.

De manière intéressante, il a été décrit par plusieurs auteurs une dynamique très forte du métabolisme des lymphocytes T au cours de la réponse T avec des alternances entre catabolisme et anabolisme<sup>1-5</sup>.

## 1.1. Ontogénèse T

La génération des lymphocytes T s'opère à partir de précurseurs issus de la moelle osseuse et est décrites comme un processus se faisant en deux étapes au sein du thymus.

La première étape se déroule au niveau du cortex thymique et consiste en l'obtention du récepteur à l'antigène des T (TCR) qui permettra au précurseur thymique de reconnaître un antigène spécifique. Celui-ci est présenté sous la forme d'un peptide par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présent à la surface des cellules épithéliales thymiques. L'acquisition du TCR par le précurseur thymique se fait par recombinaison aléatoire de segments géniques grâce aux protéines RAG (de l'anglais « recombinaison activated gene ») et conduit à la génération d'un répertoire TCR extrêmement diversifié et partiellement fonctionnel. Cette obtention du TCR s'accompagne par l'expression des corécepteurs cluster de différenciation (CD) 8 et 4 qui permettront au précurseur thymique de lier respectivement les CMH de classe 1 et 2. Cette première étape de sélection thymique, dite positive, conduit à la perte d'environ 90 % des précurseurs thymiques qui entrent en apoptose faute d'avoir généré un TCR capable de lier un peptide présenté par le cortex thymique. Les précurseurs thymique ayant survécus ne conservent que le corécepteur CD4 ou CD8 selon le CMH rencontré et migrent au niveau de la médula pour subir une seconde étape de maturation.

Le deuxième processus de maturation du précurseur thymique se déroule au sein de la médula et consiste à prévenir la génération de lymphocytes T auto-réactifs afin d'éviter toute pathologie auto-immunes. Une sélection négative est ainsi opérée via la présentation d'un vaste panel d'antigènes du SOI par les cellules épithéliales thymiques. Cette expression d'antigène du SOI est obtenues grâce au facteur de transcription AIRE (de l'anglais « autoimmune regulator ») et associe un signal de mort à tout précurseur thymique portant un TCR liant ce type d'antigène. Les rares précurseurs thymique survivant à cette dernière étape se différencient en lymphocyte T naïfs et quittent le thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires.

L'entrée d'un pathogène au sein de l'organisme conduit à la présence d'antigènes étrangers qui sont alors présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) au lymphocyte T naïf via le CMH. L'engagement CMH-TCR conduit à l'activation du lymphocyte T qui entame alors un processus de maturation et de différenciation qui va lui permettre d'exercer une fonction propre lors de la réponse T. On peut ainsi distinguer les lymphocytes T helper (Th), dont le rôle sera notamment de soutenir l'action des autres lymphocytes par la production de cytokines, et

les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dont l'action lytique permettra l'élimination des pathogènes intracellulaires. Le processus de maturation du lymphocyte T est influencé par la présence du corécepteur CD4 ou CD8 à sa surface. Ainsi un lymphocyte T possédant l'adaptateur CD8 engagera le CMH1 et se différenciera en CTL tandis qu'un lymphocyte T possédant le CD4 engagera le CMH2 et se différenciera en Th. Cette différenciation en Th peut elle-même revêtir différente couleur selon les cytokines produites par la CPA ayant identifié le pathogène. La présence de cytokines telles que l'interféron gamma ( $IFN\gamma$ ) et l'interleukine (IL) 12 conduiront à la différenciation en Th1, l'IL-4 induira une polarisation en Th2, tandis que l'IL-6 et le TGF $\beta$  (de l'anglais « transforming growth factor  $\beta$ ») conduiront à une différenciation en Th17. Les cytokines alors produites par les différents Th permettront de stimuler préférentiellement les acteurs du système immunitaire les plus à même de répondre au type de pathogène identifié par la CPA<sup>6</sup>.

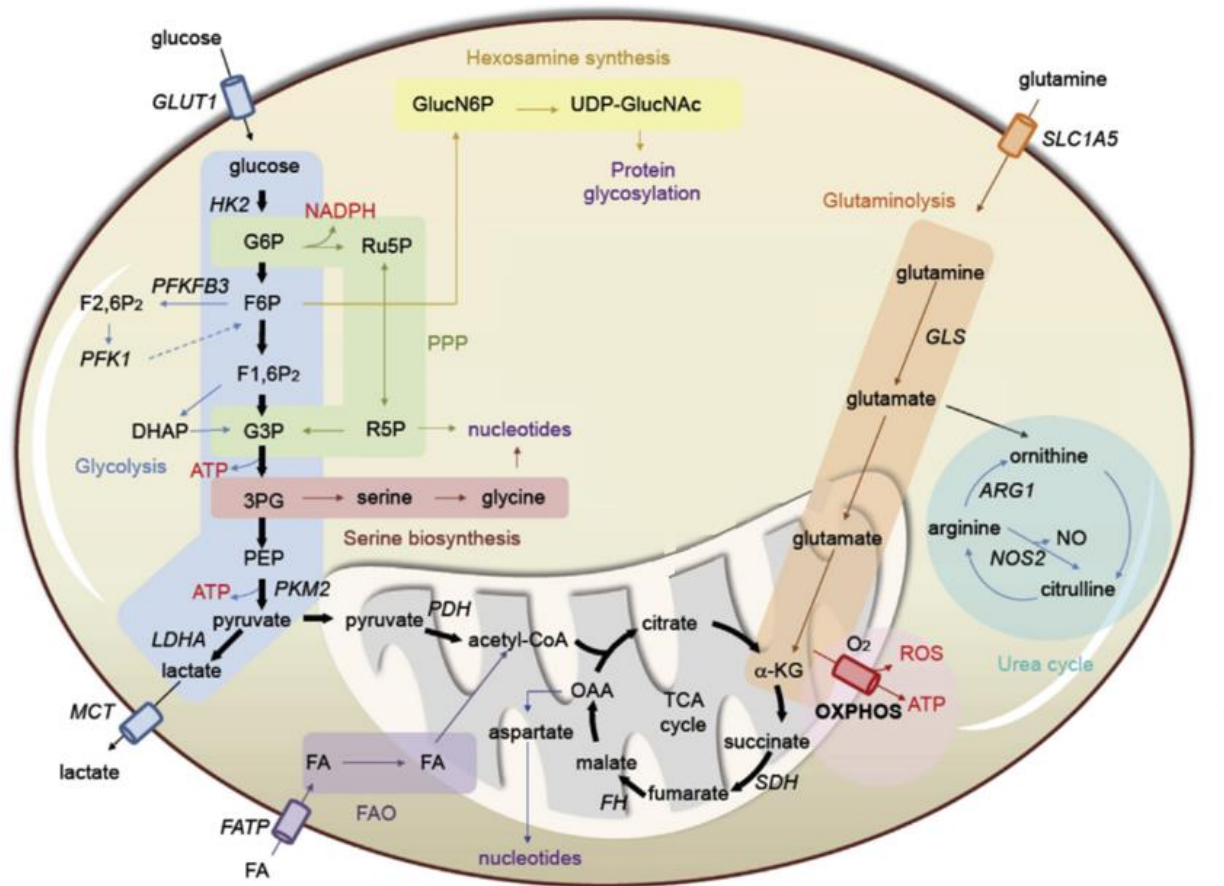
Durant toutes ces étapes d'activation et de maturation, le lymphocyte T va passer par plusieurs états cellulaires, de la quiescence à la prolifération intense, où le métabolisme cellulaire va jouer rôle crucial.

## 1.2. Métabolisme du lymphocyte T quiescent

A l'état basal un lymphocyte T est caractérisé par une activité métabolique très faible et la plupart des substrats à sa disposition, comme le glucose, la glutamine ou les acides gras, vont principalement être utilisés vers des branches cataboliques du métabolisme afin de produire de l'ATP<sup>1,7-9</sup>.

### 1.2.1. Glycolyse

Le glucose est transporté de manière active au sein du cytoplasme par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Chez les lymphocytes T, il est décrit une expression préférentielle des transporteurs de glucose (GLUT) de types 1, 2 et 3<sup>10</sup>. Une fois présent dans le cytoplasme le glucose subit une première phosphorylation afin d'être converti en glucose 6-phosphate (G6P). Celui-ci peut soit être dévié vers la voie des pentoses phosphate (PPP) pour la synthèse de nucléotides, soit subir une nouvelle série de phosphorylations, d'isomérisations et de clivage afin d'être converti en 3-phosphoglycérate (3PG). Une fois encore une sortie de la glycolyse est possible pour cet intermédiaire qui peut alors intégrer la voie de synthèse des sérines. Dans le cas contraire, le 3PG est alors converti en phosphoénolpyruvate (PEP). La réaction de glycolyse se termine par la production de 2 molécules de pyruvate à partir du PEP via la pyruvate kinase (PKM). Cette réaction donne lieu à l'obtention de 2 molécules d'ATP et 2 molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH)<sup>11</sup> (**Figure 1**).



**Figure 1 : Métabolisme du lymphocyte T quiescent.** Le lymphocyte T quiescent est caractérisé par une faible activité métabolique où les substrats à sa disposition comme le glucose, la glutamine ou les acides gras (FA) sont principalement mobilisés vers le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP en grande quantité. Adapté de *Subhra and K.Biswas Immunity 2015*.

### 1.2.2. Cycle de Krebs

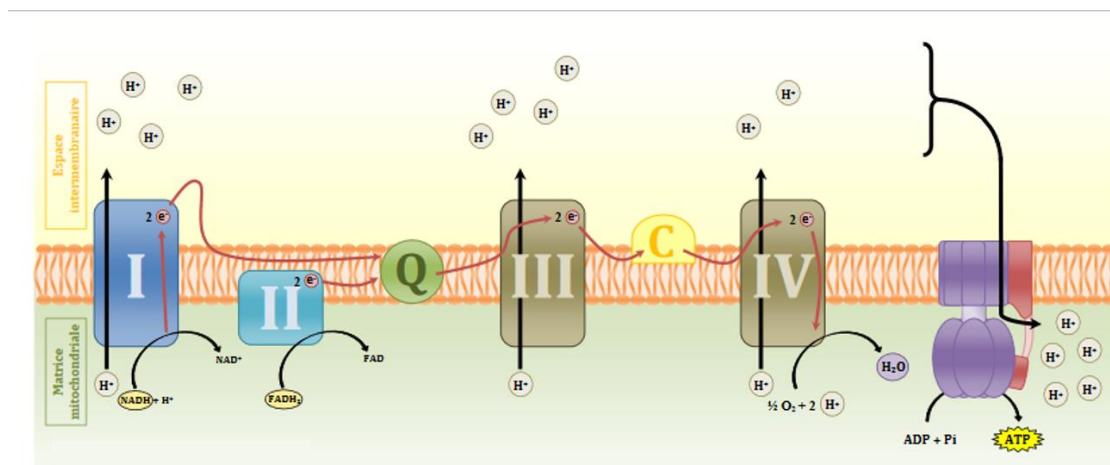
Les 2 molécules de pyruvate produites lors de la glycolyse peuvent ensuite être transloquées au sein de la mitochondrie. Elles y sont alors transformées en acétyle Coenzyme A (CoA) sous l'action du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyle-CoA ainsi formé est ensuite conjugué à l'oxaloacétate (OAA) et intègre le cycle de Krebs. Des décarboxylations oxydatives successives aboutiront à la production de différents intermédiaires tels que le citrate, l' $\alpha$ -kétoglutarate, le succinate, le fumarate et le malate, dernier intermédiaire avant un retour à l'OAA et un nouveau cycle (**Figure 1**).

Outre la génération de 2 molécules d'ATP, ces différentes oxydations permettent la production de 2 molécules de flavine adénine dinucléotide réduit (FADH) et de 8 molécules de NADH qui seront utilisés comme carburant par la chaîne respiratoire (ETC) et l'oxydation phosphorylative



(OXPHOS). Cette chaîne est située dans la matrice mitochondriale et est composée de 4 complexes protéiques. Elle permet, via l'énergie des électrons issus de NADH et du FADH, de produire un gradient de proton au niveau de l'espace inter membranaire de la mitochondrie (**Figure 2**). Ce gradient de proton permettra respectivement la production 2 et 3 molécules d'ATP par molécules de FADH et de NADH via l'ATP synthase.

L'utilisation supplémentaire des 2 molécules de NADH produites lors de la glycolyse donne un bilan de 36 molécules d'ATP produites par molécule de glucose au sein de la mitochondrie contre 2 sous l'action de la glycolyse<sup>11</sup>. Le fort rendement en ATP produit par le cycle de Krebs et l'ETC garanti la survie du lymphocyte T quiescent qui peut ainsi patrouiller au sein de l'organisme à la recherche d'une stimulation potentielle.



**Figure 2 : Structure de la chaîne respiratoire.** La chaîne respiratoire est composée de 4 complexes (I, II, III et IV) qui permettent la mise en place d'un gradient de protons (H<sup>+</sup>) entre la matrice mitochondriale et l'espace inter membranaire. Ce gradient est obtenu via un transfert d'électrons (e<sup>-</sup>) issus du NADH et du FADH depuis les complexes I et II vers les complexes III et IV. Ces transferts font intervenir l'ubiquinone (Q) et le cytochrome C (C). Le gradient de proton est ensuite utilisé par l'ATP synthase (violette) pour produire de l'ATP en grande quantité. Illustration issu du site [cours-pharmacie.com](http://cours-pharmacie.com).

### 1.2.3. Métabolisme de la glutamine

La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le sérum et constitue un autre substrat possible pour le lymphocyte T. Sa captation est permise via l'expression des transporteurs d'acides aminés (SLC) tels que SLC1A5, SLC38A1 ou SLC38A2<sup>12</sup>.

Une fois captée, la glutamine est hydrolysée au niveau de son groupement amine pour produire du glutamate et de l'ammoniac. Celui-ci pourra se lier au fructose 6-phosphate (F6P) pour

former du glucosamine 6-phosphate (GlucN6P), précurseur essentiel de la synthèse des hexosamines et des processus de glycosylation. Le glutamate peut avoir quant à lui plusieurs destins. Après son entrée dans la mitochondrie, il pourra être converti en  $\alpha$ -kétoglutarate pour intégrer le cycle de Krebs (**Figure 1**), ou, dans un second cas, être transformé en ornithine. L'ornithine ainsi produite pourra être utilisée comme précurseur de la synthèse des polyamines ou être converti sous forme de citruline et intégrer le cycle de l'urée<sup>11</sup>.

#### 1.2.4. *Oxydations des acides gras*

Les acides gras peuvent être stockés au sein du cytoplasme sous forme de glycérides via la conjugaison de 1, 2 ou 3 acides gras à un résidu glycérol estérifié.

Ces acides gras constituent un substrat utilisable pour une oxydation (FAO) au sein de la mitochondrie via une première conjugaison au CoA pour former un acyle-CoA. Dans le cas d'acide gras à chaîne courte ou moyenne (inférieure à 12 carbones) la translocation vers la mitochondrie peut se faire par diffusion libre à travers la membrane mitochondriale. Pour des acides gras plus long (de 14 à 18 carbones), cette translocation nécessite l'utilisation de la navette carnitine<sup>13</sup>. Celle-ci consiste à un transfert du groupement acyle depuis le CoA vers une molécule de carnitine via une estérification médiée par une carnitine palmitoyl transférase présente sur la membrane externe de la mitochondrie (CPT1).

L'acyle-carnitine ainsi produite traverse la membrane externe de la mitochondrie via des porines et est importée au sein de la matrice mitochondriale grâce à un système de carnitine acyle carnitine translocase qui permet l'échange de carnitine de la matrice mitochondriale contre des acyle-carnitines de l'espace inter membranaire. Une fois dans la matrice, les molécules d'acyle-carnitine peuvent restituer leur groupe acyle à un CoA sous l'action de CPT2 au niveau de la membrane interne afin de redonner de l'acyle-CoA (**Figure 1**).

L'oxydation de l'acyle-CoA peut alors commencer par retrait séquentiel de 2 carbones de l'acyle-CoA afin de produire d'une part du NADH et du FADH, utilisable par l'ETC, et de l'acétyl-CoA d'autre part, qui sera de nouveau incorporé dans le cycle de Krebs<sup>11</sup>.

### 1.3. Activation du lymphocyte T et switch métabolique

Bien que le lymphocyte T quiescent soit caractérisé par une activité métabolique faible, il a été observé un changement drastique de cette activité au cours de son activation. En effet cette stimulation induit une prolifération considérable du lymphocyte T et plusieurs auteurs ont pointé un shift massif vers un métabolisme de type anabolique après stimulation du TCR<sup>1-5</sup>.

#### 1.3.1. Effet Warburg

Un des premiers effets de l'engagement du TCR et des signaux de co-stimulation consiste en une augmentation du flux glycolytique au sein du lymphocyte T. Cette augmentation est permise via une forte translocation des récepteurs GLUT-1 à la membrane entraînant une captation massive de glucose par la cellule et sa dégradation à travers la glycolyse<sup>10,14-16</sup>.

Le flux de glycolyse d'un lymphocyte T activé se trouve cependant significativement modifié par rapport à celui d'un lymphocyte T quiescent avec une déviation préférentielle vers les voies PPP et de synthèse des sérines<sup>17</sup> (**Figure 3**). Ces déviations semblent dues à des événements ayant lieu en aval de la réaction de glycolyse. La PKM existe sous la forme de 2 isoformes, PKM1 et PKM2. La PKM2 se trouve être moins efficace que la PKM1<sup>18,19</sup> et, de manière intéressante, il a été observé une accumulation préférentielle de la PKM2 par rapport à la PKM1 chez le lymphocyte T activé<sup>20</sup>.

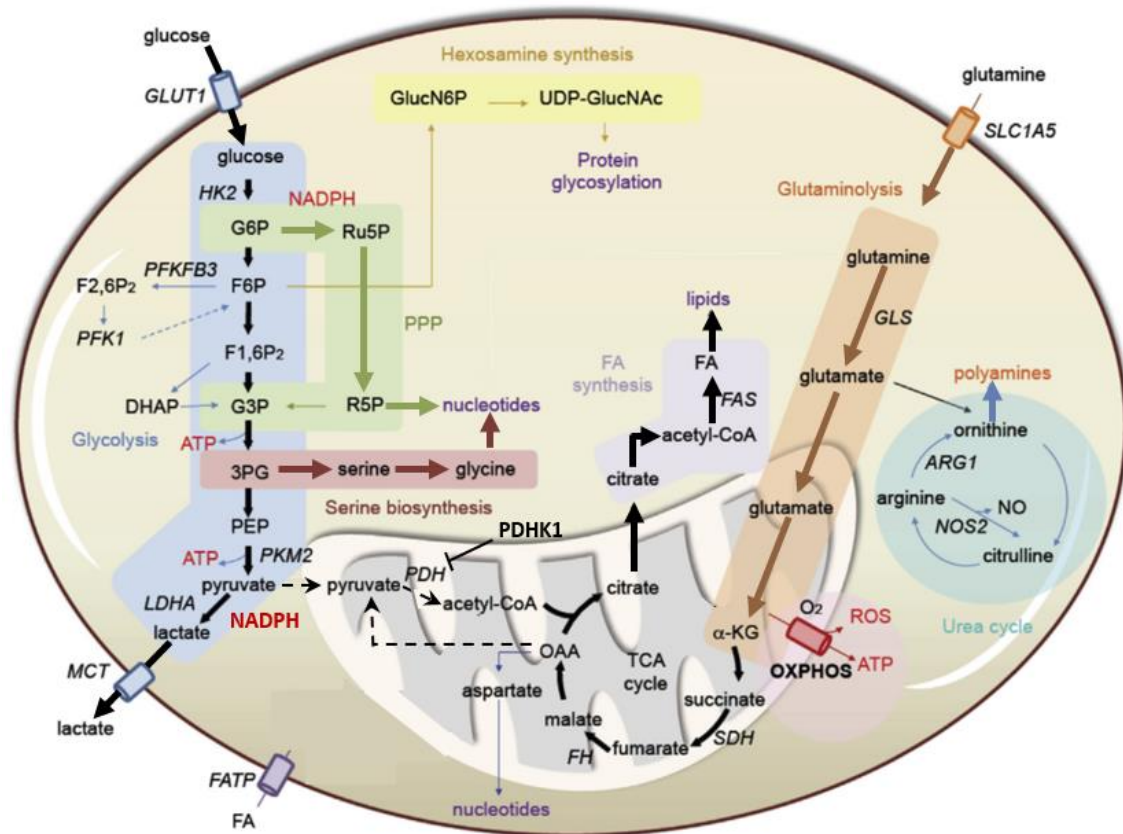
L'utilisation de cette enzyme moins efficace par le lymphocyte T activé induit un « embouteillage métabolique » et une accumulation d'intermédiaire de la glycolyse, tels que le 3PG ou le G6P qui peuvent alors être remobilisés respectivement vers la voie de synthèse des sérines et la voie PPP. L'utilisation de ces 2 voies n'est pas qu'une conséquence de « l'embouteillage métabolique » décrit plus haut, au moins dans le cas de la voie PPP. En effet, l'inhibition de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), l'enzyme limitante de la voie PPP, bloque la prolifération de lymphocytes T activés<sup>17</sup>.

La plus faible activité de la PKM2 diminue également la quantité relative de pyruvate disponible pour une utilisation au sein de la mitochondrie. En plus de cet apport diminué, la conversion du pyruvate en acétyl-CoA semble être inhibée chez le lymphocyte T activé. En effet, il a été observé qu'une activation chronique du lymphocyte T augmente l'expression de la PDH kinase 1 (PDHK1), l'inhibiteur de complexe PDH<sup>21</sup>. Le pyruvate est alors préférentiellement converti en lactate sous l'action de la lactate déshydrogénase (LDH)<sup>14,22</sup>

**(Figure 3)**. Bien que cet usage du pyruvate soit moins rentable en terme de production d'ATP qu'une utilisation dans la mitochondrie, elle permet la génération de 2 molécules de NADH qui pourront être réutilisées afin de produire du 3PG à partir de Glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) permettant de cette manière une glycolyse « en boucle »<sup>14,22</sup>.

Cette glycolyse aérobie a été pour la première fois décrite dans les cellules cancéreuses par Otto Warburg en 1956 et est connu sous le nom d'effet Warburg<sup>23</sup>. Bien que cette « version » de la glycolyse n'aboutisse qu'à une production faible d'ATP, elle permet la génération de biomasse, notamment via les voies PPP et de synthèse des sérines qui sont à l'origine de la synthèse des nucléotides et d'acides aminés. Ceux-ci sont indispensables pour la réplication de l'ADN et la synthèse de nouvelles protéines lors des phases de mitoses successives que subit le lymphocyte T.

Ce type de métabolisme rend le lymphocyte T extrêmement dépendant du glucose lors de sa prolifération. En effet, la culture de lymphocytes T activés dans un milieu pauvre en glucose conduit à forte mortalité cellulaire et à une absence d'expression de marqueurs d'activation tels que le CD25 ou le CD69 sur les cellules survivantes<sup>24,25</sup>.



**Figure 3 : Métabolisme du lymphocyte T activé.** Le lymphocyte T activé est caractérisé par une forte activité anabolique où la synthèse de molécules prime sur la production d’ATP. On observe une forte glycolyse avec une dérivation du flux vers la voie des pentoses phosphates (PPP), de synthèse des sérines et la production de lactate. Le cycle de Krebs est rompu au niveau du citrate qui est exporté hors de la mitochondrie pour la synthèse de lipides (FAS). La glutamine est alors incorporé au cycle de Krebs sous forme d’ $\alpha$ -kétoglutarate pour maintenir la continuité du cycle et l’activité de l’ETC. Adapté de *Subhra and K.Biswas Immunity 2015*.

### 1.3.2. Shunt du cycle de Krebs et activité de la chaîne respiratoire

L’effet Warburg produit une diminution de l’apport en acétyl-CoA au cycle de Krebs mais cela ne semble pas être le seul changement observé au sein de la mitochondrie lors de l’activation du lymphocyte T. Certains auteurs suggèrent que, de manière similaire à ce qui a été décrit dans les cellules cancéreuses<sup>26</sup>, le lymphocyte T activé pourrait présenter une rupture du cycle de Krebs et une sortie massive du citrate en dehors de la mitochondrie<sup>3,4</sup>. Une fois dans le cytoplasme, le citrate serait alors lysé pour libérer de l’OAA et de l’acétyl CoA qui pourrait être mobilisé pour la synthèse de lipides après une conversion préalable en malonyl CoA (**Figure 3**).

Plusieurs arguments en faveur de cette hypothèse ont été apporté par les études de Chen et al et de Chakrabarti et al<sup>27,28</sup>. La première décrit une augmentation de la synthèse du cholestérol chez

des lymphocytes T activés, la deuxième indique une hausse de l'expression de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-R), une enzyme impliquée dans la voie du mévalonate à l'origine de la génération du cholestérol.

En parallèle de cette induction de synthèse de lipides (FAS), la FAO autrefois utilisée par le lymphocyte T quiescent se trouve diminuée chez le lymphocyte T activé (**Figure 3**). En effet Wang et al ont pu montrer à l'aide de traceurs isotopiques une diminution drastique de l'oxydation de palmitate radio-marqué par les mitochondries de lymphocytes T activés<sup>17</sup>.

La question peut alors se poser quant à l'impact de cette diminution d'apport en carbone sur l'activité mitochondriale. Il a été montré chez des lymphocytes T humain qu'une stimulation analogue à celle du TCR, à l'aide de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et d'ionomycine (IONO), induisait une diminution du taux de consommation en oxygène (OCR) au sein de la mitochondrie, traduisant une diminution possible de l'activité de l'ETC<sup>29</sup>. Cette même étude a mis en évidence une modification de l'activité des différents complexes de l'ETC, avec une diminution de celle des complexes I et II en faveur d'une augmentation de celle du complexe III.

Ces changements d'activité semblent liés à une accumulation de NADH et à une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par le complexe III. En effet, Sena et al ont pu montrer que la stimulation du TCR et de la molécule de co-stimulation CD28 à l'aide d'anticorps spécifiques conduisent à une augmentation de la production de ROS mitochondriaux. Ces auteurs montrent également que cette production de ROS se trouve diminuée chez des souris avec une délétion conditionnelle du gène *uqcrfs1*, codant pour une protéine requise pour la production de ROS par le complexe III<sup>25</sup>.

Un lien mécanistique entre le TCR et la production de ROS mitochondriaux pourrait impliquer le flux calcique produit par le réticulum endoplasmique suite à l'engagement du TCR. Dans leur étude du rôle des facteurs pro-apoptotique Bax et Bak, Jones et al. ont pu constater que la délétion de ces deux protéines provoquait une altération de la mobilisation du calcium depuis le réticulum endoplasmique suite à une stimulation par un anticorps dirigé contre le CD3 (membre du complexe TCR). Cette baisse du calcium était liée à une baisse de production de ROS mitochondriaux associée à une diminution de la prolifération cellulaire et de l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69<sup>30</sup>.



La production des ROS mitochondriaux semble donc être plus qu'une conséquence métabolique et plusieurs données montrent un rôle crucial de ces molécules dans l'établissement du programme d'activation et de maturation du lymphocyte T. En effet, les lymphocytes déficients pour le gène *uqcrfs1* sont incapables d'augmenter l'expression des marqueurs CD25 et CD69 à leur surface après activation et la production d'IFN $\gamma$  est réduite dans ces cellules. Cette perte de maturation est associée à une diminution de la translocation au noyau d'un facteur de transcription clé dans la maturation du lymphocyte T, le facteur NFAT (de l'anglais « nuclear factor of activated T-cells »). Des études antérieures avait également mis en avant un lien possible entre la production de ROS et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ( de l'anglais « nuclear factor-kappa B »), également essentielle pour la maturation du lymphocyte T activé<sup>31</sup>.

L'ensemble de ces données montre que, bien que la mitochondrie ne soit plus utilisée comme un nœud de production d'ATP par le lymphocyte T activé, elle reste essentielle pour la production de biomasse sous forme de lipides nécessaires à la formation de nouvelles membranes plasmique pour la division cellulaire. De plus, cet organite semble également impliqué dans la transduction du signal d'activation, notamment par la production de ROS essentiels à l'activité de certains facteurs de transcription induit par le signal TCR.

### *1.3.3. Dépendance à la glutamine*

L'un des effets de l'activation du lymphocyte T sur le métabolisme mitochondrial semble consister en la sortie du citrate vers le cytoplasme afin de favoriser une FAS et une augmentation de biomasse (**Figure 3**). Cependant, cette rupture du cycle de Krebs pourrait fortement diminuer la quantité des intermédiaires en aval du citrate et entrainer un effondrement complet du cycle.

Un mécanisme de « sauvetage » du cycle de Krebs (anaplerose) devrait alors être mis en place dans le lymphocyte T activé afin de maintenir le fonctionnement de l'ETC et un OXPHOS minimum. Cela pourrait faire intervenir la glutamine qui pourrait réapprovisionner le cycle de Krebs sous forme d' $\alpha$ -kétoglutarate et ainsi participer au renouvellement du pool de citrate utilisable pour la FAS, comme cela a été décrit dans les cellules cancéreuses<sup>32-34</sup> (**Figure 3**).

Un second rôle de la glutamine pourrait être de permettre la production du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). En effet, dans leur étude du métabolisme des cellules

cancéreuses, Deberardinis et al. ont rapporté à l'aide de traceurs isotopiques une production de lactate à partir de la glutamine, processus qu'ils ont nommé glutaminolyse. Cette glutaminolyse permet la conversion de l'OAA issu de la glutamine en pyruvate et la production NADPH<sup>34</sup> (**Figure 3**). Le NADPH ainsi produit peut alors s'ajouter à celui produit par la voie PPP et permet d'apporter le pouvoir réducteur nécessaire à la FAS<sup>32</sup>. Le pyruvate est quant à lui converti en lactate sous l'action de la LDH participant encore au pouvoir acidifiant de la cellule<sup>34</sup>.

Une troisième fonction que la glutamine pourrait avoir au sein du lymphocyte T activé est liée à la synthèse des polyamines (**Figure 3**). Les polyamines sont de petites molécules obtenues à partir d'ornithine extraite du cycle de l'urée et peuvent jouer un rôle non négligeable dans différents processus cellulaires comme la régulation de la transcription, de la traduction ou de l'apoptose<sup>35-37</sup>. Ces molécules semblent également essentielles pour l'induction de la synthèse protéique et la prolifération des lymphocytes T activés<sup>38,39</sup>.

Il existe plusieurs observations en faveur d'une dépendance à la glutamine de la part des lymphocytes T activés. En effet, l'activation de lymphocytes T induit une augmentation de l'import de glutamine au sein de la cellule ainsi qu'une expression plus élevée de l'expression des plusieurs gènes codant pour des transporteurs de la glutamine<sup>12</sup>. De plus, lorsqu'ils sont cultivés en absence de glutamine, ces lymphocytes T activés présentent une diminution de leur prolifération et de la production de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN $\gamma$ <sup>17</sup>.

Les preuves les plus fortes de la contribution de la glutamine au sauvetage du cycle de Krebs chez les lymphocytes T activés ont été apportées par l'étude de Blagith et al. Ces auteurs ont pu montrer à l'aide de traceurs isotopiques que les carbones de la glutamine sont incorporés dans les différents intermédiaires du cycle de Krebs et que la déprivation en glutamine induisait une chute de l'OCR ainsi que du pool de citrate. Ces même auteurs ont également pu montrer qu'en condition où le glucose est limitant, les lymphocytes T activés sont capables d'utiliser les carbones de la glutamine pour produire du pyruvate<sup>40</sup>.

L'ensemble de ces données semble montrer que le lymphocyte T activé utilise activement la glutamine afin de compenser la rupture du cycle de Krebs. Cet acide aminé participe ainsi 1) au renouvellement du pool du citrate, 2) à la production de NADPH et 3) au maintien d'une activité OXPHOS minimale. La glutamine supporte ainsi la FAS et la production d'ATP par ETC.



## 1.4. Régulation intracellulaire et checkpoints métaboliques

Plusieurs données mettent en évidence un changement drastique de métabolisme lors du passage de l'état de quiescence à celui d'activé chez le lymphocyte T<sup>1,7-9</sup>. Comme tout processus biologique, le métabolisme cellulaire est régulé de manière très fine par la cellule et plusieurs voies de signalisation ont récemment été identifiées comme nœud de régulation du shift métabolique observé chez le lymphocyte T activé.

### 1.4.1. Voie mTOR

La protéine mTOR (pour « mammalian target of rapamycin » en anglais) est une sérine thréonine kinase pouvant exercer son activité sous la forme de 2 complexes protéiques respectivement nommés mTORC (de l'anglais « mTOR complexe ») 1 et 2 selon les partenaires auquel elle s'associe.

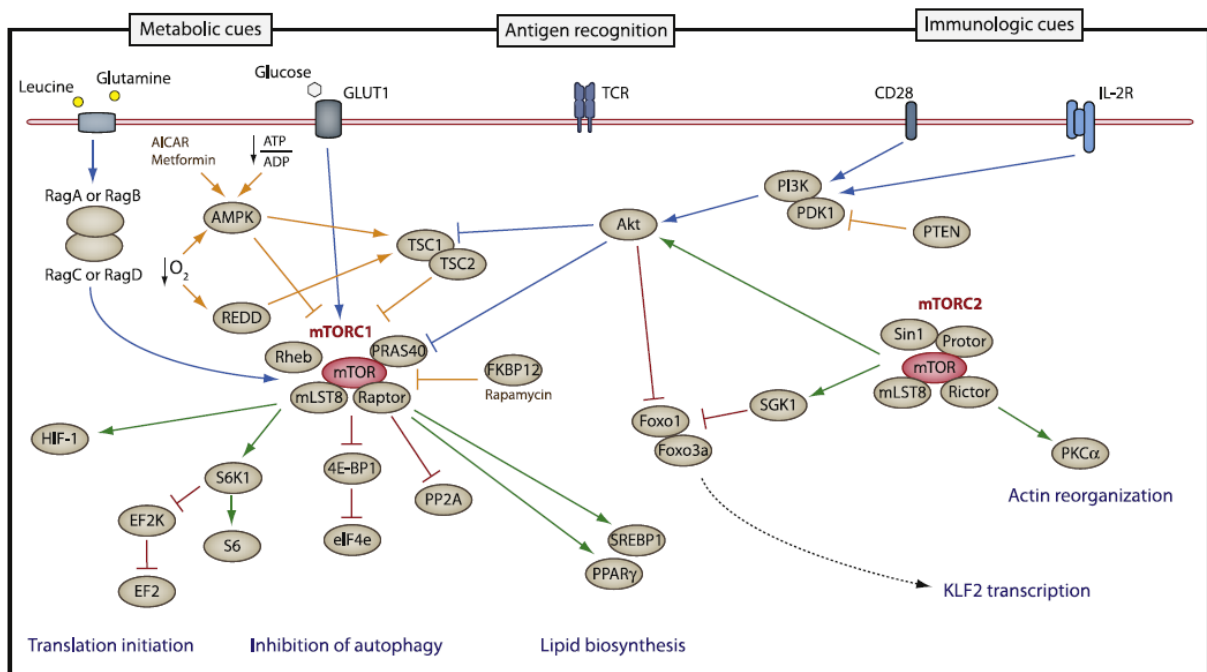
Le complexe mTORC1 est composé des partenaires suivants : Raptor (de l'anglais « regulatory associated protein of mTOR »), mLST8 (de l'anglais « mammalian lethal with sec13 protein 8 »), PRAS40 (de l'anglais « proline rich Akt substrat 40kDa ») et DEPTOR (de l'anglais « DEP domain containing mTOR interacting protein »).

Le complexe mTORC2 est quant à lui composé des partenaires suivants : Rictor (de l'anglais « rapamycin insensitive companion of mTOR »), mLST8, Protor (de l'anglais « protein observed with Rictor ») et mSin1 (de l'anglais « mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1») <sup>41</sup> (**Figure 4**).

La protéine mTOR est extrêmement conservée au cours de l'évolution et possède un rôle essentiel dans la régulation cellulaire de la croissance, de la prolifération et de la survie <sup>42</sup>. Son activité est régulée par différents stimuli tels que la disponibilité en oxygène, en acides aminés ou en facteurs de croissance mais peut également être contrôlée par l'utilisation de médiateurs chimiques tels que la rapamycine. En effet, celle-ci induit une inhibition sélective de mTORC1 lors d'une exposition courte puis une inhibition des deux complexes après une exposition plus longue <sup>43-46</sup>.

Bien que l'origine des voies de signalisation conduisant à l'activation de chacun des deux complexes fasse encore l'objet d'investigations, particulièrement pour le complexe mTORC2 <sup>41</sup>, les signaux conduisant à l'activation de mTORC1 sont bien décrits.

La liaison de différents facteurs de croissances à leur récepteur induit une augmentation de l'activité de la PI3K (de l'anglais « phosphoinositide 3-kinase ») qui conduit à une activation de la PDK1 (de l'anglais « phosphoinositide-dependent kinase-1 »). Cette kinase phosphoryle ensuite la protéine Akt qui phosphorylera à son tour les membres du complexe TSC (de l'anglais « tumor sclerosis complexe »), induisant alors l'inhibition de ce complexe. L'inactivation du complexe TSC permet alors de libérer l'activité GTPase de la protéine Rheb (de l'anglais « Ras homolog enriched in brain ») et conduit finalement à l'activation du complexe mTORC1<sup>47-49</sup> (Figure 4).



**Figure 4 : Voie mTOR et régulation du shift anabolique.** L'engagement du signal de co-stimulation CD28 et la présence de cytokines comme l'IL-2 induit une augmentation de l'activité de la PI3K qui permet l'activation de la PDK1. Celle-ci phosphoryle et active alors la protéine Akt qui inhibe à son tour le complexe TSC, inhibiteur de mTORC1. L'activation de mTORC1 conduit à une orientation vers un métabolisme de type anabolique avec une initiation de la traduction de nombreux ARNm, une inhibition de l'autophagie et une induction de la synthèse de lipides. L'induction du complexe mTORC2 conduit à une inactivation des facteurs de transcription FOXO 1/3 à l'origine du maintien de l'état de quiescence cellulaire ainsi qu'à une réorganisation de l'actine. D'après *Powell and Delgoffe Immunity 2010*.

Les conséquences de l'activation de la voie mTOR sont multiples et conduisent à une orientation de la cellule vers un métabolisme de type anabolique. L'activation du complexe mTORC1 inhibe les processus d'autophagie<sup>41</sup> et permet notamment d'initier la traduction de nombreux ARNm, dont celui du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (pour « hypoxia inducible factor » en anglais)<sup>50</sup>.

HIF-1 $\alpha$  régule l'expression de plusieurs enzymes de la glycolyse et permet notamment la dérivation du pyruvate en dehors de la mitochondrie pour sa fermentation préférentielle en lactate via l'induction de l'expression des enzymes PDHK1 et LDH<sup>51</sup> (**Figure 3**).

D'autre part, mTORC1 est à l'origine de l'activation de SREBP1 (de l'anglais « sterol regulatory element binding protein 1 ») qui a récemment été décrit comme essentiel dans l'induction de la FAS, de la voie des PPP et de la synthèse du cholestérol<sup>52</sup> (**Figure 3**).

Une autre cible potentielle de mTORC1 pourrait être c-MYC, un facteur de transcription connu pour son pouvoir oncogène et décrit comme un régulateur crucial de la glycolyse et de la synthèse des polyamines<sup>17</sup> (**Figure 3**).

L'activation de mTORC2 induit également des effets notable sur la prolifération et le métabolisme cellulaire<sup>53</sup>. En effet, mTORC2 est capable de phosphoryler la protéine Akt (sur un site différent de la PDK1) ainsi que la protéine SGK1 (pour « serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 » en anglais).

Une fois actives, ces 2 kinases inhibent l'activité des facteurs de transcription de type FOXO1/3 (pour « forkhead box protein O1/3 ») qui sont à l'origine de l'induction de KLF2 (de l'anglais « Kruppel like factor 2 ») (**Figure 4**). Ce facteur de transcription participe au maintien de l'état de quiescence, notamment par l'inhibition de c-MYC<sup>54</sup>.

D'autre part, KLF2 est également à l'origine de l'expression des molécules CD62L et CCR7 (de l'anglais « C-C chemokine receptor type 7 ») qui permettent l'entrée et la rétention du lymphocyte naïf dans le ganglion<sup>55,56</sup>. En parallèle, KLF2 régule négativement l'expression de S1P1 (pour « Sphingosine-1-phosphate receptor 1 » en anglais) qui permet la sortie du lymphocyte du ganglion<sup>57</sup>. Ainsi, l'inactivation de KLF2 par l'action indirecte de mTORC2 semble permettre la levée de l'inhibition de la prolifération et la sortie du lymphocyte T du ganglion.

De manière intéressante, plusieurs études ont montré que l'engagement de signaux de co-stimulation, comme le CD28, ou l'exposition à certaines cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-7, pouvaient induire une activation de la voie PI3K-Akt-mTOR chez les lymphocytes T en cours d'activation<sup>58-60</sup> (**Figure 4**). De plus le traitement de lymphocytes T activés avec de la rapamycine induit leur anergie in vitro et in vivo<sup>61,62</sup>, ce qui a valu à la rapamycine d'être longtemps utilisée comme traitement immunosuppresseur lors des greffes d'organes<sup>63</sup>.

Une autre preuve de l'importance de la voie mTOR dans la prolifération du lymphocyte T activé vient de l'étude de Delgoffe et al. En effet, ces auteurs ont observé que des lymphocytes T déficients pour mTOR proliféraient moins que des lymphocytes T sauvages après une stimulation CD3/28 *in vitro*<sup>64</sup>.

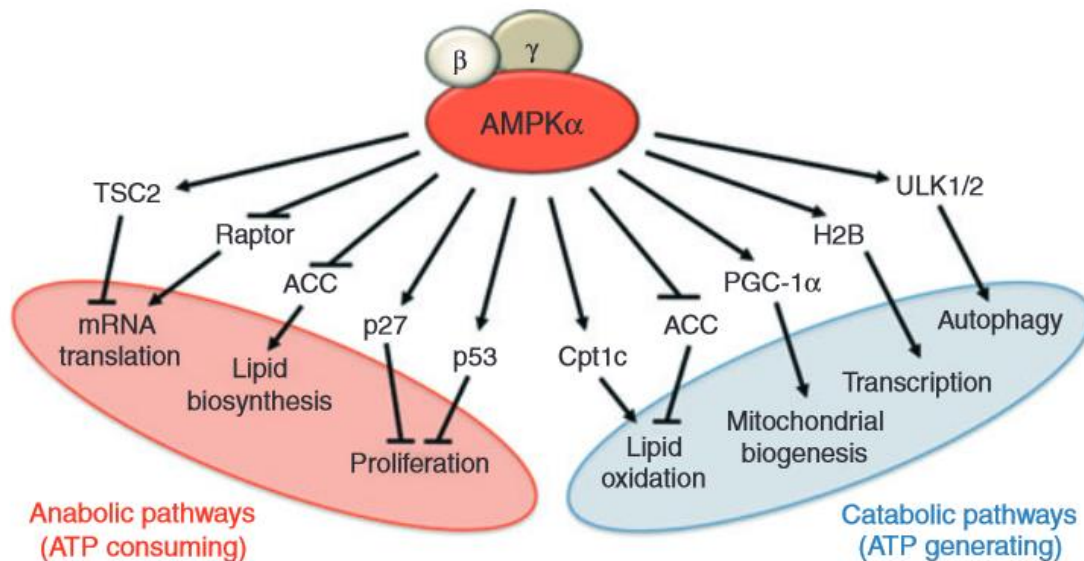
L'ensemble de ces données semble ainsi placer la voie mTOR comme un nœud de régulation central de l'induction du shift anabolique chez le lymphocyte T activé.

#### 1.4.2. Voie AMPK

La protéine AMPK (de l'anglais « AMP activated kinase ») est un complexe hétérotrimérique composé de deux sous unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$  et d'une sous unité catalytique  $\alpha$  possédant une activité sérine/thréonine kinase. On distingue 2 isoformes de la sous unité  $\alpha$  ( $\alpha 1$  et 2), 2 isoformes  $\beta$  ( $\beta 1$  et 2) et 3 isoformes  $\gamma$  ( $\gamma 1$ , 2 et 3)<sup>65</sup>. Il est admis que les isoformes  $\alpha 1$  et 2 sont fonctionnellement redondant bien qu'ayant des localisations cellulaires différentes, avec une localisation exclusivement cytosolique pour l' $\alpha 1$  tandis que l' $\alpha 2$  peut être cytosolique et nucléaire<sup>66</sup>. On observe une expression exclusive de l' $\alpha 1$  chez les cellules hématopoïétiques où l'expression de l' $\alpha 2$  n'est détectée ni à l'état basal, ni après activation<sup>67-69</sup>. La sous unité  $\beta$  est considérée comme une molécule de liaison entre les sous unités  $\alpha$  et  $\gamma$  bien qu'elle soit également capable de lier du glycogène grâce à ses domaines carbohydrates.

L'activation de l'AMPK est régulée par la liaison compétitive d'adénosine mono (AMP) ou tri phosphate (ATP) au niveau des 4 domaines cystathionine  $\beta$  synthases présent sur sa sous unité régulatrice  $\gamma$ <sup>70,71</sup>. La liaison d'AMP sur ces domaines induit un changement de conformation du complexe qui permet l'activation complète de la sous unité  $\alpha$  par phosphorylation activatrice de sa tyrosine 172 et sa protection contre la déphosphorylation. Cette phosphorylation activatrice est médié par des kinases en amont de la cascade de signalisation qui sont à ce jour au nombre de 3. La kinase LKB1 (de l'anglais « liver kinase B1 »), qui est considérée comme étant la kinase prédominante dans l'activation de l'AMPK en cas de de fort ratio AMP/ATP, la kinase CamKK (pour « calmodulin dependent protein kinase kinase » en anglais), capable de phosphoryler l'AMPK en réponse à une augmentation du niveau de calcium intra cellulaire indépendamment du ratio AMP/ATP et la kinase TAK1 (de l'anglais « transforming growth factor  $\beta$  activated kinase 1 »), décrite comme activant l'AMPK en réponse au TGF $\beta$ <sup>72-74</sup>.

Le complexe AMPK est donc sensible au ratio AMP/ATP et est activé lorsque que celui-ci est haut, c'est-à-dire lorsque la quantité d'ATP intra cellulaire est basse. Ceci fait de l'AMPK un senseur central de l'état énergétique de la cellule.



**Figure 5 : Voie AMPK et régulation du shift catabolique.** Une déprivation en ATP induit l'activation de la protéine AMPK qui se traduit par une inhibition des processus métabolique consommateur d'ATP au profit de ceux en produisant. L'AMPK promeut ainsi des voies cataboliques comme l'oxydation des lipides ou l'autophagie et inhibe des voies anaboliques telles que la synthèse de lipide ou la traduction des ARNm. D'après *Bagih et al Immunological reviews 2012*.

La protéine AMPK est donc activée lorsque le rapport AMP/ATP est haut, c'est-à-dire quand la quantité d'ATP intracellulaire diminue et que la cellule est en souffrance énergétique. En réponse à ce stress, l'AMPK va stopper les processus consommateurs d'ATP et engager un shift vers un métabolisme catabolique afin de renouveler le stock d'ATP intracellulaire (**Figure 5**).

Une des cibles directes de l'AMPK est l'acétyl CoA carboxylase (ACC) qui existe sous deux isoformes ayant leur localisation propre, ACC1 libre dans le cytoplasme et ACC2 lié à la membrane mitochondriale. Ces deux isotypes possèdent la même fonction et induisent la conversion de l'acétyl CoA en malonyl CoA, une des étapes préliminaires à la FAS décrite plus haut. La phosphorylation d'ACC par AMPK diminue son activité et ainsi la production de malonyl CoA ce qui résulte en une utilisation préférentielle de l'acétyl CoA pour la FAO et donc à une augmentation de la production d'ATP<sup>75,76</sup>.

De plus, l'AMPK est également capable de bloquer la FAS en inhibant par phosphorylation le facteur de transcription SREBP1, décrit comme essentiel à la synthèse de lipide et du cholestérol<sup>77,52</sup>.

Une seconde voie métabolique régulée directement par l'AMPK est l'autophagie qui permet l'autodigestion et le recyclage de composant cellulaire pour la production d'énergie. En effet, AMPK est capable de phosphoryler les protéines ULK 1 et 2 (de l'anglais « Unc-51 like autophagy activating kinase ») (**Figure 5**) qui ont un rôle dans l'autophagie des mitochondries (mitophagie)<sup>78</sup>. L'AMPK impacte également sur un autre aspect de la dynamique des mitochondries en phosphorylant et en activant le facteur de transcription PGC1 $\alpha$  (de l'anglais « peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  co-activator 1  $\alpha$  »), un facteur clé dans la biogénèse des mitochondries<sup>79</sup> (**Figure 5**).

Un autre processus extrêmement consommateur en ATP est la traduction des ARNm qui est décrite comme comptant pour 20% de l'utilisation de l'ATP dans une cellule en prolifération<sup>80</sup>. L'AMPK paralyse ce processus de manière indirecte en inhibant l'activité de mTORC1 via l'inactivation de Raptor<sup>81</sup> et l'activation du complexe TSC<sup>82</sup> (**Figure 5**). L'inhibition du complexe mTORC1 par l'AMPK a ainsi des conséquences indirectes et vastes sur l'ensemble des processus anaboliques induit par mTORC1. De manière générale, l'activation de l'AMPK induit une extinction massive des processus coûteux en ATP et peut même aller jusqu'à un arrêt du cycle de prolifération via une activation de la protéine 53 (p53)<sup>83</sup>. L'AMPK agit ainsi comme le garant de la balance énergétique et constitue un véritable checkpoint métabolique pour la cellule qui, en cas de faible taux d'ATP, doit éviter une prolifération suicidaire.

Plusieurs observations semblent montrer un rôle de la voie AMPK dans la favorisation du catabolisme chez le lymphocyte T quiescent. En effet, la délétion spécifique de l'AMPK chez le lymphocyte T induit une augmentation de la glycolyse, de l'expression de GLUT-1 et de certaines enzymes de la glycolyse. Ces observations corrént avec une augmentation de l'activité de mTORC1 dans ces cellules<sup>68</sup>.

Cependant la déficience en AMPK ne semble pas nuire à la fonction du lymphocyte T activé, en effet, la prolifération ainsi que la production de molécules effectrices ne semblent pas altérées chez des lymphocytes T déficient en AMPK<sup>69</sup>. L'étude de Tamas et al. a néanmoins montré que la voie AMPK semble avoir un rôle dans les étapes précoces de l'activation du lymphocyte T. En effet, ces auteurs ont pu montrer qu'une stimulation du TCR induisait une

augmentation de l'activité AMPK et que cette augmentation était liée au calcium et à la CamKK<sup>67</sup>. Cette observation a amené certains auteurs à penser qu'en plus de son rôle de rhéostat, la voie AMPK pourrait avoir un rôle de « starter d'activation », celui-ci donnerait, en peu de temps, une forte quantité d'ATP en prévision du shift anabolique à venir<sup>84</sup>.



## 1.5. Différenciation des lymphocytes T et évolution du métabolisme

Nous avons vu plus haut que l'activation du lymphocyte T est associée à un shift vers un métabolisme de type anabolique qui semble être induit grâce à une activation préférentielle de la voie mTOR. Cependant l'activation du lymphocyte T n'est qu'une des étapes nécessaires à sa fonction. En effet, une fois activé, le lymphocyte T va devoir entrer dans une phase de maturation et de différenciation afin d'acquérir ses fonctions effectrices qui lui permettront de jouer pleinement son rôle. Ce processus de maturation du lymphocyte T semble lui aussi associé à des caractéristiques métaboliques particulières provenant d'activation préférentielle des voies mTORC1 ou mTORC2<sup>48,49,85</sup>. De plus, lors de contraction de la réponse T, la population de cellules mémoires survivante semble également posséder des caractéristiques métaboliques uniques, associé à une activité AMPK forte<sup>4,84,86</sup>.

### 1.5.1. Voie mTOR et fonction effectrice

Suite à son activation, le lymphocyte T entame un processus de maturation et de différenciation qui va lui permettre d'exercer une fonction propre lors de la réponse T. Comme décrit précédemment, on distingue les Th, dont le rôle sera notamment de soutenir l'action des autres lymphocytes par la production de cytokines, et les CTL dont l'action lytique permettra l'élimination des pathogènes intracellulaires.

De manière intéressante, la différenciation en CTL est associée à une activation préférentielle du complexes mTORC1. Il a été observé que l'activité de mTORC1 était cruciale pour l'induction du shift glycolytique chez le CTL<sup>87</sup> et que la délétion de mTORC1 dans les lymphocytes T CD8 conduisait à une inhibition de leur différenciation en CTL<sup>88</sup>. De plus, l'établissement du programme génétique et de l'activité cytotoxique de ces cellules semble médié en partie par une induction de HIF-1 $\alpha$  dépendante de mTORC1<sup>89,90</sup>.

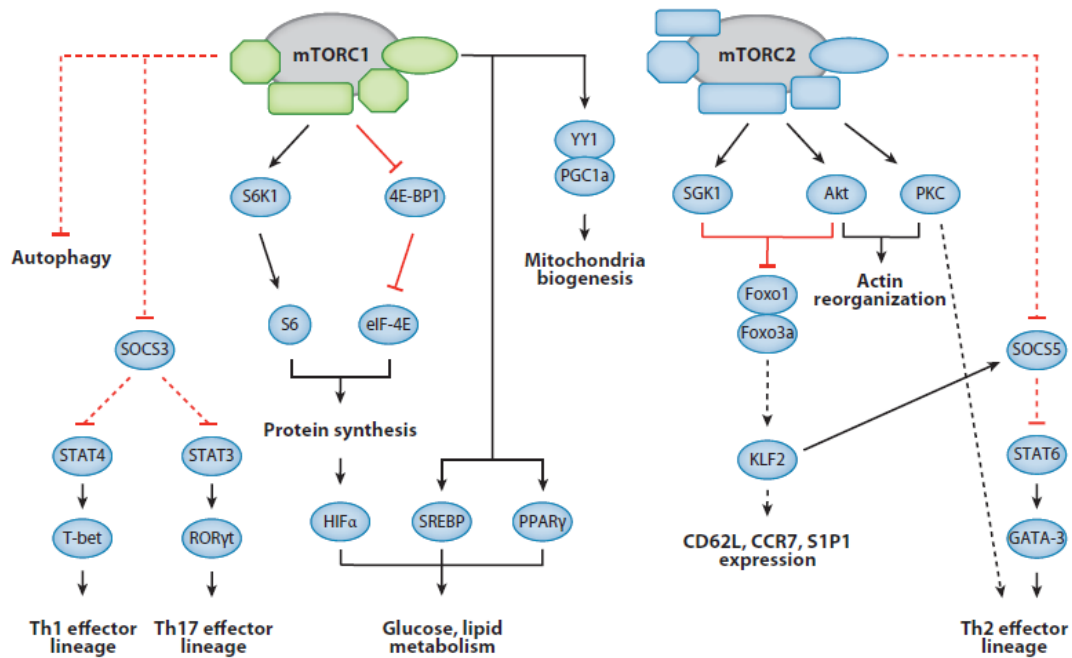
L'activité de mTORC1 semble également essentielle pour le développement de Th de type 1 et 17. En effet la délétion de Rheb (activateur du complexe mTORC1) conduit à une perte préférentielle de la différenciation des lymphocytes T CD4 en Th1 et 17 avec peu d'effet sur la différenciation en Th2. Cette diminution de différenciation en Th1 et 17 est associée à une réduction des signaux STAT 3 et 4 (pour « signal transducer and activator of transcription » en anglais)<sup>91</sup>. Ces signaux sont normalement induits en réponse à l'IL-6 et 12 et permettent l'activation des facteurs de transcription ROR $\gamma$ t (de l'anglais « RAR-related orphan receptor



gamma ») et T-bet (de l'anglais « T box transcription factor TBX21 ») qui sont respectivement nécessaire à l'établissement du programme génétique de différenciation en Th1 et 17<sup>6</sup> (**Figure 6**).

La différenciation en Th2 semble quant à elle plutôt liée à l'activité de mTORC2. En effet, la délétion de RICTOR (conduisant à une perte d'activité du complexe mTORC2) empêche la différenciation en Th2<sup>91,92</sup> et est associée à une diminution du signal STAT6. Ce signal est normalement induit par l'IL-4 et est nécessaire à l'activation du facteur de transcription GATA-3 (de l'anglais « Trans-acting T-cell-specific transcription factor ») responsable de la différenciation en Th2<sup>6</sup> (**Figure 6**).

Le lien qui pourrait exister entre activité mTOR et signaux STAT serait via les protéines SOCS (pour « suppressor of cytokine signaling » en anglais) dont le rôle est d'inhiber les signaux STAT<sup>6</sup>. En effet, certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'activité de mTORC1 pourrait permettre l'inhibition de SOCS 3, inhibiteur des signaux STAT 3 et 4, tandis que mTORC2 serait plutôt à l'origine de l'inhibition de SOCS 5, contrôlant le signal STAT 6. De cette manière l'activité des complexes mTORC1 et 2 seraient indirectement liée à l'activation des facteurs de transcription ROR $\gamma$ t, T-bet et GATA3 et donc à la différenciation en Th17, 1 et 2<sup>48</sup> (**Figure 6**).



**Figure 6 : mTORC1 et 2 participent à la différenciation des lymphocytes T helper (Th).** L’activation du complexe mTORC1 pourrait conduire (pointillés rouges) à une diminution de SOCS 3. L’inhibition de SOCS 3 conduirait alors à une augmentation de l’activité des voies STAT 3 et 4 qui sont à l’origine de l’induction des facteurs de transcription T-bet et ROR $\gamma$ t, nécessaires respectivement à la différenciation en Th1 et 17. En parallèle, mTORC2 pourrait (pointillés rouges) inhiber l’activité de SOCS 5 qui contrôle l’activité de STAT 6. Ceci permettrait alors une augmentation de l’activité de STAT 6 et une activation du facteur de transcription GATA3, responsable de la différenciation en Th2. D’après *Powell et al Ann Rev Immunol 2012*.

### 1.5.2. Voie AMPK et fonction mémoire

La phase de contraction et d’établissement de la mémoire immunitaire constitue une des phases les plus remarquables de la réponse T. Cette période correspond au moment où le pathogène a quasiment été éliminé par le système immunitaire et va donc de pair avec la résolution de l’inflammation et la fin de la réponse T. Pour le lymphocyte T, cette période se traduit par une diminution des signaux d’activation (TCR, CD28 ou cytokines) et peut être vue comme une période de transition où seuls les plus adaptés à ce contexte survivront. Vu sous cet angle, cela peut correspondre à une époque de stress qui va nécessiter une adaptation métabolique forte pour survivre et faire partie des rares cellules à devenir mémoires. La voie AMPK semble alors être déterminante pour la survie du lymphocyte T mémoires.

Ce phénomène d’adaptation métabolique est bien décrit chez les lymphocytes T CD8. Plusieurs travaux ont pu montrer que le lymphocyte T CD8 mémoire possède une capacité d’OXPHOS

plus forte que le CTL via une FAO et une activité AMPK plus importante (**Figure 7**). Les premières observations de ce phénomène sont venues des travaux de Pearce et al., qui étudiaient le rôle de TRAF6 (de l'anglais « tumour necrosis factor receptor-associated factor 6 ») dans l'établissement de la mémoire CD8, et de Akari et al., qui s'intéressaient à l'effet de la rapamycine sur ce même processus.

Pearce et al ont pu mettre en évidence que la délétion de TRAF6 induisait une forte réduction de la différenciation en lymphocyte T mémoires et que celle-ci était associée à une diminution de la FAO et de l'activité AMPK. L'utilisation de la metformine, un activateur indirect de l'AMPK, permettait alors de restaurer la FAO et de rétablir le phénotype mémoire<sup>93</sup>. De leur côté, Akari et al. ont observé que le traitement de souris en phase de fin d'infection avec de la rapamycine permettait d'augmenter la réponse CD8 mémoire de manière quantitative et qualitative<sup>94</sup>.

Une piste mécanistique a ensuite été amenée par Rao et al. qui ont pu montrer que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine permettait l'inactivation de T-bet, nécessaire à la différenciation en CTL, et l'induction d'Eomes (de l'anglais « eomesodermin »), crucial pour le passage vers un phénotype mémoire<sup>89</sup> (**Figure 7**). Des études antérieures avait déjà montré l'importance d'Eomes dans l'induction du récepteur à l'IL-15<sup>95</sup> et des travaux récents ont pu montrer que cette cytokine induit une augmentation de l'expression de CPT1 et une induction de la FAO chez le lymphocyte T CD8 mémoire<sup>96</sup>.

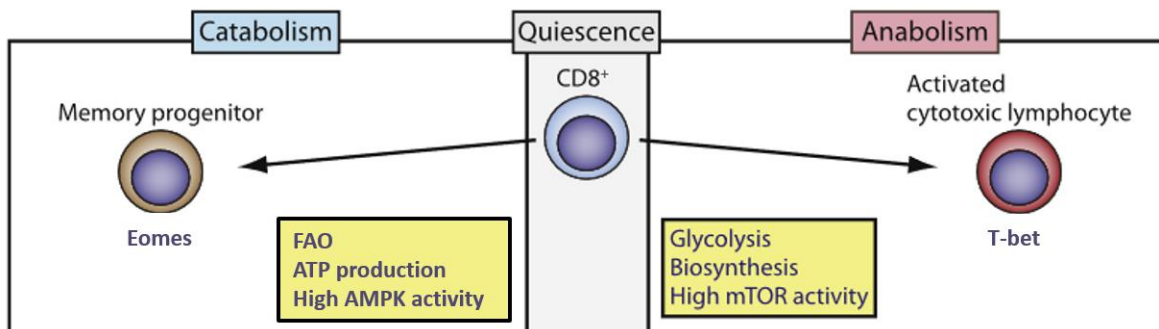
L'ensemble de ces données mène donc au modèle suivant. Lors de la phase de contraction de la réponse immune, la diminution des signaux de stimulation entrainerait une diminution de l'activité mTOR au sein du CTL. Cette perte d'activité mTOR conduirait à une diminution de l'activation de T-bet au profit de celle d'Eomes permettant alors l'expression du récepteur à l'IL-15. Cette sensibilité nouvelle du CTL envers l'IL-15 induirait alors un retour vers un métabolisme de type catabolique, sous la forme de FAO, dépendant de l'AMPK. Ce métabolisme générant de l'ATP en grande quantité garantirait alors la survie et la robustesse du lymphocyte T CD8 à long terme et ainsi permettrait sa fonction mémoire en cas de nouvelle stimulation (**Figure 7**).

Une question subsiste néanmoins quant à ce modèle. Quel pourrait être le facteur dictant l'induction de ce shift catabolique dans un CTL plutôt qu'un autre ? En effet, on observe que seule une infime partie de l'ensemble des CTL survie à la phase de contraction. Des indices ont

été apportés par des études récentes qui montrent qu’il existerait un avantage sélectif pour le CTL développant une activité AMPK précoce et que celui-ci pourrait être défini dès les premières divisions cellulaires du lymphocyte T CD8 activé.

Dans leur travaux Verbist et al. ont observé que la première division du lymphocyte T activé est asymétrique et quelle induit une ségrégation préférentielle de C-MYC et une activation plus forte de mTOR dans la cellule la plus proximale à la CPA<sup>97</sup>. La cellule distale alors moins glycolytique pourrait ainsi être plus sensible à un shift catabolique médié par l’AMPK.

Le signal CD28 semble également impliqué dans la mise en place de cette empreinte mémoire précoce. En effet, Geltink et al. ont observé que ce signal de co-stimulation induit une expression de CPT1 et une induction de la FAO associé à une remodelage à la fois du réseau et de la structure interne des mitochondrie<sup>98</sup>. Ce programme pourrait être soutenue par l’AMPK qui confèrerait un avantage sélectif au lymphocyte T CD8 mémoire, permettant ainsi sa survie lors de la baisse des signaux de stimulation pendant le phase de contraction<sup>99</sup>.



**Figure 7 : La mémoire T CD8 est associée à un métabolisme de type catabolique.** Contrairement au lymphocyte T cytotoxique (CTL) qui est tourné vers un métabolisme de type anabolique favorisé par mTOR, le précurseur CD8 mémoire possède un métabolisme de type catabolique favorisé par l’AMPK. Ce type de métabolisme permet la production d’ATP en grande quantité et donne un avantage sélectif au précurseur CD8 mémoire lors de la phase de contraction en fin de réponse T. Adapté de *Powell et al Immunity 2010*.

## 1.6. Résumé du premier chapitre

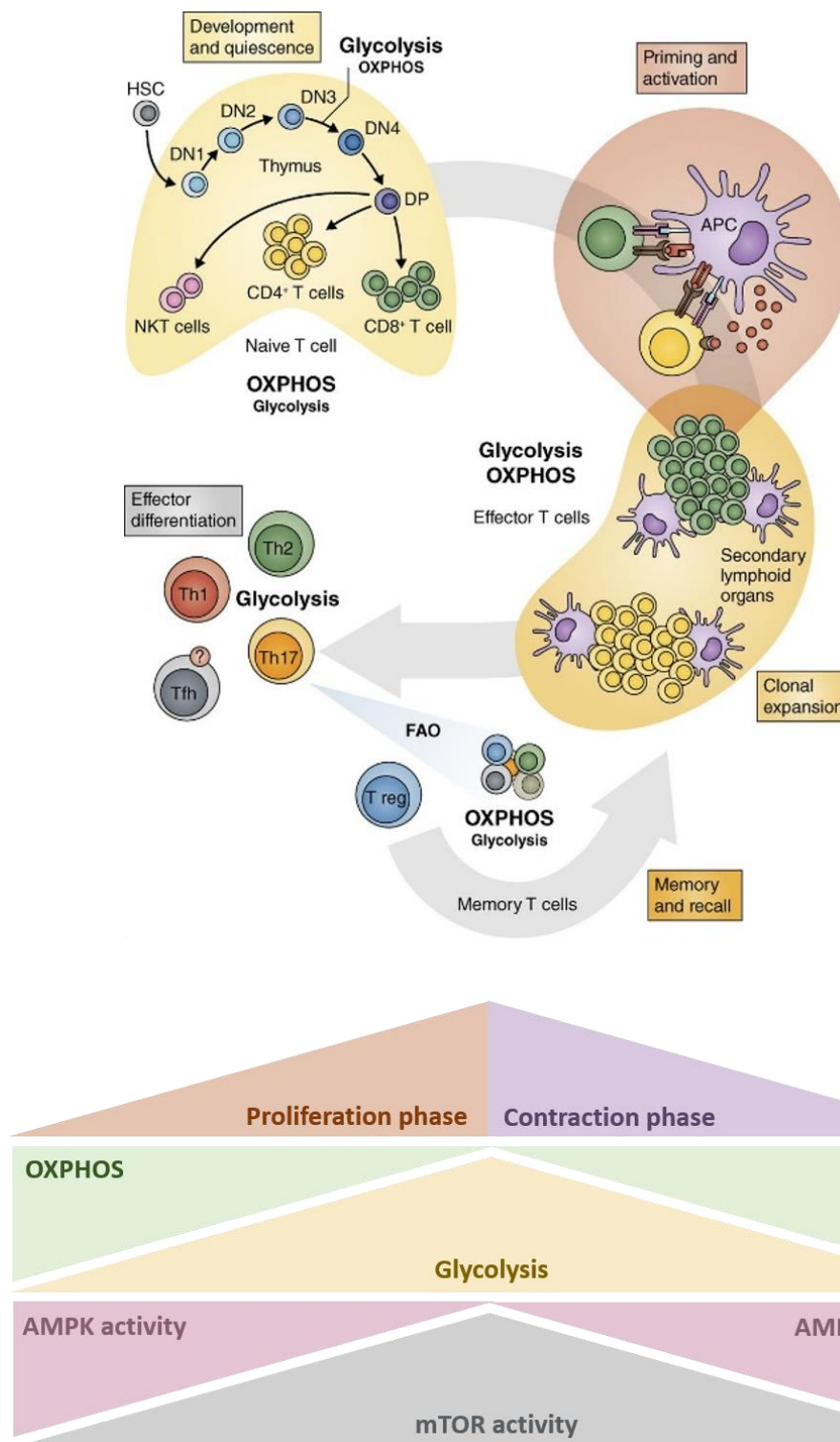
L'ensemble des données existant sur le rôle du métabolisme au cours de la réponse T permet d'établir un modèle complexe impliquant plusieurs flux métaboliques et voies de signalisation.

Après son développement thymique, le lymphocyte T naïf est caractérisé par une prolifération faible. Son métabolisme est catabolique et est basé sur l'utilisation de l'O<sub>2</sub>PHOS pour la production d'ATP à partir de substrats tels que le glucose, la glutamine ou les acides gras. Cette cellule présente une activité AMPK forte qui bride l'activité mTOR et séquestre le lymphocyte T naïf à l'état de quiescence dans le système lymphatique (**Figure 8**).

La stimulation du lymphocyte T suite à la présence d'un pathogène va cependant changer drastiquement la situation. Elle provoque une sur-activation de la voie mTOR qui prend le pas sur la voie AMPK. Un shift vers une glycolyse accrue et l'anabolisme s'opère alors sous le contrôle de mTOR afin de produire de la biomasse au détriment de l'ATP. Cette forte activité mTOR et le métabolisme anabolique qui s'en suit permet la prolifération intensive et la sortie du lymphocyte T activé hors du système lymphatique pour aller rejoindre le site enflammé. La cellule s'enfonce alors vers l'anabolisme afin de poursuivre sa maturation nécessaire à l'établissement de sa fonction complète (**Figure 8**).

Cette situation d'abondance de signaux de stimulation ne dure cependant pas pour le lymphocyte T activé. Lorsque la réponse T se termine et que le pathogène est éliminé, on observe une forte mortalité des lymphocytes T activés. Néanmoins une partie de ceux-ci parviennent à échapper à l'apoptose grâce à une réactivation de la voie AMPK qui permet un retour à l'O<sub>2</sub>PHOS et au catabolisme. L'inhibition de mTOR ramène alors ces cellules expérimentées au sein du système lymphatique. Ces cellules, robuste métaboliquement, seront armées en cas d'une nouvelle stimulation et constituent ainsi le pool de lymphocyte T mémoires (**Figure 8**).

Ainsi, ce modèle met en avant une dynamique très forte du métabolisme cellulaire au cours de l'activation du lymphocyte T, néanmoins, une population de cellules particulière pourrait avoir des caractéristiques métaboliques spécifiques, il s'agit des lymphocytes T régulateurs Foxp3+.



**Figure 8 : La réponse T est intimement liée au métabolisme cellulaire.** Le lymphocyte T naïf est caractérisé par une oxydation phosphorylative (OXPHOS) forte au détriment de la glycolyse et présente une activité AMPK forte. L’activation du lymphocyte T induit une forte activité mTOR qui se traduit par un shift métabolique en faveur de la glycolyse. Lors de la phase de contraction, les lymphocytes T ayant maturés sont presque entièrement glycolytiques et souffrent d’une forte mortalité. Une petite partie d’entre eux parvient néanmoins à survivre en réactivant le programme OXPHOS via l’AMPK. Adapté de *Buck, Sullivan and Pearce JEM 2015*.



