



HAL
open science

Étude du rôle de l'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 8$ par les lymphocytes T régulateurs dans la réponse anti-tumorale

Alexandra Lainé

► To cite this version:

Alexandra Lainé. Étude du rôle de l'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 8$ par les lymphocytes T régulateurs dans la réponse anti-tumorale. Immunologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1203 . tel-03510211

HAL Id: tel-03510211

<https://theses.hal.science/tel-03510211>

Submitted on 4 Jan 2022

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

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



N°d'ordre NNT: 2019LYS1203

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°340
(BMIC Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Immunologie
Discipline : Immuno-oncologie

Soutenue publiquement le 17/10/2019, par :
Alexandra LAINÉ

Etude du rôle de l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 8$ par les lymphocytes T régulateurs dans la réponse anti- tumorale

Devant le jury composé de :

NICOLAS Jean-François	PU-PH, HCL, Lyon-Sud	Président
LUCAS Sophie SALOMON Benoit	Professeure, deDuve Institute, UCLouvain DR, INSERM, CIMI Paris	Rapporteuse Rapporteur
PAIDASSI Helena NICOLAS Jean-François NUNES Jacques	CR, CNRS, CIRI Lyon PU-PH, HCL, Lyon-Sud DR, INSERM, CRCCM Marseille	Examinatrice Examineur Examineur
MARIE Julien	DR, INSERM, CRCL Lyon	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Parce qu'une thèse n'est pas seulement le travail de 3 ou 4 ans mais une succession d'étapes qui permettent d'y arriver. Un travail loin d'avoir été fait seul. J'ai donc beaucoup de personnes à remercier pour leur présence et leur soutien tout au long de ces années.

Merci au jury et aux membres du CST...

Tout d'abord merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au Docteur **Benoit Salomon** d'être rapporteur de ce travail. Merci pour vos conseils et votre temps. Merci au **Professeure Sophie Lucas** d'avoir également accepté d'être rapporteuse de ce travail. Merci au **Docteur Jean-François Nicolas** et au **Docteur Jacques Nunes** de faire partie de mon jury de thèse en qualité d'examineurs. Merci au Docteur **Helena Paidassi** de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer mon travail. Je vous remercie aussi pour votre aide et vos conseils lors des CST qui m'ont permis de perfectionner mon travail et surtout merci pour cette collaboration qui m'a permis d'utiliser les Tomato et de faire avancer mon projet.

Merci à **Bruno Lucas**. Pour les années passées à Cochin où tu m'as toujours traité avec beaucoup de considération mais surtout merci d'avoir fait partie de mon jury de CST, pour tous tes conseils et tes avis plus que pertinents et ton aide.

Merci au chef...

Julien, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe, de m'avoir fait confiance, et de m'avoir encadrée, même si parfois j'ai serré les dents, je me suis bien fait plaisir à mener ce projet que j'adore jusqu'au bout (ou presque). Merci pour l'autonomie que tu m'as laissé avoir et qui m'a permis de développer un regard critique sur mes expériences, une réflexion nécessaire à ce travail et d'évoluer scientifiquement. Merci pour les huîtres, le pâté, le gâteau à la pistache et les gambas. Merci aussi pour ton humour, je suis un public facile mais peu de gens connaissent cette facette de toi !!

Merci aux personnes de l'équipe...

Merci à **Saïdi**. Tu es un pilier dans ce laboratoire, tu nous aide énormément à tout niveau, tu es toujours disponible et ta bonne humeur est vraiment appréciable. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir aidé le jour où j'en ai eu le plus besoin, tu es vraiment une très belle personne et je te souhaite tout l'épanouissement possible. Merci pour cette présence les week-ends au labo, c'était moins compliqué ☺

Merci à **Olivier** pour ton humour décalé et tes blagues carambar, courage pour la dernière ligne droite, tu y es presque. **Ramdane**, je t'ai beaucoup disputé toutes ces années parce que tu laissais trop de bazar derrière toi mais merci de ta présence, de ton rire et de nous faire évader avec tes chants et tes tam-tam (même si parfois j'avais pas envie de les entendre). À **Sarah**, pour ces moments de partage culinaire, pour ta gentillesse et ton aide. À **Apos** pour cet esprit si différent qui nous a bien fait rire, je serai la « Commandante » à vie. À **Chloé**, pour ta joie australienne qui nous fait beaucoup de bien.

Merci à **Hector** pour ta gentillesse, ton calme et ta bonne humeur. Merci pour ton aide avec R, d'avoir essayé de m'apprendre quelque chose sur le codage et d'avoir toujours réussi à faire des analyses last-minute.

Merci à **Ossama** pour ton aide dans les dernières manips et pour ta patience à supporter une

thésarde en dernière année, stressée et débordée. Tu n'as jamais reculé devant le travail que je te proposai et je t'en suis reconnaissante. Bon courage pour ta thèse et si besoin de conseils techniques n'hésites pas.

Merci à **Nicolas**, pour ta bienveillance, ta gentillesse, ton écoute et ton énorme soutien. Tu es vraiment le Dr. Gastro le plus adorable et bravo pour toutes tes fabuleuses réussites dans la vie.

Je ne pouvais pas finir de remercier les personnes de l'équipe sans parler de **Violaine**, une personne aussi douce que gentille. Tu as été bien plus qu'une collègue, un énorme soutien pour moi. Merci pour ces moments que nous avons partagé, pour cette amitié, pour ton écoute, pour ton aide et pour avoir reçu le bouquet à ton mariage qui nous a valu une très belle photo.

Merci aux membres du CRCL....

Bien des gens ont fait partie de cette aventure de thèse au CRCL.

Merci aux plateformes. À **Christophe** pour ton humour et ta gentillesse envers moi (je te précise que je ne suis pas soupe au lait !!). À **Priscillia** pour ta dédication et ta présence, pour m'avoir sauvé plus d'une fois au trieur. À **Sophie** pour ton aide avec les tranches, pour ton efficacité et pour ta disponibilité. À **Bastien**, pour toute ta sympathie envers moi, à **Blandine**, **Maxime** et **Manon** pour tout ce que vous faites pour nous et votre GRANDE patience avec les JM.

Aux **Caux** pour être tous si adorables avec moi et de faire office de ravitaillement d'anticorps en cas de détresse. À **Yenkel**, merci pour tes conseils et je reviens pour m'occuper de tes plantes promis, et à **Guilhem**, pour ton calme et ta gentillesse dans ce labo, je n'ai pas encore fini de te faire découvrir tous les horizons musicaux et culinaires !! Bon courage pour ces années de thèse à venir.

Merci à **Maud** pour toutes les petites pâtisseries que tu m'as offert juste en échange d'un protocole ou d'un avis et bien sûr pour nos discussions autres que manips et FACS. Je vous souhaite à tous les 3 plein de bonheur.

Merci à **Amélien** pour ton humour et pour ces drôles moments passés à tourner la vidéo de Marion. Mais merci pour tes « faveurs mammaires » (injection de cellules pour ne pas que ce soit mal interprété☺), sans toi je n'y serai jamais arrivée.

Merci au cheney A 5^{ème} pour ces trois ans passés à vos côtés et qui ont rendu plus facile ce quotidien de thèse entre cafés, discussions et blagues. Comment parler du 5^{ème} sans parler de cet incroyable trio. **Adrien** et **Elodie** merci pour tout, vous êtes incroyablement adorables et de très belles personnes. Cette complicité entre nous trois nous a permis de passer de très bons moments ensemble, tout en sachant qu'on était là les uns pour les autres. Merci pour votre amitié. La soirée de la respiration du menthol et du lama restera à jamais gravée dans ma mémoire et je ne peux m'empêcher d'avoir des fous rires rien qu'en y pensant. Vous êtes géniaux.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cité et qui, sachez-le, ne sont pas oubliés.

Merci à **Edith** de m'avoir inclus dans cette collaboration, merci pour vos conseils, votre confiance et votre gentillesse envers moi. Merci pour votre considération.

À mes anciens labos....

Tout d'abord merci à **Marie-Claude** et **Sébastien** pour cette aventure trop cool à Québec. Vous m'avez bien poussé à continuer et voilà où j'en suis. Marie-Claude, une maman d'adoption dont je

suis fière d'avoir croisé le chemin. Merci pour tout et d'avoir aussi accueillie ma sœur à Québec.

Merci ensuite aux Donnapitiens. Avoir été à Cochin pendant 3 ans avec vous a été une expérience incroyable et enrichissante. C'était un peu comme une première thèse, je ne peux donc pas vous oublier dans ces remerciements. Merci pour votre présence encore aujourd'hui. Une grosse pensée pour **Georges, Clotilde, Marianne** et **Jérôme** pour les cafés avec vous et toutes ces discussions. Merci aussi à **Maxime, Jeanne, Nico** et **Laura** pour ces moments incroyables avec vous, c'était un jardin d'enfance scientifique entre Renée la taupe, les bombes carbo, les films de thèse, je ne sais même pas comment on a réussi à tous publier 😊

C'est aussi à Cochin que nous sommes devenues amies. **Karine** et **Emma** merci pour tout, pour ces nombreux mojitos, ces moments avec vous et ces rires.

Mais ces remerciements à l'équipe de Cochin ne peuvent se finir sans parler de **Céline**, ma Colette. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir appris tout ce que je sais aujourd'hui, surtout l'organisation. Je suis devenue maintenant presque aussi militaire que toi !!! J'ai adoré travaillé ces 3 ans avec toi. Tu m'as permis d'évoluer énormément en tant que petite chercheuse et notre synergie de travail était plus que parfaite, les 50 nuances de Foxo1 y sont pour quelque chose. Tu en es pour beaucoup de ce que je suis aujourd'hui professionnellement. Tu es une chef et une personne incroyable et je te remercie pour ta présence aujourd'hui et d'être devenue bien plus qu'une chef.

À mes amis....

On va commencer cette fois-ci dans l'ordre chronologique, ce qui implique une partie en portugais.

Rita, Tania e **Sara** obrigada suas « Conchas Malucas » por esta amizade que dura há quase 20 anos. Uma amizade que nada impede, nem a distância. Vocês sempre acreditaram em mim. Obrigada por todos estes momentos em Lyon, em Lisboa, em Rotterdam e em Mira por estas idas loucas à praia, estas saídas de bailaricos (porque « Na discoteca, o disco toca ») e tudo mais.

Ma dinde, ma **Lydie**. Merci pour ta présence, ton franc-parler, nos sorties, notre drôlerie, ces années de coloc où tu m'as supporté avec mes coutumes vestimentaires de pyjama assez innovantes mais qui nous a valu un « Wall of sentences » assez comique. Merci d'avoir toujours été présente et d'être comme tu es. Une amie géniale. Tu es une des survivantes des GH !!! La deuxième survivante c'est ma Maxi-moi. À **Perrine**, pour ta gentillesse, ton amitié et ton rire si drôle mais si communicatif. Merci de m'avoir choisie (avec Lydie) pour témoins de ton mariage. Promis maintenant je vais venir vous voir plus souvent, j'aurai le temps 😊

À ma framboise, mon **Aurore**. Cette amitié qui nous rend si paisibles, où tout est simple. Merci pour tous ces appels à se raconter nos vies, ils auraient pu être plus nombreux mais je savais qu'en cas de besoin il fallait juste appeler. Prépare le sans-fil, j'ai tout mon temps pour appeler maintenant !!!

À **Marie**, une TSF en tout point. Tout commence lorsqu'au DUT on se retrouve avec ces jeunes. De là on a créé un binôme plus qu'incroyable et je crois que je n'ai jamais autant rigolé dans ma vie que pendant ces 3 ans à la fac avec toi. Les TP de bioch avec cascades et arrosage de la salle, les cassages de certaines choses qui sont cachées quelque part, les fous rires en bactério. Merci pour tout ça. Merci pour ces années de coloc où nous avons évolué ensemble (tu sais que ça manque beaucoup,

beaucoup). Merci pour ce mariage, de m'avoir choisie comme demoiselle d'honneur. Merci pour ton amitié et toute cette compréhension mutuelle.

A mes copains du master pour ces moments ensemble : **Ludo, Sylvain, Pauline, Brice, Nelly, Julia**.

Je ne sais même pas où te caser **Marion**. On s'est rencontrés à Cochin puis nous nous sommes quittées. C'est alors qu'à mon premier jour au CRCL j'entends une petite voix criant « Alex », alors que je pensai être incognito. Et de là s'en sont suivis plusieurs entretiens non-professionnels autour de composés hydratants dont Joric et le Mr de l'Aromo en étaient les maîtres. Merci pour ta compagnie à tous ces concerts, gardons ce rituel !! C'était un plaisir de partager ces moments avec toi, merci pour le code « ROUGE », je n'en ai plus eu besoin mais savoir qu'il existait m'a énormément aidé. Merci pour ton positivisme et ta joie de vivre. Je crois que tu ne sais pas à quel point tu m'as aidé ces années.

Mon **Giacci**, Super Mario, Giacometti où je ne sais encore quel nom te donner ☺ Merci pour tout. Pour ta présence quasi quotidienne au cours de ces 4 ans, pour ta gentillesse envers moi (même si je me suis fait traiter de grosse Conne et de Stupida à peu près 340 fois par mois, mais avec ton accent c'était une douce mélodie), pour ces soirées ou week-ends au labo qui ont été moins difficiles avec toi et qui se suivaient, parfois, d'une sortie qui nous faisait du bien. Tu es un ami génial et une personne adorable.

À **MPG3**, merci de m'avoir accueillie et acceptée dans votre groupe (vous n'aviez sûrement pas le choix ☺). J'ai passé avec vous des soirées et des week-ends géniaux. Je vous dois des dîners je sais, mais maintenant je serai plus souvent dispo et prête à faire la fête. Un petit apparté pour les **MPG Girls** merci pour votre présence et pour ce week-end à Budapest (quelle nuit blanche !!!!!). Vous êtes toutes géniales.

Je ne pouvais pas finir de parler de MPG Girls sans avoir un petit paragraphe pour toi. À **Margaux**, pour ce coup de foudre amical qui nous a valu l'auto-proclamation des plus drôles du Sucre. Je cherche encore à savoir qui de nous deux est l'ange ou le diable (entre NS, le vin et le Porto, peut être sommes-nous toutes les deux le démon ☺). C'est vrai que notre première discussion aurait pu faire que ces 4 ans n'aient pas lieu. Mais nous y voilà et je te remercie de m'avoir aidé dans ces derniers mois. On a fait un binôme de choc et c'était génial de t'avoir à mes côtés. Tu m'as vraiment beaucoup aidé et apporté et je t'en suis reconnaissante. Bravo à nous et tu peux être bien fière de toi (PS : je ne suis pas contente de passer ma thèse une semaine après toi !!!!!).

À **Sonia** et **Alicia**, pour votre présence, gentillesse et pour les incroyables jeunes médecins que vous allez devenir.

À la famille....

À **Familia Encarnaçao**. Obrigada por todos os momentos que me lembro passados com vocês, uma segunda família. Mas não poderia deixar de pensar no Mario, um avô adotivo. Sempre me disseste que quando fosse doutora não te iria prestar mais atenção. Se estivesses presente, terias sido uma das primeiras pessoas que teria ido ver.

À minha família. Um pensamento especial para a minha bruxa de **Tia Xana**, querias sobrinhas

doutoras, aqui tens (a segunda hà de vir), e para o meu priminho querido, **Gonçalo**. Adoro-vos. Obrigada à **Tia Bela** pelas tuas palavras, pelo teu apoio e a tua presença. À minha **avozinha**, obrigada por estes momentos passados. Nem sempre foi facil mais adorei passar uns tempos contigo e com o avô. Obrigada pelas tuas palavras das poucas vezes que nos ligamos. Meu avôzinho, sempre me disseste para pôr os estudos em primeiro. Aqui tens a prova que te ouvi. Sei que se estivesses presente, terias muito orgulho mesmo se nunca o terias demonstrado.

Aux meilleurs pour la fin....

Aux deux femmes de ma vie. **Maman** merci pour tous les sacrifices que tu as fait pour que nous puissions avoir tout ce qu'il fallait et pour que nous puissions faire nos études (bon, évidemment on à toutes les deux choisis des parcours ~~un peu~~ long, donc parfois je me dit que fleuriste ça aurait été tout aussi bien ☺). Mais merci pour tout ton amour, ta dédication, ta présence et ton aide et pour nous élever ma sœur et moi. C'est vrai que tout n'a jamais été vraiment facile mais je pense qu'on s'en sort et qu'on continuera à s'en sortir. En tout cas, je te suis extrêmement reconnaissante et je ne te remercierai jamais assez pour tout. Grâce à toi, voilà où j'en suis (la petite arrive pas loin derrière). Je suis fière d'être ta fille et je t'aime ma petite maman. Ma petite sœur chérie, **Claudia**, pour tous ces moments avec toi (les duos de musique, tes premières sorties avec moi, nos bagarres et ta dureté à me faire apprendre mes cours qui m'ont aidé à avoir des bonnes notes, je précise, nos week-ends, etc etc), pour tous ces moments à venir (je sais je te dois encore un week-end Harry Potter, puis on le Costa Rica aussi). Je suis extrêmement fière d'être ta grande sœur. Tu es douce, généreuse, intelligente et extrêmement drôle (puis en plus t'es la plus belle des deux). Je te couve peut être trop mais c'est normal, un amour inconditionnel de sœurs. Merci de m'avoir toujours soutenue. Mon petit sac de patate qui est fait ma petite princesse. Les filles, vous êtes tout pour moi et je vous dédie cette thèse.

Vincent, je ne saurai comment te remercier de ta présence au cours de toutes ces années (ça commence à faire long dis donc !!). Merci de m'apporter autant d'écoute, de sérénité, de compréhension et de rires (parce que pas tout le monde connait ton potentiel mais le quotidien avec toi, c'est un cirque constant et toujours innovant dont je ne me lasse pas). Merci pour ton aide au cours de cette thèse, d'avoir accepté que je passe plus de temps au labo (avec Giacci) qu'à la maison et d'avoir supporté mes paniques et mes angoisses. Tu es une des plus belles personnes (même si je t'en veux pour les cordons bleu) que je connaisse et je suis extrêmement fière de tout ce que tu es, de tout ce que tu m'apportes et d'être à tes côtés. Je nous souhaite de rester ainsi, simplement heureux comme on sait si bien le faire, et pour longtemps car ta présence me rend plus qu'heureuse. Merci pour tout et merci d'être toi.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES ENCARTS	5
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE 1: Les lymphocytes T régulateurs F_{oxp3}⁺	11
I) Découverte et caractérisation des lymphocytes T régulateurs F_{oxp3}⁺.....	11
a) Découverte des cellules suppressives	11
b) Identification d'un marqueur spécifique des Tregs: F _{oxp3}	13
c) Double origine des LT régulateurs F _{oxp3} ⁺	15
d) Caractéristiques des Tregs humains et murins	17
II) Modifications épigénétiques du locus de F_{oxp3} et régulation transcriptionnelle du programme des Tregs	19
a) Les éléments régulateurs du locus F _{oxp3}	21
a) Le CNS0 de F _{oxp3}	21
b) Le promoteur de F _{oxp3}	21
c) Le CNS1 de F _{oxp3}	27
d) Le CNS2 de F _{oxp3}	29
e) Le CNS3 de F _{oxp3}	31
f) Régulation moléculaire du programme de différenciation des lymphocytes T régulateurs F _{oxp3} ⁺	33
III) Ontogénie des lymphocytes T régulateurs F_{oxp3}⁺	39
a) Les Tregs thymiques	39
- L'interaction entre le CMH des cellules présentatrices d'antigènes et le TCR des thymocytes	39
- Le rôle des cytokines dans le développement des tTregs	45
- Sortie des tTregs vers la périphérie	49
b) Les lymphocytes T régulateurs F _{oxp3} ⁺ générés en périphérie – les pTregs.....	51
- Mise en évidence de la génération des pTregs	51
- Rôle de la stimulation du TCR et de la co-stimulation dans le développement des pTregs .	51
.....	51
- Importance du TGF- β et de l'IL-2 dans le développement des pTregs	55
- Sites d'induction des pTregs.....	57
c) Les Tregs recirculants dans le thymus.....	59
d) Différence entre Tregs thymiques et Tregs périphériques	61
e) Plasticité et stabilité des Tregs	63
CHAPITRE 2: Synthèse, activation et fonction du TGF-β	67
I) Les trois isoformes du TGF-β : source et fonctions.....	67
II) La biosynthèse du TGF-β.....	71

a)	Structure et sécrétion.....	71
-	Le LTBP – gardien du TGF- β inactif dans la matrice extracellulaire	71
-	GARP – gardien du TGF- β inactif à la surface des cellules	73
III)	L'activation du TGF-β	75
a)	L'activation du TGF- β par des facteurs physico-chimiques.....	75
b)	L'activation protéolytique du TGF- β	77
-	L'activation du TGF- β par la Thrombospondine-1.....	77
-	L'activation du TGF- β par la Neuropilin-1	79
c)	L'activation du TGF- β par les intégrines.....	81
-	L'activation protéase-indépendante	85
-	L'activation protéase-dépendante	85
IV)	La signalisation du TGF-β	87
a)	Le récepteur au TGF- β	87
b)	Signalisation du TGF- β	87
c)	Régulation de la signalisation du TGF- β	89
V)	Fonctions du TGF-β sur les cellules du système immunitaire et le développement tumoral	91
a)	Rôle du TGF- β sur les lymphocytes T	91
b)	Rôle du TGF- β sur les NK	93
c)	Rôle du TGF- β sur les lymphocytes B	93
d)	Rôle du TGF- β sur les cellules myéloïdes	93
e)	Rôle du TGF- β sur les tumeurs	95
	CHAPITRE 3: Cancer et système immunitaire	97
I)	Concepts d'immunosurveillance et d'immuno-édition	97
a)	L'élimination des cellules transformées.....	97
b)	L'équilibre entre le système immunitaire et les cellules transformées	99
c)	L'échappement des cellules transformées au système immunitaire.....	99
-	Échappement passif	101
-	Échappement actif.....	101
II)	Recrutement, caractéristiques et fonctions des Tregs dans les tumeurs : des acteurs de la réponse anti-tumorale	103
a)	Origine des Tregs au sein des tumeurs : recrutement et conversion	103
-	Recrutement des Tregs par chimiotactisme.....	103
-	Conversion des LT CD4 ^{pos} en Tregs au sein des tumeurs et dans les ganglions drainants 107	
b)	Caractéristiques des Tregs tumoraux : origine et stabilité.....	109
-	Origine thymique des Tregs tumoraux.....	109
-	Stabilité des Tregs dans la tumeur	109
-	Survie des Tregs dans les tumeurs	111
c)	Fonctions suppressives des Tregs dans les tumeurs	113
-	La production de cytokines suppressives.....	113
-	La lyse cellulaire.....	115
-	La perturbation métabolique	115
-	L'expression de CD25 et la consommation en IL-2	115
-	La modulation de la maturation ou de la fonction des DC.....	117
-	Expression des récepteurs inhibiteurs	119

III) Autres acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale.....	123
a) Les MDSC.....	123
b) Les macrophages de type 2 :	125
c) Les DC tolérogènes.....	127
IV) Fonctions cytotoxiques et cytolytiques des Teffs et des NK, un mécanisme de réponse anti-tumorale.....	129
- La synapse cytotoxique	129
- Régulation des protéines impliquées dans l'établissement de la synapse cytotoxique .	131
- Rôle anti-tumoral des NK	133
- Rôle anti-tumoral des Th1 et des CD8.....	133
OBJECTIFS DE LA THÈSE	135
RÉSULTATS	139
Article 1: Itgβ8 ⁺ regulatory T cells promote cancer immune-escape by activating TGF-β produced in the tumor-microenvironnement	140
Article 2: Origin and phenotypical analysis of Itgβ8 ⁺ regulatory T cells.....	169
CONCLUSION.....	181
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	185
Publications issues de travaux collaboratifs.....	195
Présentation orales.....	197
BIBLIOGRAPHIE.....	199

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AIRE: AutoImmune REgulator	NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells
AP-1: c-Jun(Activator Protein-1)	NF-κB: Nuclear Factor/immunoglobulin κ-chain enhancer/B lymphocyte
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité	NK: Natural Killers
CNS: Conserved Non-coding Sequences	Nr4a: Nuclear receptor subfamily 4 group a
CPA: Cellules Présentatrices de l'Antigène	Nrp1: Neuropilin-1
CREB: Cyclic AMP Response Element-Binding protein	OVA: Ovalbumine
cSMAC: central SupraMolecular Activation Cluster	PD1: Programmed cell Death 1
cTEC: Cellules épithéliales corticales thymiques	pDC: DC plasmacytoïdes
CTL: Cytotoxic T Lymphocytes	périDC: DC périphériques
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4	préTregs: Précurseurs des Tregs
DC: Cellules Dendritiques	pSMAC: Peripheral supramolecular activation cluster
DEREG: Depletion of Regulatory T cell	PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
DP: Cellules doubles-positives CD4 ^{pos} CD8 ^{pos}	pTregs: Tregs périphériques
DNMT: DNA méthyltransférases	R-SMAD: SMAD associés aux récepteurs
DT: Diphteria Toxin	RA: Retinoic Acid
DTR: Diphteria Toxin Receptor	RAR/RXR: Retinoic Acid Receptor
Foxp3: Forkhead box protein-3	RALDH: Retinal dehydrogenases
Foxo: Forkhead box protein-O	RE: Réticulum endoplasmique
GARP: Glycoprotein A Repetition Predominant Protein	RER: Réticulum endoplasmique rugueux
GFP: Green Fluorescent Protein	ROS: Reactive Oxygen Species
GITR: Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene	RTE: Recent Thymic Emigrants
Gz: Granzyme	Runx1: Runt-related transcription factor 1
HAT: Histones AcétylTransférases	S1PR1: Sphingosin-1-Phosphatase Receptor 1
HDAC: Histones Déacétylases	Satb1: Special AT-rich sequence-Binding protein-1
I-SMAD: SMAD inhibitrices	SLC: Small Latent Complex
ICOS: Inducible T Cell Costimulator	SMAD: Sma [small mutants] and MAD [Mothers Against Decapentaplegic]
IDO: Indoleamine 2,3-DiOxygenase	STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
IFN-γ: Interféron gamma	TAM: Tumor-Associated Macrophages
IPEX: Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked syndrom	TCR: T-Cell Receptor
Itgβx: Intégrine αvβx	Tefts : Lymphocytes T effecteurs
iTregs: Tregs induits <i>in vitro</i>	Tet: Ten-eleven Translocation
Lag-3: Lymphocyte Activation Gene-3	TGF-β: Transforming Growth Factor Beta
LAMP: Lysosome-associated membrane proteins	TGF-βRI ou RII: récepteur I ou II au TGF-β
LAP: Latency-Associated Peptide	thyDC: DC thymiques
LB: Lymphocytes B	TIGIT: T-cell Ig and ITIM domain
LLC: Large Latent Complex	Tim-3: T-cell immunoglobulin and mucin domain-3
LT: Lymphocytes T	TNF-α: Tumor Necrosis Factor α
LTBP: Latent TGF-β Binding Protein	tolDC: DC tolérogènes
MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells	Tregs: Lymphocytes T régulateurs
MEC: Matrice extracellulaire	TSDR: Treg-Specific Demethylated Region
MMP: Métalloprotéinases	TSP-1: Thrombospondine 1
MP: Macrophages	TSS: Transcription Starting Site
mTEC: Cellules épithéliales médullaires thymiques	tTregs: Tregs thymiques
	VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Schéma de la localisation et de l'organisation du gène codant pour *Foxp3* et organisation de la protéine
- Figure 2:** Régulation épigénétique de l'expression des gènes
- Figure 3:** Organisation génique et régions régulatrices du locus de *Foxp3*
- Figure 4:** Régulation du CNS0 et des sites de liaison de Satb1
- Figure 5:** Partenaires moléculaires qui régulent l'activité du promoteur de *Foxp3*
- Figure 6:** Représentation schématique de l'enhancéosome formé dans les Tregs
- Figure 7:** Modifications épigénétiques du promoteur de *Foxp3* dans les Tregs
- Figure 8:** Partenaires moléculaires qui régulent l'activité du CNS1 de *Foxp3*
- Figure 9:** Modifications épigénétiques du CNS1 de *Foxp3* dans les Tregs
- Figure 10:** Partenaires moléculaires qui régulent l'activité du CNS2 de *Foxp3*
- Figure 11:** Modifications épigénétiques du CNS2 de *Foxp3* dans les Tregs
- Figure 12:** Partenaires moléculaires qui régulent l'activité du CNS3 de *Foxp3*
- Figure 13:** Modifications épigénétiques du CNS3 de *Foxp3* dans les Tregs
- Figure 14:** Synthèse des partenaires moléculaires qui régulent l'activité du locus de *Foxp3*
- Figure 15:** Ontogénie des lymphocytes T dans le thymus
- Figure 16:** Modèle de différenciation des tTregs
- Figure 17:** Voies de signalisation induites par l'activation des Tregs
- Figure 18:** Les récepteurs à l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15
- Figure 19:** Développement des Tregs en périphérie
- Figure 20:** Différenciation et suppression des LT CD4^{pos} effecteurs par les Tregs
- Figure 21:** Synthèse et sécrétion du TGF- β
- Figure 22:** Liaison de GARP au TGF- β latent à la surface cellulaire
- Figure 23:** Activation protéase-indépendante du TGF- β
- Figure 24:** Activation protéase-dépendante du TGF- β
- Figure 25:** Signalisation du TGF- β
- Figure 26:** Rôle du TGF- β sur les cellules du système immunitaire
- Figure 27:** Les trois étapes de l'immuno-édition tumorale
- Figure 28:** Origine des Tregs au sein des tumeurs
- Figure 29 :** Ligands et récepteurs aux chimiokines exprimées par les Tregs permettant leur recrutement au sein des tumeurs
- Figure 30:** Mécanismes suppressifs des Tregs
- Figure 31:** Interactions immunitaires impliquant les CPA ou les cellules tumorales et les cellules T
- Figure 32:** Propriétés immunosuppressives et pro-tumorales des MDSC et leur interaction avec les Tregs
- Figure 33:** Propriétés des TAM sur la réponse tumorale et leur interaction avec les Tregs
- Figure 34:** Propriétés des DC sur la réponse tumorale et leur interaction avec les Tregs
- Figure 35:** Schématisation de la structure de la synapse cytotoxique
- Figure 36:** Synapse cytotoxique entre les CTL ou les NK et les cellules tumorales
- Figure 37:** Propriétés des NK sur la réponse tumorale
- Figure 38:** Schéma récapitulatif des objectifs de thèse
- Figure 39:** Schéma conclusif : Les Tregs Itg β 8^{pos} favorisent l'échappement tumoral au système immunitaire en activant le TGF- β produit dans le micro-environnement tumoral

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux marqueurs exprimés par les Tregs humains et murins

LISTE DES ENCARTS

Encart 1: Ontogénie des lymphocytes T : de la moelle osseuse au thymus

Encart 2: La biologie des intégrines

AVANT-PROPOS

Outre les facteurs intrinsèques propres à chaque type de tumeurs, la progression tumorale est également conditionnée par différents facteurs extrinsèques. Ces facteurs, fournis par le micro-environnement tumoral, empêchent l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Les sites de développement tumoral faiblement immunogéniques tels que le cerveau, les testicules, ou la chambre oculaire, favorisent la progression des cancers. L'accessibilité des cellules du système immunitaire aux cellules tumorales notamment par la composition de la matrice extracellulaire, la vascularisation ou la densité tumorale, favorisent la progression de la tumeur solide et donc son échappement au système immunitaire. Enfin, la nature même de l'infiltrat immunitaire et les cytokines présentes dans le micro-environnement tumoral impactent considérablement sa progression. Ainsi, la présence de cellules lymphocytaires T (LT) qui expriment le facteur de transcription Forkhead box P3 (Foxp3), dites Tregs, est associée à un très mauvais pronostic dans de nombreuses tumeurs. Le Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), une cytokine hautement immunosuppressive, bloque la réponse anti-tumorale mise en place par les LT effecteurs (Teffs) conduisant au maintien de la tumeur. La particularité du TGF- β réside dans le fait qu'il est sécrété sous sa forme inactive. Ainsi, comprendre comment le TGF- β est activé dans le micro-environnement tumoral est une étape majeure vers l'amélioration des connaissances sur l'échappement des tumeurs au contrôle du système immunitaire.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes moléculaire et cellulaire conduisant à l'activation du TGF- β dans les tumeurs. Au moyen de modèles de souris (mélanome et adénocarcinome mammaire), de tumeurs fraîches humaines et d'analyse de single-cell RNA-seq, j'ai pu démontrer que les Tregs, par l'expression de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ (Itg β8) à leur surface, activent le TGF- β du micro-environnement tumoral. Cette activation réprime l'activité cytotoxique des LT CD8^{pos} et favorise le développement des tumeurs.

Dans ce manuscrit, je présenterai la biologie des Tregs, de leur origine à leur régulation ; je parlerai ensuite de la synthèse, de l'activation du TGF- β en me focalisant sur le rôle de l'Itg β8 et des fonctions du TGF- β sur le système immunitaire et les tumeurs ; je décrirai ensuite le lien entre le système immunitaire et le cancer en mettant en avant le rôle des Tregs et du TGF- β ; je finirai en exposant mes travaux de thèse démontrant l'importance de l'Itg β8 à la surface des Tregs dans l'activation du TGF- β au sein de la tumeur, ainsi qu'une étude sur la biologie des Tregs Itg β8 ^{pos}.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1: Les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺

I) Découverte et caractérisation des lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺

a) Découverte des cellules suppressives

Dans les années 70, des expériences réalisées par un groupe japonais chez la souris démontrent que la reconstitution de la moelle osseuse de souris suite à une irradiation affecte leur tolérance à une immunisation induite par des globules rouge de mouton, si et seulement si les animaux sont thymectomisés avant l'irradiation (**Gershon and Kondo 1970**). Il a ensuite été mis en évidence que des thymocytes ont un pouvoir suppresseur sur des splénocytes (**Gershon and Kondo 1971**). En 1985, Shimon Sakaguchi, démontre que la population cellulaire CD4^{pos}Lyt-1^{pos} est essentielle pour prévenir le développement de nombreuses pathologies auto-immunes induites suite au transfert de lymphocytes T (LT) dans des souris Nude, dépourvues de thymus (**Sakaguchi et al. 1985**). Ces résultats ont permis d'associer un premier marqueur à ces cellules suppressives. Dans les années 90, des expériences de co-transfert montrent que les cellules CD4^{pos}CD45RB^{low} préviennent de l'apparition d'une colite auto-immune induite par les cellules CD4^{pos}CD45RB^{high} dans des rats athymiques (**Powrie and Mason 1990**). Si la notion de cellules T régulatrices était plus ou moins acceptée, l'identification d'un marqueur plus restreint pour ces cellules va favoriser l'émergence du concept de cellules T suppressives. En 1995, Sakaguchi *et al.* démontre que le simple transfert de cellules CD4^{pos}CD25^{pos}, qui n'expriment pas CD45RB mais qui expriment Lyt-1, prévient de l'auto-immunité systémique induite par les cellules CD4^{pos}CD25^{neg} (**Sakaguchi et al. 1995**). L'injection de cellules T CD4^{pos}CD25^{pos}, suite à une thymectomie néonatale à jour 3, prévient le développement de pathologies auto-immunes, confirmant le rôle suppresseur de ces cellules (**Asano 1996**). Enfin, en 1999, leur capacité à contrôler la prolifération des LT CD25^{neg} *in vitro* est démontrée et leur origine thymique validée, toutefois sans exclure une origine périphérique (**Itoh et al. 1999**). CD25, chaîne α du récepteur à l'interleukine(IL)-2, a donc constitué un marqueur de ces cellules dites régulatrices, appelées lymphocytes T régulateurs (Tregs). Cependant, l'expression de CD25 n'étant pas restreinte aux Tregs mais également retrouvé exprimé par les cellules T effectrices (Teffs) activées CD4 et CD8, de nombreux groupes ont recherché un marqueur plus spécifique des Tregs.

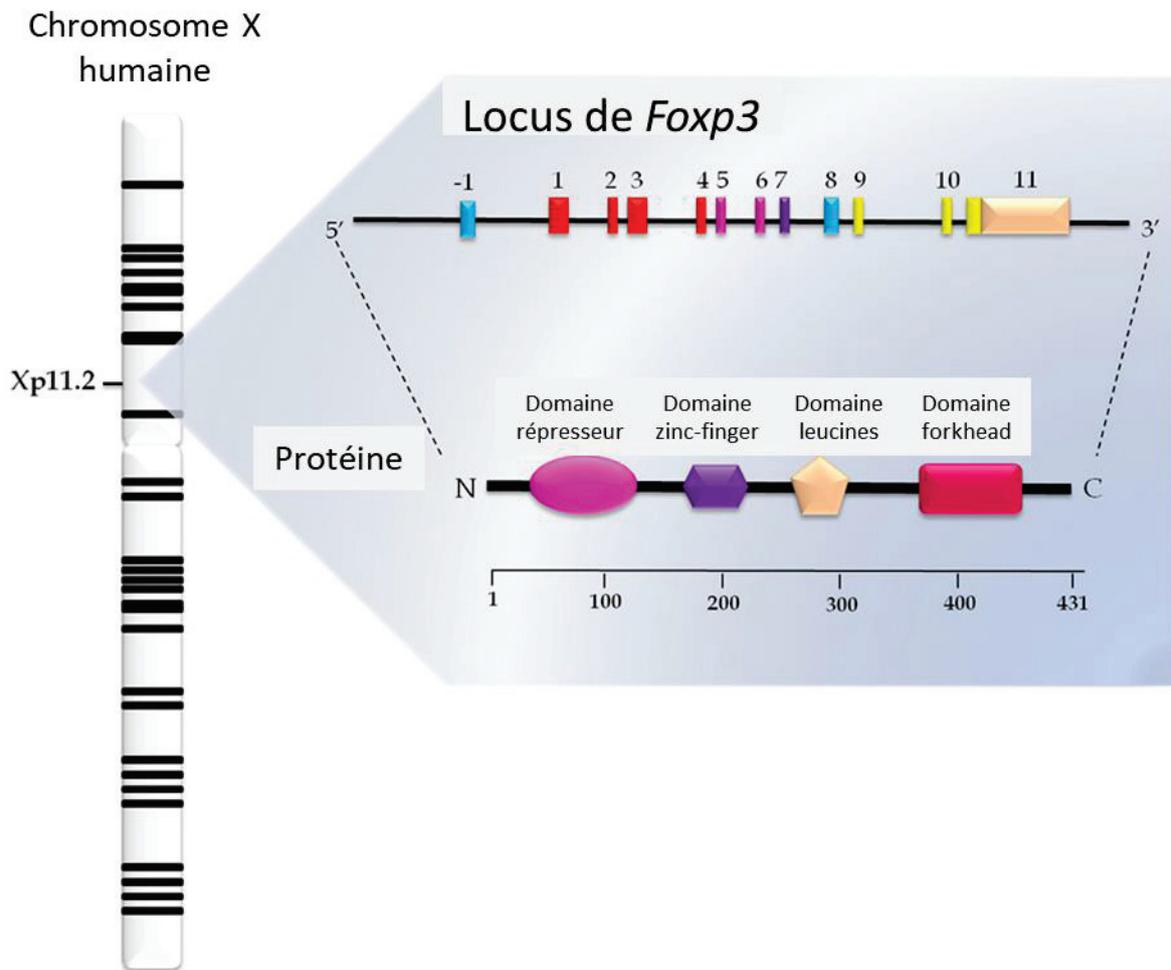


Figure 1: Schéma de la localisation et de l'organisation du gène codant pour *Foxp3* et organisation de la protéine.

Chez l'Homme, le locus de *Foxp3* se situe sur le chromosome X (Xp11.2) ainsi que chez la souris (X A1.1 ; X 3.41cM). Le gène humain possède une région non traduite, l'exon -1, alors que la souris possède 3 de ces régions : les exons -2b, -2a et -1 (non schématisées ici). Le gène est également composé de 11 exons traduits qui codent pour la protéine *Foxp3* caractérisée par un poids moléculaire de 47kDa et formée par 431 acide-aminés. *Foxp3* est un facteur de transcription de la famille Forkhead-box/winged-helix nommé ainsi car la structure secondaire de la protéine ressemble à des ailes. La protéine est formée de trois hélices α et de trois feuillets β . La région N-terminale est responsable de l'activation et de la répression des gènes (domaine répresseur), vient ensuite un domaine en doigts de zinc (zinc-finger) et un domaine glissière riche en leucines qui permet la dimérisation de la protéine. Dans la région C-terminale se trouve le domaine Forkhead qui permet la liaison de *Foxp3* à l'ADN.

(Adaptée de: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00605/full>).

b) Identification d'un marqueur spécifique des Tregs: Foxp3

Porté par le chromosome X le gène *FOXP3*, appelé anciennement *SCURFIN*, code pour un facteur de transcription de 431 acide-aminés de la famille Forkhead-box/winged-helix appelé Forkhead box protein 3 (Foxp3) (**Figure1**). Chez l'Homme, plusieurs mutations sur le gène *FOXP3* ont été associées au développement d'une maladie auto-immune lymphoproliférative sévère liée à l'X: Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked syndrom (IPEX) (**Bennett et al. 2001**). Chez la souris Scurfy, dont le gène codant pour *Foxp3* est muté, on observe le développement d'un syndrome auto-immun similaire à ce qui est observé chez l'Homme avec une prolifération exacerbée des LT CD4^{pos}, une infiltration immunitaire massive dans divers organes et une forte augmentation du taux de cytokines sécrétées (**Brunkow et al. 2001; Wildin et al. 2001**).

C'est alors en 2003 que Foxp3 est défini comme un marqueur spécifique des Tregs CD4^{pos}CD25^{pos} chez la souris (**Hori et al. 2003; Fontenot et al. 2003; Khattri et al. 2003**). Une expression ectopique de Foxp3 dans des LT naïfs ou dans des LT CD4^{pos}CD25^{pos}Foxp3^{neg}, leur permet d'acquérir des capacités suppressives et l'injection de cellules CD4^{pos}CD25^{pos} dans des souris Scurfy prévient le développement d'un syndrome auto-immun (**Hori et al. 2003; Fontenot et al. 2003**). Le développement d'une auto-immunité, similaire aux souris Scurfy, dans les souris dont uniquement les LT sont déficients pour *Foxp3* (CD4^{Cre}Foxp3^{fl/fl}), confirme l'importance de ce facteur de transcription dans les cellules T et dans le contrôle de la réponse immunitaire (**Fontenot et al. 2005c; Lin et al. 2007**). La création de souris transgéniques dont la protéine verte fluorescente (GFP – Green Fluorescent Protein) est exprimée sous le contrôle du promoteur codant pour *Foxp3* (Foxp3^{GFP}) a permis d'approfondir les connaissances sur les Tregs et notamment de suivre leur développement thymique et de détecter leur apparition à l'âge de 2,5 jours (**Fontenot et al. 2005a**), en accord avec les travaux d'Asano *et al.* sur les cellules CD4^{pos}CD25^{pos} (**Asano 1996**).

Dans le but de valider le rôle intrinsèque de *Foxp3* dans les Tregs, les équipes de T. Sparwasser et d'A. Rudensky ont généré des souris Dereg (Depletion of Regulatory T cell). Dans ces souris, le récepteur humain à la toxine diphtérique (DTR – Diphtheria Toxin Receptor) est sous le contrôle du promoteur de *Foxp3* qui sera délété par administration de la toxine diphtérique (DT – Diphtheria Toxin). Si l'équipe de T. Sparwasser démontre que seule la délétion de *Foxp3* dans les souris Dereg, chez le nouveau-né, conduit au développement de pathologies auto-immunes ; l'équipe d'A. Rudensky démontre que la délétion chez le

nouveau-né ainsi que chez l'adulte provoquent un phénotype dommageable (**Lahl et al. 2007; Kim et al. 2007**). Ce désaccord peut être expliqué, entre autres, par l'utilisation de deux constructions géniques différentes, rendant aux animaux une susceptibilité différente des cellules des nouveau-nés et des adultes à une déplétion complète.

Il est important de souligner que d'autres populations cellulaires peuvent être impactées par la délétion de *Foxp3*. Les cellules de l'épithélium thymique ou les cellules dendritiques (DC) expriment aussi ce gène. Toutefois, sa délétion, dans ces cellules, n'impacte pas l'homéostasie immunitaire ni le développement ou la fonction des Tregs (**Liston et al. 2007; Kim et al. 2009; Josefowicz et al. 2012a**). Chez l'Homme, des LT activés expriment également *Foxp3*. Mais cette expression, transitoire et néanmoins plus faible que dans les Tregs, ne leur confère pas de propriétés suppressives (**Allan et al. 2007; Tran et al. 2007**).

c) Double origine des LT régulateurs Foxp3⁺

Selon le lieu où le programme de différenciation des Tregs est acquis, ces cellules sont classées en deux sous-populations: les Tregs différenciés dans le thymus, appelés Tregs thymiques (tTregs); et les pTregs différenciés en périphérie à partir de LT CD4^{pos}, appelés Tregs périphériques (pTregs). Il est à noter que les Tregs induits *in vitro* à partir de LT CD4^{pos} naïfs, suite à une stimulation du TCR par des anticorps anti-CD3/28 ou la présence de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et en présence d'IL-2 et de la cytokine Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), sont appelés Tregs induits (iTregs) (**Abbas et al. 2013**).

Marqueur	Fonction	Commentaire	Références
CD25	Chaîne α du récepteur à l'IL-2, codé par <i>il2ra</i>	Exprimé de manière constitutive par les Tregs. Retrouvés exprimés par les Teffs, en moindre intensité.	(Sakaguchi et al. 1995; Baecher-Allan et al. 2001; Ng et al. 2001)
CTLA-4	Récepteur de co-stimulation de la famille CD28 (ligand: CD80/86)	Impliqué dans les fonctions suppressives des Tregs. Expression induite après activation des Teffs.	(Takahashi et al. 2000; Wing et al. 2008)
GITR	Récepteur de co-stimulation de la famille des TNF récepteurs (ligand: GITR-L)	Exprimé constitutivement par les Tregs. Retrouvé sur les Teffs activés. Les fonctions des Tregs ne sont pas associées à son expression.	(McHugh et al. 2002; Shimizu et al. 2002; Liao et al. 2012)
Lag-3	Homologue de CD4, interagit avec le CMHII des CPA	Associé à l'activation des Tregs, il contribue à leurs fonctions. Toutes les cellules T l'expriment après activation.	(Workman et al. 2002; Huang et al. 2004; Camisaschi et al. 2010)
PD-1	Protéine transmembranaire de la famille des immunoglobulines (ligand: PD-L1/L2)	Associé aux fonctions suppressives des Tregs chez l'Homme et la souris.	(Raimondi et al. 2006; Francisco et al. 2009; Park et al. 2015)
LAP	TGF- β latent exprimé à la membrane cellulaire	Il est présent à la surface des Tregs activés et participe aux fonctions suppressives des Tregs en libérant le TGF- β actif.	(Tran et al. 2009a; D'Ambrosio et al. 2016)
ICOS	Récepteur de co-stimulation de la famille CD28 (ligand: ICOS-L)	Associé aux fonctions suppressives des Tregs chez l'Homme et la souris.	(Burmeister et al. 2008; Ito et al. 2008; Vocanson et al. 2010; Redpath et al. 2013)
TNFR2	Récepteur de type 2 au TNF	Associé aux fonctions suppressives des Tregs chez la souris.	(van Mierlo et al. 2008; Chen et al. 2008)
GARP	Protéine transmembranaire présentant le TGF- β latent	Exprimé par les Tregs activés, contribue à leurs fonctions suppressives.	(Tran et al. 2009b; Wang et al. 2009; Stockis et al. 2009)
CD127	Récepteur à l'IL-7	Chez l'Homme, les Tregs expriment faiblement CD127 mais quelques Teffs aussi. Chez la souris, ils peuvent surexprimer CD127 après activation.	(Hartigan-O'Connor et al. 2007; Simonetta et al. 2010)
Foxp3	Facteur de transcription	Le plus spécifique des marqueurs des Tregs. Retrouvé aussi sur des Teffs humains activés mais ne leur confère pas de phénotype suppresseur.	(Bennett et al. 2001; Brunkow et al. 2001; Fontenot et al. 2005c; Allan et al. 2007)

Tableau 1: Principaux marqueurs exprimés par les Tregs humains et murins.

d) Caractéristiques des Tregs humains et murins

Les Tregs ont un rôle majeur dans le contrôle des réponses immunitaires et par conséquent dans l'homéostasie et l'immunité anti-tumorale, étant associé à un mauvais pronostic lorsqu'ils sont présents dans les tumeurs (**Cools et al. 2007; Sakaguchi et al. 2008; Sharma and Rudra 2018**). Les Tregs sont caractérisés par l'expression de Foxp3 ainsi que par divers marqueurs exprimés à leur surface dont une liste non exhaustive se trouve dans le tableau ci-contre (**Tableau 1**). Les fonctions de certains de ces marqueurs seront davantage détaillées au cours de ce manuscrit.