## 2. Biologie des lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent un sous type particulier de lymphocyte T CD4 capable de réguler l'activité des autres lymphocytes T conventionnels (Tconv)<sup>100</sup>. La découverte de ces cellules régulatrices dans les années 70 s'est d'abord faite par la mise en évidence de leur fonction. Des expériences de thymectomie chez de jeunes souris et des rats adultes ont permis de mettre en évidence l'existence d'une population de thymocytes capable d'inhiber les réponses immunes<sup>101-104</sup>. Plusieurs études ont ensuite été menées afin de découvrir les marqueurs moléculaires associés à ces cellules régulatrices. Trente années auront été nécessaires afin de déterminer les marqueurs de l'identité Treg<sup>105-108</sup>. Ces marqueurs varient entre la souris et l'homme mais il est communément admis que les Treg expriment fortement la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) et le facteur de transcription Foxp3 (de l'anglais «forkhead box P3 »). Ce facteur de transcription semble être plus qu'un simple marqueur pour les Treg et est décrit comme le gène à l'origine de leur genèse. En effet, une mutation invalidant Foxp3 a pour conséquence la disparition des Treg et la survenue d'un syndrome auto-immun généralisé chez la souris et l'homme<sup>109,110</sup>. Ces observations démontrent bien le rôle essentiel des Treg dans la maîtrise de l'activation du système immunitaire et donc dans la protection contre les pathologies auto-immunes. Bien que non traités dans ce travail, d'autres cellules ont également été décrites comme ayant des propriétés régulatrices, telles que les cellules myéloïdes suppressives, les cellules régulatrices de type 1 ou les Treg CD8<sup>+111-113</sup>.



## 2.1. Ontogénèse

Bien qu'originellement décrits dans le thymus, les Treg semblent avoir plusieurs origines possibles et peuvent également se développer en dehors du thymus, à la périphérie. Cette dichotomie en termes de provenance a conduit la communauté scientifique à définir 2 populations de Treg, les Treg d'origine thymique (tTreg) et les Treg induit à la périphérie (pTreg)<sup>100</sup>.

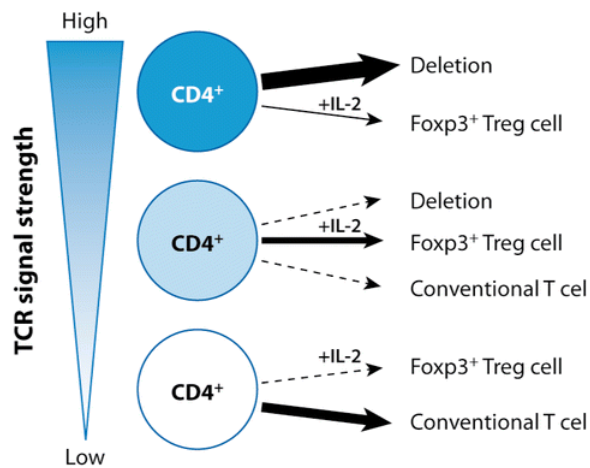
### 2.1.1. Origine thymique

Les premières expériences de thymectomie mettant en évidence l'existence des Treg suggèrent un rôle du thymus dans le développement de ces cellules. Cet organe est le chef lieu de la tolérance centrale. En effet, il permet la délétion de lymphocytes T possédant un TCR réagissant contre des molécules de l'organisme (le SOI) et donc potentiellement auto-réactif. De manière intéressante les Treg semblent échapper partiellement à cette sélection thymique et parviennent à sortir du thymus malgré leur spécificité pour le SOI<sup>6</sup>. Cet échappement à la sélection négative thymique pourrait être lié à plusieurs signaux provenant du TCR et de certaines cytokines.

Plusieurs travaux ont montré un rôle crucial de l'interaction TCR-CMH2-peptide du SOI dans le développement des tTreg. Les premiers indices viennent des études ayant permis la caractérisation moléculaire du phénotype Treg<sup>105-108</sup>. En effet, ces travaux ont pu montrer une expression préférentielle des molécules CD5, CTLA-4 (pour « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » en anglais) et CD25 par les Treg, or ces molécules sont induites par un signal TCR fort<sup>114,115</sup>. D'autre part l'étude de Jordan et al. a montré que des Treg possédant un TCR transgénique n'étaient capables de se développer et de sortir du thymus uniquement si le peptide complémentaire y était exprimé<sup>116</sup>. Le signal de co-stimulation CD28 semble également jouer un rôle non négligeable dans le processus de différenciation des tTreg. En effet, les travaux de Tai et al et de Salomon et al. ont pu montrer que le signal CD28 est nécessaire pour l'induction de l'expression de Foxp3 chez le précurseur thymique et que la déficience pour cette molécule induit une forte diminution de la proportion de tTreg<sup>117,118</sup>.

Une question découle alors de ces observations. Comment concilier la génération de tTreg suite à un signal TCR fort alors que ce même signal induit la mort des autres précurseurs thymiques ? Une explication pourrait venir des travaux de Hinterberger et Ouyang. La première équipe a pu

montrer qu'une diminution artificielle de la sélection négative thymique par réduction de la quantité de CMH2 présent sur les APC du thymus conduisait à une augmentation de la production de tTreg<sup>119</sup>. Parallèlement à cela, une augmentation de la sévérité de la sélection négative par délétion du récepteur au TGFβ sur les précurseurs thymiques induisait une diminution de la production de tTreg<sup>120</sup>. Il semblerait ainsi, selon plusieurs auteurs, que l'induction du programme Treg sur un précurseur thymique se fasse à un certain niveau de stimulation TCR, juste en deçà d'une stimulation trop forte conduisant à la mort<sup>100</sup> (**Figure 9**).



**Figure 9 : L'intensité du signal TCR reçue par le précurseur thymique dicte sa destinée.** Un signal suffisant permettra au précurseur d'échapper à la mort et de se différencier en lymphocyte T conventionnel. Un signal TCR plus fort augmentera la probabilité pour le précurseur thymique d'induire l'expression de Foxp3 et de se différencier en lymphocyte T régulateur. Le précurseur thymique ne doit cependant pas aller au-delà d'une intensité de signal TCR à partir de laquelle la probabilité d'induction de Foxp3 diminue au profit d'une délétion par apoptose. D'après *Josefowitz et al. Annu Rev Immunol 2012*.

La stimulation TCR ainsi induite semble engager un programme spécifique au sein du précurseur Treg. En effet, cette stimulation conduit à l'activation du facteur de transcription NFκB<sup>121</sup> dont la sous unité c-Rel se fixe sur la séquence conservée non codante (CNS) 3 du locus de Foxp3. Cette fixation permet d'augmenter l'accessibilité au promoteur de Foxp3 et pourrait donc faciliter l'induction de Foxp3 chez le précurseur Treg<sup>122-124</sup>.

D'autre part, l'induction de l'expression du CD25 par le signal TCR augmente la sensibilité du précurseur Treg à l'IL-2. En effet, la délétion de l'IL-2 chez la souris induit une diminution de 50% du pool de Treg<sup>125</sup>. Ce signal IL-2 pourrait lui aussi permettre l'augmentation de l'expression de Foxp3 et sa « consolidation » par un mécanisme dépendant de STAT 5. En effet, STAT 5 est induit en réponse à l'IL-2 et est capable de se fixer au CNS2 ainsi qu'au promoteur du locus de Foxp3<sup>126</sup>.

Plusieurs auteurs suggèrent ainsi un modèle de différenciation des tTreg en 2 temps. Dans un premier temps, l'interaction TCR-CMH2-peptide du soi induirait un fort signal TCR chez le précurseur Treg. Ce signal, au lieu d'induire la mort de la cellule, conduirait à une activation de NFkB qui permettrait un premier déverrouillage de l'expression de Foxp3. Le signal STAT-5 ensuite induit par la fixation de l'IL-2 sur le CD25 permettrait alors l'induction complète de l'expression de Foxp3 et la mise en place du programme régulateur.

De manière intéressante, une étude menée récemment par l'équipe de Sakaguchi suggère que des événements en amont de l'établissement de l'expression de Foxp3 pourraient être à l'origine du programme génétique spécifique aux Treg. En effet, ces travaux ont pu montrer que la protéine Satb1 (en anglais « special AT-rich sequence-binding protein-1 ») permet l'activation au sein du précurseur Treg de régions d'ADN spécifiques appelées « super enhancer ». L'activation de ces « super enhancer » semble être responsable du programme Treg étant donné qu'elle corrèle avec la transcription de certains gènes caractéristiques tels que *Ctla4*, *Il2ra* et même *Foxp3*. Selon ces auteurs, Foxp3 ne serait ainsi pas nécessaire pour la mise en place du programme Treg mais plutôt pour son renforcement après que celui-ci ait été établi par les « super enhancer »<sup>127</sup>.

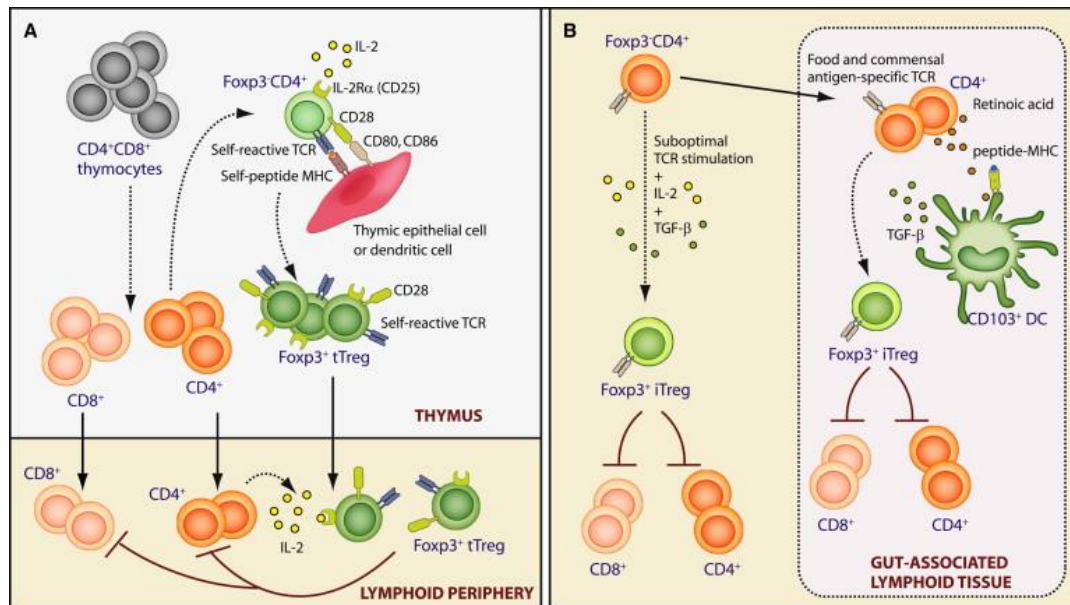
### 2.1.2. Origine périphérique

Bien que la majorité du pool Treg soit d'origine thymique, il a été observé qu'une partie de ce pool semblait provenir de la différenciation de Tconv en Treg à la périphérie. Cette proportion de pTreg est non négligeable, notamment dans les tissus lymphoïdes associés au tube digestifs tels que les plaques de Peyer ou la lamina propria<sup>128</sup> (**Figure 10**).

Contrairement aux tTreg, la spécificité du TCR des pTreg ne semble pas dirigée envers des peptides du SOI. En effet, l'étude de Lathrop et al. a pu montrer que le répertoire TCR des Treg colonisant le colon était différent de celui de Treg des autres organes lymphoïdes et que celui-ci était dirigé contre des peptides issus de la flore commensale<sup>128</sup>. De plus, cette population de Treg se trouve fortement diminuée chez des souris dénuées de flore commensale tandis que l'ajout d'un cocktail bactérien permet restaurer leur nombre au niveau du colon<sup>129</sup>. Bien que non spécifique du SOI, le TCR du précurseur pTreg semble toutefois induire une forte signalisation intracellulaire capable d'induire l'expression de Foxp3<sup>130</sup>. Ce fort signal TCR n'est cependant pas couplé à une forte co-stimulation CD28, comme dans le thymus, mais est plutôt associé au signal CTLA-4, produisant une co-stimulation plus faible<sup>131</sup> (**Figure 10**).

Le TGF $\beta$  est un autre agent facilitant l'expression de Foxp3 chez le précurseur pTreg. En effet, de nombreux travaux décrivent cette cytokine comme essentielle dans l'induction de l'expression de Foxp3 chez le Tconv, à la fois in vitro et in vivo<sup>132-134</sup>. Mécaniquement, la fixation du TGF $\beta$  à son récepteur permet l'induction de Smad3 (de l'anglais « mothers against decapentaplegic homolog 3 ») qui participe avec NFAT à l'augmentation de l'expression de Foxp3 via une fixation sur le CNS 1 du locus<sup>135</sup>. L'action de l'IL-2 est néanmoins nécessaire pour compléter celle du TGF  $\beta$  car elle permet de contrer une différenciation en Th17 dans le cas où de l'IL-6 serait présent dans le milieu<sup>136</sup>. En effet, en présence de cette cytokine, le signal TGF $\beta$  est également décrit comme induisant une différenciation en Th17 (cf partie 1.4.1).

La différenciation préférentielle des pTreg au niveau des organes lymphoïdes associés au tube digestif ne semble pas uniquement due au fait que ceux-ci présente une plus grande quantité de peptide d'origine commensale. En effet, ces organes lymphoïdes sont riches en cellules dendritiques (DC) exprimant le CD103. Ces cellules permettent la présentation du peptide commensal au précurseur pTreg et sont également à l'origine de la production de TGF $\beta$  et d'acide rétinoïque en grande quantité<sup>137</sup> (**Figure 10**). De manière intéressante, l'engagement de l'acide rétinoïque avec son récepteur induit une fixation de celui-ci à la région CNS1 de Foxp3<sup>138</sup>. Cette molécule participe ainsi également à la différenciation du précurseur pTreg.

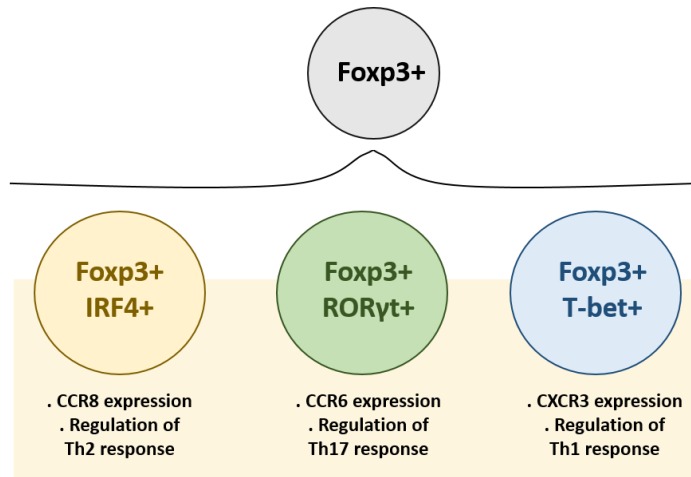


**Figure 10 : Les Treg peuvent avoir une origine thymique (tTreg) ou périphérique (pTreg).** Les tTreg se différencient au niveau du thymus via une interaction TCR-CMH2-peptide du SOI forte, une co-stimulation CD28 forte et en présence d'IL-2. Les pTreg (ici nommés iTreg selon l'ancienne nomenclature) possèdent quant à eux un TCR spécifique de peptides issus de bactéries commensales et se différencient suite à une co-stimulation plus faible via CTLA-4 en présence de TGFβ. Cette différenciation se fait préférentiellement au niveau des tissus lymphoïdes associés au tube digestif grâce à la présence de cellules dendritiques (DC) CD103+ produisant du TGFβ et de l'acide rétinoïque en grande quantité. D'après *Josefowicz and Rudensky Immunity 2009*.

### 2.1.3. Plasticité et stabilité du phénotype régulateur

L'expression de Foxp3 induit un programme génétique complexe au sein de la cellule. Ce facteur de transcription est capable de s'associer avec de nombreux partenaires et régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune, notamment par son impact sur l'épigénétique, la transcription d'ARN interférant ou par contact direct<sup>100</sup>. Le phénotype régulateur ainsi établi démontre néanmoins une certaine plasticité.

Plusieurs études ont montré que les Treg sont capables de co-exprimer Foxp3 avec d'autres facteurs de transcription impliqués dans la différenciation en Th 1, 17 ou 2 tels que T-bet, RORγt ou IRF4 (de l'anglais « interferon regulator factor 4 »)<sup>139-141</sup>. En effet, il semblerait que les loci de ces gènes ne soient pas complètement réprimés dans les Treg<sup>142</sup>. Cette expression des différents facteurs de transcription de Th permettrait au Treg de s'adapter au type d'inflammation à réguler. Il pourrait ainsi suivre sa cible Th1, 2 ou 17 et se rendre au site enflammé, notamment via l'expression de récepteurs aux chimiokines, tels que le CXCR3, le CCR8 ou le CCR6<sup>139-141</sup> (**Figure 11**).



**Figure 11 : Plasticité du phénotype régulateur.** Le phénotype Treg possède une certaine souplesse et permet l’expression simultanée de Foxp3 et d’autres facteurs de transcription impliqué dans le développement des lymphocytes T helper (Th). On observe ainsi des Treg Foxp3+ IRF4+ exprimant le CCR8, des Treg Foxp3+ RORγt+ exprimant le CCR6 et des Treg Foxp3+ T-bet+ exprimant le CXCR3. Grâce à ces récepteurs aux chimiokines, les Treg peuvent suivre leur cible au site enflammé et réguler de manière spécifique une réponse Th par rapport à une autre. Inspiré de *Josefowitz et al. Annu Rev Immunol 2012*.

Cette acquisition partielle de fonction effectrice par les Treg pourrait cependant avoir des conséquences négatives dans le cas où ces cellules perdraient l’expression de Foxp3 et donc leur phénotype régulateur. En effet, une proportion importante de ces cellules possède un TCR ayant forte affinité pour le SOI et pourrait alors se retourner contre l’organisme et déclencher une réponse auto-immune. Plusieurs verrous moléculaires semblent avoir été mis en place afin de prévenir ce genre de situation en maintenant l’expression de Foxp3 de manière stable.

Les travaux de Zheng et al. ont apporté des indices quant à la chronologie de l’expression de Foxp3 ainsi qu’à son verrouillage stable au cours de la différenciation du Treg. L’expression de Foxp3 est régulée par des modifications épigénétiques des trois régions CNS du locus du gène. Il semblerait qu’un des premiers événements permettant l’expression de Foxp3 soit l’ouverture de la région CNS3 via l’action de c-Rel (décrite dans la partie précédente). Cette première expression serait alors suivie d’une déméthylation active de la région CNS2. Une fois déméthylée, cette région serait capable de recruter Foxp3 lui-même et permettrait l’auto-amplification du gène. Ce processus pourrait ainsi permettre l’héritabilité de l’expression de Foxp3 aux Tregs produits lors des divisions cellulaires ultérieures<sup>143</sup>. En effet, les mêmes auteurs ont montré que la délétion du CNS2 n’avait aucun impact sur l’induction de l’expression de Foxp3 mais conduisait à une perte de son expression au cours des divisions cellulaires. La région CNS2 constitue donc un point clé du maintien de la stabilité de l’expression de Foxp3

et donc du phénotype régulateur. La région CNS1, quant à elle, serait plutôt impliquée dans la génération des pTreg de par sa sensibilité au TGF $\beta$  et aux facteurs Smad3 et NFAT<sup>135</sup>.

De manière intéressante, il a été constaté que l'état de méthylation de la région CNS2 n'est pas équivalent entre les tTreg et les pTreg. En effet, cette région n'est que partiellement déméthylée dans les pTreg et est associée à une stabilité plus faible de Foxp3 comparativement aux tTreg<sup>144</sup>.

Des cas de perte de stabilité des Treg ont été rapportés par plusieurs équipes. L'étude de Zhou et al. a mis en évidence qu'une proportion non négligeable de Treg peut perdre l'expression de Foxp3, produire de l'IFN $\gamma$  et devenir pathogénique<sup>145</sup>. D'autre part les travaux de Duarte et al. ont montré que, dans des conditions de lymphopénie sévère, environ 50% des Treg perdaient Foxp3 et n'étaient plus capable d'exercer leur fonction régulatrice<sup>146</sup>. Une série d'études a également décrit une conversion possible de Treg en Th17 après une stimulation continue avec de l'IL-6<sup>147,148</sup>.

Il semblerait donc que le verrou du CNS2 ne soit pas toujours suffisant pour maintenir la stabilité du phénotype régulateur. Hori propose ainsi un modèle où les Treg pourraient être vus comme une population hétérogène en termes de stabilité. En effet, cette équipe a pu constater que les Treg expriment différents niveaux de CD25 et que les Treg CD25<sup>faible</sup> sont plus sensibles à la perte de Foxp3 en condition lymphopénique que les Treg CD25<sup>fort</sup><sup>149</sup>.



## 2.2. Fonction régulatrice

L'établissement du programme génétique régulateur au sein du Treg va ainsi permettre à ces cellules d'établir leur fonction, essentielle au maintien de la tolérance immunitaire. Cette fonction régulatrice peut se faire via une sécrétion de cytokines inhibitrices, une cytolysse, par perturbation métabolique ou via le ciblage des DC.

### 2.2.1. Cytokines inhibitrices

L'action régulatrice des Treg sur les Tconv peut se faire à distance via la production de cytokines. Ce mécanisme de suppression a été étudié extensivement et est l'un des mieux documentés. Il faut à ce jour intervenir 3 cytokines qui sont l'IL-10, le TGF $\beta$  et l'IL-35.

L'importance du rôle régulateur de l'IL-10 a été mise en évidence pour la première fois en 1993 par les travaux de Kühn et al. qui avaient observé que des souris déficientes pour cette cytokine développaient une inflammation importante de l'intestin<sup>150</sup>. Quinze ans plus tard, l'importance de la production de cette cytokine régulatrice par les Treg était mise en évidence par une étude montrant que la délétion spécifique de l'IL10 dans les Treg conduisait à une inflammation du poumon, du colon et de la peau<sup>151</sup>. L'effet régulateur des Treg médié par l'IL-10 a également été montré dans des modèles de cancer, d'asthme ou de tolérance materno-fœtale<sup>152-154</sup>. Le mécanisme d'action de l'IL-10 semblerait être lié à une inactivation des DC et à l'induction d'un phénotype tolérogène sur ces cellules<sup>155</sup>. De plus, l'exposition de Tconv à cette cytokine induit une forte production d'IL-10 par ces cellules permettant ainsi une amplification progressive de l'effet régulateur de l'IL-10<sup>112</sup> (**Figure 12**).

Le TGF $\beta$ , décrit précédemment comme nécessaire à la différenciation des pTreg, a lui aussi été décrit comme une cytokine immunosuppressive. Les premières observations du pouvoir régulateur de cette molécule sont venues de l'étude de Shull et al. Cette équipe a pu montrer que la délétion du TGF $\beta$  chez la souris induisait un syndrome auto-immun majeur, comparable à celui observé dans les souris déficientes pour Foxp3 (Scurfy)<sup>156</sup>. D'autres travaux ont ensuite montré l'importance du TGF $\beta$  dans la fonction suppressive in vitro et in vivo des Treg<sup>157,158</sup>. L'action du TGF $\beta$  ne semble néanmoins pas se faire uniquement à distance. En effet, les travaux de Nakamura et al. ont pu montrer que les Treg expriment une grande quantité de TGF $\beta$  à leur surface et que celui-ci contribue à la fonction suppressive par contact direct entre les cellules<sup>159</sup>.



Cependant, la présence du TGF $\beta$  à la surface du Treg ne signifie pas obligatoirement une activité biologique de la cytokine. En effet, plusieurs études moléculaires ont pu montrer que le TGF $\beta$  est exprimé sous forme latente à la surface du Treg, notamment grâce à la protéine d'encrage GARP (pour « glycoprotein A repetitions predominant » en anglais). Cette protéine d'encrage permet le transport du TGF $\beta$  latent depuis le réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique où des intégrines permettront sa séparation de GARP, son activation complète et son relargage<sup>160</sup>. La structure moléculaire du complexe GARP-TGF $\beta$  a récemment été élucidée par le laboratoire de Lucas apportant ainsi une représentation 3D de la séquestration du TGF $\beta$  par GARP et de l'accès laissé pour l'interaction avec l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 8<sup>161</sup>. Une fois activé, le TGF $\beta$  peut alors induire la différenciation des Tconv en pTreg (comme décrit dans la partie 2.1.2) et permet ainsi d'augmenter le pool de Treg total et a fortiori l'inhibition de l'inflammation (**Figure 12**).

La dernière cytokine en date à avoir été identifiée comme impactant la fonction régulatrice des Treg est l'IL-35. Cette cytokine est constituée de 2 sous unités, l'Ebi3 (de l'anglais « Epstein-Barr virus induced gene 3 ») et p35 (aussi connue sous le nom d'IL-12 $\alpha$ ). Il a été observé que ces deux sous unités sont fortement exprimées par les Treg et que ceux-ci produisent de l'IL-35 en grande quantité. Cette cytokine semble avoir un rôle non négligeable dans la fonction suppressive des Treg étant donné que sa délétion dans ces cellules induit une forte diminution de leur potentiel suppressif in vitro et in vivo<sup>162</sup> (**Figure 12**).

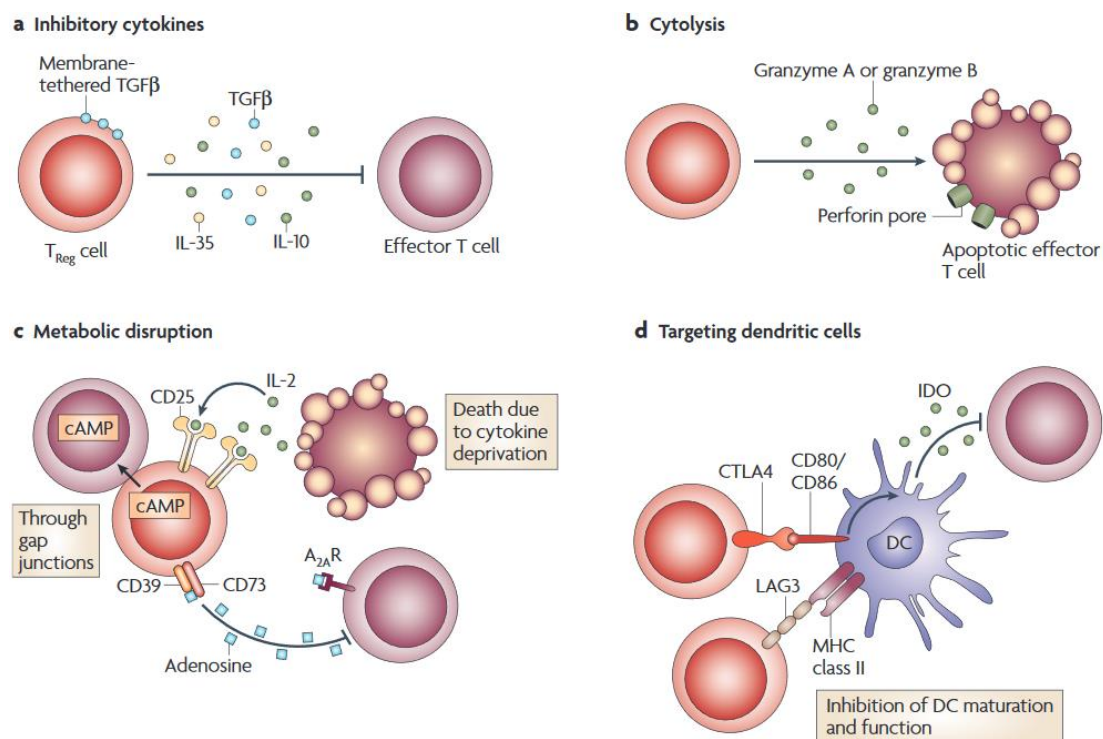
### 2.2.2. Cytolyse

Outre l'utilisation de cytokines pour une action régulatrice à distance des Treg, plusieurs études ont récemment montré que ces cellules étaient capables d'avoir une action directe sur leur cellule cible. Celle-ci semble se faire par un mécanisme de cytololyse, un processus initialement décrit chez les CTL.

Plusieurs travaux effectués au début des années 2000 ont pu démontrer un rôle du système perforine/granzyme dans la fonction régulatrice des Treg. Gondek et al ont pu montrer que des Treg déficients en granzyme exhibaient une fonction suppressive in vitro diminuée. Cette diminution de fonction était associée à une baisse de l'apoptose des Tconv cultivés en présence des Treg déficient en granzyme<sup>163</sup> (**Figure 12**).

Ces résultats paraissent surprenants étant donné qu'une interaction TCR-CMH est normalement nécessaire au fonctionnement du système granzyme/perforine. En effet, cette interaction produit une synapse immune qui permet l'insertion de perforine dans la membrane de la cellule cible afin de permettre l'entrée des granzymes et l'apoptose de la cible<sup>6</sup>. Ce phénomène pourrait être plus visible chez l'homme où une expression du CMH2 a été décrite sur les Tconv, ce qui n'est pas le cas chez la souris.

Il existe néanmoins d'autres cellules immunitaires exprimant le CMH2 et donc potentiellement ciblées par une action lytique des Treg. En effet, les Treg semblent capables d'induire la mort de lymphocytes B, un autre acteur de la réponse adaptative exprimant le CMH2, in vitro par l'utilisation du système perforine<sup>164</sup>. Les DC expriment également le CMH2 et il a été montré par Boissonnas et al. que les Treg sont capables d'induire leur mort par apoptose via des perforines<sup>165</sup>. La délétion de ces deux types d'APC pourrait ainsi conduire à une réduction des signaux d'activation disponible pour les Tconv et donc à une baisse de leur activité.



**Figure 12 : Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs.** Les lymphocytes T régulateurs (Treg) peuvent exercer leur fonction régulatrice par divers mécanismes qui peuvent être classés en 4 grands groupes : la sécrétion de cytokines inhibitrices, qui vont inhiber la fonction des lymphocytes T conventionnels (Tconv), la cytolysse, qui va conduire à la mort par apoptose des Tconv, la perturbation métabolique, qui prive les Tconv des facteurs nécessaires à leur prolifération et le ciblage des cellules dendritiques (DC) qui conduit à une diminution des signaux de stimulation accessibles pour les Tconv. D'après *Vignali et al Nature review 2008*.

### 2.2.3. *Perturbation de l'environnement*

Une autre fonction régulatrice remarquable des Treg réside dans le fait que ces cellules semblent capables de priver les Tconv de certaines molécules nécessaires à leur prolifération ou leur fonction. Cette perturbation de l'environnement peut se faire par la consommation et la monopolisation de l'IL-2 présent dans le milieu, par la dégradation d'ATP extracellulaire ou par la sécrétion de différents facteurs.

L'IL-2 est une cytokine essentielle pour les lymphocytes T activés, aussi bien pour les Tconv que pour les Treg<sup>6</sup>. Cependant, contrairement aux Tconv, les Treg ne sont pas capables de produire cette cytokine et semblent développer une forte dépendance à l'IL-2. En effet, des souris déficientes pour le CD25 développent une inflammation du colon qui peut être régulée par l'injection de Treg<sup>166</sup>. De plus, la neutralisation de l'IL-2 induit une inflammation du colon chez la souris qui corrèle avec une diminution spécifique des Treg<sup>167</sup>.

Il semblerait ainsi que l'expression du CD25 et la présence d'IL-2 soient essentielles pour le maintien d'un pool de Treg fonctionnels. Le fait que ce pool soit fortement dépendant d'une cytokine qu'il n'est pas capable de produire laisse à penser qu'il pourrait agir comme un puit captant tout l'IL-2 autour de lui, privant alors les Tconv de ce facteur. Deux observations corroborent cette hypothèse et proviennent des travaux de Pandiyan et al. et de Thornton et al.

La première équipe a observé que la culture de Tconv avec des Treg conduisait à une quantité moindre d'IL-2 dans le milieu sans modifications de la quantité d'IL-2 produite par les Tconv<sup>168</sup>. Les seconds travaux ont démontré que l'ajout d'IL-2 dans la co-culture rendait les Tconv insensibles à la suppression par les Treg<sup>169</sup>. Les Treg semblent donc être capables d'induire une pénurie d'IL-2 dans leur milieu environnant ce qui conduit à une diminution de la stimulation des Tconv alentours (**Figure 12**).

Comme expliqué dans le premier chapitre de cette introduction, l'ATP constitue une source essentielle d'énergie pour le lymphocyte T activé. Une étude menée par Deaglio et al. a pu montrer que les Treg étaient capables d'agir sur la quantité d'ATP présente dans le milieu environnant.

En effet, ces cellules expriment fortement deux ectoenzymes à leur surface, le CD39 et le CD73, qui sont impliqués dans la dégradation séquentielle de l'ATP en AMP puis en adénosine. De manière intéressante, la même étude a pu montrer que les Tconv activés expriment le récepteur

à l'adénosine et que son engagement induit une diminution de la prolifération des Tconv activés. L'importance de ce mécanisme de régulation a finalement été strictement démontrée par les mêmes auteurs qui montrent que des Treg déficient pour le CD39 présentent une activité suppressive diminuée *in vitro* et *in vivo*<sup>170</sup>. Ainsi, en plus d'influer sur la quantité d'IL-2 disponible dans le milieu, les Treg semblent pouvoir produire des métabolites capables de perturber la prolifération des Tconv (**Figure 12**).

Les prostaglandines font partie de ces métabolites néfastes pour la prolifération des Tconv et peuvent être produit par les Treg dans certains contextes. En effet, il a été montré par Mandapathil et al. que des Treg cultivés en présence de cellules tumorales expriment à leur surface une cyclooxygénase leur permettant de produire des prostaglandines de type E(2). En se fixant sur leurs récepteurs à la surface des Tconv, ces prostaglandines induisent une augmentation d'AMP cyclique au sein des Tconv qui est décrite comme néfaste pour leur activité<sup>171</sup>. En effet, une trop forte concentration intra cellulaire d'AMP cyclique induit l'activation du facteur de transcription ICER (de l'anglais « inducible cAMP early repressor ») qui est à l'origine de la répression de la prolifération et de la production de cytokines telles que l'IFN $\gamma$  et l'IL-2<sup>172</sup>.

De manière intéressante, il a été observé que les Treg expriment plus faiblement l'enzyme nécessaire à la dégradation de l'AMP cyclique ce qui conduit à une accumulation de ce métabolite au sein de la cellule. Les travaux de Bopp et al. ont mis en évidence un mécanisme par lequel le Treg parvient à évacuer son excès d'AMP cyclique. Celui-ci ferait intervenir des jonctions GAP qui permettraient au Treg de transférer son surplus d'AMP cyclique vers le Tconv lorsqu'il entre en contact avec lui. De cette manière, l'activation d'ICER et la répression de l'activité cellulaire qui s'en suit se ferait préférentiellement au sein du Tconv<sup>173</sup> (**Figure 12**).

En plus de produire différents métabolites toxiques, les Treg ont récemment été décrit comme étant à même de produire des vésicules extra cellulaires et de les relarguer dans le milieu. Ces vésicules furent observées pour la première fois en 2013 par l'équipe de Smyth et al. qui décrivent une production d'exosomes par des Treg après stimulation TCR. Ces vésicules participaient à la fonction suppressive des Treg via la présence de l'ectoenzyme CD73 à leur surface permettant ainsi une dégradation de l'ATP environant<sup>174</sup>.

De manière intéressante, le contenu de ces exosomes semble également participer à leur effet immuno régulateur. En effet, Okoye et al. ont montré en 2014 que les exosomes sécrétés par les Treg renfermaient des ARN interférents et que la délétion du système de production de ces médiateurs au sein des Treg conduisait à une perte du pouvoir immuno supprimeur des exosomes<sup>175</sup>. Bien que la cible exacte de ces ARN interférents ne soit pas encore connue, il semblerait que les Treg, via la production d'exosomes, soient capable de moduler le profil transcriptomique de leur cible à distance.

#### *2.2.4. Ciblage des cellules dendritiques*

Outre leur impact sur l'environnement cytokinique et métabolique, les Treg sont également capables d'influer sur la quantité de signaux de stimulation disponibles pour les Tconv via un ciblage des DC. En effet, le Treg peut, d'une part, entrer en compétition avec le Tconv pour l'accès aux CMH2 présent sur les DC, et d'autre part, induire une inactivation de celles-ci grâce à son expression du CTLA-4.

Les études visant à caractériser les marqueurs moléculaires des Treg ont conduit à l'identification de la molécule CTLA-4 comme présente à la surface du Treg. Cette molécule est une molécule analogue au CD28 qui entre en compétition avec ce dernier de par sa plus forte affinité pour les ligands de co-stimulation CD80/86 présent à la surface des DC<sup>176</sup>. De cette manière les Treg peuvent monopoliser l'accès aux ligands présent sur la DC au détriment des Tconv qui eux, expriment faiblement le CTLA-4<sup>177</sup>.

La liaison de CTLA-4 avec le CD80/86 induit également un signal au sein de la DC qui va conduire à une modification de son phénotype vers un profil tolérogène. En effet, ce signal induit l'expression de FOXO-3 qui inhibe la production d'IL-6 et de TNF $\alpha$  (de l'anglais « tumor necrosis facteur  $\alpha$  »), deux molécules décrites comme pro-inflammatoires<sup>178</sup>. D'autre part, l'engagement du CD80/86 avec le CTLA-4 augmente l'expression de l'enzyme IDO (pour « indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase » en anglais) au sein de la DC<sup>179</sup>. Cette enzyme est responsable de la dégradation du tryptophane extracellulaire qui conduit à une inhibition de nombreux versants de la réponse immune<sup>180</sup> (**Figure 12**).

Le CTLA-4 semble ainsi être essentiel pour l'action régulatrice des Treg en permettant le ciblage et l'inactivation des DC. Une observation illustrant bien l'importance de cette molécule vient de l'étude Wing et al. qui a montré que la délétion du CTLA-4 au sein des Treg induisait un syndrome auto-immun sévère<sup>181</sup>.

En plus de leur action sur le phénotype des DC, les Treg semblent bénéficier d'un avantage pour l'accès à ces cellules par rapport aux Tconv. Les travaux de Onhishi et al. ont pu montrer que les Treg sont plus mobiles que les Tconv in vitro et qu'ils développent des interactions plus fortes et plus fréquentes avec les DC. Ce phénomène semble dépendant de la protéine LFA1 (de l'anglais « leukocyte function associated antigen 1 ») présente à la surface du Treg étant donné que la délétion de cette protéine réduit fortement l'agrégation des Treg avec les DC<sup>182</sup>.

D'autres molécules exprimées par les Treg semblent également impliquées dans l'accès préférentiel aux DC et à la modification de leur phénotype par les Treg. En effet, Sarris et al. ont mis en évidence le rôle de la neuropiline 1 dans la mise en place d'interactions prolongées entre la DC et le Treg<sup>183</sup>. D'autre part, Liang et al. ont pointé l'importance de la protéine LAG-3 (de l'anglais « lymphocyte activation gene 3 ») dans l'induction du phénotype tolérogène chez la DC par les Treg<sup>184</sup> (**Figure 12**).

Cette description des mécanismes de suppression ne représente pas une liste exhaustive et il existe d'autres moyens d'action utilisés par les Treg qui ne seront pas abordés dans ce rapport.

### *2.2.5 Interaction avec d'autres cellules régulatrices*

Les Treg sont décrits comme étant capables d'interagir avec de nombreux acteurs du système immunitaire, dont d'autres cellules régulatrices, comme les lymphocytes B régulateurs (Breg). Cette population cellulaire a pour la première fois été décrite en 2002, lorsque Mizoguchi et son équipe identifièrent une population de lymphocytes B capables de produire de l'IL-10<sup>185</sup>. Les propriétés immuno-régulatrices de ces cellules furent ensuite établies dans des modèles murins d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), d'asthme, de lupus et d'arthrite<sup>186-189</sup>.

Il n'existe pour l'instant aucun marqueur unique des Breg qui semblent constituer une population très diversifiée. Néanmoins, une caractéristique commune des sous-populations de Breg reste la production d'IL-10 dans laquelle semble résider l'essentiel de leur potentiel immunosuppresseur. De manière intéressante, plusieurs études ont pu montrer que l'IL-10

produit par les Breg est capable d'induire la différenciation des Treg. En effet, les travaux de Flores- Borja et al. ont pu montrer que des Breg issus de patient sains étaient capables d'inhiber la différenciation de lymphocytes T naïfs en Th1 et Th17 tout en favorisant leur différenciation en pTreg<sup>184</sup>. Ceci semble se faire par l'intermédiaire de l'IL-10 produit par les Breg, une idée renforcée par l'étude de Carter et al. qui a mis en évidence que la délétion de l'IL-10 au sein des Breg conduisait à une diminution du nombre de Treg et à une arthrite exacerbée<sup>190</sup>.

Il semblerait ainsi qu'une population particulière de lymphocytes B soit capable d'exercer une activité immuno-régulatrice et que celle-ci se fasse par une favorisation de la différenciation des Treg via la production d'IL-10. Cette interaction entre Treg et Breg est d'autant plus importante car elle peut se révéler bénéfique ou délétère dépendamment du contexte pathologique.

Dans leurs travaux, Olkhanud et al. ont ainsi mis en évidence que le pouvoir métastatique de tumeurs mammaires murines étaient dépendant de la conversion de Tconv en Treg par une population particulière de Breg. Cette interaction ne semble pas faire intervenir l'IL-10 mais le TGF $\beta$  et nécessite un contact entre les deux populations de cellules<sup>191</sup>. Ainsi, la coopération Breg-Treg semble néfaste dans un contexte tumoral en favorisant la dissémination de la tumeur primaire.

A l'inverse, les travaux de Lee et al. ont pu montrer que l'interaction entre Breg et Treg était bénéfique dans le cadre d'allo-transplantation en augmentant le nombre de Treg, réduisant ainsi l'inflammation et prolongeant la survie du greffon. De manière intéressante, cette coopération faisait à nouveau intervenir le TGF $\beta$  et un contact cellulaire<sup>192</sup>. Ainsi il est possible que la nature de l'échange entre Breg et Treg varie peu selon le contexte, mais que les conséquences de cette interaction soient elles dépendantes de la situation pathologique. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'activité des Treg générés n'aura pas les mêmes conséquences dans un contexte où l'inflammation est bénéfique ou délétère.



## 1.1. Implication pathologique

Les nombreuses études portant sur la fonction des Treg ont permis d'entrevoir la diversité de leurs mécanismes d'action. Ils permettent à ces cellules de répondre à plusieurs types d'inflammation et donc de s'adapter à différents contextes pathologiques. La polyvalence et la plasticité de ces cellules en font donc une population immunitaire clé dans de nombreuses pathologies.

### 1.1.1. Auto-immunité

L'implication la mieux décrite des Treg dans un type de pathologie concerne leur rôle dans le contrôle des maladies auto-immunes. En effet, la découverte des Treg s'est faite de pair avec la mise en évidence de leur fonction régulatrice, ce qui a conduit de nombreux auteurs à se pencher sur l'implication de ces cellules dans le maintien de la tolérance immunitaire.

Les travaux de Fontenot et al. ont ainsi démontré que l'élimination spécifique du gène *Foxp3* (et donc des Treg) au sein des lymphocytes T conduit à un syndrome auto-immun sévère chez la jeune souris<sup>193</sup>. L'étude de Kim et al. a par la suite montré que la suppression des Treg chez la souris adulte conduit également à la survenue d'un syndrome auto-immun via une sur-activation des DC<sup>194</sup>. Ces observations sont ainsi en faveur de l'hypothèse selon laquelle les Treg inhiberaient en permanence le système immunitaire et garderaient l'activité des cellules immunes sous contrôle afin d'éviter leur activation excessive (**Figure 13**).

Plusieurs observations cliniques chez l'homme semblent aller dans le sens de cette hypothèse. En effet, des défauts qualitatifs ou quantitatifs ont été décrits au sein des Treg de patients atteints de maladies auto-immunes. Ainsi, la fonction suppressive *in vitro* de ces cellules a été décrite comme étant altérée chez les patients atteints de diabète insulino dépendant ou de sclérose en plaques<sup>195,196</sup>. D'autre part, les patients souffrant de lupus semblent présenter une diminution à la fois du nombre de Treg et de leur fonction<sup>197</sup>. Ces résultats doivent néanmoins être considérés avec prudence étant donné que les patients lupiques de cette étude étaient traités avec des cytostatiques et des stéroïdes qui pourraient avoir un effet non négligeable sur les Treg.

Les Treg ont de plus été récemment décrits comme jouant un rôle dans la tolérance à des molécules étrangères mais non dangereuses pour l'organisme. L'allergie constitue en effet un défaut de tolérance contre les allergènes et il a été décrit une baisse de la proportion et de la fonction suppressive des Treg chez les enfants souffrant d'asthme<sup>198</sup>. De plus, la disparition de

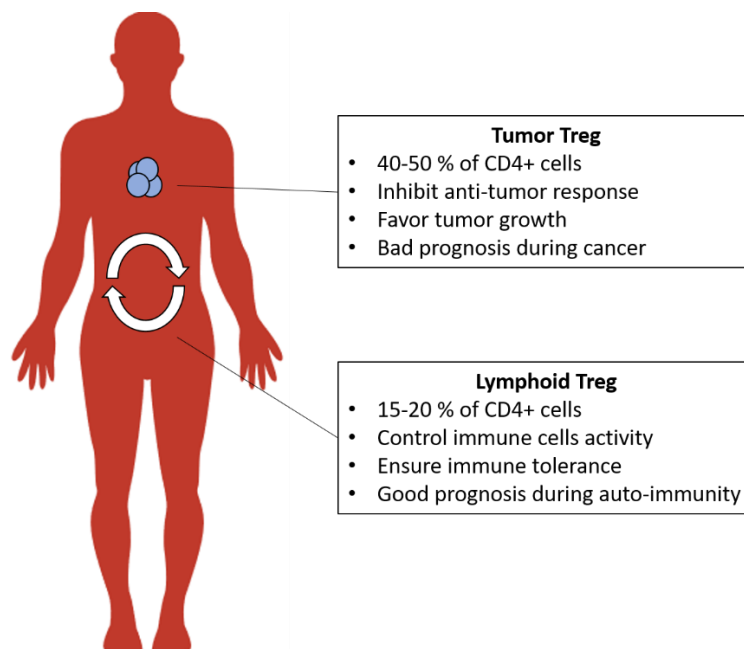


l'allergie au lait de vache chez l'enfant corrèle avec une apparition progressive de Treg dans le sang des patients ainsi qu'avec une augmentation de leur fonction suppressive<sup>199</sup>.

Dans un registre similaire de tolérance à des antigènes étrangers, il a été décrit une forte augmentation du nombre de Treg chez la femme enceinte<sup>200</sup>. De manière opposée, la faible proportion de Treg circulant dans le sang permet de prédire la probabilité de fausse couche et est aujourd'hui proposé comme un marqueur de suivi de la grossesse<sup>201</sup>.

Pour finir, plusieurs rapports ont fait état du rôle crucial des Treg dans la mise en place d'une tolérance lors de greffes d'organes solides<sup>202</sup>. Les travaux de Louis et al. ont ainsi pu montrer que le nombre de Treg circulant est plus faible chez les patients présentant un rejet chronique de leur greffon comparé aux patients développant une tolérance à celui-ci<sup>203</sup>.

De par leur action régulatrice, les Treg semblent donc participer au contrôle et à l'éducation du système immunitaire. Ceci permet, d'une part le maintien de l'intégrité de l'organisme via la protection contre les maladies auto-immunes (**Figure 13**), et d'autre part le développement de celui-ci lors du processus de reproduction et son interaction avec son environnement.



**Figure 13 : Diversité des lymphocytes T régulateurs.** Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une population cellulaire hétérogène et polyvalente, elle est donc impliquée dans de nombreuses pathologies. Les Treg des tissus lymphoïdes contrôlent l'activité des autres cellules immunes et sont donc facteur de bon pronostic en cas de maladies auto-immunes. Les Treg infiltrant les tumeurs sont néfastes car ils entravent la réponse immunitaire anti-tumorale et favorise la croissance de la tumeur.

### 1.1.2. Cancer

Contrairement au rôle protecteur décrit dans les pathologies précédentes, les Treg semblent également avoir un effet néfaste dans un contexte tumoral. En effet, les mécanismes de tolérance induit par les Treg ne sont pas uniquement capables de prévenir la survenue de maladies auto-immunes mais vont également entraver la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur qui exprime elle aussi des molécules du SOI (**Figure 13**).

La première mise en évidence de ce fait biologique a été observée par Onisuka et al. qui ont remarqué que l'injection d'un anticorps anti CD25 conduit à un rejet tumoral qui est associé à une diminution du nombre de Treg dans les tissus lymphoïdes périphériques<sup>204</sup>. De plus, Antony et al. ont pu montrer que les Treg exercent une forte immunosuppression sur les CTL ciblant la tumeur par un mécanisme qui pourrait être dépendant d'une monopolisation de l'IL-2<sup>205</sup>. Un autre mécanisme de suppression de l'activité des Tconv par les Treg au sein de la tumeur pourrait se faire via l'action du TGF $\beta$ . En effet, une étude récente a montré que la délétion spécifique de GARP au sein des Treg augmentait l'immunité anti-tumorale dans un contexte de cancer du côlon chez la souris<sup>206</sup>.

Plusieurs études ont pointé une forte accumulation de Treg au sein de différents types de tumeurs chez la souris et l'homme. Chez l'homme, les tumeurs de la tête et du cou, du poumon, du sein, du foie, du pancréas, du système gastro intestinal ou des ovaires ont toutes été décrites comme présentant une forte infiltration de Treg<sup>207</sup>. Plus important, cette accumulation de Treg semble avoir un effet sur l'évolution de la maladie étant donné que la diminution du ratio CTL/Treg est associée avec un pronostic peu favorable et qu'il existe une corrélation négative entre la fréquence de Treg infiltrant la tumeur et la survie des patients<sup>207</sup>. Ces différentes observations ont conduit à considérer les Treg comme facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer (**Figure 13**).

Un des axes de traitement récemment mis en place pour lutter contre le cancer consiste à l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant des molécules présentes à la surface des lymphocytes T et inhibant la réponse immune. Outre les anticorps anti PD-1 (de l'anglais « programmed cell death 1 ») qui démontrent une efficacité notable dans le traitement de différentes tumeurs, on trouve les anti CTLA-4<sup>208</sup>. De manière intéressante, il a récemment été suggéré que les effets bénéfiques des anti CTLA-4 pourraient être liés à une délétion des Treg de la tumeur plutôt qu'à un effet direct sur l'activité des Tconv et des CTL. En effet, les

travaux de deux équipes indépendantes ont pu montrer que l'action des anti CTLA-4 était dépendante des récepteurs aux fragments constants des anticorps présents sur les cellules myéloïdes<sup>209,210</sup>. Ces cellules pourraient alors cibler les Treg exprimant fortement le CTLA-4, et être à l'origine de leur diminution observée dans la tumeur des patients traités<sup>211,212</sup>.

L'ensemble de ces données renforcent l'idée que les Treg participent à l'inhibition de la réponse anti-tumorale et constituent donc une composante majeure à prendre en compte pour le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux (**Figure 13**).

## 1.2. Métabolisme

L'ensemble des données disponibles à ce jour sur l'implication des Treg dans de nombreuses pathologies encourage la communauté scientifique à comprendre de manière plus profonde les différentes facettes de la biologie de ces cellules. Le métabolisme cellulaire constitue un des aspects de la biologie des Treg et fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches. En effet les Treg ne semblent pas suivre le modèle de dynamique métabolique décrit dans les Tconv et la littérature disponible à ce jour fait état de données contradictoires.

### 1.2.1. Lien entre métabolisme et potentiel inflammatoire

Récemment, O'Neill et Hardie ont fait part de leur idée de lier le métabolisme cellulaire avec le potentiel inflammatoire d'une cellule. Dans une revue publiée en 2012, ces deux auteurs ont compilé les données existant sur le métabolisme de différents type de cellules immunitaires et ont établi un lien entre cellule inflammatoire et glycolyse.

L'un des exemples pris dans leurs travaux est la comparaison du métabolisme des macrophages de type M1 et M2. Bien que cette terminologie soit de moins en moins utilisée aujourd'hui, les macrophages M1 correspondent à des macrophages activés en présence de lipopolysaccharides (LPS) et d'IFN $\gamma$  tandis que la présence d'IL-4 et d'IL-13 conduit à la différenciation en macrophage M2. Une fois activés, les macrophages M1 permettent une élimination rapide du pathogène alors que les macrophages M2 sont impliqués dans la résolution de l'inflammation et la régénération des tissus endommagés<sup>213</sup>.

De manière intéressante, une étude du métabolisme de ces deux types cellulaires a montré que les macrophages M1 possèdent une forte activité glycolytique ainsi qu'une faible activité OXPHOS tandis que les macrophages M2 présentent des caractéristiques inverses<sup>214</sup>. De plus, une seconde série de travaux a pu montrer que la forte activité OXPHOS chez les macrophages M2 semble due à une induction de FAO dépendante de l'activation de STAT6 par l'IL-4<sup>215</sup>. D'autre part, la différenciation en macrophage M2 semble faire intervenir l'AMPK étant donné que l'expression d'une forme constitutivement active de cette protéine chez le macrophage biaise la différenciation vers un phénotype M2<sup>216</sup>.

L'ensemble de ces données a conduit O'Neill et Hardie à proposer le modèle suivant. La glycolyse et l'anabolisme en général pourraient être caractéristique des cellules inflammatoires car celle-ci doivent être capable de répondre rapidement et avec vigueur à un pathogène donné.

A l'inverse, l'OXPPOS et le catabolisme seraient synonyme d'une action anti-inflammatoire car celle-ci doit venir plus tardivement, après la réaction inflammatoire, et surtout doit durer dans le temps<sup>217</sup>. Ce modèle pourrait selon eux expliquer l'effet anti-inflammatoire de drogues telles que la metformine ou l'AICA ribonucleotide (AICAR) qui sont toutes deux des activateurs de l'AMPK et donc du catabolisme. En effet, ces deux molécules ont montré des effets bénéfiques dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de sclérose en plaques<sup>218,219</sup>.

### *1.2.2. Les Treg, des cellules cataboliques utilisant peu mTOR ?*

L'idée d'O'Neill et de Hardie de concilier activité mTOR et inflammation vient également d'une série d'observations suggérant un antagonisme entre activité mTOR et activité Treg. En effet, dès 2006, les travaux de Walsh et al. avait montré que les Treg présentait une faible activité de l'axe PI3K-Akt-mTOR et que celle-ci était responsable de leur faible prolifération in vitro<sup>220</sup>. En parallèle, Crelin et al. montrèrent que l'induction de cette voie à l'aide d'un système lentiviral augmentait la prolifération des Treg mais réduisait fortement leur fonction suppressive in vitro<sup>221</sup>. Par la suite, une série d'études rapportèrent que l'inhibition de la voie mTOR par l'utilisation de rapamycine ou à l'aide de modèle de délétion génétique conduisait à une augmentation de l'expression de Foxp3 et de la différenciation de Treg in vitro et in vivo<sup>222-226</sup>. L'ensemble de ces travaux conduisit alors la communauté scientifique à opposer activité mTOR et Treg et à considérer que ces cellules n'utilisaient peu ou pas les voies métaboliques associées à cette protéine.

Cette idée a été confirmée en 2011 par les travaux de Michalek et al. qui ont montré que l'induction de GLUT-1 et du flux de glycolyse après stimulation du TCR est beaucoup plus faible dans les Treg comparée aux autres populations de Tconv. En revanche, les Treg semblent montrer une dépendance plus forte à la FAO et présentent une activité AMPK plus importante<sup>227</sup>. Cette même équipe a montré 4 ans plus tard que l'inhibition de la glycolyse n'affecte pas la survie et prolifération des Treg in vitro mais que celles-ci sont fortement diminuées dans le cas d'une inhibition de l'OXPPOS. Cette plus forte dépendance des Treg à l'OXPPOS par rapport à la glycolyse pourrait être due à une faible expression par ces cellules de l'enzyme inhibant la conversion du pyruvate en acétyle-CoA (PDHK)<sup>228</sup>.

Se pose alors la question du mécanisme par lequel les Treg limitent l'activité mTOR et l'anabolisme suite à leur activation. Les travaux de Gerriets et al. ont suggéré que le programme

métabolique particulier des Treg serait sous le contrôle de Foxp3. Cette équipe a en effet montré que la transduction de Foxp3 chez des Tconv induit une réduction de la glycolyse et favorise une augmentation de l'OXPPOS et du métabolisme des lipides<sup>229</sup>. L'étude d'Angelin et al. a par la suite révélé le lien entre Foxp3 et glycolyse par le fait que Foxp3 inhibe l'expression de c-MYC, à l'origine d'une partie du programme anabolique chez le Tconv<sup>230</sup>.

L'identité Treg, l'inhibition de mTOR et du programme anabolique, ainsi que l'induction d'un métabolisme oxydatif semblent ainsi intimement liés. Cette vision est renforcée par 3 études qui ont montré que la levée des freins à l'activité mTOR chez les Treg conduit à une perte de leur stabilité. En effet, la délétion de PTEN au sein des Treg mène à une sur-activation de la voie PI3K-Akt-mTOR qui corrèle avec une perte de la stabilité de l'expression de Foxp3 et aboutit à une conversion des Treg en Th1<sup>231,232</sup>. D'autre part, la délétion de PP2A (pour « protein phosphatase 2 » en anglais), une autre phosphatase fortement exprimée au sein du Treg, résulte en une augmentation de l'activité mTORC1 et en une perte du phénotype Treg<sup>233</sup>. L'autophagie semble également participer à la régulation de l'activité mTOR au sein du Treg. En effet, des Treg déficient pour les facteurs autophagiques Atg 5 ou 7 (pour « autophagy related gene » en anglais) présentent une activité mTORC1 et c-MYC plus forte associée à plus faible stabilité de l'expression de Foxp3<sup>234</sup>.

L'ensemble de ces données semble ainsi montrer que l'inhibition de la voie mTOR est primordiale pour maintenir la stabilité de Foxp3 et le phénotype régulateur au sein du Treg. Le Treg ne pouvant plus utiliser mTOR et l'anabolisme, l'AMPK et le catabolisme serait alors la seule voie métabolique utilisable par le Treg.

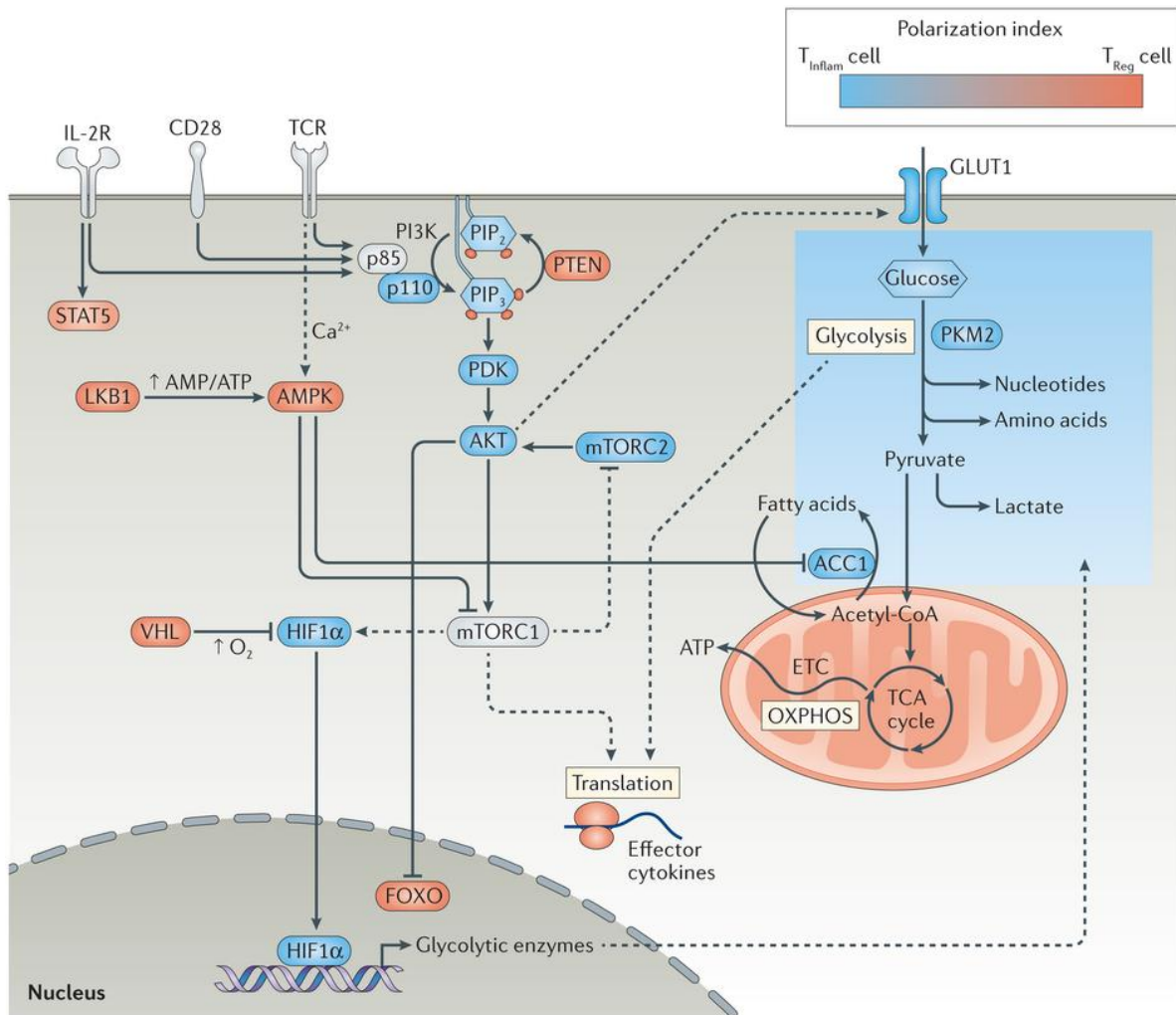
En effet, Basu et al. ont observé que l'activité réduite de la voie PI3K-Akt-mTOR est responsable de la faible expression de GLUT-1 par les Treg<sup>235</sup>. Cette aptitude réduite à utiliser le glucose pourrait expliquer la plus forte dépendance des Treg aux acides gras et à la FAO. En effet, Berod et al. ont montré que, contrairement aux Th17 qui utilisent de grande quantité de glucose pour alimenter la FAS, les Treg utilisent préférentiellement les acides gras pour approvisionner la FAO et l'OXPPOS<sup>236</sup>.

Ce métabolisme oxydatif mise en place au sein du Treg semble régulé par un des acteurs de la voie AMPK, la protéine LKB1. En effet, Yang et al. ont montré que la délétion de cette protéine conduit à une baisse de la FAO, un affaissement du cycle de Krebs ainsi qu'un déclin de l'activité de l'ETC au sein des Treg. Cette chute de l'activité mitochondriale mène alors à la

mort de ces cellules et à la survenue d'un syndrome auto-immun aigu chez les souris<sup>237</sup>. Ces observations ont été confirmées la même année par les travaux de He et al<sup>238</sup>.

Deux autres études ont par la suite mis à jour le rôle de LKB1 dans le maintien de la stabilité des Treg, notamment par la régulation de l'activité STAT-4 et de la captation du cholestérol<sup>239,240</sup>. De manière intéressante les effets décrits dans l'ensemble de ces études ne sont pas visibles suite à la délétion de l'AMPK, suggérant ainsi une régulation AMPK indépendante du métabolisme par LKB1.

Ainsi, contrairement à ce qui a été décrit chez le Tconv, l'activation du Treg ne conduirait pas à un shift vers la glycolyse mais serait caractérisée par un renforcement du métabolisme oxydatif grâce à une inhibition de la voie mTOR et à une activité LKB1 et AMPK plus forte (**Figure 14**).



**Figure 14 : Les Treg sont caractérisés par un métabolisme catabolique.** Contrairement aux Tconv, l’engagement du TCR et des signaux de co-stimulation ne conduit qu’à une modeste augmentation de la voie PI3K-Akt-mTOR chez le Treg. Ceci est permis grâce à une forte activité de la phosphatase PTEN qui inhibe l’activation de la protéine PDK responsable de l’activation d’Akt. Cette faible activité mTOR permet de restreindre l’induction de HIF-1 $\alpha$  et de conserver l’activité FOXO permettant ainsi le maintien de l’expression de Foxp3. En parallèle, la forte activité AMPK dans ces cellules favorise l’activité mitochondriale et un métabolisme de type catabolique au détriment d’une induction de la glycolyse aérobie. D’après Dupage and Bluestone *Nature Review in Immunology* 2016.



### 1.2.3. *Théorie sur le métabolisme des Treg, une fausse route ?*

L'hypothèse d'un métabolisme catabolique et d'une faible utilisation de mTOR par les Treg a cependant récemment été remise en question suite à la publication de nouvelles données sur le métabolisme des Treg activés. En effet, les travaux de Zheng et al. ont mis en évidence un rôle crucial du complexe mTORC1 dans la fonction suppressive des Treg. Dans leur étude, ces auteurs ont pu montrer que la délétion spécifique de RAPTOR, et donc de mTORC1, conduit à une perte de la fonction suppressive des Treg in vitro et in vivo. Cette réduction de fonction des Treg est associée à une diminution de la synthèse de cholestérol qui semble être à l'origine d'une baisse d'expression du CTLA-4 et d'ICOS (de l'anglais « inducible T-cell costimulator ») à la surface des Treg<sup>241</sup>. La synthèse de cholestérol, un processus pourtant anabolique, semble ainsi essentielle pour la fonction des Treg. Cette idée est également appuyée par le fait que la délétion d'une enzyme clé de ce processus au sein des Treg conduit à l'apparition d'un syndrome auto immunitaire généralisé chez la souris<sup>242</sup>.

En plus de son rôle dans la fonction suppressive des Treg, mTOR semble également important pour leur migration vers les sites enflammés. En effet, Kishore et al. ont montré que la glycolyse et l'activité mTORC2 permet l'activation d'une glucokinase à l'origine de la réorganisation du cytosquelette et de la relocalisation des Treg vers un site d'allogreffe de peau<sup>243</sup>.

D'autres preuves d'un rôle bénéfique de mTOR dans les Treg ont ensuite été apportées par les équipes de Powell et Chi un an plus tard. Dans deux articles publiés presque simultanément, ces deux équipes ont pu montrer un rôle important de mTOR dans l'activation et la maturation des Treg.

L'équipe de Powell a pu montrer que les Treg activés (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) sont plus glycolytiques et possèdent une activité mTOR plus forte que les Treg naïfs (CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>)<sup>244</sup>. En parallèle de ces résultats, l'équipe de Chi a observé que les Treg activés possèdent une activité de la voie PI3K-Akt-mTOR plus forte que les Treg naïfs. Ils ont ensuite remarqué que la délétion spécifique de mTOR, donc de mTORC1 et mTORC2, inhibe la maturation des Treg activés et leur capacité à réguler l'activité des lymphocytes Th2. En effet, les Treg déficients pour mTOR présentent une forte diminution de l'expression d'IRF4, un facteur de transcription essentiel pour le contrôle des réponses Th2 par les Treg<sup>245</sup>.

D'autre part, des travaux ont montré un rôle de la glycolyse dans la différenciation des Treg humain *in vitro*. Dans leur étude, De Rosa et al. ont rapporté que la différenciation et la fonction suppressive des Treg humains induits *in vitro* est dépendante de la glycolyse. En effet, celle-ci permet la localisation nucléaire de l'enzyme enolase 1 qui induit l'expression d'un variant de Foxp3 via des processus d'épissage alternatif en se fixant à la région CSN2<sup>246</sup>. Une dernière étude réalisée par la même équipe a finalement fortement déséquilibré l'hypothèse d'un métabolisme catabolique pour les Treg. Dans cette étude, les auteurs ont comparé le métabolisme de Treg et de Tconv, à la fois *ex vivo* et *in vitro*. Les résultats obtenus ont fait sensation car ils montraient que 1) le métabolisme des cellules était drastiquement différent *ex vivo* et *in vivo* et que 2) les Treg obtenus *ex vivo* étaient plus glycolytiques que les Tconv<sup>247</sup>.

Il semblerait ainsi que notre perception du métabolisme cellulaire ait été biaisé par des systèmes *in vitro* peu représentatifs de la réalité biologique présente *in vivo*. Le métabolisme spécifique des Treg pourrait alors n'être qu'un artefact lié aux conditions de culture. En effet, beaucoup des données corroborant l'hypothèse catabolique ont été obtenues sur des Treg différenciés *in vitro* à partir de Tconv (iTreg). Cette méthode de génération d'iTreg fait intervenir de grandes quantités de TGFβ dans la culture qui peut avoir un effet non négligeable sur le métabolisme cellulaire étant donné que cette cytokine peut activer l'AMPK via TAK1.

Une étude parue en 2018 semble confirmer cette crainte. Priyadharshini et al. ont constaté que le métabolisme des tTreg obtenu *ex vivo* n'était pas le même que celui des iTreg obtenus *in vitro*. En effet, contrairement aux iTreg, les tTreg présentaient des niveaux de glycolyse comparables à ceux des Tconv. Ces mêmes auteurs ont également montré que l'ajout de TGFβ dans la culture de tTreg induisait une diminution de leur activité PI3K-Akt-mTOR ainsi qu'une baisse de leur flux de glycolyse<sup>248</sup>. Le TGFβ pourrait donc être le principal responsable de la forte activité AMPK et du métabolisme catabolique des Treg décrits depuis bientôt 10 ans.

L'hypothèse d'un métabolisme exclusivement catabolique des Treg ne semblant plus viable, de nouvelles recherches doivent être menées afin de mieux comprendre le rôle des voies mTOR et AMPK dans le métabolisme et la biologie générale des Treg.



## 2. Description du projet

Lors de la mise en place de ce projet en 2015, plusieurs informations présentées dans cette introduction n'étaient pas encore accessibles et l'hypothèse catabolique était encore bien acceptée par la communauté scientifique. Dans ce contexte, il nous paraissait important de déterminer plus clairement le rôle de mTOR dans les Treg et tester la dépendance de ces cellules à l'AMPK.

Ce travail a donc été divisé en deux axes dont les objectifs étaient les suivants:

- 1) Compléter les connaissances existantes sur le rôle de mTOR dans les Treg.
- 2) Apporter de nouvelles données sur la fonction de l'AMPK dans ces cellules.

Pour l'ensemble de ces axes de recherche, nous avons choisi d'utiliser un modèle murin de délétion génétique permettant la suppression spécifique des gènes mTOR ou *Prkaa1* (codant pour la sous unité  $\alpha 1$  de l'AMPK) dans les Treg. Ce système est appelé système de recombinaison Cre-lox et est basé sur le croisement de différentes lignées de souris.

Nous avons ainsi croisé des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>*, dans lesquelles la recombinase CRE est exprimée sous le contrôle du promoteur de *Foxp3* et est fusionnée à la protéine fluorescente YFP, avec des souris mTOR ou *Prkaa1* dites floxées, dans lesquelles des exons des gènes mTOR ou *Prkaa1* sont encadrés par des séquences loxP. Ces croisements aboutissent ainsi à l'excision par la CRE des exons se trouvant entre les deux séquences loxP dans les cellules exprimant *Foxp3*, et donc à la délétion spécifique de mTOR ou AMPK dans les Tregs.

Le rationnel à l'origine de la production des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>lox</sup>* était de comprendre le rôle des complexes mTORC1 et mTORC2 simultanément dans les Treg. En effet, au commencement de ce projet, il n'y avait que peu d'informations quant au rôle concomitant que pouvait avoir ces deux complexes au sein du Treg.

La génération des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>* a été réalisée dans le but précis de tester l'hypothèse catabolique décrite plus haut. En effet, l'ensemble des données disponibles en 2015 montraient clairement un rôle essentiel de l'AMPK et du catabolisme dans les Treg et nous voulions tester l'effet d'une perte de ce type de métabolisme sur ces cellules.