Dans les années 90, l'expression de CD25 était associée à des cellules CD4^{pos} suppressives chez l'Homme (**Ng et al. 2001**). Mais la découverte que les Tregs peuvent également l'exprimer suite à l'activation, bien qu'en moindre quantité par rapport aux Tregs, rend son utilisation difficile. La découverte de Foxp3 a permis de mettre en évidence que dans le sang, 1 à 10% des LT CD4^{pos} sont des Tregs qui expriment Foxp3. Néanmoins, Foxp3 pouvant être exprimé par des Tregs activés, il ne peut être considéré comme un marqueur spécifique des Tregs (**Allan et al. 2007; Tran et al. 2007**). En 2006, deux études proposent l'utilisation de CD127, récepteur à l'IL-7, qui n'est pas exprimé par les Tregs contrairement aux Tregs (**Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006; Yu et al. 2012**). Ainsi, chez l'Homme, les Tregs sont identifiés en utilisant les marqueurs CD3, CD4, CD127, CD25 et Foxp3.

Chez la souris, les Tregs Foxp3^{pos} représentent 5 à 20% de la population de LT CD4^{pos} en périphérie et en conditions non pathologiques (**Sakaguchi 2005, observation personnelle**). L'utilisation du marqueur CD127 pour les Tregs murins a également été suggérée mais son expression est retrouvée sur une population de Tregs CD103^{pos}ICOS^{pos} (**Simonetta et al. 2010**). Les Tregs murins sont aujourd'hui identifiés en utilisant les marqueurs CD3, CD4, CD25 et Foxp3 qui est, chez la souris, un marqueur spécifique des Tregs.

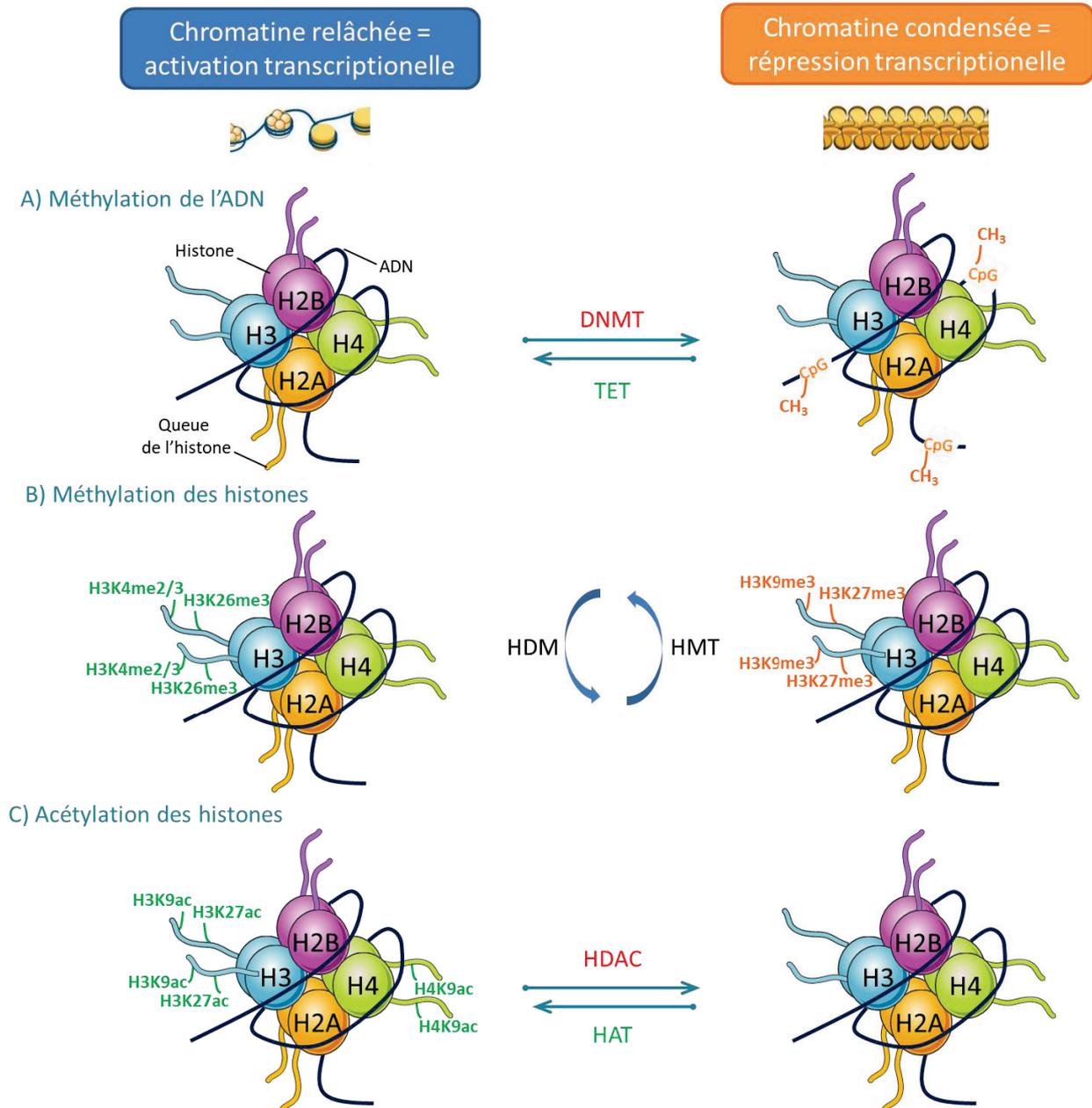


Figure 2: Régulation épigénétique de l'expression des gènes.

Les mécanismes de régulation épigénétique telle la méthylation de l'ADN, la méthylation et l'acétylation des histones, sont héréditaires. L'expression d'un gène dépend de cette régulation et de la forme de la chromatine. Une forme relâchée permet l'accès aux facteurs qui régulent le gène. **(A)** L'ajout de groupements méthyl (CH_3) sur la cytosine d'une séquence dinucléotidique de type CpG par les DNMT favorise la condensation de la chromatine et empêche la transcription du gène. À l'inverse, les enzymes TET déméthylent l'ADN. **(B)** Deux enzymes, HMT et HDM, modifient les sites méthylés des histones. La méthylation des lysines 4 et 26 d'H3 (H3K4-26me3) est associée à l'expression du gène alors qu' H3K9-27me3 à sa répression. **(C)** L'acétylation des lysines 9 et 27 d'H3 (H3K9-27ac) et d' H4K9ac par les enzymes HAT participe à l'activation transcriptionnelle du gène, la déacétylation par HDAC la réprime.

DNMT: DNA methyltransferases; H: histones; HAT: histones acetyltransferases; HDAC: histones déacétylases; HDM: histone demethylases; HMT: histone methyltransferases; TET: Ten-eleven translocation.

II) Modifications épigénétiques du locus de *Foxp3* et régulation transcriptionnelle du programme des Tregs

De par son importance dans le développement des Tregs, la compréhension des mécanismes régulant l'expression de *Foxp3* à susciter l'engouement de nombreux laboratoires. L'analyse du locus de *Foxp3* a permis de montrer que l'expression du gène est majoritairement régulée par la liaison de facteurs de transcription mais également par des modifications épigénétiques (**Figure 2**).

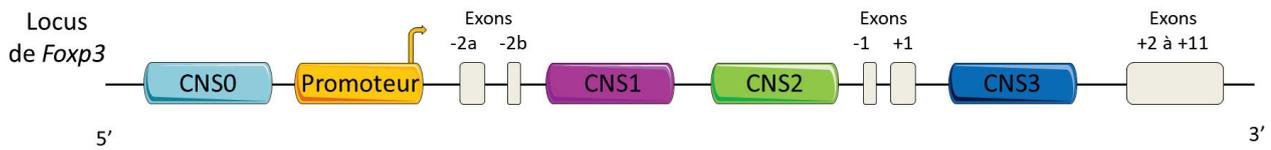


Figure 3: Organisation génique et régions régulatrices du locus de *Foxp3*.

Le gène *Foxp3* a une taille approximative de 15,5kb et comporte 14 exons dont les 3 premiers ne sont pas traduits (-2a, -2b et -1). L'expression de *Foxp3* est régulée par le promoteur et par 4 régions non-codantes hautement conservées : les CNS 0, 1, 2 et 3. Chacune de ces régions contient des sites de fixation spécifiques pour divers facteurs de transcription qui permettront l'activation ou la répression transcriptionnelle du gène. Le promoteur et les CNS sont également régulés par de nombreux mécanismes épigénétiques. Ensemble, ils permettent d'induire l'expression du gène *Foxp3* et donc la formation de la protéine Foxp3 codée par les exons +1 à +11.

CNS: Conserved Non-coding Sequences.

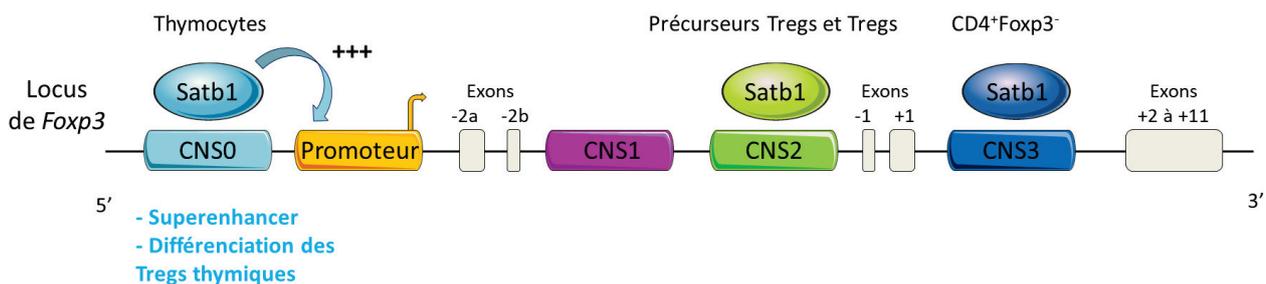


Figure 4: Régulation du CNS0 et des sites de liaison de Satb1.

Satb1, un organisateur génomique, se fixe au CNS0 dans les thymocytes DP (double-positifs $CD4^+CD8^+$), avant que *Foxp3* ne soit exprimé. Dans les LT $CD4^{pos}Foxp3^{neg}$ du thymus, Satb1 se lie au CNS3 et participe à l'induction de l'expression de *Foxp3*. Lors du développement des Tregs dans le thymus, Satb1 se trouve au niveau du CNS2 dans les précurseurs de Tregs et les Tregs où il permettra une induction stable de *Foxp3*.

Satb1: Special AT-rich sequence-binding protein-1

a) Les éléments régulateurs du locus *Foxp3*

Les gènes humain et murin codant pour *Foxp3* ont une taille avoisinant les 15,5kpb et comportent 11 exons traduits (+1 à +11) qui forment la protéine Foxp3 (**Figure 1**). Chez la souris, 3 exons ne sont pas traduits et se trouvent en amont des 11 premiers : -2a, -2b et -1, alors que chez l'Homme seul l'exon -1 est présent (**Brunkow et al. 2001; Wildin et al. 2001**). Des études comparatives des génomes de plusieurs espèces ont montré une forte homologie des séquences ainsi que 4 régions non-codantes hautement conservées, les CNS (Conserved Non-coding Sequences) (**Brunkow et al. 2001; Wildin et al. 2001**). Ces séquences consistent en un promoteur ; deux enhancers positionnés après les deux premiers exons du gène, les CNS1 et 2 ; un enhancer intronique situé après l'exon +1, le CNS3 ; et découvert plus récemment, un enhancer en amont du promoteur, le CNS0 (**Mantel et al. 2006; Zorn et al. 2006; Kim and Leonard 2007; Zheng et al. 2010; Kitagawa et al. 2017**) (**Figure 3**).

a) Le CNS0 de *Foxp3*

En 2017, Kitagawa *et al.* publient une étude où, par la méthode ChIP-Seq, ils ont analysé les régions modifiées H3K27ac, H3K27me3 et H3K4me1 du locus de *Foxp3* afin de mettre en évidence celles impliquées dans le développement des Tregs, avant l'expression de *Foxp3*. Ils ont ainsi découvert le CNS0 qui se trouve au niveau d'un intron proche de la région 5' du locus du gène *Foxp3* (**Kitagawa et al. 2017**) (**Figure 4**). Ils ont démontré que la protéine Special AT-rich sequence-Binding protein-1 (Satb1), un organisateur génomique, se lie au CNS0 dans les LT doubles-positifs CD4^{pos}CD8^{pos} (DP) dans le thymus, avant l'expression de *Foxp3*, favorisant l'activation du promoteur. Ce profil d'expression laisse donc à supposer que le CNS0 et Satb1 seraient impliqués dans le développement des tTregs. Satb1 se lie ensuite au CNS3, un élément pionnier dans l'induction de l'expression de *Foxp3*, dans les LT CD4^{pos}Foxp3^{neg} puis au CNS2 dans les précurseurs des Tregs (préTregs) et dans les tTregs (**Figure 4**).

b) Le promoteur de *Foxp3*

Le promoteur de *Foxp3*, se trouvant environ 500pb en amont du site d'initiation de la transcription (TSS – Transcription Starting Site), a une faible activité transcriptionnelle (**Mantel et al. 2006; Kim and Leonard 2007; Tone et al. 2008; Polansky et al. 2010**) (**Figure 5**). L'expression de *Foxp3* dépend donc plus fortement des quatre CNS. Néanmoins, il est régulé par divers facteurs de transcription ainsi que par la méthylation d'îlots CpG.

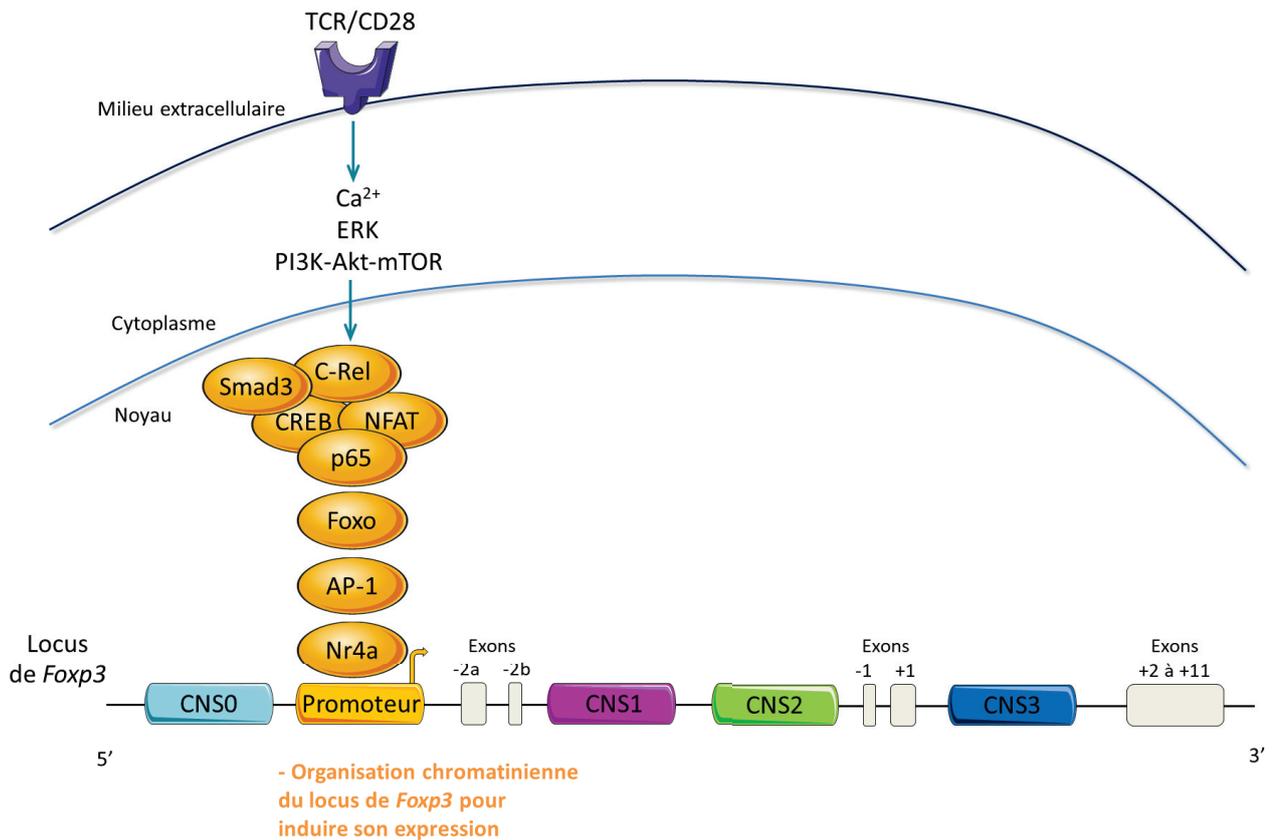


Figure 5: Partenaires moléculaires qui régulent l'activité du promoteur de *Foxp3*.

Suite à l'activation du TCR et à la co-stimulation, les voies de signalisation sous-jacentes sont activées. Elles permettent la liaison de facteurs de transcription au promoteur de *Foxp3* et participent à la formation d'un enhancéosome (Figure 6). Ces molécules induisent l'activité transcriptionnelle du promoteur.

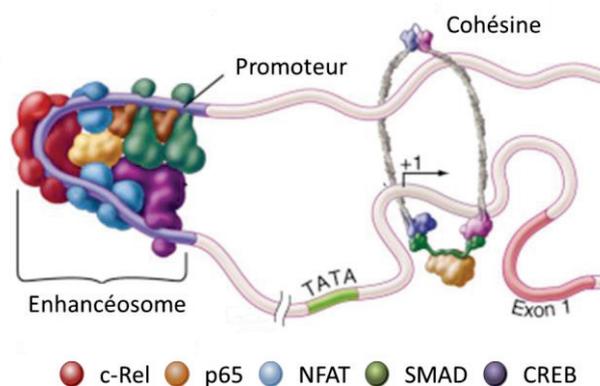


Figure 6: Représentation schématique de l'enhancéosome formé dans les Tregs.

L'enhancéosome est un complexe multi-protéique qui permet la formation d'une boucle chromatinienne maintenue par la cohésine. Cette boucle favorise le rapprochement de régions régulatrices de l'expression du gène et facilite ainsi son activation transcriptionnelle.

(Adaptée de: <https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/enhanceosome>)

L'activité du promoteur de *Foxp3* peut être induite *in vitro* en mimant une stimulation du récepteur aux LT (TCR, T-Cell Receptor) par l'ajout de PMA/Ionomycine ou d'anticorps anti-CD3/28 **(Mantel et al. 2006; Kim and Leonard 2007)**. La présence de séquences type TATA box, CAAT box et GC box permet la fixation du Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) et du c-Jun(Activator Protein-1) (AP-1) mais également du Nuclear receptor subfamily 4 group a (Nr4a) ou Nur77, fortement exprimé par les Tregs, au niveau du promoteur de *Foxp3* **(Mantel et al. 2006; Kim and Leonard 2007; Sekiya et al. 2011) (Figure 5)**.

L'activation du TCR induit aussi l'expression de c-Rel, membre de la famille du Nuclear Factor/immunoglobulin κ -chain enhancer/B lymphocyte (NF- κ B), qui se fixe au promoteur de *Foxp3* et permet la formation d'un enhancéosome formé par un complexe de facteurs de transcription composé de c-Rel/p65/NFAT/SMAD/CREB, dont certains se trouvent déjà liés au CNS2, permettant l'activation du promoteur **(Ruan et al. 2009) (Figure 6)**. De plus, l'activation de la voie NF- κ B induit la dégradation d'I κ B α/β qui permet la translocation nucléaire de p50 (NF- κ B1), lié à c-Rel ou à p65 (RelA). L'importance de cette voie dans l'induction de l'expression de *Foxp3* a été validée chez la souris. L'absence de c-Rel entraîne une importante diminution des tTregs et la double délétion de c-Rel et de p65, spécifiquement dans les Tregs, induit un phénotype similaire aux souris Scurfy dû à une diminution des Tregs et de leurs fonctions suppressives **(Long et al. 2009; Ruan et al. 2009; Isomura et al. 2009; Oh et al. 2017)**.

L'engagement du TCR active aussi la voie PI3K-Akt-mTOR qui phosphoryle les facteurs de transcription de la famille Forkhead box protein-O, Foxo1 et Foxo3, qui sont alors exclus du noyau. Dans les Tregs, l'expression de *Foxp3* mais aussi de CTLA-4 et de PD-1, entraîne une diminution de l'activité de cette voie et permet le maintien de Foxo1 et Foxo3 dans le noyau **(Parry et al. 2005; Han et al. 2012) (Figure 17)**. Foxo1 et Foxo3 se lient au promoteur de *Foxp3* ainsi qu'aux CNS1 et 3 de *Foxp3*, régulent positivement son expression ainsi que celle d'autres gènes comme *ctla4* **(Ouyang et al. 2010a; Harada et al. 2010; Kerdiles et al. 2010)**. Chez la souris, l'absence de Foxo1 dans les LT conduit au développement d'une inflammation sévère et généralisée due à une diminution des Tregs. Un défaut de la fonction des Tregs dans les souris dont Foxo1 est délété dans les LT *Foxp3*^{pos} conduit au développement d'un syndrome auto-immun **(Ouyang et al. 2010a, 2012)**. Ainsi, Foxo1 et Foxo3 participent au maintien de l'expression de *Foxp3* et aux fonctions suppressives des Tregs **(Ouyang et al. 2012)**.

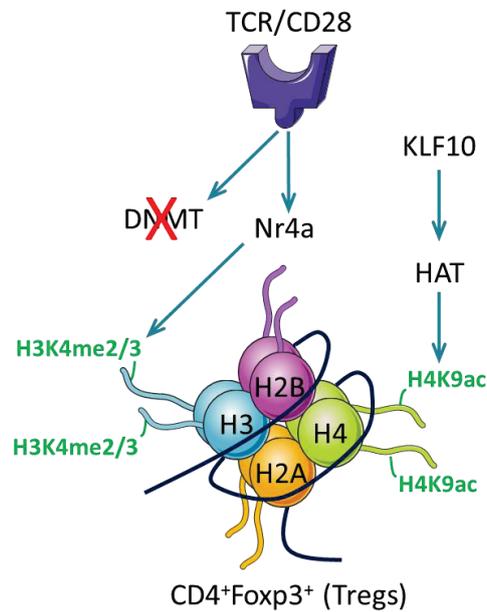


Figure 7: Modifications épigénétiques du promoteur de *Foxp3* dans les Tregs.

Suite à la stimulation du TCR, les DNMT se détachent du promoteur de *Foxp3* qui sera déméthylé au niveau des îlots CpG de la molécule d'ADN. Cette activation permet la liaison de Nr4a au promoteur de *Foxp3* qui participe à la di- ou la triméthylation d'H3K4. Ces modifications facilitent l'ouverture de la chromatine. Les Tregs, qui surexpriment KLF10, un organisateur de la structure chromatinienne, favorise l'action des enzymes HAT. Ces enzymes ont alors accès au promoteur et acétylent H4K9. Ces mécanismes, et la liaison des facteurs de transcription (Figure 6), permettent au promoteur de *Foxp3* d'être activé.

HAT: Histones AcétylTransférases; KLF10: Krueppel Like Factor 10 ; Nr4a: Nuclear receptor subfamily 4 group a.

La déméthylation des régions d'un gène et les modifications des histones associées sont importantes dans la régulation de son expression (**Figure 2**). L'analyse de la méthylation des îlots CpG du promoteur de *Foxp3* chez la souris et chez l'Homme, indique une déméthylation dans les Tregs par rapport aux Teffs et que cette différence est d'autant plus marquée suite à une stimulation du TCR (**Kim and Leonard 2007**). À l'état basal, le promoteur de *Foxp3* est associé à des DNA méthyltransférases (DNMT) et suite à l'engagement du TCR, les DNMT s'en dissocient (**Liu et al. 2010**). Le promoteur de *Foxp3* ainsi déméthylé sera alors accessible à d'autres facteurs de transcription (**Figure 7**). *In vitro*, la stimulation des LT induit la di- ou tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me2 ou H3K4me3) *via* Nr4a et cette méthylation est retrouvée dans les Tregs (**Kim and Leonard 2007; Sauer et al. 2008; Sekiya et al. 2011**). Krueppel-Like Factor 10 (KLF10), un modificateur chromatinien induit par le TGF- β , cytokine importante dans le développement des Tregs, est fortement exprimé dans ces cellules et participe à l'établissement de leurs fonctions suppressives (**Cao et al. 2009; Xiong et al. 2012**). Ainsi, H3K4me2/3 et KLF10 permettent le maintien d'une structure ouverte de la chromatine au niveau du promoteur de *Foxp3*, favorisant le recrutement d'Histones AcétylTransférases (HAT) et de p300/Cyclic AMP Response Element-Binding protein (CREB), qui induisent l'activité du promoteur (**Kim and Leonard 2007; Xiong et al. 2012**). Il est à noter que les LT CD4^{pos}, au niveau du promoteur de *Foxp3*, présentent une modification de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) qui est associée à une répression de l'expression des gènes. Cette modification n'est pas retrouvée dans les Tregs.

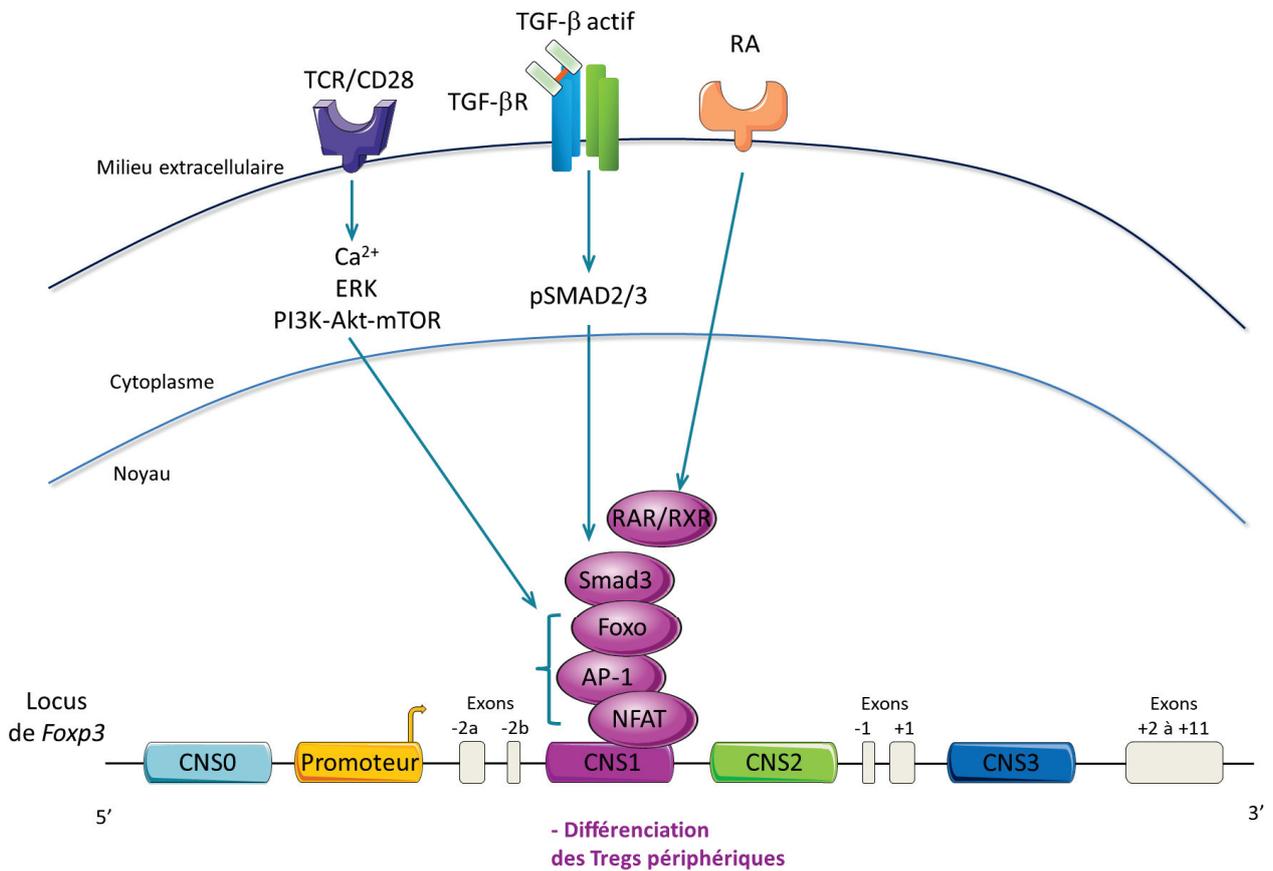


Figure 8: Partenaires moléculaires qui régulent l'activité du CNS1 de *Foxp3*.

L'activation du TCR et la co-stimulation recrutent AP-1 et NFAT au niveau du CNS1 de *Foxp3*. Le TGF- β phosphoryle SMAD3 qui se lie au CNS1. Le RA se lie à ces récepteurs nucléaires RAR/RXR qui se fixent sur le CNS1. Les protéines Foxo sont exclues du noyau par la signalisation du TCR mais y sont maintenues dans les Tregs, où elles se lient au CNS1 et participent à l'induction de l'expression de *Foxp3*.

RA: retinoic acid; RAR/RXR: retinoic acid receptor; SMAD: Sma [small mutants] and MAD [Mothers Against Decapentaplegic]; TGF- β : Transforming Growth Factor Beta; TGF- β R: Transforming Growth Factor Beta Receptor.

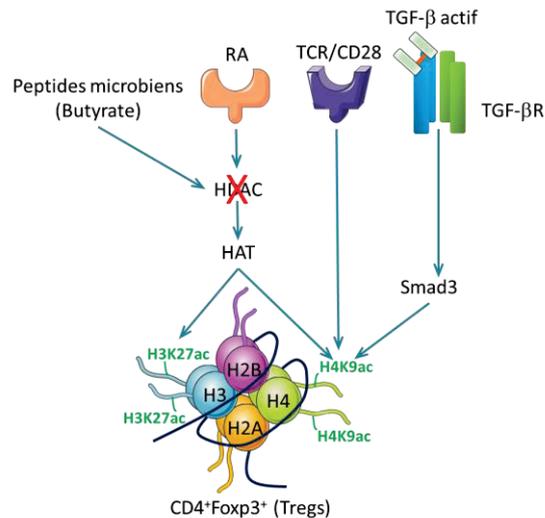


Figure 9: Modifications épigénétiques du CNS1 de *Foxp3* dans les Tregs.

La stimulation du TCR et le TGF- β , *via* SMAD3, induit l'acétylation d'H4K9. Le RA et le butyrate, qui participent au développement des Tregs en périphérie, favorisent l'acétylation des histones en inhibant HDAC et en facilitant la liaison d'HAT au locus.

c) Le CNS1 de *Foxp3*

Chez la souris, le CNS1 est localisé après l'exon non traduit -2b du locus du gène codant pour *Foxp3*, environ 2kb en aval du promoteur (**Tone et al. 2008**) (**Figure 8**). Le CNS1 ne contient pas d'îlots CpG et n'est donc pas régulé par la méthylation de l'ADN mais uniquement par la liaison de facteurs de transcription et par la modification des histones.

Suite à une stimulation du TCR et à la signalisation induite par le TGF- β , plusieurs facteurs de transcription transloquent dans le noyau comme la protéine homologs Sma [small mutants] and MAD [Mothers Against Decapentaplegic]-3 (SMAD3), NFAT et AP-1 qui se lient au CNS1 et participent à l'induction de l'expression de *Foxp3* (**Tone et al. 2008; Xu et al. 2010**). L'acide rétinoïque (RA – retinoic acid) participe aussi à cette expression en se liant à son récepteur nucléaire (RAR/RXR – retinoic acid receptor) (**Bono et al. 2016**) (**Figure 8**).

D'un point de vue épigénétique, l'activation de LT naïfs *in vitro* en présence de TGF- β induit l'acétylation d'H4 au niveau du CNS1 et ce de manière dépendante de SMAD3 (**Tone et al. 2008**) (**Figure 9**). Une autre marque de modification des histones au niveau du CNS1 est l'acétylation d'H3K27 (H3K27ac) dans les Tregs. L'ajout de butyrate, produit par le microbiote intestinal, lors d'une différenciation *in vitro* de Tregs, favorise H3K27ac sur le CNS1 mais aussi sur le promoteur de *Foxp3* (**Furusawa et al. 2013**). À cette étude s'ajoute des observations *in vivo* montrant que le butyrate, un inhibiteur d'Histones Déacétylases (HDAC) produit par le microbiote intestinal, permet une meilleure stabilité et fonctionnalité de *Foxp3* dans les pTregs (**Arpaia et al. 2013**). Le CNS1 est en effet associé au développement des pTregs (**Zheng et al. 2010; Josefowicz et al. 2012b**). De plus, le RA induit l'acétylation des histones sur le promoteur de *Foxp3* en remplaçant les HDAC associées aux histones par des HAT, favorisant l'expression du gène (**Kang et al. 2007; Xu et al. 2010; Barber et al. 2014**) (**Figure 9**).

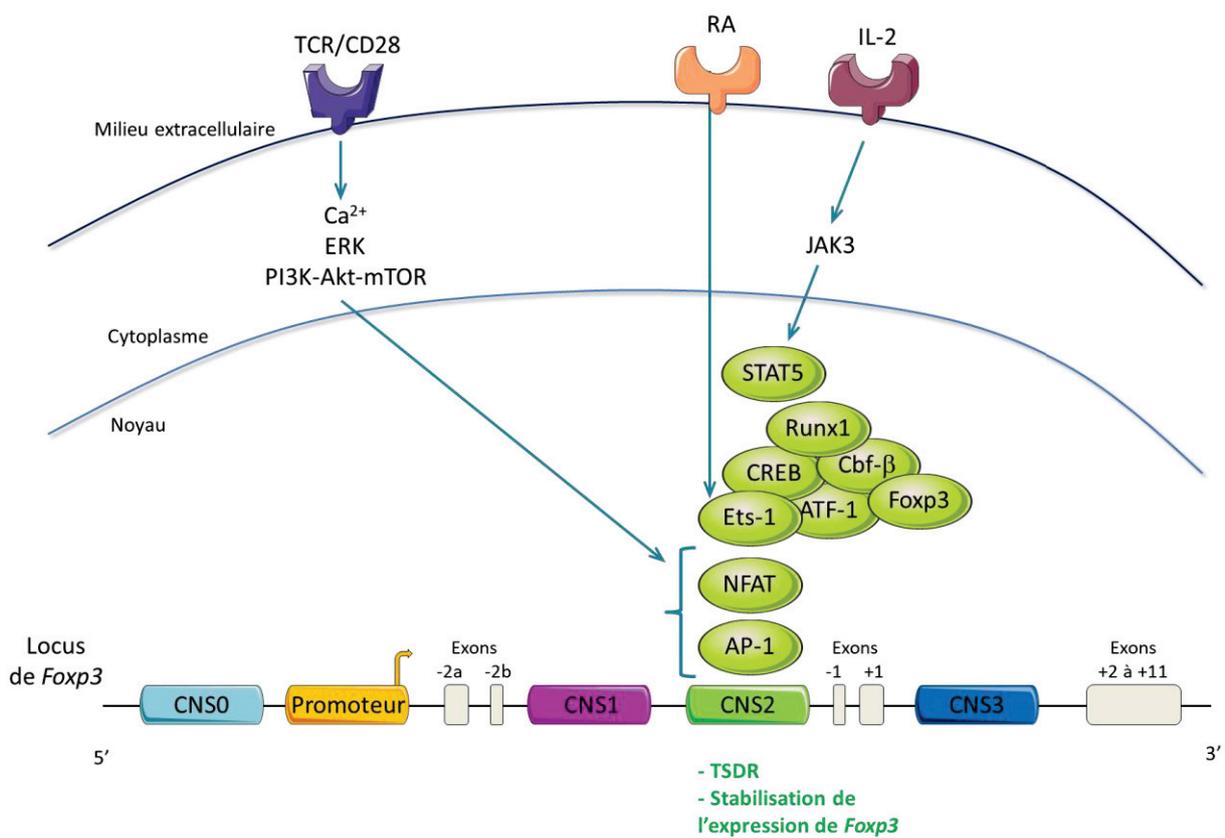


Figure 10: Partenaires moléculaires qui régulent l'activité du CNS2 de *Foxp3*.

L'activation du TCR, le signal induit par l'IL-2 et le RA, permettent la liaison de nombreux facteurs au CNS2 ainsi que la formation de complexes moléculaires entre eux. Ces interactions ne sont possibles que lorsque le CNS2, appelé aussi TSDR, est totalement déméthylé. Ces facteurs permettent aussi la formation d'une boucle chromatinienne entre le CNS2 et le promoteur, auquel sont également liées diverses protéines. Cette réorganisation chromatinienne permet l'expression de *Foxp3* dans les cellules.

ATF-1: Activating Transcription factor 1; *Cbf-β*: Core binding factor subunit beta; *IL-2*: interleukin-2; *JAK*: Janus Kinase 3; *Runx1*: Runt-related transcription factor 1; *STAT5*: Signal Transducer and Activator of Transcription 5; *TSDR*: Treg-Specific Demethylated Region.

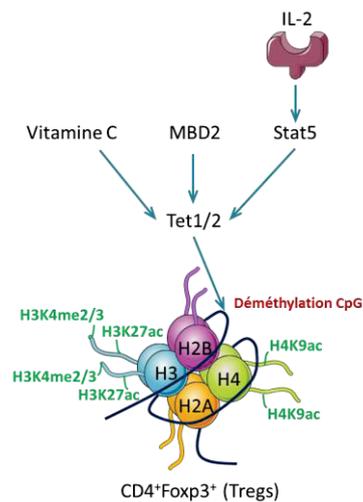


Figure 11: Modifications épigénétiques du CNS2 de *Foxp3* dans les Tregs.

Les enzymes Tet sont induites par diverses voies et permettent la déméthylation des îlots CpG notamment au niveau du CNS2 du locus de *Foxp3*. La déméthylation de cette région est une marque des Tregs, plus connue sous le nom de TSDR, et favorise la fixation de plusieurs facteurs de transcription au locus. La méthylation et l'acétylation des histones sont également indispensables à l'expression de *Foxp3*.

MBD2: Methyl-CpG Binding domain protein 2.

d) Le CNS2 de *Foxp3*

La région CNS2, de 1,2kbp, est également située avant l'exon -1, environ 4kb après le TSS (**Figure 10**). Une signalisation par les cytokines partageant la chaîne commune γ c comme l'IL-2, qui participe au développement des Tregs, induit l'activation du Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) qui se lie au CNS2 et participe au maintien de l'expression de *Foxp3* (**Yao et al. 2007; Burchill et al. 2007; Feng et al. 2014**). La liaison de c-Rel, au niveau du promoteur, et de NFAT au niveau du CNS2, vont permettre la formation de l'enhancéosome entre ces deux régions, favorisant l'activation de l'expression du gène *Foxp3* (**Mantel et al. 2006; Kim and Leonard 2007; Li et al. 2014**) (**Figures 6 et 10**).

Le CNS2 est une région riche en îlots CpG et donc sensible à la méthylation. Elle est retrouvée déméthylée dans les Tregs murins et humains par rapport aux Teffs et a ainsi été nommée TSDR pour Treg-Specific Demethylated Region (**Floess et al. 2007; Baron et al. 2007**). L'état de méthylation du TSDR est directement lié à l'activité transcriptionnelle du CNS2 et donc à l'expression de *Foxp3* (**Kim and Leonard 2007; Polansky et al. 2008**). Il a été démontré, dans les Tregs humains et murins, que CREB/ATF, Ets-1 ainsi que Runx1/Cbf- β , forment un complexe avec *Foxp3* uniquement lorsque le CNS2 est déméthylé, favorisant l'expression du gène (**Kim and Leonard 2007; Janson et al. 2008; Zheng et al. 2010; Mouly et al. 2010; Polansky et al. 2010**) (**Figure 10**). L'importance de cette méthylation a été confortée par des expériences utilisant l'azacytidine, un inhibiteur des méthyltransférases, dans des cellules Natural Killers (NK) ou en analysant des LT CD8^{pos} dépourvus en Dnmt1, montrant une expression de *Foxp3* dans ces cellules, qui ne l'exprime normalement pas (**Zorn et al. 2006; Kim and Leonard 2007; Josefowicz et al. 2009**). Ces expériences confirment que la déméthylation du CNS2 est spécifique des Tregs et a été utilisée pour énumérer les Tregs circulants chez des patients atteints de cancers (**Wieczorek et al. 2009**).

En plus de l'importance de la méthylation du CNS2, une forte méthylation d'H3K4 ainsi que l'acétylation d'H3 et d'H4 est observée dans les Tregs (**Floess et al. 2007; Zheng et al. 2010; Ohkura et al. 2012**) (**Figure 11**). En 2013, le mécanisme de déméthylation du CNS2 a été élucidé. La Methyl-CpG binding domain protein 2 (Mbd2) se lie au CNS2 et recrute l'enzyme Tet(Ten-eleven Translocation)2, qui déméthyle les CpG et donc le CNS2 (**Toker et al. 2013; Wang et al. 2013; Nair and Oh 2014**). De plus, il a été montré que STAT5, qui recrute les Tet, et la vitamine C, co-facteur primordial pour leur activité, déméthylent fortement le CNS2 (**Sasidharan Nair et al. 2016; Yue et al. 2016**) (**Figure 11**). Enfin, la délétion de Tet1 et Tet2,

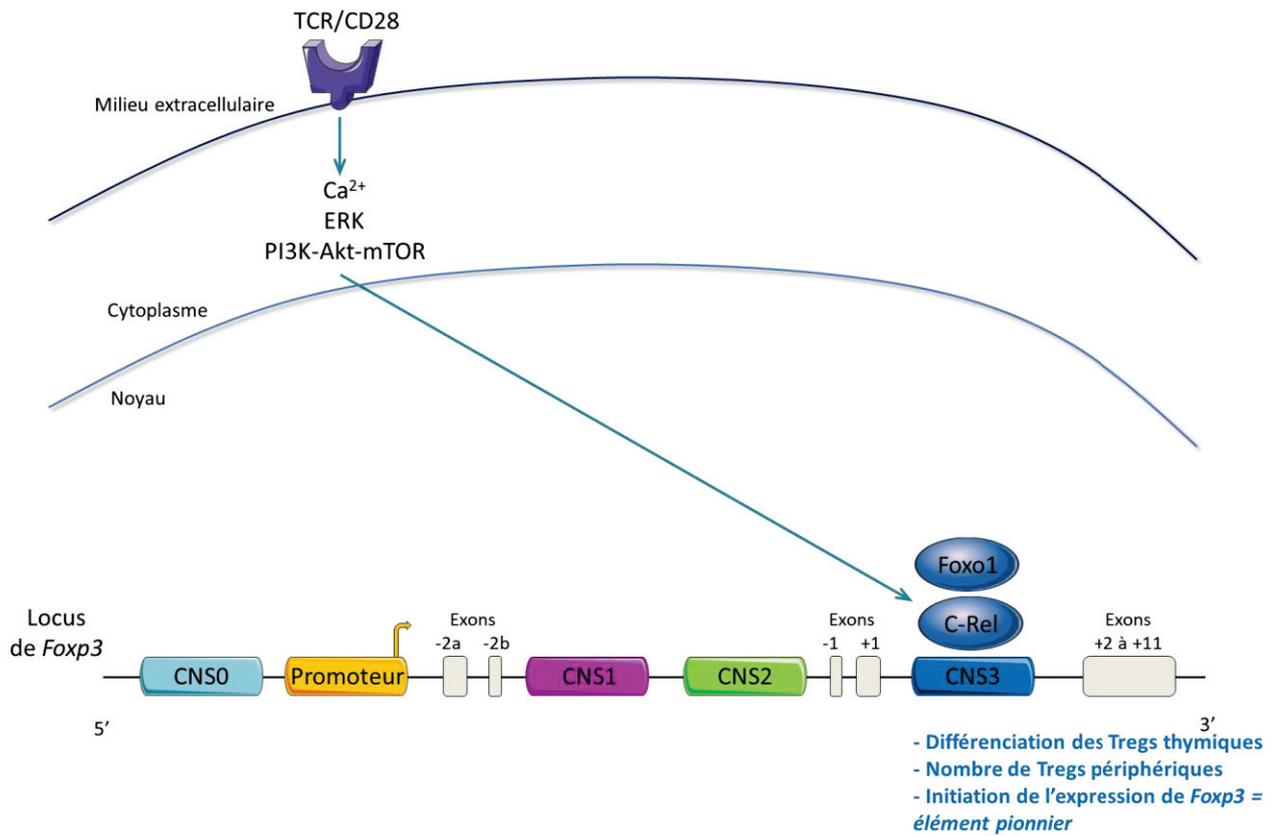


Figure 12: Partenaires moléculaires qui régulent l'activité du CNS3 de *Foxp3*.

L'activation du TCR permet à c-Rel de se lier dans un premier temps au promoteur de *Foxp3*. Il se liera ensuite au CNS3, tout comme Foxo1 et 3, qui participent à l'expression du gène.

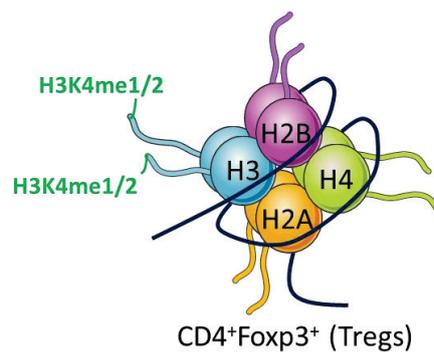


Figure 13: Modifications épigénétiques du CNS3 de *Foxp3* dans les Tregs.

La méthylation de l'histone 3 est retrouvée dans les Tregs mais également dans leurs précurseurs. Cela suggère que le CNS3 est impliqué dans l'ouverture de la chromatine du locus de *Foxp3* permettant d'initier la transcription du gène.

spécifiquement dans les Tregs, provoque une auto-immunité sévère causée par un faible développement de ces cellules (Yang et al. 2015; Yue et al. 2016).

e) Le CNS3 de *Foxp3*

Le CNS3 est localisé juste après le premier exon codant (+1), 7 kb en amont du TSS (Figure 12) (Kim and Leonard 2007). L'activation du TCR et le signal de co-stimulation par CD28 induisent l'expression de c-Rel qui se fixe tout d'abord sur le promoteur de *Foxp3* puis sur le CNS3 au niveau de régions riches en îlots CpG (Long et al. 2009; Zheng et al. 2010).

Dans les Tregs, le CNS3 est enrichi en H3K4me1 ou H3K4me2. Cette marque épigénétique est retrouvée dans les thymocytes *Foxp3*^{neg}, suggérant que le CNS3 participe à l'ouverture chromatinienne du locus *Foxp3*, facilitant son expression (Zheng et al. 2010; Feng et al. 2015) (Figure 13). Le CNS3 est ainsi considéré comme un élément pionnier car il initie l'expression de *Foxp3* mais ne participe pas au maintien de son expression (Long et al. 2009).

La figure 14 permet de récapituler tous les partenaires moléculaires de chaque région régulatrice de *Foxp3* qui ont énumérées précédemment ainsi que les voies de signalisation impliquées dans cette régulation (Figure 14).