## **RESULTATS**

---



## 1. Métabolisme basal des Treg : rôle de la voie mTOR (article soumis)

### Question

Ce travail a été initié en 2014, un an après la publication des travaux de Zheng et al. sur le rôle de RAPTOR et de mTORC1 dans la fonction suppressive des Treg. La compréhension de la fonction de mTOR dans ces cellules n'était alors qu'incomplète et nous voulions l'approfondir, notamment en étudiant le rôle simultané des complexes mTORC1 et 2.

### Méthode

Afin d'étudier le rôle des complexes mTORC1 et 2 au sein des Treg, nous avons choisi une approche de perte de fonction. Nous avons pour cela induit une délétion spécifique de mTOR au sein des Treg grâce à l'utilisation des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>Lox</sup>*, permettant une excision des exons 1 à 5 du gène mTOR parmi les cellules Foxp3+.

### Résultats

La perte de mTOR au sein des Treg a eu des conséquences visibles au niveau macroscopique. Cette délétion a conduit à la survenue d'un syndrome auto-immun sévère chez les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>Lox</sup>*, démontrant ainsi un rôle critique de mTOR dans la biologie des Treg. L'étude approfondie des conséquences de la délétion de mTOR dans un contexte non inflammatoire a par la suite permis de mettre en évidence que les Treg déficients pour mTOR avaient perdu la capacité de migrer vers les organes non lymphoïdes. Cette migration altérée était associée à une augmentation de l'expression du CD62L et du CCR7, suggérant une recirculation préférentielles des Treg déficient pour mTOR vers les organes lymphoïdes. D'autre part, nous avons rapporté que la perte de mTOR au sein des Treg conduisait à une réduction de la stabilité de l'expression de Foxp3 en condition inflammatoire. Cette diminution de stabilité était associée à une reméthylation partielle de la région CNS2 de Foxp3 au sein des Treg déficients pour mTOR.

### Conclusion

Cette étude a confirmé le rôle essentiel de mTOR dans la biologie des Treg et a rapporté un rôle nouveau de cette protéine dans la capacité des Treg à migrer vers les tissus non lymphoïdes. De plus, ces travaux ont mis au jour une implication, jusqu'ici insoupçonnée, de mTOR dans le maintien de la stabilité du phénotype régulateur de ces cellules. L'ensemble de ce travail a permis une meilleure caractérisation du rôle de cette protéine dans la biologie des Treg.





## **Regulatory T cell stability and migration is dependent on mTOR**

Romain Vallion<sup>1,§</sup>, Jordane Divoux<sup>1,§</sup>, Salomé Glauzy<sup>1</sup>, Emilie Ronin<sup>1</sup>, Yannis Lombard<sup>1</sup>,  
Martina Lubrano di Ricco<sup>1</sup>, Sylvie Grégoire<sup>1</sup>, Ivan Nemazanyy<sup>2</sup>, Aurélie Durand<sup>3</sup>, Delphine  
Fradin<sup>4</sup>, Bruno Lucas<sup>3</sup> and Benoit L Salomon<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), Paris, France.

<sup>2</sup> Platform for Metabolic Analyses, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UMS 3633, Paris, France.

<sup>3</sup> Paris Descartes Université, Sorbonne Paris Cité, Institut Cochin, CNRS UMR8104, INSERM U1016, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014, Paris, France.

<sup>4</sup> CRCINA, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, Nantes, France

<sup>§</sup> These authors contributed equally to this work.

\*Correspondence should be addressed to B.L.S. ([benoit.salomon@inserm.fr](mailto:benoit.salomon@inserm.fr)).

## ABSTRACT

CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) are essential to maintain immune tolerance as their loss leads to a fatal auto-immune syndrome in mice and human. Continuous efforts are made to understand their biology and targeting Treg represents a promising therapy in cancer and autoimmune settings. Conflicting findings have been reported on the metabolism of Treg. Some reports found that Treg have low mechanistic target of rapamycin (mTOR) activity and would be less dependent on this enzyme compared to conventional T cells, whereas other reports suggest quite the opposite. In this study, we revisited this question by using mice that have a specific deletion of mTOR in Treg. These mice developed spontaneously a severe and systemic inflammation. We found that mTOR expression by Treg is critical for their differentiation in effector cells and their migration toward non-lymphoid tissues. We also reveal that mTOR is involved in Treg stability that is associated with epigenetic modifications of *Foxp3*, which is likely due to an impact on the glutaminolysis pathway. Our work showed that mTOR is crucial for Treg differentiation, migration and identity and that drugs targeting the metabolism will impact on Treg biology.

## INTRODUCITON

Metabolism is a key regulator of the biology of conventional T cells (Tconv). T cell receptor (TCR) engagement and co-stimulatory signals trigger a metabolic switch that favors biosynthesis of nucleotides, fatty acids and proteins, increasing biomass to achieve cell proliferation and effector functions. These anabolic pathways rely on increased glycolysis and glutaminolysis<sup>1</sup>. One of the key regulators of this switch is the mechanistic target of rapamycin (mTOR), a serine threonine kinase working through its association with cofactors forming the mTORC1 and mTORC2 complexes<sup>2</sup>. mTOR is rapidly activated after TCR stimulation<sup>3</sup> and is needed for the proliferation and function of Tconv whereas its inhibition leads to the anergy<sup>4,5</sup>. The role of metabolism and mTOR in the biology of Foxp3 regulatory T cells (Treg) is subjected to some controversies. Whereas the inhibitory effect of mTOR in *in vitro* and *in vivo* Treg differentiation is clearly established<sup>6-10</sup>, contradictory findings have been reported on the role of mTOR in differentiated Treg. On one hand, it was observed that Treg have lower mTOR activity compared to Tconv and rely more on fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation (OXPHOS) than glycolysis for their biology<sup>11-14</sup>. Mechanistically, it was proposed that Foxp3 inhibits cMyc and thus glycolysis<sup>14</sup>. On the other hand, it was shown that Treg would be more glycolytic with a higher mTOR activity compared with Tconv<sup>15,16</sup>. Also, mice with a conditional knock-out (cKO) in Treg of mTOR or raptor, a critical cofactor of mTORC1, developed a severe spontaneous autoimmune syndrome that was attributed to decreased Treg proliferation and function<sup>17,18</sup>. A recent report has provided an explanation for these contradictory findings<sup>19</sup>. Most studies supported low mTOR activity and glycolysis in Treg have been performed with *in vitro* induced Treg, obtained after incubation with TGFβ. This point is critical since this cytokine seems to inhibit mTOR activity. In this report they confirmed that TGFβ-induced Treg had low mTOR activity, whereas *ex-vivo* purified thymic Treg had similar mTOR activity as Tconv<sup>19</sup>. A likely conclusion is that, except for the TGFβ-induced Treg, Treg would have normal mTOR activity that is up-regulated upon TCR activation<sup>13,15,16,20</sup>. It is still unclear whether mTOR activation promotes or inhibits Treg function since opposite findings were reported<sup>13,17,18</sup>.

To further study the role of mTOR in Treg biology, we generated cKO mice that have a specific deletion of mTOR in Treg. Here, we confirm that these mice developed an autoimmune syndrome and found new functions for mTOR in Treg biology that were not previously observed. First that mTOR-deficient Treg had reduced capacity to migrate in non-lymphoid tissues. Second that these cells were unstable and lost Foxp3 expression. Thus, our study reveals a cell intrinsic role of mTOR in Treg migration and stability.

## RESULTS

### **mTOR deletion in Treg results in systemic inflammation.**

To study the role of mTOR in Treg biology, we crossed the *Mtor<sup>lox</sup>* mice, in which the exon 1 to 5 of mTOR are flanked by two loxP sequences<sup>32</sup>, with the *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice, which have the Cre recombinase inserted in the untranslated region of Foxp3<sup>33</sup>. The *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* offspring mice harbored a specific deletion of mTOR in Treg. To assess mTOR activity, we measured phosphorylation of the S6 protein, a target of mTOR<sup>11</sup>, which was decreased in Treg of *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice compare to control, as expected (**Fig. 1a**). Compared to control *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice, *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice spontaneously develop a severe disease leading to premature death and stunted growth (**Fig. 1b, c**). Different tissues, including the colon, liver, lung and skin were inflamed and infiltrated with leukocytes. Peripheral lymph nodes (pLN) and mesenteric LN (mLN) were also inflamed in *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice (**Fig. 1d, e**). Lung and liver contained increased proportion of eosinophiles (**Fig. 1f**). In the serum, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-4, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF), as well as IgM, IgG, IgA and IgE were significantly increased in *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice compare to *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice (**Fig. 1g, h**). The systemic inflammation of *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice was associated with increased activation of Tconv, quantified by increased proportion of CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> and Ki67<sup>+</sup> cells in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> compartments and in both lymphoid and non-lymphoid tissues (**Fig. 2a-c** and **Supplementary Fig. 1a, b**). This increased Tconv activation was already observed at 2 weeks of age and was more pronounced at 5 weeks of age. However, levels of IL-17, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), TNF or IFN $\gamma$  were not increased in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconv of *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* from pLN and the liver mice and the level of TNF was even decreased in CD8<sup>+</sup> Tconv of these mice compared to control cells from *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice (**Fig. 2d** and **Supplementary Fig. 1c**). Altogether, these data confirm a previous work<sup>30</sup> showing that mTOR deficiency in Treg results in systemic inflammation, supporting a critical role of mTOR in Treg biology.

### **mTOR-deficient Treg have an altered activation status and a defect in non-lymphoid organs.**

Since Treg limit Tconv activation, we hypothesized that homeostasis or function of mTOR-deficient Treg was altered. Surprisingly, Treg proportion was increased in lymphoid organs of *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice compare to control *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice, which was more pronounced in 5 than 2 week-old mice (**Fig. 3a**). In contrast, Treg frequency dropped in non-lymphoid organs of *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice from 2 weeks of age (**Fig. 3b**). Markers that are up-

regulated upon Treg activation, such as glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) or inducible T-cell costimulator (ICOS), were all increased in both lymphoid and non-lymphoid organs of *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice at 5 weeks of age (**Supplementary Fig. 2a, b**). The reduced expression of CD25 further supports an activated phenotype of Treg in these mice (Smigel JEM). This activated status could well be due to inflammation occurring in these mice, especially since the Treg activated phenotype was more pronounced at 5 than 2 weeks of age (**Supplementary Fig. 2a, b**). Thus, to distinguish the intrinsic effect of mTOR deletion from the systemic inflammation, we analyzed Treg in heterozygous *Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* females, in which theoretically only half of Treg express the Cre recombinase, since the *Foxp3* locus is on the X chromosome. These chimeric mice have mTOR-deficient and mTOR-sufficient Treg. The latter cells may dominantly be able to prevent spontaneous inflammation, which was the case since the frequency of CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> among CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconv were the same in *Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice and *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* control mice (**Supplementary Fig. 2d**). The proportion Treg expressing CRE, quantified by YFP expression, was about the expected 50% in *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* mice but lower than 30% in *Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice, suggesting that mTOR-deficient Treg had a homeostatic defect when in competition with mTOR-sufficient Treg. This difference was clearly more pronounced in non-lymphoid organs, especially in the intestine, colon and skin than in lymphoid organs (**Fig. 3c**). The overall reduction of Treg expressing Cre in *Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice was associated with their decreased expression of GITR, ICOS, CTLA-4 and Ki-67 and increased expression of CD25 (**Supplementary Fig. 2d**). Overall, mTOR expressed by Treg plays a non-redundant role to maintain normal numbers of cells, specifically in non-lymphoid tissues, and for the acquisition of an activated Treg phenotype.

#### **mTOR deficient Treg display intrinsic metabolic alteration.**

We then analyzed the metabolism of mTOR deficient Treg in *Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice that had no inflammation, since it would change the results. A metabolomic approach showed that, compared to controls, mTOR deficient Treg had increased levels of metabolites of the TCA cycle, such as malate, aspartate and citrate, and of glutamine-derived metabolites such as glutamate,  $\alpha$ -ketoglutarate, ornithine and citruline. Levels of fatty acids and metabolites of the glycolysis pathway were not or inconsistently affected (**Fig. 4a**). Also, mTOR deficient Treg had decreased mitochondria membrane potential indicated by reduced tetramethylrhodamine (TMRM) staining (**Fig. 4b**). These data suggest that mTOR deletion in Treg induces an increase of glutaminolysis, which may lead to fuel metabolites of downstream pathways such as the urea

cycle (ornithine, citruline and arginine) and TCA cycle, associated with a reduced electron transport chain (ETC) activity.

### **mTOR deficient Treg have decreased migration capacity.**

Our data raises the question related to the reduced proportion of mTOR-deficient Treg in non-lymphoid compared to lymphoid organs. Is it due to an altered migration? This question was addressed by transferring total splenocytes from *Foxp3<sup>Cre/+</sup>mTOR<sup>lox</sup>* mice in congenic CD90.1 mice donor cells 30 minutes and 12 hours later (**Fig. 5a**). As expected, donor CD4<sup>+</sup> cells were found in the blood and highly perfused tissues, such as the liver, lung and spleen but not in the pLN and they were uniformly distributed 12 hours after injection (**Fig. 5b**). Among donor Treg, the proportion of CRE (YFP) expressing cells was comparable to the one of injected cells (syringe) in the blood, spleen and pLN, whereas it was significantly reduced in the liver and lung at both 30 minutes and 12 hours (**Fig. 5c**). This result demonstrates that migration of mTOR-deficient was normal (similar to mTOR-sufficient Treg) in lymphoid organs, whereas it was affected in the liver and lung. To explore the mechanism of this defect, we analyzed expression of molecules involved in T cell migration in *Foxp3<sup>Cre/+</sup>mTOR<sup>lox</sup>* mice. Compared to controls, mTOR deficient Treg of lymphoid organs expressed increased levels of CD62L, CCR7 and S1P1 associated with reduced expression of CD69 (**Fig. 5d** and **Supplementary Fig. 3a, b**). This suggests that mTOR deficient Treg would be fully competent (or even better) to re-circulate between the blood and lymphoid tissues, which is compatible with their normal migration in these tissues (**Fig. 5c**). In contrast these Treg expressed lower levels of CD44 and CCR4 in the liver and lung, suggesting that they may be less effective to enter these tissues. In conclusion, the decreased proportion of mTOR deficient Treg in non-lymphoid organs could be explained by a defect of entry in these tissues and maybe an increased re-circulation in lymphoid organs due to increased CD62L and CCR7 expression.

### **mTOR deficiency lead to Treg instability.**

The reduced proportion of mTOR-deficient Treg in *Foxp3<sup>Cre/+</sup>mTOR<sup>lox</sup>* mice was severe in non-lymphoid but it affects also lymphoid tissues, showing a global alteration of cell homeostasis (**Fig. 3c**). A possible mechanism would be an increased instability of mTOR-deficient Treg, a process consisting in the loss of Foxp3 expression and generation of ex-Treg, already described in specific contexts<sup>34-37</sup>. To address this question, we co-transferred in CD45.1 recipients m-TOR sufficient and deficient Treg, identified using congenic markers, and assessed Foxp3 expression in injected cells 10 days later (**Fig. 6a, b**). The frequency of ex-Treg (cells that had lost Foxp3 expression) was higher among mTOR-deficient donor cells than

among control cells (**Fig. 6c**, left panel). To confirm these results in a more inflamed context, we co-transferred in CD3 KO recipients the same two Treg subsets and added CD4<sup>+</sup> Tconv, as supplier of IL-2 and other factors favoring Treg survival (**Fig. 6a**). Strikingly, 10 days later, most mTOR deficient Treg became ex-Treg whereas only a small fraction of mTOR sufficient Treg became ex-Treg in both lymphoid and non-lymphoid tissues (**Fig. 6b, c**). The stability of Foxp3 expression is regulated at the epigenetic level, which can be quantified by analyzing the CpG methylation of the conserved non-coding sequence 2 (CNS2) region of *Foxp3*<sup>38</sup>. We thus assessed the methylation status of this region. The control cells were mTOR sufficient Treg and Tconv that were de-fully de-methylated and fully methylated, respectively, as expected (**Fig. 6d**). Interestingly, the CNS2 region of mTOR deficient Treg were partially re-methylated (**Fig. 6d**). In conclusion, mTOR deficient Treg display reduced stability, a phenomenon that could be partly due to re-methylation of the *Foxp3* locus.

## DISCUSSION

In this work, we show that mTOR expression by Treg is critical to prevent inflammatory responses since cKO mice with deletion of mTOR in Treg developed a spontaneous autoimmune syndrome, which is characterized by leukocyte infiltration of diverse organs, increased Tconv activation and increased levels of inflammatory cytokines and antibodies in the serum. Our work confirm a previous one that was recently published<sup>13</sup>. Our works differ in the proposed mechanism to explain why these mice are sick, in other words, what is the role of mTOR in the Treg biology. The published work suggests that mTOR-deficient Treg were defective in their suppressive function, which was mTORC1 dependent since similar findings were obtained in the *Foxp3<sup>Cre</sup> Raptor<sup>lox</sup>* mice but not in the *Foxp3<sup>Cre</sup> Rictor<sup>lox</sup>* mice<sup>19</sup>. Our work suggests two other mechanisms that were not previously described, migration and stability defect of mTOR-deficient Treg.

We found that mTOR-deficient Treg were present in lower proportion than mTOR-sufficient Treg in non-lymphoid tissues than in lymphoid tissues. This was observed in both the inflamed (*Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>*) and the non-inflamed (*Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>*) mice. Our data suggest that this phenomenon is due, at least partially, to a migration defect of mTOR-deficient Treg in non-lymphoid tissues rather than a decrease of exit from lymphoid tissues. What is the mechanism of this defect? Seminal work in Tconv has shown that mTOR, through mTORC2 activity, inactivates Foxo1/3, leading to down-regulation of Kruppel like factor 2 (KLF2), which impacts on T cell recirculation capacity by inhibiting CD62L, CCR7, S1P1, and promoting expression of inflammatory chemokine receptors<sup>20,21</sup>. Similar phenomenon may take place in



Treg since mTOR-deficient Treg had increased expression of CL62L, CCR7 and S1P1 and decreased expression of CD44 and CCR4. Alternatively, it was reported that mTOR coordinates a specific transcriptional program through IRF4 allowing the maturation of effector Treg and their action at mucosal site<sup>13</sup>. Also, it was shown that mTOR inhibition led to decreased proportion of effector Treg<sup>22</sup>. An alternative mechanism was proposed involving mTORC2 since its inhibition in Treg altered their capacity to migrate towards inflamed site via inhibition of the enzyme glucokinase GSK<sup>23</sup>. Altogether, mTOR seems to coordinate an effector program in Treg allowing their maturation in lymphoid organs and their migration toward non-lymphoid tissues.

The other important findings of our research concern Treg stability. The reduced proportion of mTOR-deficient Treg in the non-inflamed *Foxp3<sup>Cre/+</sup>mTOR<sup>lox</sup>* mice was observed in all tissues. This new findings could be due to decreased Treg stability characterized by a loss of Foxp3 expression, which was prominent in an inflamed and lymphopenic context but also observed at steady state. Importantly, the reduced stability of mTOR-deficient Treg could be due to partial re-methylation of the CNS2 region of *Foxp3*, which is a well known mechanism of Treg instability. What is the link between mTOR and CNS2 methylation status? We showed that mTOR deficient Treg had increased glutaminolysis and  $\alpha$ -ketoglutarate production. Interestingly, a set of studies recently highlighted a negative impact of glutamine on Foxp3 expression. Indeed, glutaminolysis inhibition using 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine let to decreased methylation of *Treg* and increased Treg differentiation from naïve T cells in vitro<sup>24</sup>. Moreover, stopping  $\alpha$ -ketoglutarate production using amino acetic acid decreased methylation of the *Foxp3* promotor and CNS2 region on Th17 cells<sup>25</sup>. Also, 2-hydroxyglutarate, derived from  $\alpha$ -ketoglutarate, antagonized Foxp3 expression through increased methylation of CNS2, a process that could depend on Tet enzymes activity<sup>25</sup>. Given this data and ours, we propose that enhanced  $\alpha$ -ketoglutarate production in mTOR-deficient Treg induces increased methylation of CNS2, which results in a decreased stability of Foxp3 expression.

To conclude, our work confirms previous observations and completes missing information about the role of mTOR in Treg biology. Our study reveals an unsuspected implication of mTOR in maintaining Foxp3 expression, favoring Treg integrity and function. Our exploration of the role of mTOR in Treg encourages us to reconsider the place of this protein in the biology of these cells to avoid any mistakes during the development of new therapeutic strategies aiming to target Treg.

## MATERIALS & METHODS

### Mice

Foxp3-CRE-IRES-YFP (Foxp3<sup>Cre</sup>) and Foxp3-IRES-GFP (CD90.1 Foxp3<sup>GFP</sup>) knock-in mice were kindly given by Prs. Alexander Rudensky and Bernard Malissen respectively. *mTOR<sup>Lox</sup>* mice were purchased at Jackson laboratory (B6.129S4-*Mtor<sup>tm1.2Koz</sup>/J*). CD3 KO (*CD3<sup>etm1Mal</sup>*) mice were obtained from the cryopreservation distribution typing and animal archiving department (Orléans, France). All mice were on a C57Bl/6J background and were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with European Union guidelines.

### Histology

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

### Cytokine quantification

Cytokines were quantified in pre-diluted sera (1/2) of 5-weeks mice using the mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit (BD Biosciences) according to manufacturer's procedure. Data were analyzed using FCAP array software.

### Immunoglobulin and autoantibody quantification by ELISA

A Nunc Maxisorp 96-well flat plates were coated with goat anti-mouse IgM, IgA, IgE or IgG (Southern Biotech). After washes, unspecific sites were saturated with BSA and incubated with mice sera followed by biotinylated goat anti-mouse IgM, IgA, IgE or IgG (Southern Biotech). Finally streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (Sigma) was added followed by the addition of TMB (eBioscience). The reaction was stopped with HCl (1N) and revealed at 450nm with an ELISA plate reader DTX880 Multimode Detector (Beckman Coulter).

### Cell preparation from tissues

Different tissues were harvested on xylazine/ketamine anesthetized mice after intra-cardiac perfusion with cold PBS. For lymphoid tissues, cells were isolated by mechanical dilacerations. Small pieces of livers and lungs were digested in type IV collagenase (0.3 mg/ml) and DNase I (100 µg/ml) for 30 min at 37°C, followed by Percoll gradient (40–80%) separation. Gut and colon were removed of their Peyer patches and epithelium, sliced in small pieces and

digested in type IV collagenase (1 mg/ml) and DNase I (10 µg/ml) for 30 min at 37°C, followed by Percoll gradient (40–80%) separation. Small pieces of shaved skin were digested in liberase DL (0.4mg/ml), collagenase D (0.05 mg/ml) and DNase I (10µg/ml) for 1h at 37°C, followed by Percoll gradient (40–80%) separation. For cytokines assessment, leukocytes were stimulated for 4 hours in RPMI 1640 10% FCS containing phorbol 12-myristate 13-acetate (25 ng/mL), Ionomycine (1 µg/mL) and Golgi plug from BD Biosciences.

### **Antibodies and flow cytometry analysis**

The following mAbs from BD Biosciences were used: anti-CD45<sub>LCA</sub> (30-F11), anti-CD8a (53-6.7), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD90.1 (OX-7), anti-CD90.2 (30-H12), anti-IL-17A (TC11-18H10), anti-GM-CSF (MP1-22E9), anti-IFN-γ (XMG1.2), anti-TNF-α (MP6-XT22), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CD25 (PC61 or 7D4), anti-ICOS (7E.17G9), anti-GITR (DTA-1), anti-CTLA-4 (UC10-4F10-11), anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (HL3), anti-IA/E (M5/114.15.2), anti-Ly6C (AL-21), anti-Ly6G (1A8). Anti-GFP antibody was purchased from Life Technologies. Anti-CD3ε (145-2C11), anti-Foxp3 (FJK-16s), anti-CD44 (IM7), anti-Ki-67 (SOLA15), anti-CCR7 (4B12), lived dead (e780) were purchased from eBioscience, and Foxp3 staining was performed using the eBioscience kit and protocol. Cells were acquired on a BD LSR II and a BD Fortessa X20 cytometers and analyzed using FlowJo software.

### **Metabolic staining**

Analysis of phospho-protein was realized as following. 2 million immune cells were stimulated ex-vivo using coated αCD3/CD28 (2 µg/mL) for 6 hours, fixed and permeabilized using transcription factor phospho buffer set perm III (BD bioscience). Mitochondria membrane potential was assessed using 200 nM tetramethylrhodamine (TMRM) (Thermofisher) diluted in PBS and incubated for 20 minutes at 37°C.

### **Treg and Tconv cell purification**

Treg were enriched from spleen, cervical and peripheral (axillary, brachial and inguinal) lymph node based on CD25 expression with a biotinylated anti-CD25 mAb (7D4) and anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec) and processed on AutoMACS pro Separator (Miltenyi Biotec). Positive fraction was then stained with anti-CD4 (RM4.5) and cell sorting was performed on CD4<sup>+</sup> YFP<sup>+</sup> cells using the BD FACS Aria II with a purity of 99,6%. Tconv cells were enriched by depleting CD8, CD19, CD11b and CD25-expressing cells with biotin-conjugated antibodies anti- CD25 mAb (7D4), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD19 (1D3) and anti-

CD11b (M1/70) mAbs and anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec) processed on AutoMACS pro Separator (Miltenyi Biotec), Negative fraction was then stained with anti-CD4 (RM4.5) and cell sorting was performed on CD4<sup>+</sup> YFP<sup>-</sup> cells using the BD FACSAria II with a purity of 99,6%.

### **T-cell adoptive transfer**

To study Treg migration, CD90.1 *Foxp3*<sup>GFP</sup> mice received intravenously a total of 20 x10<sup>6</sup> splenocytes from sex-matched CD90.2 *Foxp3*<sup>Cre/+</sup> *mTOR*<sup>lox</sup> and sacrificed 30 minutes and 12 hours later. To study Treg stability, CD45.1 mice received intravenously sorted Treg (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>, 1 x 10<sup>6</sup> each) from age and sex-matched CD45.1/2 *Foxp3*<sup>Cre/+</sup> and CD45.2/2 *Foxp3*<sup>Cre/+</sup> *mTOR*<sup>lox</sup> mice. Lymphopenic CD3 KO mice received intravenously sorted Treg (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>, 2 x 10<sup>5</sup> each) from age and sex-matched CD45.1/2 *Foxp3*<sup>Cre/+</sup> and CD45.2/2 *Foxp3*<sup>Cre/+</sup> *mTOR*<sup>lox</sup> mice and CD4<sup>+</sup> Tconv cells (CD4<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>, 2 x 10<sup>6</sup>) purified from CD90.1 *Foxp3*<sup>GFP</sup> mice.

### **Pyrosequencing-based bisulfite PCR analysis**

250ng of genomic DNA was treated with EZ DNA methylation-Gold kit according manufacturer's protocol (Zymo Research Corporation). We PCR-amplified the bisulfite treated DNA using unbiased nested primers: 5'-TTTTGGGTTTTTTTGGTATTTAAGA-3' and 5'-Biotin-TTAACCAAATTTTTCTACCATTAAC-3'. Biotin-labeled single stranded amplicons were isolated according manufacturer's protocol using the Qiagen PyroMark Q24 WorkStation (Qiagen). Pyrosequencing was next performed on a PyroMark Q24 Instrument (Qiagen) with 0.5µM of each sequencing primers: 5'- ATTCTATCTTTCTTAAATACC-3' and 5'-AAAATAACTAATCTATCCT-3'. The percent methylation for each of the CpGs within the target sequence was calculated using the PyroQ CpG Software (Qiagen).

### **Targeted LC-MS metabolites analyses**

For metabolomic analysis 3 x 10<sup>5</sup> cells were used for extraction. Extraction solution was composed of 50% methanol, 30% ACN, and 20% water. The volume of extraction solution added was adjusted to cell number (1 ml/2x10<sup>6</sup> cells). After addition of extraction solution, samples were vortexed for 5 min at 4°C and then centrifuged at 16,000g for 15 min at 4°C. The supernatants were collected and stored at 80°C until analyses. LC/MS analyses were conducted on a QExactive Plus Orbitrap mass spectrometer equipped with an Ion Max source and a HESI

II probe and coupled to a Dionex UltiMate 3000 UPLC system (Thermo, USA). External mass calibration was performed using the standard calibration mixture every 7 days as recommended by the manufacturer. 5  $\mu$ l of each sample was injected onto Zic-pHilic (150 mm  $\times$  2.1 mm i.d. 5  $\mu$ m) with the guard column (20 mm  $\times$  2.1 mm i.d. 5  $\mu$ m) (Millipore) for the liquid chromatography separation. Buffer A was 20 mM ammonium carbonate, 0.1% ammonium hydroxide (pH 9.2); buffer B was acetonitrile. The chromatographic gradient was run at a flow rate of 0.200  $\mu$ l/min as follows: 0–20 min; linear gradient from 80% to 20% B; 20–20.5 min; linear gradient from 20% to 80% B; 20.5–28 min: hold at 80% B (MacKay et al., 2015). The mass spectrometer was operated in full scan, polarity switching mode with the spray voltage set to 2.5 kV, the heated capillary held at 320°C. The sheath gas flow was set to 20 units, the auxiliary gas flow was set to 5 units, and the sweep gas flow was set to 0 unit. The metabolites were detected across a mass range of 75–1,000 m/z at a resolution of 35,000 (at 200 m/z) with the AGC target at  $10^6$ , and the maximum injection time at 250 ms. Lock masses were used to insure mass accuracy below 5 ppm. Data were acquired with Thermo Xcalibur software (ThermoFisher). The peak areas of metabolites were determined using Thermo TraceFinder software (ThermoFisher), identified by the exact mass of each singly charged ion and by known retention time on the HPLC column.

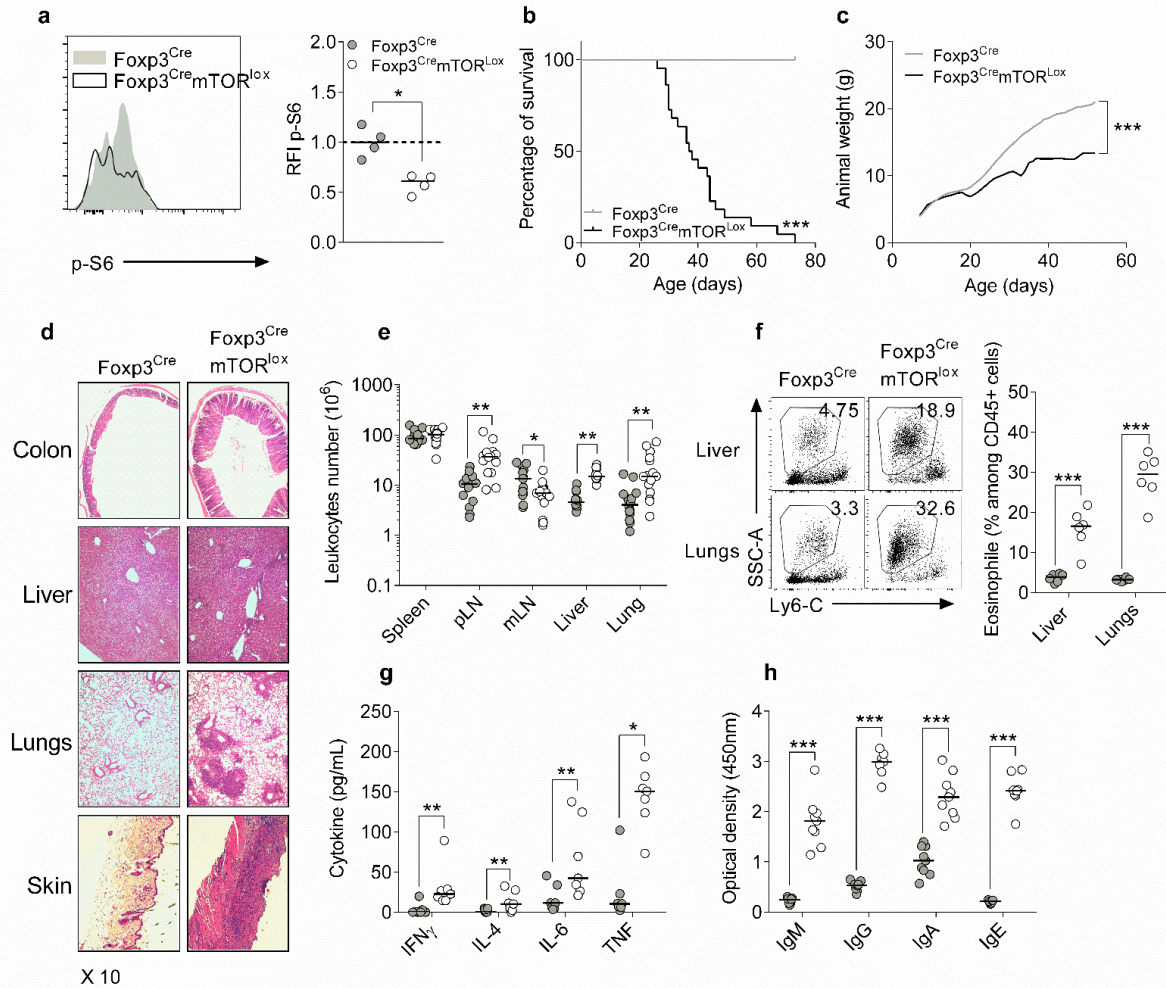
### **Statistical analysis and heatmap representation**

Statistical analyses were performed using Prism Software (Graphpad). Statistical significance was determined using a log-rank (Mantel-Cox) test for mice survival data. Curve slope comparison was done through nonlinear regression comparison. Two-tailed unpaired nonparametric Mann-Whitney U test was used for medians comparison. Theoretical median comparison were realized via Wilcoxon signed rank test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Median representation were used throughout the figures. Heatmap were drawn using R software (CRAN).

## BIBLIOGRAPHY

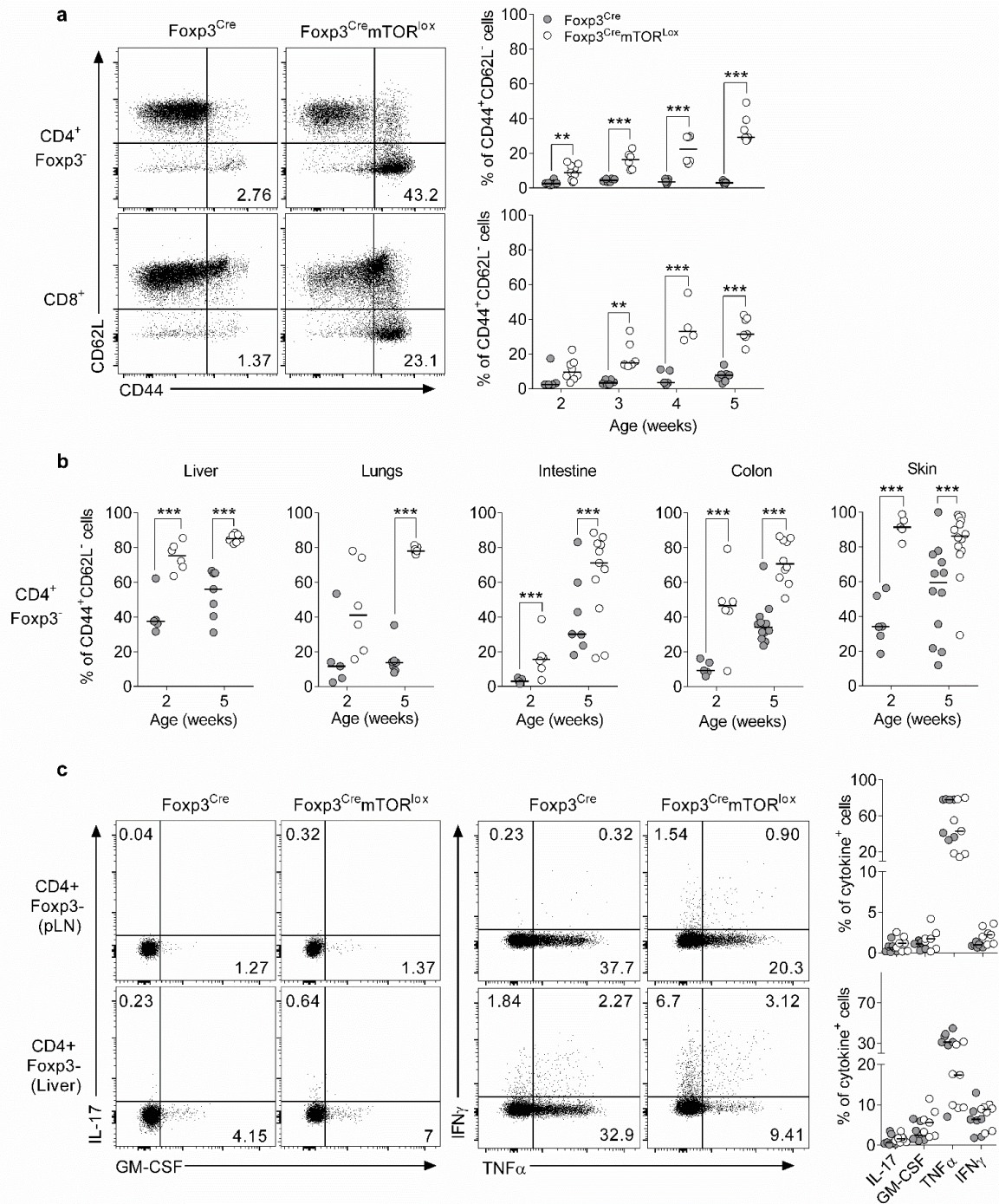
1. Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C.-H. & Jones, R. G. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* **342**, 1242454 (2013).
2. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3589–3594 (2009).
3. Colombetti, S., Basso, V., Mueller, D. L. & Mondino, A. Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 2730–2738 (2006).
4. Zheng, Y. *et al.* A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 2163–2170 (2007).
5. Zheng, Y., Delgoffe, G. M., Meyer, C. F., Chan, W. & Powell, J. D. Anergic T cells are metabolically anergic. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 6095–6101 (2009).
6. Haxhinasto, S., Mathis, D. & Benoist, C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells. *J. Exp. Med.* **205**, 565–574 (2008).
7. Sauer, S. *et al.* T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7797–7802 (2008).
8. Delgoffe, G. M. *et al.* The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* **30**, 832–844 (2009).
9. Delgoffe, G. M. *et al.* The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.* **12**, 295–303 (2011).
10. Liu, C., Chapman, N. M., Karmaus, P. W. F., Zeng, H. & Chi, H. mTOR and metabolic regulation of conventional and regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 837–847 (2015).
11. Michalek, R. D. *et al.* Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 3299–3303 (2011).
12. Basu, S., Hubbard, B. & Shevach, E. M. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 279–283 (2015).
13. Gerriets, V. A. *et al.* Foxp3 and Toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression. *Nat. Immunol.* **17**, 1459–1466 (2016).
14. Angelin, A. *et al.* Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* **25**, 1282–1293.e7 (2017).
15. De Rosa, V. *et al.* Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nat. Immunol.* **16**, 1174–1184 (2015).
16. Procaccini, C. *et al.* The Proteomic Landscape of Human Ex Vivo Regulatory and Conventional T Cells Reveals Specific Metabolic Requirements. *Immunity* **44**, 406–421 (2016).
17. Zeng, H. *et al.* mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* **499**, 485–490 (2013).
18. Chapman, N. M. *et al.* mTOR coordinates transcriptional programs and mitochondrial metabolism of activated Treg subsets to protect tissue homeostasis. *Nat. Commun.* **9**, 2095 (2018).
19. Priyadarshini, B. *et al.* Cutting Edge: TGF- $\beta$  and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signals Modulate Distinct Metabolism of Regulatory T Cell Subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **201**, 2215–2219 (2018).

20. Sun, I.-H. *et al.* mTOR Complex 1 Signaling Regulates the Generation and Function of Central and Effector Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **201**, 481–492 (2018).
21. Risson, V. *et al.* Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J. Cell Biol.* **187**, 859–874 (2009).
22. Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546–558 (2008).
23. Zhou, X. *et al.* Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **10**, 1000–1007 (2009).
24. Duarte, J. H., Zelenay, S., Bergman, M.-L., Martins, A. C. & Demengeot, J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* **39**, 948–955 (2009).
25. Xu, L., Kitani, A., Fuss, I. & Strober, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- $\beta$ . *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 6725–6729 (2007).
26. Yang, X. O. *et al.* Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* **29**, 44–56 (2008).
27. Tone, Y. *et al.* Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* **9**, 194–202 (2008).
28. Kerdiles, Y. M. *et al.* Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* **10**, 176–184 (2009).
29. Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R. A. & Li, M. O. An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* **30**, 358–371 (2009).
30. Kishore, M. *et al.* Regulatory T Cell Migration Is Dependent on Glucokinase-Mediated Glycolysis. *Immunity* **47**, 875–889.e10 (2017).
31. Klysz, D. *et al.* Glutamine-dependent  $\alpha$ -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Sci. Signal.* **8**, ra97 (2015).
32. Xu, T. *et al.* Metabolic control of TH17 and induced Treg cell balance by an epigenetic mechanism. *Nature* **548**, 228–233 (2017).

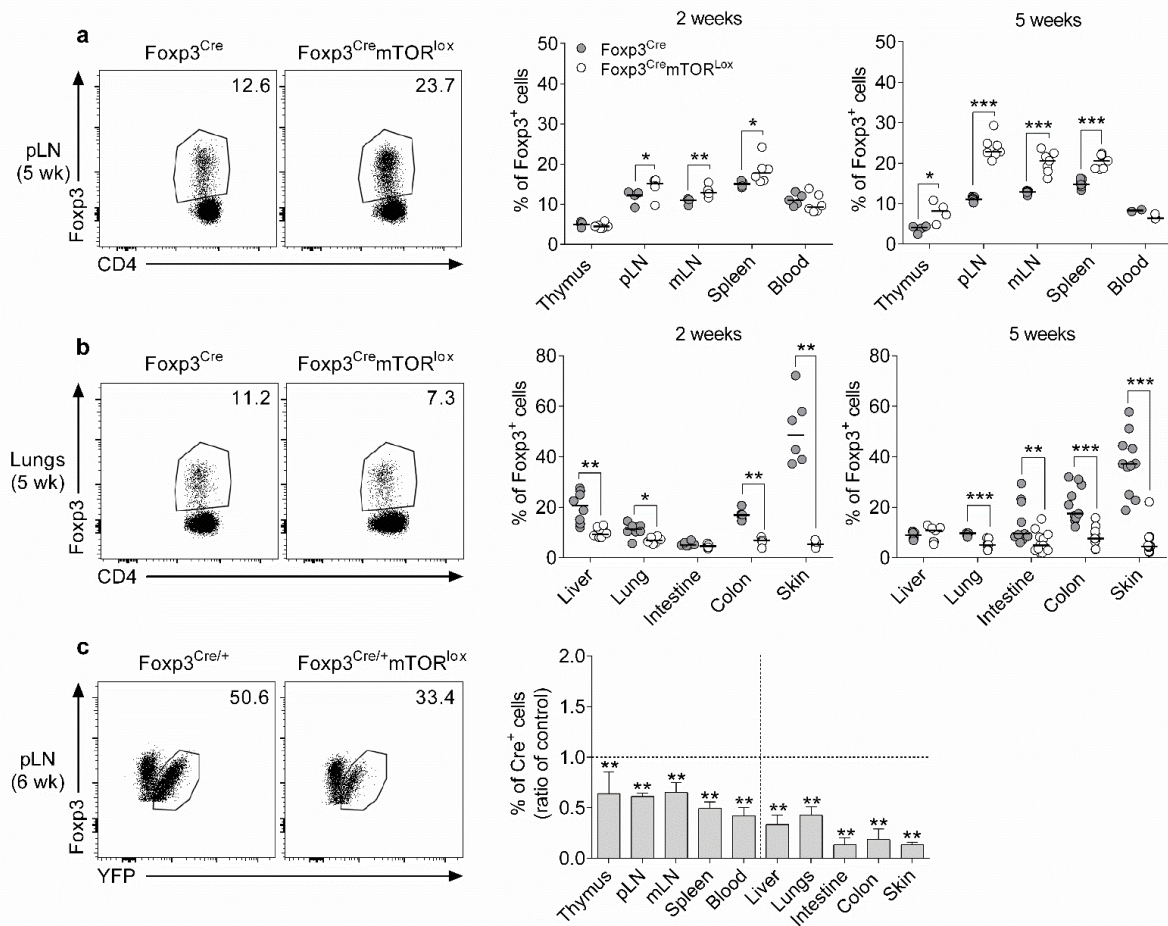


**Fig. 1: mTOR deletion in regulatory T cells (Treg) results in systemic inflammation.** 5 weeks old, *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice were analyzed. **(a)** Treg from lymphoid organs were *ex vivo* stimulated with coated CD3/CD28 antibody and stained with antibody targeting the phosphorylated form of S6 (pS6). Results are a pool of 2 independent experiments. **(b)** Mice survival and **(c)** weight were assessed daily from day 10 (n= 17 vs 16). **(d)** Leukocytes infiltration was visualized through hematoxylin/eosin staining on histological section of liver, lungs, colon, and skin. Results are representative of one experiment **(e)** Leukocytes absolute number in spleen, peripheral (p) and mesenteric (m) lymph nodes (LN), liver and lungs was assessed by flow cytometry. Results are a pool of 3 independent experiments **(d)** Eosinophile were identified by flow cytometry as Ly6C<sup>+</sup>SSC-A<sup>high</sup> cell in CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> cells in the liver and lungs. Results are a pool of 2 independent experiments. **(g)** Cytokines concentration and **(h)** level of antibodies in the serum were assessed by BD<sup>TM</sup>Cytometric Bead Array technology and by ELISA respectively. Results are a pool of 2 independent experiments. Median comparisons for **a**, **e**, **f**, **g** and **h** were performed via Mann Whitney test; survival comparison in **b** was done through Mantel cox test; curve slope comparison in **c** was assessed through non-linear regression comparison. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.

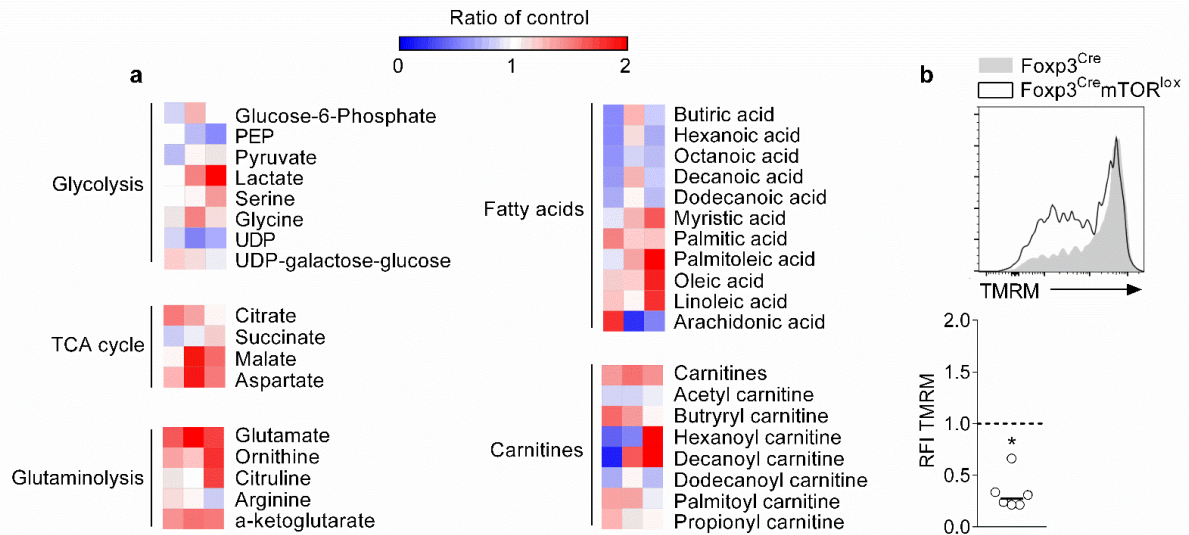




**Fig. 2: mTOR disruption in Treg leads to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconv over activation.** (a) Activated CD4<sup>+</sup> Fxp3<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell were analyzed by flow cytometry for CD44 and CD62L expression in peripheral lymph nodes (pLN) of *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice at different time points. Results are a pool of 3 independent experiments. (b) The same population was identified in CD4<sup>+</sup> Fxp3<sup>-</sup> Tconv in the liver, lungs, intestine, colon and skin of 2 and 5 weeks old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice. Results are a pool of 3 independent experiments. (c) Cytokine production was assessed by flow cytometry in CD4<sup>+</sup> Fxp3<sup>-</sup> Tconv after stimulation for 4h in pLN and liver of 5 weeks old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice. Results are a pool of 3 independent experiments. Median comparisons in a and b were performed via Mann Whitney test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.

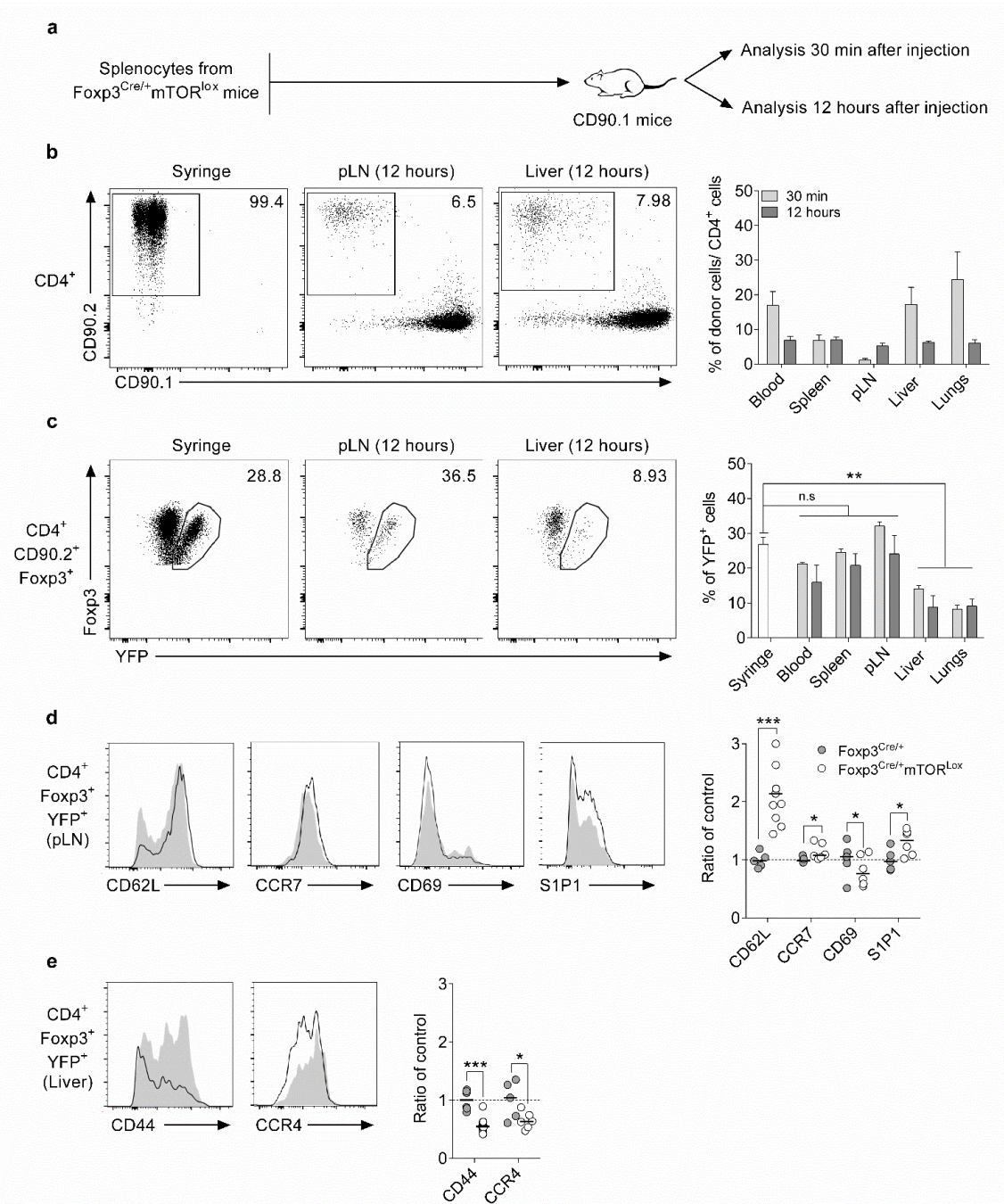


**Fig. 3: Preferential defect of mTOR-deleted Treg in non-lymphoid organs.** Treg proportion was analyzed by flow cytometry as the percentage of *Foxp3<sup>+</sup>* among *CD4<sup>+</sup>* cells in several lymphoid (a) and non-lymphoid (b) organs of 2 and 5 weeks old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice. Results are a pool of 3 independent experiments. (c) Proportion of Cre expressing cells among Treg was analyzed by flow cytometry in several lymphoid and non-lymphoid organs of 6 weeks old control *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* and *Foxp3<sup>Cre/+</sup>mTOR<sup>lox</sup>* mice. This proportion was represented as a ratio of control where values from *Foxp3<sup>Cre/+</sup>mTOR<sup>lox</sup>* mice were divided by the mean value from *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* mice (Thymus, pLN, mLN, Spleen, Liver, Lungs n=14; Blood Colon, Intestine, Skin n=3). Results are a pool of at least 2 independent experiments. Median comparisons in a and b were performed via Mann Whitney test. Theoretical median comparisons in c were done through Wilcoxon signed rank test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.



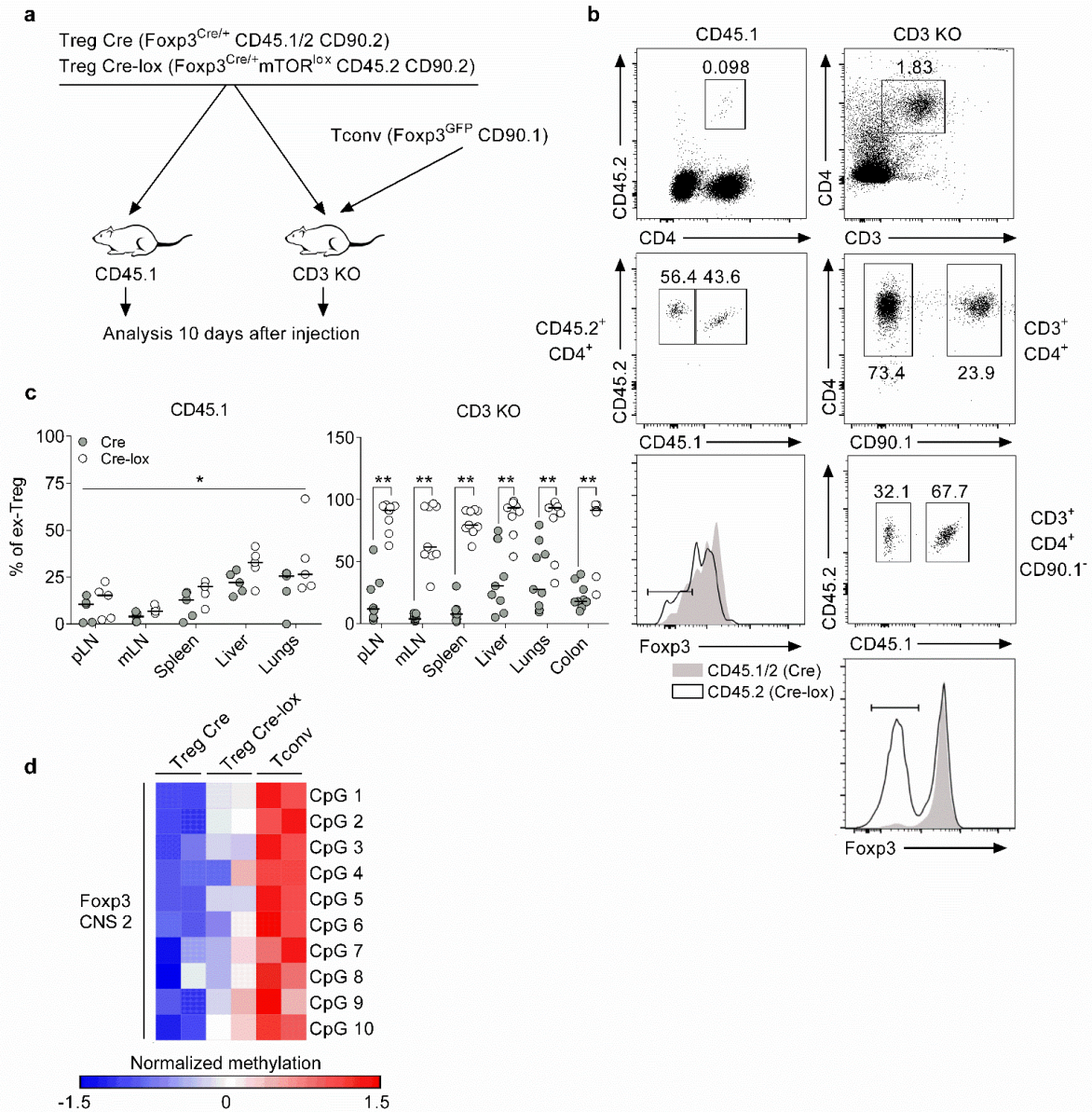
**Fig. 4: mTOR-deficient Treg display intrinsic metabolic alteration.** (a) Metabolites content of Cre expressing Treg from 12 weeks old *Foxp3*<sup>Cre/+</sup> and *Foxp3*<sup>Cre/+</sup>*mTOR*<sup>lox</sup> mice was assessed by mass spectrometry. Each column represent an individual mouse and values were represented as a ratio of control where normalized pic area from *Foxp3*<sup>Cre/+</sup>*mTOR*<sup>lox</sup> mice were divided by the mean of normalized pic area from *Foxp3*<sup>Cre/+</sup> mice. Results are representative of one experiment. (b) Cre expressing Treg from 6 weeks old *Foxp3*<sup>Cre/+</sup> and *Foxp3*<sup>Cre/+</sup>*mTOR*<sup>lox</sup> mice were ex vivo stained with Tetramethylrhodamine (TMRM) and analyzed by flow cytometry. Results are a pool of 2 independent experiments. Theoretical median comparison in b was done via Wilcoxon signed rank test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.



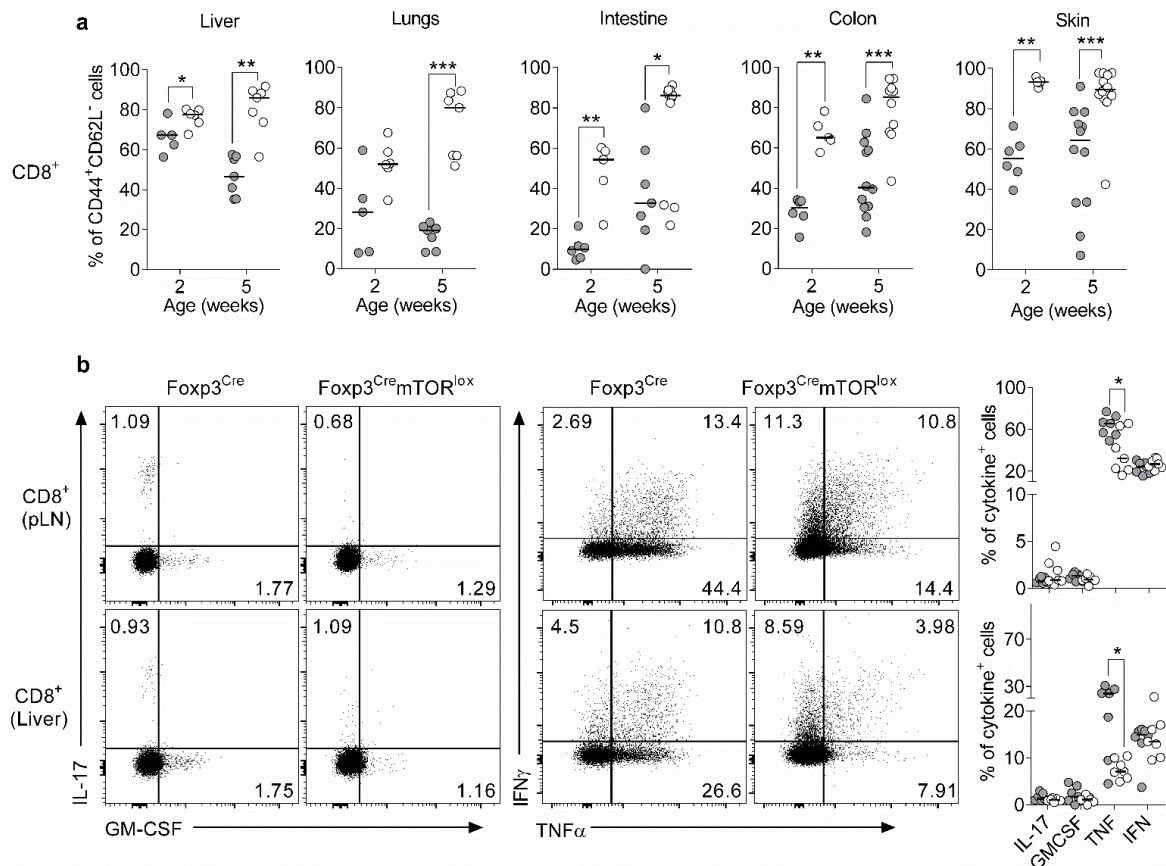


**Fig. 5: mTOR-deficient Treg have decreased migration capacity.** (a) Total splenocytes from  $Foxp3^{Cre/+}mTOR^{lox}$  (CD90.2) were intravenously injected into congenic CD90.1 mice. Several lymphoid and non-lymphoid organs were sampled 30 min and 12 hours after injection and analyzed by flow cytometry. (b) Flow cytometry analysis was realized following this gating strategy to isolate injected cell populations from the host cells. (c) Percentage of Cre-expressing cells among Treg from the donor was assessed by flow cytometry across different organs 30 minutes and 12 hours after injection (Syringe n=3, Blood n=3, Spleen, pLN, Liver, Lungs n=6). Results are a pool of 3 independent experiments. (d) CD62L, CCR7, CD69 and S1P1 expressions were assessed by flow cytometry on Cre expressing Treg coming from pLN of  $Foxp3^{Cre/+}$  and  $Foxp3^{Cre/+}mTOR^{lox}$  mice. Median fluorescence intensities were represented as a ratio of control where values were divided by the mean value from control  $Foxp3^{Cre/+}$  mice. Results are a pool of 3 independent experiments. (e) CD44 and CCR4 expressions were assessed by flow cytometry on Cre expressing Treg coming from liver of  $Foxp3^{Cre/+}$  and  $Foxp3^{Cre/+}mTOR^{lox}$  mice. Median fluorescence intensities were represented as a ratio of control as previously described. Results are a pool of 3 independent experiments. Multiple comparisons in c were assessed by two way ANOVA. Median comparisons in d and e were performed via Mann Whitney test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.



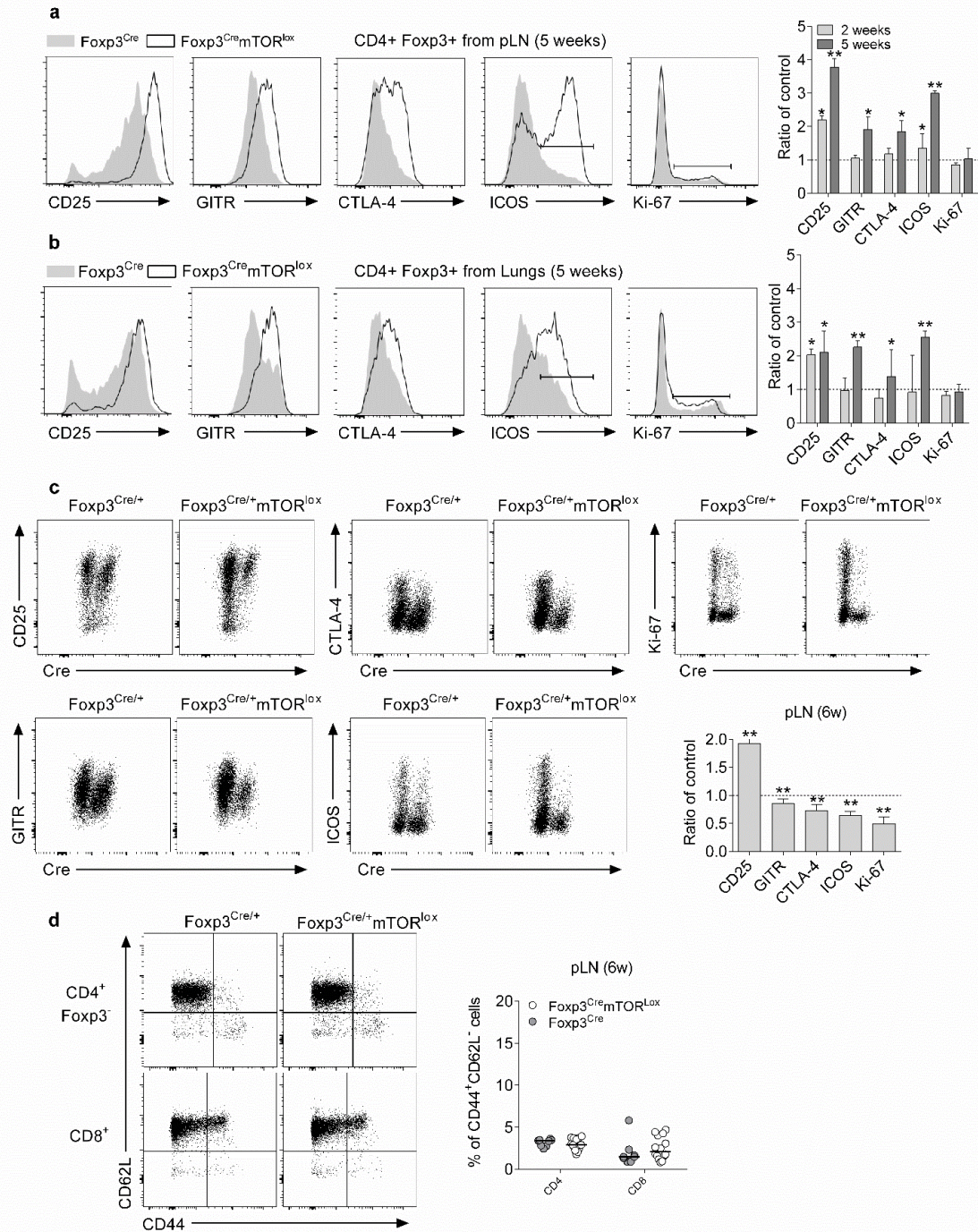


**Fig. 6: mTOR deficiency leads to Treg instability.** (a) Cre-expressing Treg were sorted from  $Foxp3^{Cre/+}$  (CD45.1/2) and  $Foxp3^{Cre/+} mTOR^{lox}$  (CD45.2) mice and were intravenously injected together with CD4<sup>+</sup> Tconv CD90.1<sup>+</sup> in lymphopenic CD3 KO mice or without Tconv in CD90.1 recipient mice. 10 days after injection, several lymphoid and non-lymphoid organs were sampled and analyzed by flow cytometry. (b) Flow cytometry analysis were realized following this gating strategy to isolate the different injected cell populations in CD90.1 and CD3 KO mice. (c) Foxp3 expression in CD45.1/2 (wild type Treg = Cre) and CD45.2 (mTOR deficient Treg = Cre-lox) was assessed by flow cytometry to calculate the percentage of Foxp3<sup>-</sup> cells (ex-Treg) in several lymphoid and non-lymphoid organs. Results are a pool of 3 independent experiments. (d) Methylation status of the CNS 2 region of *foxp3* in Cre expressing Treg coming from  $Foxp3^{Cre/+}$  and  $Foxp3^{Cre/+} mTOR^{lox}$  mice was elicited by bi-sulfite sequencing. Tconv from  $Foxp3^{Cre/+}$  mice were also analyzed as a positive control for methylation. Results are representative of one experiment. Values were represented as scaled (x-mean/standard deviation). Multiple comparison in c were assessed by two way ANOVA. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.



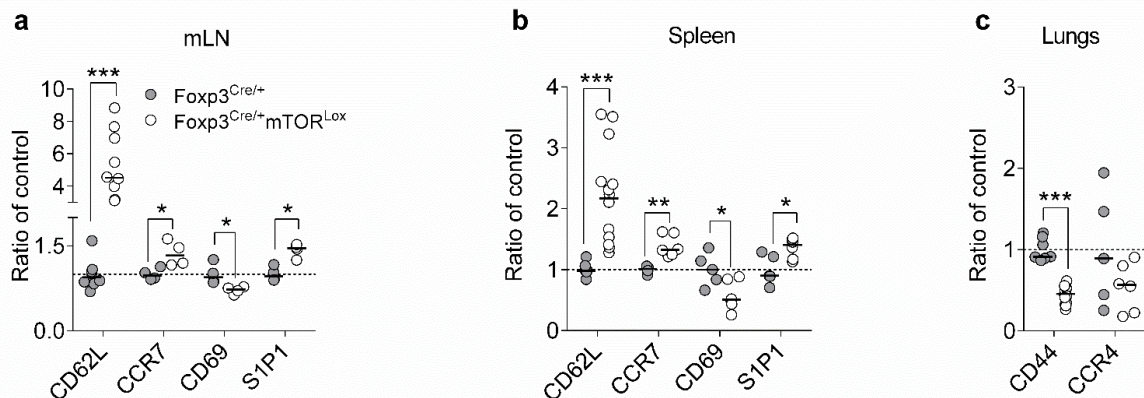
**Supplementary Fig. 1: Proliferation and activation markers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconv from Foxp3<sup>Cre</sup> and Foxp3<sup>Cre</sup>mTOR<sup>lox</sup> mice.** (a) Activated CD8<sup>+</sup> Tconv were visualized by flow cytometry as CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> cells in the liver, lungs, intestine, colon and skin of 2 and 5 weeks old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice. Results are a pool of 3 independent experiments. (b) Cytokine production was assessed by flow cytometry in CD8<sup>+</sup> Tconv after stimulation in pLN and liver of 5 weeks old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice. Results are a pool of 3 independent experiments. Median comparison in a, b, c and d were performed via Mann Whitney test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.





**Supplementary Fig 2: Activation markers of mTOR-deficient Treg in inflamed and uninfamed condition.**

Activation status of Treg from peripheral lymph node (pLN) (a) and lungs (b) of 2 and 5 weeks old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice was assessed by flow cytometry. Median fluorescence intensities (CD25, GITR, CTLA-4) and proportions of positive cells (ICOS, Ki-67) were represented as a ratio of control where values from *Foxp3<sup>Cre</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice were divided by the mean value from *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice (2 weeks, n=6 ; 5 weeks, n=7). Results are a pool of 3 independent experiments. (c) Activation status of Cre expressing Treg from pLN of 6 weeks old *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* and *Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice was assessed by flow cytometry. Median fluorescence intensities (CD25, GITR, CTLA-4) and proportions of positive cells (ICOS, Ki-67) were represented as a ratio of control where values from *Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice were divided by the mean value from *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* mice (n=14). Results are a pool of 3 independent experiments. (d) Activated CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconv were visualized by flow cytometry as CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> cells in the pLN of 6 weeks old *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* and *Foxp3<sup>Cre/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* mice. Results are a pool of 3 independent experiments. Theoretical median comparisons in a, b and c were performed via Wilcoxon signed rank test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.



**Supplementary Fig. 3: Migration markers of mTOR-deficient Treg in lymphoid and non-lymphoid organs.** CD62L, CCR7, CD69 and S1P1 expressions were assessed by flow cytometry on Cre expressing Treg coming from mLN (**a**) and Spleen (**b**) of *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* and *Foxp3<sup>Cre/+</sup>mTOR<sup>lox</sup>* mice. Median fluorescence intensities were represented as a ratio of control where values were divided by the mean value from control *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* mice. Results are pool of 3 independent experiments. (**c**) CD44 and CCR4 expressions were assessed by flow cytometry on Cre expressing Treg coming from lungs of *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* and *Foxp3<sup>Cre/+</sup>mTOR<sup>lox</sup>* mice. Median fluorescence intensities were represented as previously described. Results are pool of 3 independent experiments. Median comparisons in **a**, **b** and **c** were done via Mann Whitney test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.





## 2. Treg et environnement tumoral : importance de la voie AMPK (article en préparation)

### Question

Cette étude a été initiée à la même période que les travaux engagés sur le rôle de mTOR dans la biologie des Treg. Le but de ce travail était d'évaluer la dépendance de ces cellules à l'AMPK et, implicitement, de tester l'hypothèse initiée par les travaux de Rathmell de 2011. Ce projet, en complément de celui mené sur mTOR, devait enrichir notre compréhension du métabolisme des Treg.

### Méthode

De la même manière que pour mTOR, nous avons choisi une approche de perte de fonction de l'AMPK au sein Treg afin d'apprécier leur dépendance à cette protéine. Cette délétion propre aux Treg a été réalisée par l'utilisation des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>Lox</sup>*, permettant une excision de l'exon 3 du gène codant pour l'AMPK parmi les cellules Foxp3+.

### Résultats

Contrairement à mTOR, la perte de l'AMPK au sein des Treg n'a pas eu de conséquences marquées. A l'état basal, le pourcentage, le phénotype ainsi que la fonction suppressive des Treg n'ont pas été altérés suite à la délétion de l'AMPK. La déficience en AMPK a cependant profondément affecté le métabolisme des Treg qui présentaient une réduction de leur activité mitochondriale associée à une forte baisse de glutaminolyse. D'autre part, la croissance de cellules tumorales injectées chez les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>Lox</sup>* était ralentie par rapport aux souris contrôles suggérant ainsi un rôle de l'AMPK dans l'activité pro-tumorale des Treg. Dans ce contexte tumoral, les Treg infiltrant la tumeur des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>Lox</sup>* semblaient présenter un défaut de fonction suppressive. Cette capacité suppressive réduite était associée à une augmentation du nombre de Tconv infiltrant la tumeur ainsi qu'à une production plus importante de TNF $\alpha$  et de granzyme B par ces cellules.

### Conclusion

Ces travaux ont ainsi montré une absence de rôle essentiel de l'AMPK au sein des Treg à l'état basal et ont ainsi participé avec, d'autres études, à la remise en question de notre vision du métabolisme des Treg. De plus, ce travail montre un rôle critique de l'AMPK dans la mise en place de la fonction suppressive des Treg et apportent des informations utilisables pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.



# **AMPK pathway is needed for CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell suppressive function in a tumor context**

Jordane Divoux<sup>1</sup>, Romain Vallion<sup>1</sup>, Marie Laviron<sup>1</sup>, Emilie Ronin<sup>1</sup>, Sylvie Grégoire<sup>1</sup>, Ivan Nemazanyy<sup>2</sup>, Benoit Viollet<sup>3</sup> and Benoit L Salomon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR-S CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Paris, France.

<sup>2</sup> Platform for Metabolic Analyses, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UMS 3633, Paris, France.

<sup>3</sup> Paris Descartes Université, Sorbonne Paris Cité, Institut Cochin, CNRS UMR8104, INSERM U1016, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014, Paris, France.

Correspondence should be addressed to B.L.S. ([benoit.salomon@inserm.fr](mailto:benoit.salomon@inserm.fr)).

### ABSTRACT

Cellular metabolism is now considered as a critical factor in immune cell activity. It has been well studied in conventional T cells (Tconv), in which mammalian target of rapamycin (mTOR) activation promotes glycolysis during TCR stimulation whereas AMP activated protein kinase (AMPK) activity favors mitochondrial metabolism to support memory function. Interestingly, the key tolerance keeper regulatory CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells (Treg) are today believed to harbor a different metabolism than Tconv which would be favored by higher AMPK activity. We thus tested this hypothesis and assessed the role of AMPK in Treg using conditional knock out mouse (*Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>Lox</sup>*). Surprisingly, this mouse didn't developed any sign of inflammation and Treg compartment as well as suppressive function were preserved, suggesting a minor role of AMPK in Treg biology at basal state. AMPK disruption in Treg was nevertheless associated with strong metabolic perturbation as AMPK deficient Treg displayed lower mitochondria activity linked with reduced glutaminolysis. AMPK was moreover needed for Treg in a tumor context, as tumor Treg proportion and tumor growth were reduced in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>Lox</sup>*. Furthermore, AMPK deficiency resulted in decreased expression of several genes involved in Treg suppressive function and was associated with increased Tconv activity within the tumor. Our study thus challenge actual assumption on Treg metabolism and highlight a dynamic used of AMPK by Treg depending on the physiological context.

## INTRODUCTION

There is today a growing interest regarding the role of cellular metabolism in immune cells activity. Several studies demonstrated that T cell undergo major metabolic switch during activation, characterized by increased glycolysis and fatty acid synthesis (FAS) among others<sup>1-3</sup>. Mammalian target of rapamycin (mTOR), a serine threonine kinase active when associated with other proteins in two complexes (mTORC1 and 2), was identified as a crucial actor in this process<sup>4</sup>. mTORC1 activity is induced upon T cell receptor (TCR) engagement, co-stimulation and cytokine stimulation<sup>5,6</sup> and its inhibition using rapamycin prevents T cell activation<sup>7,8</sup>. Under low nutrients condition, mTORC1 activity can be negatively regulated by AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK is a heterotrimeric complex composed of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits which activation requires both phosphorylation of its catalytic  $\alpha$  subunit by upstream kinases such as liver kinase B1 (LKB1)<sup>9</sup> and AMP binding on its regulatory  $\gamma$  subunit<sup>10</sup>. AMPK is activated when AMP/ATP ratio increases, i.e. when the cell is lacking energy<sup>11</sup>. Once activated, AMPK shut down different ATP consuming processes, such as translation or FAS via mTORC1 and acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) inhibition<sup>12</sup> and favors an ATP generating metabolism, such as fatty acid oxidation (FAO) through the inhibition of ACC2<sup>13</sup> or autophagy through the activation of Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1)<sup>14</sup>. Thus, AMPK promotes ATP regeneration and T cell survival in low nutrient content environments, such as in some non-lymphoid tissues, in most tumors or during inflammation.

Whereas the role of major metabolic pathways is well-established in conventional T cells (Tconv), the situation is more controversial and confusing for Forkhead box P3 (Foxp3) regulatory T cells (Treg). A first set of studies reported that, unlike Tconv, Treg mostly rely on oxidative phosphorylation (OXPHOS) and FAO rather than glycolysis to proliferate and survive<sup>15,16</sup>. This specific metabolic program of Treg would be controlled by Foxp3 as its transduction in Tconv increases FAO and OXPHOS<sup>17,18</sup>. Accordingly, Treg would have reduced mTOR activity compared to Tconv, which could be explained by increased activity of different mTOR inhibitors, such as AMPK, phosphatase and tensin homolog (PTEN)<sup>19,20</sup>, tuberous sclerosis 1 (TSC1)<sup>21</sup>, protein phosphatase 2 A (PP2A)<sup>22</sup> and PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases (PHLPP)<sup>23</sup>. Also, Foxp3 seems to inhibit c-Myc activity, another actor promoting glycolysis<sup>24</sup>. In addition, high mTOR activity would be associated with loss of Treg suppressive function and loss of Foxp3 expression<sup>17</sup>. These observations suggest that Treg would display a specific metabolic feature, less reliant on glucose supply, which may explain their abundance in low glucose high lactate environments, such as some inflamed tissues or tumors<sup>24</sup>.

A second set of studies however contradicts these observations. Indeed, the work of Zeng et al. highlighted a critical role of mTORC1 and cholesterol synthesis for Treg suppressive function<sup>25</sup>. This work was followed by two studies showing increased mTOR activity and glycolysis in activated compared to resting Treg<sup>26,27</sup>. Moreover, it seems that mTOR also plays a role in Treg migration toward inflamed site through the induction of a glucokinase<sup>28</sup>. Finally, analysis of ex vivo isolated Treg indicated that these cells are more glycolytic than Tconv, which mostly use FAO at basal state<sup>29</sup>. mTOR and glycolysis thus appears to be essential for Treg activation, proliferation and function. What is the reason of these contradictory findings? A recent work showed that transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a potent AMPK activator in Treg<sup>30</sup>. Since most of the work supporting the preferential use of FAO and OXPHOS by Treg were performed with in vitro differentiated Treg (iTreg) induced by TGF- $\beta$  exposure, the presence of this cytokine may have biased the interpretation of the data. Also, it seems that too much mTOR activity is harmful for Treg stability but too few mTOR activity would impact their suppressive function, as recently discussed<sup>31</sup>. So the role of metabolic pathways in Treg biology requires further analyses.

Because AMPK has a critical function in controlling FAO, OXPHOS and other metabolic pathways, it would be interesting to study mice with conditional knock out in Treg of this kinase, which we did in this study. At steady state, AMPK deletion in Treg was associated with a profound metabolic alteration but mice were healthy and immune cells not activated. However, in models of cancer, AMPK disruption in Treg led to reduced tumor growth and increased Tconv activation, which may be due to an altered Treg-mediated suppression in the tumor. Our data suggest a flexible requirement of AMPK by Treg depending on the context.

## RESULTS

### **Mice with AMPK disruption in Treg are healthy and Treg number and function seem normal at steady state**

To investigate the role of AMPK in Treg biology we crossed the *Prkaa1<sup>lox</sup>* mice, in which the exon 3 of AMPK  $\alpha$ 1 subunit is flanked by two loxP sequences, with the *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice, which have the Cre recombinase inserted in the untranslated region of *Foxp3*. The offspring obtained from this cross, the *Foxp3<sup>Cre</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>* mice, thus harbored a specific deletion of AMPK only in Treg, as confirmed at the protein level (**Figure 1 a**). As already described<sup>32-34</sup>, lack of AMPK in Treg did not result in obvious loss of immune tolerance. The mice were healthy with normal growth curve (**Supplementary figure 1 a**) and leukocyte numbers and proportions of activated CD4<sup>+</sup> Tconv in lymphoid and non-lymphoid organs were

similar in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* and control *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice (**Supplementary figure 1 b, c and not shown**). Moreover, Treg proportion across several lymphoid and non-lymphoid organs was unchanged in *Foxp3<sup>Cre</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>* compared *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice (**Figure 1 b**). Expression of classical Treg markers were either unchanged, as for Foxp3 or cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), or minimally reduced, as for glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) and CD25, in AMPK-deficient Treg (**Figure 1 c**). In addition, ex vivo sorted Treg from *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice exerted a similar capacity to inhibit CD4<sup>+</sup> Tconv proliferation in vitro compare to control Treg (**Figure 1 d**). Altogether, these data confirm previous findings and reinforce the idea that AMPK activity is not essential for Treg homeostasis and function at basal state.

### **AMPK deficient-Treg have an altered metabolism**

Because AMPK is described as a critical regulation node of cellular metabolism, we next decided to analyze the consequences of AMPK deficiency on Treg metabolism. We first quantified the phosphorylated form of ACC (p-ACC), a major hallmark of AMPK activity. In the *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice, p-ACC was almost completely lost in Treg whereas it was present at normal levels in other immune cells (**Figure 2 a**), confirming that AMPK activity was indeed abolished in Treg of these mice. Since AMPK inhibits mTORC1 activity, we quantified phosphorylated S6 (p-S6), one of its major target, and found increased p-S6 in AMPK deficient Treg suggesting an increased mTORC1 activity (**Figure 2 b**). The increased mTOR and decreased AMPK activities in these Treg would likely have major impact on their cellular metabolism, such as FAO, glycolysis or glutaminolysis<sup>13,35</sup>. Compared to controls, AMPK-deficient Treg had reduced mitochondria membrane potential while the mass of this organelle was unchanged, suggesting a decrease of mitochondria activity (**Figure 2 c**). This reduced activity was not associated with increased mitochondria reactive oxygen species (ROS) production but correlated with a tendency to a lower fatty acid uptake (**Figure 2 c**). Interestingly, oxygen consumption rate (OCR) was severely decreased in AMPK deficient Treg and correlated with a trend to higher extra cellular acidification rate (ECAR) after T cell receptor stimulation (**Figure 2 d**). Furthermore, high-resolution analysis of metabolite content suggested alterations of metabolic pathways in AMPK deficient Treg compared to control. AMPK disruption in Treg was associated with increased metabolites belonging to the first steps of glycolysis and hexoamines synthesis, but decreased metabolites belonging to the serine/glycine, pentose phosphate pathway (PPP), tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle, glutaminolysis and urea cycle pathways (**Figure 2 e**). AMPK deletion also resulted in a



decrease of unsaturated long-chain fatty acids (LCFA) and clear accumulation of saturated short-chain (SC) FA and LCFA conjugated to carnitines in Treg (**Figure 2 e**). Concerning nucleotides, the AMP, ADP and ATP amounts were unchanged but the NAD/NADH ratio was increased in AMPK-deficient Treg compared to controls (**Figure 2 e**). To summarize, this set of data shows that AMPK deficiency in Treg leads to clear metabolic changes with alteration of glycolysis with up- or down-regulation of associated side chains (hexoamines, serine/glycine and pentose phosphate pathways), probably major down-regulation of glutaminolysis and its associated side chain (urea cycle) and major alteration of FA metabolism. These metabolic changes did not impact the ability of AMPK deficient Treg to expand *in vivo* and were even associated with slightly increased proliferation capacity of AMPK deficient Treg *in vitro* (**Supplementary figure 1 d, e**).

### **Reduced tumor growth in mice with AMPK-deficient Treg, which may be due to reduced Treg-mediated suppression in the tumor**

Our data showed so far that AMPK activity seems dispensable for Treg at basal state. Because AMPK pathway is known to be critical to face energetic stress due for instance to nutrient starvation<sup>36</sup>, we then investigated the capacity of AMPK deficient Treg to exert their function in a tumor context. Indeed, the high glycolytic activity of most tumor cells generates a glucose-low environment for infiltrating immune cells. We thus inoculated MCA fibrosarcoma subcutaneously in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>* control mice. Interestingly, we observed a reduced tumor growth in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice compared to controls (**Figure 3 a**), a phenomenon that was also found with the MC38 colon carcinoma cell line (**Supplementary figure 2 a**). This slowed tumor growth was associated with increased tumor leukocytes infiltration (**Figure 3 b**). Also, Treg proportion within the tumor was decreased in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice compared to controls from day 10 day after tumor inoculation, an effect that was more visible at later time points (day 20 for MCA and day 38 for MC38 (**Figure 3 c**, **Supplementary figure 2 b**). However, this decreased Treg proportion was not due to lower Treg number, as it actually increased over time, but to an increase of CD4<sup>+</sup> Tconv number in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice (**Figure 3 d, e**). Increased number over time was also true for CD8<sup>+</sup> Tconv (**Figure 3 f**) and result in higher density of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconv per mg of tumor 20 days after tumor graft (**Supplementary figure 2 c, d, e**). These differences of number and proportion were not observed in draining lymph node (dLN) (**Supplementary figure 3 a, b, c, d**). Altogether, these data suggest a functional alteration of AMPK-deficient Treg infiltrating the tumor. To address this question, we performed a transcriptomic analysis of tumor Treg from

*Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice at day 10 of tumor inoculation, a timing when tumor sizes were comparable between the two groups. In the 26 genes that were differentially expressed (FDR<0.05, log<sub>2</sub>FC>0.5), most of them (20 out of 26) were downregulated in AMPK-deficient Treg, including *Prkaa1* (**Figure 3 g**). Among them, two were of particular interest because of their possible function in Treg suppressive activity, *Lrrc32* coding for GARP (**Supplementary figure 4 a**) and *Arg1* coding for Arginase 1 (**Figure 3 h**). Reduction of GARP expression was confirmed at the protein level (**Supplementary figure 4 b**) but only showed a weak decrease. Furthermore, lower GARP expression by Treg had no impact on TGF- $\beta$  signaling as pSmad 1/3 staining was unchanged in Treg nor Tconv (**Supplementary figure 4 c, d, e**). Nevertheless, gene ontology analysis (FDR<0.05) of down-regulated genes in AMPK deficient Treg highlighted their involvement in regulation of T cell and myeloid cell activation (**Figure 3 i**). Of note, transcriptomic analysis of AMPK deficient Treg in dLN only resulted in 11 differentially expressed genes which were not associated with particular gene ontology (**Supplementary figure 3 e and not shown**). Altogether, these data show that reduced tumor growth in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice was associated with decreased Treg proportion in the tumor due to increased CD4<sup>+</sup> Tconv number and reduced Treg expression of genes implicated in the regulation of T and myeloid cell activation. All these observations were tumor specific and were not reported in dLN suggesting a link with the tumor environment.

#### **AMPK deletion in Treg results in increased Tconv activity and neutrophils infiltration in the tumor**

To better understand the origin of the reduced tumor growth in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice, we further analyzed tumor Tconv. Compared to controls, lower proportion of Tconv expressed the programmed cell death 1 (PD-1) inhibitory receptor and CD8<sup>+</sup> Tconv expressed slightly more granzyme B in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice (**Figure 4 a, b**). Furthermore, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) production by tumor infiltrating CD4<sup>+</sup> Tconv was increased in these mice (**Figure 4 c**). Proportion of natural killer (NK) cells was unchanged. We also analyzed myeloid cells that are essential players of anti-tumor responses<sup>37,38</sup>. Whereas proportion of dendritic cells, macrophages or eosinophils in the tumors were unchanged, proportion of neutrophils (CD11b<sup>+</sup>, Ly6-C<sup>hi</sup>, Ly6-G<sup>hi</sup>) was increased in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* compared to controls (**Figure 4 d**). Altogether, these data suggest that AMPK deletion in Treg results in increased anti-tumor activity of Tconv and increased proportion of neutrophils in the tumors.

## DISCUSSION

Although AMPK deletion significantly modifies Treg metabolism, Treg homeostasis and function seem to be preserved. Thus, unlike other major metabolic regulators, such as mTOR or LKB1, AMPK appears to exert minor role in Treg biology at basal state. The situation is quite different in a glucose depleted environment, for example in the vicinity of a tumor, where Treg function seems to be dependent on AMPK. Our data thus enrich the debate on the role of AMPK and its associated metabolic pathways in the biology of Treg.

As mentioned above, AMPK disruption strongly affect Treg basal metabolism, especially OXPHOS. Indeed, we reported lower OCR and decreased mitochondria membrane potential, suggesting a potential reduction of ETC activity in these cells. Increased NAD<sup>+</sup>/NADH ratio rather suggest a fueling problem of the ETC rather than a disruption of its structure itself, which is consistent with the decrease of some metabolites of the TCA cycle. One could ask the origin of such decrease of TCA intermediates in AMPK deficient Treg. First, we reported a decrease in glutaminolysis, which could close the door to  $\alpha$ -ketoglutarate coming from glutamine to fuel the TCA cycle. It has been shown that in a depleted glucose condition, AMPK favors this metabolic route in Tconv<sup>39</sup>, this phenomenon may also be true for Treg. Moreover, we observed a drop in pyruvate which could suggest a defective supply of TCA cycle by glycolysis. Interestingly we noted a trend to increased acetyl-CoA, which is not consistent with this idea. Surprisingly, increased acetyl-CoA was associated with elevated acyl-carnitine, suggesting intact carnitine palmitoyl transferase 1 a (Cpt1a) activity and raised FAO, which is not expected in the absence of AMPK, when ACC is no more inhibited. It is difficult to conclude unequivocally on the basis of the metabolites analyzed but one could speculate that reduce supply of the TCA cycle leads to increased FAO independently of AMPK and ACC to compensate the lack of acetyl-CoA in the mitochondria. Regarding glycolysis, it appears that AMPK deficient Treg display a partial interruption downstream of fructose-6-phosphate as we saw glucose-6-phosphate accumulation, increased hexoamines synthesis, relative maintenance of PPP pathway and a fall of serines synthesis and pyruvate. The consequences of this could be beneficial for Treg as it has been shown that increased hexoamines synthesis is linked with stronger Foxp3 stability<sup>40</sup>, but also detrimental as reduce purines synthesis could impact their proliferation. However, this default was possibly compensated by external supply of serine in our system as we didn't observed reduced proliferation of our AMPK deficient Treg.

Even if AMPK deletion did not strongly affect Treg at basal state, the loss of this protein was deleterious for Treg in a tumor context as we described decreased Treg proportion in the tumor and slowed tumor growth in *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. One could explain this reduced proportion

of Treg because of low glucose environment which would require AMPK to survive or proliferate. However, our data do not go in this direction because we do not see lack of Treg spreading in the tumor but rather an excessive Tconv expansion, thus suggesting altered suppressive function of AMPK deficient Treg. We identified GARP as a potential candidate to explain decreased Treg function as it is documented to participate to TGF- $\beta$  mediated suppression by Treg<sup>41</sup>. This hypothesis is interesting because it was described that the GARP KO in Treg leads to increased anti-tumor immunity<sup>42</sup>. However, GARP difference at the protein level was weak and we did not see a decrease of pSmad 1/3 signaling neither in Treg nor Tconv, so this hypothesis is unlikely to be true. Another candidate to explain decreased Treg suppressive function is arginase 1. The role of this enzyme is well known in the suppressive function of myeloid suppressive cells. It induces local depletion of arginine, which is essential for Tconv proliferation through mTOR activation<sup>43</sup> and survival of these cells in tumor via OXPHOS induction<sup>44</sup>. Nothing is known about the role of arginase 1 in the suppressive function of Treg, probably because its expression is null in lymphoid tissues. This expression is however strongly induced in the tumor and seems to be dependent on AMPK. Thus, the suppressive power of AMPK deficient Treg could be decreased in tumors because of less efficient depletion of arginine. Moreover, metabolites analysis of AMPK deficient Treg in lymphoid tissues shows a strong decrease of ornithine and citruline which could be explained by reduced glutaminolysis associated with AMPK defect. Unfortunately, this metabolite assay cannot be done in tumor Treg for technical reasons, but this decrease in ornithine and citruline may be even more pronounced in this context for at least two reasons. First, activation of glutaminolysis by AMPK has been described in low glucose conditions, which is probably the case in tumors. Thus, the lack of feeding of the urea cycle could be more pronounced in tumors than in non-inflamed lymphoid tissues. Second, arginase 1 activity in Treg is higher in tumor and this enzyme allows the conversion of arginine to ornithine which will itself become citruline. Thus, the lack of this enzyme by AMPK deficient Treg could have a stronger impact on the production of ornithine and citruline in this context.

What could be the consequences of a reduction of the urea cycle in tumor Treg? One possibility would be a defect of polyamines synthesis initiated from ornithine. Interestingly, some data show important role of polyamines on Tconv activation<sup>45,46</sup>, however, nothing is known about the role of this pathway in Treg. One might think that their activation and perhaps their suppressive program is linked to this pathway but further investigations are needed to answer this question.

## METHODS

### Mice

Foxp3-CRE-IRES-YFP (*Foxp3<sup>Cre</sup>*) knock-in mice were kindly given by Pr. Alexander Rudensky. *Prkaa1<sup>Lox</sup>* mice were purchased at Jackson laboratory (Jax14141.Prkaa1<sup>tm1Sjm/J</sup>). CD3 KO (*CD3<sup>etm1Mal</sup>*) mice were obtained from the cryopreservation distribution typing and animal archiving department (Orléans, France). Cancer models were set up by subcutaneous injection of 0.25 million MCA cells or 0.5 million MC38 cells on animal flank. Tumor volume was measured every three days according to the following formula:

$$Volume = \frac{(width^2 \times length)}{2}$$

All mice were on a C57Bl/6J background and were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with European Union guidelines.

### Western blot

1 million cells were lysed in ice-cold lysis buffer composed of 50 mM Tris, pH 7.4, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 50 mM NaF, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25 mM sodium-β-glycerophosphate, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF and protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche). Lysates were sonicated on ice for 10 seconds to shear DNA and reduce viscosity. The homogenates were centrifuged for 10 minutes at 10,000 x g at 4°C, and the supernatants were collected for the determination of total protein content with a BCA protein assay kit (ThermoFisher). Supernatant proteins (5 μg) were separated by SDS-PAGE in 7.5% acrylamide gels and the resulting bands were transferred to nitrocellulose membranes. Equal loading was checked by Ponceau Red staining of the blot membrane before blocking by incubation for 30 minutes at 37°C with Tris-buffered saline supplemented with 0.05% NP40 and 5% non fat dry milk. Immunoblotting was performed according to standard procedures, and the signals were detected with chemiluminescence reagents (ThermoFisher). Primary antibodies were directed against: total acetyl-CoA carboxylase (ACC) (#3676), ACC phosphorylated at Ser79 (#3661) (from Cell Signaling Technologies) and total AMPKα1 (a kind gift from G. Hardie, University of Dundee)

### Cell preparation from tissues

For lymphoid tissues, cells were isolated by mechanical dilacerations. For non-lymphoid tissues, anesthetized mice were perfused intracardially with cold PBS. Small pieces

of livers and lungs were digested in type IV collagenase (0.3 mg/ml) and DNase I (100 µg/ml) for 30 min at 37°C, followed by Percoll gradient (40–80%) separation. Small pieces of tumor, were digested in type IV collagenase (1 mg/ml), type D collagenase (0.05 mg/mL) and DNase I (10 µg/ml) for 30 min at 37°C, followed by Percoll gradient (40–80%) separation. For cytokines assessment, leukocytes were stimulated for 4 hours in RPMI 1640 10% FCS containing phorbol 12-myristate 13-acetate (25 ng/mL), Ionomycine (1 µg/mL) and Golgi plug from BD Biosciences.

### **Antibodies and flow cytometry analysis**

The following mAbs from BD Biosciences were used: anti-CD45 (30-F11), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD62L (MEL-14), anti IFN $\gamma$  (XMG1.2), anti CD19 (1D3), anti TNF (MP6-XT22), anti-CD25 (PC61 or 7D4), anti-GITR (DTA-1), anti-CTLA-4 (UC10-4F10-11), anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (HL3), anti-IA/E (M5/114.15.2), anti F4/80 (BM8) anti-Ly6C (AL-21), anti-Ly6G (1A8). Anti-CD3 (145-2C11), anti-Foxp3 (FJK-16s), anti-CD44 (IM7), anti granzyme B (GB11), anti NKP46 (29A1.4), anti PD-1 (J43), anti-Ki-67 (SOLA15), lived dead (e780) were purchased from eBioscience, and Foxp3 staining was performed using the eBioscience kit and protocol. Cells were acquired on a BD LSRII and a BD Fortessa X20 cytometers and analyzed using FlowJo software.

### **Metabolic staining**

Analysis of phospho-protein by cytometry was realized as following. 2 million immune cells were stimulated ex-vivo using coated  $\alpha$ CD3/CD28 (2 µg/mL) for 6 hours, fixed and permeabilized using transcription factor phospho buffer set perm III (BD bioscience). Cell were then stained using anti p-S6 antibody (D57.2.2E) from cell signaling technologies. Mitochondria mass and membrane potential were respectively assessed using 400 nM mito-tracker deep red (Thermofisher) and 200 nM tetramethylrhodamine (TMRM) (Thermofisher) diluted in PBS and incubated for 20 minutes at 37°C. Lipids uptake was analyzed via Bodipy FLC16 (Thermofisher) staining (1 uM) diluted in PBS and incubated for 20 min at 37°C. Mitochondrial ROS production was estimated thanks to Mito-tracker CMX ROS (Thermofisher) staining (500 nM) diluted in PBS and incubated for 20 min at 37°C.

### **Treg and Tconv cell purification**

Leukocytes from cervical, peripheral (brachial, axillary, inguinal) lymph nodes and spleen were isolated by mechanical dilacerations. Treg were then purified after enrichment of

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

### **Cell cultures**

After labeling with Cell Trace Violet Proliferation Kit (Life technologies), purified Treg (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>, 25 x 10<sup>3</sup> cells/well) were cultured with or without whole splenocyte from CD3 KO mice (7.5 x 10<sup>4</sup> cells/well), anti-CD3 mAb (0,05µg/ml, BioXcell), and IL-2 (10ng/ml, Peproteck) in a 96-well round plate in RPMI 1640 10% FCS. For suppression assays, after labeling with Cell Trace Violet Proliferation Kit (Life technologies), Tconv cells (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>-</sup>, 2.5 x 10<sup>4</sup> cells/well) were co-cultures with various Treg (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>) numbers and stimulated by splenocytes from CD3 KO mice (7.5 x 10<sup>4</sup> cells/well) and soluble anti-CD3 (0.05µg/ml 2C11, BioXCell) in RPMI 1640-10% FCS. Cells were cultured in 96 wells round plate for 3 days at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### **Extra cellular flux analysis**

Treg were ex vivo sorted as previously described. Cells were then coated in a 96 wells plate (300 000 cells per well) using cell tack (Corning), 6 experimental replicates were realized for each population of Treg. For mitochondrial stress test, a cartridge was loaded with the following drugs: oligomycin (1 µM), FCCP (1 µM), Rotenone/antymycin (0.5 µM) and together with the 96 well plate were put in a XF96 analyzer (Agilent). For glycolysis assessment, the cartridge was loaded with either glucose (20 mM) or bead coated with anti CD3/CD28 antibodies (4 beads per cell) (Thermofisher). Oxygen consumption rate (OCR) and extra cellular acidification rate (ECAR) were then measured at basal state and after drugs addition.

### **Targeted LC-MS metabolites analyses**

For metabolomic analysis 3 x 10<sup>5</sup> cells were used for extraction. Extraction solution was composed of 50% methanol, 30% ACN, and 20% water. The volume of extraction solution added was adjusted to cell number (1 ml/2x10<sup>6</sup> cells). After addition of extraction solution, samples were vortexed for 5 min at 4°C and then centrifuged at 16,000g for 15 min at 4°C. The

supernatants were collected and stored at 80°C until analyses. LC/MS analyses were conducted on a QExactive Plus Orbitrap mass spectrometer equipped with an Ion Max source and a HESI II probe and coupled to a Dionex UltiMate 3000 UPLC system (Thermo, USA). External mass calibration was performed using the standard calibration mixture every 7 days as recommended by the manufacturer. 5 µl of each sample was injected onto Zic-pHilic (150 mm × 2.1 mm i.d. 5 µm) with the guard column (20 mm × 2.1 mm i.d. 5 µm) (Millipore) for the liquid chromatography separation. Buffer A was 20 mM ammonium carbonate, 0.1% ammonium hydroxide (pH 9.2); buffer B was acetonitrile. The chromatographic gradient was run at a flow rate of 0.200 µl/min as follows: 0–20 min; linear gradient from 80% to 20% B; 20–20.5 min; linear gradient from 20% to 80% B; 20.5–28 min: hold at 80% B (MacKay et al., 2015). The mass spectrometer was operated in full scan, polarity switching mode with the spray voltage set to 2.5 kV, the heated capillary held at 320°C. The sheath gas flow was set to 20 units, the auxiliary gas flow was set to 5 units, and the sweep gas flow was set to 0 unit. The metabolites were detected across a mass range of 75–1,000 m/z at a resolution of 35,000 (at 200 m/z) with the AGC target at  $10^6$ , and the maximum injection time at 250 ms. Lock masses were used to insure mass accuracy below 5 ppm. Data were acquired with Thermo Xcalibur software (ThermoFisher). The peak areas of metabolites were determined using Thermo TraceFinder software (ThermoFisher), identified by the exact mass of each singly charged ion and by known retention time on the HPLC column.

### **Transcriptomic analysis**

RNA from  $1.10^3$  ex vivo sorted Treg from the tumor of *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice was extracted using the NucleoSpin RNA XS kit from Macherey-Nagel, quantified using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and purity/integrity was assessed using disposable RNA chips (Agilent High Sensitivity RNA ScreenTape) and an Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Waldbrunn, Germany). mRNA library preparation were performed following manufacturer's recommendations (SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit TAKARA). Final 6 samples pooled library prep were sequenced on Nextseq 500 ILLUMINA with HighOutput cartridge (2x400Millions of 75 bases reads), corresponding to 2 times  $20 \times 10^6$  reads per sample after demultiplexing. Poor quality sequences have been trimmed or removed with Trimmomatic software to retain only good quality paired reads. Star v2.5.3a {Dobin, 2013 #1263} has been used to align reads on reference genome mm10 using standard options. Quantification of gene and isoform abundances has been done with rsem 1.2.28 {Li, 2011 #1266}, prior to normalisation on library size with DESeq2



bioconductor package. Finally, differential analysis has been conducted with edgeR bioconductor package. Multiple hypothesis adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR.

### **Statistical analysis and heatmap representation**

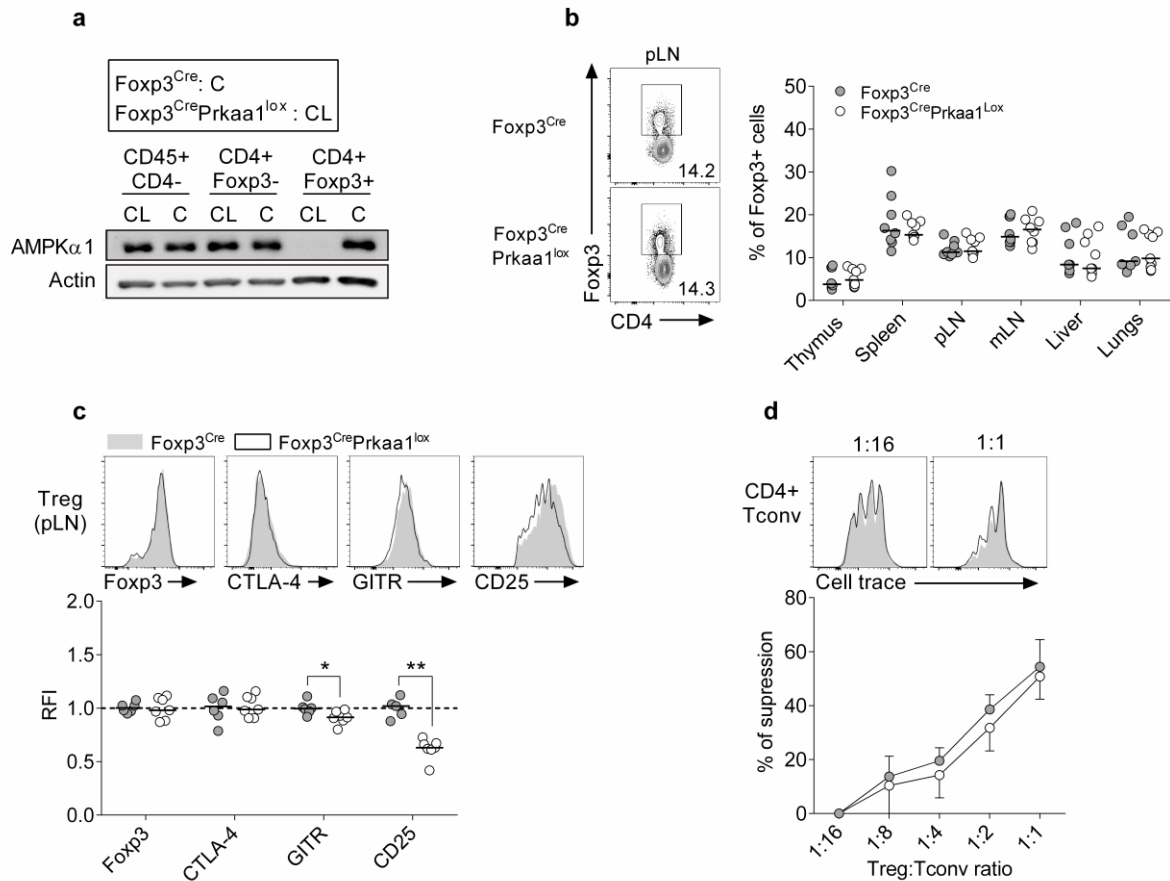
Statistical analyses were performed using Prism Software (Graphpad). Statistical significance was determined using a log-rank (Mantel- Cox) test for mice survival data. Curve slope comparison was done through nonlinear regression comparison. Multiple comparisons were realized via one and two way ANOVA with Sidak correction. Two-tailed unpaired nonparametric Mann–Whitney U test was used for medians comparison. Theoretical median comparison were realized via Wilcoxon signed rank test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Median representation were used throughout the figures. Heatmap were drawn using R software (CRAN).

## BIBLIOGRAPHY

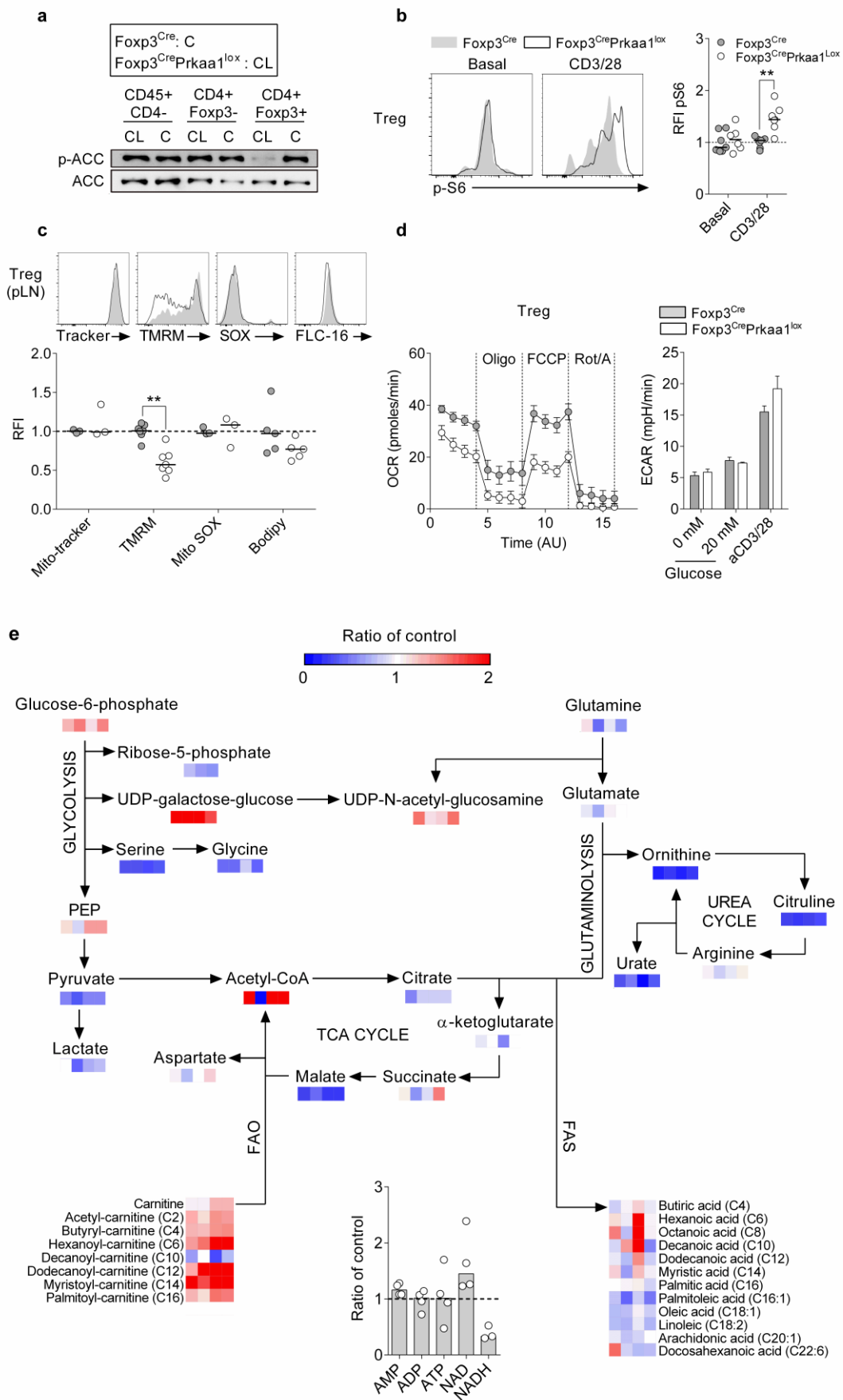
1. Van der Windt, G. J. W. & Pearce, E. L. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol. Rev.* **249**, 27–42 (2012).
2. Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C.-H. & Jones, R. G. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* **342**, 1242454 (2013).
3. Maciolek, J. A., Pasternak, J. A. & Wilson, H. L. Metabolism of activated T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 60–74 (2014).
4. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3589–3594 (2009).
5. Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W. & Thompson, C. B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 6869–6876 (2001).
6. Colombetti, S., Basso, V., Mueller, D. L. & Mondino, A. Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 2730–2738 (2006).
7. Zheng, Y. *et al.* A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 2163–2170 (2007).
8. Zheng, Y., Delgoffe, G. M., Meyer, C. F., Chan, W. & Powell, J. D. Anergic T cells are metabolically anergic. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 6095–6101 (2009).
9. Hawley, S. A. *et al.* Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* **2**, 28 (2003).
10. Xiao, B. *et al.* Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* **472**, 230–233 (2011).
11. Oakhill, J. S. *et al.* AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* **332**, 1433–1435 (2011).
12. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226 (2008).
13. Davies, S. P., Sim, A. T. & Hardie, D. G. Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* **187**, 183–190 (1990).
14. Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456–461 (2011).
15. Michalek, R. D. *et al.* Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 3299–3303 (2011).
16. Gerriets, V. A. *et al.* Metabolic programming and PDHK1 control CD4<sup>+</sup> T cell subsets and inflammation. *J. Clin. Invest.* **125**, 194–207 (2015).
17. Gerriets, V. A. *et al.* Foxp3 and Toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression. *Nat. Immunol.* **17**, 1459–1466 (2016).
18. Howie, D. *et al.* Foxp3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *JCI Insight* **2**, e89160 (2017).
19. Delgoffe, G. M. *et al.* Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* **501**, 252–256 (2013).
20. Shrestha, S. *et al.* Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses. *Nat. Immunol.* **16**, 178–187 (2015).
21. Park, Y. *et al.* TSC1 regulates the balance between effector and regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 5165–5178 (2013).

22. Apostolidis, S. A. *et al.* Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **17**, 556–564 (2016).
23. Basu, S., Hubbard, B. & Shevach, E. M. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 279–283 (2015).
24. Angelin, A. *et al.* Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* **25**, 1282–1293.e7 (2017).
25. Zeng, H. *et al.* mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* **499**, 485–490 (2013).
26. Sun, I.-H. *et al.* mTOR Complex 1 Signaling Regulates the Generation and Function of Central and Effector Foxp3+ Regulatory T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **201**, 481–492 (2018).
27. Chapman, N. M. *et al.* mTOR coordinates transcriptional programs and mitochondrial metabolism of activated Treg subsets to protect tissue homeostasis. *Nat. Commun.* **9**, 2095 (2018).
28. Kishore, M. *et al.* Regulatory T Cell Migration Is Dependent on Glucokinase-Mediated Glycolysis. *Immunity* **47**, 875–889.e10 (2017).
29. Procaccini, C. *et al.* The Proteomic Landscape of Human Ex Vivo Regulatory and Conventional T Cells Reveals Specific Metabolic Requirements. *Immunity* **44**, 406–421 (2016).
30. Priyadarshini, B. *et al.* Cutting Edge: TGF- $\beta$  and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signals Modulate Distinct Metabolism of Regulatory T Cell Subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **201**, 2215–2219 (2018).
31. Zeng, H. & Chi, H. mTOR signaling in the differentiation and function of regulatory and effector T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **46**, 103–111 (2017).
32. He, N. *et al.* Metabolic control of regulatory T cell (Treg) survival and function by Lkb1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 12542–12547 (2017).
33. Wu, D. *et al.* Lkb1 maintains Treg cell lineage identity. *Nat. Commun.* **8**, 15876 (2017).
34. Yang, K. *et al.* Homeostatic control of metabolic and functional fitness of Treg cells by LKB1 signalling. *Nature* **548**, 602–606 (2017).
35. Liu, C., Chapman, N. M., Karmaus, P. W. F., Zeng, H. & Chi, H. mTOR and metabolic regulation of conventional and regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 837–847 (2015).
36. Blagih, J., Krawczyk, C. M. & Jones, R. G. LKB1 and AMPK: central regulators of lymphocyte metabolism and function. *Immunol. Rev.* **249**, 59–71 (2012).
37. Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 253–268 (2012).
38. Engblom, C., Pfirschke, C. & Pittet, M. J. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 447–462 (2016).
39. Blagih, J. *et al.* The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. *Immunity* **42**, 41–54 (2015).
40. Liu, B. *et al.* The lineage stability and suppressive program of regulatory T cells require protein O-GlcNAcylation. *Nat. Commun.* **10**, 354 (2019).
41. Shevach, E. M. Garp as a therapeutic target for modulation of T regulatory cell function. *Expert Opin. Ther. Targets* **21**, 191–200 (2017).
42. Salem, M. *et al.* GARP Dampens Cancer Immunity by Sustaining Function and Accumulation of Regulatory T Cells in the Colon. *Cancer Res.* **79**, 1178–1190 (2019).
43. Cobbold, S. P. *et al.* Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12055–12060 (2009).

44. Geiger, R. *et al.* L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* **167**, 829–842.e13 (2016).
45. Hölttä, E. & Hovi, T. Polyamine depletion results in impairment of polyribosome formation and protein synthesis before onset of DNA synthesis in mitogen-activated human lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* **152**, 229–237 (1985).
46. Langkamp-Henken, B., Johnson, L. R., Viar, M. J., Geller, A. M. & Kotb, M. Differential effect on polyamine metabolism in mitogen- and superantigen-activated human T-cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 337–347 (1998).

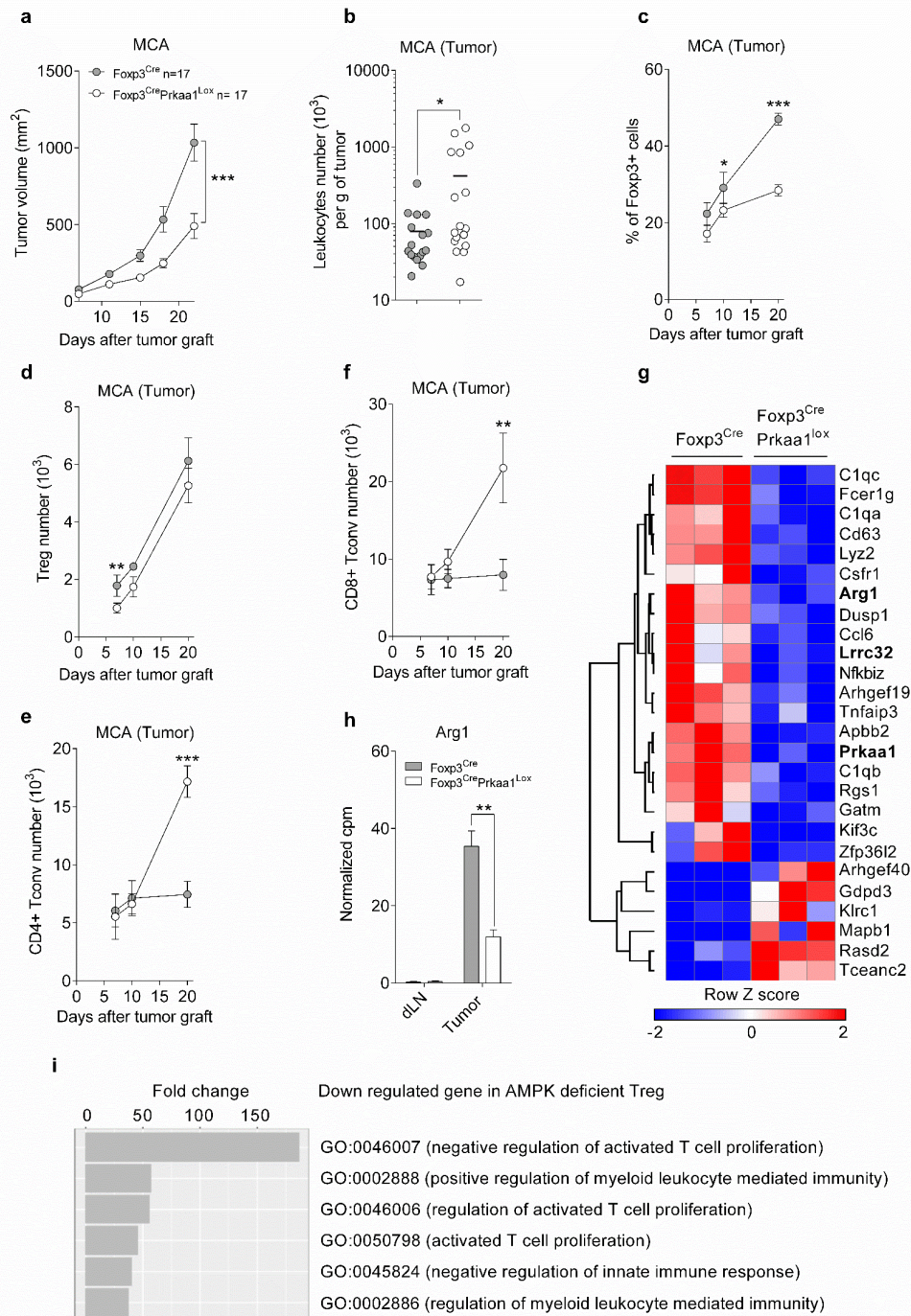


**Figure 1: AMPK is dispensable for Treg homeostasis and function at steady state.** (a) AMPK $\alpha$ 1 expression was assessed by western blot in CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells sorted from *Fxp3<sup>Cre</sup>* and *Fxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. Results are representative of two independent experiments. (b) Treg (Foxp3<sup>+</sup>) proportion among CD4<sup>+</sup> cells in the thymus, spleen, peripheral lymph nodes (pLN), mesenteric LN (mLN), liver and lung of *Fxp3<sup>Cre</sup>* (n=8) and *Fxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice (n=9). (c) Treg marker expression in pLN of *Fxp3<sup>Cre</sup>* (n=6) and *Fxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* (n=7) mice. Ratio median fluorescence intensity (MFI) of individual mouse divided by the mean MFI of *Fxp3<sup>Cre</sup>* mice (low panel). (d) In vitro suppressive activity of Treg from *Fxp3<sup>Cre</sup>* and *Fxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. (a-d) Representative dot plots (b) or histograms (c, d) are shown in left (b) or top (c, d) panels. Mice were analyzed between 8 and 12 week-old (a-d). Results are a pool from two (b, c) or three (d) independent experiments. Mann Whitney test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01.



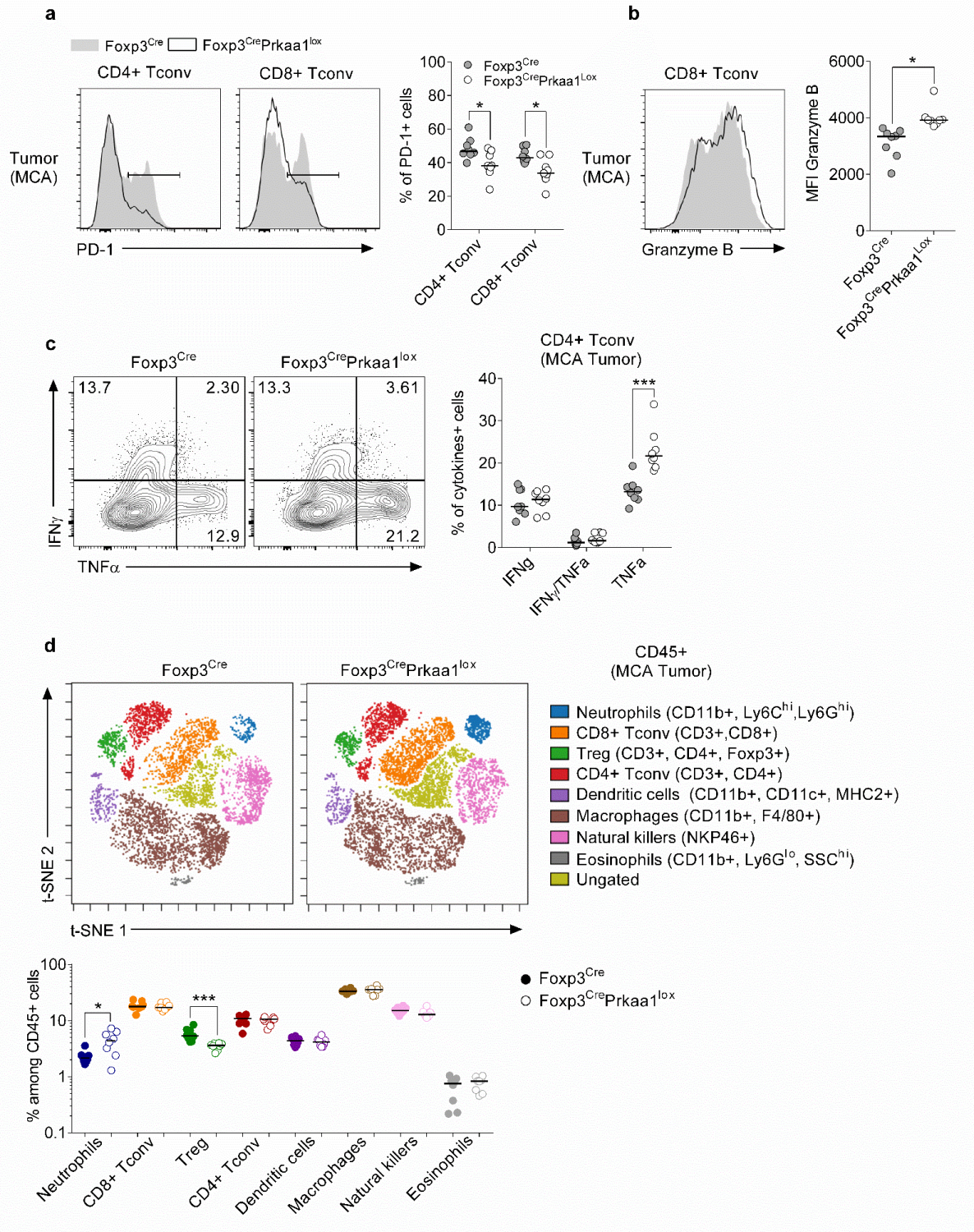
**Figure 2: AMPK deficient Treg have an altered metabolism.** (a) Phosphorylated (p) and total ACC was assessed by western blot in CD45<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells sorted from *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. Results are representative of two independent experiments. (b) In vitro activated Treg from *Foxp3<sup>Cre</sup>* (n=7) and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* (n=7) mice were analyzed for pS6 expression. (c) Mitochondrial mass (Mito-tracker), membrane potential (TMRM), reactive oxygen species (Mito-SOX) and fatty acid uptake (Bodipy FLC16) were assessed in Treg from pLN of *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice (n=3-7). (d) Oxygen consumption rate (OCR) and extra cellular acidification rate (ECAR) were measured in Treg from *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. For OCR, oligomycin (oligo), FCCP and rotenone + antimycin (Rot/A) were used to induce mitochondrial stress. ECAR was measured with or without glucose or after CD3/CD28 stimulation with glucose (20 mM). (e) Relative metabolite contents of Treg from *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice (n=4). Ratio of normalized pic area of individual *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mouse are divided by the mean normalized pic area of *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice (n=5). (a-d) Representative histograms (b, c) are shown in left (b) or top (c) panels. Mice were analyzed between 8 and 12 weeks old (a-e). Results are a pool from two (b, c) or four (d) independent experiments. Mann Whitney test. \*\* p-value < 0.01.



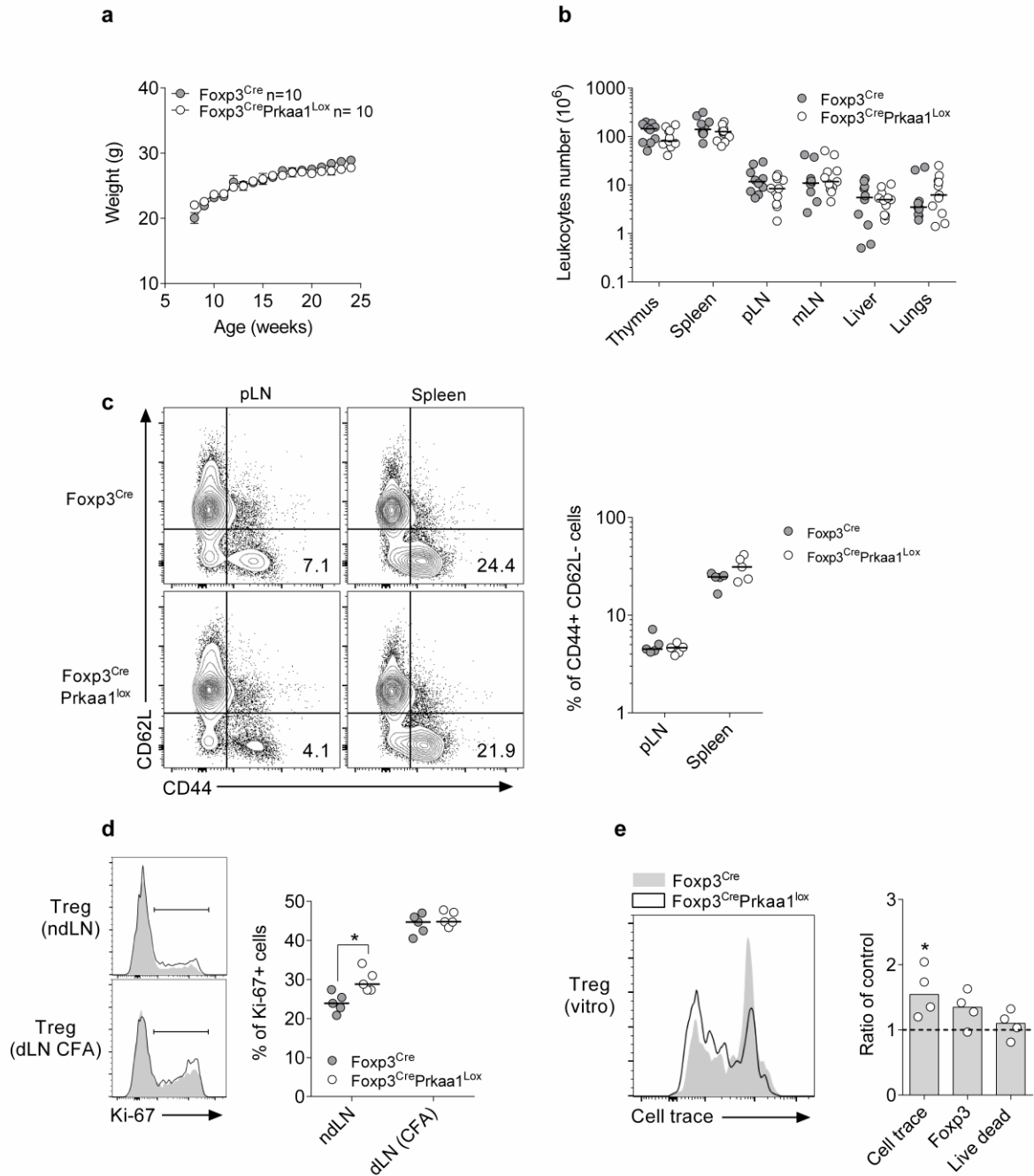


**Figure 3: AMPK deletion in Treg induced increased anti-tumor immunity by altering tumor-infiltrating Treg.** The MCA tumor cell line was inoculated at day 0 in *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. Tumor growth (a), leukocytes number per g of tumor at day 20 (b), Treg proportion among CD4<sup>+</sup> T cells (c) and Treg (d), CD4<sup>+</sup> Tconv (e) and CD8<sup>+</sup> Tconv (f) numbers infiltrating the tumors at day 7, 10 and 20. (g-h) Transcriptomic analysis of tumor-infiltrating Treg and Treg from draining lymph node (dLN), purified at day 10. (g) Most differentially expressed genes in tumor Treg through the whole transcriptome (FDR < 0.05, log<sub>2</sub>FC > 0.5) as scaled values (x-mean/standard deviation). (h) *Arg1* Expression in count per million. (i) Gene ontology analysis of downregulated genes in AMPK deficient Treg, as identified in (f). (a-i) Data are from the pool of 4 (17 mice per group) independent experiments (a, b), or of 3 at day 7 (12 mice per group), 2 at day 10 (7 mice per group) and 4 at day 20 (17 mice per group) independent experiments (c-f) or are from biological triplicates (g-i). Mice were analyzed between 8 and 12 week-old (a-i). One way ANOVA (a), Mann Whitney test (b), two way ANOVA (c-e). \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.

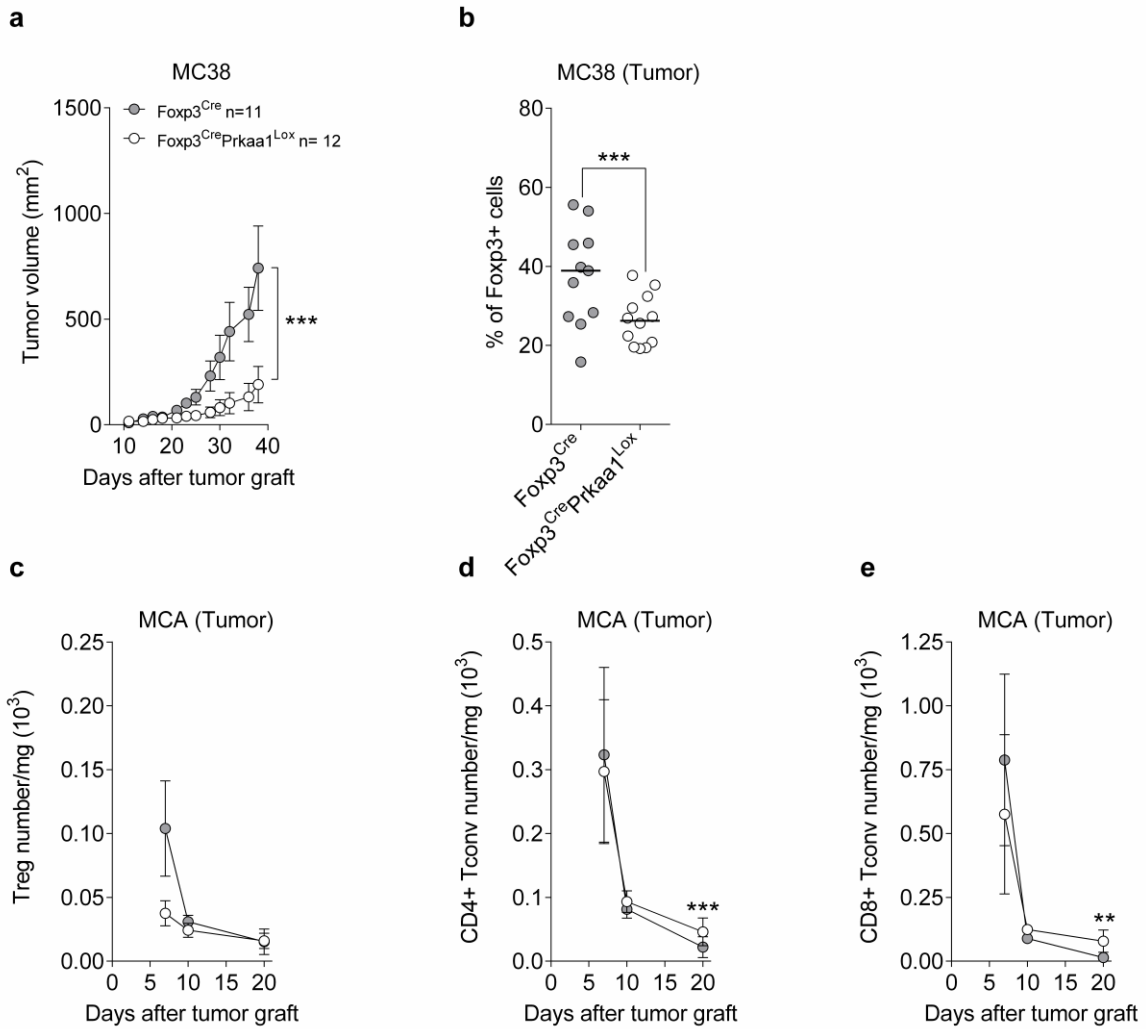




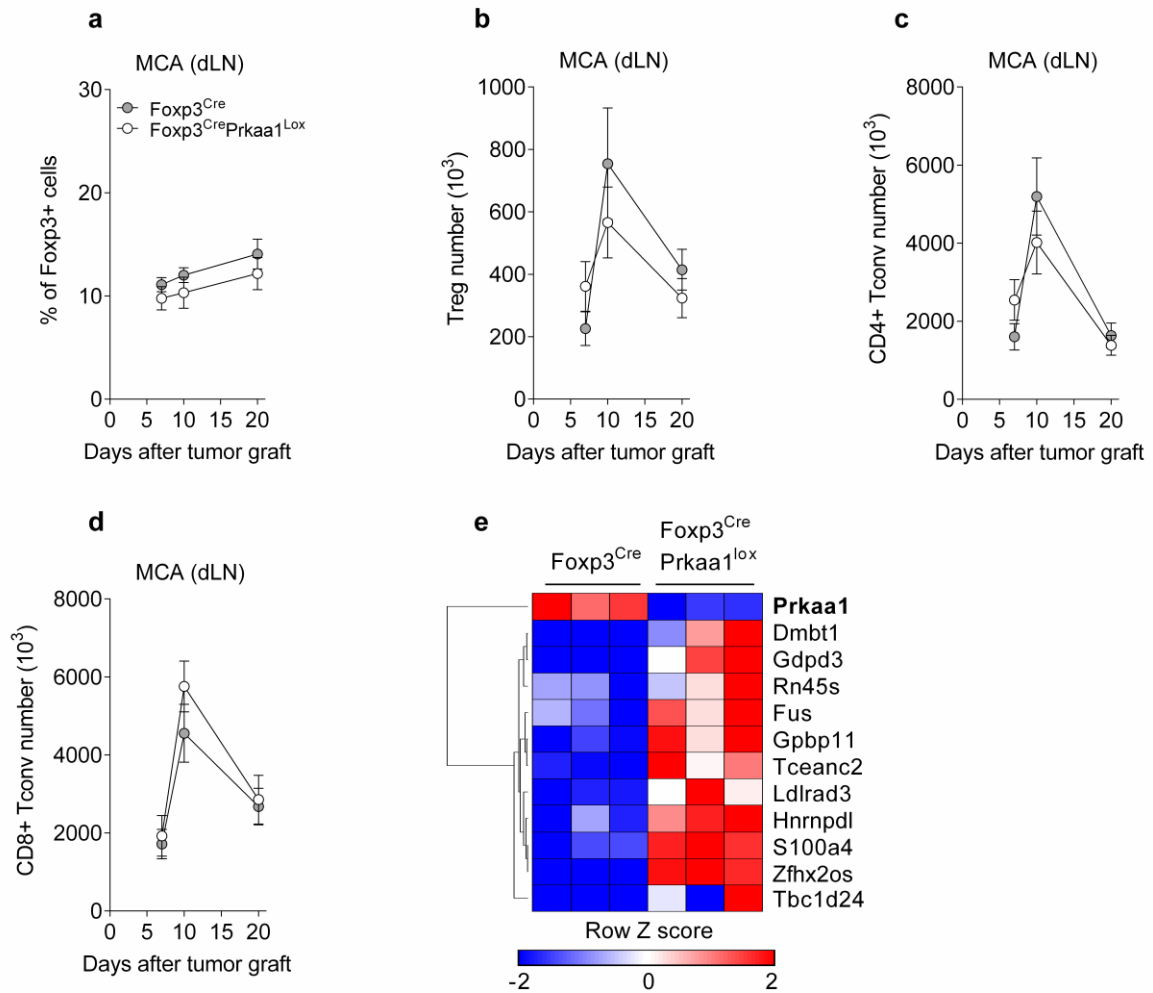
**Figure 4: AMPK deletion in Treg results in increased Tconv activity and neutrophils infiltration in the tumor.** The MCA tumor cell line was inoculated at day 0 in *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice and tumor-infiltrating cells were analyzed 20 days later. PD1 (a), granzyme B (b) and cytokines expression (c) among CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconv. (d) Unsupervised t-SNE representation of CD45<sup>+</sup> sub-populations, colored manually using markers indicated in parentheses. Data were obtained from 8-9 mice per group (2 independent experiments for (a)). (a-c) Representative dot plots (c) or histograms (a, b) are shown in left panels. Mice were analyzed between 8 and 12 week-old (a-d). Mann Whitney test (a-d). \* p-value < 0.05 \*\*\* p-value < 0.001.



**Supplementary figure 1: AMPK expressed by Treg is dispensable for their in vitro proliferation and in vivo expansion at steady state.** (a) Weight gain of *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>Lox</sup>* mice. (b) Leukocyte numbers in various lymphoid and non-lymphoid organs of *Foxp3<sup>Cre</sup>* (n=10) and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>Lox</sup>* (n=11) mice. (c) Proportion of CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> cells among CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> cells in the pLN and spleen of *Foxp3<sup>Cre</sup>* (n=5) and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>Lox</sup>* (n=5) mice. (d) Proportion of Ki-67<sup>+</sup> cells among Treg in the draining LN (dLN) and non-draining LN (ndLN) of *Foxp3<sup>Cre</sup>* (n=4) and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>Lox</sup>* (n=4) mice previously injected with complete Freund's adjuvant (CFA). (e) Survival, Foxp3 expression and proliferation of Treg after three days of in vitro CD3 stimulation. Ratio of cell trace MFI, Foxp3 MFI and life dead % of individual *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>Lox</sup>* mouse divided by the mean of *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice (right panel). (a-e) Representative dot plots (c) or histograms (d, e) are shown in left panels. Mice were analyzed at 12 (b), 16 (c), or between 8 and 12 (d, e) week-old. Results are from a pool of three (b) or four (e) independent experiments. Mann Whitney (d) and Wilcoxon signed rank (e) tests. \* p-value < 0.05.