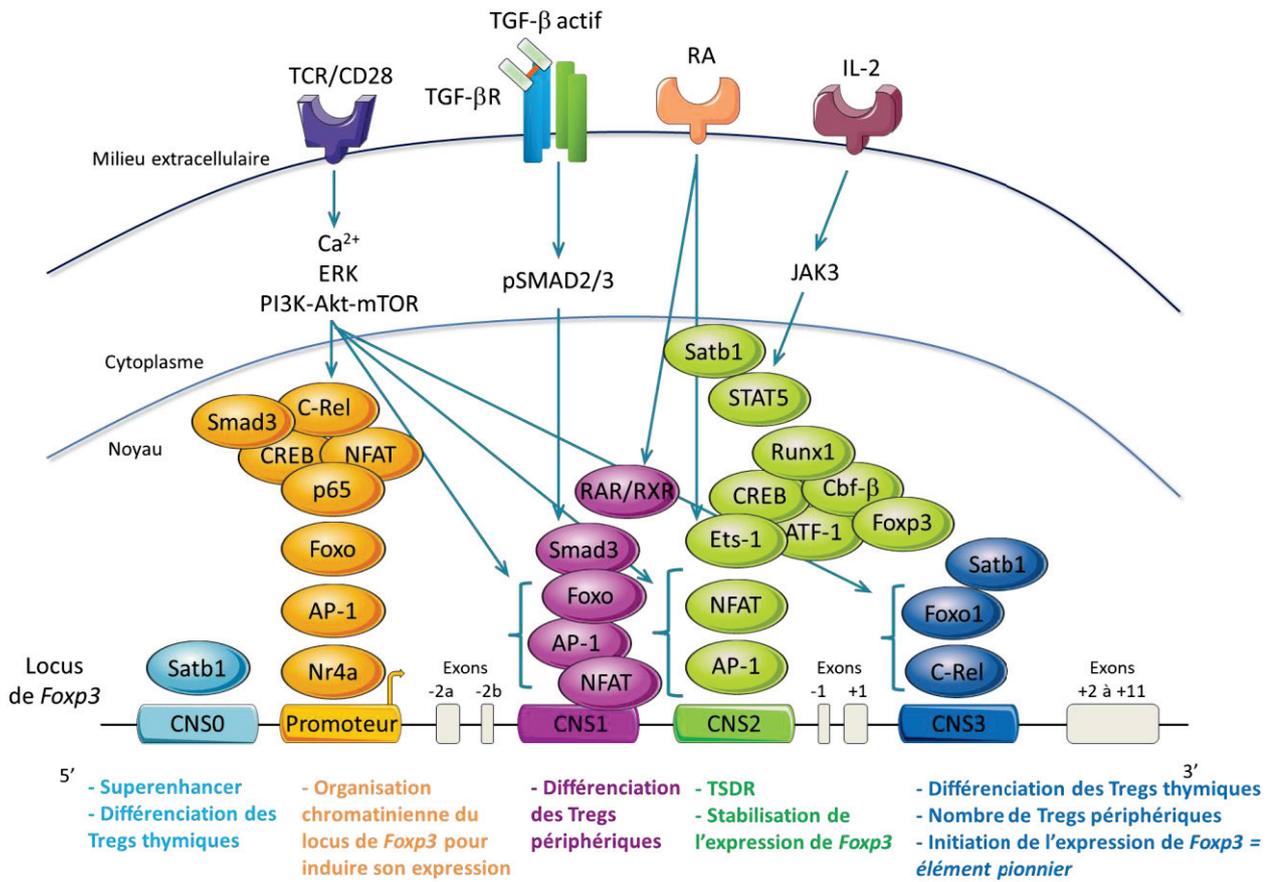


Figure 14: Synthèse des partenaires moléculaires qui régulent l'activité du locus de *Foxp3*.

f) Régulation moléculaire du programme de différenciation des lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺

Bien que Foxp3 soit le facteur majoritaire impliqué dans le phénotype, les fonctions et l'homéostasie des Tregs, plusieurs études ont permis de conclure que la signature transcriptionnelle des Tregs Foxp3^{pos} est largement influencée par l'expression d'autres molécules (**Fontenot et al. 2005a; Gavin et al. 2007; Lin et al. 2007**). Des analyses par cytométrie et puces à ADN (micro-arrays) ont montré que Foxp3 amplifie et stabilise l'expression de gènes associés au phénotype et aux fonctions des Tregs (**Gavin et al. 2007**) (**Tableau 1**). Une approche faite par « ChIP-on-chip », qui consiste en une immunoprécipitation chromosomiale suivie d'une analyse par puces à ADN, a permis d'identifier les cibles de Foxp3. De plus, l'analyse d'hybridomes T murins Foxp3^{pos} ou Foxp3^{neg} a permis de montrer que la plupart de ces gènes cibles sont associés à la signalisation du TCR. Ainsi, Foxp3 peut se lier de façon directe ou indirecte à environ 700 promoteurs, activant ou réprimant l'expression de gènes associés à la fonction des Tregs (**Marson et al. 2007; Zheng et al. 2007**). Ainsi, Foxp3 active l'expression de *Tnfrsf18*, *Il2ra* et *Ctla4* codant respectivement pour Glucocorticoid-Induced TNFR family Related gene (GITR), CD25 et Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 (CTLA-4) (**Fontenot et al. 2003; Wu et al. 2006; Ono et al. 2007**). L'expression de la molécule Programmed cell Death 1 (PD-1) dans les Tregs est associée à leurs fonctions suppressives (**Francisco et al. 2009**) et l'expression de GITR, CTLA-4, CD25 et PD-1 par les Tregs est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancers (**Park et al. 2012**).

Parmi les partenaires de Foxp3, sa liaison avec NFAT et c-Rel mais également à l'Acute Myeloid Leukaemia 1 et le Runt-related transcription factor 1 (AML1/Runx1), réprime l'expression de l'*Il2*, de l'*Il17*, de l'*Il4* et de l'interféron gamma (*IFN-γ*) (**Fontenot et al. 2003, 2005c; Bettelli et al. 2005; Wu et al. 2006; Ono et al. 2007**), cytokines associées aux LT CD4^{pos} non-Tregs dont l'inhibition permettra de confiner la cellule dans le lignage Tregs. L'IL-2 est importante pour la survie des LT et la forte expression en CD25, mais également des autres sous-unités du récepteur à l'IL-2, par les Tregs leur permet une consommation accrue de la cytokine au détriment des Teffs.

Dans le programme de différenciation des Tregs, en plus de *Foxp3*, d'autres gènes dépendent aussi d'une régulation épigénétique. Leur état de méthylation fait partie intégrante de la signature des Tregs **(Ohkura et al. 2013; Kitagawa et al. 2015)**.

La déméthylation et l'acétylation de gènes associés à une signature Tregs, indépendante de *Foxp3* mais dépendante de la stimulation du TCR, incluent *Ctla4*, *Il2ra*, *Tnfrsf18* et *Ikzf4* qui participent notamment aux fonctions suppressives des Tregs ou au maintien de leur phénotype **(Ohkura et al. 2012; Kitagawa et al. 2017)**. *Ikzf4* code pour le facteur de transcription Eos qui est exprimé dans les Tregs et les Tconv activés. La liaison entre Eos et *Foxp3* favorise l'inhibition de gènes, normalement induits par *Foxp3* seul, comme le gène codant pour l'*Il2*, suggérant un rôle d'Eos dans le rétrocontrôle des gènes induits par *Foxp3* **(Pan et al. 2009; Rieder et al. 2015)**. Une étude récente démontre que la délétion d'Eos, spécifiquement dans les Tregs, ne perturbe pas le développement de ces cellules mais participe à leur survie en périphérie **(Gokhale et al. 2019)**.

Foxp3 se lie aussi à HDAC1, 7 ou 9 ou à des HAT comme Tat-interacting protein 60 (TIP-60) et p300 **(Li et al. 2007; van Loosdregt et al. 2010; Xiao et al. 2010)**. Une mutation *Foxp3*^{A384T}, empêchant la liaison de *Foxp3* à TIP-60, induit une incapacité totale des Tregs à supprimer des Teffs *in vitro* **(Bin Dhuban et al. 2017)**. Ces molécules sont importantes dans la régulation de l'expression de *Foxp3* car la liaison de *Foxp3* à p300 permet d'éviter une dégradation protéosomale, constituant un mécanisme de régulation post-traductionnelle de *Foxp3* **(van Loosdregt et al. 2010)**.

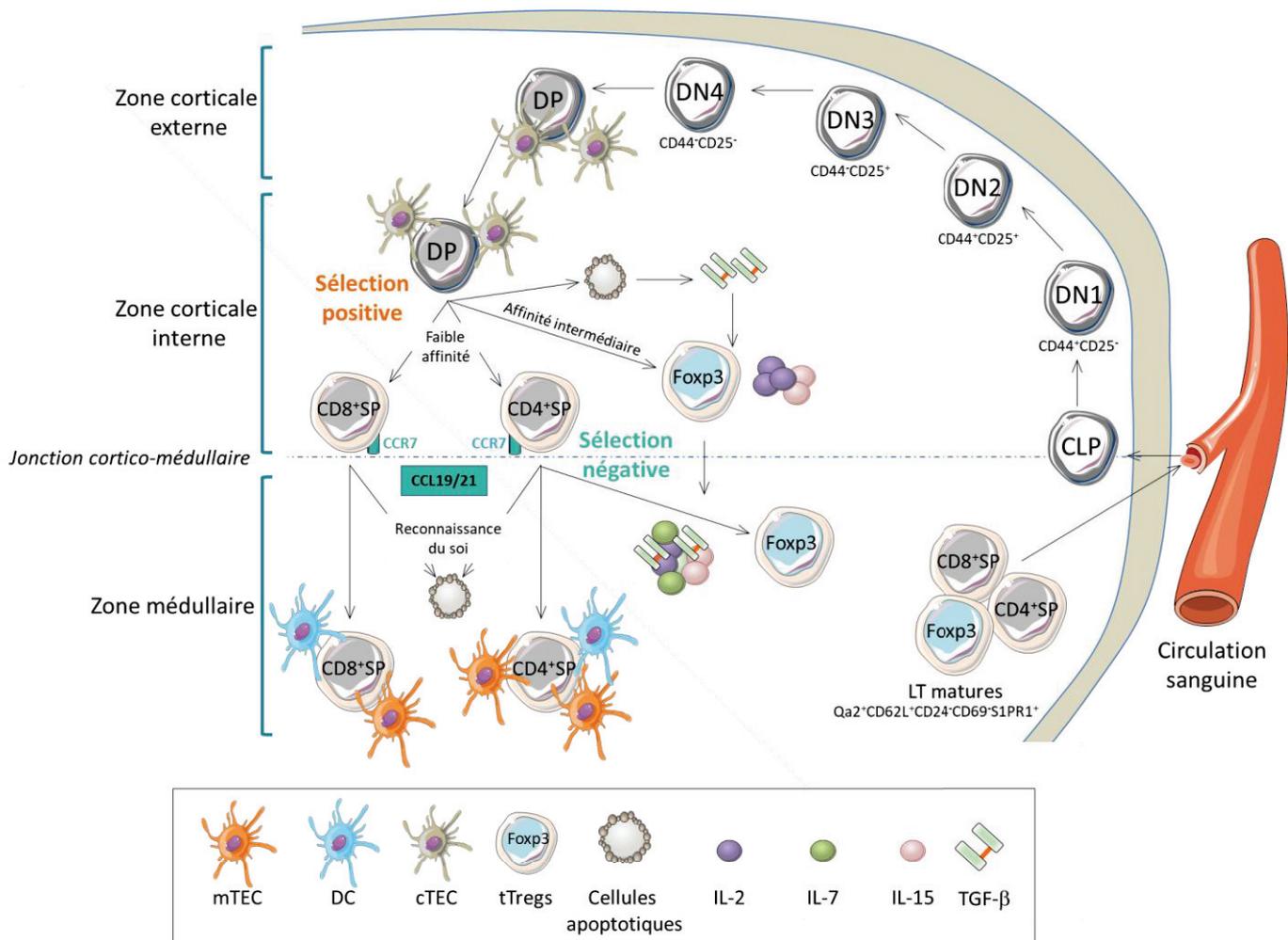


Figure 15: Ontogénie des lymphocytes T dans le thymus.

Les CLP arrivent par la circulation sanguine dans le cortex du thymus et un signal Notch leur permettra de s'engager vers un lignage T. Les réarrangements des chaînes β puis α du TCR permettent aux DP d'interagir avec les cTEC qui leur présentent un peptide du soi *via* le CMH : c'est la sélection positive. En absence d'interaction ou lors d'une interaction trop importante, les cellules meurent par apoptose. Une interaction d'affinité intermédiaire pour les antigènes du soi et l'environnement cytokinique permettent le développement des Tregs. Si l'affinité est faible, les cellules ayant reconnu un CMH de type I deviendront des CD8^{pos}SP et celles ayant reconnu un CMH de type II deviendront des CD4^{pos}SP. Ayant acquis l'expression de CCR7, les cellules migrent dans la zone médullaire en réponse aux chimiokines CCL19 ou 21. Lors de la sélection négative, les cellules reconnaissant les antigènes du soi présentés par les mTEC et les DC vont mourir par apoptose à l'exception des Tregs qui y survivent. Les LT matures pourront sortir du thymus par la jonction cortico-médullaire et rejoindre la périphérie. Les tTregs en périphérie pourront inhiber les LT auto-réactifs ayant échappés à la sélection négative. Les LT CD4^{pos}, soumis à un environnement cytokinique particulier, se différencieront en LT effecteurs (Th1, Th2, Th17, ...) ou en Tregs.

CCL19/21: C-C motif chemokine ligand 19 ou 21; *CCR7*: C-C chemokine receptor type 7; *CLP*: progéniteur lymphoïde commun; *cTEC*: cellules épithéliales thymiques corticales; *DC*: cellules dendritiques; *DN*: double-négatifs (CD4⁻CD8⁻); *DP*: double-positifs (CD4⁺CD8⁺); *mTEC*: cellules épithéliales thymiques médullaires.

Encart 1: Ontogénie des lymphocytes T : de la moelle osseuse au thymus

Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques se développent entre autres en progéniteurs lymphoïdes communs qui migrent dans le thymus *via* la circulation sanguine. Par diapédèse, ils pénètrent dans cet organe au niveau de la jonction cortico-médullaire et peuvent devenir des LT, des LB ou des NK. Ils sont alors dits « double-négatifs » ou DN ($CD4^{neg}CD8^{neg}$), se trouvent dans le cortex et seront divisés en 4 stades selon l'expression de CD25 et CD44. Un signal médié par Notch permettra une orientation vers le lignage T et les cellules seront alors appelées thymocytes. Le réarrangement des gènes codant pour la chaîne β du TCR permettra aux thymocytes d'exprimer un TCR avec une chaîne β fonctionnelle et une chaîne α invariante. Ils migreront ensuite vers la région corticale sous-capsulaire où ils co-exprimeront CD4 et CD8 et seront appelés « double-positifs » (DP). À ce stade, les cellules subissent un réarrangement des gènes de la chaîne α du TCR.

Les DP restent dans le cortex 3 à 4 jours et meurent par négligence en cas d'absence d'un signal donné au $TCR\alpha\beta$ fonctionnel. Il s'agit de la sélection positive médiée par un complexe composé d'un peptide du soi présenté par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) thymiques. Si le CMH est de type I, les LT seront $CD8^{pos}SP$ (simple-positifs), s'il est de type II ils seront des $CD4^{pos}SP$. Une interaction d'une affinité minimale est suffisante pour que les cellules survivent. À cette étape, on peut avoir l'émergence de Tregs ou de clones auto-réactifs qui vont reconnaître des cellules du soi avec une forte affinité. Les thymocytes qui surexpriment alors CCR7 vont migrer vers la zone médullaire en réponse à CCL19 et 21 où aura lieu la sélection négative. Il est à noter que la sélection positive a également lieu dans la zone médullaire.

Lors de la sélection négative, les $CD4^{pos}SP$ ou $CD8^{pos}SP$ interagissent avec différentes CPA afin de tester la reconnaissance du TCR envers le peptide du soi présenté par le CMH. Les CPA médullaires expriment les protéines AIRE (AutoImmune REgulator) et Fezf2 qui leurs permettent d'exprimer des antigènes tissulaires périphériques présentés aux thymocytes. Cette étape permet la déplétion ou l'anergie des cellules T auto-réactives et induit la tolérance par déplétion de ces cellules ainsi qu'en favorisant le développement des Tregs. Ces Tregs sont spécifiques d'auto-antigènes et, une fois en périphérie, suppriment les LT auto-réactifs qui n'ont pas été éliminés, participant à la régulation de syndromes auto-immuns.

Les LT sortiront du thymus par la jonction cortico-médullaire et rejoindront la périphérie. Ces deux sélections permettent la génération de LT matures dont certains reconnaissent des antigènes étrangers avec une forte affinité. Les cellules auto-réactives, qui reconnaissent fortement les antigènes du soi, et qui n'ont pas été éliminées lors de la sélection négative peuvent causer des syndromes auto-immuns, régulés entre autres par les Tregs. Cette sélection étant imparfaite, d'autres mécanismes sont mis en place pour éviter le développement de ces maladies, il s'agit de la tolérance périphérique. Non détaillée dans ce manuscrit, elle met en place des mécanismes comme l'ignorance et l'anergie, la délétion, les DC tolérogènes et les cellules régulatrices telles les Tregs $Foxp3^{pos}$, détaillés dans ce manuscrit, mais également les Tr1, les Th3, les CD8 régulateurs, les LB régulateurs, les NKT ou les DN. **(Voir aussi la Figure 15)**

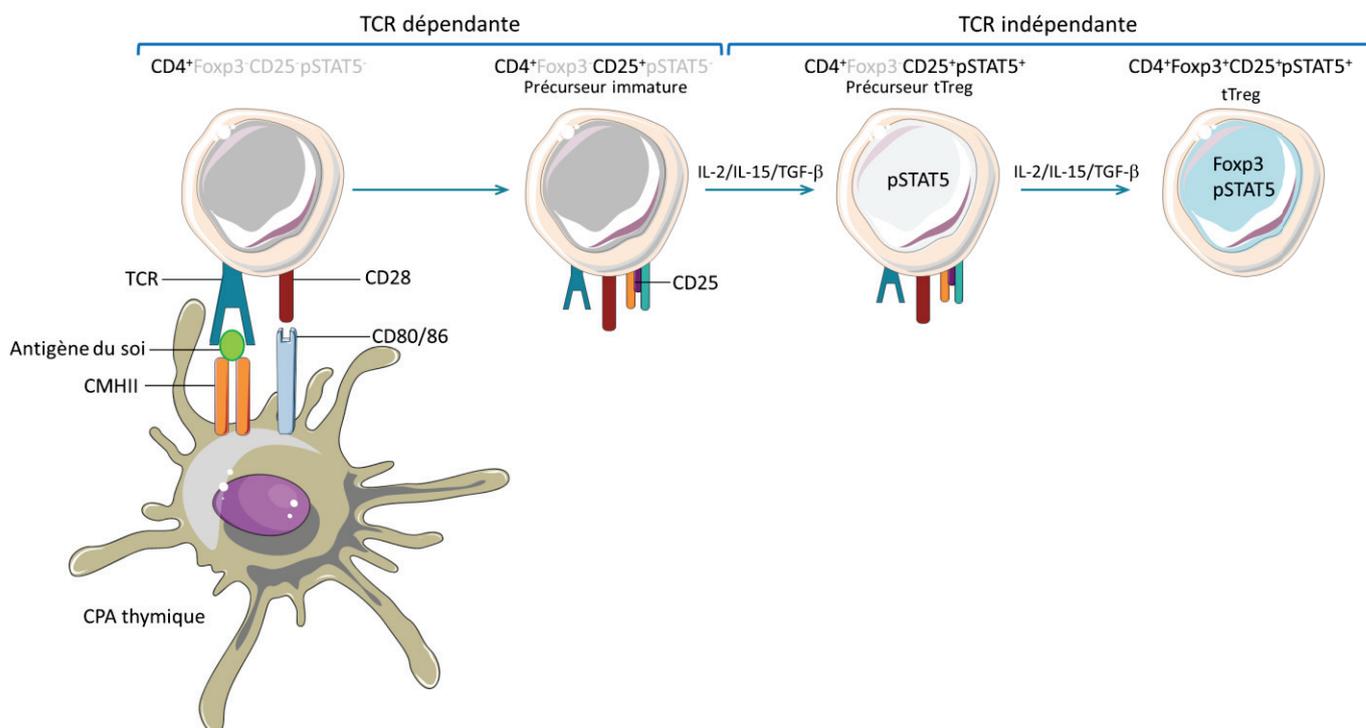


Figure 16: Modèle de différenciation des tTregs.

L'interaction entre les CPA (cTEC, mTEC ou DC) et les LT $CD4^{pos}$ permettra l'activation de voies de signalisation qui, en synergie avec l'IL-2, l'IL-15 et le TGF- β , génèreront des tTregs.

CPA : cellule présentatrice d'antigènes.

III) Ontogénie des lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺

a) Les Tregs thymiques

Le développement thymique des Tregs dépend de nombreux facteurs et semble être séquentiel. Dans un premier temps, les thymocytes deviennent des préTregs suite à la reconnaissance de l'antigène qui leur est présenté par les CPA thymiques (**Lio and Hsieh 2008**). Interviennent ensuite les cytokines IL-2, IL-15 et TGF- β qui induisent et stabilisent l'expression *Foxp3* permettant le développement des préTregs en tTregs matures (**Burchill et al. 2008; Lio and Hsieh 2008**) (**Figure 16**). Ces étapes de développement seront davantage développées dans ce chapitre.

- *L'interaction entre le CMH des cellules présentatrices d'antigènes et le TCR des thymocytes*

Lors de la sélection positive et *via* leur TCR, les thymocytes interagissent avec un peptide du soi associé au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) présenté par les CPA thymiques (**Encart 1 et Figure 15**). Il existe plusieurs types de CPA dans le thymus : les cellules épithéliales corticales thymiques (cTEC) et les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTEC). Les DC, composées des DC thymiques ou résidentes (thyDC), les DC périphériques qui recirculent dans le thymus (périDC), et les DC plasmacytoïdes (pDC) qui contribuent également à la présentation antigénique aux thymocytes.

L'importance de la reconnaissance d'un peptide du soi dans le développement des tTregs a été démontrée à l'aide de souris exprimant un TCR transgénique, reconnaissant un peptide de l'ovalbumine (OVA). Ces animaux présentent un défaut en Tregs qui est restitué quand l'OVA est exprimée dans le thymus (**Itoh et al. 1999; Jordan et al. 2001; Hsieh et al. 2004; Knoechel et al. 2005**). Il est à noter que des antigènes du non-soi sont aussi présentés aux thymocytes. Lorsqu'un fluorophore est appliqué sur la peau des souris, il peut être retrouvé dans les périDC qui capturent des antigènes en périphérie et les présentent aux thymocytes, assurant une tolérance centrale (**Bonasio et al. 2006**). Ce mécanisme, qui délète de potentiels nouveaux Teffs, favorise l'émergence de tTregs notamment chez le nouveau-né, conduisant à une tolérance contre la flore commensale tel que *Staphylococcus epidermidis* (**Scharschmidt et al. 2015**).

L'interaction avec les cTEC

Le rôle des cTEC dans le développement des tTregs a été démontré par une étude utilisant des souris transgéniques dont uniquement les cTEC expriment le CMHII. Dans ces souris, bien qu'une diminution des Tregs soit observée, ces derniers se développent normalement et sont capables d'inhiber la prolifération des Teffs *in vitro* (**Bensinger et al. 2001**). Les équipes d'H. von Boehmer et de J. van Meerwijk ont permis d'approfondir ce sujet en montrant que les cTEC, exprimant un ligand du TCR connu (fusion d'une molécule CMHII avec un peptide donné), induisent le développement de Tregs spécifiques de ce ligand alors que les thymocytes non Tregs, spécifiques du ligand, sont délétés (**Apostolou et al. 2002; Ribot et al. 2006, 2007**). Une étude publiée par l'équipe d'A. Rudensky a permis de montrer que la zone corticale, et donc les cTEC, est une zone où se développent les tTregs. Les auteurs ont pu démontrer l'importance de cette zone en bloquant la migration des thymocytes de la zone corticale vers la zone médullaire en utilisant des souris CCR7^{KO} ou la toxine pertussique, qui inhibe la signalisation des récepteurs aux chimiokines. Ces deux modèles engendrent une accumulation des tTregs dans le cortex et valident l'implication des cTEC dans le développement des tTregs (**Liston et al. 2008**).

L'interaction avec les mTEC

En plus de se dérouler dans le cortex la sélection négative a aussi lieu dans le médulla, suggérant que cette zone pourrait aussi contribuer au développement des tTregs (**Figure 15**). Cette zone est riche en cellules Foxp3^{pos} suggérant l'existence d'une niche favorable pour les tTregs et qui inclue les molécules impliquées dans l'interaction CMH/TCR et les cytokines. Les mTEC expriment le facteur de transcription AutoImmune REgulator (AIRE) et assurent une expression unique de peptides du soi couvrant un large spectre d'antigènes tissulaires qui sont codés par le génome de l'organisme (**Mathis and Benoist 2009**). L'étude de Cowan *et al.* montre que la délétion de RelB, facteur important pour le développement des mTEC, induit une diminution du nombre de préTregs et de tTregs (**Cowan et al. 2013**). L'utilisation de système TCR spécifique et dont l'expression de l'antigène est sous le contrôle d'AIRE montre une augmentation du nombre de Tregs seulement en présence d'un antigène du soi présenté par les mTEC (**Aschenbrenner et al. 2007**). Les souris déficientes pour AIRE ont une forme légère d'auto-immunité et l'analyse des clones T infiltrants les tissus montre que leur répertoire est proche de celui des Tregs des animaux sauvage, suggérant que AIRE contribue au maintien des tTregs (**Malchow et al. 2016**).

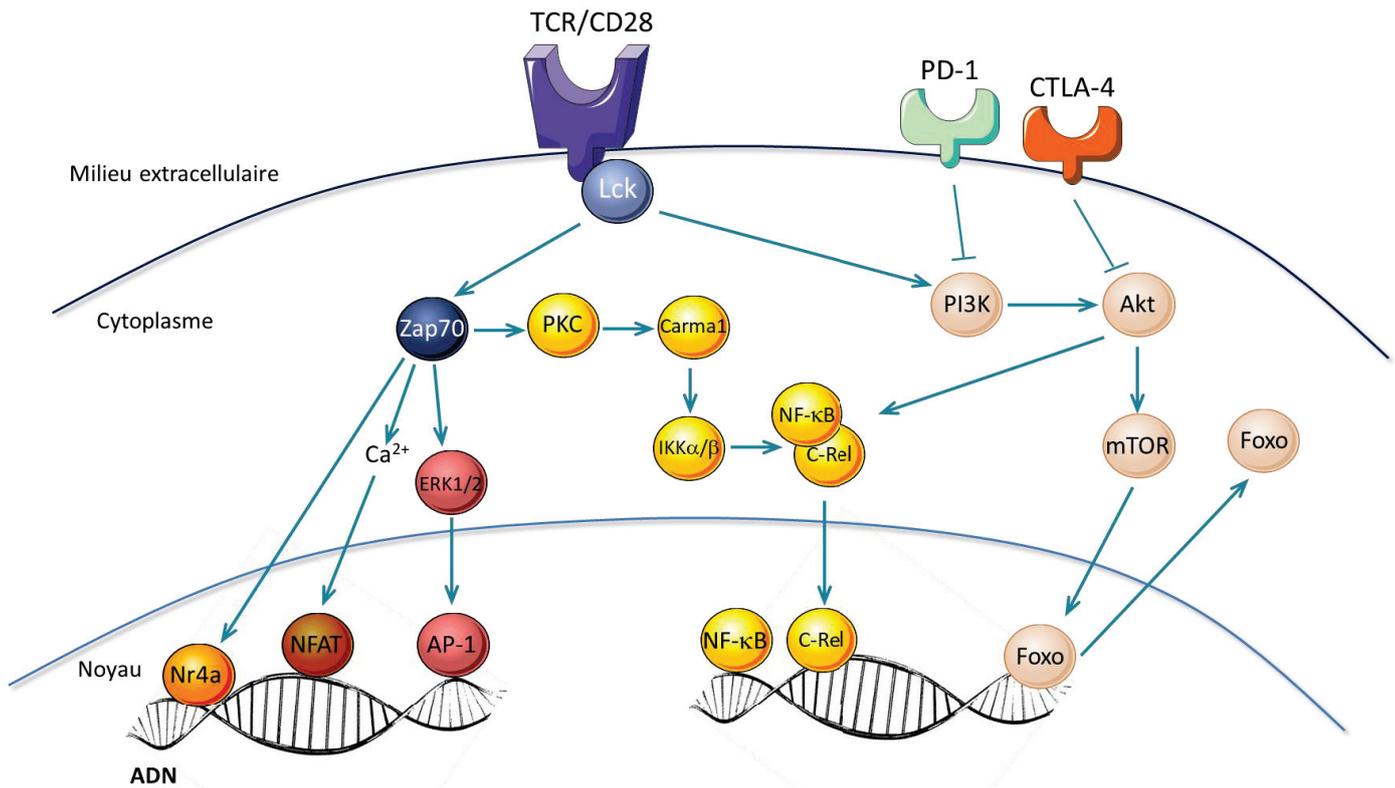


Figure 17: Voies de signalisation induites par l'activation des Tregs.

L'activation du TCR et la co-stimulation par CD28 activent Lck qui phosphoryle, entre autres, Zap70. À son tour, Zap70 active de nombreuses protéines (Vav, PLC γ , Slp76, PIP2, DAG, IP3, ...). Cette cascade de signalisation permet l'activation de nombreuses voies de signalisation et la liaison de nombreux facteurs de transcription à leurs gènes cibles afin de réguler leur expression. Nr4a, NFAT et AP-1 participent à l'induction de l'expression de *Foxp3*. L'activation de PKC active CARMA1 puis IKK α et IKK β . NF- κ B1 et c-Rel seront alors activés et transloqués dans le noyau où ils participeront à la régulation de l'expression de *Foxp3*. L'activation du TCR active aussi la voie PI3K/Akt qui phosphoryle les facteurs de transcription de la famille Foxo et les exclus du noyau. Dans les Tregs, les voies induites par PD-1 et CTLA-4 permettent de contrebalancer l'activation de la PI3K/Akt et de maintenir l'expression de Foxo1 et 3 dans le noyau qui contrôlent l'expression de *Foxp3*.

La signalisation du TCR

Nr4a, ou Nur77, est un facteur de transcription avec un domaine de liaison à l'ADN dont l'expression est rapidement induite après une stimulation du TCR et proportionnelle à l'intensité du signal reçu par le TCR du thymocyte (**Figure 17**). L'utilisation de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de *Nur77* a permis d'étudier l'importance et la force de stimulation du TCR nécessaire au développement des tTregs (**Moran et al. 2011**). Dans ces souris, les LT CD4^{pos}Foxp3^{pos} ont une intensité de fluorescence supérieure aux LT CD4^{pos}Foxp3^{neg}, démontrant une plus forte intensité du signal TCR et donc une avidité du TCR pour l'antigène plus importante dans les Tregs. Ces observations sont en lien avec le répertoire hautement auto-immun des tTregs, rapporté par les travaux d'Hsieh *et al.* (**Hsieh et al. 2006**). Ce chevauchement est également retrouvé chez l'Homme (**Fazilleau et al. 2007**). Les tTregs exprimeraient donc un TCR avec une affinité plus élevée pour les peptides du soi.

Comme décrit précédemment, Nr4a participe au contrôle de l'activité du promoteur de *Foxp3*. *In vivo*, la délétion de Nr4a résulte en une diminution du développement des tTregs (**Fassett et al. 2012**). Ces résultats ont ainsi suggéré un rôle de Nr4a dans la détection de l'intensité du signal donné par le TCR exprimé par les thymocytes. Cette hypothèse a pu être confirmée en utilisant des souris ayant des TCR d'affinités croissantes pour le peptide de l'hémagglutinine où seuls les TCR de forte affinité pour l'antigène permettent le développement des tTregs (**Cozzo Picca et al. 2011**). En effet, l'activation du TCR active NF- κ B, qui joue un rôle important dans la génèse des tTregs (**Figure 17**). L'analyse des souris déficientes pour les protéines impliquées dans l'activation de NF- κ B par le TCR, montre qu'elles ont toutes une diminution de la proportion en tTregs, qui ne peut être restaurée par la présence d'IKK α , protéine de la voie non-canonique de la voie NF- κ B. De plus, la surexpression d'IKK β est suffisante pour induire l'expression de *Foxp3* dans des cellules incapables d'activer la voie NF- κ B (**Long et al. 2009**). Une des protéines importante de cette voie est c-Rel, qui se lie au promoteur de *Foxp3*, et participe à l'induction de son expression (**Isomura et al. 2009; Visekruna et al. 2010**). Des études portées sur la délétion de CARMA1 chez la souris, impliquée dans la signalisation NF- κ B, ont conforté le rôle de cette voie dans le développement des tTregs. En effet, les thymocytes dépourvus en CARMA1 ne peuvent induire des cellules Foxp3^{pos}, contrairement à l'ablation de CARMA1 en périphérie qui ne perturbe pas le développement des pTregs (**Molinero et al. 2009**).

NFAT, également induit par la signalisation du TCR, est fortement impliqué dans le développement thymique des Tregs (**Figure 17**). *In vitro*, suite à l'engagement du TCR, l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire active NFAT qui se lie au promoteur de *Foxp3* (**Figure 14**). En lien avec cette observation, *in vivo*, une diminution des tTregs est observée chez les souris délétées pour différents membres de la famille NFAT (**Oh-Hora et al. 2013**).

Le signal de co-stimulation

L'engagement du TCR induit un premier signal de stimulation aux thymocytes CD4^{pos}Foxp3^{neg} qui augmentent leur expression en CD28 et dont l'interaction avec les molécules CD80 et 86 exprimées par les CPA conditionne leur survie. En effet, l'absence de co-stimulation chez des souris déficientes pour CD28 ou pour CD80/86, entraîne une forte diminution de la proportion en tTregs (**Salomon et al. 2000; Tai et al. 2005; Hinterberger et al. 2011**). Ce signal, combiné à celui du TCR, induit diverses cascades de signalisation et module l'activité de différents facteurs de transcription, conduisant notamment à l'expression de CD25 et à la formation de préTregs (**Figure 16**).

Les études décrites précédemment montrent que les Tregs résistent plus à la sélection négative que les Teffs. La surexpression de GITR par les Tregs leur confère une meilleure résistance à la mort cellulaire induite par l'activation (AICD – Activation-Induced Cell Death) par rapport aux autres LT qui ne l'exprime pas (**Nocentini et al. 1997; Ronchetti 2002; van Santen et al. 2004**). Un autre mécanisme permettant d'expliquer cette résistance implique la liaison entre CD27, exprimé par les Tregs, et son ligand CD70, exprimé par les mTEC et les thyDC. En effet, une fois les préTregs induits, l'IL-2 stabilise les Tregs et le signal donné par l'interaction CD27/CD70 leur permet de survivre à l'apoptose (**Coquet et al. 2013**). De plus, les Tregs surexpriment Bcl-2, molécule anti-apoptotique, et sous-expriment Bim, molécule pro-apoptotique, leur permettant de résister à la mort induite par la sélection négative (**Tischner et al. 2012**).

- **Le rôle des cytokines dans le développement des tTregs**

Plusieurs arguments ont suggéré que la génération des tTregs dépend d'autres facteurs que seulement l'activation du TCR et la co-stimulation. Par exemple, les préTregs CD4^{pos}CD25^{pos}Foxp3^{neg} sont présents immédiatement après la naissance alors que les premiers thymocytes Foxp3^{pos} sont observés à J2,5 de vie (**Fontenot et al. 2005a; Burchill et al. 2008; Lio and Hsieh 2008**).

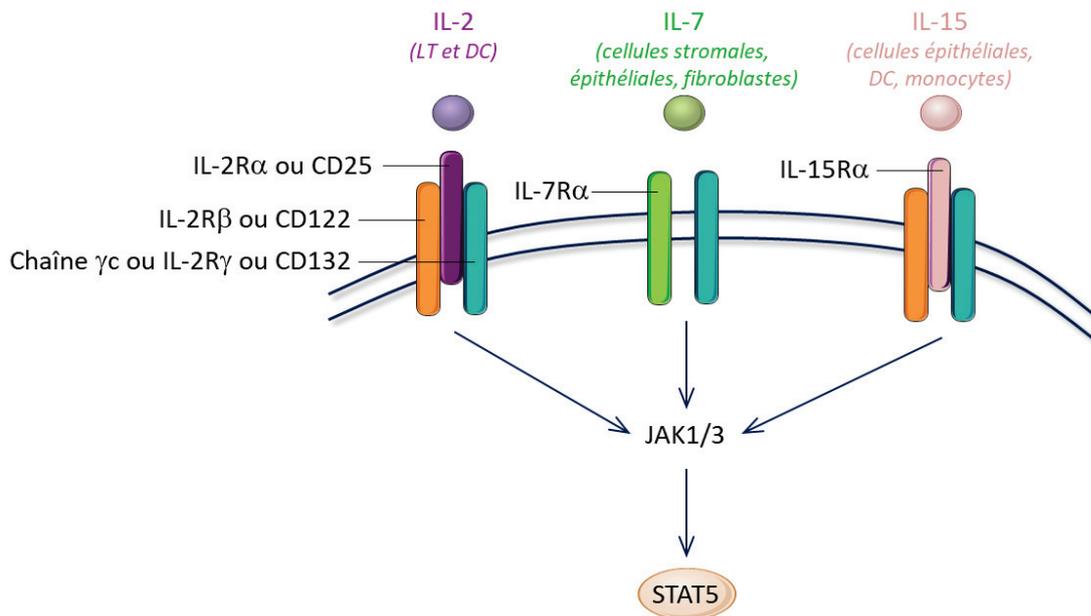


Figure 18: Les récepteurs à l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15.

La chaîne commune γ c appelée aussi IL-2R γ ou CD132 est commune dans les récepteurs pour l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15. Elle l'est également pour les récepteurs à l'IL-4, l'IL-9, l'IL-21 et la TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin). Le récepteur à l'IL-2 (IL-2R), exprimé par les LT, les LB et les NK, est composé de deux autres sous-unités : CD122 ou IL-2R β et CD25 ou IL-2R α . L'IL-7R, récepteur à l'IL-7 n'a que deux sous-unités et est exprimé par les LT, les LB et les DC. Le récepteur à l'IL-15, exprimé par les LT et les NK, partage CD132 avec l'IL-2R β et est également composé de la sous-unité IL-15 α . Ces récepteurs induisent JAK1 et JAK3 qui phosphorylent STAT5 et dans une moindre mesure STAT1 et 3.

Le rôle de l'IL-2, de l'IL-7 et de l'IL-15 dans le développement des tTregs

Les préTregs expriment fortement CD25. L'IL-2 se fixe avec une faible affinité à CD25 ou à l'hétérodimère formé par la chaîne γc (IL-2R γ ou CD132) et l'IL-2R β (CD122), mais son affinité est accrue d'un facteur 1000 quand les trois sous-unités interagissent ensemble avec l'IL-2 (**Figure 18**) (**Waldmann 1989**). Les CD132 et CD122 sont aussi partagés par le récepteur à l'IL-15, et CD132 par le récepteur à l'IL-7, deux cytokines produites en grandes quantités dans le thymus. Au sein de cet organe, l'IL-2 provient majoritairement des thymocytes auto-réactifs, alors que l'IL-7 et l'IL-15 seraient produites par les TEC (**Apert et al. 2017; Hemmers et al. 2019**). Les Tregs sont sensibles à l'IL-2 par leur forte expression en CD25 mais également par l'importante activité de PP1 et PP2A, des phosphatases qui modulent la signalisation à l'IL-2 (**Yu et al. 2015**). Les modèles murins dont les LT n'expriment pas la sous-unité γc sont totalement dépourvus en Tregs (**D'Cruz and Klein 2005; Vang et al. 2008**). Les souris n'exprimant pas l'IL-2 ou CD25 ont une diminution relative du nombre de tTregs par rapport aux souris contrôle et présentent une forte auto-immunité se traduisant par une colite (**Fontenot et al. 2005b; Burchill et al. 2007**). Les souris déficientes en IL-15 ou en STAT5, facteurs communs à la signalisation de l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-7, présentent également un défaut de tTregs contrairement aux souris déficientes en IL-7 (**Fontenot et al. 2005b; Burchill et al. 2007; Vang et al. 2008**). De plus, l'utilisation de souris présentant une forme constitutivement active de STAT5 a permis de montrer que cette voie est induite par l'engagement du TCR et le signal de co-stimulation, favorisant une réponse accrue aux cytokines telle l'IL-2, dont la sensibilité est augmentée par l'expression de CD25 dans les Tregs (**Burchill et al. 2008**). Ainsi, l'engagement du TCR et le signal donné par la co-stimulation assurent aux Tregs une sensibilité à l'IL-2 et à l'IL-15 qui, en induisant STAT5, favorisent l'induction et le maintien de l'expression de *Foxp3* (**Figure 14**).

Le rôle du TGF- β dans le développement des tTregs

Il a longtemps été pensé que le TGF- β ne joue pas de rôle dans la génèse des tTregs. En effet, les souris déficientes pour le récepteur II au TGF- β (TGF- β RII) spécifiquement dans les LT ($CD4^{Cre}$ -TGF- β RII^{flox/flox}) n'ont pas de défaut de fréquence en Tregs dans le thymus à une semaine de vie (**Li et al. 2006a; Marie et al. 2006**). Cependant, l'analyse des thymus de ces souris entre 3 et 5 jours après leur naissance, montre une quasi absence de tTregs (**Liu et al. 2008; Ouyang et al. 2010b**). La restauration du développement des tTregs serait due à une

augmentation des niveaux d'IL-2 dans le thymus, suggérée par l'analyse des souris doublement déficientes pour le TGF- β RI et l'IL-2 (**Liu et al. 2008**). Ces observations suggèrent donc que le TGF- β seul n'induit pas le développement des tTregs mais qu'il aurait un rôle en synergie avec l'IL-2. Le TGF- β a été proposé comme un protecteur du signal apoptotique *via* Bim, induit par la forte stimulation du TCR, protégeant sélectivement les thymocytes Foxp3^{pos} (**Ouyang et al. 2010b**). Cependant, l'inactivation du TGF- β RI spécifiquement dans les Tregs (Foxp3^{Cre}TGF- β RI^{flox/flox}) n'induit aucun défaut de développement des tTregs, suggérant un autre mécanisme anti-apoptotique mis en place par ces cellules (**Konkel et al. 2014**).

Dans le thymus, le TGF- β est sécrété par les thymocytes immatures, qui le libèrent en mourant par apoptose, les TEC et les Tregs matures (**Takahama et al. 1994; Chen et al. 2001b; Marks et al. 2009**). Afin de comprendre le lien entre le TGF- β , l'apoptose et l'induction des tTregs, Konkel *et al.* ont démontré que l'apoptose des thymocytes participe de manière importante à la génération des tTregs (**Konkel et al. 2014**). Cette étude a été menée en partant de deux principes : l'apoptose des thymocytes augmente fortement juste après la naissance et l'apoptose induit la sécrétion de TGF- β (**Surh and Sprent 1994; Fadok et al. 1998; Xiao et al. 2008**). Ainsi, après la naissance, l'augmentation de l'apoptose des thymocytes due à la sélection négative augmente les taux de TGF- β actif et sa signalisation dans les thymocytes, ce qui favorise la différenciation des tTregs (**Konkel et al. 2014**). Suite à cette stimulation cytokinique, les préTregs expriment Foxp3 et deviennent des Tregs matures (**Figure 16**). Cependant, à ce jour, aucun mécanisme moléculaire n'a été publié pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

- **Sortie des tTregs vers la périphérie**

Les tTregs générés vont, pour leur grande partie, quitter le thymus et migrer en périphérie par la circulation sanguine (**Figure 15**). Ces cellules expriment KLF2 qui induit l'expression de la Sphingosin-1-Phosphatase Receptor 1 (S1PR1) et de CD62L permettant l'entrée des LT dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LT qui viennent de sortir du thymus et qui arrivent dans les tissus sont appelés des émigrants thymiques récents ou RTE (Recent Thymic Emigrants) (**James et al. 2018**). Les tTregs en périphérie permettront de contrôler les LT auto-réactifs qui ont échappé à la sélection négative.

b) Les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ générés en périphérie – les pTregs

Alors que les tTregs ont un rôle incontestable dans la régulation de l'auto-immunité et donc dans la tolérance au niveau des tissus, il est également important d'avoir un mécanisme qui renforce la protection physique des muqueuses permettant de lutter contre les pathogènes extérieurs à l'organisme. Bien qu'aujourd'hui aucun marqueur ne permette vraiment de distinguer les tTregs des pTregs en périphérie ou dans le thymus, plusieurs travaux ont mis en évidence le développement et le rôle de ces derniers. Ils participent à la tolérance au microbiote, à l'alimentation, aux allergènes, aux substances chimiques ou encore à la tolérance foeto-maternelle mais ont aussi un rôle dans les maladies infectieuses et dans le cancer (Cools et al. 2007; Curotto de Lafaille et al. 2008; Hadis et al. 2011; Lathrop et al. 2011; Josefowicz et al. 2012b; Samstein et al. 2012).

- Mise en évidence de la génération des pTregs

En 2004, une étude publiée par l'équipe de J. Lafaille et menée avant la découverte de *Foxp3*, démontre qu'*in vivo* des cellules CD4^{pos}CD25^{neg} prolifèrent et acquièrent CD25 en conditions homéostatiques. Ces cellules, dont le développement est dépendant de l'IL-2 sécrétée par les cellules CD4^{pos}CD25^{neg} ou d'une stimulation antigénique, expriment des marqueurs retrouvés sur les tTregs comme CTLA-4, GITR ou CD103, sont anergiques et suppressives *in vitro* (Curotto de Lafaille et al. 2004). En 2005, le développement des Tregs à partir de cellules CD4^{pos} naïves injectées dans des souris RAG2^{KO}, dépourvues en LT, et suite à une stimulation antigénique faible confirme la capacité des LT à acquérir un programme de différenciation Treg en périphérie (Kretschmer et al. 2005).

- Rôle de la stimulation du TCR et de la co-stimulation dans le développement des pTregs

Des études menées chez la souris ont suggéré que le TCR exprimé par les pTregs serait d'haute affinité pour l'antigène. En effet, le transfert de LT CD4^{pos}Foxp3^{neg} avec un TCR transgénique dans des souris RAG2^{KO} ne permet le développement de LT CD4^{pos}Foxp3^{pos} qu'avec un antigène de forte affinité (Gottschalk et al. 2010).

Suite à l'engagement du TCR, la voie PI3K-Akt-mTOR est activée et induit la phosphorylation de Foxo1 et Foxo3 qui seront exportés dans le cytoplasme avant de rentrer dans le noyau, suite à l'arrêt de l'activation de la voie du TCR (Peng 2008) (Figure 17).

Dans les Tregs, la Phosphatase and TENSin homolog (PTEN) mais également CTLA-4 ou PD-1 inhibent la voie Pi3K/Akt et favorisent le maintien de Foxo1 et Foxo3 dans le noyau (**Wang et al. 2016**). Comme décrit précédemment, Foxo1 et Foxo3 participent à l'induction de l'expression de *Foxp3* (**Ouyang et al. 2010a; Kerdiles et al. 2010**). Des cultures *ex vivo* de thymus fœtaux, où l'activité d'Akt a été augmentée, montrent un impact négatif sur le développement des Tregs (**Haxhinasto et al. 2008**). La délétion de régulateurs négatifs d'Akt comme PTEN ou de l'E3 ubiquitin ligase Cbl-b, qui dégrade la PI3K, diminue le développement des Tregs alors qu'il est favorisé en présence d'inhibiteurs de mTOR, permettant à Foxo1 et Foxo3 de se lier au promoteur ainsi qu'au CNS1 et au CNS3 de *Foxp3* (**Battaglia 2005; Sauer et al. 2008; Harada et al. 2010**) (**Figure 14**). L'inhibition de TORC2, qui active Akt et réprime l'expression de *Foxp3*, favorise le développement des pTregs et l'ablation de Foxo1 spécifiquement dans les Tregs conduit au développement d'un syndrome auto-immun mimant celui retrouvé dans les souris Scurfy (**Sauer et al. 2008; Delgoffe et al. 2009; Ouyang et al. 2012**). Ces observations démontrent donc que l'activation de la voie PI3K/Akt inhibe le développement des tTregs mais aussi des pTregs.