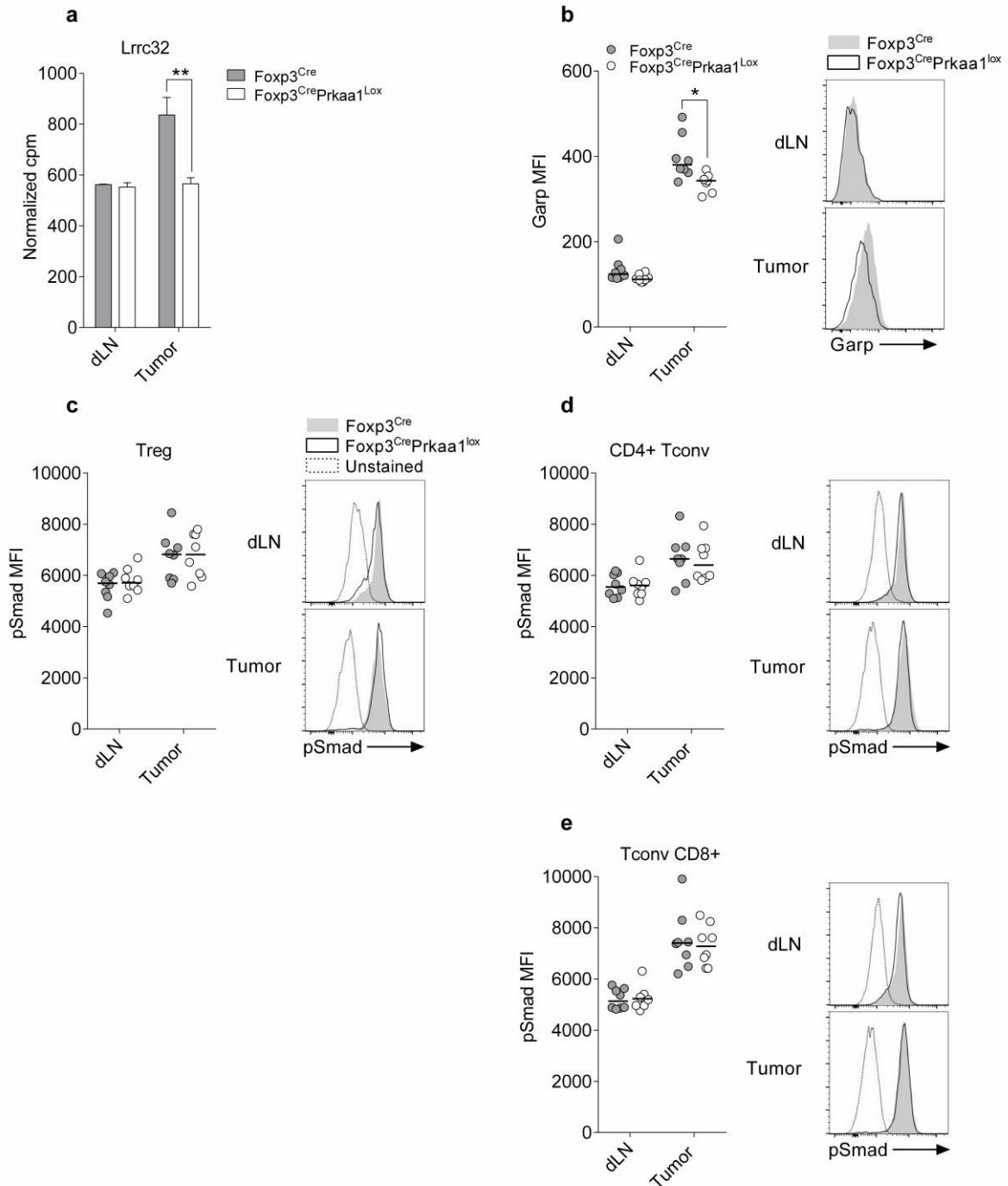


**Supplementary figure 2: AMPK deletion in Treg induced increased anti-tumor immunity.** The MC38 (**a, b**) and MCA (**c-e**) tumor cell lines were inoculated at day 0 in *Fxp3<sup>Cre</sup>* and *Fxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. Tumor growth (**a**) and Treg proportion among CD4<sup>+</sup> T cells at day 38 (**b**). Numbers of Treg (**c**), CD4<sup>+</sup> Tconv (**d**) and CD8<sup>+</sup> Tconv (**e**) per g of tumor. (**a-e**) Data are from the pool of 2 (11-12 mice per group) independent experiments (**a, b**), or of 3 at day 7 (12 mice per group), 2 at day 10 (7 mice per group) and 4 at day 20 (17 mice per group) independent experiments (**c-e**). Mice were analyzed between 8 and 12 week-old (**a-e**). One way ANOVA (**a**), Mann Whitney test (**b**), two way ANOVA (**c-e**). \*\* p-value < 0.01, \*\*\* p-value < 0.001.



**Supplementary figure 3: AMPK deletion in Treg has minor impact on proportion and phenotype of Treg in the tumor draining lymph node.** The MCA tumor cell line was inoculated at day 0 in *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. Treg proportion among CD4<sup>+</sup> T cells (a) and numbers of Treg (b) CD4<sup>+</sup> Tconv (c) and CD8<sup>+</sup> Tconv (d) in the dLN. (e) Most differentially expressed genes through the whole transcriptome (FDR<0.05, log<sub>2</sub>FC>0.5) of Treg purified from the dLN at day 10 as scaled values (x-mean/standard deviation) as in figure 3. Data are from the pool of 3 at day 7 (12 mice per group), 2 at day 10 (7 mice per group) and 4 at day 20 (17 mice per group) independent experiments. Mice were analyzed between 8 and 12 week-old (a-e).





**Supplementary figure 4: AMPK deletion in Treg results in decreased Garp expression with no impact on TGF- $\beta$  signaling.** The MCA tumor cell line was inoculated at day 0 in *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup>Prkaa1<sup>lox</sup>* mice. (a) *Lrrc32* expression on Treg was assessed by RNA sequencing as in figure 3. Garp expression on Treg (b) and p-Smad expression on Treg (c), CD4<sup>+</sup> Tconv (d) and CD8<sup>+</sup> Tconv (e) at day 13 (8 mice per group). (b-e) Representative histograms are shown in right panels. Mice were analyzed between 8 and 12 week-old (a-d). Mann Whitney test. \* p-value < 0.05, \*\* p-value < 0.01.





## **DISCUSSION**

---





## 1. Rôle de mTOR dans l'homéostasie des Treg

### 1.1 mTOR est essentiel dans l'homéostasie des Treg à l'état basal

Nous avons observé que la délétion spécifique de mTOR au sein des Treg conduit à l'apparition d'un syndrome inflammatoire systémique chez la souris, similaire, en moins grave, à celui observé chez les souris « scurfy ». Ceci montre le rôle crucial de mTOR dans la biologie des Treg à l'état basal. Plusieurs études ont également reporté la survenue d'un syndrome inflammatoire suite à la perturbation de l'activité mTOR dans les Treg. En 2013, Zeng et al ont observé une adénopathie, une forte infiltration leucocytaire dans plusieurs organes non lymphoïdes ainsi qu'une sur-activation des Tconv après la délétion spécifique de RAPTOR (complexe mTORC1) dans les Treg. Ces auteurs ont alors expliqué la survenue de cette pathologie par le fait que les Treg déficients pour RAPTOR présentaient un défaut majeure de prolifération. Ils ont également suggéré un défaut de fonction suppressive de ces cellules suite à l'altération de la voie du mévalonate impliquée notamment dans la biosynthèse du cholestérol et de la prenylation des protéines<sup>241</sup>.

Cinq ans plus tard, la même équipe de recherche a pu montrer que la délétion de la protéine mTOR, et donc des deux complexes mTORC1 et mTORC2, conduisait également à l'apparition d'un syndrome inflammatoire chez la souris<sup>245</sup>. La pathologie était comparable à celle décrite chez les souris possédant une délétion de RAPTOR et était caractérisée par un emballement du système immunitaire suggérant une fois de plus un défaut des Treg. Dans cette étude, les auteurs ont cette fois suggéré que la délétion de mTOR conduisait à un défaut de maturation des Treg effecteurs (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) et de leur action régulatrice au niveau des tissus périphériques<sup>245</sup>.

L'ensemble des travaux fourni par cette équipe a donc mis à jour un rôle jusqu'ici insoupçonné de mTOR dans la fonction et la maturation des Treg qui permet d'expliquer l'origine de la pathologie chez nos souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>lox</sup>*. Les travaux réalisés pendant cette thèse permettent néanmoins d'apporter des données supplémentaires quant au rôle de mTOR dans la biologie des Treg et aux causes du syndrome inflammatoire observé chez les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>lox</sup>*.

## 1.2 mTOR permet la migration du Treg vers les tissus non lymphoïdes

Dans notre étude sur le rôle de mTOR dans les Treg, nous avons pu montrer que la délétion de mTOR conduisait à une altération de la capacité migratoire des Treg. En effet, nous avons observé, dans des expériences de co-transfert de Treg sauvages et déficients pour mTOR chez des souris congéniques, que la proportion de Treg déficients pour mTOR était préférentiellement diminuée dans le foie et les poumons des souris hôtes. La déficience des Treg pour mTOR semble ainsi conduire à une diminution de leur migration ce qui semble cohérent avec les travaux publiés par Kishore et al. en 2017 qui suggérait un rôle de cette protéine dans la relocalisation des Treg vers des sites non lymphoïdes enflammés<sup>243</sup>.

D'autre part, l'utilisation d'une technique dite de « blood tissue partitioning » nous a permis de constater que les cellules injectées migrant vers le foie et les poumons n'infiltraient pas le parenchyme et ne traversaient pas la barrière endothéliale dans notre modèle. Ceci peut s'expliquer par les temps d'analyses précoces que nous avons choisis de réaliser (30 minutes et 12 heures) qui ne permettaient peut être pas aux cellules de mener à bien le processus de diapédèse. Notre modèle d'étude nous a donc uniquement permis de tester l'accrochage de nos Treg à l'endothélium vasculaire du poumon et du foie et pas l'infiltration de ceux-ci dans le parenchyme. Des expériences similaires à des temps plus tardifs pourraient ainsi permettre de compléter nos informations et de tester la capacité des Treg déficients pour mTOR à traverser les endothéliums du foie et des poumons. Nous pourrions également réaliser le même type d'expérience chez des souris chez qui nous aurions induit une inflammation d'un des tissus non-lymphoïdes, favorisant ainsi la pénétration des Treg dans le parenchyme.

En parallèle de leur capacité migratoire altérée, les Treg déficients pour mTOR présentaient une modification de l'expression de plusieurs récepteurs aux chimiokines et intégrines impliquées dans la migration cellulaire. En effet, nous avons observé que l'expression des molécules CCR7 et CD62L se trouvaient augmentée à la surface des Treg déficients pour mTOR dans les ganglions lymphatiques. Ces résultats pourraient s'expliquer par des travaux réalisés précédemment sur des Tconv qui ont pu montrer que le complexe mTORC2 est capables de réguler l'expression de ces deux protéines par l'intermédiaire de FOXO1/3 et KFL2<sup>53,55</sup>. La perte de mTOR et donc de mTORC2 dans notre système pourrait alors être la cause d'un maintien de l'activité des facteurs FOXO1/3 et KFL2, conduisant à la plus forte expression de CD62L et CCR7. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en analysant l'état de

phosphorylation ainsi que la localisation de FOXO1/3 qui se trouve normalement phosphorylé et exclu du noyau quand mTORC2 est actif<sup>53</sup>.

D'autre part, nous avons également constaté une diminution de l'expression des molécules CD44 et CCR4 à la surface des Treg déficients pour mTOR dans le foie. Ces deux molécules étant impliquées dans la migration vers les tissus enflammés<sup>249</sup>, la diminution de leur expression pourrait alors fournir une explication à la migration altérée de Treg déficients pour mTOR. L'ensemble de ces modifications, à savoir l'augmentation de l'expression de CCR7 et CD62L et la diminution de l'expression de CD44 et CCR4, conduirait alors à une migration préférentielle des Treg déficients pour mTOR vers les organes lymphoïdes. Ceci semble cohérent avec l'hypothèse d'un défaut de maturation des Treg déficients pour mTOR avancée par les travaux précédent étant donné que la maturation de ces cellules est normalement associée à une diminution de CCR7 et de CD62L au profit de celle du CD44<sup>250</sup>.

Ainsi, l'ensemble de nos données suggère un rôle essentiel de mTOR dans la migration des Treg vers certains tissus non-lymphoïdes comme le poumon ou le foie. L'absence de mTOR au sein des Treg conduirait alors à une séquestration partielle de ces cellules au sein des organes lymphoïdes. Le syndrome inflammatoire observé chez les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>lox</sup>* pourrait donc également s'expliquer par une baisse de la régulation des Tconv par les Treg au niveau des tissus dû à une recirculation altérée de ceux-ci. Là encore, il serait intéressant d'explorer si la migration des Treg déficients pour mTOR dans des tissus non-lymphoïdes enflammés serait altérée.

### 1.3 mTOR participe au maintien de l'expression de Foxp3

L'altération de la capacité de migration des Treg déficients pour mTOR permet d'expliquer la baisse préférentielle des Treg au niveau des organes non lymphoïdes des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>lox</sup>* et amène des informations supplémentaires quant aux causes de la pathologie observée chez ces souris. Cependant, nous avons également observé une diminution globale de la proportion des Treg déficients pour mTOR chez les souris hétérozygotes non enflammées *Foxp3<sup>Cre-YFP/+</sup> mTOR<sup>lox</sup>* qui ne saurait être expliquée par un défaut de migration. Bien que d'autres mécanismes puissent expliquer cette baisse globale, nous avons choisi d'investiguer la stabilité des Treg déficients pour mTOR.

Afin d'estimer la capacité des Treg déficients pour mTOR à maintenir une expression stable de Foxp3, nous avons mis en place deux modèles de co-transfert. Un premier modèle consistait en l'injection d'un mélange de Treg sauvages et déficients pour mTOR dans une souris hôte puis en l'analyse de la proportion de cellules Foxp3<sup>-</sup> (ex-Treg) dans ces deux populations 10 jours plus tard. Bien que l'effet se soit avéré faible, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la proportion d'ex-Treg au sein des Treg déficients pour mTOR sur l'ensemble des organes analysés. Notre second modèle de co-transfert était similaire au premier à la différence que les populations de Treg étaient injectées en compagnie de Tconv et se trouvaient dans une situation inflammatoire étant donné que la souris hôte était lymphopénique. Dans ce contexte, nous avons observé une très forte proportion d'ex-Treg parmi les Treg déficients pour mTOR et cela quel que soit l'organe analysé. Il semblerait ainsi que mTOR joue un rôle non négligeable dans le maintien de l'expression de Foxp3 et que ce phénomène soit plus visible en condition inflammatoire.

Ces résultats peuvent paraître surprenant au vu de la littérature actuelle rapportant un effet négatif de mTOR sur la différenciation des Treg. En effet, plusieurs travaux ont montré que l'activité PI3K/Akt/mTOR inhibe la différenciation des Treg, aussi bien in vitro qu'in vivo au niveau du thymus<sup>222,223</sup>. De plus, il a été montré que la délétion de mTOR facilite la différenciation des Treg in vitro, notamment via une hyper-activation de Smad3<sup>64</sup>. Cependant, il est important de souligner que l'établissement et le maintien de l'expression de Foxp3 sont deux processus distincts, faisant intervenir des acteurs différents. En effet, l'établissement de l'expression de Foxp3 chez le précurseur thymique est à l'heure actuelle considérée comme dépendante de l'action de la voie NFκB sur la région CNS3 de Foxp3<sup>122-124</sup>. Le maintien de l'expression de Foxp3, quant à lui, serait plutôt lié à l'action de l'IL-2 et de la voie STAT5 sur

la région CNS2 de *Foxp3*<sup>126</sup>. mTOR pourrait ainsi avoir un impact négatif sur l'établissement de l'expression de *Foxp3* tout en ayant un impact positif sur le maintien de l'expression de cette protéine.

Nos données semblent en accord avec cette hypothèse. En effet, l'analyse de la méthylation de la région CNS2 de *Foxp3* chez nos Treg a pu montrer que l'absence de mTOR conduit à une re-méthylation de cette région et donc à une diminution de la stabilité de l'expression de *Foxp3*. De manière intéressante, cette re-méthylation corrélait avec une glutaminolyse accrue et une forte production d' $\alpha$ -kétoglutarate au sein des Treg déficients pour mTOR. Ceci pourrait être le lien entre mTOR et l'état de méthylation de la région CNS2 de *Foxp3* étant donné que deux études ont mis en évidence un impact non négligeable de la glutaminolyse sur l'expression de *Foxp3*. En effet, Klysz et al. ont pu montrer que l'inhibition de la glutaminolyse réduit la méthylation des régions spécifiquement déméthylées de *Foxp3* tandis que Xu et al. ont mis en évidence que l'interruption de la production d' $\alpha$ -kétoglutarate conduisait à une déméthylation de la région CNS2<sup>251,252</sup>. Klysz et al ont alors proposé que l'action de l' $\alpha$ -kétoglutarate sur la méthylation des régions de *Foxp3* pourrait se faire par l'action des enzymes TET (de l'anglais « Ten-eleven translocation ») qui sont connues pour impacter le statut de méthylation de nombreuses régions géniques<sup>251,253</sup>.

Nos données sont ainsi en faveur d'un rôle bénéfique de mTOR sur le maintien de l'expression de *Foxp3* et donc de la stabilité des Treg. Cette action pourrait se faire de manière indirecte via un contrôle du flux de glutaminolyse et de la production d' $\alpha$ -kétoglutarate évitant ainsi la re-méthylation de la région CNS2 de *Foxp3*. Il est alors possible qu'une partie du syndrome inflammatoire observé chez les souris *Foxp3*<sup>Cre-YFP</sup> *mTOR*<sup>lox</sup> soit due à l'instabilité des Treg déficients pour mTOR qui subiraient l'inflammation environnante et perdraient leur identité régulatrice. Il est néanmoins peu probable que ces ex-Treg participent eux-mêmes au syndrome inflammatoire et deviennent pathogéniques étant donné que nous avons montré que ceux-ci ne produisaient pas de cytokines inflammatoires.

#### 1.4 Résumé des données actuelles et hypothèses

L'ensemble des informations disponibles à ce jour dans la littérature ainsi que les données générées au cours de ce projet permettent de mieux comprendre le rôle de mTOR dans la biologie des Treg. Ma conviction personnelle est que, lors de la différenciation du Treg dans le thymus, l'intensité du signal TCR induit une forte activation de mTOR au sein du précurseur Treg. Cette activité mTOR est néanmoins contenue grâce à l'induction parallèle de Foxp3 via le CD25 et STAT5 qui permet une augmentation de PTEN et une inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR pour garantir la différenciation en Treg. Une fois sorti du thymus, mTOR reste néanmoins nécessaire pour favoriser la maturation du Treg et sa fonction qui, je pense, comme celle des Tconv, est dépendante de l'anabolisme. Sur le long terme, l'activité mTOR au sein du Treg permet également un control du flux de glutaminolyse pour éviter l'accumulation d' $\alpha$ -kétoglutarate et la perte de Foxp3. A l'état basal, le Treg peut ainsi utiliser les voies métaboliques associées à mTOR comme la glycolyse ou la FAS sans pour autant compromettre son identité régulatrice (**Figure 15**).

## 2. Rôle de l'AMPK dans l'adaptation à l'environnement tumoral

### 2.1 AMPK n'a pas un rôle primordial dans la biologie des Treg à l'état basal

Durant notre étude sur le rôle d'AMPK dans la biologie des Treg, nous avons été surpris de constater que la délétion de cette protéine dans les Treg n'avait eu que peu de conséquences sur la biologie de ces cellules à l'état basal. En effet nous avons pu observer que contrairement aux souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>lox</sup>*, les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>* ne développaient pas de syndrome inflammatoire et ne présentaient aucun signe clinique évident. De plus, la délétion de l'AMPK au sein des Treg n'a eu aucune conséquence sur leur proportion in vivo ainsi que sur leur fonction suppressive in vitro. Il est peu probable que cette absence de phénotype soit due à des phénomènes de compensation au sein des Treg. En effet, nous avons reporté une perte quasi complète de la forme phosphorylée d'ACC ainsi qu'une augmentation de l'activité du complexe mTORC1, confirmant ainsi la perte de fonction AMPK au sein de ces cellules.

De manière intéressante, l'augmentation de l'activité mTORC1 dans les Treg déficients pour l'AMPK n'était pas associée à une augmentation du pourcentage de Treg effecteur (CD44+ CD62L-) comme auraient pu le suggérer les travaux du groupe de H.Chi décrits précédemment. Ceci pourrait être lié au fait que la niche disponible pour cette population soit restreinte et ne permette pas d'accueillir de nouveaux membres.

Les données obtenues chez les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>* nous ont surpris étant donné que la littérature du moment suggérait un rôle essentiel de l'AMPK dans la biologie des Treg. En effet, dès 2011, les travaux de Michalek avaient mis en évidence une activité AMPK plus forte associée à une FAO plus importante et une glycolyse diminuée chez les Treg stimulés in vitro<sup>227</sup>. De plus l'activité mitochondrial (favorisée par l'AMPK) avait été décrite comme essentiel à la survie des Treg dans la mesure où son inhibition induisait une forte mortalité de ces cellules in vitro<sup>228</sup>. Nous nous attendions donc à un phénotype beaucoup plus marqué chez les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>*.

Il est cependant important de noter que la plupart des observations évoquant une forte activité AMPK au sein des Treg avaient été réalisées sur des cellules différenciées in vitro et que des travaux récents ont pu montrer un impact non négligeable des conditions de culture sur l'activité AMPK. En effet, le protocole de différenciation en Treg à partir de lymphocyte T naïf in vitro (iTreg) implique de grande quantité de TGFβ qui peut induire une activation de l'AMPK via



TAK1<sup>74</sup>. Les travaux de Priyadharshini et al ont ainsi pu montrer que le flux de glycolyse de Treg isolés ex vivo est similaire à celui des Tconv et que la culture de ces Treg en présence de TGF $\beta$  induisait une inhibition de mTOR et une diminution de la glycolyse. Il est alors possible que la forte dépendance envers l'AMPK décrite chez les Treg soit issue d'un biais de culture, ce qui pourrait expliquer la divergence de nos données avec celles présentes dans la littérature.

Ainsi, nos données suggèrent un rôle mineur de l'AMPK dans la biologie des Treg in vivo bien que cette protéine ai été décrite comme essentielle dans la biologie des Treg générés in vitro.

## 2.2 AMPK est un nœud de régulation du métabolisme des Treg

Bien que l'AMPK ne semble pas jouer un rôle essentiel dans la biologie des Treg à l'état basal, cette protéine reste néanmoins un acteur majeur de la régulation du métabolisme de ces cellules. En effet, nous avons observé que la délétion de l'AMPK induit une forte perturbation du métabolisme cellulaire chez les Treg liée à une modification de l'utilisation du glucose, de la glutamine et des acides gras.

Un des axes de perturbation métabolique visible suite à la délétion de l'AMPK semble concerner la glycolyse où l'on observe une accumulation d'intermédiaires de la synthèse des hexosamines tels que l'uridine di-phosphate (UDP), l'UDP-N-acétyl-glucosamine et l'UDP-galactose-glucose. Cette utilisation du glucose vers la voie des hexosamines semble se faire au détriment des autres branches de la glycolyse telle que la voie PPP et surtout de la voie de biosynthèse des sérines. Le flux en fin de glycolyse semble également réduit et l'on observe une diminution du pyruvate et du lactate qui corrèle avec une augmentation de PEP. Il semblerait ainsi que les Treg déficients pour l'AMPK utilisent le glucose afin d'augmenter leur capacité de synthèse des hexosamines. Cette adaptation métabolique pourrait être bénéfique aux Treg étant donné que Liu et al. ont pu montrer que la stabilité de l'expression de Foxp3 semble liée au processus d'O-GlcNacylation permis par cette voie métabolique<sup>254</sup>. Néanmoins, cette réorientation de la glycolyse pourrait également conduire à une diminution de la production de pyruvate qui entrainerait une réduction de l'alimentation du cycle de Krebs au niveau de l'acétyl-CoA.

Une seconde voie métabolique fortement perturbée au sein du Treg suite à la délétion de l'AMPK est la glutaminolyse où l'on observe une diminution de nombreux intermédiaires tels que la glutamine, le glutamate et l' $\alpha$ -kétoglutarate. Cette diminution semble cohérente avec les travaux de Blagih et al. qui ont mis en évidence l'implication de l'AMPK dans l'induction de cette voie chez des Tconv cultivés dans un milieu pauvre en glucose<sup>40</sup>. La réduction du flux de glutaminolyse au sein des Treg déficients pour l'AMPK pourrait avoir un impact sur le cycle de Krebs où l'on observe une diminution de certains intermédiaires en aval et en amont de l' $\alpha$ -kétoglutarate tels que le citrate et le malate. L'activité du cycle de Krebs pourrait aussi être affectée par le défaut d'apport en pyruvate du fait de l'altération de la glycolyse. Cette plus faible activité du cycle de Krebs pourrait expliquer la plus faible quantité de NADH observée chez les Treg déficients pour l'AMPK et pourrait alors être la cause d'une réduction de l'activité de l'ETC au sein de la mitochondrie. Ceci pourrait ainsi expliquer la diminution de la

consommation en oxygène et du potentiel de membrane mitochondrial observés chez les Treg déficients en AMPK.

D'autre part, la réduction de glutaminolyse observée chez les Treg déficients pour l'AMPK corrèle également avec une forte diminution d'ornithine, de citruline, d'arginine et de l'urée, indiquant un collapse du cycle de l'urée. Ceci pourrait avoir des conséquences non négligeables sur l'activité de nos Treg étant donné que l'activité de ce cycle est à l'origine de la synthèse des polyamines, décrits comme essentielle pour l'induction de la synthèse protéique et la prolifération des lymphocytes T activés<sup>38,39</sup>.

Le dernier axe métabolique touché par la délétion de l'AMPK au sein des Treg concerne le flux d'acides gras entre le cytoplasme et la mitochondrie. Nous avons en effet observé une forte accumulation de différents types d'acide gras conjugués à des carnitines chez les Treg déficients pour l'AMPK. Cette abondance d'acyle-carnitines peut donner lieu à deux interprétations diamétralement opposées.

La première serait que cette accumulation d'acyle-carnitines serait due à une inhibition de leur entrée et de leur dégradation dans la mitochondrie pour la FAO. Cette interprétation est appuyée par le fait que l'AMPK est décrit comme favorisant la FAO via l'inhibition de l'ACC2<sup>75</sup>. La perte d'AMPK chez le Treg aurait alors pour conséquence une augmentation de l'activité de l'ACC2 qui inhibe celle de CPT1, empêchant ainsi l'entrée des acides gras conjugués aux carnitines au sein de la mitochondrie. Cependant, si la délétion de l'AMPK conduisait à une inhibition de CPT1 dans les Treg, il est peu probable que nous observions une augmentation d'acyle-carnitines, étant donné que la conjugaison des acides gras aux carnitines est elle-même dépendante de CPT1<sup>13</sup>. L'augmentation du pool d'acyle-carnitines pourrait alors à l'inverse refléter une augmentation de l'activité de CPT1 et donc de la mobilisation des acides gras vers la mitochondrie pour leur utilisation au sein de la FAO. Cette augmentation de FAO pourrait alors être utilisée pour compenser la diminution d'apport de pyruvate au niveau du cycle de Krebs pour ainsi maintenir le pool d'acétyl-CoA.

Il demeure compliqué de donner une interprétation claire et tranchée à l'accumulation d'acyle-carnitines observée dans les Treg déficients pour l'AMPK. On peut formuler l'hypothèse d'une FAO augmentée dans ces cellules pour plusieurs raisons. La première réside dans le fait que l'on observe une tendance à l'augmentation d'acétyl-CoA. Étant donné que l'apport en pyruvate semble diminué, cette hausse pourrait être due à une FAO accrue. Deuxièmement, on

observe une réduction de la quantité de plusieurs acides gras insaturés et cela pourrait être la conséquence d'une augmentation de FAO. Troisièmement, on n'observe pas de diminution d'ATP malgré la diminution de certains métabolites du cycle de Krebs et la réduction de l'activité de l'ETC dans les Treg déficients pour l'AMPK. La FAO pourrait alors être à l'origine d'une compensation énergétique.

On peut tout aussi bien formuler l'hypothèse inverse d'une FAO réduite dans ces cellules pour deux raisons. La première réside dans le fait qu'un des produits phare de la FAO, le NADH se trouve diminué dans les Treg déficients pour l'AMPK. La deuxième raison est que le pool de carnitines n'est pas uniquement un système de transport et qu'il peut également refléter le bon fonctionnement de la FAO au sein de la mitochondrie. En effet, il a été montré qu'une FAO altérée conduit à une accumulation d'acyle-CoA au sein de la mitochondrie qui se trouve tamponnée par un export massif d'acyle-carnitine en dehors de celle-ci<sup>255</sup>. Il est alors possible que l'accumulation d'acyle-carnitines observée chez les Treg déficients en AMPK ne soit qu'une conséquence indirecte d'une FAO réduite dans la mitochondrie.

L'ensemble des modifications métaboliques observées dans les Treg déficients pour l'AMPK place ainsi cette protéine au cœur de la régulation du métabolisme de ces cellules. Bien que les voies métaboliques favorisées par l'AMPK ne semblent pas indispensables pour les Treg à l'état basal, il est possible que celles-ci soient cruciales dans un contexte où la quantité de nutriments est limitante, comme par exemple à proximité d'une tumeur fortement glycolytique.

### 2.3 AMPK est impliqué dans l'activité pro-tumorale des Treg

Devant le faible effet de la délétion de l'AMPK sur le phénotype des Treg à l'état basal, nous avons décidé de nous placer dans un système plus « stressant » au niveau énergétique pour nos Treg. Nous avons pour cela choisi d'inoculer une lignée de tumeur fibroblastique (MCA) par voie sous cutanée chez nos souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>*. De manière intéressante, nous avons rapporté une croissance tumorale plus faible associée à une plus forte infiltration leucocytaire dans la tumeur de ces souris. Ces premiers résultats suggéraient un rôle de l'AMPK dans la capacité des Treg à promouvoir la croissance tumorale. Nous avons alors plusieurs pistes à explorer pour expliquer la baisse d'action des Treg déficients en AMPK au niveau de la tumeur, telles qu'un défaut de survie, de prolifération, de migration ou de fonction.

Nous avons ainsi commencé notre étude par l'analyse de la proportion de Treg parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de la tumeur chez les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>* et témoins. Celle-ci était fortement diminuée et, de manière intéressante, n'était pas associée à une diminution du nombre de Treg. En effet, ce nombre était similaire entre les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>* et témoins et augmentait de manière quasi linéaire avec le volume de la tumeur. Cette observation nous a conduits à nous détourner rapidement de l'hypothèse d'un défaut de survie, de prolifération ou de migration des Treg déficients pour l'AMPK.

Le fait que la survie des Treg déficients pour l'AMPK ne semblait pas diminuée dans un contexte tumoral nous a surpris étant donné que cette protéine est décrite comme essentielle pour faire face à une période de stress énergétique. De plus, Rao et al. avaient décrit en 2015 un rôle important de l'AMPK dans le maintien de la survie des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur. Ce rôle semblait passer par une inhibition de la FAS par l'AMPK afin d'éviter une accumulation d'acide gras cytoplasmiques capables d'activer des phosphatases inhibitrices<sup>256</sup>. La différence observée entre lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et Treg pourrait provenir du fait que, dans notre cas, beaucoup des acides gras présents étaient conjugués à des carnitines, empêchant possiblement l'activation des phosphatases chez les Treg.

Nous avons vu plus haut que la baisse de proportion de Treg observée dans la tumeur des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>* n'était pas associée à une diminution de leur nombre. De manière intéressante, celle-ci s'expliquait en fait par une augmentation progressive du nombre de Tconv CD4<sup>+</sup> dans la tumeur des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>*. Cette observation nous a encouragé à penser que les Treg déficients pour l'AMPK étaient moins suppressifs et qu'une perte de

contrôle de l'activité des Tconv CD4<sup>+</sup> pouvait être à l'œuvre chez les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>*. L'analyse du transcriptome de nos Treg nous a conforté dans cette idée étant donné que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la capacité des Treg à réguler l'activité des Tconv se trouvait diminuée chez les Treg déficients pour l'AMPK. De plus, nous avons observé une légère augmentation de l'expression de granzyme B dans les Tconv CD8<sup>+</sup> ainsi qu'une augmentation de la proportion de Tconv CD4<sup>+</sup> sécrétant du TNF $\alpha$  parmi les cellules infiltrant la tumeur des souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>*. Ces deux observations argumentent ainsi une nouvelle fois en faveur d'une baisse d'activité suppressive des Treg déficients pour l'AMPK dans la tumeur.

Se pose alors la question du mécanisme suppressif mis en jeu. *Lrrc32*, un des gènes identifiés comme ayant une expression diminuée dans les Treg déficients pour l'AMPK, est un candidat sérieux. En effet ce gène code pour la protéine GARP qui a été décrite comme participant à l'ancrage du TGF $\beta$  latent à la membrane du Treg, nécessaire au clivage de cette cytokine, libérant sa forme active<sup>160</sup>. Nous avons pu observer une légère diminution de l'expression de GARP à la membrane des Treg infiltrant la tumeur, néanmoins, cette diminution ne conduisait pas à une baisse de la signalisation TGF $\beta$ . En effet, nous n'avons pas détecté de différence de phosphorylation des protéines Smad 2/3, ni au sein des Treg, ni dans les Tconv CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

Ces observations nous ont conduits à nous tourner vers un autre gène identifié comme régulé à la baisse dans les Treg déficients en AMPK, le gène codant pour l'enzyme arginase 1. Cette enzyme agit au sein du cycle de l'urée et est responsable de la conversion de l'arginine en ornithine. Elle possède également un rôle immuno-régulateur bien décrit passant par un appauvrissement du milieu en arginine qui est un acide aminé essentiel pour la prolifération des Tconv<sup>257</sup> et leur survie dans un environnement tumoral<sup>258</sup>. La diminution de cette enzyme pourrait ainsi expliquer 1) la diminution d'ornithine et la réduction possible, bien que non analysé ici, de synthèse de polyamines chez les Treg déficients pour l'AMPK et 2) la réduction de leur activité suppressive dans un contexte tumoral. De manière intéressante, nous avons constaté que cette enzyme est très peu exprimée par les Treg au sein du ganglion drainant la tumeur mais qu'elle est fortement induite dans les Treg infiltrant la tumeur chez les souris témoins. La diminution de cette enzyme par les Treg déficients en AMPK pourrait ainsi nuire à leur adaptation à cet environnement décrit comme pauvre en nutriments<sup>259</sup> et ainsi conduire à une baisse de leur activité suppressive dans ce contexte bien spécifique. Il est intéressant ici de noter que l'activité suppressive liée à l'expression d'arginase 1 a souvent été rapportée pour les

cellules myéloïdes suppressives mais jamais pour les Treg, sans doute car cette enzyme n'est pas exprimée par les Treg des tissus lymphoïdes même enflammés. Cependant, ce nouveau mode de suppression des Treg pourrait s'exercer dans des tissus non-lymphoïdes enflammés dans la mesure où nous avons également observé l'expression d'arginase 1 dans les Treg du système nerveux central au cours de l'EAE.

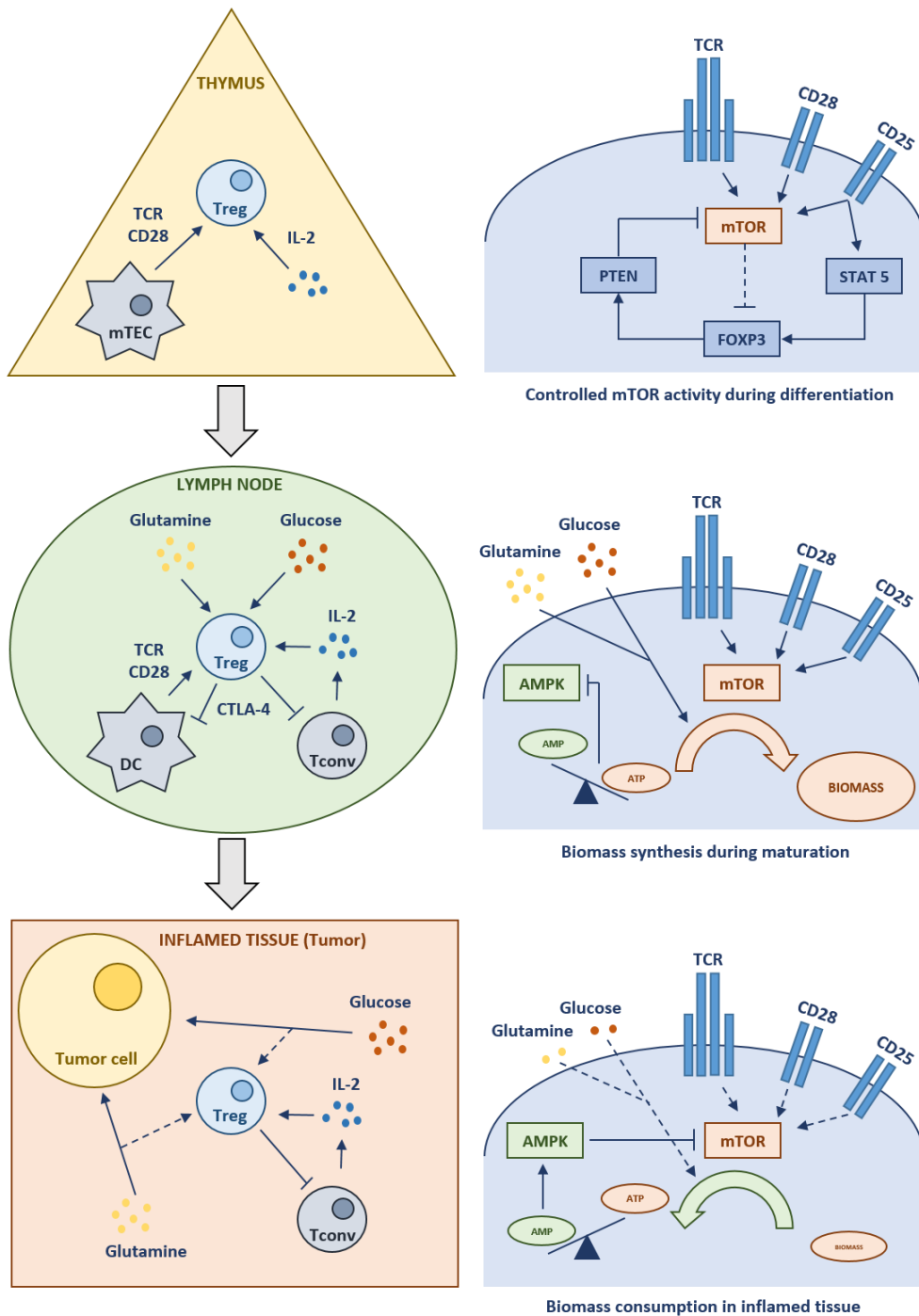
Nos données suggèrent ainsi une implication de l'AMPK dans l'activité suppressive des Treg dans un contexte tumoral. Cette implication pourrait passer par une augmentation de la glutaminolyse associée à plus forte expression d'arginase 1 qui pourraient aussi conduire à une synthèse augmentée des polyamines permettant aux Treg de s'adapter à l'environnement tumoral pauvre en glucose.

## 2.4 Résumé et hypothèses

Nos travaux remettent ainsi en cause l'hypothèse selon laquelle la protéine AMPK et le métabolisme catabolique qu'elle favorise seraient essentiels pour l'homéostasie des Treg. Nos données montrent clairement que cette protéine n'est pas indispensable pour les Treg à l'état basal bien que celle-ci ait un rôle majeur dans la régulation du métabolisme de ces cellules. Notre étude montre néanmoins que l'AMPK a un rôle essentiel dans la capacité du Treg à s'adapter et à exercer sa fonction suppressive dans un environnement pauvre en nutriments, comme une tumeur. De plus, je ne pense pas que le rôle de l'AMPK se limite uniquement à l'environnement tumoral et je suis convaincu que cette protéine participe à la fonction des Treg dans d'autres types d'environnement stressant métaboliquement, comme un site enflammé (**Figure 15**). Il serait intéressant de tester d'autres pathologies chez nos souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>lox</sup>*, comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Ce modèle de sclérose en plaques permettrait ainsi de tester l'adaptation de nos Treg déficients pour l'AMPK à l'environnement enflammé du système nerveux central.



### 3. Nouveau modèle du métabolisme des Treg



**Figure 15 : Nouveau modèle du métabolisme des Treg.** Lors de sa différenciation thymique, le précurseur Treg contrôle l'activité mTOR induite suite à la forte stimulation de son TCR afin de maintenir l'expression de Foxp3 et son identité Treg. Une fois différencié, le Treg sort du thymus et rejoint les organes lymphoïdes secondaires dans lesquels l'activité mTOR, favorisée par des signaux de stimulation et l'abondance de nutriments, permet sa maturation. Une fois mature et après accumulation suffisante de biomasse, le Treg peut rejoindre le site enflammé où il devra développer une activité AMPK plus forte afin de s'adapter à la faible quantité de nutriments.

#### **4. Métabolisme des Treg : quels liens avec la famille des récepteurs au TNF $\alpha$ ?**

Les effets du TNF $\alpha$  sur le métabolisme sont assez bien décrit et il est admis que cette cytokine a un impact non négligeable sur le métabolisme des lipides dans de nombreux types de cellules et de tissus<sup>260</sup>. Il a par exemple été montré que la fixation du TNF $\alpha$  a son récepteur favorise la FAS au sein des hépatocytes<sup>261</sup> et la lipolyse chez les adipocytes<sup>262</sup>. Ces changements de métabolisme s'expliquent par la capacité du TNF $\alpha$  à réguler l'activité et l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides telles que la lipoprotéine lipase ou la lipase hormonosensible<sup>263,264</sup>. Ces régulations d'expression semblent impliquer la voie NF $\kappa$ B en aval du récepteur au TNF $\alpha$ <sup>265</sup>.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai eu la chance d'être impliqué dans deux autres projets de recherches portant sur le rôle des récepteurs de la famille du TNF $\alpha$  et de la voie NF $\kappa$ B dans la biologie des Treg. Contre toute attente, il existe des liens bien réels entre ces deux projets et le métabolisme des Treg. Les travaux menés par le Dr Martina Lubrano Di Rocco ont pu mettre en évidence que la stimulation de plusieurs membres de la famille des récepteurs au TNF $\alpha$  présents à la surface des Treg conduisait à une augmentation de la capacité prolifératrice de ces cellules *in vitro* (Cf. Article 4). De manière intéressante les différents agonistes utilisés produisaient des signatures transcriptomiques similaires dont une partie des gènes induits correspondait à des acteurs impliqués dans la régulation de la voie de mévalonate. Il est alors possible que l'augmentation de prolifération et de fonction suppressive des Treg induite par ces agonistes soit liée à l'activation de cette voie métabolique qui est décrite comme essentielle pour la fonction des Treg *in vivo*<sup>241</sup>. Il serait alors intéressant de tester si l'effet de ces agonistes est perdu chez les Treg déficients pour mTOR étant donné que cette protéine constitue un acteur majeur de la régulation de la voie du mévalonate chez les Treg<sup>241</sup>.

Dans son travail, le Dr Lubrano Di Rocco a également mis en évidence que l'effet des agonistes utilisés était en partie dépendant de la sous unité RelA du facteur de transcription NF $\kappa$ B étant donné que l'utilisation de Treg déficients pour ce gène conduisait à une perte d'environ 50 % de l'effet des agonistes. Les travaux du Dr Emilie Ronin, menés en amont, avaient quant à eux permis de comprendre plus en profondeur le rôle de la sous unité RelA dans les Treg *in vivo*. Par l'utilisation du système Cre-lox, le Dr Ronin a pu montrer que la perte de RelA chez les Treg conduisait à une perte de stabilité de ceux-ci et à la survenue d'un syndrome auto-immun

systemique et létal pour la souris (Cf. Article 3). Cette instabilité des Treg rappelle celle observée chez les Treg déficients pour mTOR et pourrait indiquer une interaction entre les voies mTOR et NFκB. Cette interaction pourrait très bien être verticale dans le sens où la fixation du TNFα à son récepteur pourrait induire une activation de NFκB qui conduirait elle-même à la stimulation de mTOR et finirait par une induction de la voie du mévalonate conduisant au boost des Treg. Cependant, le fait que l'effet des agonistes ne soit pas entièrement perdu suite à l'absence de RelA suggère plutôt une interaction en parallèle des voies mTOR et NFκB. Celles-ci pourraient alors agir en synergie pour induire le boost des Treg.

Néanmoins, ces spéculations sont plus qu'incertaines et devront faire l'objet d'étude plus approfondies afin d'évaluer clairement le rôle de mTOR et du métabolisme dans le boost des Treg induit par les récepteurs de la famille du TNFα.

## 5. Modèle Cre-lox : ami ou ennemi ?

### 5.1 Un système de délétion spécifique in vivo

Les immunologues ont réellement commencé à s'intéresser au rôle du métabolisme dans la réponse immunitaire au début des années 2000, créant ainsi un nouveau domaine de recherche en immunologie, l'immuno-métabolisme. Bien que plusieurs auteurs se soient intéressés à ce champ de recherche dès les années 1990<sup>10,20,22,28</sup>, les travaux réalisés par l'équipe de Thompson et Rathmell sont parmi les études fondatrices de l'immuno-métabolisme. Leurs études in vitro ont permis d'établir les premières cartes de régulation du shift métabolique lors de l'activation du lymphocyte T et ont ainsi ouvert la voie à la (re)découverte de nouveaux acteurs tels que mTOR ou AMPK<sup>60,14,266,267,24</sup>. Leurs travaux et ceux d'autres auteurs ont ensuite suggéré une régulation différente du métabolisme selon les populations de T activés, particulièrement entre les Treg et les Tconv et ont permis d'identifier des caractéristiques métaboliques spécifiques à chaque population<sup>222,223,227</sup>.

Cependant ces études, réalisées majoritairement à l'aide d'inhibiteur peu spécifiques et dans des conditions de culture riche en nutriments, posaient la question de leur véracité in vivo. Il fallait donc trouver une méthode permettant de tester la réalité de ces observations au sein de l'organisme et le système Cre-lox semblait tout désigné étant donné qu'il permettait la délétion spécifique d'un gène dans une population cellulaire donnée. L'équipe de Powell a ainsi croisé la souris *CD4<sup>Cre</sup>* avec la souris *mTOR<sup>lox</sup>* et a permis de confirmer le rôle critique de mTOR dans la prolifération et l'activation des lymphocytes T. L'équipe a également rapporté au cours de ce travail que les lymphocytes T déficients pour mTOR se différenciaient plus facilement en Treg après stimulation de leur TCR<sup>224</sup>. Les conclusions, quant au rôle de mTOR dans les Treg, restaient cependant délicates étant donné que la délétion de mTOR n'était en aucun cas spécifique de ces cellules. En effet, la délétion de mTOR dans l'ensemble des lymphocytes T pouvait avoir des conséquences indirectes sur le développement des Treg de cette souris.

La publication en 2008 de la souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>* par le laboratoire de Rudensky apporta finalement l'outil manquant pour étudier le métabolisme des Treg<sup>151</sup>. Cette souris permettait pour la première fois la délétion d'un gène spécifiquement au sein des Treg et ouvrait un champ de possibilités pour tester certaines hypothèses générées par les expériences in vitro. Les souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>* ont ainsi été croisées avec de nombreuses souris, dont la souris *Raptor<sup>lox</sup>*, qui a permis en 2013 de mettre en évidence le rôle crucial et inattendu de mTORC1 dans les Treg<sup>241</sup>.

En plus de la possibilité de délétion spécifique offerte par la souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>*, la présence de l'YFP permettait également l'isolation et le tri des Treg pour des analyses plus poussées ex-vivo. La souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>* a ainsi fortement contribué à notre compréhension actuelle du métabolisme des Treg et participe encore aujourd'hui à la génération du savoir entourant la biologie de ces cellules.

## 5.2 Un modèle avec ses limites

Comme chaque modèle, le système Cre-lox possède néanmoins des limites qu'il est essentiel d'avoir à l'esprit avant d'utiliser la souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>*. La première limitation concerne l'impact de l'insertion de la Cre dans la région non transcrite de *Foxp3*. En effet, cette insertion n'est en aucun cas anodine et nous avons observé un désavantage des Treg exprimant la Cre comparé aux Treg sauvages dans les femelles hétérozygotes *Foxp3<sup>Cre/+YFP</sup>*. Ce handicap des Treg exprimant la Cre est caractérisé par un pourcentage plus faible, une expression réduite de plusieurs marqueurs d'activation ainsi qu'une prolifération diminuée de ces cellules. Cet effet néfaste de l'insertion de la Cre sur la biologie des Treg peut s'expliquer par le fait que l'allèle *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>* serait hypomorphe et induirait une diminution de l'expression de *Foxp3* qui contrôle à lui seul de nombreux aspects de la biologie des Treg<sup>268</sup>.

Cet impact non négligeable de la Cre sur la biologie des Treg implique donc d'utiliser des témoins adéquats afin de ne pas confondre l'effet de la délétion du gène ciblé avec celui de la Cre. Carow et al. ont ainsi rapporté que les résultats statistiques de plus de 200 études étaient impactés par l'utilisation de mauvais témoins. Cette équipe a alors proposé que l'utilisation de souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>* comme témoin devienne la norme dans le cas de l'utilisation du système Cre-lox chez les Treg<sup>269</sup>.

Une seconde limitation quant à l'utilisation de la souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>* concerne sa spécificité. Il a été rapporté que l'allèle *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>* peut s'exprimer dans d'autres cellules que les Treg et ceci de manière très variable d'une souris à l'autre, tant d'un point de vue quantitatif que du type de cellules concernées, et donc induire une recombinaison du gène cible en dehors de la population voulue<sup>268</sup>. Ce phénomène pose problème car premièrement il remet en question la spécificité du modèle et deuxièmement il peut générer des souris KO complet si l'expression aléatoire de la Cre a lieu dans la lignée germinale.

Nous avons pu visualiser ce phénomène par l'utilisation du système ROSA26-Tomato qui permet d'associer une fluorescence permanente aux cellules ayant exprimé la Cre, même transitoirement (**Annexe 1**). Le fait que ce système ait généré dans certain cas des souris entièrement fluorescentes nous a permis de nous rendre compte de l'ampleur du problème chez certains individus... En parallèle, nous avons mis en place une PCR qui nous a permis de visualiser la présence de l'allèle recombiné et donc la fuite de la Cre lors du génotypage de nos souris (**Annexe 1**). Ces deux systèmes, ROSA26-Tomato et PCR, ont ainsi été utilisés afin de

détecter et d'éliminer de notre étude les individus les plus sujets à la fuite d'expression de la Cre.

Une autre solution en cours de développement au laboratoire pour palier à la fuite d'expression de la Cre chez la souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>* repose dans l'utilisation d'un système inductible, également développé par le laboratoire du Pr Rudensky<sup>270</sup>, la souris *Foxp3<sup>Cre-ind-GFP</sup>*. Dans ce système, l'expression de la Cre reste liée à celle de Foxp3 mais sa localisation est cytoplasmique, ce qui empêche son action sur le patrimoine génétique du Treg. L'action de la Cre n'est alors permise que lorsque la cellule se trouve exposée à du Tamoxifen qui permet la relocalisation de la protéine au niveau du noyau et donc son action sur l'ADN. De cette manière, une souris *Foxp3<sup>Cre-ind-GFP</sup> Prkaa1<sup>Lox</sup>* ne subira une recombinaison du gène de l'AMPK dans les Treg uniquement si celle-ci est traitée avec du Tamoxifen.

De manière intéressante, ce système inductible semble fortement diminuer, voire stopper la fuite d'expression de la Cre. En effet, les systèmes ROSA26-Tomato et PCR mis en place au sein de notre laboratoire n'ont à ce jour pas mis en évidence d'expression de la Cre en dehors de la population Treg. Ce système Cre-lox inductible pourrait alors pallier le défaut de spécificité du système Cre-lox actuel.

## 6. Pertinence de l'étude face à la situation chez l'homme

Une question se pose néanmoins quant à la véracité de l'ensemble de ces données chez l'homme. En effet, l'essentiel des informations présentées dans ce manuscrit ont été obtenues dans des modèles murins et quelques études ont mis en évidence des différences significatives en termes de flux métabolique entre les Treg humains et murins. En effet, contrairement aux travaux de Rathmell suggérant un métabolisme des Treg murins basées sur l'OXPPOS et la FAO<sup>227-230</sup>, des études chez l'homme ont montré une forte dépendance des Treg à la glycolyse. Ceci est illustré par les travaux de Procaccini et al. qui ont pu observer, via l'analyse du protéome de cellules issus de sang de donneur sains, que les Treg étaient fortement glycolytiques et que ceux-ci utilisaient à la fois la FAO et la glycolyse pour proliférer *in vitro*<sup>247</sup>. D'autre part, l'étude de Li et al. a permis de montrer que les Treg humain présentent un profil métabolique, en terme d'expression d'enzyme et d'abondance de métabolites, beaucoup plus orienté vers la glycolyse que les Tconv<sup>271</sup>.

On peut alors se demander si cette différence de métabolisme entre Treg murins et Treg humains ne pourrait pas simplement venir du fait que les études réalisées chez la souris l'ont été principalement sur des iTreg tandis que celles réalisés chez l'homme ont été faites sur des tTreg. En effet nous avons vu précédemment que le TGF $\beta$  utilisé pour induire des Treg à partir de Tconv *in vitro* pouvait induire une activation de l'AMPK via TAK1 et ainsi biaiser totalement le métabolisme de ces cellules (cf. INTRODUCTION, chapitre 2, partie 1.2.3). Cette hypothèse est étayée par les travaux de De Rosa et al. qui ont mis en évidence un rôle crucial de la glycolyse dans l'établissement de l'expression de Foxp3 dans un système d'induction d'iTreg humain sans TGF $\beta$ <sup>246</sup>. Ceci renforce l'idée que la différence de métabolisme entre iTreg murin et iTreg humain pourrait être liée à l'addition de TGF $\beta$  dans la culture. De plus, si on se réfère aux travaux de Priyadharshini et al. évoqués dans l'introduction de ce manuscrit, on constate que les tTreg murins semblent également être glycolytiques et présentent des niveau de GLUT-1 et de relargage de lactate similaire aux Tconv<sup>248</sup>.

Il semblerait ainsi que le métabolisme des Treg murins et humain soit comparable et que, bien que certainement dépendant du contexte et du tissu dans lequel le Treg se trouve, celui-ci soit orienté vers une glycolyse importante à l'état basal. Il est alors probable que les données générées au cours de ce travail soient transférables à l'homme. Néanmoins, se pose la question de la justesse des modèles animaux utilisés. Il est évident que le syndrome auto-immun observé



chez la souris *Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> mTOR<sup>lox</sup>* est extrêmement aigu et ne reflète absolument pas les différentes pathologies auto-immunes existantes chez l'homme. De plus, nous n'avons à ce jour pas trouvé de description d'une mutation induisant une perte de fonction de mTOR chez l'homme, la comparaison avec notre modèle murin est donc compliquée. Néanmoins, l'étude de Chapman et al. a pu montrer que l'inhibition de mTOR à l'aide de Torine conduit à une réduction de l'expression de Foxp3 chez des Treg humain in vitro<sup>245</sup>. L'importance de mTOR dans le maintien de la stabilité des Treg pourrait ainsi ne pas se limiter uniquement à la souris.

Une autre critique pourrait concerner la validité de nos modèles de croissance tumorale in vivo. Dans ce travail, nous avons utilisés deux lignées de cellules tumorales murines, la lignée MCA, un fibrosarcome et la lignée MC38, un adénocarcinome colorectal. Cependant, ces deux lignées ont été injectées et se sont développées de manière sous cutanée, ce qui ne reflète en aucun cas le contexte pathologique de ces types de cancers chez l'homme. On peut alors imaginer que la vascularisation de ces modèles tumoraux n'est pas à l'image de la pathologie humaine et que, par conséquent, l'environnement métabolique et l'infiltrat immunitaire associés à ces tumeurs n'ont rien à voir avec ce qui est observé chez le patient. Il serait alors intéressant d'utiliser des modèles tumoraux implantés de façon orthotopique, tels que la lignée LL/2-Luc, un carcinome pulmonaire murin exprimant la luciférase, dont la croissance au sein du poumon pourrait être suivie par luminescence sous anesthésie. Ceci permettrait une meilleure modélisation de la pathologie et permettrait une transférabilité moins incertaine chez l'homme.

Bien qu'imparfaits, nos modèles ont néanmoins eu le mérite de mettre en lumière des phénomènes biologiques encore mal décrits à ce jour et nous encouragent à pousser nos investigations plus loin afin de nous rapprocher au maximum des événements physiologiques se déroulant chez l'homme.

## 7. Traitement modulant le métabolisme, nouveaux espoirs

L'ensemble des données disponibles à l'heure actuelle fait état d'un rôle essentiel du métabolisme cellulaire dans la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. Manipuler le métabolisme à l'aide d'inhibiteurs pourrait donc constituer un moyen valable de contrôler l'activité du système immunitaire dans différentes situations, telles que les greffes d'organes, les pathologies auto-immunes ou les cancers.

### 7.1 La rapamycine, un antimicrobien venu de l'île de pâque

La rapamycine constitue un des inhibiteurs métaboliques les plus couramment utilisés à l'heure actuelle. Cette drogue, initialement découverte en 1975 dans la région de Rapa pour ses propriétés antimicrobiennes, fit l'objet d'un vif intérêt de la part de la communauté scientifique dans les années 90. En effet, celle-ci démontra des propriétés immunosuppressives via sa capacité à stopper la prolifération de nombreuses cellules immunes dont celles des lymphocytes T et B<sup>272,273</sup>. L'identification de sa cible cellulaire conduisit ainsi à la découverte de la protéine mTOR comme nœud de régulation du métabolisme des lymphocytes T activés et participa à l'avènement de l'immuno-métabolisme<sup>274-276</sup>.

Le Sirolimus (nom générique de la rapamycine), en combinaison avec des inhibiteurs de calcineurines, fut ainsi testé lors de protocoles de greffes d'organes solides et démontra des effets bénéfiques dans le maintien de la tolérance à la greffe de rein chez l'homme<sup>277</sup>. Ceci valut au Sirolimus d'être approuvé comme prophylaxie lors des transplantations rénales dans de nombreux pays. La combinaison Sirolimus-Cyclosporine (un inhibiteur de calcineurines) a également montré un prolongement de la survie du greffon dans des modèles animaux de greffe de moelle osseuses, d'ilots pancréatiques et de cœur suggérant ainsi de nouvelles perspectives pour cette molécule<sup>278</sup>.

En plus de son application dans les greffes d'organes, la rapamycine semble également avoir un effet bénéfique dans un contexte auto-immun. En effet, il a été observé que l'administration orale de rapamycine dans des modèles murins de lupus érythémateux systémique (SLE), de diabète de type I ou de sclérose en plaques, retarde la survenue des symptômes et atténue la sévérité de la pathologie<sup>279</sup>. De plus, d'autres études ont pu montrer que l'infusion de Treg, préalablement cultivés en présence de rapamycine, permettait de réduire les symptômes associés à la maladie du greffon contre l'hôte (GVH)<sup>280</sup> ou au diabète de type I<sup>281</sup> chez l'homme.

Pour finir, il a été montré que l'expansion *in vivo* de Treg à l'aide d'IL-2 et de rapamycine conférait une résistance à l'EAE chez la souris<sup>282</sup>. Ces observations évoquent ainsi une application potentielle de la rapamycine dans des pathologies auto-immunes et font aujourd'hui naître un nouvel espoir quant à l'amélioration de la prise en charge de ces maladies.

Plus récemment, la rapamycine a également suscité un intérêt dans le développement de traitement anti-cancéreux. En effet, le métabolisme d'une cellule tumorale est généralement caractérisé par une forte activité mTOR, favorisée par la survenue de mutation dans des oncogènes tels que PI3K, Akt ou dans des gènes suppresseurs de tumeur tels que LKB1 ou PTEN<sup>283</sup>. Cette forte activité mTOR permet une reprogrammation métabolique similaire à celle du lymphocyte T activé et donne ainsi un avantage de croissance à la cellule tumorale<sup>284</sup>. Ces observations ont donc conduit à la mise en place de plusieurs essais cliniques testant l'efficacité de la rapamycine dans le traitement de différents types de cancers. Bien que l'Everolimus (un analogue de la rapamycine plus soluble dans l'eau) ait été approuvé aux Etats Unis pour les traitements des carcinomes rénaux et des tumeurs neuroendocrines, l'efficacité de ces traitements reste limitée<sup>285</sup>. Les essais actuels se concentrent donc plus sur d'éventuelles combinaisons avec des inhibiteurs d'aromatases, tels que l'Exemestane qui, en combinaison avec l'Everolimus, a été approuvé aux Etats Unis pour le traitement du cancer du sein post ménopause<sup>285</sup>.

## 7.2 La metformine, plus qu'un anti diabétique ?

Initialement isolée à partir d'une plante, la metformine fut à l'origine décrite comme ayant des propriétés hypoglycémiantes de par son action inhibitrice sur la production du glucose par les cellules hépatiques et activatrice sur l'absorption de celui-ci par les tissus périphériques. Ceci valut à cette drogue le statut d'antidiabétiques et son utilisation comme traitement de référence chez les patients présentant un diabète de type 2<sup>286</sup>. Des études complémentaires montrèrent par la suite que l'action de la metformine passait par une inhibition du complexe I de l'ETC. Cette inhibition induisait alors une chute de production d'ATP et résultait en une activation indirecte de l'AMPK et, a fortiori, une réduction de l'activité mTOR<sup>287</sup>.

Certain auteurs, s'appuyant sur le travail de O'Neill et Hardie, ont alors suggéré que la metformine, par son action sur l'AMPK, pourrait favoriser les cellules anti-inflammatoires au détriment des cellules pro-inflammatoires<sup>288</sup>. Plusieurs observations semblent en accord avec cette idée. En effet, les travaux de Nath et al. ont pu montrer que des souris traitées avec de la metformine présentaient une réduction des symptômes de l'EAE associée à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires<sup>219</sup>. De manière intéressante, une seconde équipe a pu montrer que l'atténuation des symptômes de l'EAE après traitement à la metformine était également associée à une augmentation du compartiment Treg au détriment du compartiment Th17<sup>289</sup>. De plus, les effets bénéfiques de la metformine ne semblent pas s'arrêter à l'EAE. En effet, une réduction des symptômes inflammatoires a également été rapportée dans des modèles murins d'arthrite rhumatoïde, de maladie de Crohn, de GVH et du SLE après traitement à la metformine<sup>290-293</sup>.

Très peu de données sont disponibles à ce jour sur les effets thérapeutiques de la metformine dans les pathologies auto-immunes chez l'homme. Une étude de cohorte a néanmoins été réalisée en 2015 sur des patients atteints de sclérose en plaques, traités ou non à la metformine. Cette étude a pu montrer que les patients sous metformine présentaient des symptômes plus faibles ainsi qu'une diminution de proportion de cellules sécrétant de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-17 dans le sang<sup>294</sup>. D'autre part, une preuve de concept sur l'efficacité de la metformine dans le traitement du SLE a également été apportée dans une étude qui montrait que la prise de metformine réduisait de moitié les risques de poussées<sup>295</sup>. Concernant l'arthrite rhumatoïde, un essai clinique est actuellement en cours en Italie afin de tester l'efficacité de la metformine dans cette pathologie<sup>288</sup>.

La metformine intéresse également la communauté scientifique et médicale pour une autre raison. En 2010, une étude épidémiologique a mis en lumière que, chez les patients atteints de diabète de type 2, les individus sous traitement metformine présentaient une réduction de 31% du risque de développer un cancer par rapport aux individus prenant d'autres traitements<sup>296</sup>. Ce risque diminué peut s'expliquer par le fait que la metformine diminue la quantité d'insuline et de glucose dans le sang, or ces deux molécules sont décrites comme capables d'induire la survie et la prolifération des cellules tumorales<sup>297</sup>. La metformine pourrait également avoir un impact direct sur le métabolisme des cellules tumorales via son action sur l'AMPK qui inhiberait l'activité mTOR, essentielles pour ces cellules<sup>297</sup>.

De manière intéressante, il semblerait que la metformine ait également un impact sur la réponse anti-tumorale. En effet Eikawa et al. ont rapporté que l'effet bénéfique de la metformine sur la croissance tumorale chez la souris n'était visible qu'en présence d'un système immunitaire complet. Cette même équipe a pu également montrer que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur des souris traitées à la metformine étaient plus nombreux et semblaient protégés de l'épuisement immunitaire induit par la tumeur<sup>298</sup>. Une seconde étude a apporté des précisions quant au mécanisme pouvant expliquer le phénotype des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur des souris traitées à la metformine. Dans leur étude, Cha et al. ont montré que la metformine induisait une activation de l'AMPK au sein de la cellule tumorale. Celle-ci conduisait alors à une réduction de l'expression de la molécule de surface PD-L1 (de l'anglais « programmed cell death ligand-1 ») qui a été décrite comme étant à l'origine du phénotype d'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur<sup>299</sup>.

L'ensemble de ces observations ont ainsi conduit à la mise en place de plusieurs essais cliniques, notamment dans le cancer du sein. Ces essais ont montré une réduction de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de la proportion de cellules apoptotiques au sein de tumeurs mammaires de femmes sous traitement metformine. Bien que l'ensemble des patientes étaient toutes non diabétiques, l'effet de la metformine était plus visible chez les sujets possédant une insulino résistance<sup>300-302</sup>. Les mécanismes derrière l'effet bénéfique de la metformine dans un contexte tumoral semble ainsi complexes et mérites des investigations plus poussées.





## CONCLUSION

Par ce travail, j'espère vous avoir convaincu du rôle essentiel du métabolisme cellulaire dans l'activité des lymphocytes T. D'autre part, contrairement à ce que la littérature de ces dernières années suggérait, nous avons pu montrer que l'AMPK n'a pas un rôle prépondérant dans la biologie des Treg à l'état basal. A l'inverse, nous, et d'autres auteurs, avons mis en évidence un rôle critique de mTOR dans la biologie de ces cellules à l'état basal. En effet, nos données montrent clairement l'implication de mTOR dans le maintien de la stabilité des Treg ainsi que de leur capacité migratoire vers les organes non-lymphoïdes. Néanmoins, les Treg ne semblent pas uniquement se reposer sur mTOR et requièrent l'AMPK pour exercer leur fonction suppressive dans la tumeur. Le métabolisme des Treg devrait ainsi être vu comme une balance entre activité mTOR et AMPK dont l'équilibre serait dicté par le contexte environnemental, comme la présence de nutriments ou de signaux de co-stimulation. Comprendre en profondeur le métabolisme des Treg sera, je pense, un des enjeux majeurs du futur de l'immuno-métabolisme. Cette compréhension permettra de mieux déchiffrer les effets des inhibiteurs métaboliques utilisés actuellement en clinique afin d'étendre leur application à un plus grand nombre de pathologies et de peut-être identifier de nouvelles cibles du métabolisme pour modifier la biologie des Treg et proposer de nouveaux traitements.





## **BIBLIOGRAPHIE**

---



1. Fox, C. J., Hammerman, P. S. & Thompson, C. B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 844–852 (2005).
2. Gerriets, V. A. & Rathmell, J. C. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.* **33**, 168–173 (2012).
3. van der Windt, G. J. W. & Pearce, E. L. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol. Rev.* **249**, 27–42 (2012).
4. Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C.-H. & Jones, R. G. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* **342**, 1242454 (2013).
5. Almeida, L., Lochner, M., Berod, L. & Sparwasser, T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Immunol.* **28**, 514–524 (2016).
6. Jr, C. A. J. *et al.* *Immunobiology*. (Garland Science, 2001).
7. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* **27**, 173–178 (2007).
8. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
9. Krauss, S., Brand, M. D. & Buttgerit, F. Signaling takes a breath--new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction. *Immunity* **15**, 497–502 (2001).
10. Chakrabarti, R., Jung, C. Y., Lee, T. P., Liu, H. & Mookerjee, B. K. Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **152**, 2660–2668 (1994).
11. Bruce Alberts, A. J. J. L. D. M. M. R. K. R. P. W. *Biologie moléculaire de la cellule*. (Médecine Sciences Publications, 2017).
12. Carr, E. L. *et al.* Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 1037–1044 (2010).
13. Fritz, I. B. & Yue, K. T. LONG-CHAIN CARNITINE ACYLTRANSFERASE AND THE ROLE OF ACYLCARNITINE DERIVATIVES IN THE CATALYTIC INCREASE OF FATTY ACID OXIDATION INDUCED BY CARNITINE. *J. Lipid Res.* **4**, 279–288 (1963).
14. Frauwirth, K. A. *et al.* The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* **16**, 769–777 (2002).
15. Nath, M. D., Ruscetti, F. W., Petrow-Sadowski, C. & Jones, K. S. Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. *Blood* **101**, 3085–3092 (2003).
16. Manel, N. *et al.* The HTLV receptor is an early T-cell activation marker whose expression requires de novo protein synthesis. *Blood* **101**, 1913–1918 (2003).
17. Wang, R. *et al.* The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity* **35**, 871–882 (2011).
18. Lunt, S. Y. & Vander Heiden, M. G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 441–464 (2011).
19. Ashizawa, K., Willingham, M. C., Liang, C. M. & Cheng, S. Y. In vivo regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **266**, 16842–16846 (1991).
20. Marjanovic, S., Eriksson, I. & Nelson, B. D. Expression of a new set of glycolytic isozymes in activated human peripheral lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1087**, 1–6 (1990).
21. Ostroukhova, M. *et al.* The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, L300-307 (2012).

22. Bental, M. & Deutsch, C. Metabolic changes in activated T cells: an NMR study of human peripheral blood lymphocytes. *Magn. Reson. Med.* **29**, 317–326 (1993).
23. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
24. Jacobs, S. R. *et al.* Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 4476–4486 (2008).
25. Sena, L. A. *et al.* Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* **38**, 225–236 (2013).
26. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20 (2008).
27. Chen, H. W., Heiniger, H. J. & Kandutsch, A. A. Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1950–1954 (1975).
28. Chakrabarti, R. & Engleman, E. G. Interrelationships between mevalonate metabolism and the mitogenic signaling pathway in T lymphocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* **266**, 12216–12222 (1991).
29. Kamiński, M. M. *et al.* T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation. *Cell Rep.* **2**, 1300–1315 (2012).
30. Jones, R. G. *et al.* The proapoptotic factors Bax and Bak regulate T Cell proliferation through control of endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis. *Immunity* **27**, 268–280 (2007).
31. Los, M. *et al.* IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J.* **14**, 3731–3740 (1995).
32. Deberardinis, R. J., Sayed, N., Ditsworth, D. & Thompson, C. B. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 54–61 (2008).
33. Metallo, C. M. *et al.* Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* **481**, 380–384 (2011).
34. DeBerardinis, R. J. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19345–19350 (2007).
35. Perez-Leal, O. & Merali, S. Regulation of polyamine metabolism by translational control. *Amino Acids* **42**, 611–617 (2012).
36. Fillingame, R. H., Jorstad, C. M. & Morris, D. R. Increased cellular levels of spermidine or spermine are required for optimal DNA synthesis in lymphocytes activated by concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4042–4045 (1975).
37. Fillingame, R. H. & Morris, D. R. Polyamine accumulation during lymphocyte transformation and its relation to the synthesis, processing, and accumulation of ribonucleic acid. *Biochemistry* **12**, 4479–4487 (1973).
38. Hölttä, E. & Hovi, T. Polyamine depletion results in impairment of polyribosome formation and protein synthesis before onset of DNA synthesis in mitogen-activated human lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* **152**, 229–237 (1985).
39. Langkamp-Henken, B., Johnson, L. R., Viar, M. J., Geller, A. M. & Kotb, M. Differential effect on polyamine metabolism in mitogen- and superantigen-activated human T-cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 337–347 (1998).
40. Blagih, J. *et al.* The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. *Immunity* **42**, 41–54 (2015).
41. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3589–3594 (2009).

42. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**, 9–22 (2007).
43. Loewith, R. *et al.* Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **10**, 457–468 (2002).
44. Sarbassov, D. D. *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol. CB* **14**, 1296–1302 (2004).
45. Jacinto, E. *et al.* Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1122–1128 (2004).
46. Sarbassov, D. D. *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* **22**, 159–168 (2006).
47. Powell, J. D. & Delgoffe, G. M. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity* **33**, 301–311 (2010).
48. Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B. & Horton, M. R. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 39–68 (2012).
49. Liu, C., Chapman, N. M., Karmaus, P. W. F., Zeng, H. & Chi, H. mTOR and metabolic regulation of conventional and regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 837–847 (2015).
50. Sengupta, S., Peterson, T. R. & Sabatini, D. M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* **40**, 310–322 (2010).
51. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**, 177–185 (2006).
52. Düvel, K. *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* **39**, 171–183 (2010).
53. Oh, W. J. & Jacinto, E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**, 2305–2316 (2011).
54. Buckley, A. F., Kuo, C. T. & Leiden, J. M. Transcription factor LKLF is sufficient to program T cell quiescence via a c-Myc-dependent pathway. *Nat. Immunol.* **2**, 698–704 (2001).
55. Kerdiles, Y. M. *et al.* Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* **10**, 176–184 (2009).
56. Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R. A. & Li, M. O. An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* **30**, 358–371 (2009).
57. Matloubian, M. *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
58. Cardoso, C. R. *et al.* IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G593–600 (2009).
59. Colombetti, S., Basso, V., Mueller, D. L. & Mondino, A. Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 2730–2738 (2006).
60. Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W. & Thompson, C. B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 6869–6876 (2001).
61. Zheng, Y. *et al.* A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 2163–2170 (2007).
62. Zheng, Y., Delgoffe, G. M., Meyer, C. F., Chan, W. & Powell, J. D. Anergic T cells are metabolically anergic. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 6095–6101 (2009).

63. Nguyen, L. S. *et al.* Sirolimus and mTOR Inhibitors: A Review of Side Effects and Specific Management in Solid Organ Transplantation. *Drug Saf.* (2019). doi:10.1007/s40264-019-00810-9
64. Delgoffe, G. M. *et al.* The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* **30**, 832–844 (2009).
65. Hardie, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 774–785 (2007).
66. Salt, I. *et al.* AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem. J.* **334** ( Pt 1), 177–187 (1998).
67. Tamás, P. *et al.* Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca<sup>2+</sup> in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **203**, 1665–1670 (2006).
68. MacIver, N. J. *et al.* The liver kinase B1 is a central regulator of T cell development, activation, and metabolism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 4187–4198 (2011).
69. Mayer, A., Denanglaire, S., Viollet, B., Leo, O. & Andris, F. AMP-activated protein kinase regulates lymphocyte responses to metabolic stress but is largely dispensable for immune cell development and function. *Eur. J. Immunol.* **38**, 948–956 (2008).
70. Xiao, B. *et al.* Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* **472**, 230–233 (2011).
71. Oakhill, J. S. *et al.* AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* **332**, 1433–1435 (2011).
72. Hawley, S. A. *et al.* Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* **2**, 28 (2003).
73. Hawley, S. A. *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* **2**, 9–19 (2005).
74. Xie, M. *et al.* A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17378–17383 (2006).
75. Davies, S. P., Sim, A. T. & Hardie, D. G. Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* **187**, 183–190 (1990).
76. Lochner, M., Berod, L. & Sparwasser, T. Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function. *Trends Immunol.* **36**, 81–91 (2015).
77. Li, Y. *et al.* AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* **13**, 376–388 (2011).
78. Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456–461 (2011).
79. Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12017–12022 (2007).
80. Buttgerit, F. & Brand, M. D. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem. J.* **312** ( Pt 1), 163–167 (1995).
81. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226 (2008).
82. Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A. & Guan, K.-L. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.* **18**, 1533–1538 (2004).

83. Jones, R. G. *et al.* AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **18**, 283–293 (2005).
84. Andris, F. & Leo, O. AMPK in lymphocyte metabolism and function. *Int. Rev. Immunol.* **34**, 67–81 (2015).
85. Yang, K. & Chi, H. mTOR and metabolic pathways in T cell quiescence and functional activation. *Semin. Immunol.* **24**, 421–428 (2012).
86. Blagih, J., Krawczyk, C. M. & Jones, R. G. LKB1 and AMPK: central regulators of lymphocyte metabolism and function. *Immunol. Rev.* **249**, 59–71 (2012).
87. Finlay, D. K. *et al.* PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* **209**, 2441–2453 (2012).
88. Pollizzi, K. N. *et al.* mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* **125**, 2090–2108 (2015).
89. Rao, R. R., Li, Q., Odunsi, K. & Shrikant, P. A. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8<sup>+</sup> T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* **32**, 67–78 (2010).
90. Doedens, A. L. *et al.* Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat. Immunol.* **14**, 1173–1182 (2013).
91. Delgoffe, G. M. *et al.* The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.* **12**, 295–303 (2011).
92. Lee, K. *et al.* Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* **32**, 743–753 (2010).
93. Pearce, E. L. *et al.* Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* **460**, 103–107 (2009).
94. Araki, K. *et al.* mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460**, 108–112 (2009).
95. Intlekofer, A. M. *et al.* Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* **6**, 1236–1244 (2005).
96. van der Windt, G. J. W. *et al.* Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8<sup>+</sup> T cell memory development. *Immunity* **36**, 68–78 (2012).
97. Verbist, K. C. *et al.* Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. *Nature* **532**, 389–393 (2016).
98. Klein Geltink, R. I. *et al.* Mitochondrial Priming by CD28. *Cell* **171**, 385–397.e11 (2017).
99. Rolf, J. *et al.* AMPK $\alpha$ 1: a glucose sensor that controls CD8 T-cell memory. *Eur. J. Immunol.* **43**, 889–896 (2013).
100. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
101. Nishizuka, Y. & Sakakura, T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* **166**, 753–755 (1969).
102. Gershon, R. K. & Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**, 723–737 (1970).
103. Penhale, W. J., Farmer, A., McKenna, R. P. & Irvine, W. J. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin. Exp. Immunol.* **15**, 225–236 (1973).
104. Sakaguchi, S., Takahashi, T. & Nishizuka, Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J. Exp. Med.* **156**, 1577–1586 (1982).
105. Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. & Masuda, T. 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 (1985).
106. Powrie, F. & Mason, D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J. Exp. Med.* **172**, 1701–1708 (1990).
107. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. 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. Baltim. Md 1950* **155**, 1151–1164 (1995).
108. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).
109. Brunkow, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68–73 (2001).
110. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20–21 (2001).
111. Gabilovich, D. I. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 3–8 (2017).
112. Groux, H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737–742 (1997).
113. Churlaud, G. *et al.* Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front. Immunol.* **6**, 171 (2015).
114. Azzam, H. S. *et al.* Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 5464–5472 (2001).
115. Wong, P., Barton, G. M., Forbush, K. A. & Rudensky, A. Y. Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands. *J. Exp. Med.* **193**, 1179–1187 (2001).
116. Jordan, M. S. *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* **2**, 301–306 (2001).
117. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431–440 (2000).
118. Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. & Singer, A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.* **6**, 152–162 (2005).
119. Hinterberger, M. *et al.* Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat. Immunol.* **11**, 512–519 (2010).
120. Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q. & Li, M. O. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* **32**, 642–653 (2010).
121. Weil, R. & Israël, A. Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB. *Cell Death Differ.* **13**, 826–833 (2006).
122. Isomura, I. *et al.* c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3001–3014 (2009).
123. Long, M., Park, S.-G., Strickland, I., Hayden, M. S. & Ghosh, S. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* **31**, 921–931 (2009).
124. Ruan, Q. *et al.* Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* **31**, 932–940 (2009).

125. Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **6**, 1142–1151 (2005).
126. Burchill, M. A. *et al.* Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* **28**, 112–121 (2008).
127. Kitagawa, Y. *et al.* Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* **18**, 173–183 (2017).
128. Lathrop, S. K. *et al.* Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* **478**, 250–254 (2011).
129. Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
130. Gottschalk, R. A., Corse, E. & Allison, J. P. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J. Exp. Med.* **207**, 1701–1711 (2010).
131. Zheng, S. G. *et al.* TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 3321–3329 (2006).
132. Kretschmer, K. *et al.* Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* **6**, 1219–1227 (2005).
133. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886 (2003).
134. Selvaraj, R. K. & Geiger, T. L. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 7667–7677 (2007).
135. Tone, Y. *et al.* Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* **9**, 194–202 (2008).
136. Laurence, A. *et al.* Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* **26**, 371–381 (2007).
137. Annacker, O. *et al.* Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med.* **202**, 1051–1061 (2005).
138. Xu, L. *et al.* 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 (2010).
139. Koch, M. A. *et al.* The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* **10**, 595–602 (2009).
140. Zheng, Y. *et al.* Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **458**, 351–356 (2009).
141. Voo, K. S. *et al.* Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4793–4798 (2009).
142. Wei, G. *et al.* Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* **30**, 155–167 (2009).
143. Zheng, Y. *et al.* Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* **463**, 808–812 (2010).
144. Floess, S. *et al.* Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* **5**, e38 (2007).
145. Zhou, X. *et al.* Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **10**, 1000–1007 (2009).
146. Duarte, J. H., Zelenay, S., Bergman, M.-L., Martins, A. C. & Demengeot, J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* **39**, 948–955 (2009).

147. Xu, L., Kitani, A., Fuss, I. & Strober, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 6725–6729 (2007).
148. Yang, X. O. *et al.* Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* **29**, 44–56 (2008).
149. Hori, S. Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **259**, 159–172 (2014).
150. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Müller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
151. Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546–558 (2008).
152. Loser, K. *et al.* IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 365–371 (2007).
153. Joetham, A. *et al.* Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 1433–1442 (2007).
154. Schumacher, A. *et al.* Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **110**, 1137–1145 (2007).
155. Steinbrink, K., Wöfl, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A. H. Pillars Article: Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritic Cells. *J. Immunol.* 1997. 159: 4772-4780. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**, 1547–1555 (2016).
156. Shull, M. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693–699 (1992).
157. Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **201**, 1061–1067 (2005).
158. Li, M. O., Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* **26**, 579–591 (2007).
159. Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. 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 (2001).
160. Shevach, E. M. Garp as a therapeutic target for modulation of T regulatory cell function. *Expert Opin. Ther. Targets* **21**, 191–200 (2017).
161. Liénart, S. *et al.* Structural basis of latent TGF-β1 presentation and activation by GARP on human regulatory T cells. *Science* **362**, 952–956 (2018).
162. Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–569 (2007).
163. Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 1783–1786 (2005).
164. Zhao, D.-M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J. & Shevach, E. M. Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* **107**, 3925–3932 (2006).
165. Boissonnas, A. *et al.* Foxp3<sup>+</sup> T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* **32**, 266–278 (2010).
166. Willerford, D. M. *et al.* Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* **3**, 521–530 (1995).

167. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. 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 (2005).
168. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–1362 (2007).
169. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**, 287–296 (1998).
170. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).
171. Mandapathil, M. *et al.* Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 27571–27580 (2010).
172. Bodor, J. *et al.* Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J. Leukoc. Biol.* **69**, 1053–1059 (2001).
173. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1303–1310 (2007).
174. Smyth, L. A. *et al.* CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2430–2440 (2013).
175. Okoye, I. S. *et al.* MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity* **41**, 89–103 (2014).
176. Yokosuka, T. *et al.* Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* **33**, 326–339 (2010).
177. Teft, W. A., Kirchhof, M. G. & Madrenas, J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 65–97 (2006).
178. Dejean, A. S. *et al.* Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat. Immunol.* **10**, 504–513 (2009).
179. Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 1097–1101 (2002).
180. Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* **34**, 137–143 (2013).
181. Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–275 (2008).
182. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10113–10118 (2008).
183. Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L. & Betz, A. G. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* **28**, 402–413 (2008).
184. Liang, B. *et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 5916–5926 (2008).
185. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. & Bhan, A. K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* **16**, 219–230 (2002).
186. Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Fujimoto, M. & Tedder, T. F. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* **118**, 3420–3430 (2008).

187. Amu, S. *et al.* Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 1114–1124.e8 (2010).
188. Watanabe, R. *et al.* Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 4801–4809 (2010).
189. Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* **3**, 944–950 (2002).
190. Carter, N. A., Rosser, E. C. & Mauri, C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R32 (2012).
191. Olkhanud, P. B. *et al.* Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* **71**, 3505–3515 (2011).
192. Lee, K. M. *et al.* TGF- $\beta$ -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1728–1736 (2014).
193. Fontenot, J. D. *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**, 329–341 (2005).
194. Kim, J. M., Rasmussen, J. P. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* **8**, 191–197 (2007).
195. Lindley, S. *et al.* Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **54**, 92–99 (2005).
196. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* **199**, 971–979 (2004).
197. Lyssuk, E. Y., Torgashina, A. V., Soloviev, S. K., Nasonov, E. L. & Bykovskaia, S. N. Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **601**, 113–119 (2007).
198. Hartl, D. *et al.* Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1258–1266 (2007).
199. Karlsson, M. R., Rugtveit, J. & Brandtzaeg, P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J. Exp. Med.* **199**, 1679–1688 (2004).
200. Somerset, D. A., Zheng, Y., Kilby, M. D., Sansom, D. M. & Drayson, M. T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* **112**, 38–43 (2004).
201. Winger, E. E. & Reed, J. L. Low circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* **66**, 320–328 (2011).
202. Gorantla, V. S. *et al.* T Regulatory Cells and Transplantation Tolerance. *Transplant. Rev. Orlando Fla* **24**, 147–159 (2010).
203. Louis, S. *et al.* Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* **81**, 398–407 (2006).
204. Onizuka, S. *et al.* Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* **59**, 3128–3133 (1999).
205. Antony, P. A. *et al.* CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 2591–2601 (2005).

206. Salem, M. *et al.* GARP Dampens Cancer Immunity by Sustaining Function and Accumulation of Regulatory T Cells in the Colon. *Cancer Res.* **79**, 1178–1190 (2019).
207. Tanaka, A. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* **27**, 109–118 (2017).
208. Philips, G. K. & Atkins, M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Int. Immunol.* **27**, 39–46 (2015).
209. Bulliard, Y. *et al.* Activating Fc  $\gamma$  receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J. Exp. Med.* **210**, 1685–1693 (2013).
210. Simpson, T. R. *et al.* Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* **210**, 1695–1710 (2013).
211. Hodi, F. S. *et al.* Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3005–3010 (2008).
212. Liakou, C. I. *et al.* CTLA-4 blockade increases IFN $\gamma$ -producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14987–14992 (2008).
213. Mantovani, A., Sica, A. & Locati, M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* **23**, 344–346 (2005).
214. Rodríguez-Prados, J.-C. *et al.* Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 605–614 (2010).
215. Vats, D. *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab.* **4**, 13–24 (2006).
216. Sag, D., Carling, D., Stout, R. D. & Suttles, J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 8633–8641 (2008).
217. O'Neill, L. A. J. & Hardie, D. G. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* **493**, 346–355 (2013).
218. Nath, N. *et al.* 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a novel immunomodulator with therapeutic efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 566–574 (2005).
219. Nath, N. *et al.* Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 8005–8014 (2009).
220. Walsh, P. T. *et al.* PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs. *J. Clin. Invest.* **116**, 2521–2531 (2006).
221. Crellin, N. K., Garcia, R. V. & Levings, M. K. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood* **109**, 2014–2022 (2007).
222. Haxhinasto, S., Mathis, D. & Benoist, C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J. Exp. Med.* **205**, 565–574 (2008).
223. Sauer, S. *et al.* T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7797–7802 (2008).
224. Delgoffe, G. M. *et al.* The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* **30**, 832–844 (2009).
225. Liu, G., Yang, K., Burns, S., Shrestha, S. & Chi, H. The S1P(1)-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of T(H)1 and T(reg) cells. *Nat. Immunol.* **11**, 1047–1056 (2010).

226. Delgoffe, G. M. *et al.* The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.* **12**, 295–303 (2011).
227. Michalek, R. D. *et al.* Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 3299–3303 (2011).
228. Gerriets, V. A. *et al.* Metabolic programming and PDHK1 control CD4<sup>+</sup> T cell subsets and inflammation. *J. Clin. Invest.* **125**, 194–207 (2015).
229. Gerriets, V. A. *et al.* Foxp3 and Toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression. *Nat. Immunol.* **17**, 1459–1466 (2016).
230. Angelin, A. *et al.* Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* **25**, 1282-1293.e7 (2017).
231. Huynh, A. *et al.* Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability. *Nat. Immunol.* **16**, 188–196 (2015).
232. Shrestha, S. *et al.* Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses. *Nat. Immunol.* **16**, 178–187 (2015).
233. Apostolidis, S. A. *et al.* Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **17**, 556–564 (2016).
234. Wei, J. *et al.* Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis. *Nat. Immunol.* **17**, 277–285 (2016).
235. Basu, S., Hubbard, B. & Shevach, E. M. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 279–283 (2015).
236. Berod, L. *et al.* De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat. Med.* **20**, 1327–1333 (2014).
237. Yang, K. *et al.* Homeostatic control of metabolic and functional fitness of Treg cells by LKB1 signalling. *Nature* **548**, 602–606 (2017).
238. He, N. *et al.* Metabolic control of regulatory T cell (Treg) survival and function by Lkb1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 12542–12547 (2017).
239. Wu, D. *et al.* Lkb1 maintains Treg cell lineage identity. *Nat. Commun.* **8**, 15876 (2017).
240. Timilshina, M. *et al.* Activation of Mevalonate Pathway via LKB1 Is Essential for Stability of Treg Cells. *Cell Rep.* **27**, 2948-2961.e7 (2019).
241. Zeng, H. *et al.* mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* **499**, 485–490 (2013).
242. Lacher, S. M. *et al.* HMG-CoA reductase promotes protein prenylation and therefore is indispensable for T-cell survival. *Cell Death Dis.* **8**, e2824 (2017).
243. Kishore, M. *et al.* Regulatory T Cell Migration Is Dependent on Glucokinase-Mediated Glycolysis. *Immunity* **47**, 875-889.e10 (2017).
244. Sun, I.-H. *et al.* mTOR Complex 1 Signaling Regulates the Generation and Function of Central and Effector Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **201**, 481–492 (2018).
245. Chapman, N. M. *et al.* mTOR coordinates transcriptional programs and mitochondrial metabolism of activated Treg subsets to protect tissue homeostasis. *Nat. Commun.* **9**, 2095 (2018).
246. De Rosa, V. *et al.* Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nat. Immunol.* **16**, 1174–1184 (2015).

247. Procaccini, C. *et al.* The Proteomic Landscape of Human Ex Vivo Regulatory and Conventional T Cells Reveals Specific Metabolic Requirements. *Immunity* **44**, 406–421 (2016).
248. Priyadarshini, B. *et al.* Cutting Edge: TGF- $\beta$  and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signals Modulate Distinct Metabolism of Regulatory T Cell Subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **201**, 2215–2219 (2018).
249. Kim, C. H. & Broxmeyer, H. E. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 6–15 (1999).
250. Smigiel, K. S. *et al.* CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.* **211**, 121–136 (2014).
251. Klysz, D. *et al.* Glutamine-dependent  $\alpha$ -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Sci. Signal.* **8**, ra97 (2015).
252. Xu, T. *et al.* Metabolic control of TH17 and induced Treg cell balance by an epigenetic mechanism. *Nature* **548**, 228–233 (2017).
253. Ichiyama, K. *et al.* The methylcytosine dioxygenase Tet2 promotes DNA demethylation and activation of cytokine gene expression in T cells. *Immunity* **42**, 613–626 (2015).
254. Liu, B. *et al.* The lineage stability and suppressive program of regulatory T cells require protein O-GlcNAcylation. *Nat. Commun.* **10**, 354 (2019).
255. Reuter, S. E. & Evans, A. M. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin. Pharmacokinet.* **51**, 553–572 (2012).
256. Rao, E. *et al.* Deficiency of AMPK in CD8+ T cells suppresses their anti-tumor function by inducing protein phosphatase-mediated cell death. *Oncotarget* **6**, 7944–7958 (2015).
257. Cobbold, S. P. *et al.* Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12055–12060 (2009).
258. Geiger, R. *et al.* L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* **167**, 829–842.e13 (2016).
259. O’Sullivan, D., Sanin, D. E., Pearce, E. J. & Pearce, E. L. Metabolic interventions in the immune response to cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 324–335 (2019).
260. Chen, X., Xun, K., Chen, L. & Wang, Y. TNF- $\alpha$ , a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochem. Funct.* **27**, 407–416 (2009).
261. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J. Clin. Invest.* **80**, 184–190 (1987).
262. Mattacks, C. A. & Pond, C. M. Interactions of noradrenalin and tumour necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 4 and interleukin 6 in the control of lipolysis from adipocytes around lymph nodes. *Cytokine* **11**, 334–346 (1999).
263. Price, S. R., Olivecrona, T. & Pekala, P. H. Regulation of lipoprotein lipase synthesis by recombinant tumor necrosis factor--the primary regulatory role of the hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 738–746 (1986).
264. Sumida, M., Sekiya, K., Okuda, H., Tanaka, Y. & Shiosaka, T. Inhibitory effect of tumor necrosis factor on gene expression of hormone sensitive lipase in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* **107**, 1–2 (1990).
265. Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T. R., Van Parijs, L. & Lodish, H. F. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  is obligatory. *Diabetes* **51**, 1319–1336 (2002).
266. Rathmell, J. C., Elstrom, R. L., Cinalli, R. M. & Thompson, C. B. Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2223–2232 (2003).



267. Wieman, H. L., Wofford, J. A. & Rathmell, J. C. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1437–1446 (2007).
268. Franckaert, D. *et al.* Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3(+) and Foxp3(-) T cells. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 417–423 (2015).
269. Carow, B., Gao, Y., Coquet, J., Reilly, M. & Rottenberg, M. E. Ick-Driven Cre Expression Alters T Cell Development in the Thymus and the Frequencies and Functions of Peripheral T Cell Subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**, 2261–2268 (2016).
270. Rubtsov, Y. P. *et al.* Stability of the Regulatory T Cell Lineage in Vivo. *Science* **329**, 1667–1671 (2010).
271. Li, L. *et al.* TLR8-Mediated Metabolic Control of Human Treg Function: A Mechanistic Target for Cancer Immunotherapy. *Cell Metab.* **29**, 103-123.e5 (2019).
272. Dumont, F. J., Staruch, M. J., Koprak, S. L., Melino, M. R. & Sigal, N. H. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **144**, 251–258 (1990).
273. Kay, J. E., Kromwel, L., Doe, S. E. & Denyer, M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology* **72**, 544–549 (1991).
274. Brown, E. J. *et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**, 756–758 (1994).
275. Chen, Y. *et al.* A putative sirolimus (rapamycin) effector protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1–7 (1994).
276. Sabers, C. J. *et al.* Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 815–822 (1995).
277. Saunders, R. N., Metcalfe, M. S. & Nicholson, M. L. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int.* **59**, 3–16 (2001).
278. Sehgal, S. N., Molnar-Kimber, K., Ocain, T. D. & Weichman, B. M. Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide. *Med. Res. Rev.* **14**, 1–22 (1994).
279. Carlson, R. P., Baeder, W. L., Caccese, R. G., Warner, L. M. & Sehgal, S. N. Effects of orally administered rapamycin in animal models of arthritis and other autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **685**, 86–113 (1993).
280. Hippen, K. L. *et al.* Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 1148–1157 (2011).
281. Putnam, A. L. *et al.* Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **58**, 652–662 (2009).
282. Webster, K. E. *et al.* In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J. Exp. Med.* **206**, 751–760 (2009).
283. Menon, S. & Manning, B. D. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene* **27 Suppl 2**, S43-51 (2008).
284. Yecies, J. L. & Manning, B. D. Transcriptional control of cellular metabolism by mTOR signaling. *Cancer Res.* **71**, 2815–2820 (2011).
285. Li, J., Kim, S. G. & Blenis, J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* **19**, 373–379 (2014).
286. Rena, G., Hardie, D. G. & Pearson, E. R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **60**, 1577–1585 (2017).
287. Viollet, B. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **122**, 253–270 (2012).
288. Ursini, F. *et al.* Metformin and Autoimmunity: A ‘New Deal’ of an Old Drug. *Front. Immunol.* **9**, 1236 (2018).

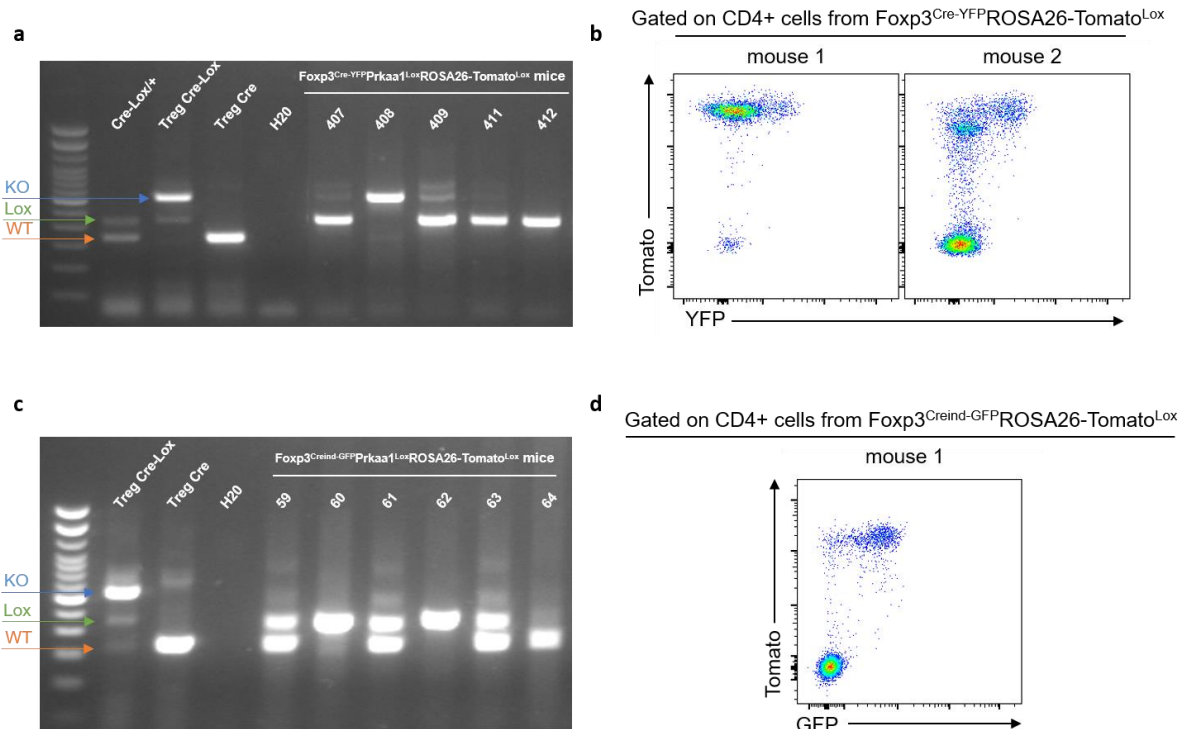
289. Sun, Y. *et al.* Metformin ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating T helper 17 and regulatory T cells in mice. *J. Neuroimmunol.* **292**, 58–67 (2016).
290. Kang, K. Y. *et al.* Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int. Immunopharmacol.* **16**, 85–92 (2013).
291. Lee, S.-Y. *et al.* Metformin Ameliorates Inflammatory Bowel Disease by Suppression of the STAT3 Signaling Pathway and Regulation of the between Th17/Treg Balance. *PLoS One* **10**, e0135858 (2015).
292. Lee, S.-Y. *et al.* Metformin Suppresses Systemic Autoimmunity in Roquin3/san Mice through Inhibiting B Cell Differentiation into Plasma Cells via Regulation of AMPK/mTOR/STAT3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **198**, 2661–2670 (2017).
293. Park, M.-J. *et al.* Metformin attenuates graft-versus-host disease via restricting mammalian target of rapamycin/signal transducer and activator of transcription 3 and promoting adenosine monophosphate-activated protein kinase-autophagy for the balance between T helper 17 and Tregs. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **173**, 115–130 (2016).
294. Negrotto, L., Farez, M. F. & Correale, J. Immunologic Effects of Metformin and Pioglitazone Treatment on Metabolic Syndrome and Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* **73**, 520–528 (2016).
295. Wang, H., Li, T., Chen, S., Gu, Y. & Ye, S. Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**, 3190–3200 (2015).
296. Decensi, A. *et al.* Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **3**, 1451–1461 (2010).
297. Morales, D. R. & Morris, A. D. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu. Rev. Med.* **66**, 17–29 (2015).
298. Eikawa, S. *et al.* Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1809–1814 (2015).
299. Cha, J.-H. *et al.* Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol. Cell* **71**, 606–620.e7 (2018).
300. Hadad, S. *et al.* Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. *Breast Cancer Res. Treat.* **128**, 783–794 (2011).
301. Niraula, S. *et al.* Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Res. Treat.* **135**, 821–830 (2012).
302. Bonanni, B. *et al.* Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 2593–2600 (2012).



## **ANNEXES**

---





**Annexe 1 : L'expression de la Cre n'est pas restreinte à celle de Foxp3 au sein des souris Foxp3<sup>Cre-YFP</sup>.** (a) La présence des allèles sauvages (WT), loxés (Lox) et recombinés (KO) a été déterminé par PCR sur des populations de Treg triés et sur des phalanges issues de souris de la lignée Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> Prkaa1<sup>Lox</sup> ROSA26-Tomato<sup>Lox</sup>. (b) L'expression de la tomato a été suivie par cytométrie de flux au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris Foxp3<sup>Cre-YFP</sup> ROSA26-tomato<sup>Lox</sup>. (c) La présence des allèles sauvages (WT), loxés (Lox) et recombinés (KO) a été déterminé par PCR sur des populations de Treg triés et sur des phalanges issues de souris de la lignée Foxp3<sup>Creind-GFP</sup> Prkaa1<sup>Lox</sup> ROSA26-Tomato<sup>Lox</sup>. (d) L'expression de la tomato a été suivie par cytométrie de flux au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris Foxp3<sup>Creind-GFP</sup> ROSA26-tomato<sup>Lox</sup>.



**Annexe 2 : Participation aux travaux sur le rôle de la protéine Rel A dans la biologie des Treg (article en révision)**

**The NF- $\kappa$ B RelA transcription factor is critical for regulatory T cell activation and stability**

Emilie Ronin<sup>1</sup>, Martina Lubrano di Ricco<sup>1</sup>, Romain Vallion<sup>1</sup>, Jordane Divoux<sup>1</sup>, Ho-Keun Kwon<sup>3</sup>, Sylvie Grégoire<sup>1</sup>, Davi Collares<sup>2</sup>, Angéline Rouers<sup>1</sup>, Véronique Baud<sup>2</sup>, Christophe Benoist<sup>3</sup> and Benoit L Salomon<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratoire NF- $\kappa$ B, Differentiation and Cancer, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

<sup>3</sup>Division of Immunology, Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115.

\*Corresponding author

Correspondence should be addressed to B.L.S. ([benoit.salomon@inserm.fr](mailto:benoit.salomon@inserm.fr)).



### **ABSTRACT**

Regulatory T cells (Tregs) play a major role in immune homeostasis and in the prevention of autoimmune diseases. It has been shown that c-Rel is critical in Treg thymic differentiation, but little is known on the role of NF- $\kappa$ B on mature Treg biology. We thus generated mice with a specific knockout of RelA, a key member of NF- $\kappa$ B, in Tregs. These mice developed a severe autoimmune syndrome with multi-organ immune infiltration and high activation of lymphoid and myeloid cells. Phenotypic and transcriptomic analyses showed that RelA is critical in the acquisition of the effector Treg state independently of surrounding inflammatory environment. Unexpectedly, RelA-deficient Tregs also displayed reduced stability and cells that had lost Foxp3 produced inflammatory cytokines. Overall, we show that RelA is critical for Treg biology as it promotes both the generation of their effector phenotype and the maintenance of their identity.

### **KEYWORDS**

Regulatory T cells, NF- $\kappa$ B, autoimmunity, stability, activation

## INTRODUCTION

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) play a critical role in immune homeostasis and in the prevention of autoimmune diseases by regulating immune responses (1). In humans and mice, it is well established that *forkhead box protein 3* (*Foxp3*) deficiency conducts to the development of an autoimmune syndrome leading to early death. Although *Foxp3* plays a critical role in the differentiation, suppressive function and stability of Tregs, other transcription factors (TFs), some of which interacting with Foxp3 in multi-molecular complexes, are also involved in different aspects of their biology. Some, such as c-Rel, are involved in Treg differentiation (2, 3). Others, such as NFAT, RunX1, BACH2 or Eos are critical to maintain their suppressive activity (4–7). Another group of TFs, including Blimp1, Myb, STAT3, Tbet, IRF4, Bcl6 or PPAR $\gamma$  are involved in further differentiation of activated Tregs and in their capacity to suppress different types of immune responses (8–14). Finally, STAT5, TET, GATA3, p300/CBP, Blimp1 or Ezh2 have been shown to maintain Treg identity and stability by controlling Foxp3 transcription and epigenetics (15–20). Although it has been reported that NF- $\kappa$ B is able to bind to the regulatory sequence of *Foxp3* and to interact with a complex containing Foxp3 (2, 3, 21), its role in Treg biology needs to be further analyzed.

The NF- $\kappa$ B TFs consist of homo or heterodimeric molecules of NF- $\kappa$ B1 (p105/50), RelA (p65) and c-Rel subunits for the canonic pathway and of NF- $\kappa$ B2 (p100/52) and RelB subunits for the non-canonic pathway. It has been reported that c-Rel is essential for thymic Treg development by binding to the promoter sequence and the conserved non-coding sequence (CNS) 3 of *Foxp3* (2, 3, 22). The role of NF- $\kappa$ B in mature Treg biology has been addressed by knocking-out upstream activators of the pathway, such as IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases. Mice with a conditional knockout (KO) in Tregs of either Ubc13, an E2 ubiquitin ligase activating IKK $\beta$ , or of IKK $\beta$  itself, develop a spontaneous autoimmune syndrome, associated with conversion of Tregs into effector-like T cells without Foxp3 loss or reduced Treg survival, respectively (23, 24). Mice with a conditional KO of IKK $\alpha$  in CD4<sup>+</sup> T cells have a decreased proportion of Tregs in lymphoid organs, which seem to have a defective suppression and proliferation capacities *in vivo* (25). The specific role of RelA in Tregs, which is considered as the main factor of NF- $\kappa$ B members in conventional T cells (26), has been recently studied. By interacting with RelA and other TFs, such as Helios and p300, Foxp3 forms a multimolecular complex localized in active nuclear areas to act primary as a transcriptional activator (27). Mice with a conditional KO of RelA in Tregs develop a severe and early spontaneous autoimmune syndrome that is associated with a defect of effector Tregs (28–30). Here, we confirmed these latter findings and added

further information on the nature of the disease with extensive description of lymphoid and myeloid cell activation in lymphoid and non-lymphoid tissues. Importantly, we revealed that RelA-deficient Tregs were unstable, lost Foxp3 expression and produced inflammatory cytokines, highlighting that RelA is also critical to maintain Treg stability and identity.

## RESULTS

### Conditional ablation of RelA in Tregs leads to the development of a spontaneous autoimmune syndrome

To assess the role of RelA in Treg biology, we generated *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice that have a specific deletion of RelA in Tregs by crossing mice expressing CRE in Tregs with mice expressing a *Rela* floxed allele. In these *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice, Tregs expressed a non-functional truncated form of RelA (Fig. 1A), as expected using this floxed allele (31). From 5-10 weeks of age, *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice developed a spontaneous disease characterized by localized alopecia and skin lesions (epidermal hyperplasia, hyperparakeratosis, cystic hair), and reduced weight gain compared to *Foxp3<sup>Cre</sup>* control mice (Fig. 1B, C). This pathology had high penetrance and was severe since most of the animals had to be sacrificed for ethical reasons by 45 weeks of age (Fig. 1D, E). At 10-12 weeks of age, *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice exhibited adenomegaly and macroscopic signs of mild colon inflammation (Fig. 1F, G). Histological analyses showed moderate immune cell infiltration in the lung, stomach and colon and massive infiltration in the skin (Fig. 1H). The liver and small intestine were not or minimally infiltrated. Thus, mice with RelA-deficient Tregs developed a severe and systemic inflammatory syndrome.

We started the characterization of this syndrome by analyzing the lymphocyte compartment of 10-12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice. Numbers of CD45<sup>+</sup> leukocytes were highly increased in the skin draining lymph nodes (sdLN), the internal LN (iLN, corresponding to pancreatic and paraaortic LN) and the inflamed non-lymphoid tissues (lung and skin) but not in the spleen, mesenteric LN (mLN) or the non-inflamed non-lymphoid tissues (liver, small intestine) (Fig. 2A). This leukocyte expansion was due to increased numbers of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, B cells (Fig. 2B and data not shown) and myeloid cells (see below). Moreover, the proportions of CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>, ICOS<sup>+</sup> and Ki67<sup>+</sup> activated/memory CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> conventional T cells were significantly increased in the spleen, sdLN and lung of *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice compared to *Foxp3<sup>Cre</sup>* control mice (Fig. 2C, D and Sup. Fig. 1A). The same tendency was observed in the colon and skin, although this was not significant, probably because basal levels of activated

cells were already high in *Foxp3<sup>Cre</sup>* control mice. Interestingly, an increased proportion of activated/memory T cells was observed in the iLN and mLN as well as in the non-inflamed liver and small intestine, demonstrating a global systemic T cell activation in *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice (Sup. Fig. 1B). Systemic inflammation was confirmed by quantifying cytokines in the serum, where we observed highly increased levels of IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-6 and TNF $\alpha$  (Fig. 2E). Also, serum levels of IgM, IgG1, IgG2b, IgA and IgE (Fig. 2F) and of anti-DNA autoantibodies (Fig. 2G) were increased in 12-14 week-old sick *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice compared to *Foxp3<sup>Cre</sup>* control mice.

The systemic inflammation was further documented by analyzing myeloid cells, characterized as shown in Supp. Fig. 2A. Their numbers were strongly increased in the spleen and sdLN as well as in the inflamed non-lymphoid tissues, lung and skin, in *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice compared to controls (Supp. Fig. 2B). This increase of myeloid cells was due to an increase of neutrophils in all these tissues and of eosinophils and monocytes in the lymphoid organs and the skin (Supp. Fig. 2C). A similar trend was observed in the colon.

Only part of this inflammatory phenotype was observed in 4-6 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice. Increased numbers of whole CD45<sup>+</sup> leukocytes were observed in sdLN and iLN but not yet in the lung and skin (Sup. Fig. 3A). A trend for higher proportion of activated/memory T cells, defined by expression of CD44, CD62L and Ki67, was observed in all analyzed lymphoid and non-lymphoid tissues of young mice (Sup. Fig. 3B). Finally, inflammatory cytokines, natural antibodies and anti-DNA antibodies were not or minimally increased in 4-6 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* compared to control mice (Fig. 2E-G). In conclusion, *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice developed a severe systemic autoimmune syndrome, already uncovered at 4-6 weeks of age, followed, 1-3 months later, by massive activation of lymphoid and myeloid cells, immune infiltration of several tissues and high rise of serum inflammatory cytokines, immunoglobulins and auto-antibodies.

### **Homeostasis and function of Tregs in *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>***

We then analyzed Treg homeostasis in 12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice. Strikingly, Treg proportion was significantly increased in lymphoid organs, except in mLN, while it was decreased in the colon and skin and unchanged in the liver, lung and small intestine compared to *Foxp3<sup>Cre</sup>* control mice (Fig. 3A). Interestingly, Treg proportion seemed already decreased in the small intestine, colon and skin of 4-5 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice (Fig. 3B). The proportion of activated/memory CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>low</sup> Tregs was decreased in all LN and the liver, and the same tendency was observed in the skin. However, their proportion was unchanged in

the spleen, colon and small intestine and even increased in the lung (Fig. 3C). Foxp3 and CD25 expressions were unchanged (data not shown).

The severe disease of *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice in the absence of major Treg quantitative defect suggests that Tregs may be dysfunctional. *In vitro* assays showed that RelA-deficient Tregs, purified from 5-6 week-old mice, were able to suppress proliferation of conventional T cells almost as efficiently as control Tregs (Fig. 3D). To further analyze their function, we assessed their capacity to suppress colitis induced by effector T cells transferred into lymphopenic mice, measured by weight loss and histology. Surprisingly, not only RelA-deficient Tregs were unable to control colitis but the disease was even more severe compared to mice transferred with effector T cells alone (Fig. 3E, F). This exacerbated colitis was not associated with increased number of cells from Tconv origin or to their lower propensity to differentiate in peripheral Treg (Sup. Fig. 4). Instead, the severe colitis was rather due to the fact that most RelA-deficient Tregs lost Foxp3 expression in the colon and mLN, potentially differentiating in pathogenic effector T cells (Fig. 3G). In conclusion, *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice had higher numbers of Tregs in lymphoid tissues (probably due to systemic inflammation) but lower numbers of Tregs in the colon and skin, which could be due to Treg instability and Foxp3 loss.

### **RelA deficiency leads to a defect of effector Tregs at steady state**

*Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice developed systemic inflammation, which in return impacted on Treg biology. Thus, to assess the intrinsic role of RelA in Tregs at steady state, we generated *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* heterozygous females, in which theoretically half of Tregs expressed RelA and the other half were RelA-deficient because of the localization of *Foxp3* locus in the X chromosome. We observed that these mice did not have any sign of disease and inflammation, as first noticed by macroscopic observations and the absence of cell infiltration in tissues (Fig. 4A, B), which was most likely due to the presence of functional RelA-sufficient Tregs. This was further confirmed by analyzing the numbers of CD45<sup>+</sup> leukocytes and Tregs that were similar in *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* females and *Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* controls (Fig. 4C, D). Moreover, the proportions of activated conventional T cells (Tconvs), defined by the expression of CD44, CD62L and Ki67, was identical between the two mouse types (Fig. 4E). Finally, no increased level of anti-DNA auto-antibodies were detected in the serum of the *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* females (Fig. 4F). Thus, *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* heterozygous females represent a proper model to study the intrinsic role of RelA in Tregs.

In the *Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* control females, CRE-expressing Tregs were present in lower proportion and with slightly lower expression of activation markers compared to Tregs not expressing CRE,

suggesting that the CRE transgene moderately impact on Treg biology in this competitive condition (Fig. 5). That is why it was critical to compare *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice with *Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* controls. Compared to these controls, the knockout of RelA did not modify the proportion of Tregs (Fig. 5A). However, the absence of RelA expression had a severe impact on Treg activation, as the proportions of CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>, Ki67<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> Tregs were strongly and systematically reduced and the expression of ICOS, CTLA-4 and GITR were reduced in some tissues (Fig. 5B, C). Also, the proportion of Nrp1<sup>+</sup>, Helios<sup>+</sup> thymic derived Tregs and FoxP3 expression were slightly but not significantly reduced in the absence of RelA (Sup. Fig. 5). In conclusion, RelA expression by Tregs appears critical for the acquisition of their effector phenotype at the steady state.

### **RelA plays an important role in Treg activation**

To characterize more extensively the effects of the RelA deficiency on Tregs, we purified CRE-expressing Tregs from *Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* (WT) and *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* (RelA KO) mice and profiled their transcriptomes by low-input RNAseq. Overall, transcriptome differences were modest (Fig. 6A), with 180 differentially expressed genes at an arbitrary fold change cutoff of 2.0 (and false discovery rate <0.05). The most biased transcript was *Klrg1*, as previously reported (28), but several other transcripts involved in Treg function and/or homing in the gut and skin showed a significant bias (e.g. *Ccr4*, *Ccr6*, *Maf* and *Ahr*). Gene ontology analysis did not reveal any evocative common pathway, so we projected various Treg-specific signatures onto the comparison of WT vs. RelA KO Tregs profiles (Fig. 6B). RelA deficit modestly but significantly reduced the canonical signature of genes differentially expressed in Tregs vs Tconv cells (32) (Fig. 6B, left). Moreover, consistent with the phenotype described above showing reduced proportion of activation markers in RelA-deficient Tregs, a stronger bias was observed for signatures typical of activated Tregs (from comparison of CD44<sup>hi</sup> vs CD62L<sup>hi</sup> Tregs, or from Blimp1- WT vs KO Tregs (11)) (Fig. 6B, middle and right). This effect was not unique to Treg activation, as GSEA analysis showed a strong bias of generic signatures of activation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> Tconv cells (33) (Fig. 6C). For further resolution, we cross-matched the RelA WT/KO difference to a curated series of 289 signatures that distinguish different sub-phenotypes of Tregs (33) (Fig. 6D). Compared with WT counterparts, RelA KO Tregs were impoverished in several signatures of activated Tregs (lower region of Fig. 6D), consistent with Fig. 6B. Interestingly, however, RelA-deficient Tregs were enriched in several signatures resulting from the expression of TF with inhibitory roles in Tregs, and most markedly for *Bach2* (upper region of Fig. 6D). Indeed, the changes found here in response to RelA deficiency were

largely anti-correlated with changes provoked by the absence of Bach2 in a previous report (7) (Fig. 6E,  $r = -0.13$  with  $p < 10^{-15}$  using a Pearson correlation). Overall, these results support the strong inability of RelA-deficient Tregs to adopt fully active configurations.

### **RelA-deficient Tregs have a defect of stability**

Our RNAseq data indicate an identity defect of RelA-deficient Tregs, which was first suggested in the colitis model. However, one cannot conclude from this latter experiment that RelA plays an intrinsic role in Treg stability, owing to the very severe colitis developed by the mice injected with RelA-deficient Tregs. Indeed, increased instability of these latter could be well due to increased inflammation, and not RelA deficiency, since it is well established that different inflammatory factors precipitate Foxp3 loss (34). Thus, we further investigated whether RelA had any role in maintenance of Treg stability and identity by analyzing Foxp3 expression after co-transfer of RelA-sufficient and -deficient Tregs into the same mouse. Cells were purified from *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice (*Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* for controls) and not from *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice, since systemic inflammation in these latter mice could modify Treg biology in addition to the impact of the RelA defect. Tregs were co-transferred in CD3 KO mice with Tconvs to sustain viability and expansion of injected Tregs, (Fig. 7A). Sixteen days after transfer, the proportions of RelA-deficient cells were much reduced compared to the ones of RelA-sufficient cells (Fig. 7B), particularly in the colon, a location subjected to high inflammation in this setting. Importantly, a large fraction of RelA-deficient Tregs lost Foxp3 expression, becoming so-called ex-Tregs, in all lymphoid and non-lymphoid tissues, compared to RelA-sufficient Tregs (Fig. 7C). Moreover, RelA-deficient ex-Tregs expressed higher amounts of the pro-inflammatory cytokines IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , in the spleen and mLN, than their wildtype counterparts (Fig. 7D). To further explore the mechanism of Treg instability, and since it has been reported that c-Rel is involved in the differentiation of Th1 and Th17 cells (35, 36), we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) combined with supershifts to assess the activation status of the different NF- $\kappa$ B subunits in Tregs of *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice (Fig. 7E). In control Tregs, there was mainly an activation of RelA, rather than RelB or c-Rel. As expected, we did not observe this phenomenon in RelA-deficient Tregs, confirming that the truncated RelA protein was not functional. However, in Tregs of *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice there were much more activated NF- $\kappa$ B complexes, obviously due to the more activated phenotype of Tregs in these mice, which were mostly, if not only, constituted of c-Rel subunit. This massive c-Rel activation may be involved in Treg instability. In conclusion, our data show that lack of RelA activation

strongly affect Treg stability leading to Foxp3 loss and increased differentiation of ex-Tregs, which may turn pathogenic through the production of inflammatory cytokines.

## DISCUSSION

Here, we show that RelA plays a major role in Treg biology, both at steady state and during inflammation, since its specific deletion leads to the development of a spontaneous, severe and systemic autoimmune syndrome. The disease recapitulates some of the symptoms observed in Treg-deficient scurfy mice, although with a slower kinetics (1). Our data suggest that this disease is initially due to a major activation defect of RelA-deficient Tregs. Indeed, in the *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* non-inflamed mice, we observed reduced numbers of effector Tregs and suppressive molecules among the RelA-deficient Tregs. We thus speculate that in the *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice, and more specifically in tissues that are in contact with external environment and microbiota like the intestine and skin, effector T cells and myeloid cells become highly activated because of insufficient control by effector Tregs. Moreover, the decreased Treg proportion observed in those tissues in 4-5 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>*, potentially due to a Treg instability and a decreased expression of gut and skin homing molecules, may exacerbate this phenomenon. Then, inflammatory factors may alter drastically stability of RelA-deficient Tregs most of them becoming pathogenic ex-Tregs, as we observed in the colitis model and cell co-transfer in lymphopenic mice experiments, precipitating local inflammation. The combination of reduced Treg proportion in the intestine and the skin, reduced Treg activation and the generation of pathogenic ex-Tregs may be the driving forces of the autoimmune syndrome of *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice.

Recent reports describe similar conditional KO mice developing a related autoimmune syndrome (28–30). They observed that *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice developed inflammation of the skin, stomach, lung and colon, massive activation of effector T cells and myeloid cells in lymphoid organs and high levels of inflammatory cytokines, immunoglobulins and anti-DNA in the serum. We confirmed these data and got deeper into the analysis of the disease since we showed that the effector T cells and myeloid cells were also drastically activated in multiple non-lymphoid organs. These data suggest a major defect of RelA-deficient Tregs. In addition, the injection of WT Tregs before 7 days of age was sufficient to stop the development of the pathology (data not shown). We and others observed an increase of Treg proportion in lymphoid organs and *in vitro* assays did not reveal Treg suppressive defect. However, our extensive analysis enabled to point out a decrease of Treg proportion in the inflamed non-lymphoid



tissues, such as the colon and skin. Our RNAseq analysis revealed a decreased expression of *Ccr4*, *Ccr6*, *Maf*, *Ahr* and *Itgae* (encoding for CD103, data not shown) which are involved in Treg function and/or homing in those tissues. Particularly, it has been shown that *Ahr* regulates the expression of *Ccr6* and *Itgae* and that *Ahr* deletion in Tregs leads to their decrease in the gut (37). As discussed above, this initial event may ignite the whole immune system, leading to widespread activation of the lymphoid and myeloid compartments and release of inflammatory cytokines that will boost global Treg activation and expansion, which remains insufficient to control the pathology.

Investigating initial events that led to disease could not be properly analyzed in *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice since inflammation has major impact on Treg migration, survival, activation, suppressive function or stability (34, 38), confounding the interpretation of what was due to inflammation or to the intrinsic RelA deficit. Using *Lck<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice, Messina *et al.* suggested that a major alteration of RelA-deficient Tregs was their defect to differentiate in effector Tregs (28). However, in this work, this defect was only partial, observed in LN and not in the spleen, and mostly analyzed in a quite irrelevant model since RelA was knockout in whole T cells. Vasanthakumar *et al.* showed a more global activation defect of RelA-deficient Tregs using *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice or mixed bone marrow chimeric mice (30). We confirmed and completed these results by showing a downregulation of CD44, ICOS, CD103, Ki67, GITR and CTLA4 not only in the lymphoid organs but also in the liver and lung of *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice. Moreover, our transcriptomic analysis highlighted the major activation defect of RelA-deficient Tregs, since a strong bias was observed for signatures typical of activated Tregs.

What was more consistent and unexpected was the increased instability of RelA-deficient Tregs. This was first suggested in the colitis model but more direct evidence came from studies where we compared RelA-sufficient and -deficient Tregs in the same environment after cell co-transfer in lymphopenic mice. We clearly showed that most RelA-deficient Tregs became ex-Tregs, contrary to control Tregs. Although with reduced intensity, increased instability of RelA-deficient Tregs was also observed in the absence of inflammation, as measured after transfer in lymphoreplete mice (data not shown). Moreover, we detected low amounts of the truncated RelA protein in the TconvS of *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice, which may reveal the existence of ex-Tregs in these mice. Furthermore, we showed that these newly RelA-deficient ex-Tregs expressed inflammatory cytokines, suggesting that they could become pathogenic. This phenomenon may explain the increased severity observed in the colitis experiment and support our hypothesis that this ex-Tregs contribute to the pathology of *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice.

Foxp3 stability is controlled by histone and protein acetylation and by DNA methylation in the CNS 2 of *Foxp3*. RelA activity may impact on these epigenetic modulations by different ways. We observed an increased expression of *Dnmt3a* in RelA-deficient Tregs suggesting that RelA may directly or indirectly regulate this methyltransferase (data not shown). On the other hand, RelA interacts with CBP and p300 histone/protein acetyltransferases, which seems to be critical for the recruitment of CBP and p300 to their target promoter sites, as shown in fibroblasts (39). Because CBP and p300 promote *Foxp3* transcription, *Foxp3* stability at the level of CNS2 and prevent Foxp3 degradation (17, 40), RelA-deficient Tregs may have major instability. It has also been recently reported that RelA binds to genes involved in histone modification (30). Also, Foxp3 and RelA seem to cooperate to promote Foxp3 and CD25 expression by binding to their regulatory sequences (41, 42), which may favor Treg stability given the known role of IL-2 receptor signaling pathway in maintenance of Treg identity (16). Furthermore, Oh *et al.* recently reported that Foxp3 expression was down-regulated in Tregs of *Foxp3<sup>Cre</sup> cRel<sup>lox</sup>* mice and even more in the *Foxp3<sup>Cre</sup> cRel<sup>lox</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice, suggesting that RelA favors Foxp3 expression (29). Interestingly, we observed a dramatic increased binding of c-Rel to its target DNA sequence in Tregs of *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice. This phenomenon may hide the genuine role of RelA in Tregs and may further increase their conversion in pathogenic cells since c-Rel has been reported to be involved in Th1 and Th17 differentiation (35, 36). Overall, our study further confirms the non-redundant role of RelA in Treg biology and reveals its new role in Treg stability. Further studies trying to target this NF-κB subunit in Tregs, through RelA-activating receptor specific of this cell population, would be of strong interest to propose new therapies triggering or inhibiting Tregs in autoimmune diseases or cancer, respectively.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Mice.

*Foxp3-CRE-IRES-YFP* (*Foxp3<sup>Cre</sup>*) (43), *RelA<sup>lox</sup>* (31) and *Foxp3-IRES-GFP* (44) knock-in (*Foxp3<sup>GFP</sup>*) mice were kindly given by Prs. Alexander Rudensky, Falk Weih and Bernard Malissen, respectively. *CD3e<sup>tm1Mal</sup>* (*CD3<sup>-/-</sup>*), *CD45.1*, *CD90.1* and *RAG2<sup>-/-</sup>* mice were obtained from the cryopreservation distribution typing and animal archiving department (Orléans, France). All mice were on a C57Bl/6 background. Mice were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with European Union guidelines.

### **Western blot.**

Cells were lysed for 20 min on ice in extraction buffer (0.4 M NaCl, 25 mM Hepes pH 7.7, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 1%, NP40, 20 mM glycerol phosphate, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM PNPP, 2mM DTT, 0.1 M PMSF). Whole cell extract was harvested after centrifuging the lysate for 10 min at 9500 X g. 20 µg of whole cell extract were separated on 7.5% SDS–polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Immunoblotting was performed with anti-RelA (C20) polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology) and anti-β-actin antibody (Sigma Aldrich) and visualized using the ECL Western blotting detection kit (Pierce).

### **Histology.**

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

### **Cell preparation from tissues.**

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

### **Antibodies and flow cytometry analysis.**

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

performed using the eBioscience kit and protocol. Cells were acquired on a BD LSRII and a BD Fortessa X20 cytometers and analyzed using FlowJo software.

### **Cytokine quantification.**

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

### **Immunoglobulin and autoantibody quantification by ELISA.**

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

### **Treg and Tconv cell purification.**

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

### **Cell cultures.**

Purified Treg (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>, 25 x 10<sup>3</sup> cells/well) were cultured with or without whole splenocyte from CD3KO mice (7.5 x 10<sup>4</sup> cells/well), anti-CD3 mAb (0,05µg/ml, BioXcell), TNF (50ng/ml, Protein Service Facility, VIB, Belgium) and IL-2 (10ng/ml, Peproteck) in a 96-well round plate in RPMI 1640 10% FCS. For suppression assays, after labeling with CellTrace Violet Proliferation Kit (Life technologies), Tconv cells (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>-</sup>, 2.5 x 10<sup>4</sup> cells/well) were co-cultures with various Treg (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>) numbers and stimulated by splenocytes from CD3 KO

mice ( $7.5 \times 10^4$  cells/well) and soluble anti-CD3 ( $0.05 \mu\text{g/ml}$  2C11, BioXCell) in RPMI 1640-10% FCS.

### **Colitis.**

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

### **T-cell adoptive transfer.**

CD3 KO mice were co-transferred with Treg ( $\text{CD4}^+\text{YFP}^+$ ,  $1 \times 10^5$  each) purified from age and sex-matched  $\text{CD45.1/2 Foxp3}^{\text{Cre/+}}$  and  $\text{CD45.2/2 Foxp3}^{\text{Cre/+}} \text{Rela}^{\text{lox}}$  mice and Tconv cells ( $\text{CD4}^+\text{GFP}^-$ ,  $8 \times 10^5$ ) purified from  $\text{CD90.1 Foxp3}^{\text{GFP}}$  mice.

### **Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) combined with supershift assays.**

Nuclear extracts were prepared and analyzed for DNA binding activity using the HIV-LTR tandem  $\kappa\text{B}$  oligonucleotide as  $\kappa\text{B}$  probe (45). For supershift assays, nuclear extracts were incubated with specific antibodies for 30 min on ice before incubation with the labeled probe.

### **Gene-Expression Profiling and Analysis.**

Tregs (1,000) were double-sorted into TRIzol (Invitrogen). Subsequent sample processing was followed by Ultra-low input RNAseq protocol as described (46). Normalized data were analyzed with Multiplot Studio, GSEA and Gene-e modules in Genepattern. For signature enrichment analysis, each signature was curated from published datasets and computed by comparison between two conditions (e.g. WT vs KO). Data were downloaded from GEO containing replicates were used. To reduce noise, genes with a coefficient of variation between biological replicates  $> 0.6$  in either comparison groups were selected. Up- and down-regulated transcripts were defined as having a fold change in gene expression  $> 1.5$  or  $< 2/3$  and a t.test p-value  $< 0.05$ .

### **Statistical analysis.**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software. Statistical significance was determined using a log-rank (Mantel- Cox) test for the mouse survival data. For all the other statistical analysis, the two-tailed unpaired nonparametric Mann-Whitney  $U$  test was used for data not following a normal distribution and the  $t$ -test was used for data following a normal distribution.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ . Means  $\pm$  SEM were used throughout the figures.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

BLS and ER designed the research. ER performed almost all the experiments and analyzed the data. MLR, RV, JD, SG and AR helped ER on some experiments. HK and CB performed and analyzed the RNA-seq data. DC and VB performed and analyzed the western blot and EMSA. BLS and ER wrote the manuscript using comments from all authors.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to Pr. Alexander Rudensky and Pr. Falk Weih for providing us the *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Rela<sup>lox</sup>* mice, respectively, and Christelle Enond, Doriane Foret, Flora Issert, Olivier Bregerie, Bocar Kane and Maria Mihoc for their expert care of the mouse colony. We also want to thank Fatiha Bouhidel for helping for the histological analysis. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-15-CE15-0015-03), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipes FRM 2015; FDT20160435696) and the Fondation Bettencourt Schueller.

### **COMPETING FINANCIAL INTERESTS.**

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

1. Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. 2006. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212: 8–27.
2. Isomura, I., S. Palmer, R. J. Grumont, K. Bunting, G. Hoyne, N. Wilkinson, A. Banerjee, A. Proietto, R. Gugasyan, L. Wu, A. McNally, R. J. Steptoe, R. Thomas, M. F. Shannon, and S. Gerondakis. 2009. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206: 3001–3014.
3. Long, M., S.-G. Park, I. Strickland, M. S. Hayden, and S. Ghosh. 2009. Nuclear Factor- $\kappa$ B Modulates Regulatory T Cell Development by Directly Regulating Expression of Foxp3 Transcription Factor. *Immunity* 31: 921–931.
4. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* 126: 375–387.
5. Ono, M., H. Yaguchi, N. Ohkura, I. Kitabayashi, Y. Nagamura, T. Nomura, Y. Miyachi, T. Tsukada, and S. Sakaguchi. 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446: 685–689.
6. Pan, F., H. Yu, E. V. Dang, J. Barbi, X. Pan, J. F. Grosso, D. Jinasena, S. M. Sharma, E. M. McCadden, D. Getnet, C. G. Drake, J. O. Liu, M. C. Ostrowski, and D. M. Pardoll. 2009. Eos Mediates Foxp3-Dependent Gene Silencing in CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *Science* 325: 1142–1146.
7. Roychoudhuri, R., K. Hirahara, K. Mousavi, D. Clever, C. A. Klebanoff, M. Bonelli, G. Sciumè, H. Zare, G. Vahedi, B. Dema, Z. Yu, H. Liu, H. Takahashi, M. Rao, P. Muranski, J. G. Crompton, G. Puskosdy, D. Bedognetti, E. Wang, V. Hoffmann, J. Rivera, F. M. Marincola, A. Nakamura, V. Sartorelli, Y. Kanno, L. Gattinoni, A. Muto, K. Igarashi, J. J. O’Shea, and N. P. Restifo. 2013. BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature* 498: 506–510.
8. Chaudhry, A., D. Rudra, P. Treuting, R. M. Samstein, Y. Liang, A. Kas, and A. Y. Rudensky. 2009. CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells Control TH17 Responses in a Stat3-Dependent Manner. *Science* 326: 986–991.
9. Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* 10: 595–602.
10. Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J. M. Kim, T.-T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein, and A. Y. Rudensky. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature* 458: 351–356.
11. Cretney, E., A. Xin, W. Shi, M. Minnich, F. Masson, M. Miasari, G. T. Belz, G. K. Smyth, M. Busslinger, S. L. Nutt, and A. Kallies. 2011. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 12: 304–311.
12. Linterman, M. A., W. Pierson, S. K. Lee, A. Kallies, S. Kawamoto, T. F. Rayner, M. Srivastava, D. P. Divekar, L. Beaton, J. J. Hogan, S. Fagarasan, A. Liston, K. G. C. Smith, and C. G. Vinuesa. 2011. Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17: 975–982.
13. Cipolletta, D., M. Feuerer, A. Li, N. Kamei, J. Lee, S. E. Shoelson, C. Benoist, and D. Mathis. 2012. PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486: 549–553.
14. Dias, S., A. D’Amico, E. Cretney, Y. Liao, J. Tellier, C. Bruggeman, F. F. Almeida, J. Leahy, G. T. Belz, G. K. Smyth, W. Shi, and S. L. Nutt. 2017. Effector Regulatory T Cell

Differentiation and Immune Homeostasis Depend on the Transcription Factor Myb. *Immunity* 46: 78–91.

15. Wohlfert, E. A., J. R. Grainger, N. Bouladoux, J. E. Konkel, G. Oldenhove, C. H. Ribeiro, J. A. Hall, R. Yagi, S. Naik, R. Bhairavabhotla, W. E. Paul, R. Bosselut, G. Wei, K. Zhao, M. Oukka, J. Zhu, and Y. Belkaid. 2011. GATA3 controls Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 121: 4503–4515.

16. Feng, Y., A. Arvey, T. Chinen, J. van der Veeke, G. Gasteiger, and A. Y. Rudensky. 2014. Control of the Inheritance of Regulatory T Cell Identity by a cis Element in the Foxp3 Locus. *Cell* 158: 749–763.

17. Liu, Y., L. Wang, R. Han, U. H. Beier, T. Akimova, T. Bhatti, H. Xiao, P. A. Cole, P. K. Brindle, and W. W. Hancock. 2014. Two Histone/Protein Acetyltransferases, CBP and p300, Are Indispensable for Foxp3<sup>+</sup> T-Regulatory Cell Development and Function. *Mol. Cell. Biol.* 34: 3993–4007.

18. DuPage, M., G. Chopra, J. Quiros, W. L. Rosenthal, M. M. Morar, D. Holohan, R. Zhang, L. Turka, A. Marson, and J. A. Bluestone. 2015. The Chromatin-Modifying Enzyme Ezh2 Is Critical for the Maintenance of Regulatory T Cell Identity after Activation. *Immunity* 42: 227–238.

19. Yang, R., C. Qu, Y. Zhou, J. E. Konkel, S. Shi, Y. Liu, C. Chen, S. Liu, D. Liu, Y. Chen, E. Zandi, W. Chen, Y. Zhou, and S. Shi. 2015. Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis. *Immunity* 43: 251–263.

20. Garg, G., A. Muschaweckh, H. Moreno, A. Vasanthakumar, S. Floess, G. Lepennetier, R. Oellinger, Y. Zhan, T. Regen, M. Hiltensperger, C. Peter, L. Aly, B. Knier, L. R. Palam, R. Kapur, M. H. Kaplan, A. Waisman, R. Rad, G. Schotta, J. Huehn, A. Kallies, and T. Korn. 2019. Blimp1 Prevents Methylation of Foxp3 and Loss of Regulatory T Cell Identity at Sites of Inflammation. *Cell Rep.* 26: 1854-1868.e5.

21. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- $\kappa$ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 5138–5143.

22. Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Tone, L. Li, H.-C. Liou, M. I. Greene, M. Tone, and Y. H. Chen. 2009. Development of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Is Driven by the c-Rel Enhanceosome. *Immunity* 31: 932–940.

23. Chang, J.-H., Y. Xiao, H. Hu, J. Jin, J. Yu, X. Zhou, X. Wu, H. M. Johnson, S. Akira, M. Pasparakis, X. Cheng, and S.-C. Sun. 2012. Ubc13 maintains the suppressive function of regulatory T cells and prevents their conversion into effector-like T cells. *Nat. Immunol.* 13: 481–490.

24. Heuser, C., J. Gotot, E. C. Piotrowski, M.-S. Philipp, C. J. F. Courrèges, M. S. Otte, L. Guo, J. L. Schmid-Burgk, V. Hornung, A. Heine, P. A. Knolle, N. Garbi, E. Serfling, C. Evaristo, F. Thaiss, and C. Kurts. 2017. Prolonged IKK $\beta$  Inhibition Improves Ongoing CTL Antitumor Responses by Incapacitating Regulatory T Cells. *Cell Rep.* 21: 578–586.

25. Chen, X., J. Willette-Brown, X. Wu, Y. Hu, O. M. Z. Howard, Y. Hu, and J. J. Oppenheim. 2015. IKK $\alpha$  is required for the homeostasis of regulatory T cells and for the expansion of both regulatory and effector CD4 T cells. *FASEB J.* 29: 443–454.

26. Oh, H., and S. Ghosh. 2013. NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. *Immunol. Rev.* 252: 41–51.

27. Kwon, H.-K., H.-M. Chen, D. Mathis, and C. Benoist. 2017. Different molecular complexes that mediate transcriptional induction and repression by FoxP3. *Nat. Immunol.* 18: ni.3835.

28. Messina, N., T. Fulford, L. O'Reilly, W. X. Loh, J. M. Motyer, D. Ellis, C. McLean, H. Naeem, A. Lin, R. Gugasyan, R. M. Slattery, R. J. Grumont, and S. Gerondakis. 2016. The



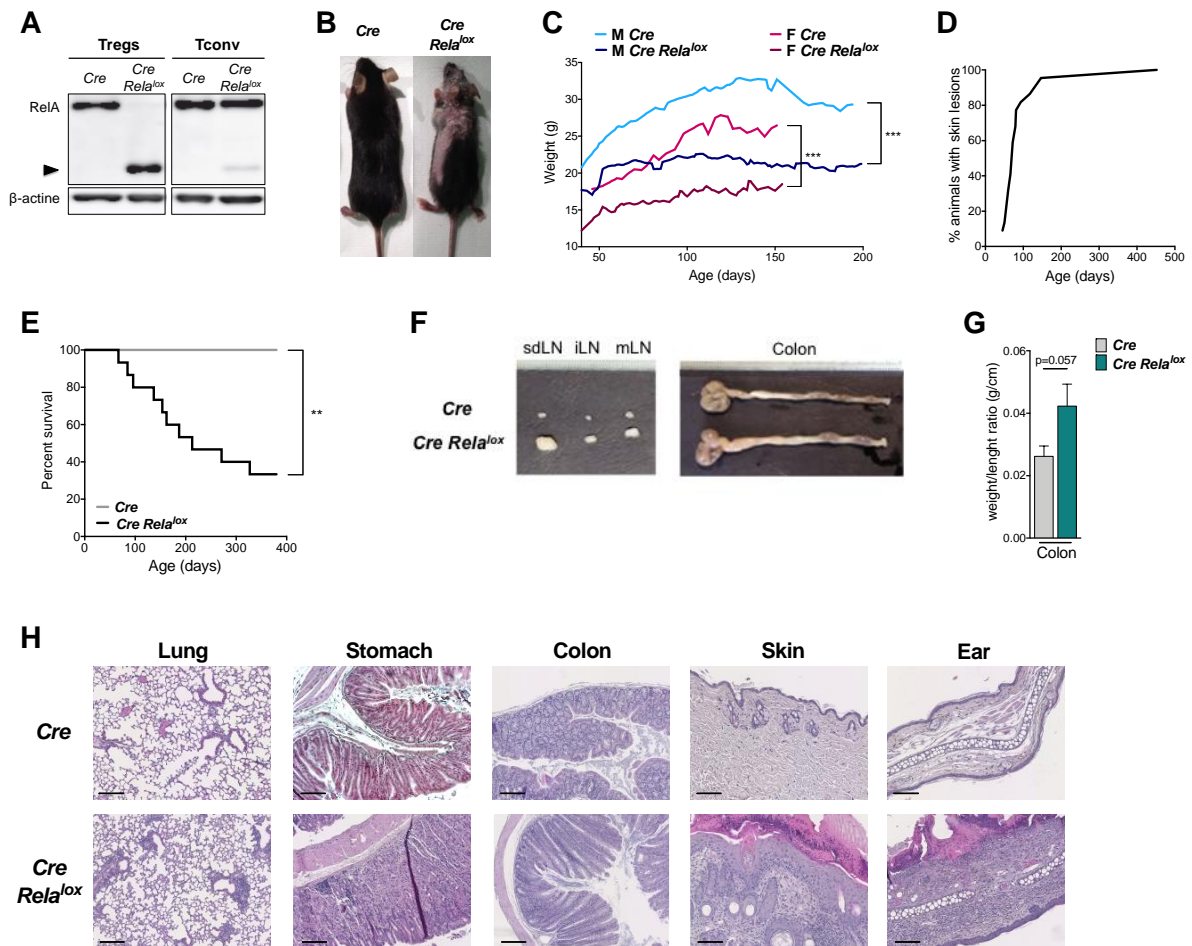
- NF- $\kappa$ B transcription factor RelA is required for the tolerogenic function of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Autoimmun.* 70: 52–62.
29. Oh, H., Y. Grinberg-Bleyer, W. Liao, D. Maloney, P. Wang, Z. Wu, J. Wang, D. M. Bhatt, N. Heise, R. M. Schmid, M. S. Hayden, U. Klein, R. Rabadan, and S. Ghosh. An NF- $\kappa$ B Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* .
30. Vasanthakumar, A., Y. Liao, P. Teh, M. F. Pascutti, A. E. Oja, A. L. Garnham, R. Gloury, J. C. Tempany, T. Sidwell, E. Cuadrado, P. Tuijnburg, T. W. Kuijpers, N. Lalaoui, L. A. Mielke, V. L. Bryant, P. D. Hodgkin, J. Silke, G. K. Smyth, M. A. Nolte, W. Shi, and A. Kallies. 2017. The TNF Receptor Superfamily-NF- $\kappa$ B Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *Cell Rep.* 20: 2906–2920.
31. Algül, H., M. Treiber, M. Lesina, H. Nakhai, D. Saur, F. Geisler, A. Pfeifer, S. Paxian, and R. M. Schmid. 2007. Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J. Clin. Invest.* 117: 1490–1501.
32. Hill, J. A., M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Foxp3 Transcription-Factor-Dependent and -Independent Regulation of the Regulatory T Cell Transcriptional Signature. *Immunity* 27: 786–800.
33. Zemmour, D., R. Zilionis, E. Kiner, A. M. Klein, D. Mathis, and C. Benoist. 2018. Single-cell gene expression reveals a landscape of regulatory T cell phenotypes shaped by the TCR. *Nat. Immunol.* 19: 291–301.
34. Zhou, X., S. L. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker, C. Penaranda, M. Martínez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J. A. Bluestone. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 10: 1000–1007.
35. Hilliard, B. A., N. Mason, L. Xu, J. Sun, S.-E. Lamhamedi-Cherradi, H.-C. Liou, C. Hunter, and Y. H. Chen. 2002. Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 110: 843–850.
36. Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Zhang, S. Zheng, J. Sun, J. Wang, J. DeVirgiliis, H.-C. Liou, A. A. Beg, and Y. H. Chen. 2011. The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR $\gamma$ -ROR $\gamma$ T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* 208: 2321–2333.
37. Ye, J., J. Qiu, J. W. Bostick, A. Ueda, H. Schjerven, S. Li, C. Jobin, Z. E. Chen, and L. Zhou. 2017. The Aryl Hydrocarbon Receptor Preferentially Marks and Promotes Gut Regulatory T Cells. *Cell Rep.* 21: 2277–2290.
38. van der Veecken, J., A. J. Gonzalez, H. Cho, A. Arvey, S. Hemmers, C. S. Leslie, and A. Y. Rudensky. 2016. Memory of Inflammation in Regulatory T Cells. *Cell* 166: 977–990.
39. Mukherjee, S. P., M. Behar, H. A. Birnbaum, A. Hoffmann, P. E. Wright, and G. Ghosh. 2013. Analysis of the RelA:CBP/p300 Interaction Reveals Its Involvement in NF- $\kappa$ B-Driven Transcription. *PLOS Biol.* 11: e1001647.
40. van Loosdregt, J., and P. J. Coffey. 2014. Post-translational modification networks regulating FOXP3 function. *Trends Immunol.* 35: 368–378.
41. Soligo, M., C. Camperio, S. Caristi, C. Scottà, P. D. Porto, A. Costanzo, P.-Y. Mantel, C. B. Schmidt-Weber, and E. Piccolella. 2011. CD28 costimulation regulates FOXP3 in a RelA/NF- $\kappa$ B-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 41: 503–513.
42. Camperio, C., S. Caristi, G. Fanelli, M. Soligo, P. D. Porto, and E. Piccolella. 2012. Forkhead Transcription Factor FOXP3 Upregulates CD25 Expression through Cooperation with RelA/NF- $\kappa$ B. *PLOS ONE* 7: e48303.
43. Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson Jr., W. Muller, and A. Y. Rudensky. 2008. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* 28:

546–558.