Si les tTregs nécessitent un signal de co-stimulation donné par le CD28, les pTregs y sont au contraire réfractaires (**Semple et al. 2011**). Les souris dont les Tregs matures sont délétés pour CD28 (*Foxp3^{Cre}CD28^{fl/fl}*) ont un nombre de tTregs normal mais développent une auto-immunité sévère due à une augmentation de l'apoptose des Tregs ainsi qu'à une diminution de l'expression de PD-1 et CTLA-4 (**Zhang et al. 2013**). Une forte stimulation CD28 bloque le développement des pTregs alors que la molécule co-inhibitrice CTLA-4, induite par le TGF- β et en synergie avec celui-ci, favorise leur génèse (**Zheng et al. 2006; Benson et al. 2007**). L'induction de la voie PD-1/PD-L1, qui inhibe la voie PI3K/Akt par une augmentation de PTEN, favorise le développement des pTregs et leur maintien *in vivo* (**Francisco et al. 2009**).

- **Importance du TGF- β et de l'IL-2 dans le développement des pTregs**

Les études menées *in vitro* sur des cellules murines et humaines montrant qu'il est possible d'induire l'expression de *Foxp3* dans des LT CD4^{pos}Foxp3^{neg} en présence de TGF- β et d'IL-2, ont suggéré la possibilité que les pTregs soient aussi dépendants de ces deux facteurs (**Chen et al. 2003; Fantini et al. 2004; Bettelli et al. 2006**). En l'absence de TGF- β , un défaut de Tregs est observé en périphérie et les Tregs périphériques ont un niveau de *Foxp3* diminué (**Marie et al. 2005**). *In vitro*, il a été démontré que le TGF- β induit la liaison de NFAT et de SMAD3 au CNS1, stimule l'acétylation des histones et permet l'induction de l'expression de *Foxp3* (**Tone et al. 2008**) (**Figure 14**). De plus, le TGF- β inhibe le recrutement de Dnmt1 sur le locus de *Foxp3* et permet la déméthylation de l'ADN et l'activation de l'expression du gène (**Josefowicz et al. 2009**). Cette observation a été confirmée *in vivo*, lorsque l'ablation du CNS1 spécifiquement dans les Tregs (Foxp3^{Cre}CNS1^{fl/fl}) induit un défaut de développement des pTregs dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin sans défaut de génération des tTregs (**Zheng et al. 2010**). Cependant, le rôle du TGF- β sur le développement des pTregs reste encore à déterminer. Seules des expériences permettant de déléter spécifiquement le récepteur au TGF- β dans les Tregs (modèle murin Foxp3-Cre-ERT2) permettrait de répondre clairement à cette question.

En périphérie, l'IL-2 aurait un rôle dans la survie, la prolifération et la stabilité des Tregs en induisant la phosphorylation de STAT5 qui permettra le maintien de l'expression de *Foxp3* en inhibant le développement des Th17 et en participant au maintien de leurs fonctions suppressives (**D'Cruz and Klein 2005; Fontenot et al. 2005b; Laurence et al. 2007; Davidson et al. 2007; Chen et al. 2011; Chinen et al. 2016**).

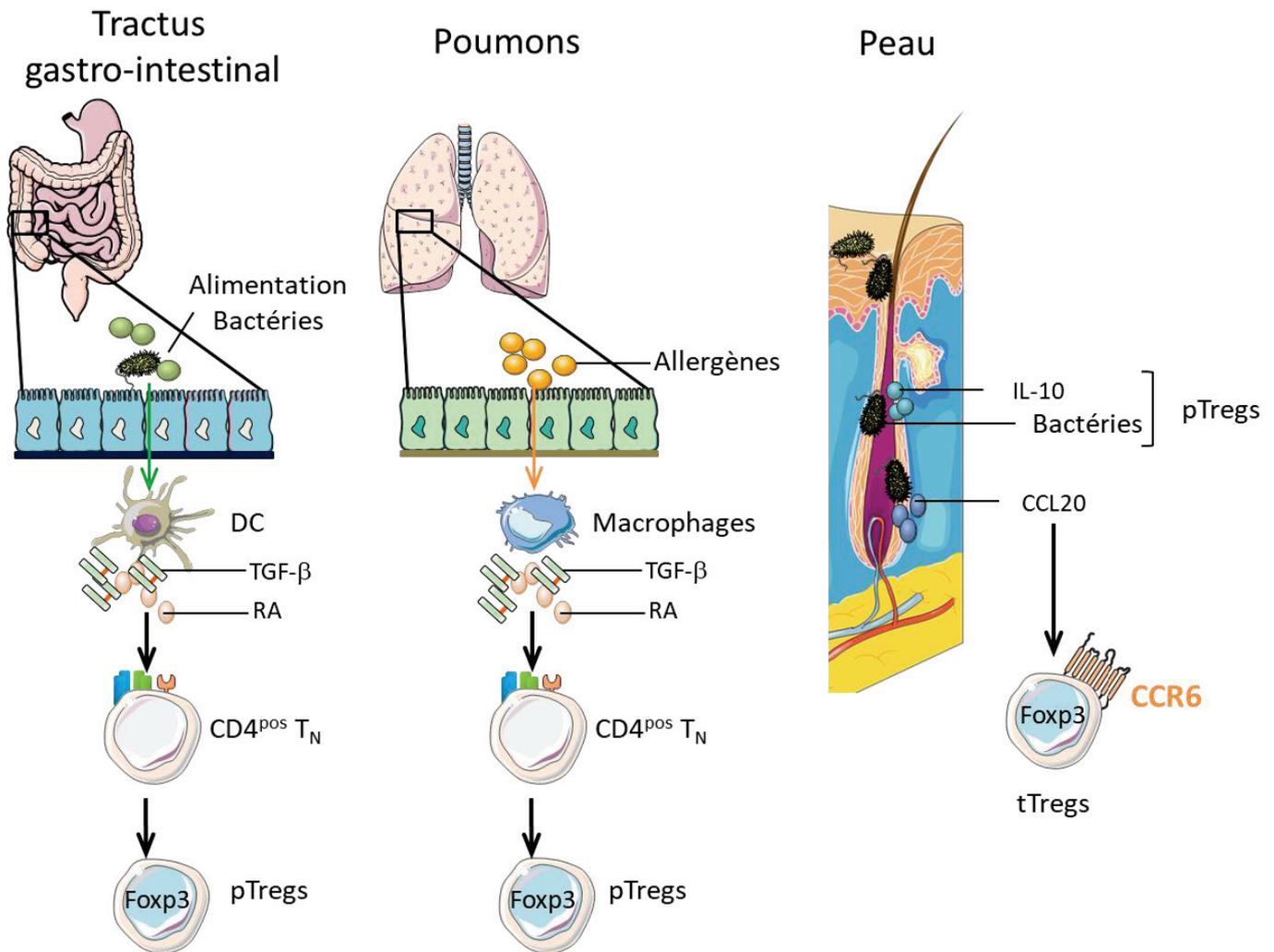


Figure 19: Développement des Tregs en périphérie.

Le tractus gastro-intestinal, les poumons ou la peau sont des sites où la présentation antigénique est fréquente et sont riches en IL-2, en TGF-β, en IL-10 et en RA. Ces conditions permettent le développement de pTregs qui établissent la tolérance périphérique. Ils contrôlent les réponses immunitaires exacerbées et menées par les LT contre les antigènes présents. Ils dialoguent également et de façon directe avec ces antigènes extérieurs à l'organisme, notamment les bactéries, pour contrôler ces réponses et maintenir l'homéostasie tissulaire. Dans la peau, les Tregs ont une origine périphérique par la sécrétion d'IL-10 par les cellules dendritiques du derme ou les bactéries commensales. Ils ont également une origine thymique par leur expression en CCR6 dont le ligand, CCL20, est sécrété par les cellules épithéliales des follicules pileux.

RA : acide rétinoïque.

- Sites d'induction des pTregs

Les études présentées précédemment suggèrent que la génération des pTregs dépend d'un signal du TCR de haute affinité, d'une co-stimulation et de la présence de TGF- β et d'IL-2. Ces conditions sont retrouvées au sein de muqueuses qui sont en contact permanent avec des antigènes du non-soi telles que les intestins ou les poumons, mais également au niveau de la peau. Au niveau de ces zones de barrière, les cellules sont exposées à un environnement très immunogène. Dans la *lamina propria* de l'intestin se trouvent, entre autres cellules, les DC qui capturent des antigènes, bactériens ou alimentaires, et migrent dans les ganglions mésentériques où ils les présentent aux cellules T naïves qui se différencient alors en cellules T spécifiques de l'antigène. Parmi ces DC, on trouve des DC dits tolérogènes (tolDC) qui sécrètent du TGF- β et du RA qui permettrait le développement des pTregs dans la *lamina propria* du tractus digestif ainsi que dans les ganglions mésentériques (Coombes et al. 2007; Sun et al. 2007; Hill et al. 2008) (Figure 19).

L'activation de la signalisation du TGF- β permet la liaison de SMAD3 au CNS1 de *Foxp3* et le RA induit l'acétylation des histones au niveau de son promoteur, participant à son expression (Kang et al. 2007; Xu et al. 2010) (Figure 14). Les souris *Foxp3^{Cre}CNS1^{fl/fl}* présentent une dérégulation de l'immunité intestinale et pulmonaire due à un défaut de pTregs conduisant au développement de cellules de type Th2 inflammatoires, impliquées dans les réactions allergiques, ainsi qu'à une perturbation du microbiote intestinal qui amplifie la dérégulation de l'homéostasie des Tregs (Josefowicz et al. 2012b). Le rôle du microbiote dans le développement des Tregs a été démontré chez les souris dépourvues de microbiote (Germ-Free mice), où les Tregs sont présents en moindre quantité (Östman et al. 2006). Les bactéries comme *Clostridium* ou *B. fragilis*, induisent le développement des pTregs et leur sécrétion en IL-10 (Round and Mazmanian 2010; Atarashi et al. 2011; Geuking et al. 2011). Les bactéries du genre *Clostridium* et la fermentation des fibres alimentaires entraînent la production de butyrate qui inhibe HDAC et permet une meilleure stabilité et fonctionnalité de *Foxp3* dans les pTregs (Arpaia et al. 2013).

D'autres modèles dont la présentation antigénique chronique et/ou l'inflammation est récurrente, participent au développement des pTregs comme l'asthme, les colites induites par la prolifération de cellules T dans un environnement lymphopénique ainsi que l'infection par des parasites intestinaux (Curotto de Lafaille et al. 2008; Haribhai et al. 2009; Grainger et al. 2010; Weiss et al. 2012).

Un cas intéressant est la capacité des helminthes à produire une molécule très proche du TGF- β qui est capable de générer des pTregs et d'induire des mécanismes de tolérance au niveau des muqueuses (**Grainger et al. 2010**).

En plus des DC, les macrophages (MP) participent également au développement des pTregs. Les MP issus de poumons murins et humains sécrètent de grandes quantités de TGF- β et induisent le développement des iTregs. Les MP résidents dans les poumons expriment de manière constitutive du TGF- β et les Retinal dehydrogenases (RALDH)-1 et -2, impliquées dans la régulation de la production du RA. Ainsi, la présentation antigénique des MP aux LT, associée à un environnement tolérogène, permettrait le développement des pTregs (**Soroosh et al. 2013**) (**Figure 19**).

Dans la peau, une vague d'apparition de Tregs activés a été démontrée chez la souris entre 6 à 13 jours après leur naissance (**Scharschmidt et al. 2015; Ali and Rosenblum 2017**). Ces Tregs ont une origine périphérique par influence du microbiote présent sur la peau mais peuvent également être recrutés par leur expression en CD103 et CCR4 (**Figure 19**) (**Scharschmidt et al. 2017; Ali and Rosenblum 2017**). Leur différenciation et/ou maintien dépend aussi de la sécrétion d'IL-10 par les DC du derme ou de l'interaction entre les Tregs et les cellules de Langherans. Mais une source thymique a également été démontrée, notamment par la migration de DC de la peau dans le thymus. Les tTregs, qui expriment CCR6, y sont recrutés par l'environnement riche en CCL20 sécrétée par les cellules épithéliales des follicules pileux (**Scharschmidt et al. 2017**).

c) Les Tregs recirculants dans le thymus

Après la sélection positive et donc la fin de la recombinaison des gènes du TCR, l'expression du gène RAG2 est rapidement inhibée. Les souris RAG2^{KO}GFP; Foxp3-Thy1.1^{POS} permettent de distinguer par cytométrie les Tregs (Thy1.1^{POS}), les cellules nouvellement générées (GFP^{POS}) et les cellules générées plus anciennement qui seront GFP^{NEG}, la GFP ayant une demi-vie de 56 heures. Ainsi, en utilisant ce modèle, Thiault *et al.* ont pu caractériser les Tregs retrouvés dans le thymus à l'âge adulte (**Thiault et al. 2015**). À ce stade, les Tregs du thymus sont majoritairement recirculants et s'y retrouvent grâce à leur expression en CXCR4. Ces Tregs ont un phénotype activé et partagent l'expression de gènes associés à des Tregs résidents dans les tissus musculaire ou adipeux. Les Tregs recirculants inhibent la

production de tTregs dans la médulla afin de limiter la génération de nouveaux clones de tTregs qui entreraient en compétition avec le large répertoire qui existe en périphérie (**Thiault et al. 2015**). L'identification de certains marqueurs moléculaires chez la souris a permis de suggérer l'existence d'un mécanisme similaire chez l'Homme (**Thiault et al. 2015**). Toutefois, si les auteurs se basent sur différentes observations prouvant qu'il s'agisse bien de Tregs recirculants, il n'est pas impossible qu'une partie de ces cellules provienne de Tregs n'ayant jamais quitté le thymus comme il a pu être proposé (**Yang et al. 2014**).

d) Différence entre Tregs thymiques et Tregs périphériques

Les pTregs ont longtemps été différenciés des tTregs sur la base de l'expression des molécules Neuropilin-1 (Nrp1) et Helios, codé par le gène *Ikzf2*. En 2010, il est suggéré qu'Helios est un marqueur spécifique des tTregs car il est non observable dans les iTregs mais retrouvé dans 100% des tTregs et seulement dans 70% des pTregs (**Thornton et al. 2010**). En 2012, cette théorie est contredite par des expériences montrant que les pTregs induits par une stimulation antigénique répétée et les LT activés expriment aussi Helios (**Akimova et al. 2011; Gottschalk et al. 2012**). Le rôle d'Helios dans les Tregs a été démontré plus récemment. Les souris dont Helios est délété spécifiquement dans les Tregs développent une maladie auto-immune à partir de l'âge de 2 mois en conséquence d'une lymphoprolifération. Helios participerait donc au contrôle de certaines fonctions suppressives des Tregs qui reste à définir (**Sebastian et al. 2016**).

L'expression de Nrp1, dépendante du TGF- β mais pas de la stimulation du TCR, a aussi été associée aux tTregs et n'est pas retrouvée dans les iTregs ou dans les pTregs des muqueuses (**Weiss et al. 2012; Yadav et al. 2012**). Contrairement à Helios, l'absence de Nrp1 dans les LT n'induit pas de phénotype dommageable ni de défaut dans la différenciation des tTregs chez la souris (**Corbel et al. 2007**). De plus, même si une forte expression d'Helios corrèle avec celle de Nrp1, une partie des Tregs exprimant faiblement Helios exprime fortement Nrp1 dans les ganglions périphériques, ces deux marqueurs ne peuvent donc être associés aux tTregs (**Schliesser et al. 2013**).

Aujourd'hui, et grâce à la connaissance de la régulation épigénétique de *Foxp3*, il semble que la déméthylation du CNS1 soit associée aux pTregs, et celui du CNS3 aux tTregs, mais aucun marqueur extracellulaire en rapport avec cet état de méthylation n'a encore été découvert afin de faciliter l'étude de ces cellules (**Zheng et al. 2010; Josefowicz et al. 2012b**).

e) Plasticité et stabilité des Tregs

Une diminution de l'expression de *Foxp3* dans les Tregs est observée en cas d'inflammation associée à l'auto-immunité, suite à l'activation des Tregs en conditions inflammatoires ou après transfert dans des souris lymphopéniques (**Wan and Flavell 2007; Xu et al. 2007; Yang et al. 2008; Komatsu et al. 2009; Duarte et al. 2009**).

L'utilisation de souris $Foxp3^{GFP-Cre}Rosa26^{YFP}$ dont l'expression de *Foxp3* dans les Tregs est matérialisée par la GFP, permet aussi l'expression de la Cre recombinase qui excise le codon STOP et permet de maintenir la lecture des ribosomes sur le promoteur Rosa26, ainsi que l'expression constitutive de la YFP (Yellow Fluorescent Protein) dans toutes les cellules qui expriment ou qui ont exprimé *Foxp3* (**Zhou et al. 2009**). *In vivo*, les Tregs qui perdent l'expression de *Foxp3*, les exTregs ($GFP^{neg}YFP^{pos}$), proviennent aussi bien des tTregs que des pTregs. Ces cellules ont un phénotype de cellules activée-mémoire qui produisent de l'IFN- γ et de l'IL-17. Leur proportion augmente dans les sites inflammatoires lors de pathologies auto-immunes. De plus, ces cellules sont pathogéniques car l'injection d'exTregs chez la souris induit des maladies auto-immunes (**Zhou et al. 2009**).

Cette instabilité du programme des Tregs est due en partie à l'environnement cytokinique particulier des tissus inflammés. La présence d'IL-6 et d'IL-1 β activent STAT3 qui inhibe l'expression de *Foxp3* corrélant avec une augmentation de la méthylation du TSDR des exTregs (**Zhou et al. 2009**). Le rôle de STAT3 dans la plasticité des Tregs est aussi suggéré par la surexpression du facteur de transcription E47 dans les Tregs en lien avec une diminution de l'expression de *Foxp3* (**Rauch et al. 2016**). En effet, E47 induit l'expression de Spib et de Suppressor Of Cytokine Signaling 3 (SOCS3), induit par STAT3, qui inhibent la transcription de *Foxp3*.

En accord avec Zhou *et al.*, en utilisant des souris $Foxp3^{GFP-Cre}Rosa26^{RFP}$, d'autres travaux montrent qu'une partie des pTregs, mais non des tTregs, exprimant faiblement CD25 et étant partiellement méthylés au niveau du TSDR, perdent l'expression de *Foxp3* (**Miyao et al. 2012**).

La *Nrp1*, non impliquée dans les fonctions suppressives des Tregs, participerait à la stabilité de l'expression de *Foxp3* (**Delgoffe et al. 2013**). En effet, la liaison de Sema4a à la *Nrp1* active PTEN qui inhibe l'activation d'Akt et empêche l'export nucléaire de Foxo3a.

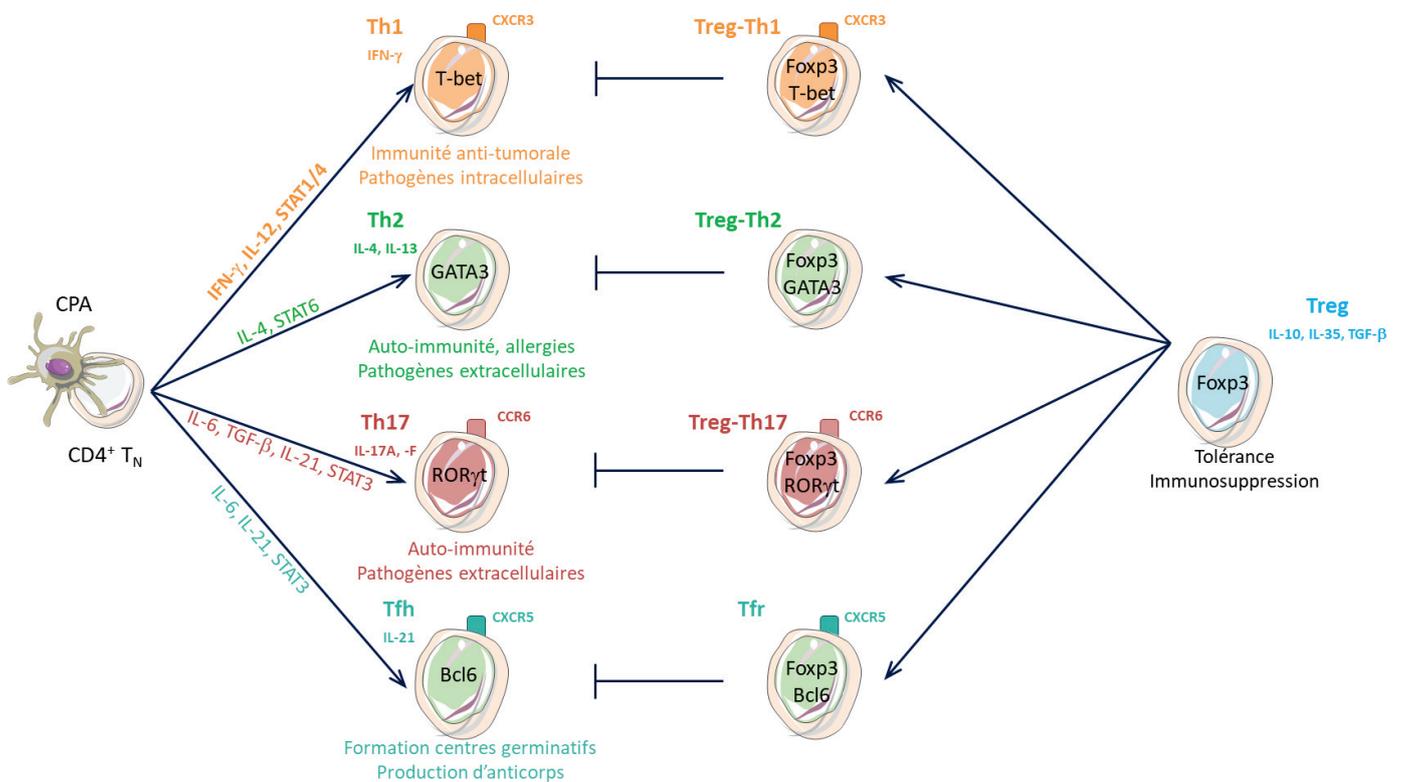


Figure 20: Différenciation et suppression des LT CD4^{pos} effecteurs par les Tregs.

Suite à la stimulation du TCR par les CPA et en présence d'un environnement cytokinique particulier, l'engagement des voies de signalisation sous-jacentes permet la différenciation des LT CD4^{pos} naïfs (CD4^{pos}T_N) en sous types de LT tels les Th1, les Th2, les Th17 ou les Tfh. Dans les sites inflammatoires, ces cellules seront présentes et les Tregs y seront recrutés afin d'inhiber les réponses immunitaires médiées par ces Tconv. Ces Tregs vont alors acquérir l'expression de récepteurs aux chimiokines facilitant leur recrutement au site en question. Ils vont également acquérir l'expression de facteurs de transcription spécifique de ces LT afin d'établir une réponse suppressive plus adaptée.

Tfh : lymphocytes T folliculaires helper ; *Tfr* : lymphocytes T folliculaires régulateurs.

Cependant, l'absence de Nrp1 dans les LT n'induit pas de phénotype dommageable ni de défaut de la différenciation des Tregs chez la souris **(Corbel et al. 2007)**.

Les Tregs, recrutés dans les sites inflammatoires dans le but de réguler la réponse immunitaire, peuvent acquérir des caractéristiques de Teffs qui sont à l'origine de cette inflammation, afin de mieux les cibler. Ainsi, les Tregs peuvent exprimer des facteurs de transcription spécifiques comme T-bet (Th1), GATA-3 (Th2) ou ROR γ t (Th17) ainsi que les récepteurs aux chimiokines associés, favorisant leur localisation sur le site d'inflammation **(Josefowicz et al. 2012b) (Figure 20)**.

IRF4, facteur de transcription impliqué dans le développement des Th2 et des Th17, est induit par Foxp3. La délétion d'IRF4 spécifiquement dans les Tregs provoque le développement d'une auto-immunité sévère avec une réponse de type Th2 exacerbée **(Zheng et al. 2009)**. IRF4 coopère avec Blimp-1 afin de réguler le développement des Tregs de type Th2 permettent de contrôler les réponses inflammatoires **(Cretney et al. 2018)**.

La délétion de STAT3 ou de T-bet spécifiquement dans les Tregs, mène à une inflammation sévère non contrôlée qui implique les Th17 ou les Th1, respectivement. Les Tregs déficients pour STAT3 expriment moins CCR6, et ceux déficients en T-bet expriment moins CXCR3 **(Chaudhry et al. 2009)**. De même, l'augmentation de Bcl-6 dans les Tregs leur permet d'acquérir CXCR5 et de se diriger davantage vers les centres germinatifs afin de contrôler les Tfh (T folliculaires helpers) et donc la réponse aux anticorps **(Linterman et al. 2011; Wollenberg et al. 2011)**.

La question de la stabilité des Tregs ainsi que la différence entre tTregs et pTregs nécessitent encore davantage de recherches car il est peu clair si cette instabilité contribue ou non au développement de diverses pathologies. Par ailleurs, les mécanismes qui initient l'acquisition de traits phénotypiques des Teffs, sur la base de l'expression des récepteurs aux chimiokines, est pour lors non compris.

CHAPITRE 2: Synthèse, activation et fonction du TGF- β

Le TGF- β est une cytokine multifonctionnelle, ubiquitaire et hautement conservée chez tous les mammifères. Cette cytokine, sécrétée par de nombreuses cellules, est impliquée dans plusieurs fonctions comme la différenciation, la prolifération, la migration, la survie, l'apoptose ; mais également dans l'embryogénèse, la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC), la modulation de l'inflammation ou la réparation tissulaire. Au niveau du système immunitaire, cette cytokine joue un rôle majeur dans l'homéostasie et la régulation des fonctions cellulaires, comme il a notamment été démontré sur le développement des Tregs. Le TGF- β a un rôle également important sur le développement et la progression tumorale qui sera davantage décrit au cours de ce manuscrit.

La superfamille du TGF- β comprend 32 membres divisés en deux sous-familles selon la similarité de leurs séquences génomiques et leurs fonctions: les Bone Morphogenetic Protein (BMP) et le TGF- β . La sous-famille des BMPs comporte 9 BMPs, le Growth Differentiation Factor (GDF)-5 et -9 et l'hormone anti-mullérienne. La sous-famille du TGF- β contient les trois isoformes du TGF- β (TGF- β 1, 2 et 3), les activines A et B, la protéine Nodal, la myostatine ou GDF8 ainsi que d'autres membres des GDF (GDF1, 3, 9 et 11) (**David and Massagué 2018**).

Chez les mammifères, les trois isoformes du TGF- β , de nature polypeptidique, sont codées par trois gènes distincts ayant une homologie de séquence proche à plus de 70% (**Travis, M. A. & Sheppard 2014**). Bien que ces trois isoformes partagent un même récepteur, leurs actions ne sont pas redondantes mais peuvent être complémentaires.

1) Les trois isoformes du TGF- β : source et fonctions

Tout comme le TGF- β 3, le TGF- β 2 est majoritairement exprimé au niveau de l'appareil reproducteur mais également dans les poumons et le cerveau. Le TGF- β 3 est aussi retrouvé exprimé dans les tissus hépatique et musculaire (<http://www.proteinatlas.org>). Au sein du système immunitaire, l'isoforme majeure est le TGF- β 1 (**Li et al. 2006**; <http://www.immgen.org>; <http://www.proteinatlas.org>). Chez l'Homme, le TGF- β 1 est très fréquemment retrouvé surexprimé dans les tumeurs (**Teicher 2007**).

Les souris déficientes en TGF- β 1 meurent à 50% au stade embryonnaire suite à un défaut de vasculogénèse et de développement hématopoïétique (**Dickson et al. 1995**). Les animaux qui survivent après leur naissance développent une auto-immunité sévère et multifocale,

accompagnée d'une infiltration lymphocytaire massive dans les poumons et le cœur, et succombent à l'âge de 4 à 5 semaines (**Shull et al. 1992; Kulkarni et al. 1993**). La délétion de *Tgfb2* conduit à une mort périnatale due à un défaut d'organogénèse multiple atteignant entre autres l'appareil oculaire, urinaire et les poumons (**Sanford et al. 1997**). Les souris déficientes pour le TGF- β 3 ne souffrent pas de mort périnatale mais succombent peu après leur naissance suite à un défaut de développement pulmonaire et vasculaire. Au stade embryonnaire, les animaux ont un défaut de fusion de la fente palatine avec une pénétrance de 100%, contrairement aux souris déficientes pour le TGF- β 2 dont uniquement 20% présentent ce défaut (**Brunet et al. 1995; Proetzel et al. 1995; Sanford et al. 1997**).

Chez l'Homme des mutations de *TGFB1* sont associées à la mucoviscidose et au syndrome Camurati-Engelmann, caractérisé par une atteinte osseuse et musculaire. Une mutation du gène *TGFB2* est associée au développement du glaucome congénital de Peters. Concernant les mutations touchant le gène *TGFB3*, elles provoquent des dysplasies ventriculaires et un anévrisme familial de l'aorte thoracique (<http://www.orpha.net>).

Si *in vitro* une redondance et une fonctionnalité des différentes isoformes sont largement observées, *in vivo* les différentes invalidations conduisent à des phénotypes différents, suggérant une spécificité de la fonctionnalité mais également la présence d'une sécrétion locale formant une niche enrichie en un type d'isoforme.

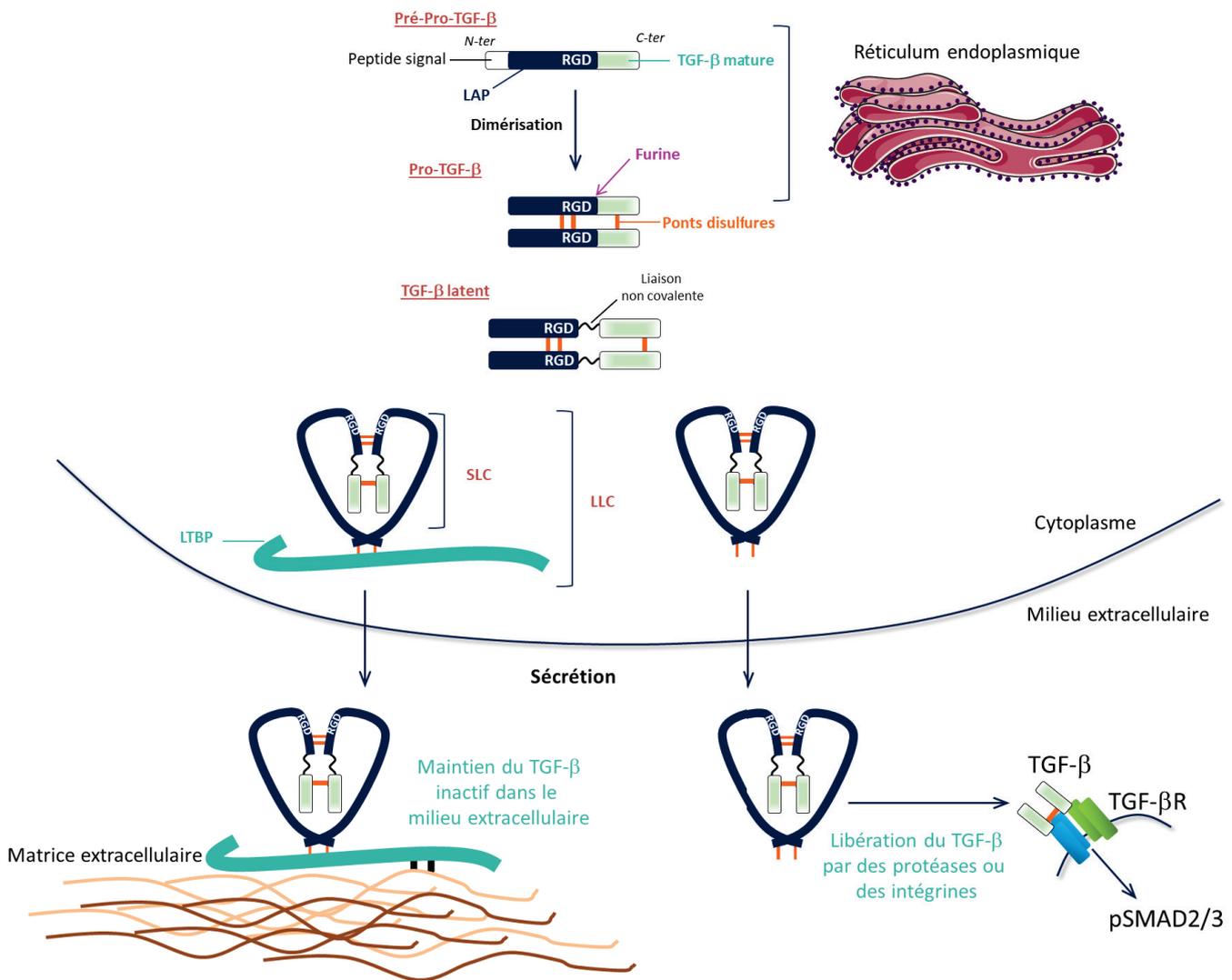


Figure 21: Synthèse et sécrétion du TGF-β.

Le TGF-β est synthétisé en pré-pro-TGF-β composé d'un peptide signal, qui le dirige vers le réticulum endoplasmique, d'une région de latence (LAP) et de la cytokine mature. Suite à la dimérisation, le pro-TGF-β est constitué d'un dimère relié par des ponts disulfures. Clivé par une furine, le LAP et le TGF-β se trouvent alors liés par des liaisons non-covalentes, il s'agit du SLC. Le LAP va alors se replier autour du TGF-β mature, masquant son site de liaison à son récepteur, le rendant inactif. Cette forme latente du TGF-β peut être sécrétée ainsi ou se lier au LTBP, formant le LLC. Le LLC sera sécrété et le TGF-β sera maintenu inactif par des liaisons covalentes entre les protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine ou la fibrilline par l'action de transglutaminases, et la région N-terminale du LTBP. Le TGF-β latent sécrété sera soumis à des protéases, des intégrines ou des forces de rétention permettant le relargage du TGF-β actif par le démasquage des sites de liaison à son récepteur.

LAP: Latency Associated Peptide; LLC: Large Latent Complex; LTBP: Latent TGF-β Binding Protein; SLC: Small Latent Complex.

II) La biosynthèse du TGF- β

a) Structure et sécrétion

Les trois isoformes du TGF- β sont synthétisées sous forme de précurseurs, appelé le pré-pro-TGF- β , au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (**Figure 21**). Le pré-pro-TGF- β est composé de trois sous-unités : un peptide signal lui permettant de se diriger vers le réticulum endoplasmique (RE), une région en N-terminale appelée LAP (Latency-Associated Peptide) qui confère la latence au TGF- β , et un petit domaine en C-terminal qui constitue le TGF- β mature. Suite au clivage du peptide signal à la membrane du RER, le polypeptide LAP/TGF- β , appelé aussi pro-TGF- β , se trouve dans le lumen du RE où il forme un dimère relié par des ponts disulfures. Il est alors clivé une deuxième fois par la furine entre le LAP et le TGF- β , formant un homodimère de 25 kDa (**Dubois et al. 1995, 2001**). Cette forme constitue le petit complexe latent ou Small Latent Complex (SLC). Le SLC représente la forme mature mais inactive du TGF- β . En effet, le LAP masque le site de fixation du TGF- β à son récepteur, empêchant l'induction de sa signalisation (**Gentry et al. 1988; Miyazono et al. 1991; Travis and Sheppard 2014**). Une analyse cristallographique a permis de mettre en évidence la structure tridimensionnelle du TGF- β latent (**Shi et al. 2011**). Celle-ci est composée de deux monomères LAP qui entourent le dimère de TGF- β mature, formant un anneau. Au niveau de la région N-terminale, les LAP se superposent. Au niveau de la région C-terminale, les LAP sont liés par deux ponts disulfures. Proche de la région C-terminale, se trouve un motif RGD (arginine-glycine-aspartate) ainsi que des résidus cystéines en position 33 (Cys33) (**Figure 21**).

- *Le LTBP – gardien du TGF- β inactif dans la matrice extracellulaire*

Dans de nombreux types cellulaires, en parallèle de la dimérisation du pro-TGF- β dans le RE, est produit le Latent TGF- β Binding Protein (LTBP). Le LTBP est une glycoprotéine de 120-140 kDa qui se lie au LAP/TGF- β par des ponts disulfures formés entre ses cystéines et les Cys33 de chaque monomère du LAP. Ce complexe est appelé le grand complexe latent ou Large Latent Complex (LLC). Les LTBP sont des protéines de la MEC comprenant 4 isoformes : LTBP1, 2, 3 et 4, qui diffèrent selon leur structure, leur profil d'expression tissulaire et leur affinité aux différentes isoformes du TGF- β . LTBP1 et 3 se lient aux trois isoformes alors que LTBP4 se lie uniquement au TGF- β 1 (**Miyazono et al. 1991; Saharinen and Keski-Oja 2000**) (**Figure 21**).

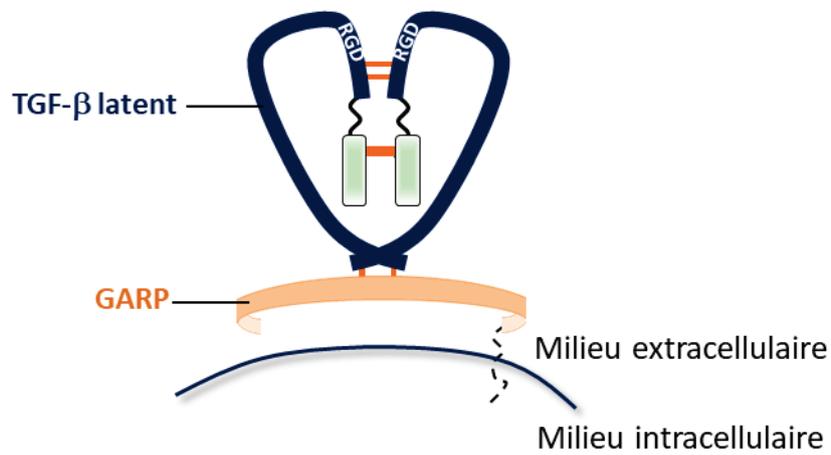


Figure 22: Liaison de GARP au TGF-β latent à la surface cellulaire.

Le TGF-β latent sécrété se lie à GARP par des ponts disulfures et est ainsi retenu à la membrane cellulaire sous une forme inactive. Des forces contractiles, notamment avec les intégrines (intégrines $\alpha\beta 6$ et $\alpha\beta 8$), permettent de relâcher le TGF-β actif qui peut alors se lier à son récepteur.

GARP : Glycoprotein A Repetition Predominant Protein.

Une fois sécrété, le LLC peut être retenu dans la MEC par des interactions covalentes entre la région N-terminale du LTBP et les protéines de la MEC comme la fibrilline ou la fibronectine suite à l'action des enzymes extracellulaires, les transglutaminases **(Travis and Sheppard 2014) (Figure 21)**. Le LTBP permet ainsi le stockage du TGF- β latent dans la MEC.

- **GARP – gardien du TGF- β inactif à la surface des cellules**

Le TGF- β sécrété peut également s'ancrer à la membrane plasmique en se liant à la Glycoprotein A Repetition Predominant Protein (GARP), codée par *Lrrc32*. Cette protéine transmembranaire, riche en répétitions de leucine, se lie au LAP/TGF- β par des ponts disulfures entre ses deux cystéines (Cys-192 et 331) et les deux Cys-4 du LAP/TGF- β **(Wang et al. 2012) (Figure 22)**. L'expression de GARP est restreinte à l'endothélium, aux plaquettes et aux Tregs activés **(Tran et al. 2009b; Wang et al. 2009; Stockis et al. 2009)**. Contrairement aux LTBP qui sont exprimés de manière ubiquitaire, le profil d'expression de GARP suggère une implication préférentielle dans le TGF- β fourni au niveau du système immunitaire **(Rifkin 2005; Wang et al. 2008b)**. L'invalidation de l'expression de GARP par siRNA dans les Tregs humains conduit à une diminution de leurs capacités suppressives *in vitro* et la délétion de GARP, chez la souris, entraîne un défaut d'induction des iTregs et des Th17, dont les mécanismes sont dépendants du TGF- β **(Tran et al. 2009b; Wang et al. 2009; Stockis et al. 2009; Edwards et al. 2013)**. La génération de souris CD4^{Cre}GARP^{fl/fl} par l'équipe d'E. Shevach démontre que l'absence de GARP n'est pas associée à une auto-immunité ni aux fonctions suppressives des Tregs *in vitro* **(Edwards et al. 2013)**. En 2015, le rôle de GARP associé à l'activation du TGF- β est démontré par l'utilisation d'anticorps bloquant spécifiquement cette protéine **(Cuende et al. 2015)**. En effet, l'anti-GARP bloque l'activation du TGF- β *in vitro* par des Tregs humains et inhibe l'immunosuppression médiée par les Tregs humains *in vitro* ainsi qu'*in vivo* dans un modèle de rejet de greffe **(Cuende et al. 2015)**. Ces résultats contradictoires entre les approches humaines et murines, peuvent être expliqués par le fait qu'*in vivo*, l'absence de GARP dans les Tregs peut être compensée par d'autres mécanismes mis en place par les Tregs dans l'activation du TGF- β . La récente structure cristallographique de la liaison entre GARP et le TGF- β latent a permis de caractériser les sites d'interaction et de comprendre comment GARP, une molécule chaperone, oriente la cytokine pour qu'elle soit activée par les intégrines et notamment l'intégrine $\alpha\beta 8$ comme il l'a été suggéré en 2014 **(Edwards et al. 2014; Liénart et al. 2018)**.

III) L'activation du TGF- β

Toutes les cellules sécrètent le TGF- β sous sa forme inactive, associée ou non au LTBP ou à GARP, où le LAP masque le site de fixation du TGF- β à son récepteur empêchant toute signalisation. Sous cette forme, le TGF- β 1 latent a une demi-vie d'environ 100 minutes alors que celle du TGF- β actif n'est de l'ordre que de 2 à 3 minutes (**Wakefield et al. 1990**). Cette forme de sécrétion permet une régulation fine des effets du TGF- β et une rapide mobilisation de sa forme active dans l'environnement extracellulaire. Plusieurs mécanismes d'activation du TGF- β ont été décrits et diffèrent d'un type cellulaire à l'autre.

a) L'activation du TGF- β par des facteurs physico-chimiques

Différents paramètres physico-chimiques peuvent intervenir dans l'activation du TGF- β comme les radiations ionisantes, les détergents, les ROS (Reactive Oxygen Species), la chaleur, les forces de cisaillement ou un pH acide. Bien que tous ces facteurs activent le TGF- β *in vitro*, la relevance *in vivo* n'est pas totalement confirmée car de nombreux autres facteurs entrent en jeu comme l'environnement cellulaire, la MEC, les protéines présentes et/ou les cellules impliquées.

- Le TGF- β inactif peut être activé par des radiations ionisantes *in vitro*. *In vivo*, des radiations au niveau du tissu mammaire induisent une fibrose qui est, en partie, due à l'activation du TGF- β (**Barcellos-Hoff et al. 1994**).
- Il a été démontré indirectement qu'*in vitro* et *in vivo*, les ROS permettent l'activation du TGF- β par catalysation du LAP (**Barcellos-Hoff et al. 1994; Barcellos-Hoff and Dix 1996**).
- Les forces de cisaillement ou le mouvement cellulaire prolongé auxquels sont exposées les plaquettes activent une partie du TGF- β lié au LTBP (**Ahamed et al. 2008**). Les forces biophysiques, intracellulaires ou avec la MEC sont encore mal décrites mais pourraient contribuer à l'activation du TGF- β .
- Le TGF- β latent peut être activé *in vitro* par un pH acide (pH4.5) qui permet une dénaturation protéique du LAP et le relargage du TGF- β actif (**Lyons 1988**). *In vivo*, quelques études sur le remodelage osseux suggèrent un rôle du pH dans l'activation du TGF- β , important dans ce processus (**Chen et al. 2012**). En effet, lors de la résorption osseuse, les ostéoblastes créent une matrice osseuse riche en TGF- β latent et les ostéoclastes, se trouvant à l'état actif, créent un environnement très acide en relarguant des protons dans le milieu qui activerait le TGF- β *in vitro* (**Oreffo et al. 1989**). Néanmoins, aucun résidu du TGF- β

latent n'a été mis en évidence dans le voisinage des ostéoclastes, la relevance physiologique de cette activation reste donc encore à déterminer.

b) L'activation protéolytique du TGF-β

Plusieurs études menées *in vitro*, ont montré une activation du TGF-β par diverses enzymes telles la plasmine ou les métalloprotéinases (MMP)-2 et -9 (**Sato 1989; Yu and Stamenkovic 2000**). La structure cristallographique du LAP/TGF-β a permis de mettre en évidence des sites protéolytiques accessibles à ces enzymes (**Shi et al. 2011**).

L'ajout de plasmine sur des cultures de fibroblastes ou de fibrosarcomes (lignée HT-1080) engendre une augmentation du relargage de TGF-β et de LTBP clivé. Cette observation suggère que le relargage du TGF-β latent, associé au LTBP par des cellules fibroblastiques, est dû à un clivage protéolytique par la plasmine (**Taipale 1994**). D'autres études ont permis de démontrer l'activation du TGF-β par la plasmine sur des péricytes ou des cellules endothéliales, activation inhibée par la présence d'un anticorps bloquant LTBP1 (**Flaumenhaft et al. 1993**).

In vivo, une délétion de ces enzymes comme le plasminogène, ces activateurs ou des MMP, n'ont pu permettre de mettre en évidence une fonction de la perte de l'activation du TGF-β.

- L'activation du TGF-β par la Thrombospondine-1

La Thrombospondine-1 (TSP-1) est une protéine de la MEC sécrétée par les fibroblastes, les plaquettes et les cellules endothéliales. TSP-1 possède un peptide dont la séquence (KRFK) se lie à une séquence spécifique du LAP (LSKL). Cette liaison induit une dissociation entre le LAP et le TGF-β, permettant le relargage de la cytokine active (**Schultz-Cherry et al. 1995; Ribeiro et al. 1999a**). D'autres études *in vitro* ont démontré également une liaison du TGF-β à TSP-1 (**Murphy-Ullrich et al. 1992**). L'ajout de TSP-1 ou du peptide KRFK induit l'activation du TGF-β latent en perturbant la liaison non covalente entre le LAP et le TGF-β (**Murphy-Ullrich and Poczatek 2000**). Les souris déficientes pour TSP-1 développent une inflammation pulmonaire ainsi qu'un phénotype auto-immun, néanmoins moins sévère que les souris déficientes pour le TGF-β1 (**Lawler et al. 1998**). De manière intéressante, le traitement de ces souris avec un peptide KRFK diminue le développement de l'inflammation au niveau des poumons et du pancréas. Si cette étude montre, *in vivo*, l'importance de TSP-1 dans l'activation du TGF-β, des études menées sur l'activation du TGF-β par des plaquettes,

source riche en TSP-1, n'ont montré aucune différence entre des animaux sauvages ou déficients pour TSP-1 (**Abdelouahed et al. 2000**).

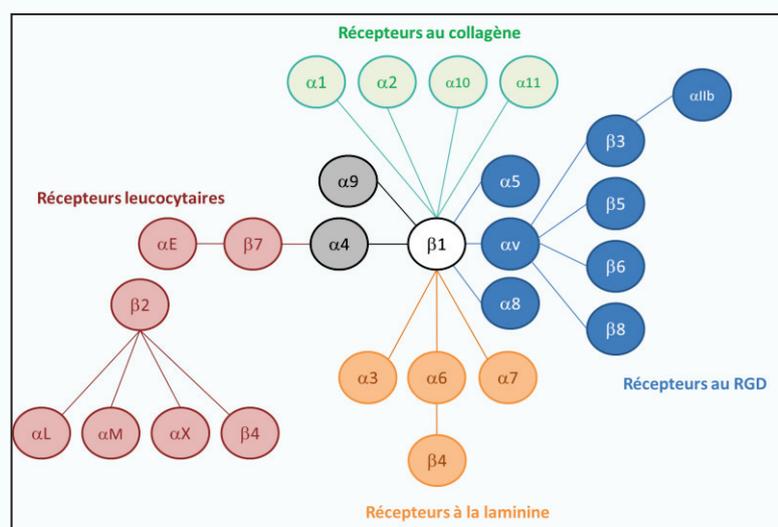
- ***L'activation du TGF- β par la Neuropilin-1***

La Nrp1 est une molécule impliquée dans le guidage axonal, dont le ligand est la sémaphorine 3A, et dans l'angiogenèse se liant au facteur de croissance endothélial (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor) et à son récepteur (VEGF-R). Au sein du système immunitaire, la Nrp1 est exprimée par les DC et par les Tregs (**Tordjman et al. 2002; Bruder et al. 2004**). Il a été suggéré que la Nrp1 pouvait être impliquée dans l'activation du TGF- β notamment à la surface des LT et de quelques lignées tumorales (**Glinka and Prud'homme 2008; Glinka et al. 2011**). Le mécanisme associé est mal connu mais des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de démontrer que la partie C-terminale du LAP/TGF- β se lie à Nrp1 (**Glinka and Prud'homme 2008**). La Nrp1 pourrait donc jouer un rôle de co-récepteur du TGF- β , capable de capturer le LAP/TGF- β et d'activer le TGF- β (**Glinka et al. 2011**). Une étude plus récente dans un modèle de cellules hépatiques démontre que la Nrp1, associée à la Galectin-1, favorise l'activation du TGF- β augmentant les capacités invasives de ces cellules (**Wu et al. 2017**). Ainsi, Nrp1, seule ou en association avec d'autres molécules, permettrait d'augmenter le pool de TGF- β bio-disponible.