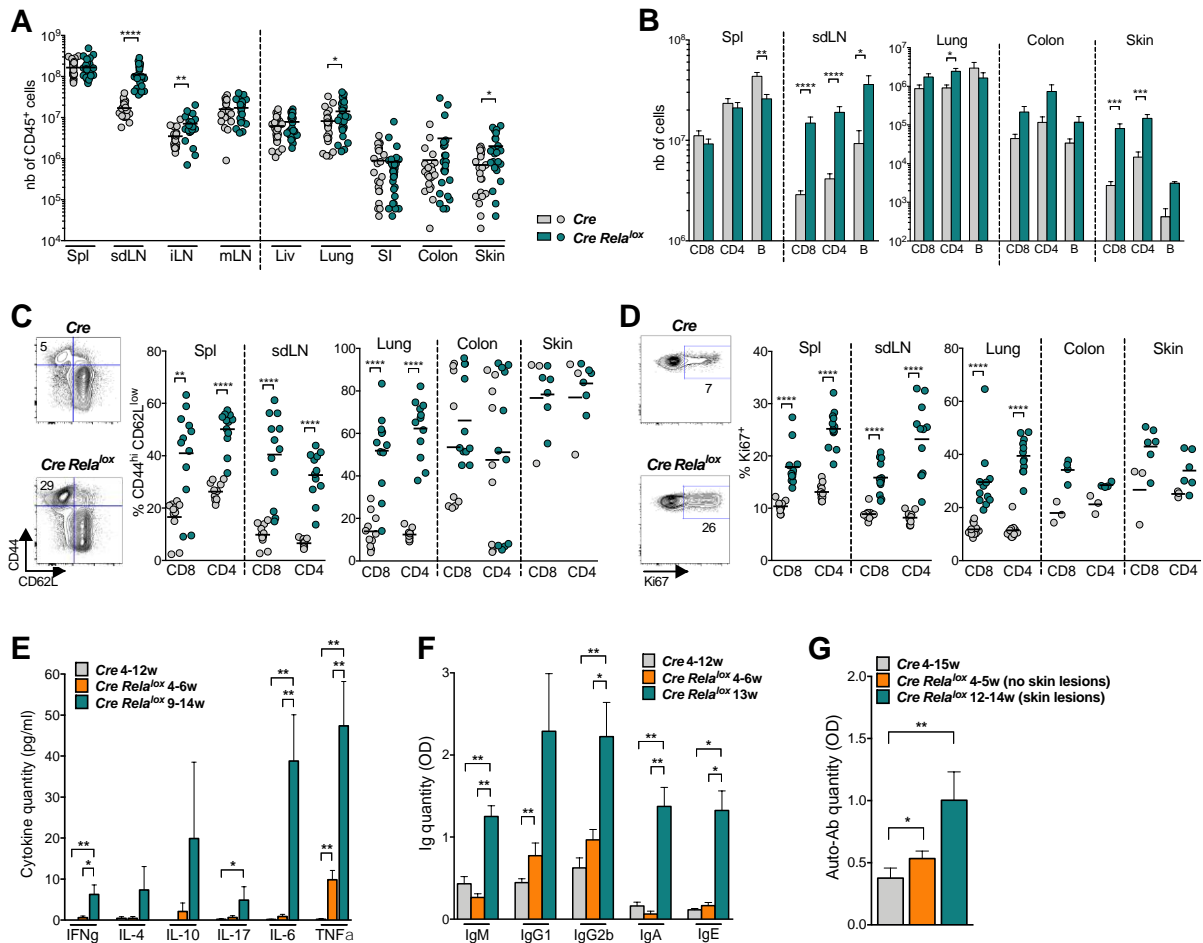
44. Wang, Y., A. Kissenpfennig, M. Mingueneau, S. Richelme, P. Perrin, S. Chevrier, C. Genton, B. Lucas, J. P. DiSanto, H. Acha-Orbea, B. Malissen, and M. Malissen. 2008. Th2 Lymphoproliferative Disorder of *Lat*<sup>Y136F</sup> Mutant Mice Unfolds Independently of TCR-MHC Engagement and Is Insensitive to the Action of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 180: 1565–1575.

45. Jacque, E., K. Billot, H. Authier, D. Bordereaux, and V. Baud. 2013. RelB inhibits cell proliferation and tumor growth through p53 transcriptional activation. *Oncogene* 32: 2661–2669.

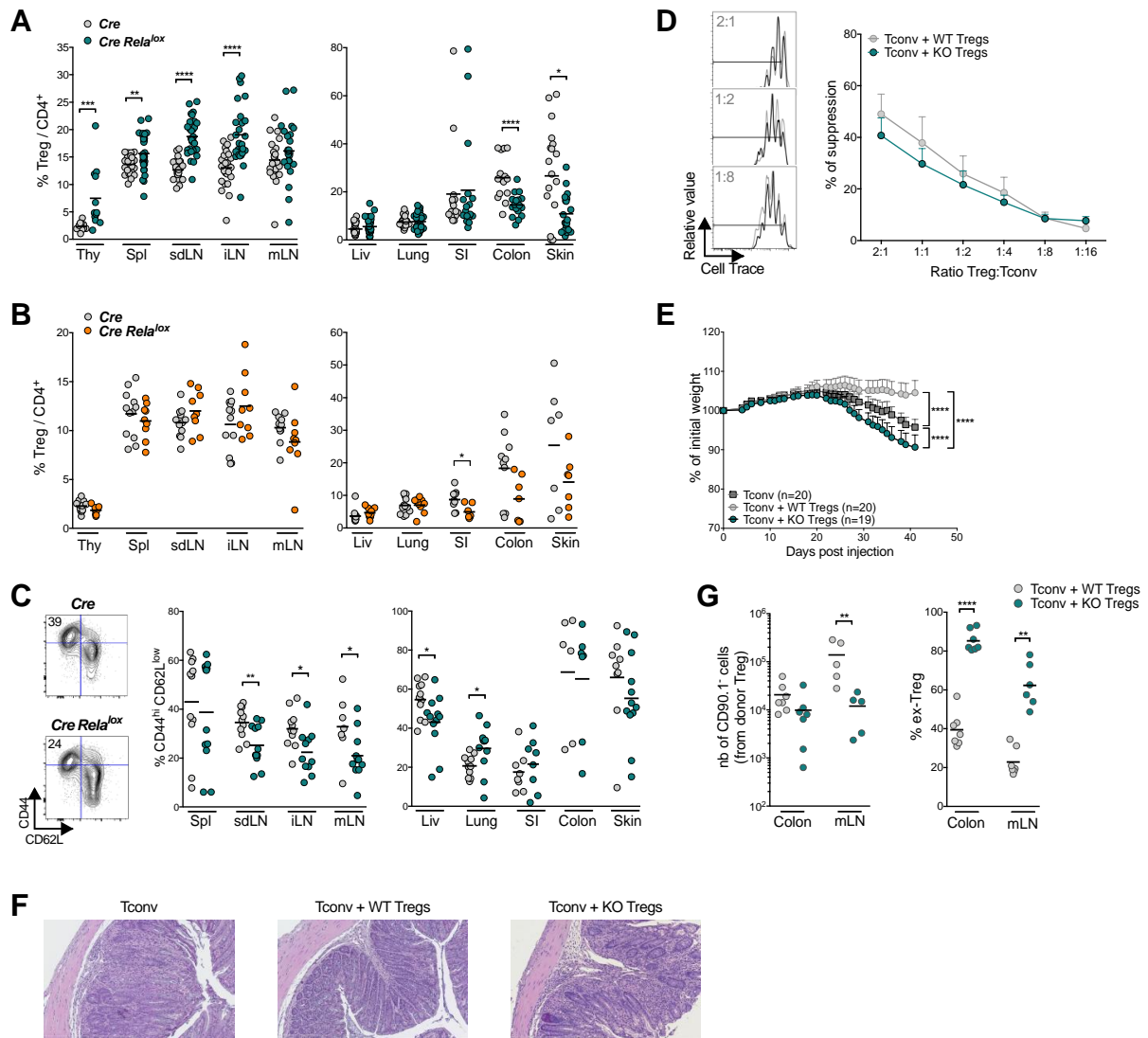
46. Zemmour, D., A. Pratama, S. M. Loughhead, D. Mathis, and C. Benoist. 2017. Flicr, a long noncoding RNA, modulates Foxp3 expression and autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114: E3472–E3480.



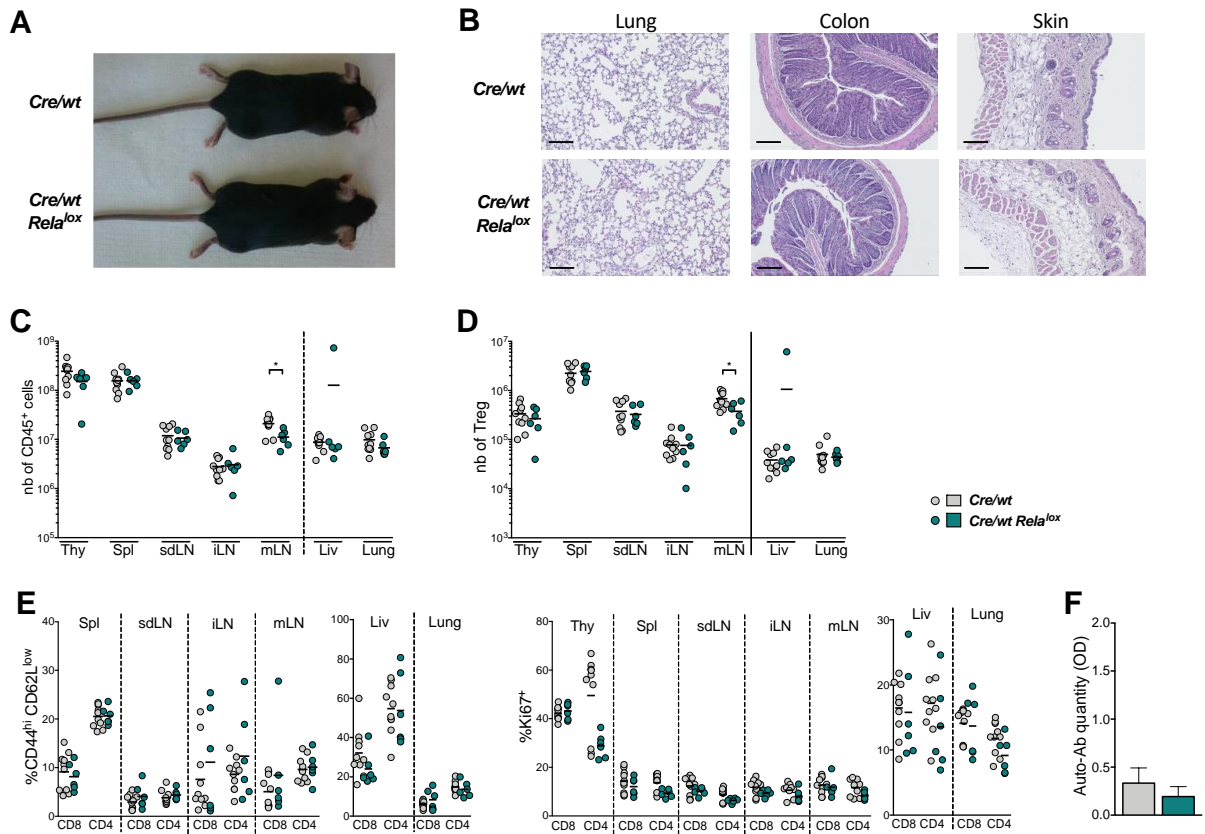
**Figure 1. Mice with RelA deficient Tregs develop systemic inflammation.** (A) Western blot analysis of RelA expression in Tregs and CD4<sup>+</sup> conventional T cells (Tconv) isolated from *Foxp3<sup>Cre</sup>* (*Cre*) and *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* (*Cre RelA<sup>lox</sup>*) mice.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



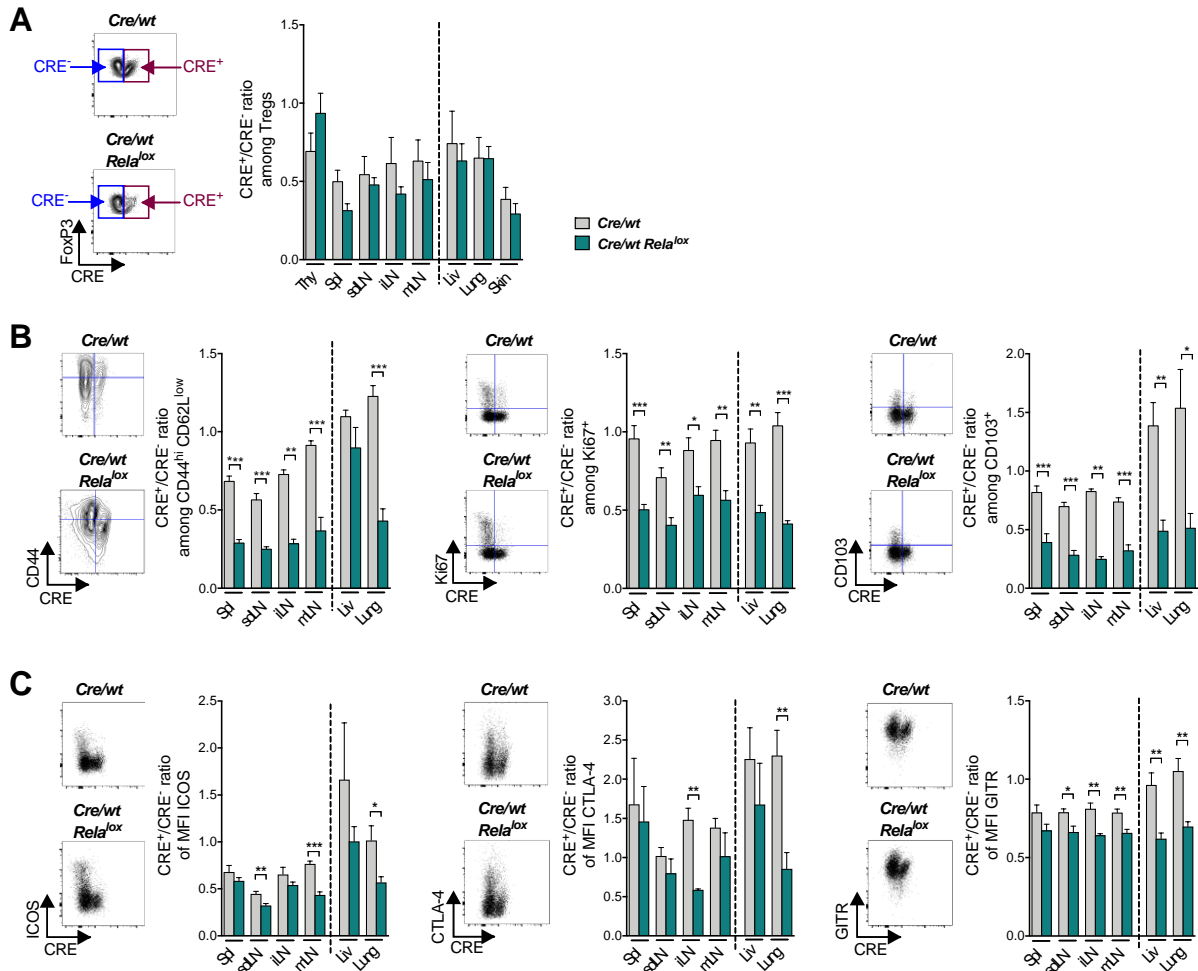
**Figure 2. High activation of T and B lymphocytes in *Foxp3<sup>Cre</sup> Relat<sup>lox</sup>* mice.** (A, B) Number of CD45<sup>+</sup> (A), CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and B cells (B) in the indicated organs (spl=spleen, liv=liver, SI=small intestine) of 12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>* (*Cre*) and *Foxp3<sup>Cre</sup> Relat<sup>lox</sup>* (*Cre Relat<sup>lox</sup>*) mice. Each dot represents a mouse, collected from 8 independent experiments. (C, D) Representative dot plots and proportion of CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>low</sup> (C) and Ki67<sup>+</sup> (D) among CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> Tconv in the indicated organs of 12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> Relat<sup>lox</sup>* mice. Each dot represents a mouse, collected from 5 (spleen, sdLN and lung) and 2 (colon and skin) independent experiments. (E) Cytokine quantification in the serum of 4-12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>*, and 4-6 week-old and 9-14 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> Relat<sup>lox</sup>* mice (n=5). (F) Immunoglobulin quantification in the serum of 4-12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice, and 4-6 week-old and 13 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> Relat<sup>lox</sup>* mice (n=5). (G) Anti-DNA antibody quantification in the serum of 4-15 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>* mice (n=15), and 4-12 week-old (n=6) and 12-14 week-old (n=9) *Foxp3<sup>Cre</sup> Relat<sup>lox</sup>* mice. Data were pooled from 2 independent experiments.



**Figure 3. Tregs in *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice appear to be less stable.** (A) Proportion of Tregs among the CD4<sup>+</sup> T cells in the indicated organs (thy= thymus, spl=spleen, liv=liver, SI= small intestine) of 12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>* (*Cre*) and *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* (*Cre Rela<sup>lox</sup>*) mice. (B) Proportion of Tregs among CD4<sup>+</sup> cells in 5 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice. (C) Representative dot plots and proportions of CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>low</sup> among the Tregs of 12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice. Each dot represents a mouse, collected from 4 to 8 independent experiments. Each dot represents a mouse, collected from 4-8 (A, C) or 2-3 (B) independent experiments. (D) *In vitro* suppressive activity of Treg cells from *Foxp3<sup>Cre</sup>* (WT Tregs) and *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* (KO Tregs) 5-6 week-old mice. Representative data at 2:1, 1:2 and 1:8 (left) and different (right) Treg:Tconv ratios of 4 independent experiments. (E-G) *In vivo* suppressive activity of Treg cells from *Foxp3<sup>Cre</sup>* (WT Tregs, 6 week-old mice) and *Foxp3<sup>Cre</sup> Rela<sup>lox</sup>* (KO Tregs, 6 week-old mice) mice, determined in a colitis model stopped at 6 weeks for analyses. (E) Percentage of initial body weight pooled from 4 independent experiments. (F) Representative histology of the colon from 4 mice. (G) Numbers of CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>-</sup> cells derived from Tregs and proportions of ex-Treg defined by their CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> phenotype in the mLN and colon. Each dot represents a mouse, collected from 2 independent experiments.

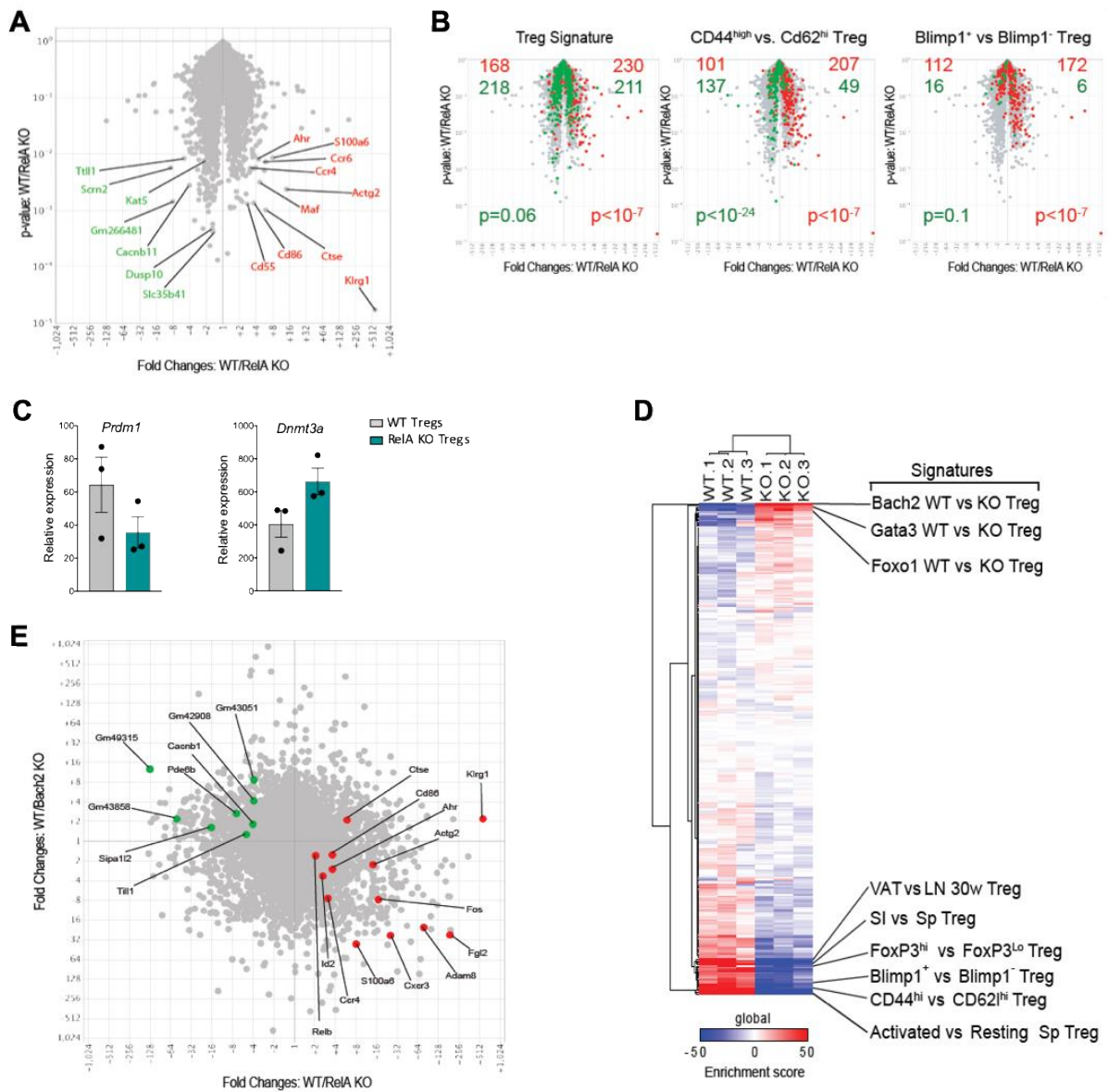


**Figure 4. Heterozygous *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> Rela<sup>lox</sup>* do not develop systemic inflammation.** (A) Representative pictures of 8 week-old mice. (B) Representative histology of lung, colon and skin of 8 week-old. Scale bars represent 100 $\mu$ m. Number of CD45<sup>+</sup> (C), of Tregs among CD4<sup>+</sup> T cells (D) and proportion of CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>low</sup> and Ki67<sup>+</sup> among CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> conventional T cells (E) in different tissues (thy=thymus, spl=spleen, liv=liver, SI= small intestine) of 8 week-old *Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* (*Cre/wt*) and *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> Rela<sup>lox</sup>* (*Cre/wt Rela<sup>lox</sup>*) mice. Each dot represents a mouse, collected from 3 independent experiments. (F) Anti-DNA auto-antibodies quantification in the serum of 8 week-old *Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* and *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> Rela<sup>lox</sup>* mice (n=5 and 10, respectively).



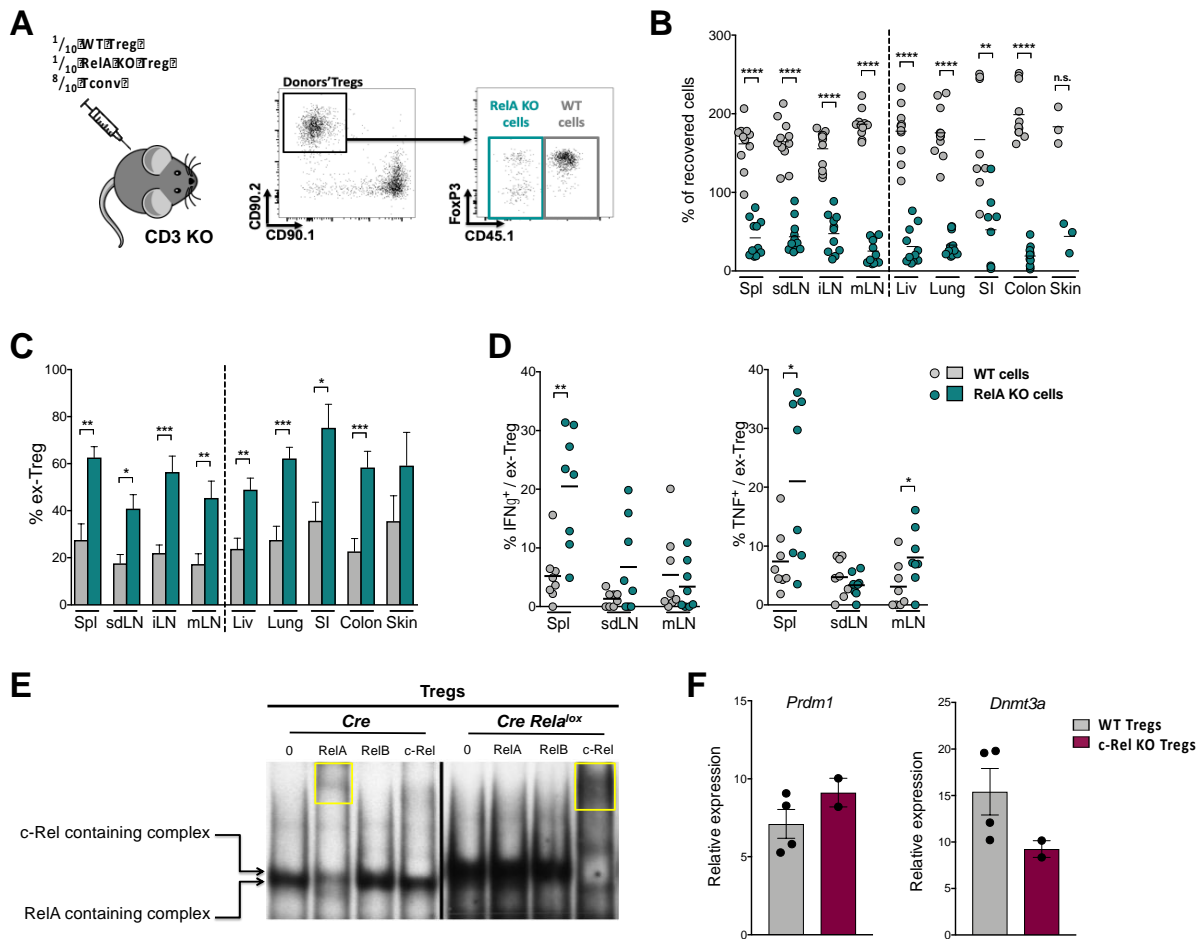
**Figure 5. Reduced expression of activation markers in RelA-deficient Tregs at steady state.** Analyses in the indicated organs (thy= thymus, spl=spleen, liv=liver) of 8 week-old *Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* (*Cre/wt*) and *Foxp3<sup>Cre/wt RelA<sup>lox</sup></sup>* (*Cre/wt RelA<sup>lox</sup>*) mice. Representative dot plots and ratios of the percentage of Tregs expressing (CRE<sup>+</sup>) or not (CRE<sup>-</sup>) CRE among Tregs (A) and among CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>low</sup>, Ki67<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup> Tregs (B). Representative dot plots and ratios of the MFI of ICOS, CTLA-4 and GITR in CRE<sup>+</sup> Tregs by the same MFI in CRE<sup>-</sup> Tregs (C). Data are from 2 or 3 independent experiments (n=6 to 13).



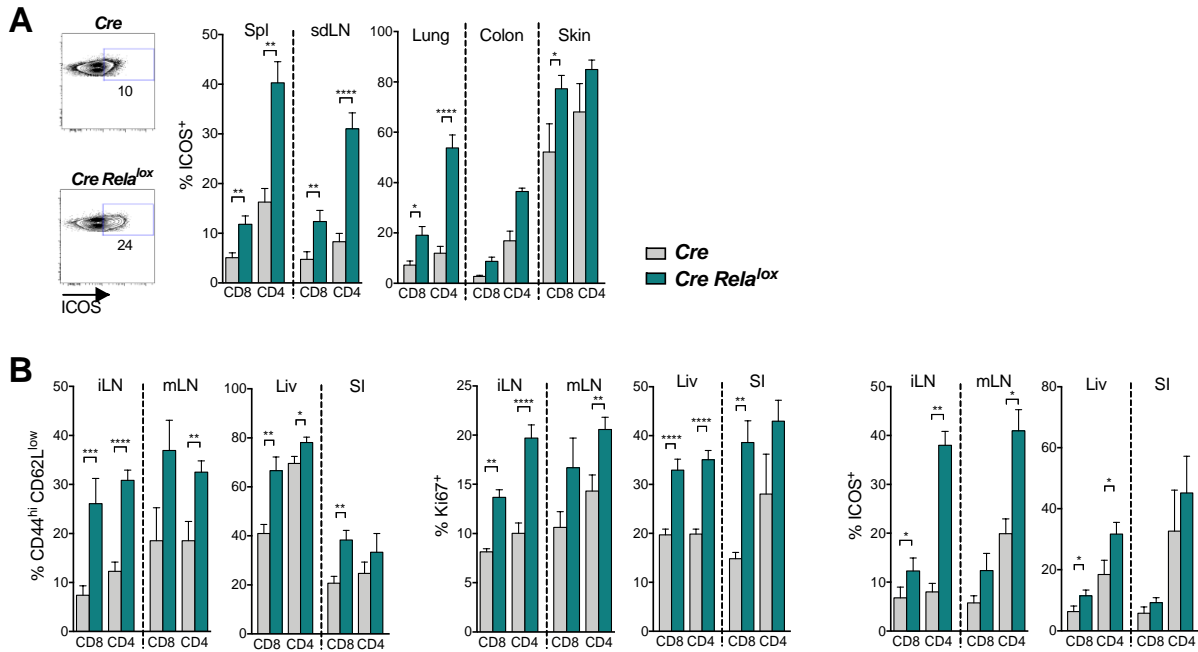


**Figure 6. RelA-deficient Tregs have identity and activation defects.** (A) Volcano plot of WT vs. RelA KO Tregs. Red and green indicate transcripts up- and down-regulated, respectively, by WT Tregs cells. (B) WT vs. RelA KO Tregs (as in A) overlaid with various Tregs signatures. Red and green indicate genes up- and down-regulated, respectively, in each signature (chi-squared test for p-value). (C) Relative expression of *Prdm1* and *Dnmt3a* in WT and RelA KO Tregs. (D) Heatmap for the enrichment score of each gene signature. (E) Fold change-fold change plot of WT vs RelA KO Tregs (x-axis) and WT iTregs vs WT Bach2 KO iTregs (y-axis, from published data (Roychoudhuri *et al.*, 2013)). Red and green transcripts from (A).

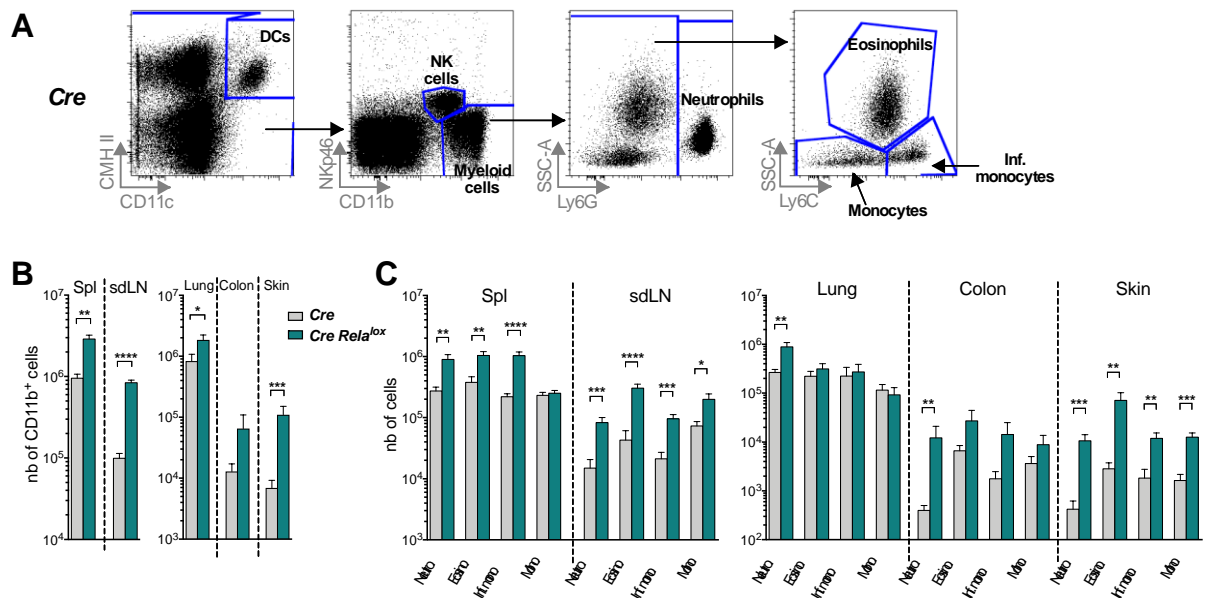




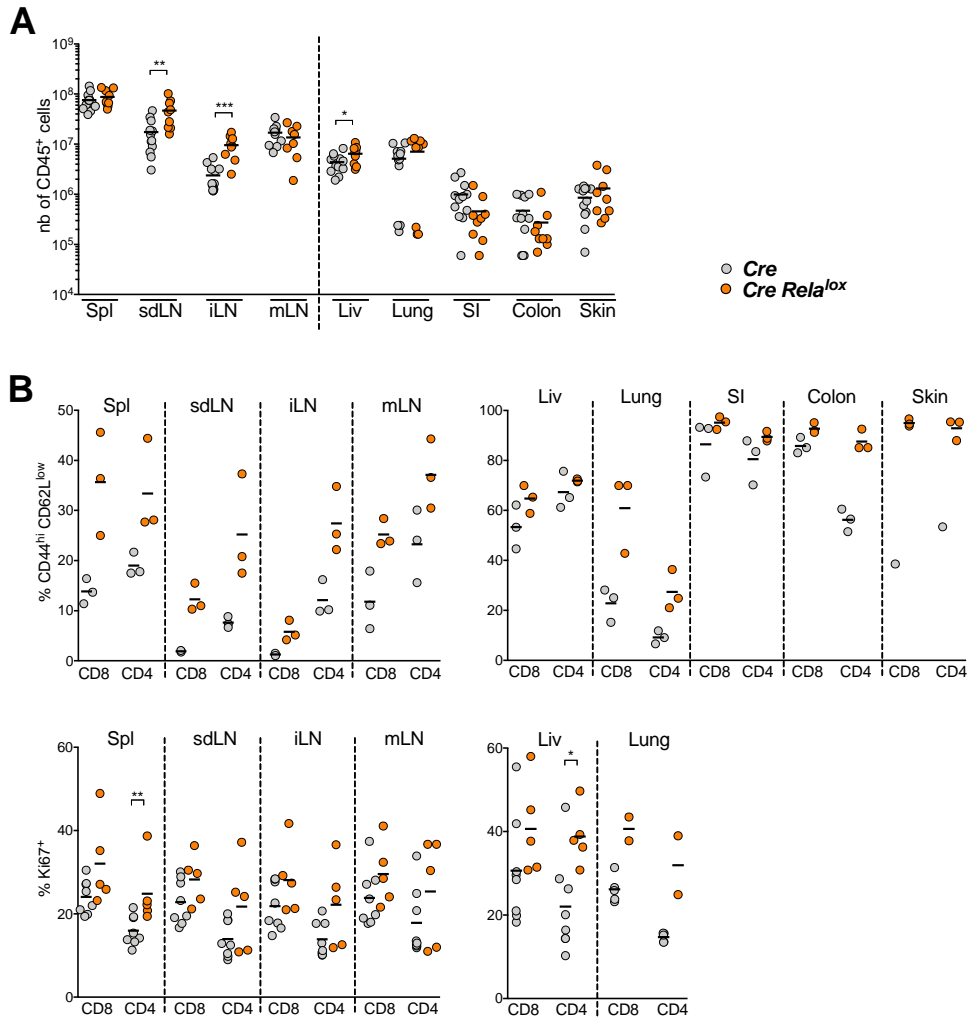
**Figure 7. RelA-deficient Tregs are unstable and turn pathogenic.** (A-D) Adoptive transfer of a 1:1:8 ratio of a mix of CRE-expressing Tregs from *Foxp3*<sup>Cre/wt</sup> (CD45.1/2 CD90.2 WT Tregs), *Foxp3*<sup>Cre/wt</sup> *Rela*<sup>lox</sup> (CD45.2 CD90.2 RelA KO Tregs) mice and CD4<sup>+</sup> conventional T cells (CD90.1 Tconv) into CD3 KO mice and analysis of donor cells 16 days later. Data are from 3 independent experiments. (A) Experimental scheme and representative gating strategy. (B) Percentage of recovered WT and RelA KO cells compared to the respectively injected percentage in the indicated organs (spl=spleen, liv=liver, SI= small intestine). (C) Proportion of ex-Tregs from injected WT cells and RelA KO cells in different tissues. (D) Proportions of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> and TNF<sup>+</sup> cells among WT ex-Tregs and RelA KO ex-Tregs. Each dot represents a mouse, collected from 2 or 3 independent experiments. (E) EMSA combined with supershift assay analysis of NF- $\kappa$ B subunits activation in Tregs isolated from *Foxp3*<sup>Cre</sup> (*Cre*) and *Foxp3*<sup>Cre</sup> *Rela*<sup>lox</sup> (*Cre Rela*<sup>lox</sup>) mice. The yellow dot line identifies the RelA containing complexes, and the yellow squares point out the supershift of RelA or c-Rel containing complexes. The results are representative of 2 independent experiments. (F) Relative expression (FPKM) of *Prdm1* and *Dnmt3a* in WT and c-Rel KO Tregs.



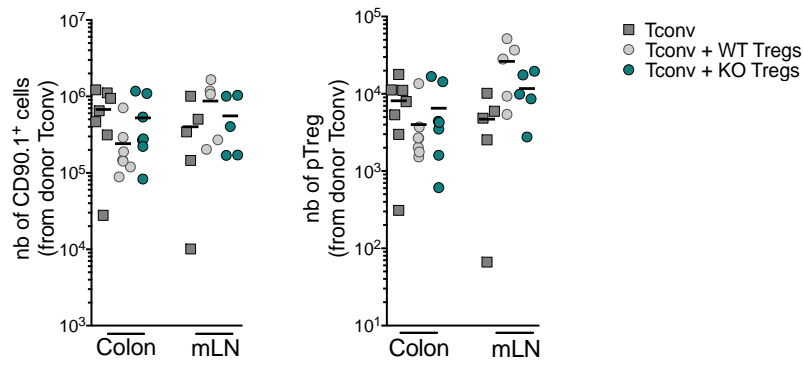
**Supplementary Figure 1. Systemic activation of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> conventional T cells in *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* mice.** (A) Representative dot plots and proportion of ICOS<sup>+</sup> among CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> conventional T cells in different tissues (spl=spleen) of *Foxp3<sup>Cre</sup>* (*Cre*) and *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>* (*Cre RelA<sup>lox</sup>*). (B) Proportion of CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>low</sup>, Ki67<sup>+</sup> and ICOS<sup>+</sup> among CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> conventional T cells in different tissues (liv=liver, SI= small intestine) of *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>Cre</sup> RelA<sup>lox</sup>*. Data were pooled from 2 to 5 independent experiments in 12 week-old mice (n=4 to 15).



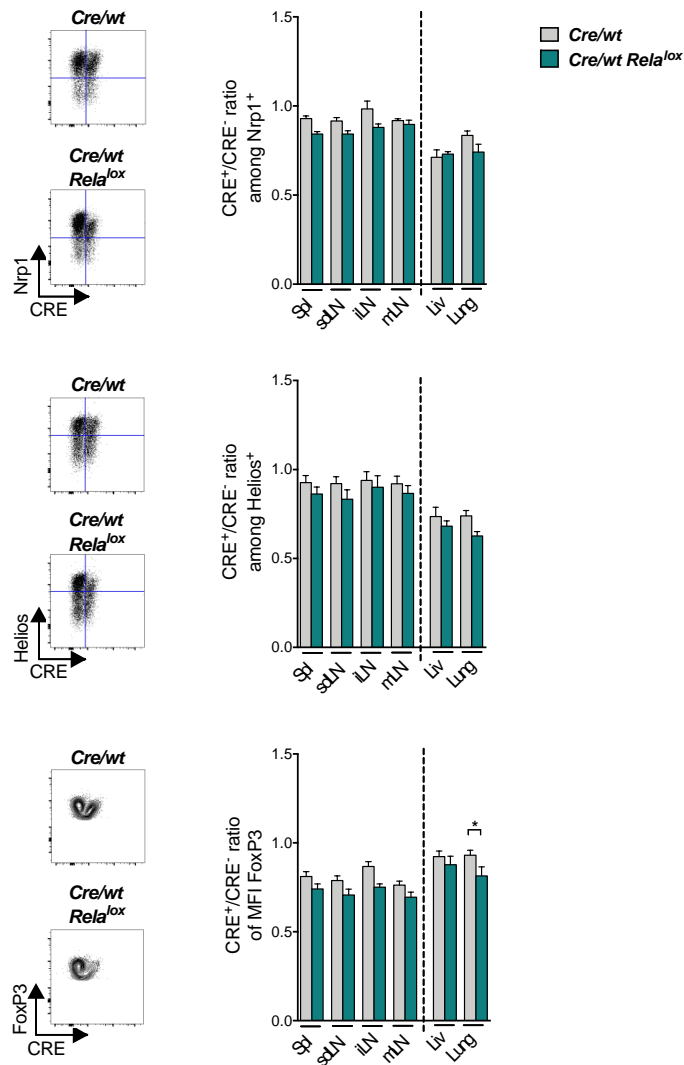
**Supplementary Figure 2. Increased numbers of myeloid cells in *Foxp3<sup>Cre</sup> Relalox* mice.** (A) Gating strategy of myeloid and NK cells. (B, C) Number of CD11b<sup>+</sup> (B) and of neutrophils, eosinophils, inflammatory monocytes and monocytes (C) in the indicated organs (spl=spleen) of 12 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup>* (*Cre*) and *Foxp3<sup>Cre</sup> Relalox* (*Cre Relalox*) mice. Data were from 3 independent experiments (n=8 to 10).



**Supplementary Figure 3. Homeostasis and phenotype of T cells in 5 week-old *Foxp3<sup>Cre</sup> Relalox* mice.** Number of CD45<sup>+</sup> (A) and proportion of CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>low</sup>, ICOS<sup>+</sup> and Ki67<sup>+</sup> among CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> conventional T cells (B) in different tissues (spl=spleen, liv=liver, SI=small intestine) of *Foxp3<sup>Cre</sup>* (*Cre*) and *Foxp3<sup>Cre</sup> Relalox* (*Cre Relalox*). Each dot represents a mouse, collected from 2 or 3 independent experiments in 5 week-old mice.



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



**Supplementary Figure 5. RelA deficient Tregs have a slight reduced expression of Nrp1, Helios and FoxP3 at steady state.** Representative dot plots and ratios of the percentage of Nrp1<sup>+</sup> and Helios<sup>+</sup> and Foxp3 MFI among the CRE<sup>+</sup> Tregs by the same percentage or MFI among the CRE<sup>-</sup> Tregs in different tissues (spl=spleen, liv=liver) of 8 week-old *Foxp3<sup>Cre/wt</sup>* (*Cre/wt*) and *Foxp3<sup>Cre/wt</sup> Rela<sup>lox</sup>* (*Cre/wt Rela<sup>lox</sup>*) mice. Data are from 2 or 3 independent experiments (n=6 to 10).



**Annexe 3 : Participation à l'étude de la fonction des récepteurs de la famille du TNF dans la biologie des Treg (article soumis)**

**Tumor necrosis factor receptor family co-stimulation increases regulatory T cell activity via NF- $\kappa$ B**

Martina Lubrano di Ricco<sup>1</sup>, Emilie Ronin<sup>1,#</sup>, Davi Collares<sup>2,#</sup>, Jordane Divoux<sup>1</sup>, Sylvie Grégoire<sup>1</sup>, Harald Wajant<sup>3</sup>, Tomás Gomes<sup>4</sup>, Yenkel Grinberg-Bleyer<sup>5</sup>, Véronique Baud<sup>2,#</sup>, Gilles Marodon<sup>1,#</sup>, Benoît L Salomon<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France.

<sup>2</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire NF- $\kappa$ B, Differentiation et Cancer, Paris, France

<sup>3</sup>Division Molecular Internal Medicine, Department of Internal Medicine II, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany.

<sup>4</sup>Wellcome Sanger Institute, Wellcome Genome Campus, Hinxton, UK

<sup>5</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Labex DEVweCAN, Centre Léon Bérard, Lyon, France

# Equal contributions

\* Correspondence and requests for materials should be addressed to Benoît Salomon, CIMI-Paris, 91 Bd de l'hôpital, Faculté de médecine de Sorbonne Université, 75013 Paris, France. Tel +33 1 40 77 97 69. (benoit.salomon@inserm.fr).



### **ABSTRACT**

Drugs targeting members of TNF superfamily or TNF receptor superfamily (TNFRSF) are widely used in medicine and are under investigations in clinical trials. However, their mechanisms of action remain poorly understood. Here, we explored the effects of TNFRSF co-stimulation on Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell (Treg) biology. We show that engagement of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3, but not OX40, increased Treg proliferation and survival. Accordingly, TNFRSF co-stimulation enhanced Treg ability to suppress colitis. Strikingly, triggering of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 induced a similar gene expression pattern, suggesting that these receptors utilize a common signal transduction pathway to promote Treg functions. Using a DNA binding assay and loss of function experiments, we show a critical role of the canonical NF- $\kappa$ B pathway in Treg TNFRSF co-stimulation. Our data suggest that TNFRSF co-stimulation plays a major role in Treg biology and that the beneficial effects of drugs targeting TNFRSF or their ligands may be mediated by their effect on Tregs.

## INTRODUCTION

The TNF superfamily (TNFSF) is composed of 19 structurally related cytokines that play major roles in the immune system. There is a considerable interest in targeting of the TNFSF ligands and receptors of the TNF receptor superfamily (TNFRSF) in medicine. Beyond PD1 and CTLA4, several TNFRSF members (4-1BB, GITR, CD27, OX40, CD40, CD30, BAFFR or TACI) are emerging targets in cancer immunotherapy and are currently tested in clinical trials<sup>1-3</sup>. TNFSF and TNFRSF members are also important targets for the treatment of autoimmune or inflammatory bowel diseases to dampen inflammation. Some drugs targeting the TNFRSF/TNFSF are clinically approved, such as anti-TNF drugs, and many others are under investigation in clinical trials.

Experiments done in mice have started to elucidate the mode of action of some TNFRSF agonists in cancer. 4-1BB, GITR and OX40 agonistic monoclonal antibodies (mAb) have been proposed to achieve tumor rejection by depleting or inhibiting tumor infiltrating regulatory T cells (Tregs) and by stimulating conventional T cells (Tconvs)<sup>4-9</sup>. Intriguingly, these same agonists of 4-1BB and OX40 are also able to suppress autoimmune diseases<sup>6,7,9,10</sup>. Some mechanisms have been proposed to explain these paradoxical findings. 4-1BB agonists would increase IFN- $\gamma$  production by Tconvs, leading to protective IDO production in an autoimmune context and tumor rejection in cancer<sup>11,12</sup>. OX40 agonistic mAb can promote protective Treg expansion in an autoimmune context while depleting tumor-infiltrating Tregs<sup>6,13</sup>. Thus, whereas the therapeutic potential of drugs targeting TNFSF ligands or TNFRSF receptors is major, their mode of action is still poorly defined and challenging to predict.

Transcriptomic analyses have clearly demonstrated that several members of the TNFRSF are preferentially expressed on human and mouse Tregs when compared to other immune cell subsets. For instance, *Tnfrsf1b* (TNFR2), *Tnfrsf9* (4-1BB), *Tnfrsf18* (GITR) and *Tnfrsf4* (OX40) belong to the very restrictive core Treg signature expressed by all Treg subsets, composed of the top 10 genes that are the most highly expressed by Tregs compared to Tconvs<sup>14,15</sup>. Also, *Tnfrsf9*, *Tnfrsf18* and *Tnfrsf4* were among the top genes that were the most highly expressed by tumor infiltrating Tregs compared to healthy tissue Tregs and tumor infiltrating Tconvs in mice and human<sup>16,17</sup>. Moreover, GITR protein expression is often considered as a prototypic Treg marker and early upregulation of 4-1BB is used to discriminate human activated Tregs from activated Tconvs<sup>18</sup>.

However, the cell-intrinsic functions of TNFRSF receptors in Treg biology are poorly defined. Experiments done in mice with germline ablation of TNFRSFs are difficult to interpret, since

it is unclear whether effects on Tregs are direct or indirect. To date, conditional knockout models of TNFRSF receptors in Tregs are lacking. Injections of agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR, DR3 or OX40 led to Treg expansion in mice, some of them associated with therapeutic effects in autoimmunity<sup>13,19-22</sup>, but it was unclear whether this relied on a direct effect on Tregs. In vitro experiments showed that agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 increased Treg expansion<sup>23-27</sup>. Importantly, the effect of several TNFRSF agonists on Treg suppressive function led to some apparently contradictory findings. It was suggested that agonists of TNFR2, GITR and OX40 inhibited Treg suppressive function. However, these agonists rendered Tconvs refractory to Treg-mediated suppression. When using experimental design to restrict the effects of the agonists on Tregs, it was usually found that most TNFRSF agonists did not inhibit their suppressive function in vitro<sup>9,28-31</sup>.

Most of what we know about signal transduction induced by triggering of TNFRSF receptors comes from studies performed in cell lines, showing activation of the NF- $\kappa$ B, PI3K and MAPK pathways<sup>32,33</sup>. Some studies have been performed with primary Tconvs and very few (only five for all TNFRSF receptors) on primary Tregs, which suggest activation of the same pathways<sup>34-38</sup>. Moreover, only two studies have analyzed the effect of TNFRSF agonists in vitro on the Treg transcriptome, one for TNF and one for OX40 agonist<sup>39,40</sup>. A throughout comparison of the effects of different TNFRSF agonists on Tregs has not been performed, so we know very little on what is common and what is specific to each TNFRSF. Here, we performed a global in vitro and in vivo analysis to explore the effect of TNFRSF engagement on Treg biology, function and identity. We found that different TNFRSF agonists modulated the expression of a common core set of genes with subtle differences along NF- $\kappa$ B activity. These co-stimulations resulted in Tregs better able to survive, proliferate and control an inflammatory disease, opening new perspectives for therapeutic interventions using TNFRSF co-stimulated Tregs.

## RESULTS

### **Increased Treg proliferation and survival by agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3**

Most TNFRSF members – with the notable exception of GITR – are expressed at low levels on resting Tregs and are rapidly up-regulated upon TCR/CD28 activation. This is the case for TNFR2, 4-1BB, GITR or OX40 with high expression at the protein level as early as 24h after initial activation (Supplementary Fig. 1a). At the mRNA level, 18h after initial activation, *Tnfrsf1b* (TNFR2), *Tnfrsf9* (4-1BB), *Tnfrsf18* (GITR), and *Tnfrsf4* (OX40) were highly

expressed, *Tnfrsf25* (DR3), *Tnfrsf10b* (DR5), *Cd27*, *Fas* and *Tnfrsf14* (HVEM) were expressed at low level and *Tnfrsf11a* (RANK) was undetectable (Supplementary Fig. 1b). To address the direct effect of these different TNFRSF agonists on Treg biology and determine their optimal concentrations, we stimulated highly purified Tregs with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Addition of TNFR2-, 4-1BB-, GITR- and DR3-specific agonists increased the numbers of living Tregs by 3 to 4 fold at their optimal concentration at day 3 compared to the control Tregs (culture in the absence of TNFRSF agonist). In contrast, addition of agonists of OX40, DR5, HVEM, CD27 or RANK had minimal or no effects; whereas Fas engagement even killed all Tregs (Supplementary Fig. 1c). For the rest of the study, we therefore analyzed the effects of agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 at their optimal concentration, along with OX40 agonist because of the well-characterized capacity of the latter to boost Tregs in vivo and to suppress autoimmune diseases while promoting tumor rejection (see above).

TNFR2 and 4-1BB agonists induced remarkable increase in Treg proliferation and survival, while GITR and DR3 agonists had a weaker effect and OX40 agonist had no effect (Fig. 1, a-c). We then addressed whether additive effects could be observed by combining two agonists. Co-treatment with agonists of TNFR2 and 4-1BB or 4-1BB and DR3 or TNFR2 and DR3 or GITR and DR3 had clearly additive effects on survival and proliferation whereas combining agonists of TNFR2 and GITR or 4-1BB and GITR had no or a minimal additive effect (Fig. 1, d-f and Supplementary Fig. 2a). Addition of OX40 co-stimulation did not further enhance proliferation or survival induced by any of the other agonists (Supplementary Fig. 2b). None of the agonists increased their own mRNA expression or expression of the other TNFRSF members, ruling out that these additive effects were due to increased expression of TNFRSF receptors (Supplementary Fig. 2c). In conclusion, agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 had a direct effect on Tregs to increase their survival and proliferation with some additive effects when they were combined.

### **TNFRSF agonists induce a shared transcriptome signature in Tregs**

To link changes in Treg biology to gene expression profiles, we performed high-throughput RNA-sequencing experiments. Tregs were stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs in the presence or absence of agonists of TNFR2, 4-1BB, DR3 and OX40 for 18 and 36 hours before transcriptome analysis. Of note, GITR agonist was omitted in this analysis because of its relative weak capacity to co-stimulate Treg proliferation, whereas OX40 agonist was included as a “negative control”. Principal component analysis (PCA) showed that Tregs co-stimulated by each of the four agonists had a specific transcriptomic signature that was clearly separated

from Tregs without TNFRSF co-stimulation (Supplementary Fig. 3a). To document the level of similarities in the effects of the different TNFRSF agonists on Tregs, we analyzed fold change (FC) of differential gene expression compared to control. The FC/FC plots, to compare the effects of TNFR2 and 4-1BB agonists, showed that gene clouds gather on the diagonal with a high positive correlation ( $r=0.85$  at 18h and  $r=0.87$  at 36h using a Pearson correlation), suggesting that these two agonists induced a very similar response (Fig. 2a and Supplementary Fig. 3b). Similar analysis to compare the effects of TNFR2 and DR3 agonists showed also strong positive correlation although milder at 18h ( $r=0.83$  at 18h and  $r=0.87$  at 36h). Interestingly, the off-diagonal placement of the gene clouds indicates that the impact of the DR3 agonist was weaker than the impact of the TNFR2 agonist on the whole gene expression pattern. Finally, and not surprisingly, a lower correlation was observed between TNFR2 and OX40 agonists ( $r=0.81$  at 18 and 36h) (Fig. 2a and Supplementary Fig. 3b). Similarities and differences between control Tregs and Tregs stimulated by each of the four TNFRSF agonists were further documented by detailing differentially expressed genes (DEG). Most of the DEG (with a false discovery rate (FDR) set below 0.05 and  $\log_2FC < -0.5$  or  $>0.5$ ) were shared between at least two agonists (766 out of 1211) and 22% (262 out of 1211) were shared between the four agonists at 18 h, indicating a core regulation between all agonists (Fig. 2b). Heatmap representations of a two-group comparison (controls vs the four agonists,  $FDR < 0.05$ ) confirmed similarities of the effects of the four agonists but also highlighted that 4-1BB and TNFR2 agonists induced the strongest response compared to the control, which was more marked than the one induced by DR3 and OX40 agonists at 18 and 36h (Fig. 2c and Supplementary Fig. 3c). Interestingly, a number of the top DEG induced by the TNFRSF agonists at 36 h belonged to the Treg transcriptomic signature (Supplementary Fig. 3d). Importantly, gene ontology analysis of DEG that were shared by at least two agonists showed that the “cytokine signaling”, “lymphocyte activation” and “TNF/NF- $\kappa$ B signaling” pathways were among the most significantly represented (Fig. 2d).

Because of the strong similarities in the transcriptomic signatures induced by the different TNFRSF agonists in Tregs, we had to exclude that TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 co-stimulation triggered the same TNFRSF receptor, directly or indirectly, to promote Treg proliferation and survival. As discussed before, none of the agonists was able to increase the expression of the other TNFRSF receptors (Supplementary Fig. 2c). Because Tregs can express TNF at a high level but not the ligands of the other three TNFRSF receptors, we focused our attention on the TNF/TNFR2 interaction by using Tregs isolated from *Tnf* and *Tnfrsf1b* (coding

for TNFR2) knockout mice. Agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 increased proliferation and survival of Tregs similarly in wild type and *Tnf* knockout Tregs, showing that their effects were not TNF-mediated (Fig. 2e). When using *Tnfrsf1b* knockout Tregs, the increased Treg proliferation and survival was abolished only with the TNFR2 agonist, showing that agonists of 4-1BB, GITR or DR3 did not co-stimulate Tregs via TNFR2 (Fig. 2f). In conclusion, triggering of TNFR2, 4-1BB, DR3 and OX40 induced a shared transcriptomic signature in Tregs with the strongest response observed with agonists of TNFR2 and 4-1BB.

### **Impact of TNFRSF agonists on Treg function.**

The classical Treg suppressive assay, studying the capacity of Tregs to inhibit proliferation of conventional T cells in vitro, is an accurate and quantitative way to measure Treg function, although only a fraction of the numerous in vivo suppressive mechanisms is tested. We found that Tregs that were pre-stimulated for 3 days with agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR or DR3 before being tested in this assay had similar suppressive activity compared to control Tregs (Fig. 3a). To further explore putative changes in Treg suppressive profile, we used our RNA-seq data and identified a series of genes involved in immune suppression, with significantly down- and up-regulated expression upon TNFR2 and 4-1BB engagements (e.g. *Il10/Ctla4* and *Ebi3*, respectively) (Fig. 3b). This suggested that, beyond their similar suppressive profile in vitro, TNFRSF-stimulated Tregs may use different means to achieve target inhibition. To further explore whether Treg identity was maintained upon TNFRSF stimulation, we also analyzed cytokine production by Tregs after 3 days of culture. As expected, control Tregs mainly produced IL-10, whereas “T helper” cytokines (IL4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-23p19, IFN-g) and TNF were detected at very low levels. Interestingly, agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 increased Th2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) (Fig. 3c), suggesting that these TNFRSF agonists may favor the polarization towards type 2 Tregs. Production of the other cytokines was not reproducibly modified by the TNFRSF agonists. Consistent with this finding, we detected increased expression of *Il5*, *Ccr4*, *Ccr6*, *Jun* and *Fosl2* and decreased expression of *Tnf*, *Il10* and *Cxcr3* (Supplementary Fig. 4a), as well as modified protein levels for CXCR3, CCR6 and GATA3 (Supplementary Fig. 4b). Finally, to definitely harness the effects of TNFRSF co-stimulation, we assessed the impact of the agonists on Treg function in vivo in a colitis model induced by Tconv injection in *Rag2*<sup>-/-</sup> mice. Remarkably, Tregs that were pre-incubated with agonists of TNFR2 or GITR displayed a significantly increased capacity to control the disease compared to control Tregs. Indeed, mice injected with these co-stimulated Tregs gained increased weight over time (Fig. 3d). Histology of the colon further supported

these findings. Mice injected with TconvS alone had marked inflammatory cell infiltrates associated with major epithelial hyperplasia and loss of intestinal glands (Fig. 3e). Mice co-injected with control Tregs displayed reduced but clear colitis with moderate inflammatory cell infiltrates and mild epithelial hyperplasia. Mice co-injected with Tregs co-stimulated with agonists of TNFR2 or GITR had no or minor colitis with no or minimal scattered mucosal inflammatory cell infiltrates without epithelial hyperplasia. In conclusion, triggering of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 induced differentiation of type 2 Tregs and increased their capacity to suppress colitis, at least for TNFR2 and GITR.

### **Triggering of TNFRSF increased in vivo Treg expansion.**

To assess the effect of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 engagement on Treg homeostasis in vivo, we used an adoptive cell transfer approach. Tregs, first stimulated in vitro with TNRSF agonists, were co-transferred intravenously with the same number of control Tregs into WT recipients to compare the homeostasis of the two Treg subsets, identified using congenic markers. Early migration was analyzed 12 hours after cell transfer, before later homeostatic re-organization. Proportions of TNFRSF co-stimulated and control Tregs were comparable in any of the analyzed lymphoid and non-lymphoid tissues, except in the blood. In this latter compartment, TNFRSF-stimulated Tregs were virtually absent, which might be explained by their increased CD62L expression, leading to augmented entry in lymph nodes, therefore impoverishing blood Tregs (Supplementary Fig. 5).

Treg tissue-distribution and phenotype was furthermore analyzed 7 days after co-transfer of control and TNFRSF co-stimulated Tregs (Fig. 4a). Overall, co-stimulated Tregs were present in higher numbers than control Tregs in the spleen, LN, lung and liver, with variations depending on the tissue and the TNFRSF agonist used (Fig. 4b). 4-1BB co-stimulation induced the strongest effect, followed by GITR, TNFR2 and DR3 co-stimulation. Importantly, co-stimulated Tregs expressed higher levels of the Ki67 proliferative marker in all tissues compared to control (Fig. 4c). Since Ki67 differential expression was not yet observed 12 hours after transfer (Supplementary Fig. 5b), co-stimulated Tregs proliferated more than control Tregs or proliferating co-stimulated Tregs had better survival after transfer. The increased mRNA expression of *Bcl2l1* (Bcl-XL) and decreased expression of *Bcl2l11* (Bim) in co-stimulated Tregs, two molecules critical in cell survival, may indicate an effect on cell survival (not shown). Compared to control cells, co-stimulated Tregs expressed higher levels of CD62L and CCR6 and lower levels of CXCR3 7 days after transfer (Fig. 4d), a phenomenon that was already observed 12 hours after transfer (Supplementary Fig. 5c). In conclusion, Tregs that were

co-stimulated with TNFRSF agonists modified their phenotype and recirculation features after transfer and acquired rapidly an increased capacity to expand in lymphoid and non-lymphoid tissues.

### **Role of NF- $\kappa$ B in Treg boost induced by agonists of TNFRSF members.**

Gene ontology analysis showed that NF- $\kappa$ B was among the top-ranked represented pathway in Tregs stimulated by TNFRSF agonists (Fig. 2d). To assess whether this signaling pathway would be involved in this TNFRSF Treg co-stimulation, we used the most reliable biochemical assay consisting in measuring the capacity of protein extracts to bind to a consensus NF- $\kappa$ B sequence i.e. electrophoretic mobility shift assay (EMSA), combined with supershift analysis to assess the involvement of individual NF- $\kappa$ B subunit. This was performed on Tregs pre-stimulated with coated anti-CD3 and anti-CD28 mAb for 24 hours to synchronize their activation and induce TNFRSF receptor up-regulation, followed by co-stimulation with TNFRSF agonists. TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 agonists induced strong NF- $\kappa$ B activation 30 minutes after initial co-stimulation with sustained activation for at least 4 hours (Fig. 5a). Compared to these four agonists, OX40 agonist induced very minor NF- $\kappa$ B activation, suggesting once more that OX-40 had a separate mechanism of action on Tregs. When looking at the identity of the different NF- $\kappa$ B activated subunits by supershift, RelA and cRel were detected in cells co-stimulated by TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 (Fig. 5b). This biochemical analysis shows that these TNFRSF agonists strongly activate the canonical NF- $\kappa$ B pathway in Tregs. To then assess whether the Treg transcriptomic signature induced by this TNFRSF co-stimulation was NF- $\kappa$ B dependent, we compared our RNA-sequencing data with the one reported in stimulated Tregs that were deficient for *Rela*, *Rel* (coding for c-Rel) or both subunits of the canonical NF- $\kappa$ B pathway<sup>41</sup>. Among the genes that were up-regulated by the agonists, 31% for TNFR2 (112 out of 366), 30% for 4-1BB (119 out of 402) and 32% for DR3 (62 out of 196) were down-regulated in *Rela/Rel* KO Tregs. Similarly, among the genes that were down-regulated by the agonists, 23% for TNFR2 (112 out of 494), 24% for 4-1BB (122 out of 514) and 20% for DR3 (49 out of 241) were up-regulated in *Rela/Rel* KO Tregs (Fig. 5c). To investigate the statistical relevance of this finding, we used gene set enrichment analysis (GSEA). Among genes that were regulated by at least two TNFRSF agonists, we found significant enrichment of RelA/cRel-dependent genes with positive and negative correlations with genes down- and up-regulated by TNFRSF agonists, respectively (Fig. 5d). These findings suggest that a significant part of the effects of the agonists were mediated by NF- $\kappa$ B. Focusing on the genes that were regulated by the agonists and depend on NF- $\kappa$ B, gene ontology analyses



revealed that the “lymphocyte activation”, “cytokine signaling”, leukocyte migration” and “TNF signaling” were among the top-ranked pathways (Fig. 5e). To assess the mechanistic relevance of this observation, we finally analyzed whether the effect of these agonists would be lost using Tregs purified from mice with conditional ablation of *Rela* in Tregs. Compared to control Tregs, *Rela*-deficient Tregs had significant reduction of proliferation and major reduction of survival induced by the TNFRSF agonists (Fig. 5, f and g). Altogether, these experiments demonstrated that the co-stimulatory effects of agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 on Tregs required activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway.

## DISCUSSION

There are multiple drugs targeting TNFSF ligands and TNFRSF receptors. Some are widely used to treat autoimmune diseases (for example anti-TNF) and many others are in clinical trials for cancers, autoimmune and inflammatory diseases. Although their mechanisms of action are likely diverse, there is strong evidence that part of them are Treg-mediated for different reasons: (i) Tregs specifically express high levels of several TNFRSF members (ie TNFR2, 4-1BB, GITR, OX40...), (ii) different agonists of TNFRSF members increase Treg expansion in vitro, and (iii) injecting agonists of several TNFRSF induced Treg expansion, although it could be *via* indirect mechanisms. Besides these findings, we know surprisingly very little on the direct biologic effect of TNFRSF agonists on Tregs.

Our study shows for the first time the following new findings: (i) Triggering of 4-1BB, GITR and DR3 increases Treg survival, (ii) there is an additive effect of combining agonists of some TNFRSF receptors for Treg proliferation and survival, (iii) at the whole transcriptome level, agonists of TNFRSF receptors induce a surprisingly similar signature, although the global effect is stronger with agonists of TNFR2 and 4-1BB, (iv) agonists of 4-1BB, GITR and DR3 do not co-stimulate Tregs simply by increasing the TNF/TNFR2 signaling, (v) agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 induce a type 2 Treg profile, (vi) agonists of TNFR2 and GITR increase the capacity of Tregs to control colitis, (vii) agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 have a direct effect to increase Treg expansion in vivo in lymphoid and non-lymphoid organs, (viii) agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 activate the canonical NF- $\kappa$ B pathway by increasing RelA and cRel DNA binding activity, (ix) finally, part of the increased Treg proliferation and survival induce by agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 is lost when using *Rela*-deficient cells. Overall, we show here that triggering several members of the

TNFRSF in Tregs modify their biology, increasing their capacity to proliferate and survive due to increased canonical NF- $\kappa$ B activity.

One of the major surprises of our data is the strong similarities of the effects of agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and OX40 when looking at the whole transcriptome level or on some gene sets. Since we excluded the possibility that this was due to triggering the same receptor (TNFR2) via endogenous TNF, this indicates that their downstream signaling pathways are likely related or even identical. Illustrating this point, the absence of co-stimulatory activity of OX40 is best explained by its inability to induce canonical NF- $\kappa$ B activation.

It was shown previously that triggering of TNFR2, 4-1BB, GITR or DR3 increase Treg proliferation *in vitro*<sup>23-27</sup> and we confirm these findings. However, there has been no report showing that this would be the case *in vivo* as well. It was shown that injection of agonists of several TNFRSF molecules did induce Treg expansion but this could be due to an indirect effect<sup>13,19-22</sup>. For instance, triggering of some TNFRSF receptors also activate Tconvs, which produce IL-2 that in turn may boost Treg proliferation<sup>42,43</sup>. Interestingly, it was proposed that injection of an OX40 agonist increased Treg expansion by increasing their sensitivity to IL-2 due to decreased SOCS1 and increased miR155 expression<sup>44</sup>. Thus, the absence of an effect of OX40 agonist *in vitro* could be due to the high IL-2 level in the culture. Here, we show that triggering of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3 on Tregs increase their expansion *in vivo* by a direct effect on the cells.