Encart 2: La biologie des intégrines

Les intégrines assurent les contacts cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire. L'interaction entre les intégrines et leurs ligands active des voies de signalisation qui permettent l'adaptation de la cellule à l'environnement extracellulaire. Elles sont impliquées dans l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose et participent au développement de nombreuses pathologies, notamment dans les cancers. Les intégrines sont des molécules hétérodimériques résultant de l'interaction non-covalente entre une sous-unité α et une sous-unité β . Chez les mammifères, il existe 24 dimères d'intégrines dont l'association des sous-unités détermine la spécificité de l'intégrine pour son substrat. Chaque type cellulaire exprime un répertoire spécifique d'intégrines. Ainsi, il existe quatre groupes d'intégrines : celles qui se lient à la laminine (α v3-6-7 β 1 et α v6 β 4), les intégrines qui se lient au collagène (α v1-2-10-11 β 1), les intégrines leucocytaires (α E β 7 ou CD103, α v4 β 2, α vL β 2 ou LFA-1, α vM β 2 ou Mac-1, α vN β 2 et β 2 β 4) et celles qui reconnaissent les motifs RGD (α v5 β 1, α v8 β 1, α vIIb β 3 et α v β 1/3/5/6/8).

De ces 8 intégrines reconnaissant le motif RGD, seules α v β 1, α v β 6 et α v β 8 se lient au motif RGD



présent au niveau du LAP et peuvent activer, *in vitro*, le TGF- β 1. Les intégrines ont un large domaine extracellulaire (700 à 110 acide-aminés), un petit domaine transmembranaire de 20 à 30 acide-aminés et une petite région cytoplasmique de 10 à 70 acide-aminés permettant l'interaction avec le cytosquelette d'actine.

Cette structure est dynamique et permet aux intégrines d'adapter différentes conformations afin de réguler diverses fonctions cellulaires. Elles peuvent ainsi envoyer deux types de signalisation : « inside-out » et « outside-in ». La première provient de signaux intracellulaires qui activent les intégrines afin qu'elles induisent l'adhésion cellulaire, la migration ou le remodelage de la matrice extracellulaire. La deuxième dépend de la fixation du substrat à l'intégrine qui active les voies de signalisation sous-jacentes à celle-ci. Dans le cas des intégrines α v β 1, α v β 6 et α v β 8 la réponse consiste en l'activation extracellulaire du TGF- β latent.

c) L'activation du TGF- β par les intégrines

Les études majoritairement menées *in vitro* énoncées précédemment n'ont pour l'heure aucune confirmation physiologique. Les animaux mutés pour les différents acteurs protéiques ne développent aucun phénotype en lien avec une déficience en TGF- β . Une potentielle redondance entre les mécanismes d'activation du TGF- β est envisageable et permettrait un contrôle fin de l'activation de cette cytokine.

La seule relevance physiologique confirmée dans l'activation du TGF- β est le rôle des intégrines. Il existe chez l'Homme 24 intégrines dont 8 ont la capacité de se lier au motif RGD exprimé par certaines protéines : $\alpha\nu\beta 1$, $\alpha\nu\beta 3$, $\alpha\nu\beta 5$, $\alpha\nu\beta 6$, $\alpha\nu\beta 8$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ (**Voir encart 2**). De ces 8 intégrines, seules $\alpha\nu\beta 1$, $\alpha\nu\beta 6$ et $\alpha\nu\beta 8$ se lient au motif RGD présent au niveau du LAP et peuvent activer, *in vitro*, le TGF- $\beta 1$. Seuls le TGF- $\beta 1$ et le TGF- $\beta 3$ peuvent être activés par les intégrines *via* la reconnaissance de leur RGD, la molécule TGF- $\beta 2$ ne contenant pas cette séquence (**Hinck et al. 2016**).

L'intégrine $\alpha\nu\beta 1$ (Itg $\beta 1$) est exprimée par les fibroblastes. En 2015, il est démontré que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique pour cette intégrine diminue significativement la fibrose induite au niveau hépatique et pulmonaire, phénomène dépendant du TGF- β (**Reed et al. 2015**).

L'expression de l'intégrine $\alpha\nu\beta 6$ (Itg $\beta 6$) est très largement restreinte aux cellules épithéliales et impliquée dans l'inflammation pulmonaire et rénale (**Huang 1996; Morris et al. 2003; Wang et al. 2007; Sugimoto et al. 2012**). Les souris déficientes pour l'Itg $\beta 6$ présentent un infiltrat inflammatoire dans la peau et les poumons et des défauts de développement proche de ceux observés chez les souris délétées pour le TGF- β , mais ne présentent pas de défaut au niveau embryonnaire (**Huang 1996; Morris et al. 2003**).

L'intégrine $\alpha\nu\beta 8$ (Itg $\beta 8$) est exprimée par les cellules endothéliales, épithéliales, les fibroblastes, les neurones, les cellules gliales mais également par les cellules du système immunitaire (**Cambier et al. 2000; Travis et al. 2007; Kitamura et al. 2011; Hirota et al. 2011; Arnold et al. 2012**). Chez les souris déficientes pour l'Itg $\beta 8$, une mort embryonnaire peut avoir lieu au stade E10 due à un défaut de vasculogénèse, de façon très similaire aux souris déficientes pour le TGF- $\beta 1$ (**Zhu et al. 2002**). Les animaux qui survivent à cette mort embryonnaire peuvent présenter un défaut de la fente palatine, comme pour les souris déficientes en TGF- $\beta 3$, et ont des défauts de vascularisation cérébrale (**Zhu et al. 2002**).

En 2007, le groupe de J. Munger a créé un modèle murin knock-in où le motif RGD du TGF- β 1 a été remplacé par un motif RGE non fonctionnel. Bien que les niveaux de TGF- β latent soient invariés dans ces souris, celles-ci développent une inflammation multifocale et une forte auto-immunité proche de celle des souris délétées pour le TGF- β 1 (Yang et al. 2007). Enfin, la modification de la souche murine permettant la délétion totale de l'Itg β 6 et de l'Itg β 8 avec une mort, non pas embryonnaire mais à deux mois après la naissance, récapitule la délétion des TGF- β 1 et 3 *in vivo* (Aluwihare et al. 2009). Ces résultats démontrent donc l'importance de l'activation du TGF- β par les intégrines reconnaissant le RGD du LAP *in vivo*. Des souris avec une mutation spécifique de l'Itg β 8 dans les leucocytes (Vav1^{Cre}Itg β 8^{fl/fl}) développent une auto-immunité sévère suggérant un rôle de cette intégrine dans l'homéostasie immunitaire (Travis et al. 2007). Le développement des modèles murins dont uniquement les DC ou LT sont dépourvus en Itg β 8 (CD11c^{Cre}Itg β 8^{fl/fl} et CD4^{Cre}Itg β 8^{fl/fl}) a permis de comprendre quelles cellules immunitaires exprimant cette intégrine sont importantes dans le contrôle de l'auto-immunité. L'absence de l'Itg β 8 dans les DC entraîne une auto-immunité sévère, majoritairement colique à partir de 5 mois, semblable à celle observée dans les souris Vav1^{Cre}, alors que la déprivation sur les LT n'engendre aucun phénotype (Travis et al. 2007). L'Itg β 8 exprimée par les DC a été montrée comme importante dans l'induction des Tregs et des Th17 *in vivo*, au niveau du tractus intestinal, processus dépendant du TGF- β (Travis et al. 2007; Acharya et al. 2010; Melton et al. 2010; Païdassi et al. 2011; Worthington et al. 2011). Cependant, la délétion de l'Itg β 8 spécifiquement dans les Tregs et uniquement en conditions inflammatoires accroît la colite et la dermatite (Worthington et al. 2015). Ces observations suggèrent que l'homéostasie en lien avec le TGF- β activé est fournie par plusieurs types cellulaires, dont les DC, étant suffisant pour prévenir du développement d'une auto-immunité mais qu'en conditions inflammatoires, les Tregs assurent l'augmentation du pool de TGF- β actif dans l'environnement cellulaire afin de contrôler la réponse immunitaire. L'expression de l'Itg β 8 par les tumeurs a été récemment proposée comme favorisant l'activation du TGF- β , contribuant ainsi à l'immunosuppression (Takasaka et al. 2018). La surexpression de l'Itg β 8 dans une lignée de carcinome pulmonaire engendre une augmentation de la croissance tumorale et une dissémination métastatique accrue. L'injection d'un anticorps neutralisant l'Itg β 8 aux souris porteuses de ces tumeurs conduit à une augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale (Takasaka et al. 2018).

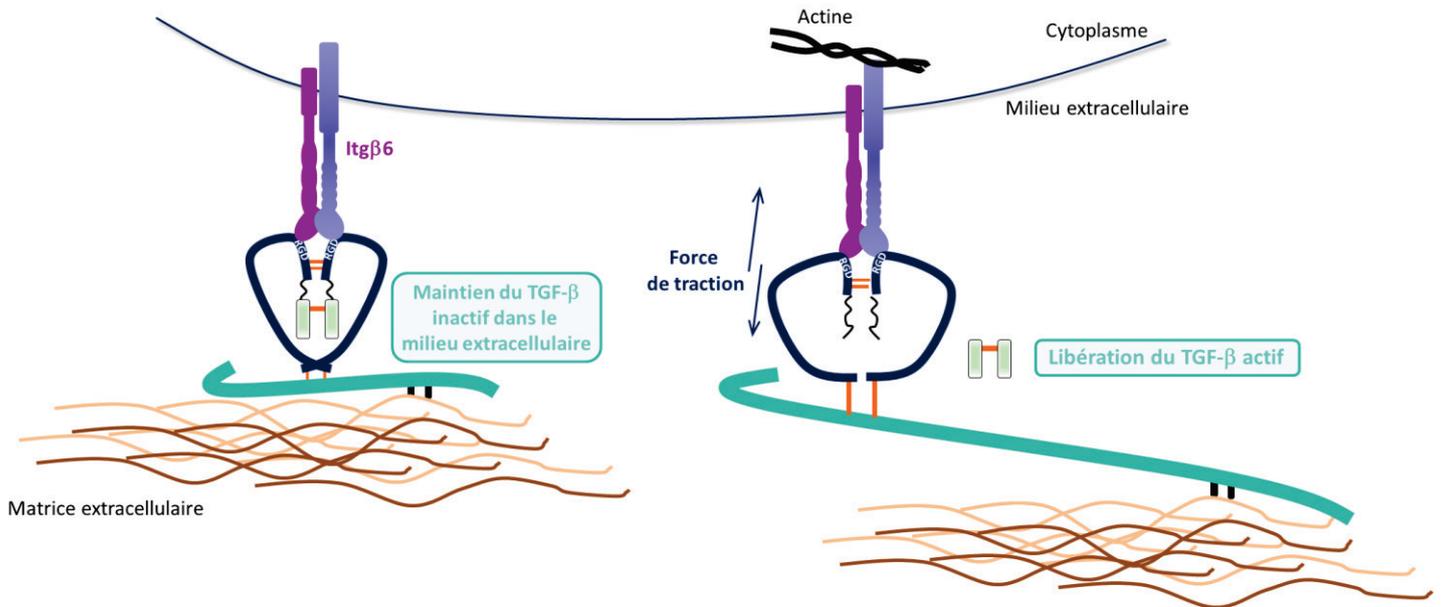


Figure 23: Activation protéase-indépendante du TGF-β.

Le TGF-β peut être retenu sous sa forme latente dans l'environnement extracellulaire en étant associé au LAP, au LTBP et à la matrice extracellulaire composée, entre autres, de fibronectine. Son activation peut avoir lieu par l'action des intégrines qui reconnaissent la séquence RGD. Cette interaction induit une force de traction entre les cellules et la matrice qui est transmise au LAP. Cette force va induire la déformation physique du LAP et libérer le TGF-β actif dans l'environnement extracellulaire.

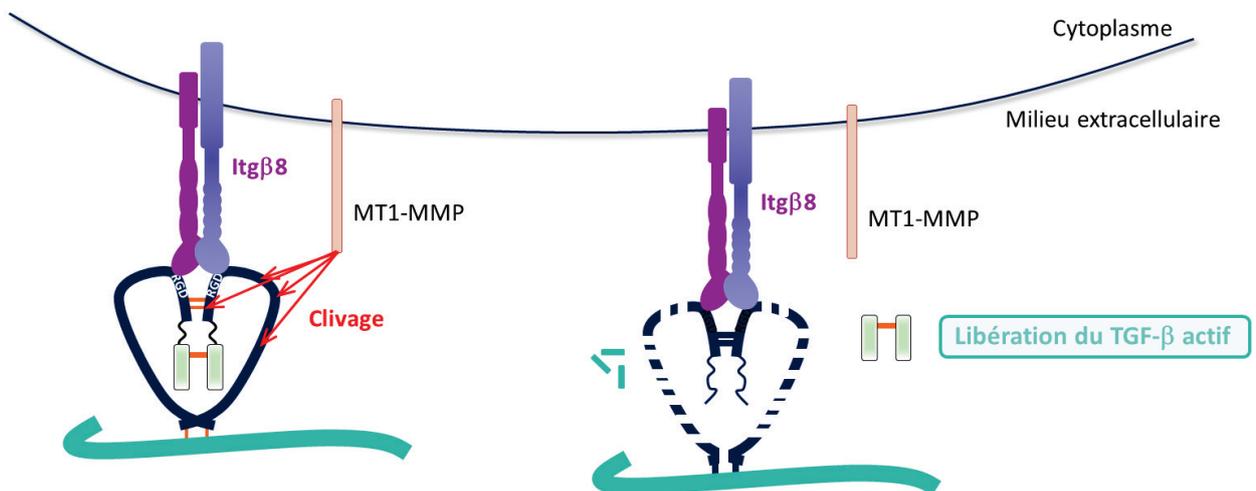


Figure 24: Activation protéase-dépendante du TGF-β. Lorsque l'intégrine se lie au LAP/TGF-β en reconnaissant le RGD, les protéases exprimées à la membrane cellulaire se trouvent plus proches et peuvent agir sur le LAP. MT1-MMP (MMP-14) est une protéase qui clive le LAP et permet la libération du TGF-β actif.

Cependant, si ces travaux décrivent un effet néfaste de l'Itgβ8 sur la croissance tumorale, ils ne permettent pas de définir la cible de l'anticorps, au vu de l'expression de l'Itgβ8 non restreinte à la tumeur.

L'activation du TGF-β par les intégrines se fait par deux procédés : l'activation protéase-indépendante et dépendante.

- **L'activation protéase-indépendante**

L'activation protéase-indépendante a été d'abord démontrée dans des cellules surexprimant l'Itgβ6, qui activent le TGF-β et ce même en présence d'inhibiteurs de protéases (**Munger et al. 1999**). Cette activation a été démontrée par une co-culture entre ces cellules et une lignée reportrice exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur *PAIL1*, induit par le TGF-β (**Abe et al. 1994; Munger et al. 1999**). Dans cette étude, il a également été montré que l'activation est dépendante d'un contact cellule-cellule car la séparation par une membrane semi-perméable des cellules reportrices et des cellules surexprimant l'Itgβ6 ne permet plus l'activation du TGF-β *in vitro*. Ce mécanisme dépend : de l'interaction directe entre l'Itgβ6 et la séquence RGD du LAP, de l'interaction entre le LAP/TGF-β et LTBP1, de la liaison de l'intégrine au réseau du cytosquelette d'actine et de la présence d'une matrice de fibronectine (**Annes et al. 2004; Fontana et al. 2005**).

La sous-unité α de l'intégrine reconnaît la séquence RGD du LAP, mais n'est pas suffisante pour l'activer. La sous-unité β interagit avec le cytosquelette d'actine de la cellule, induisant une force de traction transmise à l'intégrine et au LTBP, qui permet de libérer le TGF-β sous sa forme active par déformation physique du LAP (**Munger et al. 1999; Annes et al. 2004; Fontana et al. 2005; Wipff et al. 2007**) (**Figure 23**).

- **L'activation protéase-dépendante**

L'Itgβ8 reconnaît la séquence RGD exprimée par le LAP. Des études sur des cellules épithéliales pulmonaires ont permis de mettre en évidence que l'activation médiée par l'Itgβ8 requiert la présence de MMP-14, qui possède une activité protéinase permettant de cliver le LAP, libérant ainsi le TGF-β actif (**Mu et al. 2002**) (**Figure 24**). Cette activation du TGF-β est bloquée suite à l'ajout d'inhibiteurs de MMP ou lorsque la protéine MT1-MMP (ou MMP14) est délétée. Cependant, les souris MMP-14^{KO} ne semblent pas développer de pathologie en lien avec un défaut de TGF-β, questionnant ainsi le mode d'action utilisé *in vivo* par l'Itgβ8 (**Holmbeck et al. 1999; Zhou et al. 2000**).

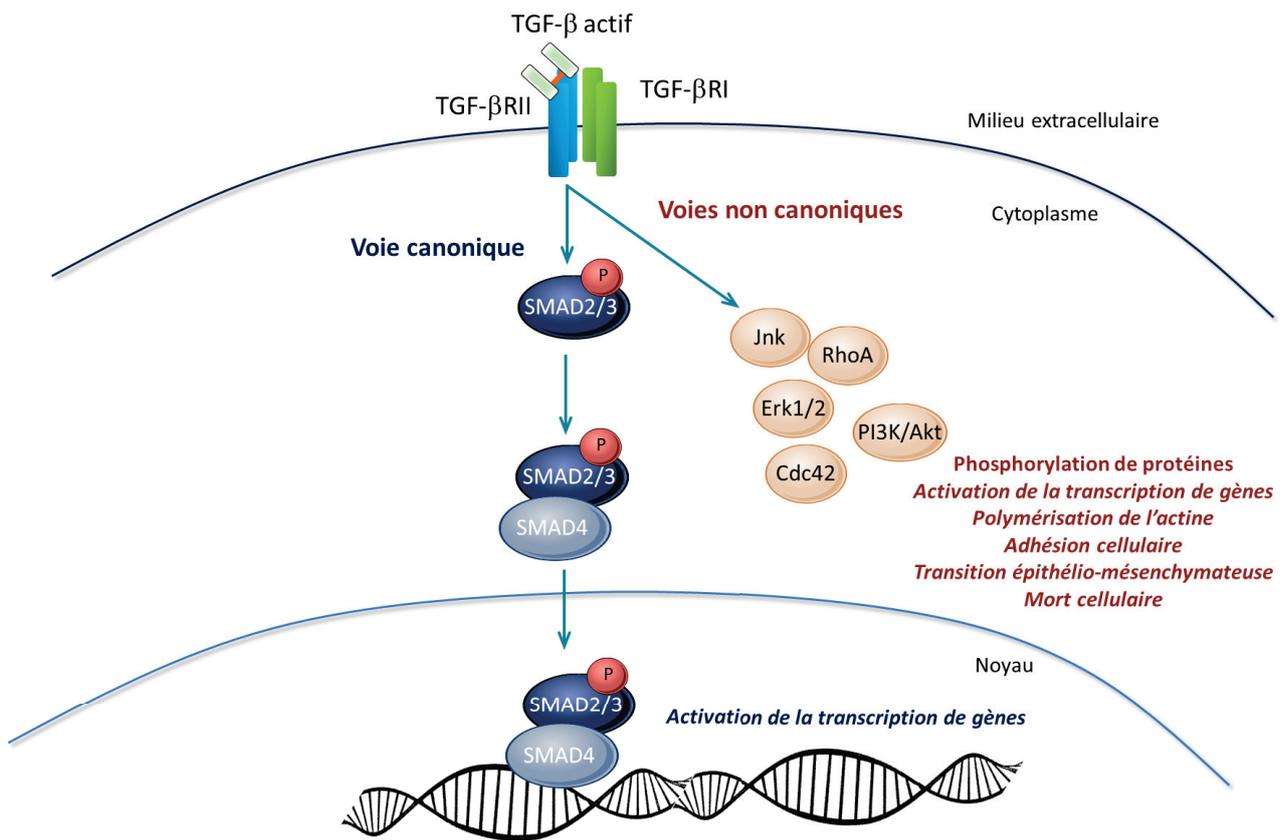


Figure 25: Signalisation du TGF- β .

Lorsque le TGF- β actif se lie à ces dimères de récepteurs (TGF- β RI et RII), SMAD2/3 est phosphorylé et se lie à SMAD4. Cette liaison permet la translocation du complexe dans le noyau qui va alors induire l'activation ou l'inhibition de l'expression de gènes cibles. Il s'agit de la voie canonique. La liaison du TGF- β à son récepteur peut également induire l'activation des voies non-canoniques qui sont associées à diverses fonctions.

IV) La signalisation du TGF- β

a) Le récepteur au TGF- β

Suite à la libération de la forme active du TGF- β , la cytokine pourra se lier à son récepteur et transmettre une réponse biologique. Les trois isoformes du TGF- β partagent un même complexe de récepteurs formé par un homodimère du récepteur de type 1 (TGF- β RI) et un homodimère du TGF- β RII ; un homodimère formé par le TGF- β RIII, aussi appelé récepteur accessoire, permettrait une amélioration de l'affinité du TGF- β aux récepteurs I et II **(Cheifetz et al. 1992; Massagué and Chen 2000; Attisano and Wrana 2002; Velasco-Loyden et al. 2004) (Figure 25)**. Les TGF- β RI et RII sont des récepteurs transmembranaires. Alors que TGF- β RII a une activité kinase intrinsèque, TGF- β RI doit être phosphorylé pour être actif. Le TGF- β actif, libéré du LAP, se lie tout d'abord à l'homodimère TGF- β RII dont la région extracellulaire est riche en cystéines et dont un domaine sérine/thréonine kinase est retrouvé dans sa partie intracellulaire **(Wrana et al. 1994)**. L'affinité entre le TGF- β et le récepteur de type 2 est très forte, formant un complexe hétérodimérique qui s'auto-phosphoryle. Cette liaison permet le recrutement du TGF- β RI dont les résidus sérines et thréonines seront phosphorylés par le domaine kinase du récepteur II, formant un complexe hétéro-tétramérique **(Shi and Massagué 2003)**.

b) Signalisation du TGF- β

Une fois le TGF- β RI activé, il va entraîner la phosphorylation des protéines SMAD associées au récepteur (R-SMAD), SMAD2 et 3, au niveau de leur séquence SSXS **(Figure 25)**. Les R-SMAD possèdent les domaines MH1 et MH2. MH1 est responsable de leur liaison à l'ADN alors que MH2 contient la région SSXS qui permet l'activité transcriptionnelle ainsi que les interactions entre les protéines SMAD. Le complexe SMAD2/3 phosphorylé se dissocie du récepteur de type 1 et se lie alors à SMAD4, formant ainsi un complexe trimérique. Ce complexe est alors transloqué dans le noyau permettant la régulation de gènes dépendants de SMAD4. Cette voie est communément appelée la voie canonique de la signalisation du TGF- β . D'autres voies de signalisation sont activées par le TGF- β et sont appelées voies non-canoniques **(Zhang 2009)**. Le TGF- β peut ainsi induire l'activation d'Erk, de Jnk/p38, de RhoA ou de la PI3K/Akt. L'effet de ces voies avaient été démontré sur la transition épithélio-mésenchymateuse et la mort cellulaire. Aujourd'hui, ces voies sont davantage étudiées et semblent jouer davantage de rôles selon le type cellulaire étudié.

c) Régulation de la signalisation du TGF- β

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la régulation des voies de signalisation induites par le TGF- β . SMAD2 peut être ubiquitinylé par Smurf2, et SMAD3 est dégradé rapidement après l'induction de son activité transcriptionnelle par le complexe SCF/Roc1 (**Zhang et al. 2001; Fukuchi et al. 2001**). SMAD4 est également dégradé par Jab1, SCF et Trim-33 (**Wan et al. 2002, 2004; He et al. 2006**).

Un autre mécanisme de régulation implique les protéines SMAD inhibitrices (I-SMAD), comme SMAD7 (**Miyazawa and Miyazono 2017**). Les I-Smad présentent une affinité pour le récepteur de type 1 plus accrue que les R-SMAD, entrant ainsi en compétition. Les I-SMAD peuvent également induire la déphosphorylation du récepteur, diminuant son activation. Le TGF- β lui-même induit l'expression de ces protéines afin de réguler sa voie de signalisation, entre autres stimuli. D'autres moyens de régulation impliquent l'endocytose des récepteurs de façon clathrine-dépendante (**Di Guglielmo et al. 2003**). Les protéines Ski et SnoN inhibent la voie du TGF- β en entrant en compétition avec pSMAD2 (SMAD2 phosphorylé) dans l'interaction avec SMAD4. Le complexe trimérique est ainsi détruit, inhibant la transcription induite par les SMAD (**Deheuninck and Luo 2009**).

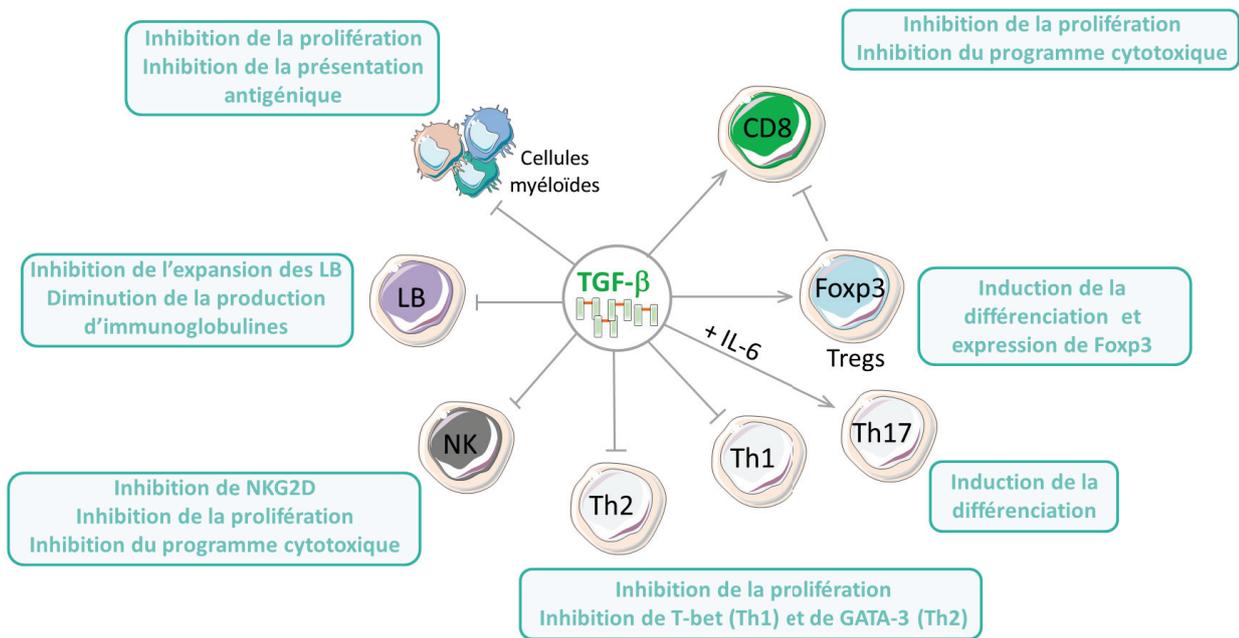


Figure 26: Rôle du TGF-β sur les cellules du système immunitaire.

Le TGF-β agit positivement sur les Tregs en participant à leur programme de différenciation. Il participe également au développement des Th17 en synergie avec l'IL-6. Les NK, les LB, les cellules myéloïdes, les CD8, les Th1 et les Th2 sont eux inhibés par le TGF-β qui agit sur leur prolifération ou sur leurs fonctions.

V) Fonctions du TGF- β sur les cellules du système immunitaire et le développement tumoral

Le TGF- β contrôle les réponses immunitaires en maintenant l'homéostasie par la régulation de la prolifération, de la différenciation, de la survie et des fonctions des cellules immunitaires ainsi qu'en contrôlant l'immunité anti-tumorale (**Li et al. 2006b; Dahmani and Delisle 2018**) (Figure 26).

a) Rôle du TGF- β sur les lymphocytes T

L'effet du TGF- β sur les LT a clairement été démontré par l'utilisation d'un modèle murin dont uniquement les LT expriment un dominant négatif du TGF- β RII (CD4-dnRII) (**Gorelik and Flavell 2000**). Ces souris développent une auto-immunité caractérisée par une inflammation sévère au niveau des poumons et du colon associée à une forte activation des LT (**Gorelik and Flavell 2000**). Le TGF- β agit sur les LT CD4^{pos} en impactant leur programme de différenciation. En inhibant l'expression de T-bet et de GATA-3, cette cytokine empêche, respectivement, la différenciation des LT CD4^{pos} en Th1 et en Th2 (**Gorelik et al. 2000, 2002; Kitani et al. 2003**). En revanche, en synergie avec l'IL-6, *in vitro*, le TGF- β est impliqué dans la différenciation des Th17 (**Veldhoen et al. 2006; Mangan et al. 2006**).

Dans les souris CD4-dnRII, une éradication totale de thymomes et de mélanome est observée et est en lien avec une augmentation de la prolifération et des capacités cytotoxiques des LT CD8^{pos} (**Gorelik and Flavell 2001**). En effet, le TGF- β est impliqué dans l'inhibition de l'acquisition d'un programme cytotoxique en inhibant l'expression des perforines, des granzymes, de FasL et de l'IFN- γ par la liaison de SMAD2/3 à leurs promoteurs inhibant ainsi l'expression des gènes (**Ranges 1987; Thomas and Massagué 2005**). L'expression de ces molécules, importantes dans la mise en place d'une réponse anti-tumorale, est restaurée suite à l'inhibition du TGF- β dans le modèle tumoral de thymome et permet une clairance efficace des tumeurs (**Thomas and Massagué 2005**). Cette inhibition du programme cytotoxique des LT CD8^{pos} par le TGF- β est faite en synergie avec les Tregs comme le montre des études utilisant des LT CD8^{pos} de souris CD4-dnRII et des Tregs, tous deux spécifiques d'un antigène tumoral donné (**Chen et al. 2005**).

b) Rôle du TGF- β sur les NK

La prolifération et la fonction des NK sont inhibées par le TGF- β et ce, en synergie avec les Tregs (**Ghiringhelli et al. 2005b**). L'expression de NKp30 et NKG2D, récepteurs exprimés par les NK et impliqués dans leurs fonctions lytiques est inhibé par le TGF- β et le blocage de la cytokine entraîne une accumulation des NK qui produisent de l'IFN- γ (**Castriconi et al. 2003; Lee et al. 2004; Laouar et al. 2005**). Une étude publiée en 2016 a permis de montrer que le TGF- β , en ciblant la voie mTOR dans les NK, bloque la production d'IL-15 et par conséquent leurs capacités cytotoxiques (**Viel et al. 2016**).

c) Rôle du TGF- β sur les lymphocytes B

La délétion de la signalisation du TGF- β spécifiquement dans les lymphocytes B (LB) résulte en une manifestation auto-immune faible (**Cazac and Roes 2000**). Cette observation est due au fait que la cytokine inhibe l'expansion et la fonction des LB en diminuant leur expression en immunoglobulines (**Kehrl et al. 1991; Cazac and Roes 2000**). Il a également été démontré que l'inhibition des LB par le TGF- β pouvait être dépendante d'un contact cellule-cellule par la présentation du TGF- β à la membrane des Tregs aux LB (**Nakamura et al. 2001**). Il est à noter qu'une population de LB régulateurs, dont le développement dépend du TGF- β , sécrète de l'IL-10 et est impliquée dans l'inhibition des LT CD8^{pos} et des NK dans un contexte tumoral (**Inoue et al. 2006**).

d) Rôle du TGF- β sur les cellules myéloïdes

Les CPA comme les MP ou les DC peuvent être inhibée par le TGF- β qui impact leur prolifération mais inhibe également les voies de signalisation impliquées dans la présentation antigénique et dans l'expression du CMH à leur surface (**Bogdan and Nathan 1993; Vodovotz and Bogdan 1994; Yamaguchi et al. 1997; Lee et al. 1997; Geissmann et al. 1999**).

En revanche, une population de cellules myéloïdes fortement immunosuppressive, les MDSC pour Myeloid-Derived Suppressor Cells, est induite en partie par le TGF- β qui leur permet de s'expandre et favorise leurs fonctions suppressives (**Lee et al. 2018**).

e) Rôle du TGF- β sur les tumeurs

Sur les cellules saines et dans les premières étapes du développement tumoral, le TGF- β est connu pour avoir un effet suppresseur en inhibant, par exemple, la prolifération des cellules épithéliales et en induisant leur apoptose (**Siegel and Massagué 2003**). Le TGF- β participe à l'arrêt de la prolifération en bloquant, entre autres, le cycle cellulaire par inhibition de c-Myc, un proto-oncogène, par la fixation de SMAD3 à son promoteur, ainsi qu'en inhibant les molécules impliquées dans le cycle cellulaire (**Hannon and Beach 1994; Reynisdottir et al. 1995; Chen et al. 2001a; Yagi et al. 2002**).

Néanmoins, dans de nombreux cancers, le TGF- β est associé à un mauvais pronostic. Il participe à l'immunosuppression en inhibant la prolifération des Teffs, à l'angiogenèse en augmentant la production de VEGF et induit la transition épithélio-mésenchymateuse

favorisant la dissémination des cellules tumorales en augmentant la production de MMP, de vimentine, de N-cadhérine ou de fibronectine, participant ainsi au développement des métastases (**Neel et al. 2012**). Ces effets ont clairement été démontré *in vivo* lorsque l'ablation du TGF- β dans les tumeurs ou dans l'environnement tumoral entraîne une importante diminution de la croissance des tumeurs associée à une augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale (**Nam et al. 2008; Courau et al. 2016; Mariathasan et al. 2018**).

Ainsi, le TGF- β agit majoritairement sur les cellules immunitaires en les inhibant. Mais, si à l'état basal cela permet une homéostasie immunitaire afin d'éviter une exacerbation des réponses mises en place par les Teffs, dans les cancers ce rôle est très délétère. En synergie avec le TGF- β , les Tregs participent à cette immunosuppression.

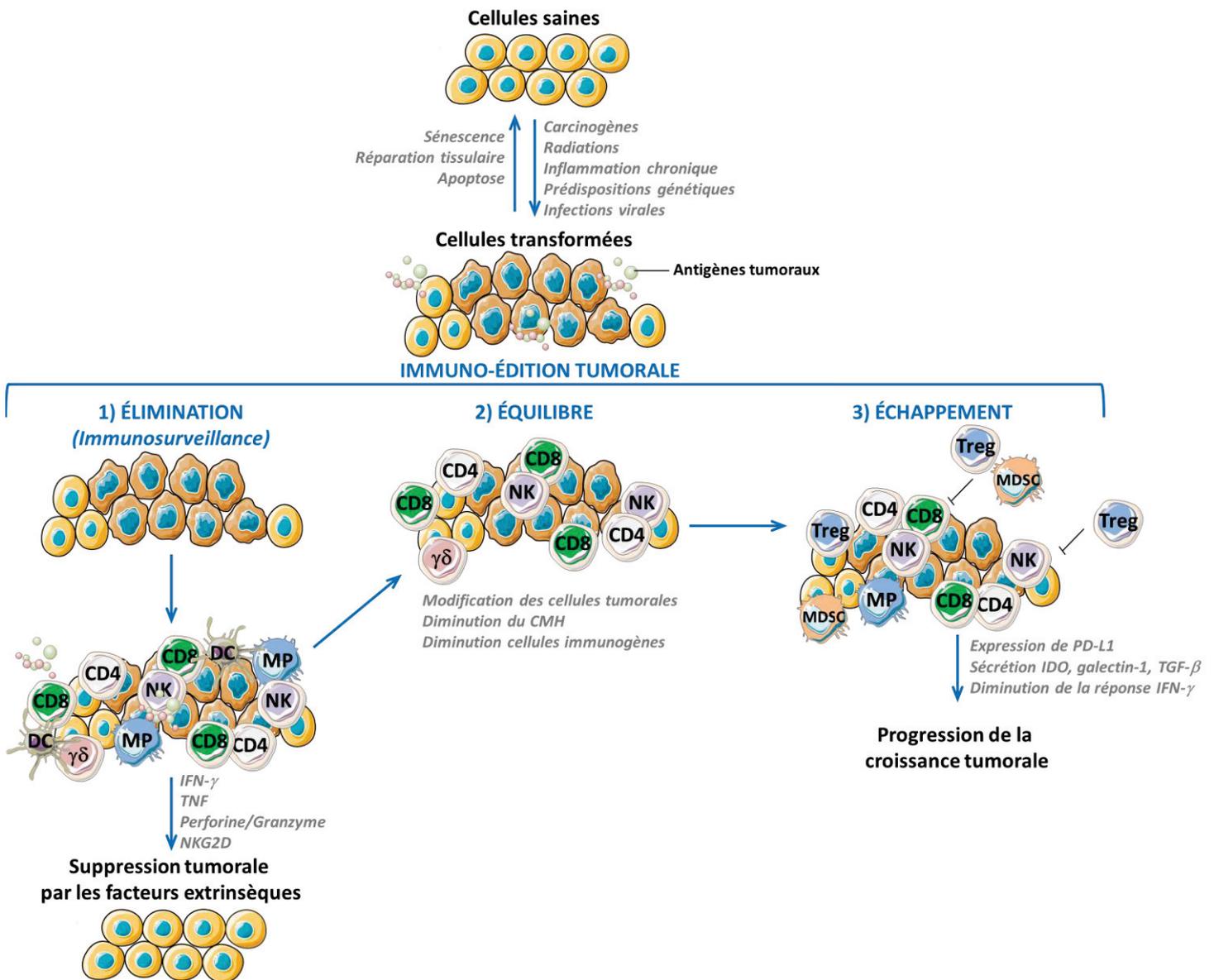


Figure 27: Les trois étapes de l'immuno-édition tumorale.

Les facteurs environnementaux ou génétiques peuvent engendrer la transformation des cellules saines. Ces cellules transformées acquièrent de nouvelles caractéristiques, prolifèrent de façon anarchique et deviennent des cellules tumorales. Elles expriment, entre autres, des antigènes qui permettent au système immunitaire de détecter un signal de danger et d'initier la phase d'élimination. Dans cette phase, les cellules du système immunitaire inné et adaptatif détruisent les cellules cancéreuses par divers mécanismes avant qu'elles ne soient cliniquement détectables. Toutes les cellules tumorales sont alors éliminées mais dans certains cas, ce processus est incomplet et le système se trouve en phase d'équilibre. Dans cette phase, les cellules tumorales peuvent rester présentes de nombreuses années. Au cours du temps, quelques cellules peuvent développer des mécanismes d'échappement permettant aux cellules tumorales de ne plus être reconnues par le système immunitaire comme la modification des antigènes exprimés, la diminution des molécules présentatrices de l'antigène ou l'induction de mécanismes immunosuppresseurs. Parmi ceux-là on trouve le développement ou le recrutement de Tregs au sein des tumeurs, le recrutement des MDSC ou l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. Ainsi, les cellules cancéreuses peuvent proliférer et se développer en une tumeur détectable capable de métastaser.

CHAPITRE 3: Cancer et système immunitaire

I) Concepts d'immunosurveillance et d'immuno-édition

Le système immunitaire joue un rôle primordial dans le contrôle de l'établissement et du développement tumoral. Les premiers travaux ayant suggéré ce rôle ont été publiés dans les années 50. En accord avec d'autres études, Foley montre que la greffe de carcinomes ou de sarcomes dans des modèles syngéniques conduit à un rejet systématique des tumeurs (**Foley 1953**). Ces observations suggèrent l'existence d'une surveillance des cellules transformées par le système immunitaire et d'une mémoire immunitaire.

En 1970, Burnet établit la théorie de l'immunosurveillance qui consiste en la mise en place de mécanismes immunologiques qui éliminent ou inactivent les cellules transformées (**Burnet 1970**). Ce concept est totalement accepté lorsque la déficience ou l'absence de cellules immunitaires sont associées à une augmentation des cancers chez la souris et chez l'Homme. L'équipe de R. Schreiber montre que l'injection d'anticorps anti-IFN- γ et/ou l'absence de LT en utilisant des souris RAG2^{KO} ou des anticorps déplétant les LT CD4^{pos} et CD8^{pos}, diminue ou retarde de manière importante la croissance tumorale (**Shankaran et al. 2001; Koebel et al. 2007**). Chez l'Homme, les patients atteints de syndromes immuno-déficients à leur naissance ou à l'âge adulte (SIDA, syndrome Wiskott-Aldrich, entre autres) ou chez les patients traités par des immuno-suppresseurs à la suite de greffes, une augmentation du nombre de cancers est observée incluant des leucémies, des lymphomes, des cancers du sein ou des cancers viro-induits (**Mueller and Pizzo 1995; Vial and Descotes 2003; Grulich et al. 2007; Mortaz et al. 2016**).

Le concept d'immunosurveillance a plus tard évolué et fait maintenant partie d'une étape du concept d'immuno-édition. L'immuno-édition des tumeurs est un processus divisé en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement immunitaire (**Figure 27**).

a) L'élimination des cellules transformées

L'invasion tissulaire par les cellules transformées génère la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui permettent de recruter les NK, les NKT, les LT $\gamma\delta$ ou les MP au sein de la tumeur et qui sont capables de détecter un signal de danger. L'expression de NKG2D et d'autres récepteurs exprimés par les NK ou les $\gamma\delta$, permet une interaction avec les cellules tumorales et leur élimination par la production d'IFN- γ , auquel elles sont sensibles. De plus, cette cytokine permet le recrutement des MP qui sécrètent de l'IL-12 et qui active les NK.

Les NK vont ainsi pouvoir augmenter leur capacité à tuer les cellules transformées en sécrétant plus d'IFN- γ mais aussi par les voies TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) ou perforine/granzyme (Gz). La mort des cellules tumorales permet le relargage d'antigènes qui seront capturés par les DC. Suite à leur migration dans le ganglion drainant la tumeur, les DC vont activer les LT CD4^{pos} et CD8^{pos} afin de mettre en place la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules vont se différencier majoritairement en Th1 et en LT CD8^{pos} cytotoxiques (CTL – Cytotoxic T Lymphocytes) et migrer vers la tumeur afin d'éliminer les cellules tumorales par la sécrétion de perforines et des Gz. Les Th1, en libérant de l'IFN- γ , participent à la mort des cellules tumorales mais également au développement des CTL. Les cellules transformées peuvent ainsi être éliminées dans leur totalité. Néanmoins, certains clones de cellules cancéreuses, moins immunogènes peuvent résister à cette phase et ne seront pas éliminées (Dunn et al. 2002, 2004a, b).

b) L'équilibre entre le système immunitaire et les cellules transformées

Au cours de cette phase a lieu un équilibre dynamique entre la prolifération des cellules tumorales ayant survécu à la phase d'élimination et la présence des cellules immunitaires. L'IFN- γ permet de maintenir les cellules transformées en dormance et qui sont réfractaires à l'apoptose induite par les NK et les CTL. Cette phase peut durer de nombreuses années. Chez l'Homme elle peut être illustrée par le développement tumoral chez des patients ayant reçu une greffe d'organe. En effet, des greffons qui semblaient sains avant la greffe, peuvent être pourvus de tumeurs non détectables cliniquement qui se trouvent en phase d'équilibre. Une fois chez le patient receveur et dans un environnement immunitaire différent, la tumeur échappe à son contrôle et peut se développer (Dunn et al. 2004a).

c) L'échappement des cellules transformées au système immunitaire

La phase d'échappement consiste en la croissance des cellules tumorales ayant échappé au contrôle du système immunitaire. Cet échappement, qui peut être passif ou actif, est dû à de nombreuses modifications géniques et épigénétiques des cellules transformées mais également à l'établissement de mécanismes immunosuppresseurs (Dunn et al. 2004a).

- *Échappement passif*

Les cellules tumorales peuvent diminuer leur reconnaissance par les cellules immunitaires en diminuant l'expression de leurs antigènes ou en les modifiant, en développant une insensibilité à l'IFN- γ , en diminuant l'expression de ligands de NKG2D, de Fas, ou encore en perdant l'expression des molécules du CMH (**Dunn et al. 2004a**). Associée à la perte du CMH, les cellules tumorales peuvent aussi perdre l'expression de Transporter associated with Antigen Processing-1 (TAP-1) qui est nécessaire à la présentation antigénique, empêchant la reconnaissance des cellules transformées par les LT (**Maeurer et al. 1996; Khong et al. 2004**).

- *Échappement actif*

Les cellules tumorales peuvent surexprimer des molécules comme PD-L1, HLA-E ou G qui participent à l'inhibition des LT et des NK (**Würfel et al. 2019; Salmaninejad et al. 2019**). Elles peuvent également sécréter des cytokines immunosuppressives comme le TGF- β , l'IL-10 ou d'Indoleamine 2,3-DiOxygenase (IDO), impliqué dans le métabolisme du tryptophane. Ces cytokines inhibent les DC, les LT et/ou les NK et favorisent le développement ou la stabilité des Tregs au sein de la tumeur (**Burkholder et al. 2014**). Les cellules tumorales sécrètent aussi du VEGF qui permet l'angiogenèse, favorise l'expression de PD-L1 et, en synergie avec le TGF- β et les Tregs, favorisent l'accumulation des Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) (**Gabrilovich and Nagaraj 2009; Salmaninejad et al. 2019**).

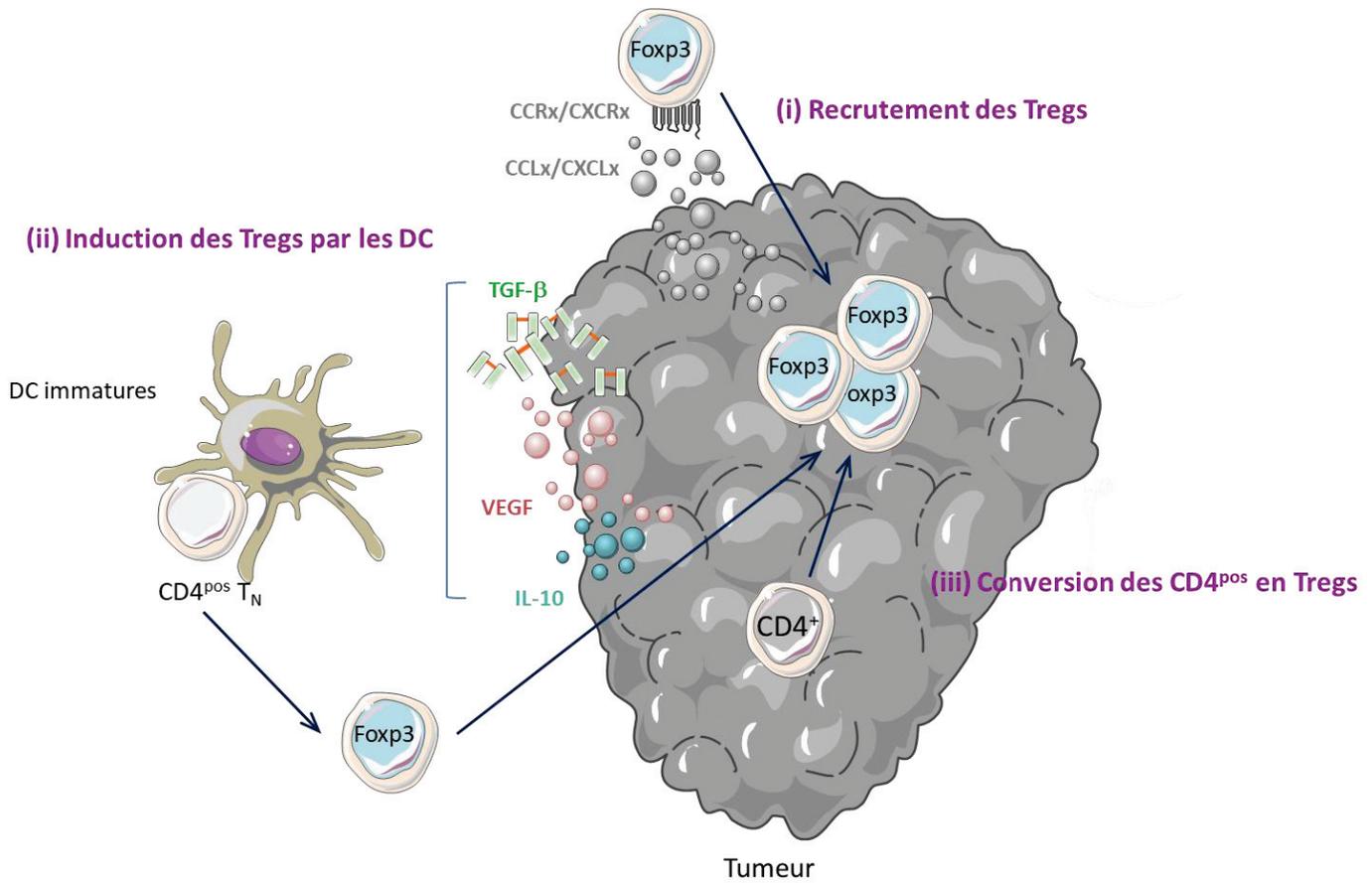


Figure 28: Origine des Tregs au sein des tumeurs.

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'origine des Tregs dans la tumeur. Ils peuvent être (i) recrutés de la périphérie par chimiotactisme en réponse à des chimiokines sécrétées par les cellules tumorales ou les TAM ; (ii) induits par les tolDC dans les ganglions; (iii) être convertis dans les tumeurs à partir de LT CD4^{pos} par l'environnement cytokinique riche en TGF- β notamment.

II) Recrutement, caractéristiques et fonctions des Tregs dans les tumeurs : des acteurs de la réponse anti-tumorale

Le rôle des Tregs dans l'immunité anti-tumorale a été évoqué à la fin des années 90 lorsqu'il a été démontré que leur déplétion, par l'administration d'anticorps déplétants CD25, retarde la croissance tumorale ou augmente significativement son rejet (**Onizuka et al. 1999; Shimizu et al. 2002**). Ces résultats ont été confirmés en utilisant les souris Foxp3^{DTR} (**Quezada et al. 2008; Bos et al. 2013; Burzyn et al. 2013; Gyori et al. 2018**). De plus, chez l'Homme ainsi que chez la souris, les Tregs sont retrouvés dans divers types de tumeurs incluant les cancers du sein, du poumon, du foie ou le mélanome et leur présence est très souvent corrélée à un mauvais pronostic (**Tanaka and Sakaguchi 2017**). Dans les lymphomes, ou dans des tumeurs qui se développent suite à une inflammation chronique comme le cancer colorectal, la présence des Tregs est associée à un bon pronostic (**Tanaka and Sakaguchi 2017**). En effet, ils permettent d'inhiber l'inflammation médiée par les Teffs qui sont à l'origine de l'établissement d'une inflammation chronique et donc au développement tumoral.

a) Origine des Tregs au sein des tumeurs : recrutement et conversion

Dans la tumeur, les Tregs peuvent être recrutés de la périphérie par chimiotactisme. Ils peuvent également être différenciés à partir de LT CD4^{pos} par les tolDC dans les ganglions drainants les tumeurs et y migrer ensuite. Ils peuvent aussi se différencier au sein même de la tumeur à partir de LT CD4^{pos} suite à un environnement cytokinique particulier (**Figure 28**).

- Recrutement des Tregs par chimiotactisme

De nombreuses chimiokines sont sécrétées au sein des tumeurs par les cellules tumorales et/ou les macrophages associés aux tumeurs (TAM – Tumor-Associated Macrophages) (**Togashi et al. 2019**). En exprimant les récepteurs correspondants à ces chimiokines, les Tregs en périphérie (d'origine thymique et/ou périphérique) peuvent être recrutés et exercer leurs capacités suppressives. Les chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans ce recrutement varient en fonction du type de tumeurs et de la réponse anti-tumorale mise en place (**Figure 29**).

Dans les tumeurs ovariennes, les Tregs peuvent aussi exprimer CXCR3 et y sont recrutés *via* CXCL9 et CXCL10 où ils inhibent les réponses anti-tumorales médiées par les Th1 (**Redjimi et al. 2012**).

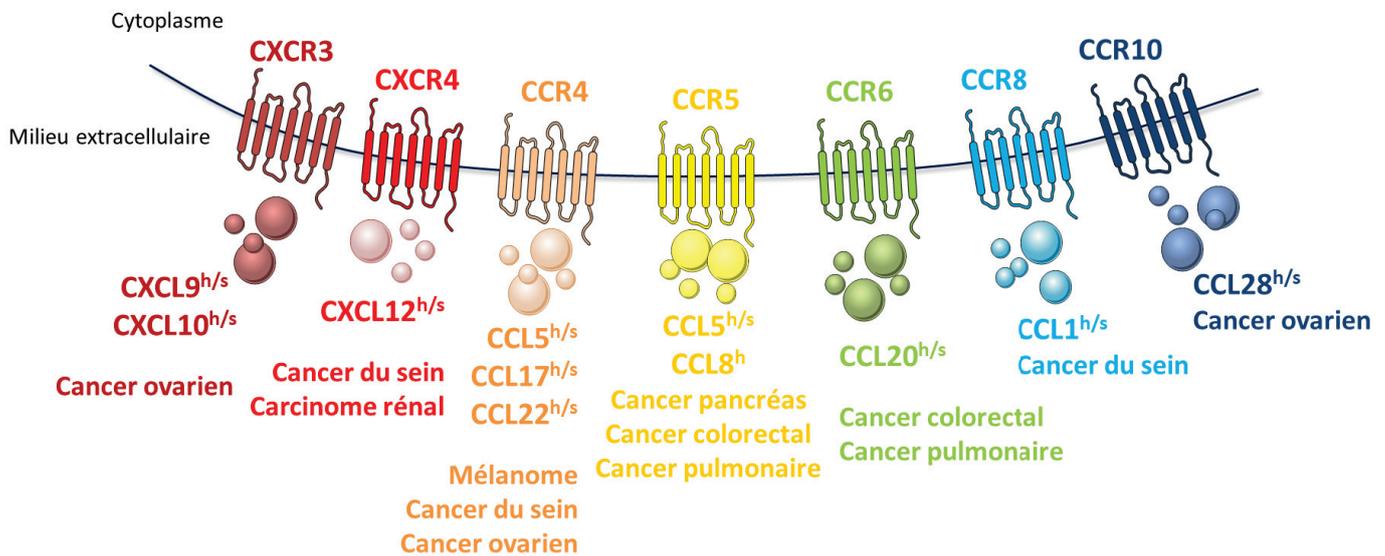


Figure 29: Ligands et récepteurs aux chimiokines exprimées par les Tregs permettant leur recrutement au sein des tumeurs.

Les récepteurs aux chimiokines et leurs ligands font partie de la famille des chimiokines. Ils sont divisés en quatre classes différentes selon la localisation de leurs deux premiers résidus cystéine (C): CC-chimiokines, CXC-chimiokines, les C-chimiokines et les CX₃C-chimiokines. Différents ligands (L) peuvent se lier au même récepteur et la liste schématisée est non exhaustive. Les symboles en exposant indiquent s'ils sont exprimés chez l'Homme (h) et/ou chez la souris (s). Des exemples d'implication de ces récepteurs/ligands dans différents types de cancers sont indiqués mais sont non-exhaustifs.

Dans les cancers du sein, la sécrétion de CXCL12 permet le recrutement des Tregs CXCR4^{POS} et le traitement de ces Tregs avec des antagonistes de CXCR4 diminue leurs fonctions suppressives dans le carcinome rénal **(Yan et al. 2011; Santagata et al. 2017)**.

Dans le mélanome, les cancers du sein et de l'ovaire, la production de CCL22 par les cellules tumorales et/ou les TAM attire les Tregs qui expriment le récepteur CCR4 dans la tumeur **(Curiel et al. 2004; Faget et al. 2011; Klarquist et al. 2016)**.

Dans les cancers pancréatique et colorectal, le recrutement des Tregs CCR5^{POS} par CCL5 favorise la croissance tumorale alors que l'absence de CCR5 spécifiquement dans les Tregs retarde le développement de cancers colorectaux **(Tan et al. 2009; Ward et al. 2015; Wang et al. 2017)**. En accord avec ces observations, il a été démontré que l'augmentation de l'activité de FAK dans des cellules tumorales, qui régule l'expression de chimiokines telles CCL5, augmente le recrutement des Tregs dans les tumeurs favorisant la croissance tumorale et le développement de métastases **(Serrels et al. 2015; Jiang et al. 2016)**. Dans le cancer du poumon et les métastases pulmonaires les Tregs CCR5^{POS} sont recrutés par CCL8, sécrétée par les TAM, et l'inhibition de CCR5 réduit le taux de Tregs infiltrant les sites tumoraux et le développement de métastases **(Halvorsen et al. 2016)**.

Les Tregs CCR6⁺ sont recrutés au sein de sites inflammatoires ou tumoraux en réponse à CCL20 comme il l'a été démontré dans le cancer colorectal, pulmonaire mais également chez les patients souffrant d'une infection à *H. Pylori* qui est fortement corrélée au développement de tumeurs gastriques **(Cook et al. 2014; Zhang et al. 2015; Wang et al. 2019)**.

CCR8, récepteur de CCL1, est un marqueur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du sein et est associé à un phénotype très activé des Tregs et donc très immunosuppresseurs **(Plitas et al. 2016)**. L'injection d'anti-CCL1 chez la souris favorise le rejet des tumeurs **(Hoelzinger et al. 2010)**. Ce rejet est dû à l'augmentation de l'infiltrat en LT CD8^{POS}NKG2D^{POS} et en cellules NK qui sont inhibées par les Tregs, dont la proportion est diminuée au sein de ces tumeurs après traitement **(Hoelzinger et al. 2010)**.

L'environnement des tumeurs est connu pour être hypoxique. Cette hypoxie favorise l'expression de CCL28 et permet le recrutement des Tregs CCR10^{POS} dans les tumeurs ovariennes **(Facciabene et al. 2011)**. Elle induit également la sécrétion de VEGF par les Tregs tumoraux qui favorisent l'angiogenèse **(Facciabene et al. 2011)**.

- **Conversion des LT CD4^{pos} en Tregs au sein des tumeurs et dans les ganglions drainants**

La présence de TGF- β dans l'environnement tumoral permet aux DC CD11c^{pos}CD11b^{pos}CMHII^{pos} de devenir tolérogènes. Ces cellules sécrètent du TGF- β , de l'IL-10 et du VEGF qui participent au développement des Tregs au sein de la tumeur. Ces DC migrent dans le ganglion drainant la tumeur et y présentent les antigènes tumoraux aux cellules T naïves. Le TGF- β sécrété et associé à une faible stimulation antigénique permet leur différenciation en Tregs qui migreront ensuite dans la tumeur (**Ghiringhelli et al. 2005b**). La conversion de CD4^{pos} en Tregs spécifiques d'antigènes tumoraux a été montrée dans deux études portant sur le lymphome et le mélanome (**Zhou 2006; Wang et al. 2008a**). Plus récemment, une étude sur le cancer du sein démontre que la production de CCL18 par les TAM permet de recruter des cellules naïves au sein des tumeurs. L'analyse du répertoire TCR des cellules naïves et des Tregs tumoraux suggère une conversion intra-tumorale des CD4^{pos} naïfs en Tregs. De plus, l'inhibition de CCL18 dans des xénogreffes réduit la croissance tumorale et la proportion de Tregs infiltrants les tumeurs (**Su et al. 2017**). L'analyse du répertoire TCR des Tregs infiltrants les tumeurs dans divers modèles murins ont permis de mettre en évidence que les Tconvs et les Tregs expriment un répertoire très différent (**Hindley et al. 2011; Sainz-Perez et al. 2012; Malchow et al. 2016**). Ces observations suggèrent que les Tregs tumoraux seraient plutôt recrutés que différenciés à partir de LT CD4^{pos} au sein de la tumeur.

Ces conclusions contradictoires sur la provenance des Tregs trouvent diverses explications. La source de Tregs peut différer selon le type de tumeurs mais également selon le stade tumoral. En effet, les études présentées précédemment ont été faites sur différents types de tumeurs comme le cancer du sein, colorectal, de la prostate ou le mélanome. Il est aussi possible qu'au sein des tumeurs, les LT soient sélectionnés et que le répertoire TCR analysé soit le reflet d'un avantage prolifératif de certains clones. De plus, certaines analyses portent sur la comparaison des TCR de LT naïfs et des Tregs alors que d'autres ont été réalisées sur des LT CD4^{pos} déjà différenciés.

b) Caractéristiques des Tregs tumoraux : origine et stabilité

- Origine thymique des Tregs tumoraux

Des analyses chez l'Homme et la souris dans les cancers pulmonaires, colorectaux et ovariens ont permis de mettre en évidence que la source des Tregs intratumoraux est davantage thymique sur la base du profil de méthylation du TSDR (CNS2) et en éliminant le TGF- β au sein des tumeurs (**Zhuo et al. 2014; Waight et al. 2015**). Les Tregs recrutés au sein des tumeurs et dont le TSDR est hypométhylé, sont associés à un mauvais pronostic. Un autre argument en faveur d'une origine thymique est que l'expression d'AIRE, exprimé par les mTEC, contribue au développement de Tregs spécifiques d'antigènes tumoraux (**Malchow et al. 2013**). Cependant en l'absence actuelle de marqueurs permettant de définir l'origine des Tregs, la nature des Tregs présents dans les tumeurs reste encore incertaine.

- Stabilité des Tregs dans la tumeur

Helios n'est pas un facteur important pour la stabilité des Tregs en périphérie mais dans leurs fonctions (**Sebastian et al. 2016**). Dans les tumeurs, il serait important pour leur stabilité car les Tregs dépourvus en Helios sont instables et deviennent des Tregs qui sécrètent de l'IFN- γ et du Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) (**Nakagawa et al. 2016**).

Une autre molécule importante pour la stabilité des Tregs tumoraux serait la Nrp1. La délétion de la Nrp1 spécifiquement dans les Tregs conduit à leur instabilité dans les tumeurs et à une perte de leurs fonctions suppressives (**Overacre-Delgoffe et al. 2017**). Ces Tregs sécrètent de grandes quantités d'IFN- γ et favorisent l'immunité anti-tumorale. Ces cellules favorisent la diminution de la croissance tumorale et une meilleure réponse aux traitements anti-PD1 chez la souris dont les Tregs sont déficients pour la Nrp1. De plus, la présence de Tregs Nrp1^{POS} corrèle avec un mauvais pronostic chez des patients atteints de mélanome ou de carcinomes de la tête et du cou (**Overacre-Delgoffe et al. 2017**). Chez la souris, l'expression de la Nrp1 par les Tregs favorise leur recrutement au sein des tumeurs par le VEGF et est associée à une augmentation de la croissance tumorale (**Hansen et al. 2012**).

Dans des modèles murins de cancers ovarien ou colorectal, il a été montré que les Tregs peuvent également provenir de cellules Th17 (IL-17A^{POS}Foxp3^{neg}) ou de Tregs-Th17 (IL-17A^{POS}Foxp3^{POS}) et sont alors appelés Tregs-exTh17 (**Downs-Canner et al. 2017**). Ces cellules, pour l'instant mal décrites, ont des fonctions métaboliques et un profil particulier au sein des tumeurs et sont également retrouvées chez les patients.

- *Survie des Tregs dans les tumeurs*

L'environnement des tumeurs solides est très hypoxique, pauvre en nutriments comme la glutamine ou le tryptophane, mais riche en acide lactique et en kynurénines (**Anderson et al. 2017**). Cet environnement modifie le métabolisme des cellules auquel les Tregs semblent être plus résistants que les Teffs. La présence de lactate ne modifie pas la prolifération ni les fonctions suppressives des Tregs mais inhibe la prolifération et les fonctions anti-tumorales des Teffs (**Angelin et al. 2017**). Cette résistance des Tregs serait due à la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme par Foxp3.

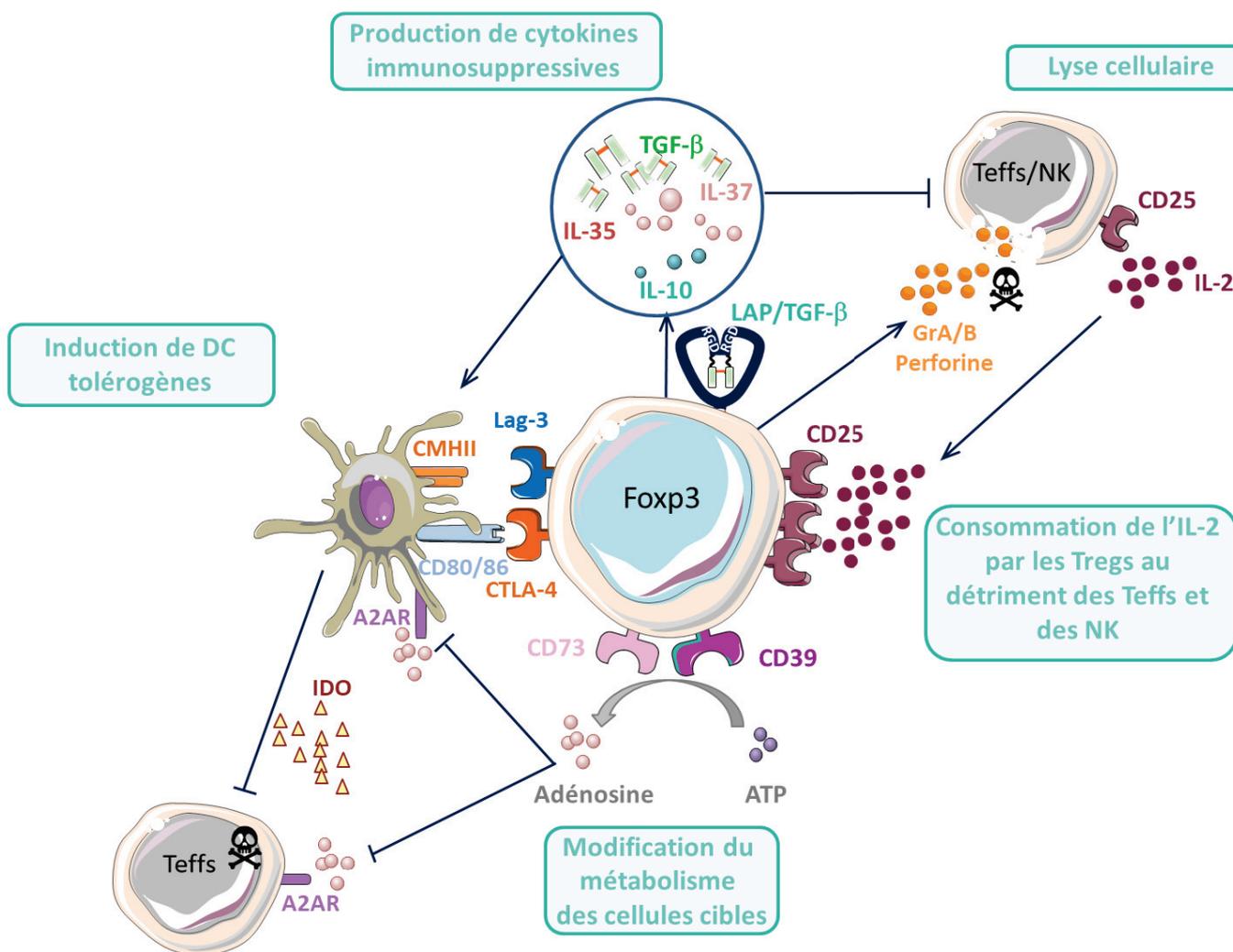


Figure 30: Mécanismes suppressifs des Tregs.

Les Tregs ne produisent pas d'IL-2 mais leur forte expression en CD25, en association avec les autres chaînes impliquées dans la formation du récepteur à l'IL-2, favorisent leur forte affinité pour l'IL-2 et leur permet d'entrer en compétition avec les Teffs et les NK. L'IL-2 est donc moins accessible pour ces cellules qui entrent en anergie et qui mourront par apoptose. Les Tregs relarguent de grandes quantités d'ATP qui est convertie en adénosine par les ecto-enzymes CD39 et CD73. L'adénosine, en se liant à son récepteur exprimé par les Teffs et les DC, inhibe ces cellules. Les Tregs expriment de manière constitutive CTLA-4 qui se lie avec une plus forte affinité que CD28, exprimé par les Teffs, à CD80/86 qui sont exprimés par les CPA. Cette interaction inhibe les DC et empêche également leur interaction avec les Tconv et donc l'induction de leur activation. La sécrétion de TGF-β et d'IL-10 par les Tregs rend les DC tolérogenes qui sécrètent à leur tour ces cytokines immunosuppressives, inhibant les Teffs. Ces cellules sécrètent également IDO qui induira l'apoptose des Teffs. La sécrétion de cytokines immunosuppressives et/ou la présentation de TGF-β latent à la surface des Tregs inhibe les NK et les Teffs. De plus, les Tregs peuvent sécréter des granzymes et des perforines qui vont lyser les membranes des NK, des LB et des Teffs et induire leur apoptose.

c) Fonctions suppressives des Tregs dans les tumeurs

Au sein des tumeurs, les Tregs ont un phénotype très activé et expriment diverses molécules associées ou non à cette activation et à leurs fonctions suppressives (**Nishikawa and Sakaguchi 2014; Chaudhary and Elkord 2016; De Simone et al. 2016**). Cette activation est due en partie aux nombreux antigènes du soi sécrétés par les tumeurs et qui sont reconnus par les Tregs. Grâce aux molécules extracellulaires mais également intracellulaires qu'ils expriment, les Tregs sont capables de mettre en place plusieurs mécanismes de suppression (**Figure 30**).

- *La production de cytokines suppressives*

L'IL-10, dont l'expression est dépendante de STAT5 qui est induit par l'IL-2, inhibe les LT (**Tsuji-Takayama et al. 2008**). De plus, la sécrétion d'IL-10 par les Tregs participe au développement des tolDC qui généreront des LT anergiques, dont la production de cytokines est fortement diminuée (**Steinbrink et al. 1997**) (**Figure 30**).

L'IL-35 a des propriétés inhibitrices sur la prolifération des LT, sur leurs fonctions effectrices ainsi que sur le développement de cellules mémoires et induit l'épuisement des LT dans les tumeurs (**Collison et al. 2007; Turnis et al. 2016**). La délétion de l'IL-10 et/ou de l'IL-35 dans des modèles de mélanome et de thymome chez la souris, conduit à une diminution de la croissance tumorale et à une diminution des LT CD8^{pos} intratumoraux exprimant des récepteurs inhibiteurs comme Tim-3, Lag-3, TIGIT et 2B4 (**Sawant et al. 2019**). L'expression de ces marqueurs est associée à un phénotype épuisé des CD8, contrôlé entre autres par Blimp-1 (**Welsh 2009**). L'IL-10 et l'IL-35 induisent Blimp-1 dans les LT CD8^{pos} ce qui engendre un phénotype épuisé de ces cellules et une augmentation de la croissance tumorale dans différents modèles chez l'Homme et chez la souris (**Zhu et al. 2017; Sawant et al. 2019**).

Le TGF- β , important dans le développement des Tregs, participe à leurs propriétés suppressives et est retrouvé à des taux élevés dans les tumeurs (**Teicher 2007**). Celui-ci peut être sécrété dans l'environnement extracellulaire par les Tregs ou être présenté sous sa forme latente à leur surface via GARP. Le TGF- β induitIDO qui recrute les Tregs et d'autres cellules myéloïdes suppressives au sein des tumeurs, inhibe l'activité anti-tumorale des LT et des NK et induit le développement des tolDC qui participent à la différenciation des Tregs (**Anderson et al. 2017**). De plus,IDO est une enzyme qui dégrade le tryptophane en kynurénine, qui inhibe l'activation des LT et induit leur mort, à laquelle les Tregs sont réfractaires (**Baban et al. 2009; Pallotta et al. 2011; Li et al. 2017; Anderson et al. 2017**).

L'expression de GARP et de LAP est associée aux fonctions suppressives des Tregs car ils permettent l'expression du TGF- β inactif à leur surface qui pourra être activé et participer ainsi à l'immunosuppression. Leur expression est retrouvée chez des patients atteints de cancers colorectaux ou dans le sang de patients atteints de cancer du pancréas et est associée à un mauvais pronostic (**Scurr et al. 2014; Mahalingam et al. 2014; Samid et al. 2016**).

- *La lyse cellulaire*

Les Tregs humains et murins sécrètent du GzA ou du GzB, des sérines protéases qui induisent l'apoptose des cellules cibles comme les LT (**Grossman et al. 2004; Gondek et al. 2005, 2008**) (**Figure 30**). En 2006, une étude démontre que les Tregs sont capables de tuer les LB par contact direct en libérant des granules contenant du granzyme dans l'espace extracellulaire (**Zhao 2006**). Ce mécanisme de lyse cellulaire a, par la suite, été démontré comme étant important dans le développement tumoral (**Cao et al. 2007; Choi et al. 2013**).

- *La perturbation métabolique*

Chez la souris les Tregs co-expriment CD39 et CD73 alors que chez l'Homme ils n'expriment que CD39, bien que cette unique expression soit encore en débat (**Deaglio et al. 2007; Gourdin et al. 2018**). Ces molécules, exprimées par les cellules tumorales, les Tregs et les cellules endothéliales, sont des ecto-enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ATP en AMPc et sont de mauvais pronostic dans les tumeurs (**Allard et al. 2017**). Lorsque les cellules sont endommagées ou activées, elles relarguent de l'ATP ou de l'ADP qui sont hydrolysés par CD39 en AMP. CD39 représente un facteur de survie pour les Tregs qui sont sensibles à l'apoptose induite par l'ATP extracellulaire car ils surexpriment son récepteur, P2X7 (**Rissiek et al. 2015**). L'AMP sera ensuite hydrolysée par CD73 en adénosine. L'adénosine, en se fixant à son récepteur A2A (A2AR), inhibe les Teffs en activant l'adénylate cyclase qui augmente l'AMPc et inhibe la production d'IL-2, d'IFN- γ et la prolifération des Teffs et des DC (**Kobie et al. 2006; Deaglio et al. 2007; Linden 2011**). Dans le micro-environnement tumoral, de nombreux Tregs sont apoptotiques mais restent immunosuppresseurs chez l'Homme et chez la souris (**Maj et al. 2017**). Ces Tregs apoptotiques relarguent de grandes quantités d'ATP transformé en adénosine par CD39 et CD73, constituant un mécanisme suppresseur en conditions de stress oxydatif (**Maj et al. 2017**) (**Figure 30**).

- *L'expression de CD25 et la consommation en IL-2*

Comme il a été décrit, les Tregs expriment fortement et de manière stable CD25 par rapport

aux Teffs. L'IL-2, sécrétée par les LT, est une cytokine importante dans le maintien de la survie des LT et des Tregs ainsi que dans la résistance des Teffs à la suppression médiée par les Tregs (**Setoguchi et al. 2005**). Mais l'expression de *Foxp3* inhibe la production de l'IL-2 (**Wu et al. 2006; Ono et al. 2007**). Les Tregs vont alors entrer en compétition avec les Teffs mais également avec les NK dans la capture de l'IL-2 qui se liera préférentiellement aux Tregs par leur forte expression en CD25, mais aussi en CD122 et CD132, au détriment des Teffs dont l'activation sera inhibée favorisant leur apoptose (**Thornton and Shevach 1998; Setoguchi et al. 2005; Pandiyan et al. 2007**) (**Figure 30**).

- **La modulation de la maturation ou de la fonction des DC**

La délétion de CTLA-4 spécifiquement dans les Tregs conduit à une prolifération exacerbée des Teffs et un défaut de la suppression médiée par les Tregs (**Wing et al. 2008**). Chez l'Homme, des mutations du gène codant pour *ctla4* sont associées à des syndromes auto-immuns multiples avec un défaut des fonctions suppressives des Tregs (**Kuehn et al. 2014**). CTLA-4, surexprimée par les Tregs et notamment par les Tregs intratumoraux, est impliqué dans leur rôle suppresseur (**Read et al. 2000, 2006; Takahashi et al. 2000; Wing et al. 2008; Friedline et al. 2009**) (**Figures 30 et 31**). CTLA-4 se lie à CD80/86 exprimés par les DC avec une meilleure affinité que CD28 exprimé par les Teffs (**Yokosuka et al. 2010**). Suite à la liaison de CTLA-4 à CD80/86, ces molécules sont endocytées ou transférées à la surface des Tregs par trogocytose, empêchant la maturation des DC et l'interaction avec les LT naïfs (**Qureshi et al. 2011; Walker and Sansom 2011**). Ainsi, l'expression de CTLA-4 représente un mécanisme permettant aux Tregs d'inhiber les Tconvs de façon antigène spécifique.

L'expression de la Nrp1 par les Tregs permet aussi d'augmenter le temps d'interaction avec les DC et de limiter celle avec les Teffs, comme il a pu être démontré par microscopie intravitale (**Tadokoro et al. 2006; Sarris et al. 2008**).

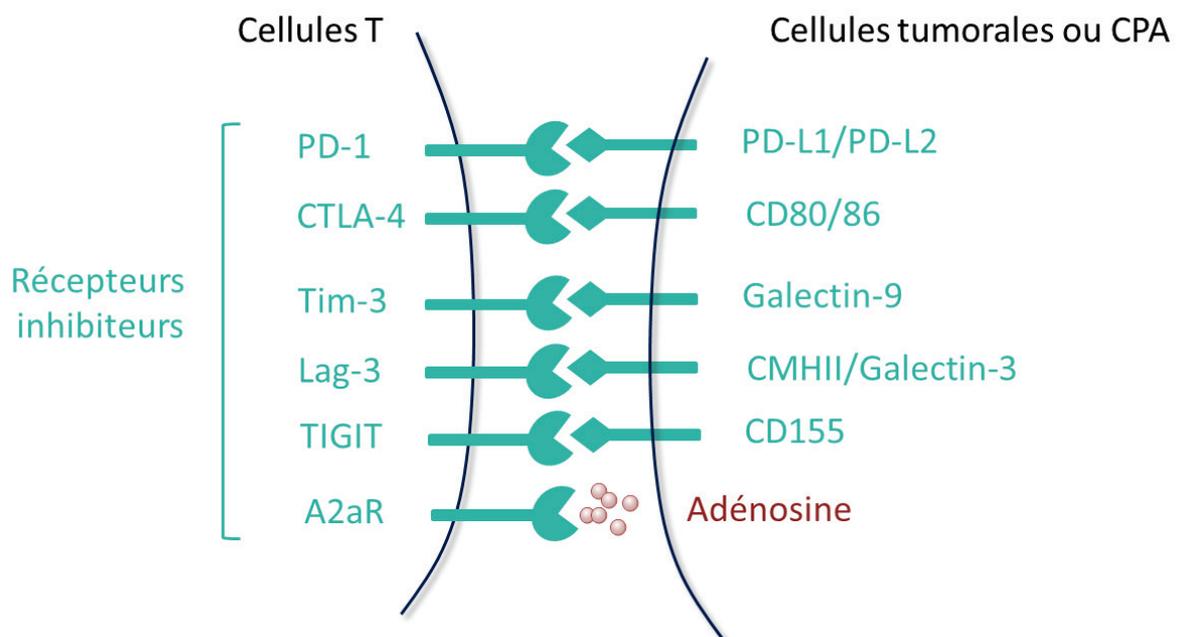


Figure 31: Interactions immunitaires impliquant les CPA ou les cellules tumorales et les cellules T.

Les cellules tumorales ou les cellules présentatrices d'antigènes expriment un panel de molécules qui interagissent avec celles exprimées par les LT. En condition physiologique, ces interactions permettent entre autres de limiter une réponse exacerbée du système immunitaire. L'expression des récepteurs inhibiteurs par les Tregs leur confère des fonctions hautement suppressives notamment dans les tumeurs. Leur expression sur les Tregs intra-tumoraux corrèle fortement avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de divers types de cancers.

- *Expression des récepteurs inhibiteurs*

Les récepteurs aux « immune-checkpoints » sont d'importants régulateurs du système immunitaire en participant à l'élimination des cellules transformées tout en protégeant les tissus d'une sur-activation du système immunitaire. Ces récepteurs sont divisés en deux groupes. Les récepteurs activateurs, qui favorisent la prolifération et l'activation des LT comme Inducible T Cell Costimulator (ICOS), CD40L, OX40 ou GITR, et les récepteurs inhibiteurs tels PD-1, CTLA-4, T-cell Ig and ITIM domain (TIGIT), T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 (Tim-3) ou Lymphocyte Activation Gene-3 (Lag-3), qui inhibent les LT (**Figure 31**). Les ligands de ces récepteurs sont exprimés par les DC, les MP mais également par les cellules tumorales, ce qui conduit à une dérégulation de la réponse anti-tumorale et par conséquent favorise la croissance des tumeurs (**Pardoll 2012**). Le blocage de ces récepteurs inhibiteurs fait partie des stratégies thérapeutiques utilisées et/ou testées en clinique dans de nombreux cancers aujourd'hui (**Darvin et al. 2018**).

Dans les tumeurs, et selon le type et le grade, les Tregs surexpriment un ou plusieurs de ces récepteurs qui leur confèrent de fortes fonctions suppressives et leur expression corrèle avec un mauvais pronostic chez les patients. Par exemple, dans les cancers colorectaux, les Tregs expriment LAP, CTLA-4 et ICOS (**Scurr et al. 2014**). Dans les carcinomes hépatocellulaires, les cancers colorectaux, cervicaux et ovariens des Tregs très suppressifs sont également retrouvés et expriment CTLA-4, GITR et Tim-3 (**Chaudhary and Elkord 2016**).

Un des récepteurs inhibiteurs exprimé par les Tregs dans les tumeurs est la molécule Lag-3 qui appartient à la superfamille des immunoglobulines et qui, étant un homologue du CD4, se lie avec une grande affinité au CMHII (**Hannier et al. 1998; Huang et al. 2004**). Cette liaison empêche l'interaction entre les CPA et les LT CD4^{pos}, inhibant l'induction d'une réponse anti-tumorale par ces cellules, mais inhibe également les DC (**Liang et al. 2008; Goldberg and Drake 2010**). De plus, Lag-3 favorise la différenciation des Tregs et leur confère des capacités suppressives (**Huang et al. 2004; Durham et al. 2014**). Les Tregs Lag-3^{pos} sont retrouvés augmentés dans les tumeurs et peuvent co-exprimer PD-1, CTLA-4 et Tim-3, sécrètent du TGF- β et de l'IL-10 (**Camisaschi et al. 2010; Park et al. 2012; Wei et al. 2015; Ma et al. 2018**). Les ligands de Lag-3 sont le CMH et la Galectin-3, retrouvée enrichie dans les tumeurs et qui inhibe les CTL et les DC (**Kouo et al. 2015**).

Tim-3 est retrouvé fortement exprimé par les Tregs intra-tumoraux et son expression est associée à leurs fonctions suppressives. Les Tregs Tim-3^{pos} co-expriment TIGIT et suppriment

fortement la réponse anti-tumorale en inhibant les Teffs de type Th1, Th17 et les CD8, en exprimant du GzB et en induisant la mort des Teffs par la Galectin-9 (Yu et al. 2009; Zhu et al. 2010; Levin et al. 2011; Joller et al. 2014; Kurtulus et al. 2015). L'expression de Tim-3 peut également corrélérer avec celle de PD-1 sur les Tregs. Ces cellules doublement positives s'accumulent dans les tumeurs avant l'apparition de LT CD8^{pos} au phénotype épuisé et sont de mauvais pronostic (Gao et al. 2012; Sakuishi et al. 2013).

Dans les mélanomes, les Tregs surexpriment TIGIT, qui participe à leur développement, à leurs fonctions suppressives et est associé à un phénotype stable, ainsi qu'ICOS, qui participe à l'induction d'une réponse pro-tumorale (Strauss et al. 2008; Fourcade et al. 2018). De plus, il a été démontré que TIGIT induit une suppression de la réponse anti-tumorale en favorisant le développement des tolDC par inhibition de la production de l'IL-12 tout en induisant celle de l'IL-10 (Yu et al. 2009).

PD-1, possède des domaines de type immunoglobuline au niveau extracellulaire. Son ligand, PD-L1, est exprimé par les DC, les LB et les cellules tumorales alors que PD-L2 serait exprimé par les MP et les DC (Yamazaki et al. 2002; Topalian et al. 2016). L'engagement de PD-1 diminue l'activation et la prolifération des LT et inhibe la production des cytokines et des molécules cytotoxiques (Mazanet and Hughes 2002; Brown et al. 2003). Les Tregs surexpriment PD-1 dans les tumeurs et les traitements ciblant cette molécule permettent de restaurer l'activité cytotoxique des LT spécifiques des tumeurs, d'augmenter les cytokines pro-inflammatoires et d'inhiber le nombre et les fonctions suppressives des Tregs (Park et al. 2012; Giancchetti and Fierabracci 2018).

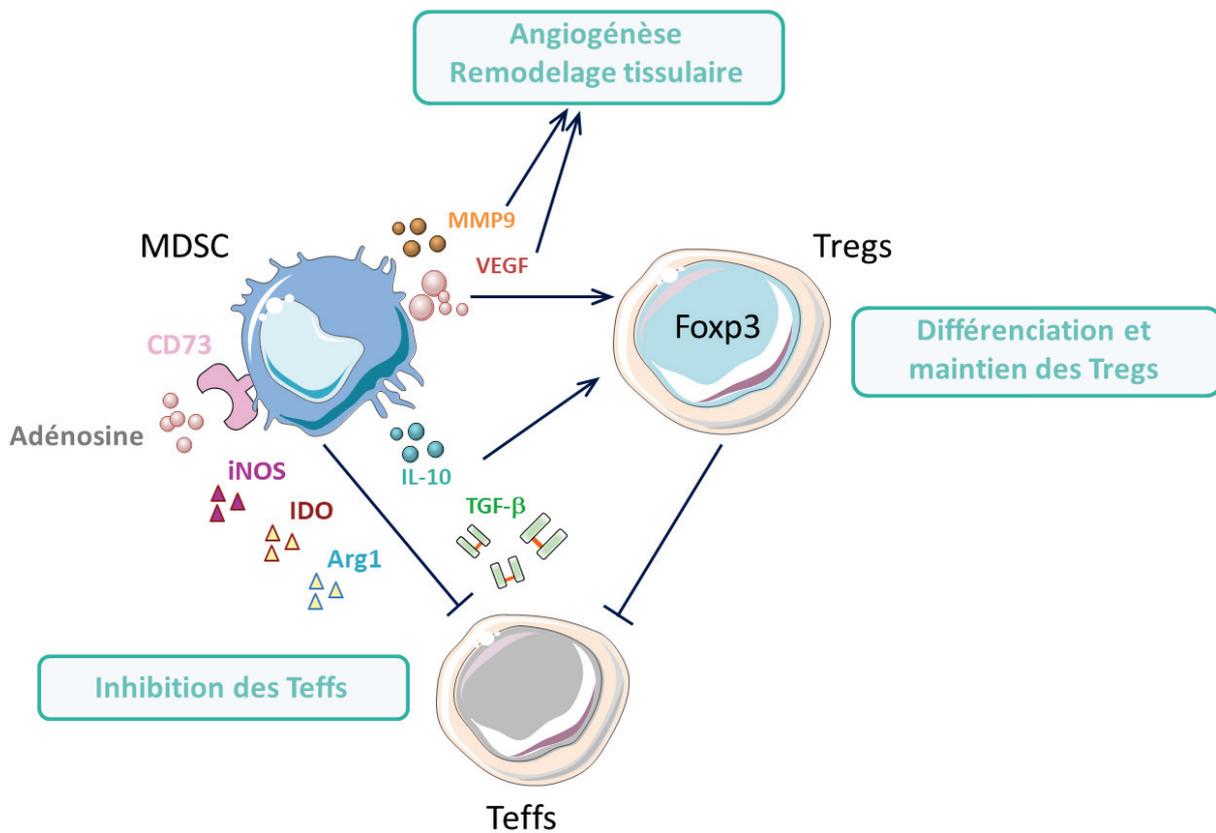


Figure 32: Propriétés immunosuppressives et pro-tumorales des MDSC et leur interaction avec les Tregs.

Les MDSC sont des cellules hautement suppressives retrouvées dans les tumeurs, dans lesquelles elles sont recrutées par des mécanismes similaires aux Tregs. Elles participent au remodelage tissulaire et à l'angiogenèse, favorisant le développement tumoral. Elles sécrètent également un large panel de cytokines et de molécules qui vont inhiber les Teffs mais promouvoir le développement et le maintien des Tregs dans les tumeurs.

III) Autres acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale

L'environnement tumoral est composé de divers types cellulaires incluant les cellules tumorales, les cellules endothéliales, les cellules associées à la MEC et les cellules immunitaires. Selon l'infiltrat immun, les tumeurs sont classées en tumeurs « froides » ou « chaudes ». Dans les premières, l'infiltrat lymphocytaire est très faible voire inexistant et rend difficile l'efficacité immunothérapeutique. Dans les deuxièmes, plusieurs mécanismes sont mis en place par le système immunitaire afin de lutter contre la croissance tumorale ou au contraire de la favoriser. Connaître le type d'infiltrat, les cellules qui le compose et comment elles interagissent permet de développer des stratégies thérapeutiques plus adaptées en fonction des types de cancers et des patients.

a) Les MDSC

Les MDSC se divisent en deux groupes : les PMN-MDSC, dont le profil ressemble à celui des neutrophiles, et les M-MDSC, qui se rapprochent phénotypiquement des monocytes. Chez la souris, les PMN-MDSC sont $CD11b^{pos}Ly6G^{pos}Ly6C^{low}$ alors que les M-MDSC sont $CD11b^{pos}Ly6G^{neg}Ly6C^{high}$. Chez l'Homme, les PMN-MDSC se différencient des neutrophiles par l'expression de LOX-1 et les M-MDSC peuvent être séparés des monocytes par l'expression d'HLA-DR (**Gabrilovich 2017**). Bien que ces deux types cellulaires utilisent différents mécanismes suppresseurs, je parlerai des MDSC de manière générale.

Le pourcentage de MDSC dans le sang ou dans les tumeurs de patients atteints de cancers du sein, de la vessie, de la prostate ou de mélanome corrèle avec un mauvais pronostic ainsi qu'à une mauvaise réponse aux immunothérapies (**Weber et al. 2018**). Les principales cibles des MDSC sont les LT dont ils inhibent l'activité en sécrétant un large panel de molécules incluant l'Arg1, iNOS, TGF- β , IL-10, COX2 et IDO (**Figure 32**). Ils participent également à la progression tumorale en favorisant le remodelage tissulaire et l'angiogenèse par la sécrétion de VEGF ou de MMP-9 (**Figure 32**).

Les MDSC et les Tregs ont une régulation très similaire au sein des tumeurs et collaborent dans l'établissement de l'évasion immunitaire. Les facteurs qui influencent le recrutement des MDSC sont semblables à ceux qui recrutent les Tregs comme CCL2, CCL5, CCL22 ou CXCL12 (**Gonzalez et al. 2018**) (**Figure 29**). Dans le mélanome, les MDSC sécrètent du TGF- β et de l'IL-10 qui favorisent le développement et le maintien des Tregs dans les tumeurs, et expriment aussi CD73 qui participe à la production d'adénosine inhibant les LT (**Fujimura et al. 2012**) (**Figure 32**).

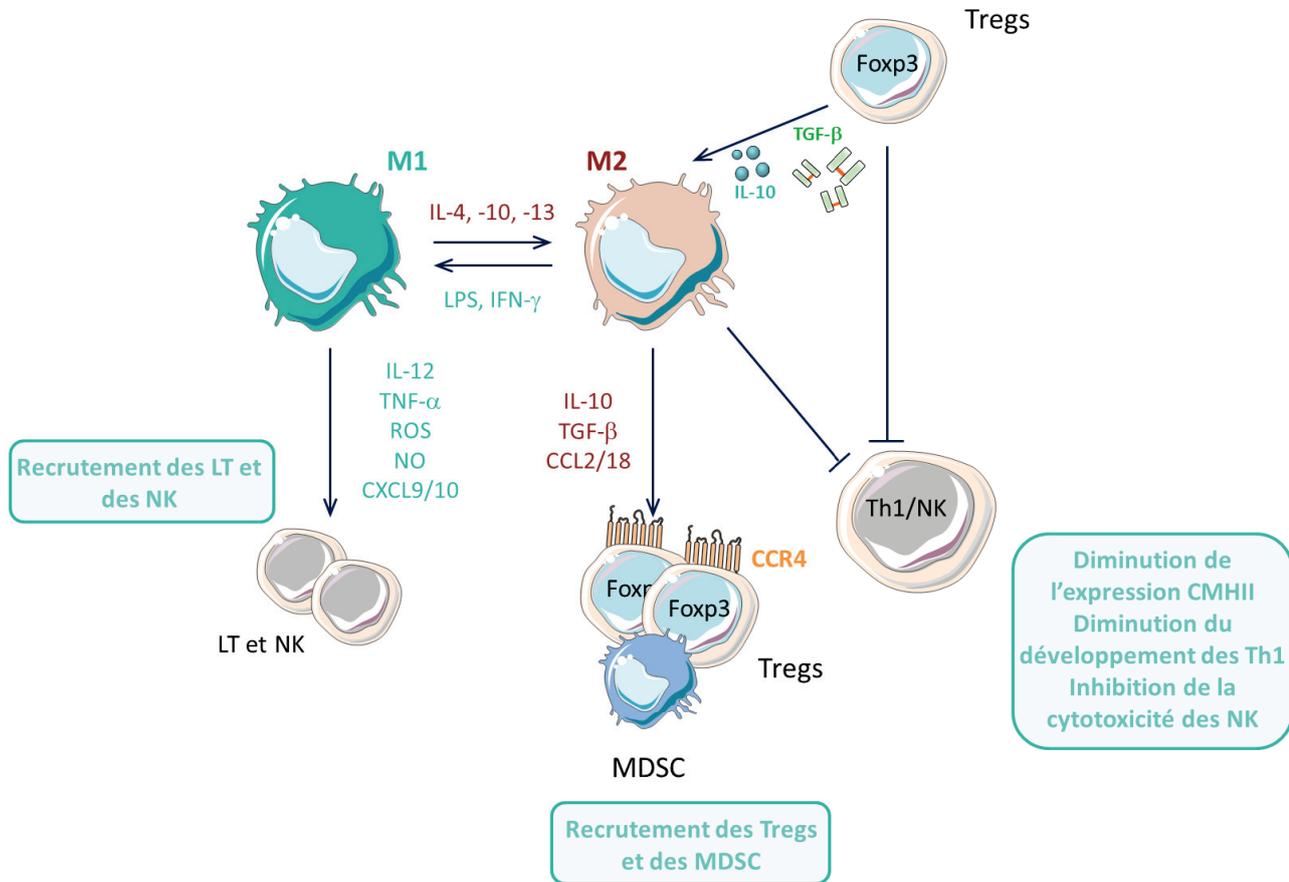


Figure 33: Propriétés des TAM sur la réponse tumorale et leur interaction avec les Tregs.

Les M1 sont présents dans les phases d'initiation de la croissance tumorale et favorisent la réponse anti-tumorale par le recrutement de NK et de LT dans les tumeurs. L'environnement immunosuppresseur provoque leur différenciation rapide en M2. Les M2 permettent le recrutement des MDSC et des Tregs au sein des tumeurs par leur sécrétion en chimiokines. Les Tregs et les M2 favorisent leur développement dans les tumeurs mutuellement par leur sécrétion en IL-10 et en TGF- β . Ils agissent en synergie afin d'inhiber les NK et de diminuer le développement des Th1 en diminuant l'expression des molécules du CMHII exprimées par les CPA.

b) Les macrophages de type 2 :

Lors des premières phases du développement tumoral les monocytes recrutés au sein des tumeurs se différencient en MP, appelés alors TAM (Tumor-Associated Macrophages). Les TAM, qui expriment CD11b, F4/80 et CSF-1R, sont présents à de forts taux dans les tumeurs et sont associés à un mauvais pronostic chez les patients **(Noy and Pollard 2014)**. Il a récemment été démontré que la déplétion des MP par des anticorps inhibiteurs de CSF-1R, favorise la migration des CD8 au sein des tumeurs et potentialise l'effet du traitement anti-PD-1 **(Peranzoni et al. 2018)**.