We showed here that agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR, and DR3 increased Treg survival. This was shown previously for Tconvs but not for Tregs<sup>45</sup>. For Tconvs, it was observed that increased survival was associated with increased expression of pro-survival molecules, such as survivin, Bcl-2, Bcl-XL, cFLIP-short or Bfl-1 and decreased expression of pro-apoptotic molecules, such as Bim and Bad<sup>45-47</sup>. The mechanisms of Treg survival induced by TNFRSF agonists may be only partly similar to those of Tconvs since, on one side, we also observed increased expression of *Bcl2l1* (coding for Bcl-XL) and decreased expression of *Bcl2l1l* (coding for Bim) but, on the other side, we had reduced expression of *Bcl2* and no significant difference for the other described molecules (Not shown). Other molecules may play a role since we found changes in the expression of caspases (*Casp2* and *7*), *Ripk1* and *Ripk3* and TRAF molecules (*Traf1*, *3*, *6* and *7*), all involved in T cell survival or apoptosis. Interestingly, Tregs co-stimulated by TNFRSF agonists expressed lower levels of *Il1a* and of *Il6ra* and *Il6st* (coding for Gp130), both involved in IL-6 signaling. Since it was shown that IL-6 and IL-1 rendered Tregs unstable<sup>48</sup>, co-stimulated Tregs could be more stable in inflammatory contexts.

We also demonstrated that triggering of TNFRSF did not modify Treg suppressive function in vitro, as previously suggested. However, these in vitro assays only reflect the “tip of the iceberg” of the suppressive potential of Tregs that use very diverse mechanisms of suppression in vivo. Our findings that only 2 hours of pre-incubation with agonists of TNFR2 or GITR increased the capacity of Tregs to suppress colitis suggest that such co-stimulation would improve their suppressive function in vivo. Alternatively, their increased efficacy could be well due to their increased proliferation and expansion, as we showed in another setting 7 days after transfer. Our findings are important with respect to the use of Tregs in cell therapy. This strategy is a therapeutic approach that is intensively investigated in pre-clinical experiments and some clinical assays to limit graft rejection, GvHD or autoimmune and inflammatory diseases<sup>49</sup>. The major challenge is to obtain high amounts of pure, stable and functional Tregs after in vitro cell expansion. Adding of TNFRSF agonists to the culture might help to reach this goal given their capacity to increase Treg proliferation, expansion and probably in vivo suppressive function. The tendency toward a type 2 profile of Tregs co-stimulated by the TNFRSF agonists was not expected. It might be due to the increased expression of *Gata3*, *Stat5*, *Stat6* and AP-1 factors (*Jun* and *Fosl2*), all involved in Th2 differentiation of Tconv<sup>50</sup>, although decreased expression of *Maf* and *Irf4* may limit type 2 Treg differentiation. Our findings may suggest that Tregs co-stimulated with TNFRSF agonists would be more adapted to control Th2 type disease, such as allergy, rather than Th1 or Th17 type diseases, notably because the increased expression of CCR4 and decreased expression of CXCR3 would favor their migration in Th2 type inflammations.

The signal transduction triggered by TNFRSF agonists in vitro has hardly been studied in Tregs. To date and to our knowledge, transcriptomic analyses have been reported in only two studies. In one, they studied the effect of TNF on human Tregs but there was no TCR/CD28 stimulation<sup>40</sup>. In the other one, they studied the effect of an agonist of OX40 in combination with TCR activation on purified mouse Tregs in vitro<sup>39</sup>, which is the condition that resembles the most to our experimental setting. However, they detected only 21 DEG, suggesting that co-stimulation was maybe not optimal since we could detect about 100 DEG induced by OX40 triggering (FDR<0.05, FC>2). Also, we observed that OX40 is the one, among the five studied TNFRSF, that had no effect on Treg proliferation and survival. Thus, using our transcriptomic analysis, comparing the effect of agonist of TNFR2, 4-1BB, DR3 and OX40 on Tregs, opens a new field of investigation. As for the transcriptome, very few biochemical data exploring the signals transduced by TNFRSF on Tregs have been published. These reports, measuring

amounts of I $\kappa$ B $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B members (NF $\kappa$ B1, NF $\kappa$ B2, RelA, c-Rel and RelB) by Western blot, suggested that triggering of TNFR2, GITR and DR3 activates both the canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B pathways<sup>34-38</sup>. However, these assays are less informative than the EMSA and supershift assays that we performed since the amount of a transcription factor does not necessarily reflect its DNA binding activity. Our study challenges previous findings and indicates that TNFRSF agonists mainly activate the canonical NF- $\kappa$ B pathway with activation of cRel and RelA subunits. This was confirmed using *Rela*-deficient Tregs in which part of the biological activity induced by TNFRSF co-stimulation was lost. We did not find any evidence of the activation of the non-canonical pathway, which may be even inhibitory for Tregs since GITR-costimulation induced an increase of proliferation when cells were deficient for the NF- $\kappa$ B-inducing kinase, an up-stream activator of this pathway<sup>36</sup>. Overall, we show here that triggering several members of the TNFRSF in Tregs increased their proliferation and survival, modified their biology, increased their capacity to suppress colitis and that some of these effects are due to increased activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway. Thus, the TNFRSF may play a major role in Treg biology and part of the beneficial effects of drugs targeting TNFRSF or TNFRSF molecules is likely Treg-mediated.

## METHODS

### Mice.

*Foxp3-CRE-IRES-YFP* (*Foxp3<sup>Cre</sup>*)<sup>51</sup> and *Foxp3-IRES-GFP*<sup>52</sup> (*Foxp3<sup>GFP</sup>*) knock-in mice were kindly given by Prs. Alexander Rudensky and Bernard Malissen, respectively. *Foxp3-DTR* (*Foxp3<sup>tm3(DTR/GFP)</sup>Ayr/J*), *Tnf<sup>-/-</sup>* (*Tnf<sup>tm1Gk1/J</sup>*), *Tnfrsf1b<sup>-/-</sup>* (*Tnfrsf1<sup>btm1Mwm/J</sup>*) were obtained from the Jackson laboratory. *Cd3<sup>-/-</sup>* (*CD3<sup>etm1Mal</sup>*) and *Rag2<sup>-/-</sup>* mice were obtained from the cryopreservation distribution typing and animal archiving department (Orléans, France). *Rela<sup>fllox</sup>* and *Rel<sup>fllox</sup>* mice were previously described<sup>41,53</sup>. All mice were on a C57Bl/6J background. Mice were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the local ethics committee and are in compliance with European Union guidelines.

### Cell preparation from tissues.

For lymphoid tissues, cells were isolated by mechanical dilacerations. For non-lymphoid tissues, anesthetized mice were perfused intracardially with cold PBS. Small pieces of livers and lungs were digested in type IV collagenase (0.3 mg/ml) and DNase I (100  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37°C, followed by Percoll gradient (30–70%) separation.

### **Antibodies and flow cytometry analysis.**

The following mAbs from BD Biosciences were used: anti-CD45 (30-F11), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD90.1 (OX-7), anti-CD90.2 (30-H12), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CD25 (PC61 or 7D4), anti-ICOS (7E.17G9), anti-GITR (DTA-1), anti-CD103 (M290), anti-CTLA-4 (UC10-4F10-11), anti-GATA3 (L50-823), anti-CD49d (R1-2), anti-CD11a (2D7), anti-CXCR3 (CXCR3-173), anti-CCR6 (140706). Anti-GFP antibody was purchased from Life Technologies. Anti-CD3 (145-2C11), anti-Foxp3 (FJK-16s), anti-CD44 (IM7), anti-Ki-67 (SOLA15), anti-CD73 (TY/11.8) were purchased from eBioscience, and Foxp3 staining was performed using the eBioscience kit and protocol. Cell survival was assessed with fixable viability dyes (e780 and e506). Cells were acquired on a BD LSRII and a BD Fortessa X20 cytometers and analyzed using FlowJo software.

### **Treg and Tconv purification.**

Tconvs were purified after enrichment of CD25<sup>-</sup> cells using biotinylated anti-CD25 mAb (7D4) or of CD8<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> cells using biotinylated anti-CD8 (53-6.7), CD19 (1D3) and CD11b (M1/70) mAbs and anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec), followed by CD4 staining (RM4.5) and cell sorting of CD4<sup>+</sup> Foxp3/YFP<sup>-</sup> cells or CD4<sup>+</sup> Foxp3/GFP<sup>-</sup> using the BD FACSAria II. Control Tregs were purified from spleen and lymph nodes after enrichment of CD25<sup>+</sup> cells using biotinylated anti-CD25 mAb (7D4) and anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec), followed by CD4 staining (RM4.5) and cell sorting of CD4<sup>+</sup> Foxp3/YFP<sup>+</sup> cells or CD4<sup>+</sup> Foxp3/GFP<sup>+</sup> using the BD FACSAria II. TNF<sup>-</sup> and TNFR2-deficient Tregs were similarly purified from *Tnf<sup>f/-</sup> x Foxp3<sup>GFP</sup>* and *Tnfrsf1b<sup>-/-</sup> x Foxp3<sup>GFP</sup>* mice, respectively. RelA-deficient Tregs and their control Tregs were similarly purified from *Foxp3<sup>Cre/+</sup> x RelA<sup>fllox</sup>* and *Foxp3<sup>Cre/+</sup>* mice, respectively. We used *Foxp3<sup>Cre/+</sup> x RelA<sup>fllox</sup>* mice because they did not develop autoimmunity, contrary to *Foxp3<sup>Cre</sup> x RelA<sup>fllox</sup>* mice.

### **Cell cultures.**

Purified Tregs were cultivated in a complete medium composed of RPMI 1640, glutamax and 10% fetal bovine serum, which was supplemented with IL-2 (10 ng/ml, Peprotech). Tregs were stimulated either with coated anti-CD3 (pre-coating at 1 or 2 µg/ml, 2C11, BioXcell) and anti-CD28 (pre-coating at 2 µg/ml) mAbs in 96-well flat plates (15 x 10<sup>4</sup> cells/well) or with irradiated splenocytes from *Cd3<sup>-/-</sup>* mice (7.5 x 10<sup>4</sup> cells/well) used as antigen presenting cells and soluble anti-CD3 (0.05 µg/ml) mAb in 96-well round plate (2.5 x 10<sup>4</sup> cells/well). The following soluble TNFRSF agonists were used to co-stimulate Tregs: anti-4-1BB mAb (10 µg/ml, 3H3, BioXcell), anti-GITR mAb (3 µg/ml, DTA-1, BioXcell), OX40L (100 ng/ml,

AdipoGen), TNC-sc(mu)TNF80 (STAR2) (12 ng/ml<sup>19</sup>), TL1A (12 ng/ml), LIGHT (AdipoGen), CD70, RANKL (Adipogen), FASL (Adipogen), TRAIL (Adipogen), anti-DR5 mAb (MD5-1, BioXCell). Proliferation was assessed by labeling Tregs with CellTrace Violet (Life Technologies). Living cells were assessed using the live/dead assay.

The “Relative Division” value was calculated using the following formula: [(CellTrace mean fluorescence intensity (CT MFI) of CTRL Tregs minus CT MFI of TNFRSF co-stimulated Tregs) divided by CT MFI of CTRL Tregs] x 100, among living cells. The “FC living cells” value was calculated using the following formula: percentage of TNFRSF co-stimulated living Tregs divided by percentage of control living Tregs. For the additive effect of two TNFRSF agonists, the increased proliferation was calculated using the following formula: CT MFI of Tregs cultivated with one agonist divided by CT MFI of Tregs cultivated with two agonists and the FC living cells was calculated using the following formula: percentage of living cells of Tregs cultivated with two agonists divided by percentage of living cells of Tregs cultivated with one agonist.

For the suppression assay, Tconvs ( $2.5 \times 10^4$  cells/well), labeled with CellTrace Violet, were incubated with different concentration of Tregs and splenocytes from *Cd3<sup>-/-</sup>* mice ( $7.5 \times 10^4$  cells/well) with an anti-CD3 mAb (0.05 µg/ml, 2C11) in a round-bottom plate in complete medium. The percentage suppression was calculated using the following formula: (% of divided cells in Tconvs alone minus % of divided cells in Tconvs + Tregs) divided by % of divided cells in Tconvs alone. Data show mean ± SD of biological triplicates.

### **Cytokine quantification.**

After 3 days of Treg stimulation with coated antibodies and agonists, cytokine production in the supernatant was assessed using a Luminex kit from R&D systems.

### **Colitis.**

Tregs were first pre-incubated for 2 h at 37°C in complete medium and IL-2 and anti-GITR antibody (12 µg/ml) or STAR2 (48 ng/ml). Then, Tconvs (CD4<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>,  $1 \times 10^5$  cells) and Tregs (CD4<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup>,  $2 \times 10^4$  cells) were injected intravenously into sex-matched *Rag2<sup>-/-</sup>* mice. The clinical evaluation was performed three times a week by measuring body weight. For histology, colons were fixed in 10% formaldehyde. Five-micrometer paraffin-embedded sections were stained with haematoxylin and eosin and blindly analyzed.

### **T-cell adoptive transfer.**

Tregs purified from *Foxp3<sup>GFP</sup>* mice expressing the CD90.1 CD45.2 congenic markers and from *Foxp3-DTR* mice expressing the CD90.2 CD45.1 congenic markers were cultivated from 3 days as explained above, rested for 24 h in complete medium and IL-2 and then co-injected intravenously ( $5 \times 10^5$  of each group) in C57BL/6J mice (CD90.2/CD45.2). Donor cells were analyzed 12 hours and 7 days post injection.

### **RNA-sequencing and bioinformatics analyses.**

Tregs were stimulated by coated anti-CD3 and CD28 mAbs as above for 18 and 36 hours to generate biological triplicates. RNA was extracted using the NucleoSpin RNA XS kit from Macherey-Nagel, quantified using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and purity/integrity was assessed using disposable RNA chips (Agilent High Sensitivity RNA ScreenTape) and an Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Waldbrunn, Germany). mRNA library preparation were performed following manufacturer's recommendations (SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit TAKARA). Final-17 samples pooled library prep was sequenced on Nextseq 500 ILLUMINA with HighOutPut cartridge (2x400Millions of 75 bases reads), corresponding to 2 times  $23 \times 10^6$  reads per sample after demultiplexing. Poor quality sequences have been trimmed or removed with Trimmomatic software to retain only good quality paired reads. Star v2.5.3a<sup>54</sup> has been used to align reads on reference genome mm10 using standard options. Quantification of gene and isoform abundances has been done with rsem 1.2.28 (Ref. 55), prior to normalization on library size with DESeq2 bioconductor package. Finally, differential analysis has been conducted with edgeR bioconductor package. Multiple hypothesis adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR. Principal Component Analysis was performed using Partek-flow® (Partek). Heatmaps were performed using Qlucore® omics explorer 3.5 (Glucore). Gene ontology analyses were performed using Metascape (Metascape.org) and Gene Set Expression Analysis (GSEA, <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). For creating GSEA signature datasets of NF-κB-dependent genes, the DEG from *Rela/Rel* single or double KO Tregs stimulated for 4 h with anti-CD3/CD28 mAbs were obtained from Oh *et al.*<sup>41</sup>. For the comparison between TNFRSF co-stimulated and NF-κB-deficient Tregs, identical cut-offs were used:  $\log_2$  FC <-0.5 or >0.5, with FDR<0.05 (Fig. 5, c-e).

### **Gene sets of supervised RNA-Seq analyses.**

The “Treg effector” list of genes used in Fig. 3b is the following: “Areg, Ccl3, Ccl4, Cd274 (PDL1), Ctla4, Ebi3, Entpd1, Ezh2, Fgl2, Foxp3, Furin, Gzm\*, Hmox1, Hmox2, Icos, Il10,

Il1r\*, Il2r\*, Il6ra, Itgal, Itgb2, Itgb8, Lag3, Lgals1, Lrrc32, Nrp1, Nt5e, Pdc1, Pde3b, Tgfb\*, Tigit, Tnfsf\*, Tnfrsf\*”). The “T helper cytokines and chemokine receptors” and “T helper transcription factors” lists of genes used in Fig. 3d are the following: “Ccr10, ccr4, Ccr6, Ccr8, Cxcr3, Ifng, Il10, Il13, Il17, Il2, Il21, Il22, Il23r, Il4, Il5, Il9, Klr1c, Ptgdr2, Tnf” and “Ahr , Fos12, Foxo4, Gata3, Irf4, Jun, Maf, Rorc, Sp1, Stat\*, Tbx21”.

#### **Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) combined with supershift assays.**

Tregs from *Foxp3<sup>GFP</sup>* mice were stimulated for 24 h with coated anti-CD3/CD28 mAbs, rested for 1.5 or 4 hours in complete medium and IL-2, and re-stimulated with TNFRSF agonists and IL-2 for 0.5, 1 and 4 hours. Total protein extracts were prepared and analyzed for DNA binding activity using the HIV-LTR tandem  $\kappa$ B oligonucleotide as  $\kappa$ B probe as previously described<sup>56</sup>. For supershifts, protein extracts were incubated with specific antibodies for 30 min on ice before incubation with the labeled probe.

#### **Statistics.**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software. Statistical tests used were indicated in the figure legends. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



### **AUTHORS CONTRIBUTION**

M.L.d.R., E.R., D.C., J.D. and S.G. performed experiments and analyzed data. H.W. provided essential reagents and edited the manuscript. Y.G.-B., T.G. and G.M. performed bio-informatic analyses and edited the manuscript. V.B. contributed to experimental design and edited the manuscript. B.L.S. designed and analyzed experiments and wrote the manuscript.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the great expertise of Yannick Marie, Delphine Bouteiller, Beata Gyorgy and Justine Guegan from the bio-informatic platform of the Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (Paris) and of Vincent Alcazer from the Centre Léon Bérard (Lyon). We thank Flora Issert and Doriane Foret from the animal facility for taking care of the mice. We thank Prs. Alexander Rudensky and Bernard Malissen who kindly provided us with the *Foxp3<sup>Cre</sup>* and *Foxp3<sup>GFP</sup>* mice, respectively. We thank Odile Devergne for critical reading of the manuscript.

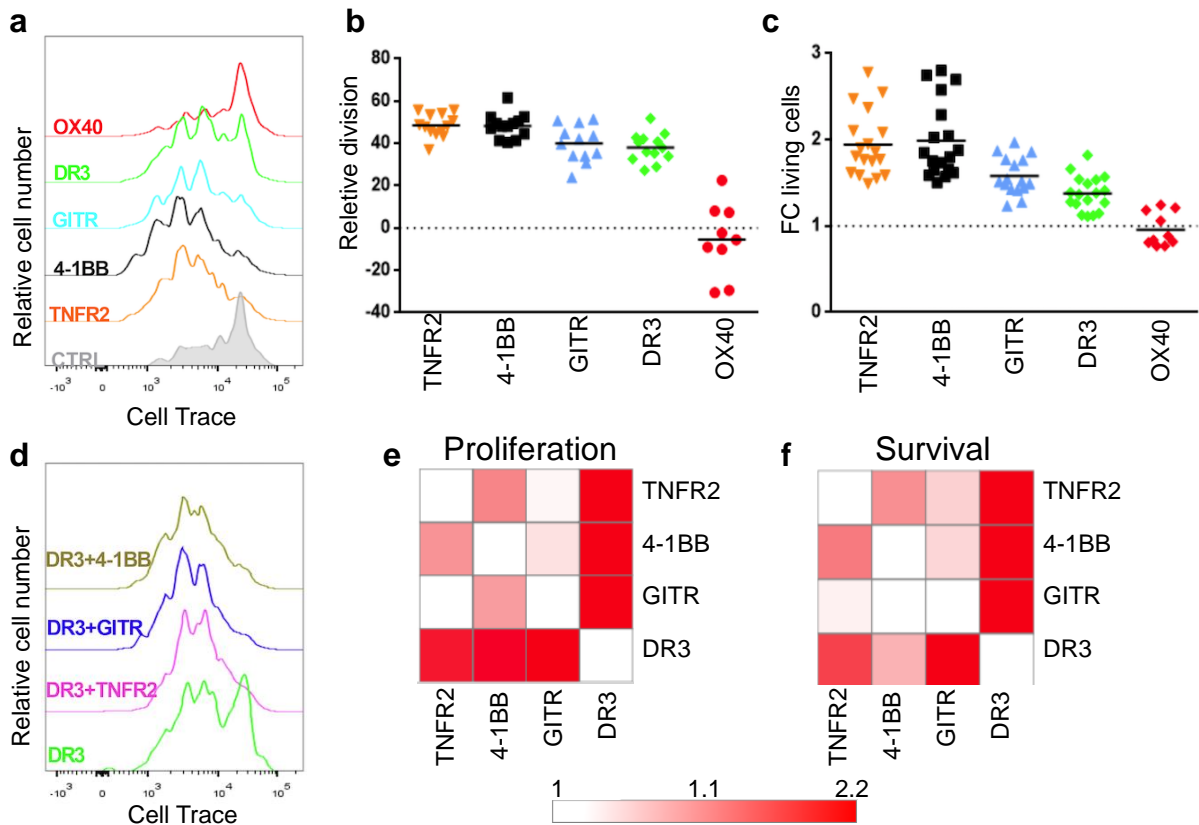
MLdR and TG were funded by the European Union's H2020 research and innovation program "ENLIGHT-TEN" under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement 675395. This work was supported by the ENLIGHT-TEN program, the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipes FRM 2015) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE15-0015-01) to B.L.S. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – Projektnummer 324392634 – TRR 221 and WA 1025/31-1 to H.W.

## REFERENCES

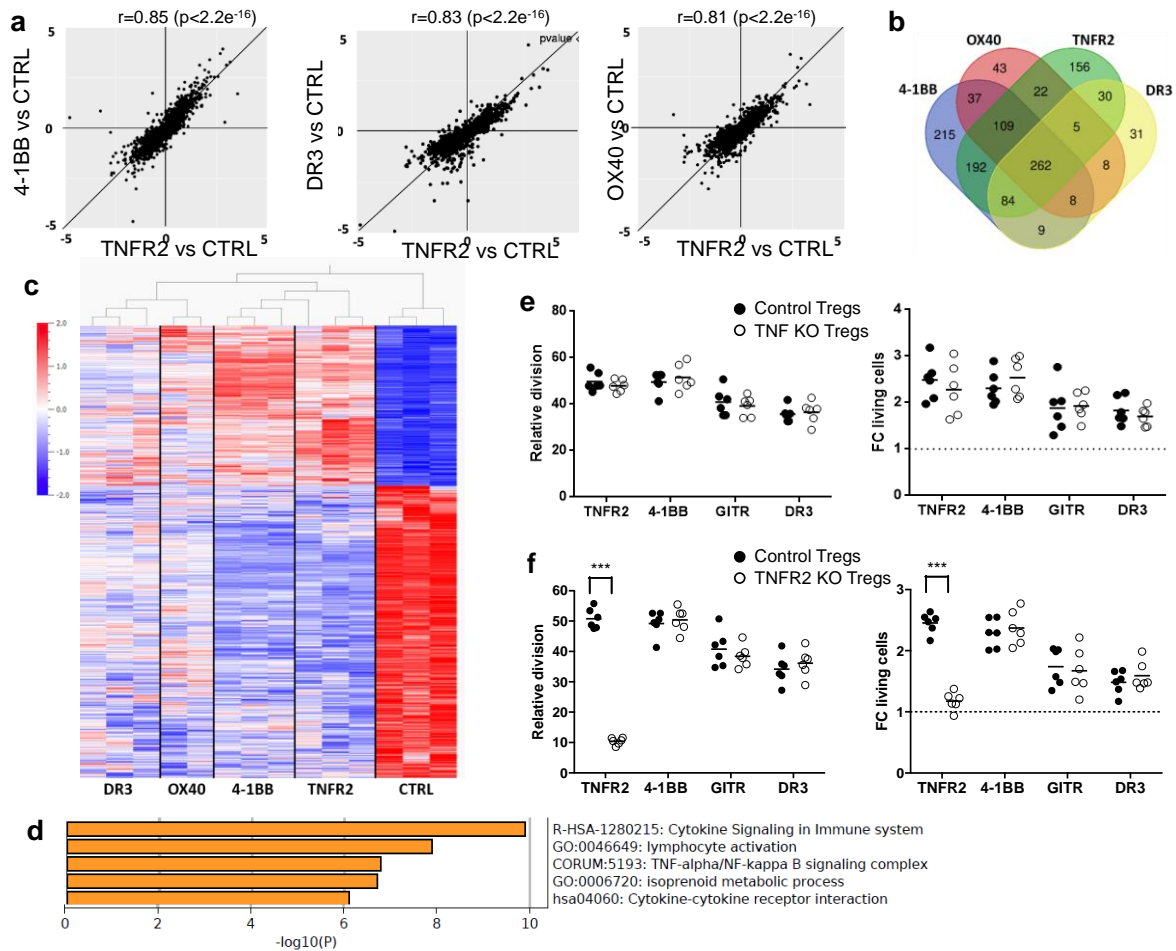
1. Assal, A., Kaner, J., Pendurti, G. & Zang, X. Emerging targets in cancer immunotherapy: beyond CTLA-4 and PD-1. *Immunotherapy* **7**, 1169-1186 (2015).
2. Burugu, S., Dancsok, A.R. & Nielsen, T.O. Emerging targets in cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol* **52**, 39-52 (2018).
3. Croft, M., Benedict, C.A. & Ware, C.F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 147-168 (2013).
4. Buchan, S.L., *et al.* Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function. *Immunity* **49**, 958-970 e957 (2018).
5. Bulliard, Y., *et al.* Activating Fc gamma receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med* **210**, 1685-1693 (2013).
6. Bulliard, Y., *et al.* OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating Fc gammaRs, leading to antitumor efficacy. *Immunol Cell Biol* **92**, 475-480 (2014).
7. Kocak, E., *et al.* Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. *Cancer Res* **66**, 7276-7284 (2006).
8. Menk, A.V., *et al.* 4-1BB costimulation induces T cell mitochondrial function and biogenesis enabling cancer immunotherapeutic responses. *J Exp Med* **215**, 1091-1100 (2018).
9. Piconese, S., Valzasina, B. & Colombo, M.P. OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J Exp Med* **205**, 825-839 (2008).
10. Sun, Y., *et al.* Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **168**, 1457-1465 (2002).
11. Chen, S., *et al.* Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model. *Cancer Immunol Res* **3**, 149-160 (2015).
12. Choi, B.K., Asai, T., Vinay, D.S., Kim, Y.H. & Kwon, B.S. 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. *Cytokine* **34**, 233-242 (2006).
13. Ruby, C.E., *et al.* Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J Immunol* **183**, 4853-4857 (2009).
14. Arvey, A., *et al.* Genetic and epigenetic variation in the lineage specification of regulatory T cells. *eLife* **4**, e07571 (2015).
15. Zemmour, D., *et al.* Single-cell gene expression reveals a landscape of regulatory T cell phenotypes shaped by the TCR. *Nature immunology* **19**, 291-301 (2018).
16. Magnuson, A.M., *et al.* Identification and validation of a tumor-infiltrating Treg transcriptional signature conserved across species and tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E10672-E10681 (2018).
17. Plitas, G., *et al.* Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity* **45**, 1122-1134 (2016).
18. Bacher, P., *et al.* Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell* **167**, 1067-1078 e1016 (2016).
19. Chopra, M., *et al.* Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *J Exp Med* **213**, 1881-1900 (2016).

20. Ephrem, A., *et al.* Modulation of Treg cells/T effector function by GITR signaling is context-dependent. *Eur J Immunol* **43**, 2421-2429 (2013).
21. Irie, J., Wu, Y., Kachapati, K., Mittler, R.S. & Ridgway, W.M. Modulating protective and pathogenic CD4+ subsets via CD137 in type 1 diabetes. *Diabetes* **56**, 186-196 (2007).
22. Schreiber, T.H., *et al.* Therapeutic Treg expansion in mice by TNFRSF25 prevents allergic lung inflammation. *J Clin Invest* **120**, 3629-3640 (2010).
23. Chen, X., Baumel, M., Mannel, D.N., Howard, O.M. & Oppenheim, J.J. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* **179**, 154-161 (2007).
24. Nguyen, D.X. & Ehrenstein, M.R. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* **213**, 1241-1253 (2016).
25. Taraban, V.Y., *et al.* Sustained TL1A expression modulates effector and regulatory T-cell responses and drives intestinal goblet cell hyperplasia. *Mucosal Immunol* **4**, 186-196 (2011).
26. Valzasina, B., *et al.* Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* **105**, 2845-2851 (2005).
27. Zheng, G., Wang, B. & Chen, A. The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **173**, 2428-2434 (2004).
28. Chen, X., *et al.* Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4+FoxP3- conventional T cells to suppression by CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* **185**, 174-182 (2010).
29. Stephens, G.L., *et al.* Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* **173**, 5008-5020 (2004).
30. Takeda, I., *et al.* Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol* **172**, 3580-3589 (2004).
31. Zaragoza, B., *et al.* Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. *Nat Med* **22**, 16-17 (2016).
32. Croft, M. & Siegel, R.M. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **13**, 217-233 (2017).
33. So, T. & Croft, M. Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells. *J Immunol* **179**, 1427-1430 (2007).
34. Bittner, S. & Ehrenschrwender, M. Multifaceted death receptor 3 signaling-promoting survival and triggering death. *FEBS Lett* **591**, 2543-2555 (2017).
35. Joetham, A., *et al.* Loss of T regulatory cell suppression following signaling through glucocorticoid-induced tumor necrosis receptor (GITR) is dependent on c-Jun N-terminal kinase activation. *J Biol Chem* **287**, 17100-17108 (2012).
36. Lu, L.F., Gondek, D.C., Scott, Z.A. & Noelle, R.J. NF kappa B-inducing kinase deficiency results in the development of a subset of regulatory T cells, which shows a hyperproliferative activity upon glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene stimulation. *J Immunol* **175**, 1651-1657 (2005).
37. Wang, J., *et al.* TNFR2 ligation in human T regulatory cells enhances IL2-induced cell proliferation through the non-canonical NF-kappaB pathway. *Sci Rep* **8**, 12079 (2018).

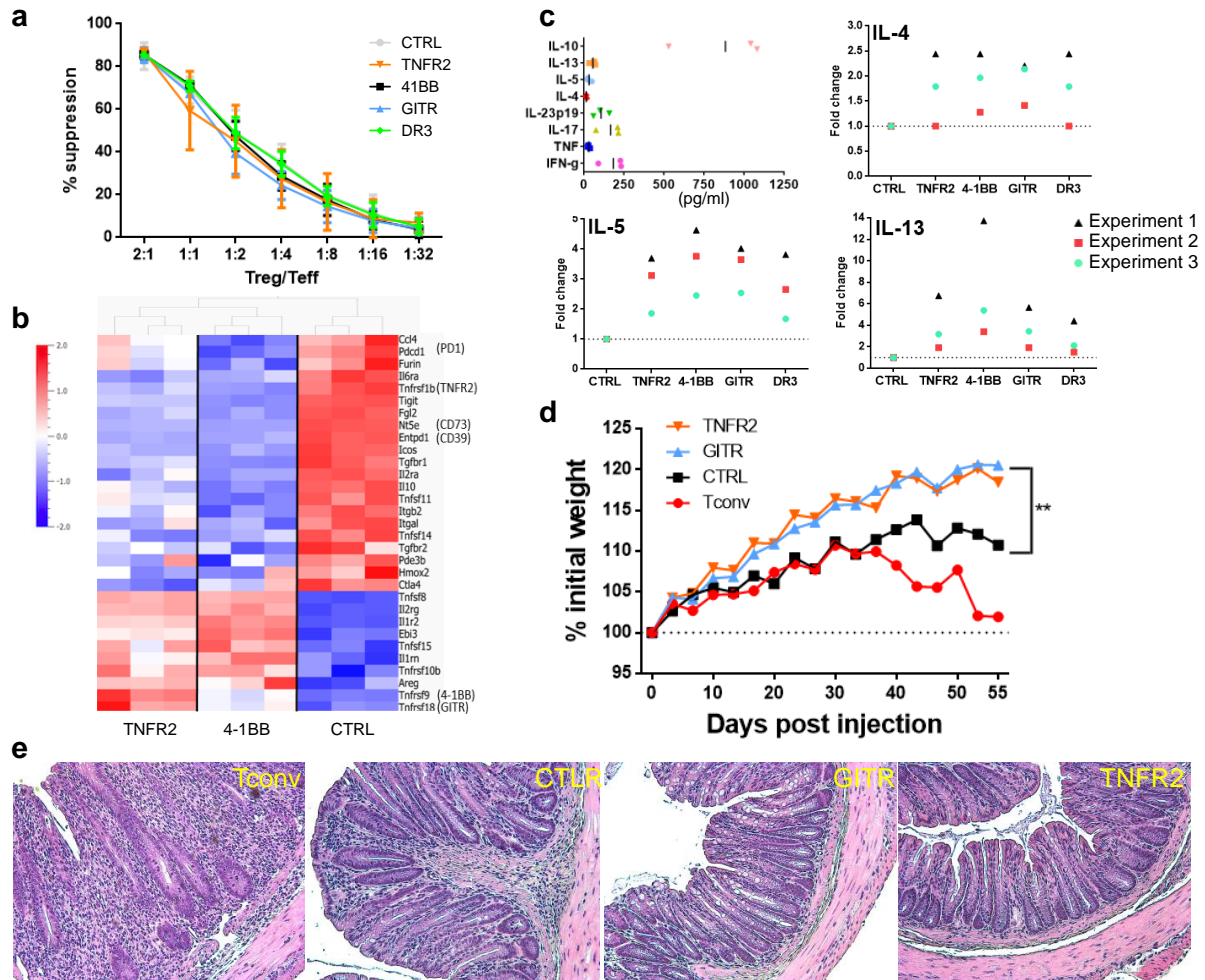
38. Vasanthakumar, A., *et al.* The TNF Receptor Superfamily-NF-kappaB Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *Cell Rep* **20**, 2906-2920 (2017).
39. Burocchi, A., Pittoni, P., Gorzanelli, A., Colombo, M.P. & Piconese, S. Intratumor OX40 stimulation inhibits IRF1 expression and IL-10 production by Treg cells while enhancing CD40L expression by effector memory T cells. *Eur J Immunol* **41**, 3615-3626 (2011).
40. Nagar, M., *et al.* TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J Immunol* **184**, 3570-3581 (2010).
41. Oh, H., *et al.* An NF-kappaB Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* **47**, 450-465 e455 (2017).
42. Grinberg-Bleyer, Y., *et al.* IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* **207**, 1871-1878 (2010).
43. Grinberg-Bleyer, Y., *et al.* Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* **120**, 4558-4568 (2010).
44. Piconese, S., *et al.* A non-redundant role for OX40 in the competitive fitness of Treg in response to IL-2. *Eur J Immunol* **40**, 2902-2913 (2010).
45. So, T. & Croft, M. Regulation of PI-3-Kinase and Akt Signaling in T Lymphocytes and Other Cells by TNFR Family Molecules. *Front Immunol* **4**, 139 (2013).
46. Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X. & Croft, M. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity* **22**, 621-631 (2005).
47. Starck, L., Scholz, C., Dorken, B. & Daniel, P.T. Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-xL and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *Eur J Immunol* **35**, 1257-1266 (2005).
48. Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L.T. & Bluestone, J.A. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* **21**, 281-285 (2009).
49. Brusko, T.M., Putnam, A.L. & Bluestone, J.A. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev* **223**, 371-390 (2008).
50. Li, P., Spolski, R., Liao, W. & Leonard, W.J. Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells. *Immunol Rev* **261**, 141-156 (2014).
51. Rubtsov, Y.P., *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546-558 (2008).
52. 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).
53. Powolny-Budnicka, I., *et al.* RelA and RelB transcription factors in distinct thymocyte populations control lymphotoxin-dependent interleukin-17 production in gammadelta T cells. *Immunity* **34**, 364-374 (2011).
54. Dobin, A., *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21 (2013).
55. Li, B. & Dewey, C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323 (2011).
56. Authier, H., *et al.* IKK phosphorylates RelB to modulate its promoter specificity and promote fibroblast migration downstream of TNF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 14794-14799 (2014).



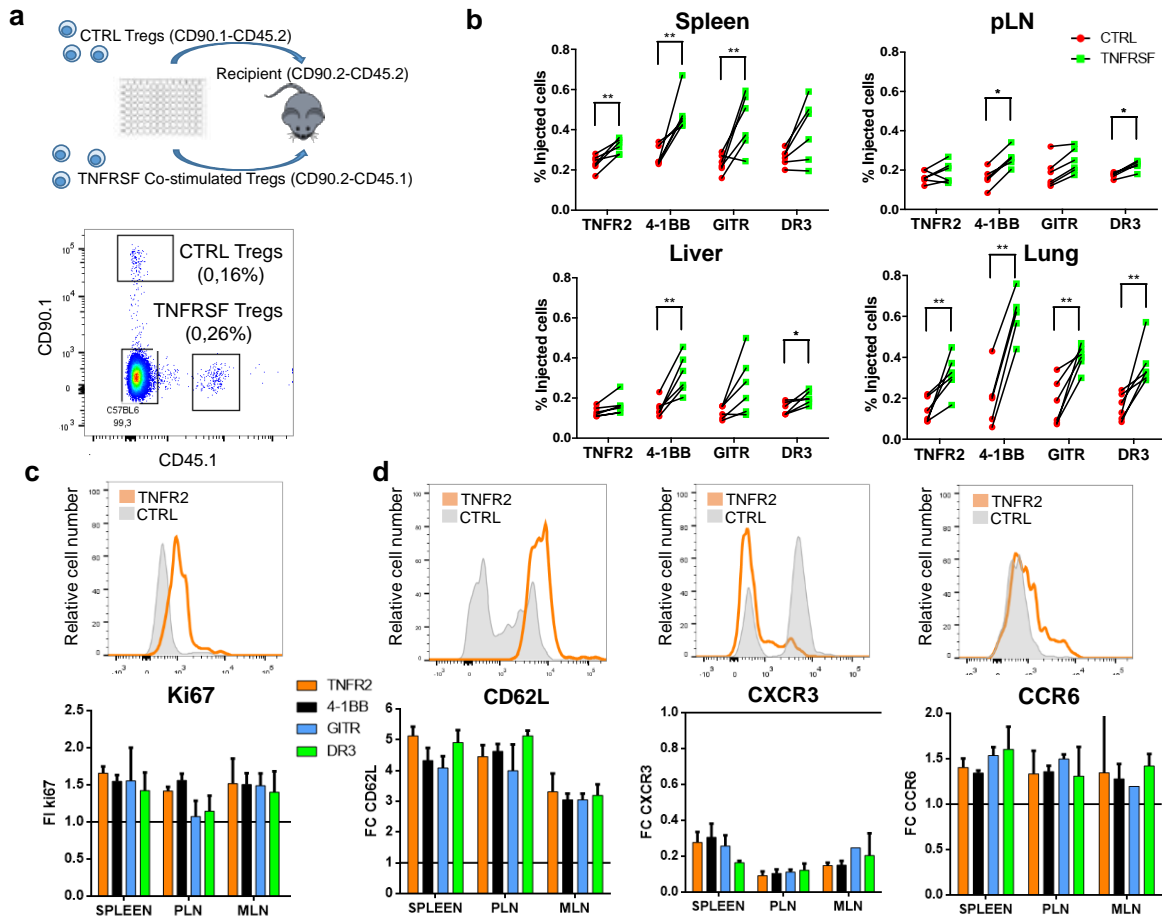
**Fig. 1** Increased Treg proliferation and survival by agonists of TNFR2, 4-1BB, GITR and DR3. Tregs were stimulated by antigen presenting cells, anti-CD3 mAb and agonists of TNFRSF receptors for 3 days to quantify proliferation and survival when agonists were added individually (**a-c**) or combined by two (**d-f**). Representative cell proliferation profile of at least nine (**a**) and three (**d**) independent experiments. Increased proliferation (**b**) and fold change (FC) of living cells (**c**) relative to the control culture (without agonist, dotted lines), with each symbol representing the mean of biological duplicates of independent experiments (at least nine). TNFRSF agonists were combined one by one to measure increased proliferation (**e**) and FC of living cells (**f**) relative to the control culture with a single agonist (indicated on the bottom of the heatmaps). Mean of three independent experiments is shown.



**Fig. 2** Different TNFRSF agonists induced a similar transcriptomic signature. **(a-d)** RNA-sequencing was performed on Tregs stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs and agonists of TNFRSF for 18 hr. **(a)** FC/FC plots (expressed in log<sub>2</sub>) of differentially expressed genes (DEG) compared to controls (FDR<0.05) to compare the effects of TNFR2 with the effects of the three other agonists (4-1BB, DR3 and OX40) on Tregs. **(b)** Venn diagram showing shared genes among all the DEG (FDR<0.05 and log<sub>2</sub>FC <-0.5 or >0.5) between co-stimulated and control Tregs. **(c)** DEG (FDR<0.05) by comparing control Tregs with Tregs co-stimulated by the four agonists. **(d)** Most significantly represented pathways analyzed by gene ontology of the 262 DEG shared in Tregs co-stimulated by the four agonists. **(e, f)** Effect of TNFRSF agonists on TNF-deficient **(e)** and TNFR2-deficient **(f)** Tregs compared to control WT Tregs, stimulated and analyzed as in figure 1. Each dot is the value from an individual mouse and the pool of three independent experiments is shown for e and f. Unpaired Mann-Whitney test was used.

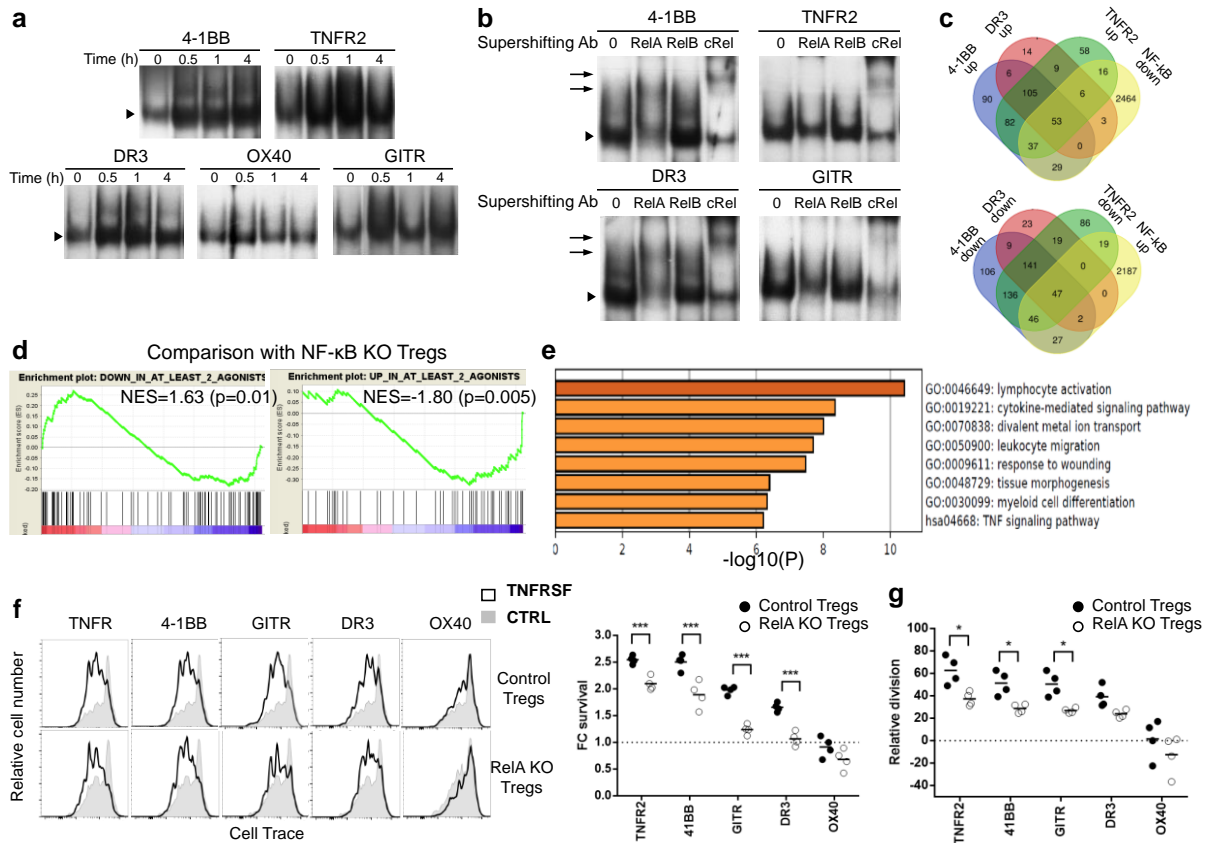


**Fig. 3** TNFRSF receptor co-stimulation of Tregs modified the expression of suppressive molecules and increased their capacity to control an inflammatory disease. **(a)** Tregs, pre-activated with anti-CD3/CD28 mAb and TNFRSF agonists, were tested for their in vitro suppressive function. Mean ( $\pm$ SD) values from one representative of three independent experiments is shown. **(b)** DEG (FDR<0.05) between control and co-stimulated Tregs among a gene sets of Treg effector molecules on Tregs stimulated for 36 hr. **(c)** Cytokine production (measured in the supernatant) by Tregs activated by anti-CD3/CD28 mAb and TNFRSF agonists for 3 days. The upper left panel shows values in the control culture (absence of agonist) and the other panels show the FC compared to the control culture (indicated by a dotted line). Each symbol represents mean values of biological triplicates from an independent experiment. **(d, e)** Tregs pre-incubated with agonists of GITR or TNFR2 or control (CTRL) Tregs were injected in *Rag2*<sup>-/-</sup> mice to assess their ability to control colitis induced by Tconv. Pool of two independent experiments with a total of 6 mice per group. Colitis was assessed by measuring mouse weight **(d)** and by histology of the colon at sacrifice **(e)**. Statistical significance was analyzed using an ANOVA test. Representative histologies are shown in e.

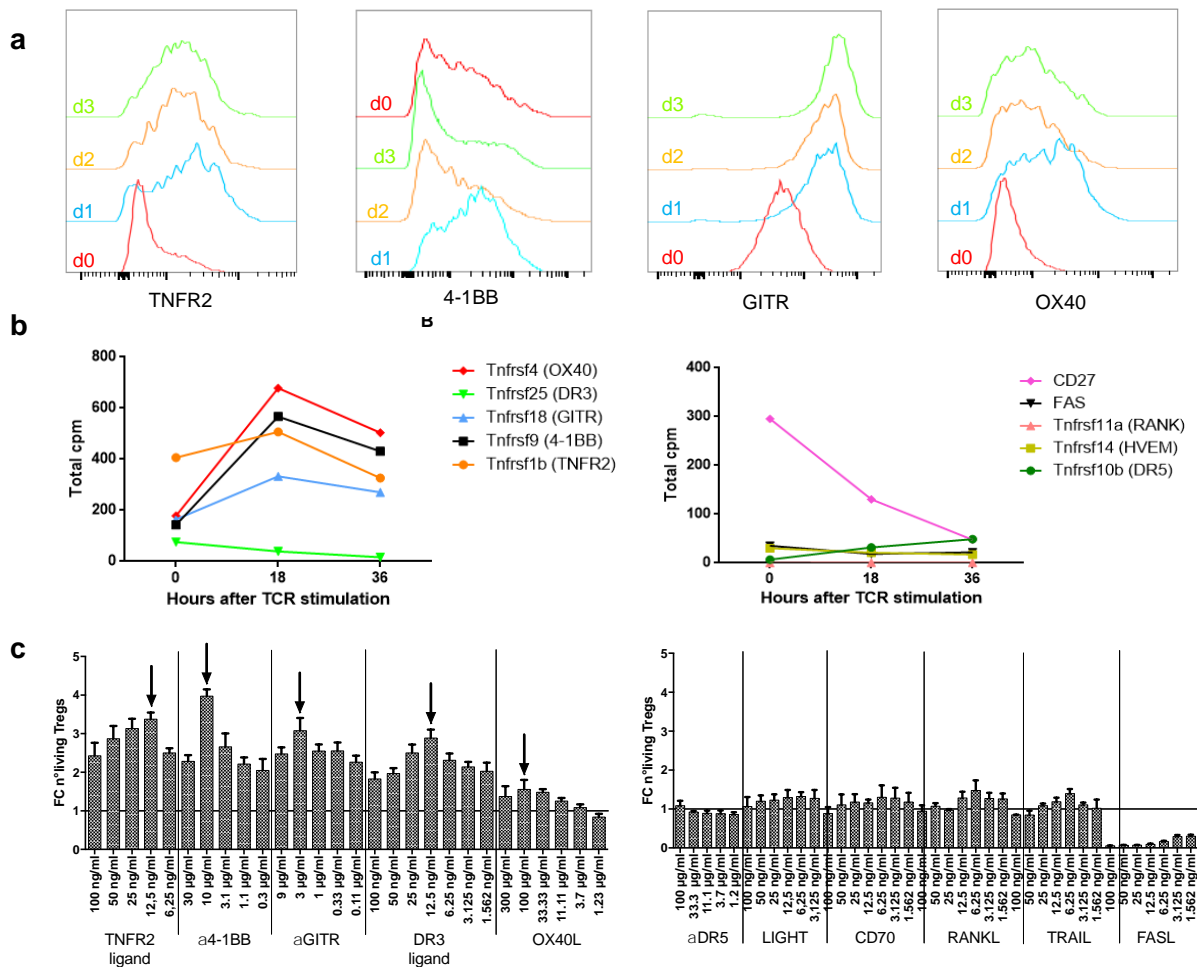


**Fig. 4** TNFRSF co-stimulation increased Treg in vivo expansion and modified Treg tissue recirculation. Tregs, pre-activated with anti-CD3/CD28 mAbs alone (control Tregs) or combined with TNFRSF co-stimulation (co-stimulated Tregs), were co-transferred in equal numbers to assess their in vivo homeostasis 7 days later. **(a)** Experimental design (upper panel) and representative plot showing co-transferred Tregs identified with congenic markers (low panel). **(b)** Proportions of co-injected Tregs in various organs. Each dot is a mouse and lines connect cells from the same mouse. Unpaired Mann-Whitney test was used. **(c, d)** Ki67, CD62L, CXCR3 and CCR6 expression among injected cells. Upper panels show representative histograms for control and TNFR2 co-stimulated Tregs in the spleen. Lower panels show the means (+SD) of FC MFI expression of co-stimulated compared to control Tregs in spleen, peripheral (PLN) and mesenteric (MLN) LN. Data were obtained from 2 independent experiments with 6 mice per group.

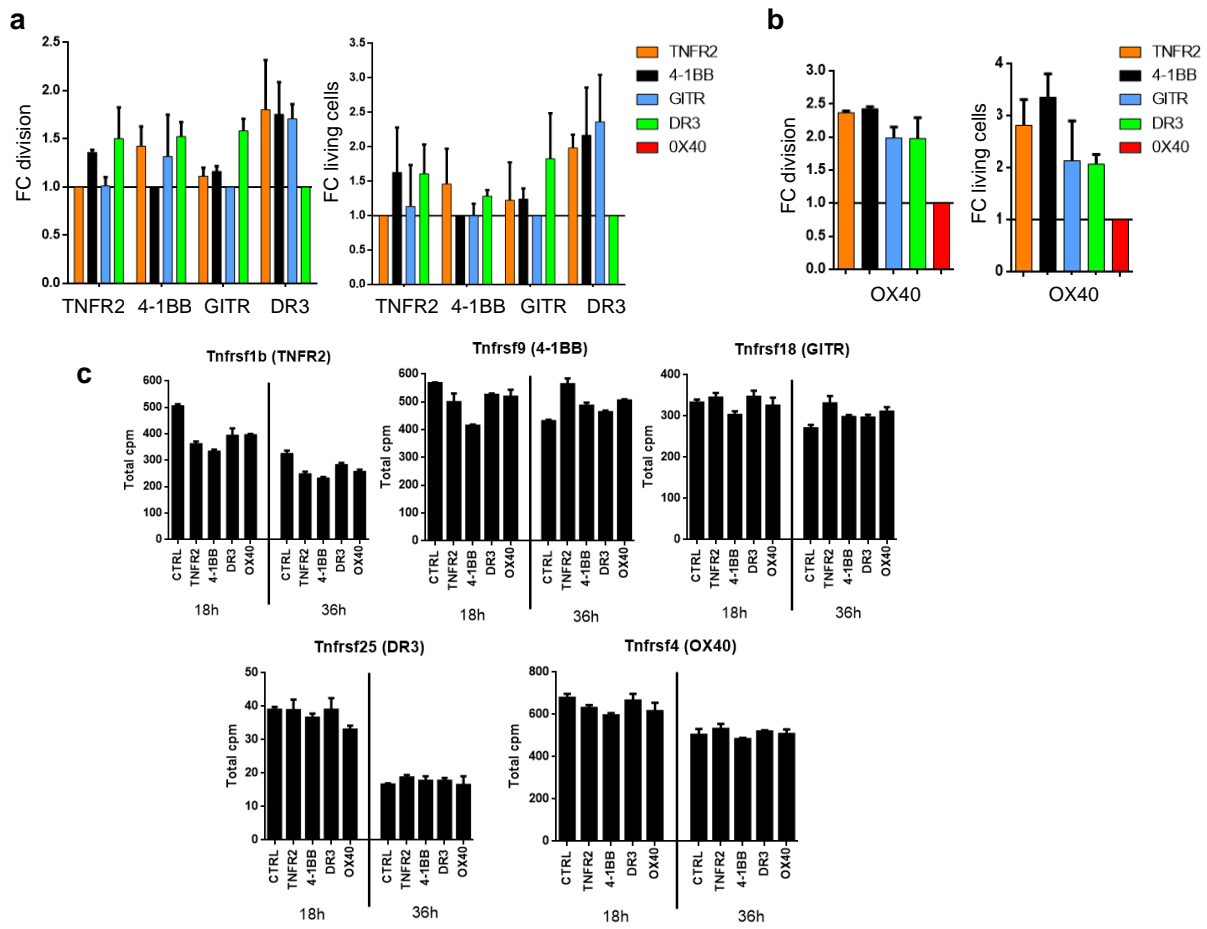




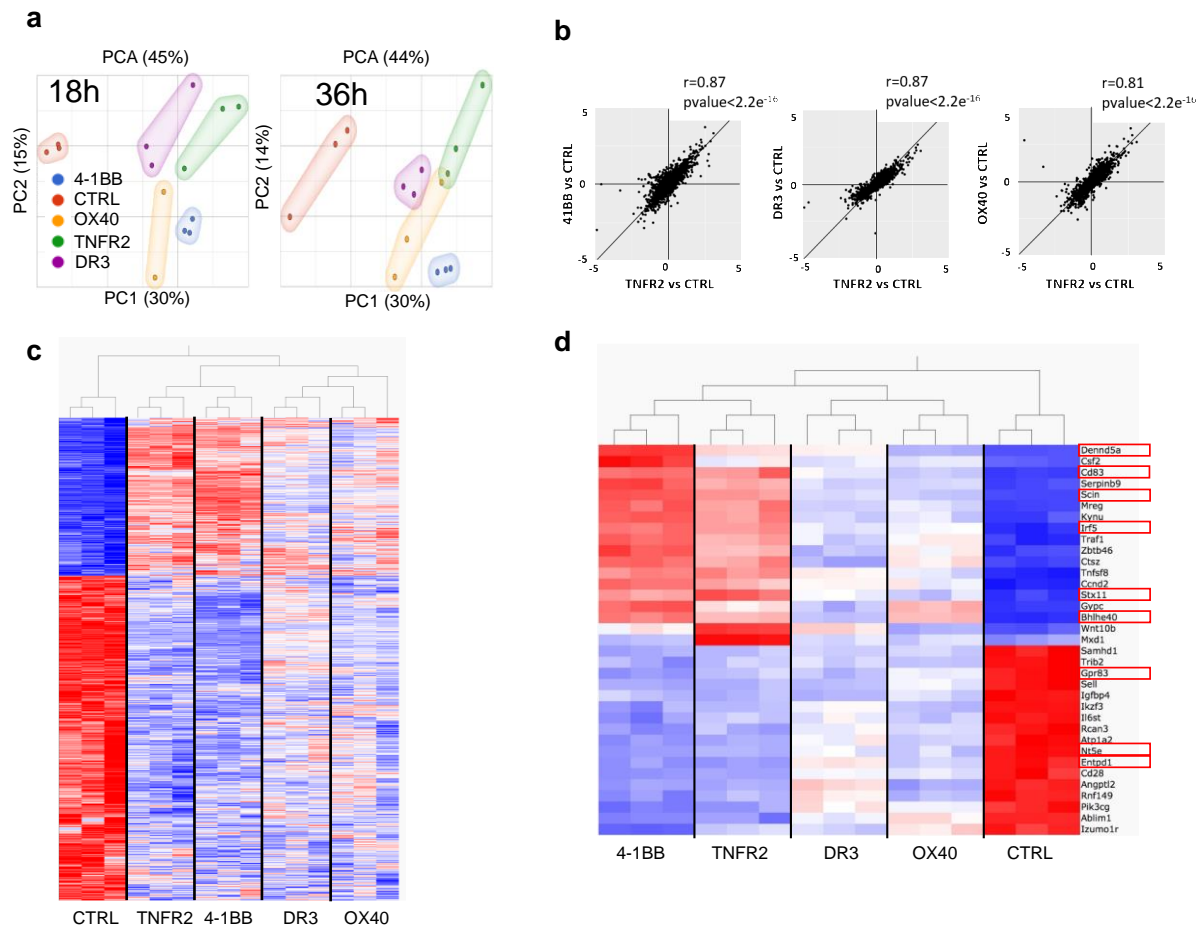
**Fig. 5** TNFRSF receptor co-stimulation of Tregs activated the canonical NF-κB pathway. **(a)**, **(b)** Tregs, pre-activated with anti-CD3/CD28 mAbs for 24 h, were re-stimulated with TNFRSF agonists alone. The EMSA **(a)** was performed at 0, 0.5, 1 and 4 hr of re-stimulation. The supershift **(b)** was performed at 0.5 hr of re-stimulation to investigate the subset composition of the NF-κB containing complex. Arrowheads indicate the position of the NF-κB containing complex and arrows indicate the positions of the supershifting complexes bound to mAb specific to RelA and c-Rel. A representative of three independent experiments is shown. **(c)**, upper panel) Venn diagram showing DEG (FDR<0.05) shared between genes up-regulated (log<sub>2</sub>FC>0.5) in TNFRSF co-stimulated Tregs and down-regulated (log<sub>2</sub>FC<-0.5) in Tregs single or double KO for *Rela* and *rel* (NF-κB). **(c)**, lower panel) Similar analysis showing DEG shared between genes down-regulated by the TNFRSF agonists and up-regulated genes in Tregs single or double KO for *Rela* and *rel*. **(d)** GSEA plot showing significant enrichment of NF-κB-dependent genes among genes down-regulated (left) or up-regulated by at least two TNFRSF agonists in Tregs. **(e)** Most statistically represented pathways analyzed by gene ontology of the 285 DEG that are shared between TNFRSF co-stimulated Tregs and *Rela/rel* KO Tregs as defined in **(c)**. Proliferation **(f)** and survival **(g)** of *Rela* KO and control Tregs, stimulated and analyzed as in figure 1. One representative proliferation profile (left panels) and increased proliferation and FC living cell numbers relative to the control culture (right panels) from the pool of two independent experiments. Each circle represents a mouse (Two-way ANOVA).



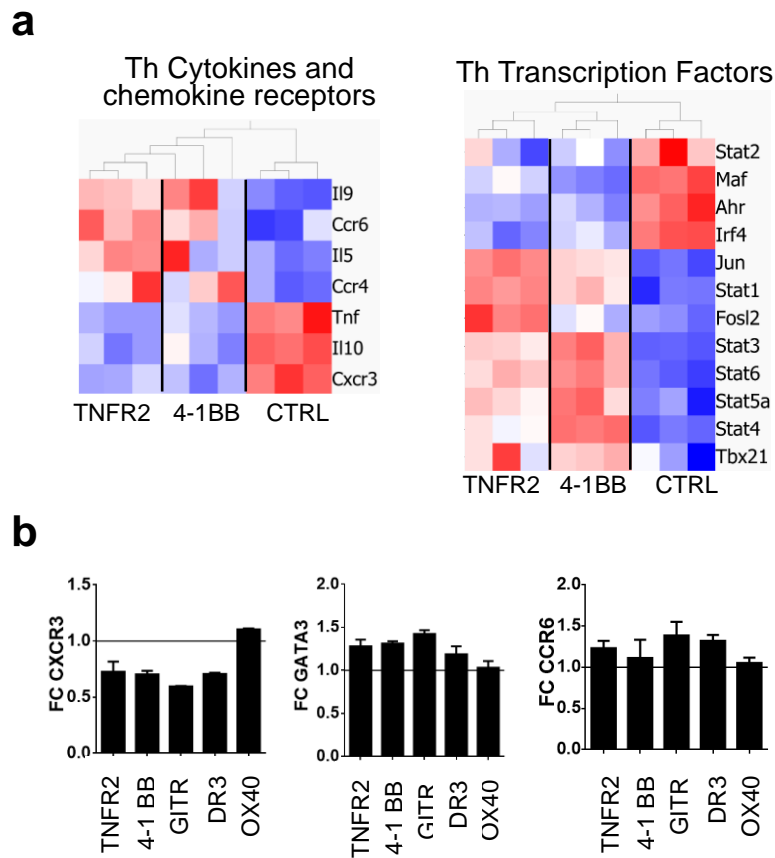
**Supplementary Fig. 1.** Treg expression kinetics of TNFRSF and titration of TNFRSF agonists on Treg expansion. **(a)** Expression of TNFR2, 4-1BB, GITR and OX40 was assessed on freshly purified Tregs and after 24, 48 and 72 hr of culture with agonists and beads coated with anti-CD3/CD28 mAbs. One representative of three experiments is shown. **(b)** Counts per millions (cpm) of reads, obtained by RNA-sequencing, were used to quantify the expression of different TNFRSF members on freshly purified Tregs and Tregs stimulated with coated anti-CD3/CD28 mAbs for 18 and 36 hr. **(c)** Tregs were stimulated for 3 days with anti-CD3/CD28 coated mAbs and different doses of agonists for TNFRSF to measure the fold change (FC) expansion of living cells compared to control culture (solid line). The dose with the best effect, indicated with an arrow, was selected for the rest of the study. Mean (+SD) of three independent experiments is shown.



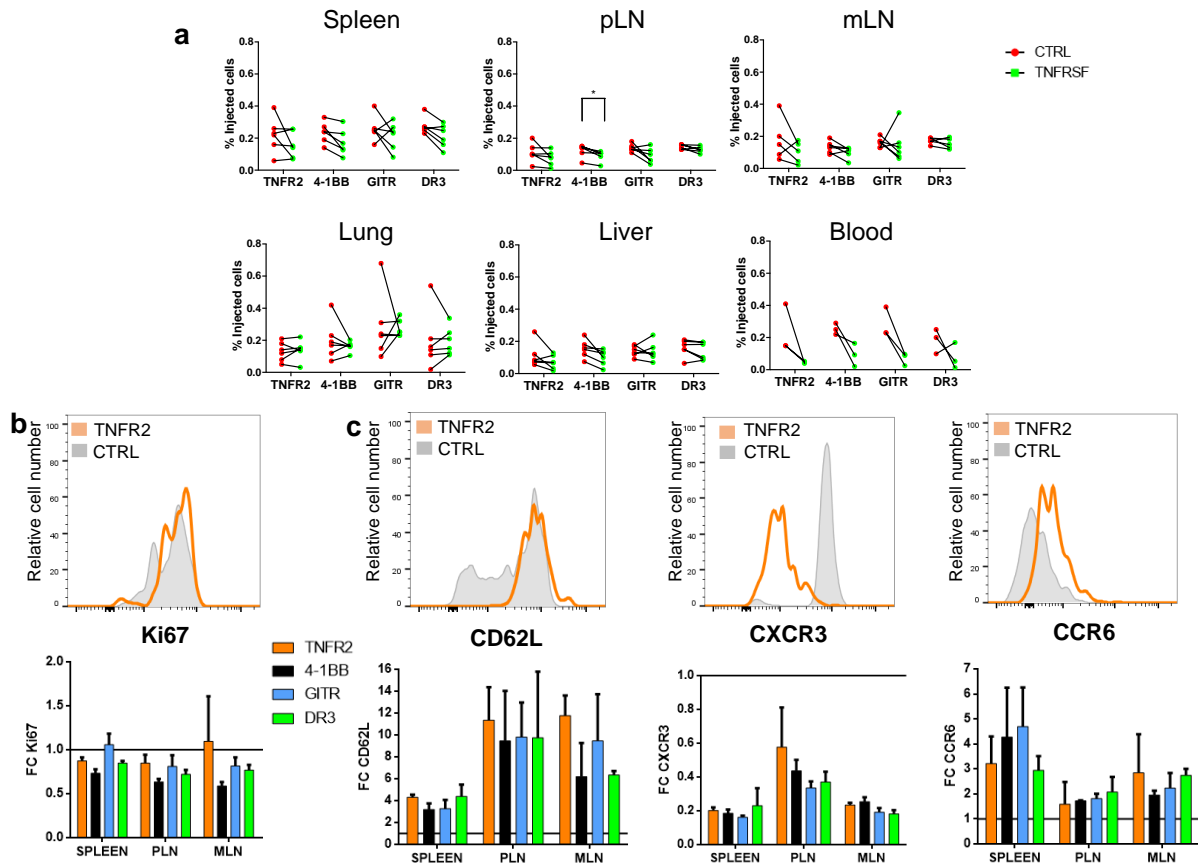
**Supplementary Fig. 2** Quantification of the increased proliferation and survival with combination of two TNFRSF agonists and TNFRSF expression. (a, b) Fold change (FC) of increased proliferation and living cell numbers of the data shown in figure 1 d-f, with the first TNFRSF agonist indicated below the x axis and the second agonist indicated in the legend. (c) Counts per millions (cpm) of reads, obtained by RNA-sequencing, were used to quantify the expression of various TNFRSF on Tregs cultivated for 18 and 36 hr with coated anti-CD3/CD28 mAbs and different TNFRSF agonists (indicated below the x axis).



**Supplementary Fig. 3** Similarities in the signature induced by the different TNFRSF agonists in Tregs. RNA-sequencing was performed on Tregs stimulated with coated anti-CD3/CD28 mAbs and agonists of TNFRSF. **(a)** PCA analysis of the biological triplicates at 18 and 36 hr of stimulation. **(b)** FC/FC plots (expressed in log2) of DEG compared to controls (FDR<0.05) to compare the effects of TNFR2 with the effects of the three other agonists (4-1BB, DR3 and OX40) on Tregs at 36 hr of stimulation. **(c)** DEG (FDR<0.05) by comparing control Tregs with Tregs co-stimulated by the four agonists at 36 hr of stimulation. **(d)** List of the top DEG in Tregs co-stimulated by TNFRSF agonists at 36hr using the FDR to set the threshold. Genes belonging to the Treg transcriptomic signature are indicated.



**Supplementary Fig. 4** TNFRSF agonists favor the polarization towards type 2 Tregs. **(a)** DEG (FDR<0.05) between control and co-stimulated Tregs among a gene sets of “T helper” (Th) cytokine and chemokine receptors and transcription factors on Tregs stimulated for 36 hr. **(b)** FC compared to control of CXCR3, CCR6 and GATA3 expression of Tregs stimulated by anti-CD3/CD28 mAbs and TNFR agonists for 3 days. Means (+SD) values of three independent experiments.



**Supplementary Fig. 5** Early cell homeostasis of Tregs co-stimulated by TNFRSF agonists. Tregs, pre-activated with anti-CD3/CD28 mAbs alone (control Tregs) or combined with TNFRSF co-stimulation (co-stimulated Tregs), were co-transferred in equal numbers as in figure 4 to assess their *in vivo* homeostasis 12 hr later. **(a)** Proportions of co-injected Tregs in various organs. Each symbol is a mouse and lines connect cells from the same mouse. Unpaired Mann-Whitney test was used. **(b, c)** Ki67, CD62L, CXCR3 and CCR6 expression among injected cells. Upper panels show representative histograms for control and TNFR2 co-stimulated Tregs in the spleen. Lower panels show the means (+SD) of FC MFI expression of co-stimulated compared to control Tregs. Data were obtained from 2 independent experiments with 6 mice per group.



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Métabolisme du lymphocyte T quiescent.....	20
<b>Figure 2</b> : Structure de la chaîne respiratoire.....	21
<b>Figure 3</b> : Métabolisme du lymphocyte T activé.....	25
<b>Figure 4</b> : Voie mTOR et régulation du shift anabolique.....	30
<b>Figure 5</b> : Voie AMPK et régulation du shift catabolique.....	33
<b>Figure 6</b> : mTORC1 et 2 participent à la différenciation des lymphocytes T helper (Th).....	38
<b>Figure 7</b> : La mémoire T CD8 est associée à un métabolisme de type catabolique.....	40
<b>Figure 8</b> : La réponse T est intimement liée au métabolisme cellulaire.....	42
<b>Figure 9</b> : L'intensité du signal TCR reçue par le précurseur thymique dicte sa destinée.....	46
<b>Figure 10</b> : Les Treg peuvent avoir une origine thymique (tTreg) ou périphérique (iTreg)....	49
<b>Figure 11</b> : Plasticité du phénotype régulateur.....	50
<b>Figure 12</b> : Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs.....	54
<b>Figure 13</b> : Diversité des lymphocytes T régulateurs.....	61
<b>Figure 14</b> : Les Treg sont caractérisés par un métabolisme catabolique.....	68
<b>Figure 15</b> : Nouveau modèle du métabolisme des Treg.....	149





## RESUME

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> régulateurs (Treg) participent à la régulation de l'activité du système immunitaire et sont essentiels au maintien de la tolérance immunitaire. Ces cellules sont ainsi bénéfiques lors de pathologies auto-immunes tandis que leur action anti-inflammatoire favorise la croissance tumorale. Comprendre le fonctionnement des Treg constitue donc un axe majeur pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques applicables à ces deux types de pathologies. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au métabolisme des Treg étant donné que les informations disponibles à ce jour sont encore l'objet de controverse. A l'inverse des lymphocytes T conventionnels (Tconv), qui utilisent un métabolisme de type anabolique sous le contrôle de mTOR, les Treg sont aujourd'hui considérés comme des cellules présentant un métabolisme de type catabolique favorisé par l'AMPK. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé des modèles murins de délétion conditionnelle permettant la délétion génique d'AMPK ou mTOR, spécifiquement dans les Treg. L'étude de ces souris a permis de mettre en évidence un rôle jusqu'ici insoupçonné de mTOR dans la stabilité et la migration des Treg ainsi qu'une implication de l'AMPK dans la capacité des Treg à inhiber la réponse anti-tumorale. Ces travaux remettent ainsi en question les considérations actuelles sur le métabolisme des Treg et ouvrent la voie vers une meilleure compréhension du métabolisme de ces cellules à l'homéostasie et en condition pathologique.

CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) are able to control the activity of the immune system and are essential to maintain immune tolerance. These cells are thus beneficial in autoimmune diseases while their anti-inflammatory action promotes tumor growth. Understanding Treg biology is therefore a major axis for the development of new therapeutic strategies applicable to these two types of pathologies. In this work we investigated Treg metabolism as information available to date are still controversial. In contrast to conventional T cells (Tconv), which use anabolic metabolism under the control of mTOR, Treg are today considered as catabolic cells with a metabolism favored by AMPK. In order to test this hypothesis, we used conditional knock out mice allowing gene deletion of AMPK or mTOR, specifically in Treg. The study of these mice highlights an unsuspected role of mTOR in the stability and migration of Treg as well as an involvement of AMPK in the ability of Treg to inhibit anti-tumor response. This work puts in question current considerations on Treg metabolism and opens the way towards a better understanding of the metabolism of these cells at homeostasis and in pathological context.