Les TAM sont des cellules très plastiques et selon l'environnement cytokinique peuvent se différencier en macrophages de type 1 (M1) ou de type 2 (M2) **(Mantovani et al. 2002, 2004) (Figure 33)**. Alors que les M1 sont associés à un bon pronostic, les M2 sont eux associés à un mauvais pronostic dans les cancers du poumon, par exemple **(Jackute et al. 2018)**.

Dans les tumeurs les TAM se différencient rapidement en M2 en présence d'IL-4 ou d'IL-13 mais également d'IL-10, sécrétée par les Tregs **(Figure 33)**. Les M2 sont associés à la résolution de l'inflammation et sont favorables dans l'homéostasie tissulaire mais ils favorisent la progression tumorale par leurs capacités suppressives. Ils expriment CD206 et CD163, produisent du TGF- β et de l'IL-10 ainsi que CCL2 et CCL18 permettant le recrutement des Tregs CCR4^{pos} et des MDSC CCR2^{pos}Ly6C^{pos} au sein des tumeurs **(Mantovani et al. 2004; Chang et al. 2016)**. La présence de Tregs et de M2 CD163^{pos} corrèle avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de carcinomes du larynx **(Sun et al. 2017)**. De plus, l'environnement tumoral riche en TGF- β , en IL-10 et en PGE2 participe à la diminution de l'expression du CMHII exprimé par les TAM résultant en une diminution de la polarisation des cellules anti-tumorales Th1 **(Lewis and Pollard 2006)**. La production de TGF- β par ces cellules induit un phénotype épuisé des NK et diminue leur cytotoxicité **(Krnetá et al. 2017)**.

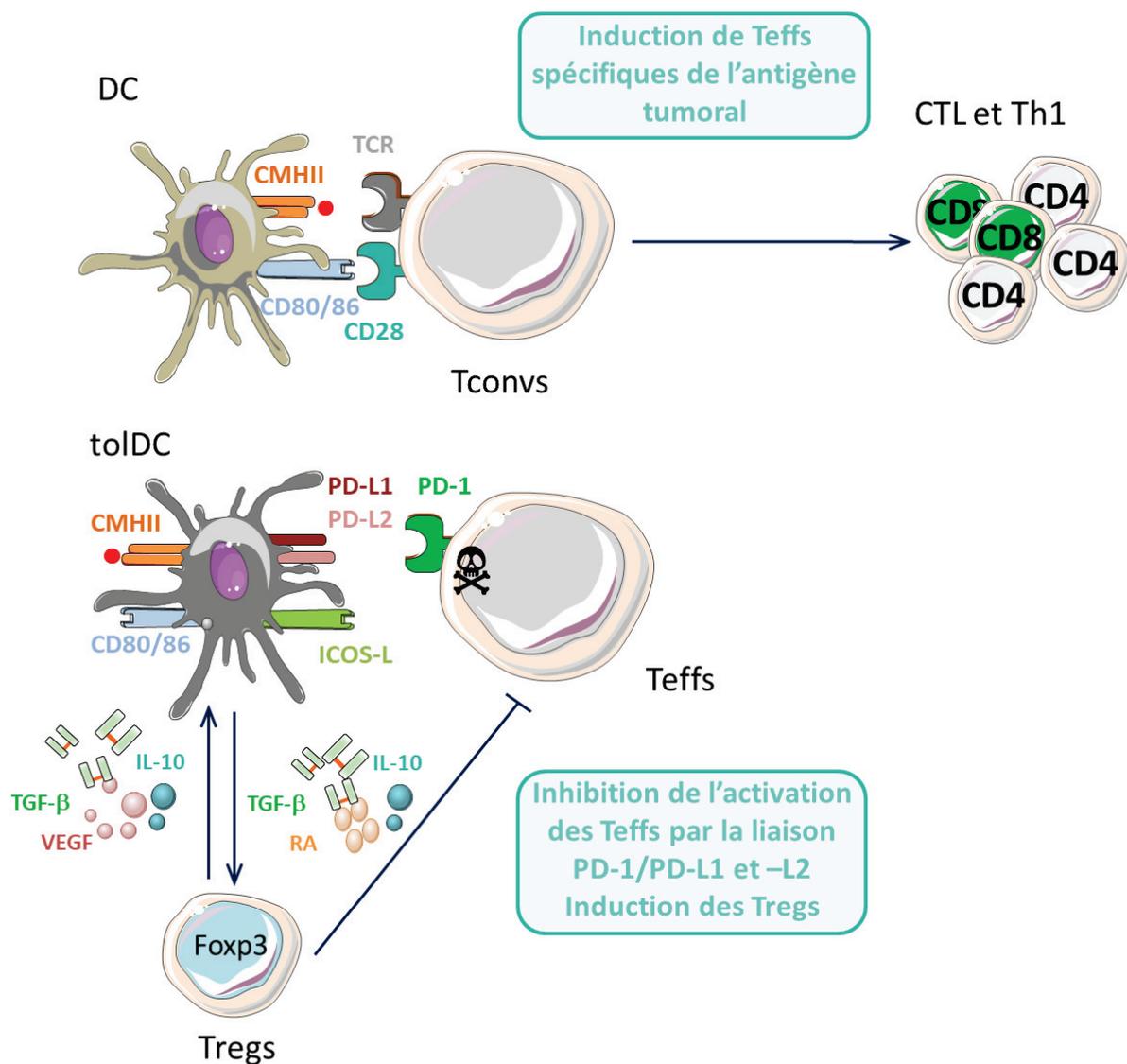


Figure 34: Propriétés des DC sur la réponse tumorale et leur interaction avec les Tregs.

Les DC présentent les antigènes tumoraux aux LT $CD4^{pos}$ et $CD8^{pos}$ naïfs et mémoires afin d'induire leur activation et la prolifération de Teffs et de CTL spécifiques des tumeurs. En présence d'un environnement immunosuppresseur médié entre autres par les Tregs, les DC deviennent tolérogènes (tolDC) et sécrètent des molécules suppressives qui inhibent les LT et favorisent le développement des Tregs. Ces tolDC expriment également des ligands pour les récepteurs inhibiteurs qui sont exprimés par les LT activés. La liaison entre PD-1 et PD-L1 ou PD-L2 inhibe l'activation des Teffs et induit leur apoptose.

c) Les DC tolérogènes

Lors du développement tumoral, les DC présentent les antigènes tumoraux aux cellules naïves et mémoires CD4^{pos} et CD8^{pos} permettant le développement et la prolifération de Teffs spécifiques des tumeurs. Ces antigènes, présentés par les DC CD11c^{pos}CD11b^{pos}Ly6C^{pos}, proviennent des cellules tumorales apoptotiques et activent de manière efficace les Teffs **(Ma et al. 2013)**. Dans les métastases pulmonaires du mélanome, il a été démontré par imagerie intravitale que les DC CD103^{pos} sont d'importants acteurs dans la suppression tumorale **(Headley et al. 2016)**.

Néanmoins, les cytokines présentes dans l'environnement peuvent modifier ces DC qui deviennent alors tolérogènes (tolDC) car elles sécrètent des molécules immunosuppressives favorisant l'induction de Tregs dans les tumeurs ou dans les ganglions drainants les tumeurs. La présence de TGF- β , d'IL-10, de VEGF ou de PGE2 induit le développement de tolDC qui sécrètent du TGF- β , de l'IL-10 et du RA **(Figure 34)**. De plus, ces cellules expriment PD-L1, PD-L2 et ICOS-L et participent à l'inhibition des Teffs **(Maldonado and von Andrian 2010)**. Dans les tumeurs, les DC augmentent l'activité lytique des NK **(Miller et al. 2002; Wong et al. 2013)**. Une étude récente montre que dans les cancers du sein, colorectal et le mélanome chez la souris, la production de PGE2 par la tumeur inhibe le recrutement des DC dans les tumeurs et donc la lyse tumorale par les NK **(Böttcher et al. 2018)**.

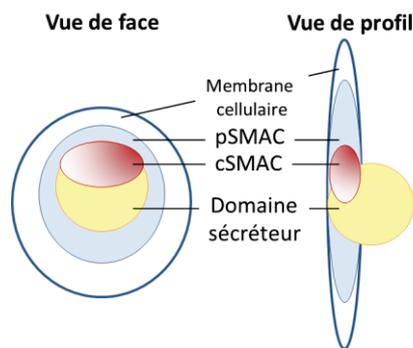


Figure 35: Schématisation de la structure de la synapse cytotoxique.

La liaison entre la cellule cible et le NK ou le CTL entraîne un réarrangement du cytosquelette de la cellule cytotoxique qui permet l'acheminement des lysosomes sécréteurs à la synapse cytotoxique. Le cSMAC se forme en premier avec la présence de LFA-1 et de NKG2D pour les NK, et de TCR et du CD8, pour les CTL. Proche du cSMAC se trouve le domaine sécréteur où seront libérées les granzymes et les perforines. Le pSMAC entoure ce domaine formé par le cSMAC, le réseau d'actine ainsi que le MTOC.

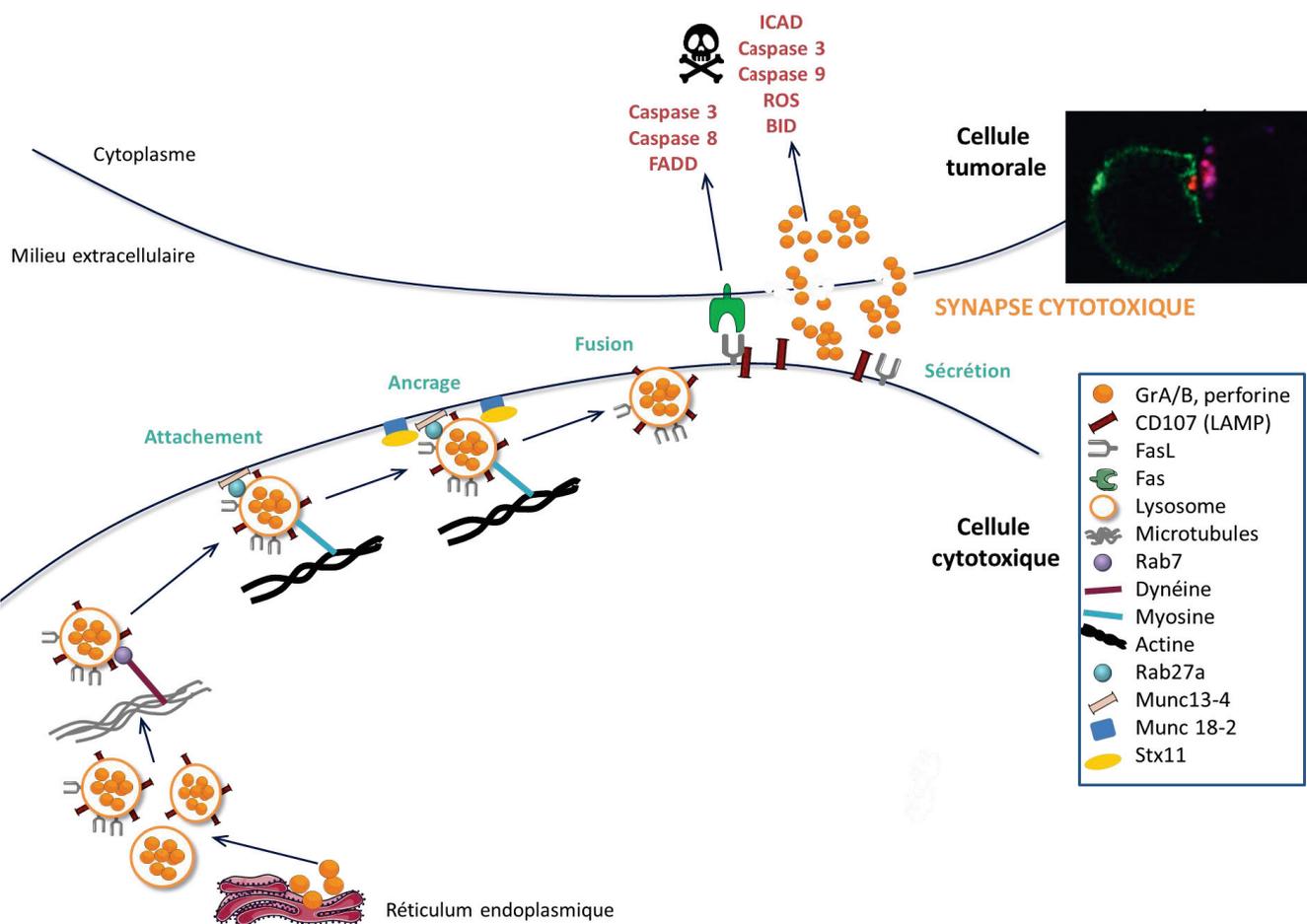


Figure 36: Synapse cytotoxique entre les CTL ou les NK et les cellules tumorales. Lors de la reconnaissance d'une cellule cible, infectée ou transformée, les CTL et les NK vont être activés, produire des molécules cytotoxiques et cytolytiques (Gz et perforines) et former une synapse cytotoxique. Ces molécules seront transportées par le cytosquelette dans des lysosomes sécréteurs qui peuvent exprimer ou non CD107 et/ou FasL. Ces lysosomes sont liés aux microtubules par Rab7 qui, grâce à la dynéine, permet leur transport à la membrane cellulaire. Les lysosomes sont alors transférés aux filaments d'actine auxquels ils sont reliés par la myosine. Les lysosomes peuvent ainsi s'attacher à la membrane cellulaire grâce au complexe formé par Rab27a et Munc13-4. L'activation de la cellule cible permet au complexe Munc18-2/Stx11 de se lier à la membrane et d'y ancrer les lysosomes. Aura alors lieu la fusion de la membrane du lysosome avec la membrane cellulaire. La cellule cytotoxique exprime ainsi CD107, qui la protège de la mort induite par les granzymes, et FasL à sa surface. Les granules sont eux libérés et lysent la membrane de la cellule cible et induisent son apoptose par divers mécanismes. Photo d'après : Stinchcombe et al. 2001 – rouge = GzB ; vert = CTL.

IV) Fonctions cytotoxiques et cytolytiques des Teffs et des NK, un mécanisme de réponse anti-tumorale

Dans l'établissement d'une réponse anti-tumorale efficace, les LT CD8^{pos} et les NK ont la particularité de sécréter, comme les LT CD4^{pos}, diverses cytokines comme l'IFN- γ ou le TNF- α , mais leur rôle majeur réside dans leur capacité à tuer les cellules tumorales en formant une synapse immunologique cytotoxique. Il a également été démontré que les LT CD4^{pos} activés forment une synapse avec leurs cellules cibles et participent à la lyse cellulaire en sécrétant des granules cytotoxiques (**Shen et al. 2006**).

- La synapse cytotoxique

Lorsque les cellules NK ou les CTL vont reconnaître les cellules cibles, infectées ou cancéreuses, elles vont créer une synapse cytotoxique et sécréter des molécules lytiques (perforines et granulysines) et cytotoxiques (Gz) qui les détruisent (**Stinchcombe and Griffiths 2007**). La présentation de l'antigène aux LT CD8^{pos} permet la production de Gz alors que les NK le produisent au cours de leur développement suite à la liaison de ligands à NKG2D, un récepteur activateur (**Lettau et al. 2015**). Cette liaison induit un flux calcique qui permet le recrutement de divers TCR, du CD8 et de LFA-1 à la synapse formant le cSMAC (central supramolecular activation cluster) (**Krzewski and Coligan 2012; Lettau et al. 2015**) (**Figure 35**). Proche du cSMAC se trouve un espace qui permettra à la cellule de sécréter ces granules, le domaine sécréteur (**Stinchcombe et al. 2001**). L'actine corticale présente au site de liaison cellule-cellule forme ensuite un anneau périphérique appelé le pSMAC (peripheral supramolecular activation cluster). Entre le domaine sécréteur et le cSMAC se formera le centrosome (MTOC) qui permet de réorganiser le cytosquelette de la cellule. Les lysosomes contenant les Gz et les perforines vont alors se lier à la tubuline sous le contrôle de la dynéine et de l'actine et seront transportés jusqu'à la synapse. Il existe deux types de lysosomes : les granules denses qui ne contiennent que les perforines et les Gz et les lysosomes FasL^{pos} qui expriment LAMP1 et 2 (lysosome-associated membrane proteins) appelé aussi CD107a et b, CD63 (LAMP3) et FasL (**Bossi and Griffiths 1999; Lettau et al. 2015**). Ces lysosomes ont un pH faible et contiennent des hydrolases permettant de maintenir les perforines et les Gz à l'état inactif. Les lysosomes seront ensuite exocytés, leurs membranes fusionnant avec la membrane cellulaire, et les granules seront libérés dans la synapse (**Figure 36**). Les cellules sécrétrices exprimeront alors à leur surface LAMP et FasL.

L'observation de l'expression de ces marqueurs à la surface cellulaire indiquera donc une dégranulation. De plus, l'expression de LAMP-1 a été associée à une protection des cellules sécrétrices aux granules cytotoxiques et cytolytiques libérés au niveau de la synapse **(Cohnen et al. 2013)**. L'expression de FasL à la membrane de la cellule cytotoxique va permettre la liaison à Fas, exprimé par la cellule tumorale. Fas contient un domaine de mort (DD) au niveau de sa région cytoplasmique. Suite à la liaison Fas/FasL, le domaine de mort associé à Fas (FADD) sera recruté et permettra la liaison de la pro-caspase-8 formant le complexe de mort induit par la signalisation (DISC). La caspase 8 sera ensuite activée et activera à son tour la caspase 3 permettant d'induire l'apoptose **(Volpe et al. 2016)**. Le GzB induit l'apoptose en clivant BID (BH3-interacting domain death agonist) qui perméabilise les membranes mitochondriales impliquant les ROS **(Martinvalet 2015)**. Les mitochondries vont alors libérer des facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome C qui active la pro-caspase-9. La caspase 3 est ensuite activée et clive à son tour l'inhibiteur de la DNase activée par les caspases (ICAD) et induit ainsi la fragmentation de l'ADN résultant en la mort de la cellule **(Metkar et al. 2003; Lieberman 2003)**.

- **Régulation des protéines impliquées dans l'établissement de la synapse cytotoxique**

La protéine Rab7, en recrutant la dynéine et en se liant aux lysosomes sécréteurs et aux microtubules, permet de les diriger le long du cytosquelette et de favoriser la polarisation du centrosome **(Daniele et al. 2011)**. Sa délétion dans les cellules cytotoxiques inhibe fortement leurs fonctions **(Daniele et al. 2011)**. Les lysosomes sont ensuite transférés à l'actine où ils seront fusionnés à la membrane cytoplasmique de manière dépendante du complexe formé par Rab27a et Munc13-4 **(Neeft et al. 2005) (Figure 36)**. Il a été démontré que les CTL dépourvus en Munc13-4 présentent des granules à leurs membranes, au niveau cytoplasmique, mais sont incapables de dégranuler **(Elstak et al. 2011)**. De plus, des mutations sur l'un ou les deux gènes codant pour Rab27a et Munc13-4 sont associés au développement du syndrome de type 2 de Griscelli, caractérisé par une incapacité des CTL à dégranuler **(Neeft et al. 2005)**. La syntaxine 11 (Stx11), codée par le gène *stxbp2*, interagit avec Munc 18-2 et participe à l'ancrage des lysosomes à la membrane plasmique dans CTL **(Dieckmann et al. 2015)**. L'absence de la Stx11 dans les NK et les CTL entraîne un défaut d'activité cytotoxique associée à une diminution de leur capacité à dégranuler sans que l'expression des granzymes et des perforines soient modulées **(D'Orlando et al. 2013)**. Dans

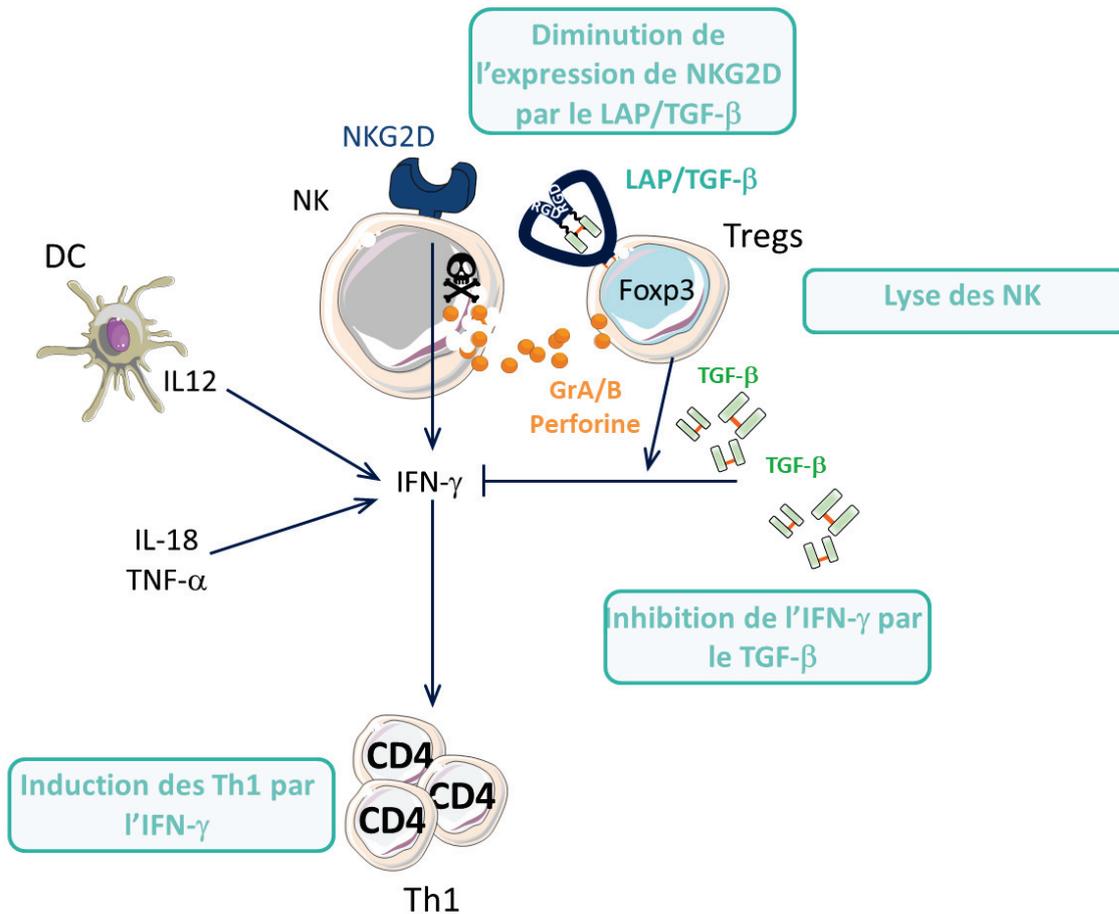


Figure 37: Propriétés des NK sur la réponse tumorale.

Les NK expriment des récepteurs activateurs, dont NKG2D, qui participe à l'activation de ces cellules et à la sécrétion d'IFN- γ . Cette cytokine va permettre le développement des Th1 qui établissent une réponse immunitaire anti-tumorale. L'IL-12, l'IL-18 et le TNF- α produit par les LT, les NK et les DC induisent également la sécrétion de l'IFN- γ . Celle-ci est inhibée par la présence de TGF- β dans le microenvironnement tumoral, sécrété notamment par les Tregs. Les Tregs utilisent plusieurs mécanismes pour inhiber les NK : la lyse cellulaire par la sécrétion de perforine et granzyme ou la diminution du récepteur activateur NKG2D par le TGF- β latent exprimé à leur surface.

ces cellules, l'augmentation de la production d'IFN- γ suggère un mécanisme compensatoire des cellules qui ne peuvent réaliser la cytolyse.

- **Rôle anti-tumoral des NK**

Les cellules NK ont la capacité de tuer des cellules infectées ainsi que des cellules tumorales comme il vient d'être décrit. L'activité de ces cellules est régulée par la liaison de ligands à leurs récepteurs activateurs ou inhibiteurs. Parmi ces récepteurs, NKG2D a été associé à leurs capacités anti-tumorales. La signalisation *via* ce récepteur favorise leur relargage d'IFN- γ et donc la différenciation des LT CD4^{pos} en Th1, cellules aux propriétés anti-tumorales (**Paul et al. 2016**). Cette sécrétion est potentialisée par l'IL-12 sécrétée par les DC mais également par le TNF- α ou l'IL-18 (**Ortaldo 2006**). Dans le mélanome murin, le traitement à l'IL-18 diminue la croissance tumorale en augmentant les propriétés anti-tumorales des NK (**Cho et al. 2000**). La production d'IFN- γ mais aussi de TNF- α et de GM-CSF par les NK est inhibée par le TGF- β (**Bellone et al. 1995**) (**Figure 37**). Dans ce sens, il a plus tard été démontré que la présence de TGF- β latent à la membrane des Tregs inhibe les NK en régulant négativement l'expression de NKG2D (**Ghiringhelli et al. 2005a**). Dans les tumeurs, certains Tregs expriment le GzB et utilisent ce mécanisme afin d'induire l'apoptose des NK et des CTL, favorisant la croissance tumorale (**Cao et al. 2007**).

- **Rôle anti-tumoral des Th1 et des CD8**

Suite à la présentation antigénique par les CPA, les LT CD8^{pos} se différencient en CTL et lors de la reconnaissance des cellules cibles, comme les cellules tumorales, ils vont mettre en place une synapse cytotoxique résultant en la lyse des cellules cibles (**Figure 34**). Lorsque les LT CD4^{pos} reçoivent une stimulation antigénique, ils vont se différencier, entre autres, en Th1. Ces cellules ont des propriétés anti-tumorales bien établies. Les Th1 libèrent d'importantes quantités d'IL-2, de TNF- α et d'IFN- γ et favorisent ainsi l'activation des CTL et l'activité anti-tumorale des TAM et des NK (**Horowitz et al. 2010; Ahrends et al. 2017**). La présence de Th1 et de LT CD8^{pos} corrèle avec un bon pronostic chez de nombreux patients atteints de divers types de cancers (**Fridman 2012**). Les Tregs ainsi que le TGF- β ont une forte capacité à inhiber les Th1 et les CD8 comme il a été décrit au cours de ce manuscrit (**Figures 26, 30, 32-34**).

Les Tregs, en synergie avec le TGF- β , emploient donc diverses stratégies afin d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale et de favoriser la progression des cellules cancéreuses.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

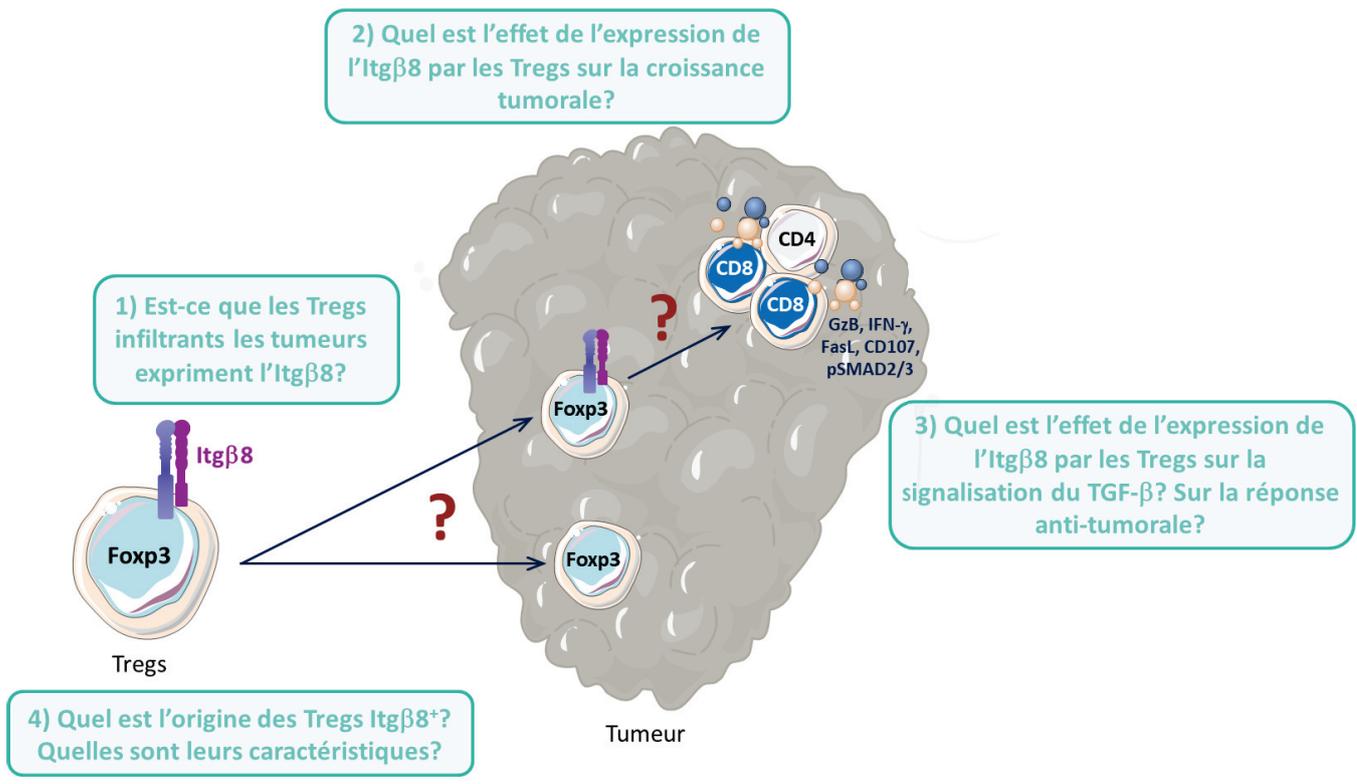


Figure 38: Schéma récapitulatif des objectifs de thèse.

Les taux de TGF- β dans les tumeurs ainsi que la présence de Tregs sont associés à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancers car ils inhibent fortement la réponse anti-tumorale et favorisent la croissance des tumeurs (**Teicher 2007; Neel et al. 2012; Tanaka and Sakaguchi 2017**). Ils représentent donc deux freins à la réussite des traitements anti-cancéreux et de nombreuses études visent à les cibler. Mais le TGF- β étant une cytokine sécrétée sous sa forme inactive, comprendre les mécanismes associés à son activation dans les tumeurs relève d'une importance majeure. Le rôle de l'Itg β 8 dans l'activation du TGF- β a clairement été démontrée et est fortement exprimée par les Tregs en condition basale chez l'Homme et chez la souris.

Ce projet a donc porté sur la détermination du rôle de l'Itg β 8 exprimée par les Tregs dans l'activation du TGF- β en contexte tumoral et les conséquences sur la réponse immunitaire anti-tumorale ainsi que sur la caractérisation de cette population de Tregs (**Figure 38**).

Afin de répondre à cette question j'ai analysé :

- 1) L'expression de l'Itg β 8 parmi les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs grâce à l'utilisation de souris reportrices pour l'*itgb8* et *foxp3* (Itg β 8-td-Tomato ; Foxp3-IRES-GFP) en condition non pathologique et après injection de cellules tumorales (mélanome et adénocarcinome mammaire) ;
- 2) La croissance tumorale de mélanome et de cancers du sein dans des souris déficientes pour l'Itg β 8 spécifiquement dans les Tregs (Foxp3^{Cre}; Itg β 8^{fl/fl} – Foxp3 ^{Δ Itg β 8}) ;
- 3) La réponse immunitaire des LT infiltrants les tumeurs des souris Foxp3 ^{Δ Itg β 8} et leurs contrôles ainsi que l'impact sur la signalisation du TGF- β dans ces cellules ;
- 4) La relevance de nos données obtenues chez la souris dans la pathologie humaine à partir d'étude bio-informatiques et de tumeurs fraîches de patients atteints de mélanome et de cancers du sein.

La population de Tregs Itg β 8^{pos} n'ayant, à ce jour, jamais été caractérisée, j'ai ensuite souhaité comprendre :

- 1) L'origine thymique et/ou périphérique des Tregs Itg β 8^{pos} ;
- 2) Les mécanismes impliqués dans la régulation de leur développement ;
- 3) Le profil d'expression des Tregs Itg β 8^{pos}.

RÉSULTATS

Les résultats issus de mes travaux de thèse ont permis : la rédaction d'un article qui sera soumis avant la fin de l'année 2019 ainsi que la préparation d'un deuxième article qui sera soumis pendant le premier trimestre de l'année 2020.

Article 1: Itgβ8⁺ regulatory T cells promote cancer immune-escape by activating TGF-β produced in the tumor-microenvironment

Résumé:

Parmi les stratégies permettant aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire, une des plus puissantes implique le TGF-β (Transforming Growth Factor Bêta). Néanmoins, le TGF-β est sécrété sous sa forme inactive et son activation dans le micro-environnement tumoral est à ce jour inconnu. Nos travaux démontrent que les cellules T régulatrices Foxp3^{pos} (Tregs) qui expriment l'intégrine αvβ8 (Itgβ8), activent le TGF-β produit dans le micro-environnement tumoral. La délétion de l'Itgβ8 spécifiquement dans les Tregs entraîne une diminution de la signalisation du TGF-β dans les LT effecteurs infiltrants les tumeurs. Par conséquent, le programme cytotoxique des LT CD8^{pos} est activé, permettant une élimination efficace des tumeurs. La relevance de ces données obtenues chez la souris a été confirmée chez l'Homme. Ainsi, cette étude révèle que les cellules tumorales agissent de concert avec les Tregs afin de générer un micro-environnement suppresseur et justifie le ciblage des Tregs Itgβ8^{pos} dans les thérapies anti-cancéreuses.

Itgβ8⁺ regulatory T cells promote cancer immune-escape by activating TGF-β produced in the tumor-microenvironment

Alexandra Lainé¹, Ossama Labiad¹, Hector Hernandez-Vargas¹, Sébastien This³, Amélien Sanlaville¹, Stéphane Dalle^{1,2}, Dean Sheppard⁴, Mark A. Travis⁵, Helena Paidassi³ and Julien C Marie^{1*}

¹ Department of Immunology Virology and Inflammation, Cancer Research Center of Lyon INSERM U 1052, CNRS UMR 5286, Centre Léon Bérard, Claude Bernard Lyon1 University, 69373, Lyon, France

² Department of Dermatology, Claude Bernard Lyon 1 University, Centre Hospitalier Lyon Sud 69495 Pierre Bénite, France

³ Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U 1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Claude Bernard Lyon1 University, 69000, Lyon, France

⁴ University of California San Francisco, USA

⁵ Manchester Immunology group, faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester M13 9PT, UK

Abstract:

Among the strategies allowing the cancer cells to escape the immune system, the presence of TGF-β1 in their micro-environment is regarded as a potent one. However, TGF-β1 is secreted under an inactive form and how TGF-β1 present in the tumor micro-environment is activated remains a key question that is unsolved. Here, we demonstrated that Foxp3 regulatory T cells (Tregs) expressing integrin αvβ8 (Itgβ8) activate the TGF-β1 produced by the tumor micro-environment. The selective ablation of Itgβ8 in Tregs impaired TGF-β signaling in tumor-infiltrating effector T cells. Subsequently, the cytotoxic program of CD8^{pos} T cells was activated, leading to efficient elimination of the cancer cells. We confirmed the relevance of our data in mice to the human pathology. Thus, this study reveals that cancer cells act in concert with Itgβ8^{pos} Tregs to produce a bioactive source of TGF-β1 and provides rationale for therapeutic targeting of Itgβ8 Tregs in cancer.

One Sentence Summary:

Tumor cells and regulatory T cells collaborate to create an effective immunosuppressive micro-environment.

Main Text:

The tenet of cancer immunotherapy is based on the ability of the immune system to survey for malignant transformation and be efficient to eliminate tumor cells. However, solid tumors can escape from the immune system by orchestrating a micro-environment that spoils the productivity of an efficient anti-tumor immune response. Transforming growth factor beta (TGF- β) 1 is regarded as a potent actor of the tumor immunosuppressive micro-environment (1). This cytokine is a polypeptide highly conserved in all mammals (2), impairs numerous effector T lymphocyte functions and promotes the development and stability of regulatory T cells (3, 4, 5). Subsequently, the selective deprivation of TGF- β signaling in T lymphocytes was reported to efficiently prevent from solid tumor growth (6).

A particularity of TGF- β is to be secreted under its inactive form composed of the mature cytokine encircled by the latency-associated peptide (LAP) in a wreath-like structure which effectively covers all the contact sites of the mature TGF- β that must interact with TGF- β receptor complexes (TGF β RI and TGF β RII) to induce signaling including the phosphorylation of SMAD2/3 (7). Hence, as long as LAP maintains close contacts with the mature cytokine, the secreted TGF- β can be stored in the tumor micro-environment without functionality (8). The activation of latent complex is therefore indispensable for TGF- β function. Thus, how TGF- β 1 present in the tumor micro-environment is activated is a crucial, but unanswered question to understand tumor-immune escape.

Among the immune cells, CD4^{pos} T cells expressing the transcriptional factor FOXP3 (Tregs), whose the presence within the tumor has largely been associated to bad prognosis both in mice and in human (9), are regarded as high providers of TGF- β 1 (1). However, the deprivation of TGF- β 1, selectively in Tregs, has been reported to have no effect neither on tumor growth nor on the activation of effector T cells infiltrating the tumor (7). Surprisingly, we observed that the specific depletion of Tregs led to a clear decrease of the levels of activated TGF- β 1 in the tumor and impairment of TGF- β signaling, based on the phosphorylation of SMAD2/3 in tumor infiltrating T cells (**Fig. S1A-C**). These observations strongly suggest that Tregs contribute to the source of bioactive TGF- β 1 in the tumor-

microenvironment not through the TGF- β 1 they produce but likely by activating TGF- β 1 produced by other cells of the tumor micro-environment.

Strikingly, in clear contrast to the deprivation of TGF β 1 in Tregs, we observed that *Tgf- β 1* ablation in cancer cells impaired their growth and led to exacerbated activation of tumor-infiltrating effector T lymphocytes based on granzyme B (GzB), IFN- γ and TNF- α production as well as LAMP1 (CD107a) surface expression testifying of degranulation (**Fig. S2A-F**). In line with a selective effect of the TGF- β 1 produced by the cancer cells on infiltrating T cells and not directly on the cancer cells *per se*, the growth of TGF β 1-deficient cancer cells was not affected in CD3 ϵ deficient mice (**Fig. S2G**). Thus, these set of observations strongly implies that within the tumor micro-environment, the main source of TGF- β 1 responsible for the impairment of the anti-tumor response mediated by effector T cells is provided by the cancer cells *per se*, and that Tregs help enforce the immune-suppressor potential of TGF- β 1 secreted by cancer cells by increasing its activation.

In order to confirm this assumption, we first generated *Itg β 8*-td-Tomato reporter mice, to analyze the expression of integrin $\alpha\beta$ 8 (*Itg β 8*) (**Fig. S3**), a cell-surface protein reported to promote TGF- β 1 activation and be expressed on hematopoietic cells (11). Flow cytometry analysis of melanoma and breast cancer revealed that among hematopoietic cells (CD45^{pos}) infiltrating the tumors, T lymphocytes composed the largest part of the cells expressing *Itg β 8* (80-90%) (**Fig. S4A**). Moreover, within the T-cell compartment the *Itg β 8* expression was mainly restricted to Tregs (75-85%) (**Fig. S4A-C**). In agreement with their *Itg β 8* expression, we found that only *Itg β 8*^{pos} Tregs efficiently activated TGF- β 1 compared to their *Itg β 8*^{neg} counterparts or non Foxp3 T cells (**Fig. S5 and not shown**).

Next, we selectively ablated *Itg β 8* in Tregs, using *FOXP3-Cre Itg β 8^{fl/fl}* mice (*FOXP3* ^{Δ *Itg β 8*}), we previously reported to exhibit any defect in Treg numbers (12). In clear contrast to their littermate controls, *FOXP3* ^{Δ *Itg β 8*} mice showed a profound impairment of the tumor growth (**Fig. 1A-B**), with 15-45% of the animals exhibiting a complete control of the tumor progression depending on the tumor type (**Fig. 1C**). Interestingly, flow cytometry analysis of the tumors and their draining lymph nodes (tdLN) demonstrated that both the numbers and the proportion of Natural Killers (NK) cells and T cells, including Tregs, were

similar between FOXP3^{ΔItgβ8} mice and control animals (**Fig. 2A**). Moreover, the proliferative status of tumor-infiltrating T cells was not affected in FOXP3^{ΔItgβ8} mice (**Fig. 2B**), excluding a role of the Itgβ8 in ability of Tregs to impair effector T cell-recruitment and proliferation in the tumor. However, the inhibition of tumor growth observed in FOXP3^{ΔItgβ8} mice was completely lost when animals were depleted in their CD8^{pos} T cells (**Fig. 2C**), implying that Itgβ8^{pos} Tregs may repress CD8^{pos} T cell anti-tumor functions. In line with this scenario, we found strikingly high levels of production of GzB in association with the surface expression of their degranulation marker CD107a in CD8^{pos} T cells infiltrating tumors of FOXP3^{ΔItgβ8} mice compared to tumors from control animals (**Fig. 2D**). In agreement with the exacerbated cytotoxic features of CD8^{pos} T cells in the tumor from FOXP3^{ΔItgβ8} mice, histology analysis showed higher numbers of apoptotic tumor cells surrounded by GzB^{pos} CD8^{pos} T cells in FOXP3^{ΔItgβ8} mice compared to their littermate controls (**Fig. 2E-F**). Notably, no difference in cytotoxic phenotype of CD8 T cells was observed in the tdLN of FOXP3^{ΔItgβ8} mice and control animals, underlying the ability of Itgβ8 expression on Tregs to selectively repress tumor-infiltrating T cells (**Fig. S6**).

We next assessed whether Itgβ8 in Tregs controlled the cytotoxic program of tumor infiltrating CD8 T cells by modulating their TGF-β signaling. We found that the phosphorylation of SMAD2-3 was importantly impaired in tumor infiltrating T cells from FOXP3^{ΔItgβ8} mice compared to their counterparts (**Fig. 3A**). Of note, in line with the absence of effect of Itgβ8^{pos} Tregs on effector T cells in the tdLN, the phosphorylation of SMAD2-3 in these cells was similar between FOXP3^{ΔItgβ8} mice and control animals (data not shown). In order to firmly confirm that Itgβ8^{pos} Tregs repressed the cytotoxic functions of tumor infiltrating T cells by impairing the ability of TGF-β to signal in effector T cells, we reconstituted the T cell-compartment of CD3ε-KO mice with Tregs from FOXP3^{ΔItgβ8} mice and Foxp3^{neg} T cells expressing either a constitutively active (CA) form of TGFβR (TGFβRI^{CA}) or TGFβRI^{WT} (*13*) (**Fig. 3B**). In clear contrast to TGFβRI^{WT} CD8 T cells, TGFβRI^{CA} CD8 T cells infiltrating the tumor failed to exhibit exacerbated cytotoxic features (**Fig. 3C-D**). Thus, by activating TGF-β1 present in the tumor micro-environment, Itgβ8^{pos} Tregs provide a functional source of TGF-β1 that signals in effector T cells and efficiently represses their anti-tumor response and hence contributes to tumor progression.

In order to address the relevance of our findings in mice to the human pathology, we cultured fresh tumor sections in the presence of neutralizing anti-Itgβ8 antibodies. Importantly, like in mice, among tumor infiltrating hematopoietic cells, we found that Tregs composed the main population expressing the Itgβ8 (**Fig. S7**). In line with our observations in FOXP3^{ΔItgβ8} mice (**Fig. 2**), flow cytometry analysis of the tumor immune infiltrates revealed that anti-Itgβ8 antibody treatment was sufficient to increase the cytotoxic features of infiltrating CD8^{pos} T cells, both in melanoma and breast cancers (**Fig. 4A-B**).

Finally, to determine whether the presence of Itgβ8 Tregs in tumors can be used as an independent prognostic factor for patient survival, we made use of a recent publicly available set of single Treg cell-sequencing analysis data from breast cancer patients (14), and obtained a specific Itgβ8^{pos} Treg gene expression signature, allowing us to perform multivariable survival analysis. In total agreement with our work in mice, we found that tumors with high Itgβ8^{pos} Treg score were associated with worse survival outcome of patients (**Fig. 4C**). Of note, already reported by others (15), Foxp3 expression was not sufficient to predict patient prognosis (**Fig. S8A**). Moreover, given that *Itgβ8* expression was reported to be increased on activated Tregs (12), we also removed activated Treg signature from the Itgβ8^{pos} Treg gene expression signature. We obtained similar results as the Itgβ8^{pos} Treg total gene signature (**Fig. S8B**), excluding a contribution of Itgβ8^{pos} Treg associated to their potential activation status in their immunosuppressive function in the tumor.

Understanding how the immunosuppressive micro-environment of the tumor is generated is essential to establish new and efficient cancer immunotherapies. The present study reveals an unsuspected collaboration between Itgβ8^{pos} Tregs and cancer cells to forge a potent immunosuppressive micro-environment within the tumor by providing a bio-active source of TGF-β1 which impairs effector T cell-function and allows tumor immune escape and progression. Though some tumors are considered more immunogenic than others, evidences of tumor-infiltrating lymphocytes and their subset composition paralleling disease progression are largely reported. Here, we propose that the levels of Itgβ8^{pos} Tregs in the tumors can be considered as a prognostic marker for patient outcome and that targeting Itgβ8^{pos} Tregs may represent a promising immunotherapy approach for the treatment of cancer.

References

1. E. Batlle, J. Massague, Transforming Growth Factor-beta Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **50**, 924-940 (2019).
2. M. M. Shull *et al.*, Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693-699 (1992).
3. J. C. Marie, D. Liggitt, A. Y. Rudensky, Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* **25**, 441-454 (2006).
4. M. O. Li, S. Sanjabi, R. A. Flavell, Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* **25**, 455-471 (2006).
5. Y. P. Rubstov, A. Y. Rudensky, TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* **7**, 443-453 (2007).
6. L. Gorelik, R. A. Flavell, Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* **7**, 1118-1122 (2001).
7. Y. Shi, J. Massagué, Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700 (2003).
8. M. A. Travis, D. Sheppard, TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* **32**, 51-82 (2013).
9. A. Tanaka, S. Sakaguchi, Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res* **27**, 109-118 (2017).
10. M. K. Donkor *et al.*, T cell surveillance of oncogene-induced prostate cancer is impeded by T cell-derived TGF-beta1 cytokine. *Immunity* **35**, 123-134 (2011).
11. P. Aluwihare *et al.*, Mice that lack activity of alphavbeta6- and alphavbeta8-integrins reproduce the abnormalities of Tgfb1- and Tgfb3-null mice. *J Cell Sci* **122**, 227-232 (2009).
12. J. J. Worthington *et al.*, Integrin alphavbeta8-Mediated TGF-beta Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **42**, 903-915 (2015).

13. J. M. Doisne *et al.*, iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med* **206**, 1365-1378 (2009).
14. P. Savas *et al.*, Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat Med* **24**, 986-993 (2018).
15. G. Plitas, C. Konopacki, K. Wu, P. D. Bos, M. Morrow, E. V. Putintseva, D. M. Chudakov, A. Y. Rudensky, Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer. *Immunity* **45**, 1122-1134 (2016).
16. M. Abe, J. G. Harpel, C. N. Metz, I. Nunes, D. J. Loskutoff, D. B. Rifkin, An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Anal Biochem* **216**, 276-284 (1994).

Acknowledgements

The expert assistance of V. Bernet, S. Léon-Goddard, is acknowledged as well as the advices from F. Fauvet and V. Fontanier. We also thank Drs J. Fontenot and S. M'Homa Soudja for critically reading the manuscript and the Marie lab members for their helpful discussions. This work was supported by grants from ANR investissement d'Avenir ANR-10-LABX-61 (JCM), the Helmholtz-DKFZ-Inserm program (JCM), BMS foundation Grant and Fonder contre le cancer (JCM). AL was supported by a LabEx DEVweCAN grant and Ligue Nationale Contre le Cancer.

Supplemental material will be illustrated online.

Supplementary Materials:

Materials and Methods

Figures S1-S8

Materials and Methods:

Mice

$Itgb8$ -Td-Tomato mice were generated on a C57BL/6 background by expression of an internal ribosomal entry site-fluorescent tandem dimer (td)-Tomato cassette (IRES-Td-Tomato) immediately following the stop codon in exon 14 of *Itgb8* (**Fig. S3**) (GenOway, Lyon, France). *Itgb8-Td-Tomato* mice had no gross abnormalities and were born at the expected female:male ratios. Animals were cross on Foxp3-IRES-GFP background to follow Treg cells. FOXP3-Cre^{eYFP}; $Itgb8^{fl/-}$ (Foxp3^{Ctrl}) mice and FOXP3-Cre^{eYFP}; $Itgb8^{fl/fl}$ (Foxp3 ^{$\Delta Itgb8$}) mice on C57BL/6 background were described in (12). FOXP3-DTR mice were described, *CD4-Cre; Stop^{fl/fl}; tgfb1^{CA}; Foxp3^{GFP}* on C57BL/6 background were described (13). CD3 ϵ ^{KO} and C57BL/6 mice were purchased (Charles Rivers, France). All animals were between 2-6 months of age and were maintained in SPF mouse facility AniCan and PBES, Lyon and treated in accordance with the European Union guidelines for animal experimentation. Mouse protocols were all approved by ethic committee CECCAP and got French Ministry accreditation.

Cell lines

B16-shTGF- β 1 cells were generated by introduction of shTGF- β 1 RNA in B16-F10 (B16) melanoma obtained from ATCC. Briefly, lentiviral vectors encoding shRNA pLKO.1 puro Tgf- β 1: NM-011577.1-1753s1c1 was kindly given by Prof Klatzmann. Infected B16 were selected on puromycin (Sigma, P8833). Breast medullary adenocarcinoma cell line E0771 were obtained from ATCC. MLEC cells, with luciferase activity reporting TGF- β signaling were previously described (16). All cell lines were maintained in DMEM (Gibco, 31966-021) supplemented with 10% FCS (LifeTechnologies, 10270-106), 1% HEPES (LifeTechnologies, 15630-056), 1% penicillin/streptomycin (LifeTechnologies, 15140-122). 5 μ g/ml of puromycin (P8833-10MG) or 250 μ g/ml of geneticin (LifeTechnologies, 10131-027) were added for B16-shTGF- β 1 and MLEC cell culture respectively. All cell lines were tested negative for mouse pathogens, including mycoplasma by PRIA test (Charles-Rivers).

Human tumor

Breast adenocarcinoma tumors and primary melanoma were obtained by the Biological Resource Center of Centre Léon Bérard (French agreement number: AC-2013-1871) and Hôpital Lyon Sud respectively, after approval by the institutional review board and ethics committee, with fully informed patient consent. Fresh tumors were imbedded in 1% agarose and cut at 250 μm with microtome (Seica). Tumor slides were then cultured on sponge (Uvac 1264) and 45 μm membrane (Millipore) in RPMI-completed medium, 1% FCS, 1% HEPES, 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM-NEAA (LifeTechnologies), 1% NaPyruvate (LifeTechnologies) with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of neutralising Itg β 8 antibody ADWA-16 provided by Dean Sheppard. Tumor slices were harvested 48 hours later, minced with scalpel, and incubated with 5 mg/ml collagenase IV (Gibco) and 1 mg/ml DNase I (Sigma, 11284932001) in RPMI supplemented with 1% FCS and 1% HEPES for 30 minutes at 37°C with agitation.

Mouse tumor implantation and mouse tissue preparation

5×10^5 B16 cells or B16-shTGF- β 1 cells were injected intra-dermally (id) in the back skin. 5×10^5 E0771 cells were injected in the abdominal mammary gland # IV. Tumor growth was monitored every 2 days with caliper. Tumor diameter (mm^2) was calculated as Width (L) x length. Tumors were minced with scalpel, incubated with 1 mg/ml collagenase V (Sigma, C2674-1G) and DNase I at 1 mg/ml (Sigma, 11284932001) in DMEM supplemented with 1% FCS and 1% HEPES for 30-45 minutes at 37°C with 200 rpm agitation. Tumor draining lymph nodes (tdLN, inguinal) were mechanically grinded.

Adoptive T cell transfers

CD3^{pos}Foxp3^{neg} cells from the lymph nodes of *CD4-Cre;Stop^{fl/fl};tgfbr1^{CA};Foxp3^{GFP}* mice, *CD4-Cre;Foxp3^{GFP}* mice and CD4^{pos}Foxp3^{pos} cells from Foxp3 ^{Δ Itg β 8} were purified by cell sorting with ARIA-II (BD). 5×10^4 CD4^{pos}Foxp3^{pos} cells mixed with 4.5×10^5 CD3^{pos}Foxp3^{neg} were intravenously injected to CD3 ϵ ^{KO} mice.

CD8 T cell depletion

Depletion of CD8 T cells was performed by intra-peritoneal injection of anti-CD8 β (BioXCell, clone Lyt3.2; BE0223). 387,5 μ g per mouse were injected every 4 days, 8 days before tumor injection and all along the experiment. Depletion was systematically checked by flow cytometry on blood samples before tumor injection and on spleen after the experiments using anti-CD8 β (YTS156.7.7, Biolegend).

Flow cytometry and antibodies

Surface staining of mouse cells was performed using the following fluorescent-conjugated antibodies: CD3 (145-2C11; BD biosciences), CD4 (RM4-5; Biolegend), CD8a (53.6.7; BD biosciences), NK1.1 (PK136; Biolegend), CD11c (N418; BD biosciences), CD11b (M1/70; eBiosciences), CD19 (1D3; BD biosciences), CD45 (30-F11; BD biosciences), CD107A (eBio1D4B, eBiosciences), CD107B (M3/84, BD biosciences), FasL (MFL3, eBiosciences). For intracellular cytokine staining, mouse cells were restimulated *ex vivo* for 4h with 500 ng/ml PMA (Sigma Aldrich) and 500 ng/ml ionomycin (Sigma Aldrich) in presence of Brefeldin A at 1/1000 (Invitrogen). For intracellular staining cells were fixed and permeabilized using Fixation and Permeabilization Buffer kit (eBiosciences) according to the manufacturer's protocol and stained with anti IFN- γ (XMG1.2; eBiosciences), TNF-a (MP6-XT22, BD biosciences) and Granzyme B (Invitrogen). For P-SMAD2/3 staining, cells were immediately fixed with Fixation and Permeabilization Buffer kit (eBiosciences) prior staining and anti P-SMAD2/3 (D27F4, Cell Signaling) was detected with goat-anti rabbit A488 (LifeTechnologies, A11034). Human staining was performed using the following fluorescent-conjugated antibodies: CD3 (UCHT1; BD biosciences), CD45 (HI30; BD biosciences), CD4 (RPA-T4; LifeTechnologies), CD8 (SK1; BD biosciences), CD107 (H4A3; BD biosciences) and Granzyme B (Invitrogen). All samples were acquired with BD Fortessa and data were analyzed with FlowJo Software.

Quantitative real-time PCR

mRNAs were isolated with RNeasy mini kit (Qiagen) and reverse transcribed with iScript cDNA synthesis kit (Biorad). Real-time RT-PCR was performed using LightCycler 480 SYBR Green Master (Roche) and different set of primer on Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche). Samples were normalized on HPRT and analyzed according to the $\Delta\Delta C_t$ method. mTGF- β 1 (forward), 5'-ATCCTGTCCAAACTAAGGCTCG-3'; mTGF- β 1 (reverse), 5'-ACCTCTTTAGCATAGTAGTCCGC-3'; mHPRT (forward), 5'-TCAGTCAACGGGGGACATAAA-3'; mHPRT (reverse), 5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG-3'

Measure of active TGF- β

B16 and B16shTGF β 1 were co-cultured with MLEC cells. Tumors were dilacerated in small volume of unsupplemented DMEM that was rapidly placed overnight on MLEC cells. Luciferase activity was detected via the Luciferase Assay System (Promega, E1500) on a TECAN. TGF- β bioactivity was normalized to the area of the tumor. Presented as luminescence in arbitrary units (a.u.).

Immuno-staining

Tumor sections were permeabilized with 0.2% Triton (Sigma, T9284) and digested with Proteinase K (ThermoFisher, K182001). For positive control, sections were incubated with DNase I at 1mg/ml (Sigma, 11284932001). Sections were then incubated with biotin-16-dUTP (Sigma, 11093070910) and TUNEL enzyme (Sigma, 11767305001) in deoxynucleotidyltransferase buffer (1mM CoCl₂ (Sigma, 15862-1ml-F), Tris-HCl, 200mM Sodium Cacodylate (Sigma, C0250-25G), 0.125% BSA (Sigma, A7906-500G)) at 37°C for 60 min. Sections were washed in stop buffer (300mM NaCl (Sigma, S3014-1KG), 30mM Sodium Citrate (Sigma, 71406-500G)) and blocked with 2% BSA. Sections were then labelled with streptavidin-Phycoerythrin (eBiosciences, 12-4317-87), CD8-A488 (53-6.7, BD biosciences) and DAPI (Euromedex, 1050-A) and mounted with Fluoromount (Sigma, F4680-25ml).

Single Cell RNA-Seq Reanalysis

All single cell data was analysed with the 'Seurat' package v.3.1.0 [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031>]. A Seurat object containing published human Treg single cell RNA-Seq data [<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.001>] was downloaded from the figshare repository [https://figshare.com/articles/Treg_and_Tmem_scRNA-seq_across_tissues_-_10X/7098551]. Re-scaling was performed after subsetting in FOXP3^{pos} cells, followed by marker identification (using the "bimod" parameter for a Likelihood-ratio test) in ITGB8-expressing cells. Genes with a p value < 0.05 were considered as markers of ITGB8^{pos} FOXP3^{pos} cells. In a similar way, published RNA-Seq data for CD3^{pos} single T cells in triple-negative breast cancer (TNBCs) [<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0078-7>] was downloaded from the GEO repository [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE110686>] in a matrix market format. A Seurat object was created, normalized, subset and re-scaled, followed by ITGB8^{pos} marker identification, as described above. For both Itgβ8^{pos} single-cell signatures, a score was created using the sig.score function of the 'genefu' package v.2.11.2 [<https://doi.org/10.1093/jnci/djr545>], with logarithmic fold-change (logFC) as coefficient giving the direction and strength of the association of each gene in the gene list.

TCGA data exploitation

Breast cancer expression and clinical data was downloaded from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) repository [<https://www.cancer.gov/tcga>.] using the R packages 'TCGAbiolinks' v.2.9.4 [<http://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>] and 'RTCGA.clinical' v.20151101.8.0 [Kosinski M (2019). RTCGA.clinical: Clinical datasets from The Cancer Genome Atlas Project. R package version 20151101.14.0.], respectively. Briefly, TCGA-BRCA was queried for Illumina HiSeq RNA-Seq results. Downloaded data was preprocessed, normalized and filtered using 'TCGAbiolinks', and a ITGB8^{pos} score was calculated for each sample, as described above. Tumor samples were classified into two groups, Low and High, based on the median of the ITGB8⁺ score. Survival data (i.e. time to last follow-up and overall survival status), was used to fit a Cox proportional hazards regression model using the 'survival' package v.2.44-1.1 [<https://CRAN.R-project.org/package=survival>]. Survival

Kaplan-Meier curves were plotted with 'survminer' v.0.4.5 [<https://CRAN.R-project.org/package=survminer>].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using paired t-test, unpaired t-test and Mann-Whitney when appropriate. For survival analysis Mantel Cox proportional hazard model was used. Differences were considered significant when p values were < 0.05.

Figure legends

Fig. 1: $Itg\beta 8^{pos}$ Tregs are essential to promote tumor growth

$Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$ mice and their controls ($Foxp3^{Ctrl}$) were injected either i.d. with B16-F10 melanoma cells or in the mammary gland with E0771 breast cancer cells. **(A)** Graphs illustrate the size of the tumors at different days post injection. n = 8 mice per group (melanoma) and N = 6-9 mice per group (breast cancer), representative of 2-3 experiments. Means are shown \pm SD. **(B)** Graphs demonstrate the tumor size at the day of the sacrifice of 2-3 experiments. Means are shown \pm SD. **** $p < 0.0001$ and * $p < 0.05$ were determined by Student's paired *t* test. **(C)** Tables illustrate the numbers and percentage of animals with a full control of tumor growth (Tumor < 10 mm² all along the experiment).

Fig. 2: $Itg\beta 8^{pos}$ Tregs impair the tumor-infiltrating CTL function

$Foxp3^{Ctrl}$ and $Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$ mice were injected i.d. with B16-F10 melanoma cells. **(A, B, D-F)** Inguinal lymph nodes (tdLN, tumor-draining lymph node) and the tumors were harvested 15-18 days later and analyzed by flow cytometry. **(A)** Graphs illustrate the percentage of T cells as well as the absolute number of Tregs, CD4 T cells, CD8 T cells and NK cells. Means are shown \pm SD. **(B)** Graphs demonstrate the percentage of Ki67^{pos} cells among the different populations. **(C)** $Foxp3^{Ctrl}$ and $Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$ mice were treated or not with depleting anti-CD8 β . Graph illustrates the tumor size 16 days after cell injection. Means are shown \pm SD. * $p < 0.05$ was determined by paired t-test. **(D)** Representative counter plots of CD107a/b and granzyme (Gz)B in CD8^{pos} T cells from tumors. Graph illustrates the percentage of GzB^{pos}CD8^{pos} T cells in the tumor and is representative of 2 experiments. Means are shown \pm SD. ** $p < 0.01$, was determined by Mann-Whitney test. **(E)** Illustration of immunostainings of tumor sections.

Graph demonstrates the quantification of TUNEL^{pos} cells. Each dot represents a counted field within the tumor. * $p < 0.05$, was determined by unpaired t-test.

Fig. 3: Itgβ8^{pos} Tregs promote TGF-β signaling in tumor infiltrating T cells affecting their anti-tumor response

(A) Foxp3^{Ctrl} and Foxp3^{ΔItgβ8} mice were injected i.d. with B16-F10 melanoma cells. Tumors were harvested 15-18 days later and analyzed by flow cytometry. Histograms illustrate the levels of phosphorylation of SMAD2/3 in tumor infiltrating T cells. FMO was used as a negative control. Data are representative of 2 independent experiments. (B-D) FOXP3^{neg} T cells from *CD4-Cre;Stop^{fl/fl}tgfbr1^{CA};Foxp3^{GFP}* mice (TGFβRI^{CA}) and their littermate controls (TGFβRI^{WT}) and Tregs from Foxp3^{ΔItgβ8} mice were adoptively transferred in CD3ε^{KO} mice. 10 days later recipient mice were injected i.d. with B16-F10 melanoma. (B) Experimental design. (C) Representative counter plots of CD107 and GzB expressed by tumor infiltrating CD8^{pos} T cells 15 days after tumor cell injection. Data are representative of 2 experiments. (D) Graph illustrates the percentage of GzB^{pos}CD8^{pos}, CD107^{pos}CD8^{pos} and GzB^{pos}CD107^{pos}CD8^{pos} T cells in the tumor and is representative of 2 experiments. Means are shown ± SD. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, was determined by unpaired t-test.

Fig. 4: Targeting Itgβ8 in human tumors increases effector T cells function and Itgβ8 Tregs gene signature correlates with poor survival

(A-B) Fresh human tumor sections were maintained in culture conditions in the presence or not of neutralizing anti-Itgβ8 antibody. 48 hours later tumors were analyzed by flow cytometry. Graphs illustrate the percentage of CD107a^{pos} and GzB^{pos} among the infiltrating CD8^{pos} T cells. (C) Overall survival of breast cancer patients stratified by Itgβ8 signature in tumor infiltrating Tregs. n = 1,080 (541 with high score, 539 with low score). log rank p = 0.0018, Mantel-Cox test.

Supplementary figure legends

Fig S1: Defect of TGF- β activation in the tumor in the absence of Tregs

FOXP3-DTR mice expressing the receptor of the diphtheria toxin (DT) selectively in Tregs were injected i.d. with B16-10 melanoma as well as their littermate controls. 1 week later, animals were treated with DT for two consecutive days. **(A)** Graphs illustrate the percentage of Foxp3^{pos} among the infiltrating CD3^{pos} cells in tumors. **(B)** Active TGF- β was measured on tumor dilacerates 4 days later. Graph illustrates the concentration of TGF- β (AU arbitrary Unit) per grams of tumor. Means are shown \pm SD. **(C)** Graphs illustrate the MFI of pSMAD2/3 in tumor-infiltrating CD3^{pos} cells.

Fig S2: TGF- β 1 produced by tumor cells promotes tumor immune escape

(A) Graph illustrates the relative expression of *tgfb1* after RT-qPCR on B16shTGF- β 1 cells and B16 controls (B16). The values were normalized on *hpert* expression. Means are shown \pm SD. $***p < 0.001$ was determined by Student t-test. **(B-G)** B16 or B16shTGF- β 1 cells were injected i.d. **(B)** Graph demonstrates the tumor size 18 days after injection in C57BL/6 mice. Means are shown \pm SD. $**p < 0.01$ was determined by Mann-Whitney test. **(C-F)** Tumors were analyzed by flow cytometry at day 18 following their injection. Graphs illustrate the expression of CD107a at the surface of CD8^{pos} T cells as well as the production of granzyme B (GzB) and of TNF- α and IFN- γ by CD8^{pos} T cells or CD4^{pos} T cells. Means are shown \pm SD. Data are representative of 2-3 experiments.

Fig S3: Generation of *Itgb8-Td-Tomato* mice

Genetic construction and model validation of the new mouse reporter *Itgb8*-tdTomato for *Itgb8* expression. **(A)** Black rectangles represent *Itgb8* coding sequences, grey rectangle indicates non-coding exon portions, solid line represents introns. Start (ATG) and Stop codons are indicated, and yellow and red rectangles represent the IRES and the reporter (tdTomato) sequences, respectively. **(B)** Tomato^{pos} and Tomato^{neg} CD3^{pos} T cells were sorted from the spleen of naïve *Itgb8*-td-Tomato mice. **(C)** β 8 integrin gene (*Itgb8*) and protein expression were assessed by RT-qPCR and Western Blot. Histogram shows *itgb8* expression relative to *gapdh*.

Fig S4: Tregs compose the main hematopoietic cells expressing Itgβ8 in tumors

Melanoma and breast cancer from Itgβ8-dt-Tomato reporter mice were analyzed by flow cytometry for their hematopoietic cell (CD45^{pos}) compositions 12 and 18 days after their implantation in the dermis or in the mammary gland, respectively. **(A)** Representative dot plots illustrate the Itgβ8 expression among CD45^{pos} cells as well as the expression of CD3 and Foxp3 among Itgβ8^{pos}CD45^{pos} cells. **(B)** Pie charts represent the average repartition of Itgβ8^{pos}CD45^{pos} cells in the indicated populations. **(C)** Representative counter plots illustrating Itgβ8 expression in Tregs. Data are representative of 2-6 animals.

Fig S5: Increased ability of Itgβ8^{pos} Tregs to activate TGF-β

Graph demonstrates the concentration of activated TGF-β in a 24 hour-culture of Itgβ8^{pos} Tregs and Itgβ8^{neg} Tregs. Means are shown ± SD.

Fig S6: Itgβ8^{pos} Tregs do not impaired effector T cell functions in tumor draining lymph nodes

Foxp3^{Ctrl} and Foxp3^{ΔItgβ8} mice were injected i.d. with B16-F10 melanoma cells. Inguinal lymph nodes (tdLN, tumor-draining lymph node) were harvested 15-18 days later and analyzed by flow cytometry. Representative counter plots of CD107a/b and granzyme (Gz)B in CD8^{pos} T cells from tdLN. Graph illustrates the percentage of GzB^{pos}CD8^{pos} T cells in the tdLN and is representative of 2 experiments.

Fig S7: Human Tregs infiltrating tumor express high amount of Itgβ8

Analysis of datas published by Plitas et al. (15) from RNA-sequencing of sorted Tregs and Tconvs from blood and patient tumors.

Fig S8: Foxp3 signature does not correlate with patient prognosis, whereas Itgβ8^{pos} Treg signature deprived of activation signature correlates with bad prognosis

(A) Overall survival of breast cancer patients stratified by Foxp3 expression in tumors. n = 1,080 (535 with high expression, 545 with low expression). log rank p = 0.19, Mantel-Cox test. **(B)** Overall survival of breast cancer patients stratified by Itgβ8 signature deprived of activation signature in tumor infiltrating Tregs. n = 1,080 (540 with high score, 540 with low score). log rank p = 0.00086, Mantel-Cox test.

Fig. S1 Lainé *et al.* 2019

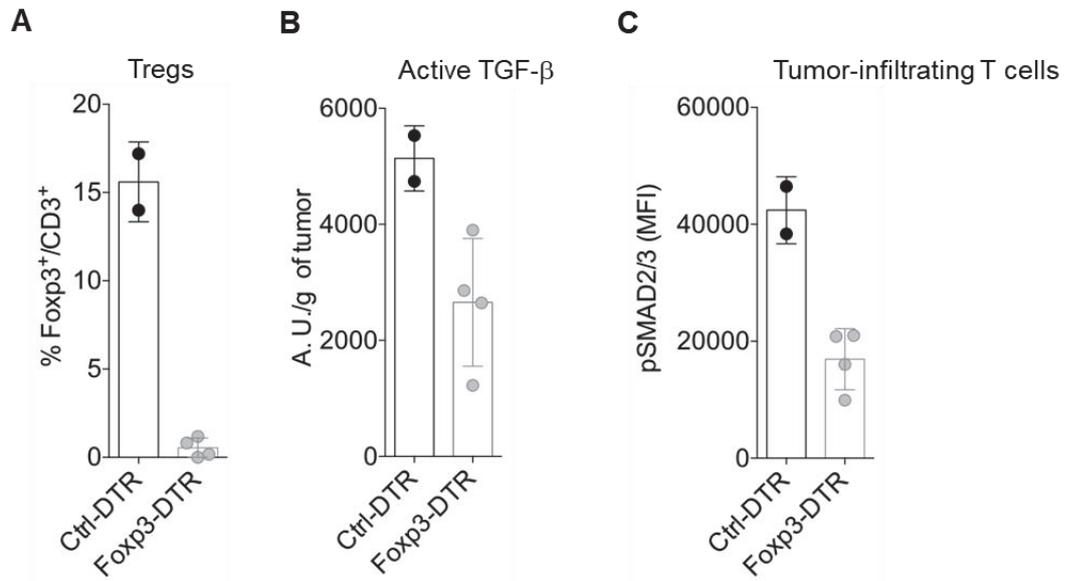


Fig S1: Defect of TGF-β activation in the tumor in the absence of Tregs

Fig. S2 Lainé *et al.* 2019

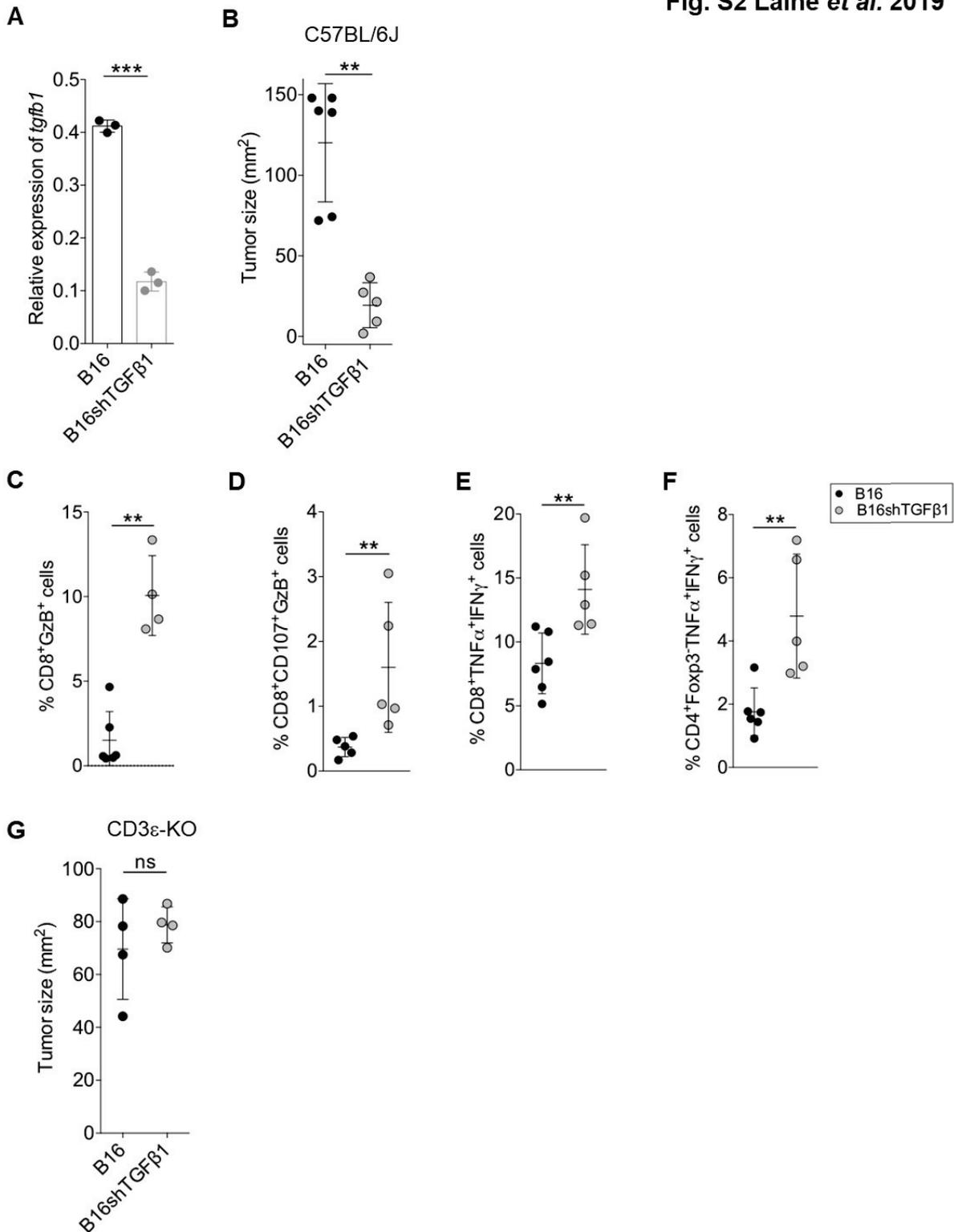


Fig S2: TGF-β1 produced by tumor cells promotes tumor immune escape

Fig. S3 Lainé *et al.* 2019

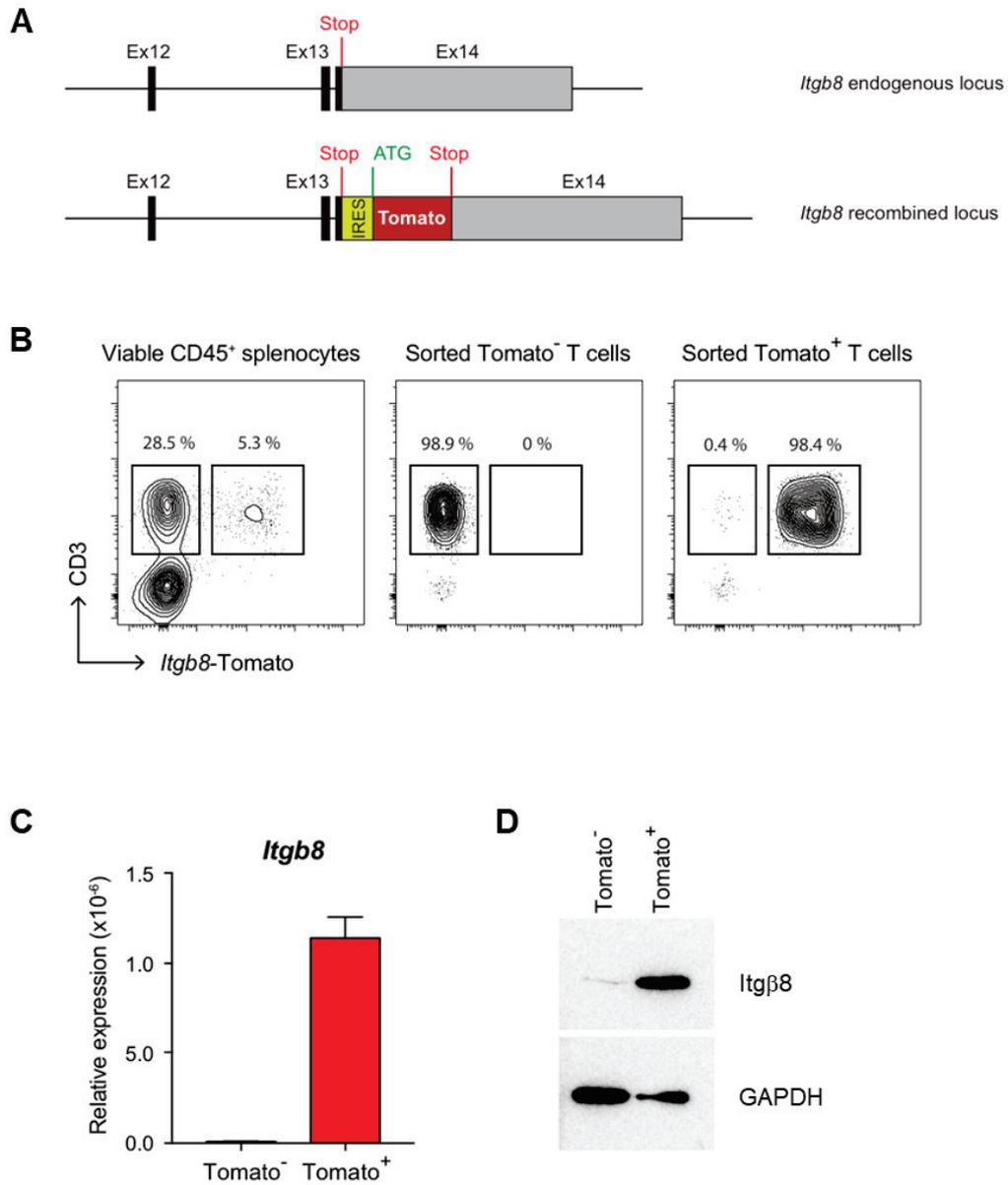


Fig S3: Generation of *Itgb8-Td-Tomato* mice

Fig. S4 Lainé *et al.* 2019

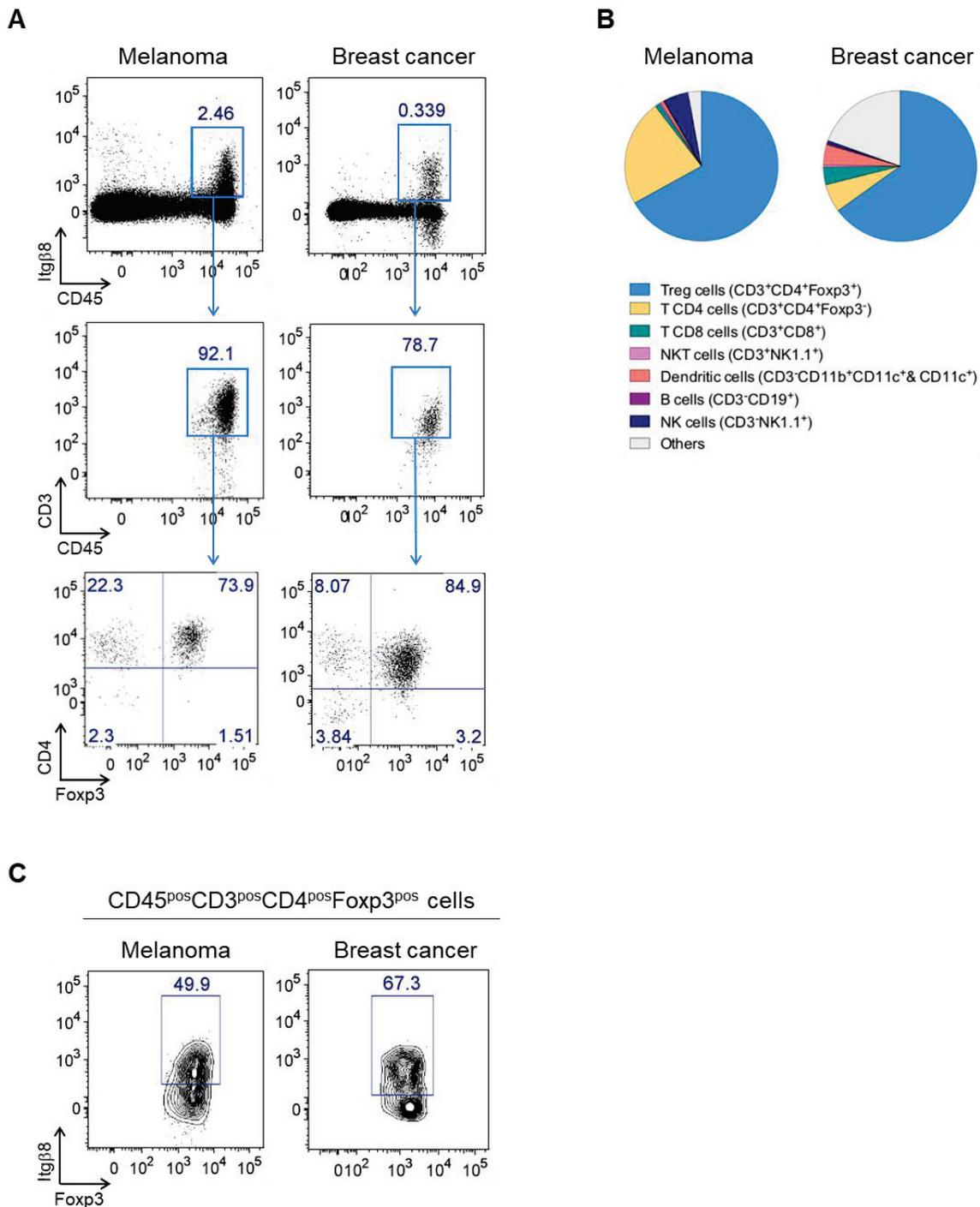


Fig S4: Tregs compose the main hematopoietic cells expressing Itgβ8 in tumors

Fig. S5 Lainé et al. 2019

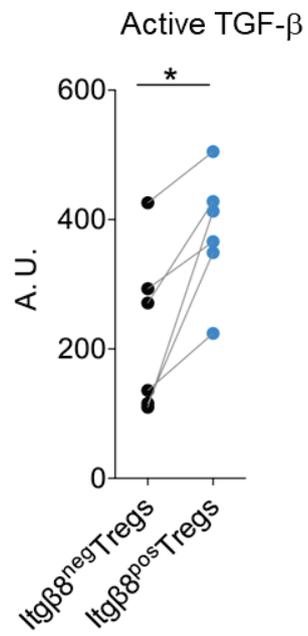


Fig S5: Increased ability of Itgβ8^{pos} Tregs to activate TGF-β

Fig. 1 Lainé et al. 2019

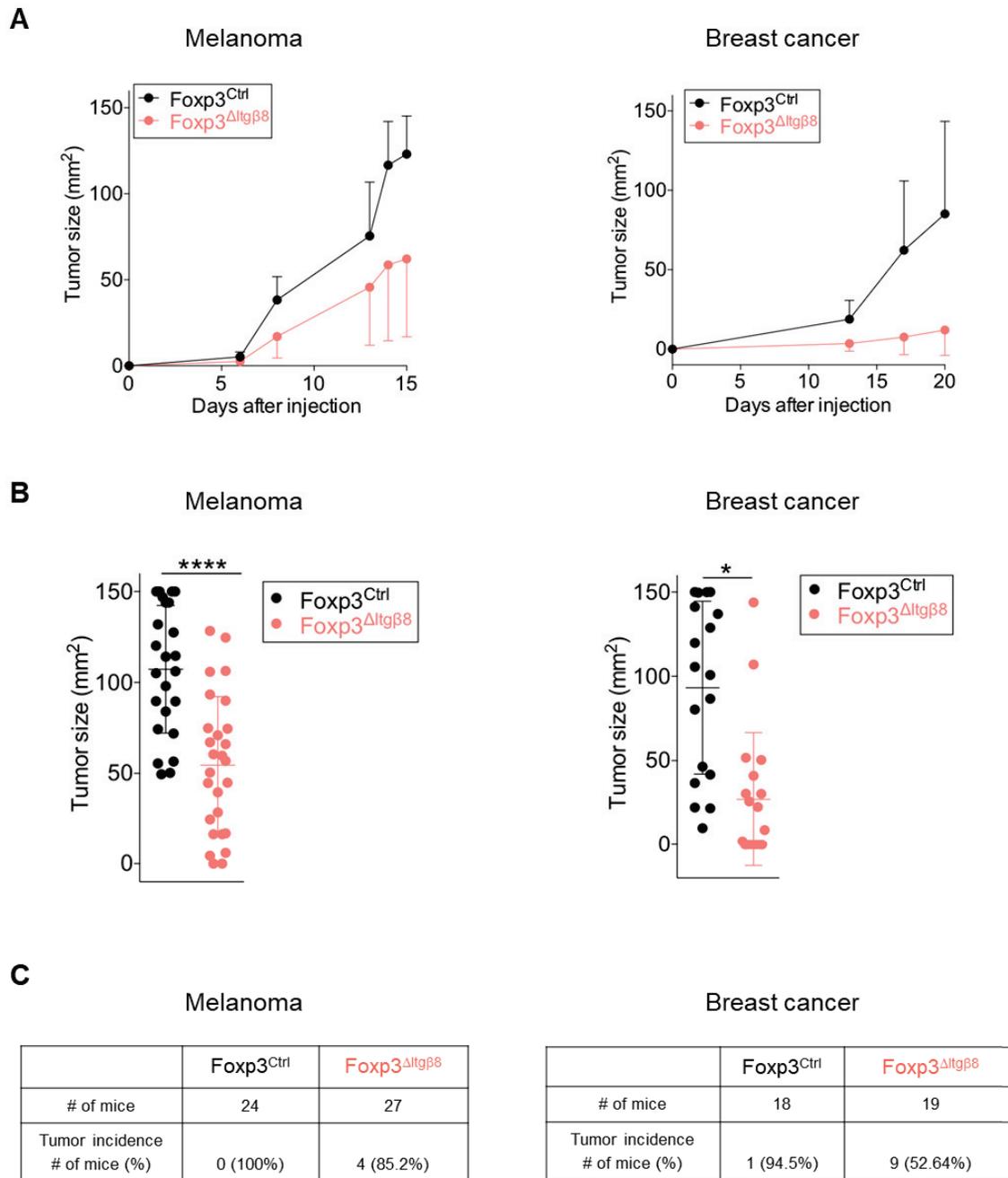


Fig. 1: Itgβ8^{Pos} Tregs are essential to promote tumor growth

Fig. 2 Lainé et al. 2019

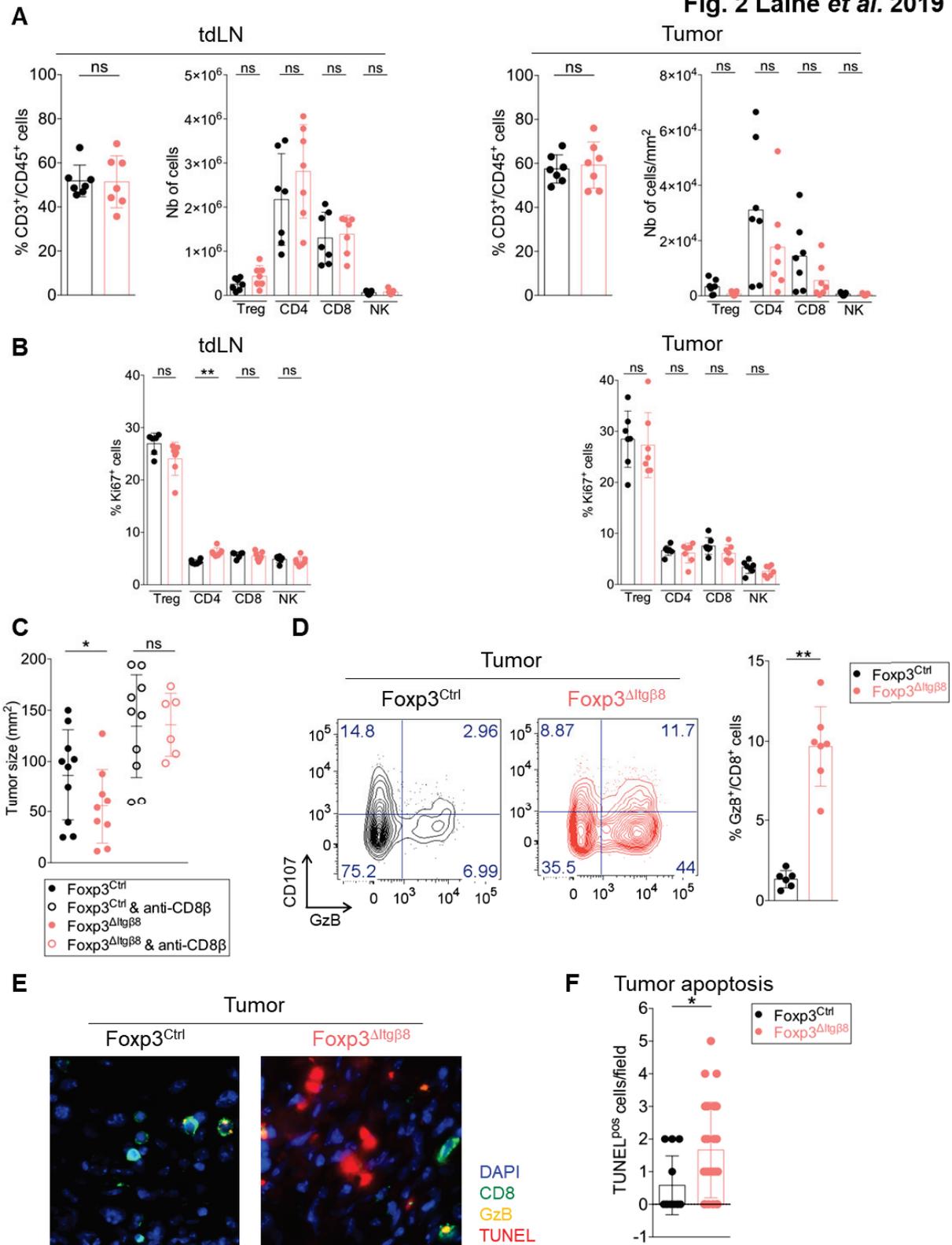


Fig. 2: $Itg\beta 8^{pos}$ Tregs impair the tumor-infiltrating CTL function

Fig. S6 Lainé et al. 2019

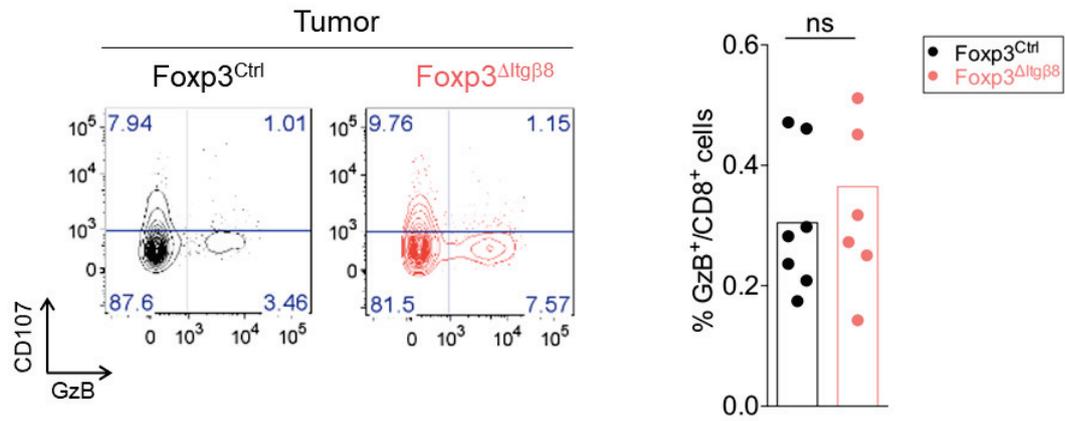


Fig S6: Itgβ8^{pos} Tregs do not impaired effector T cell functions in tumor draining lymph nodes

Fig. 3 Lainé *et al.* 2019

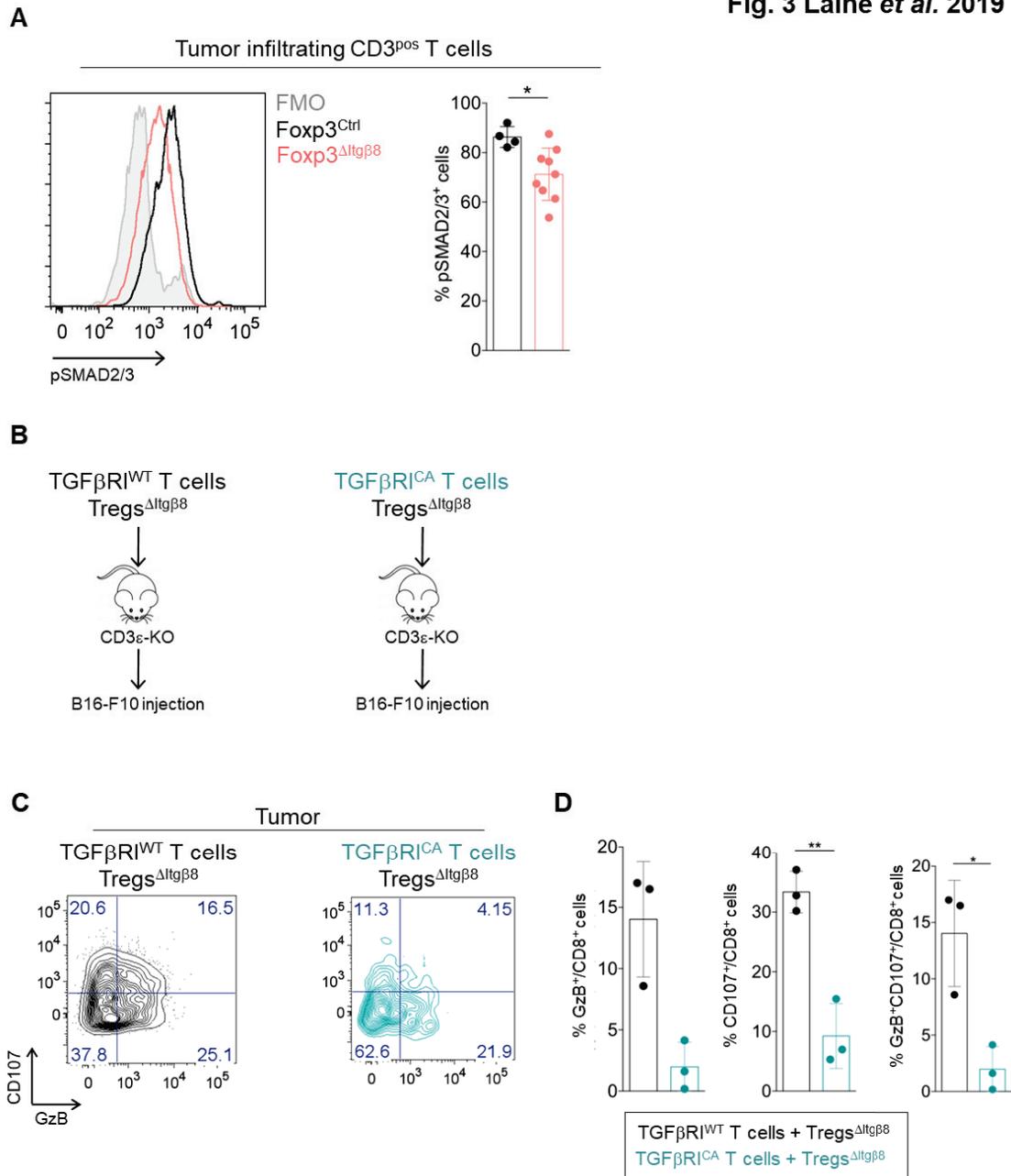


Fig. 3: *Itgβ8*^{pos} Tregs promote TGF-β signaling in tumor infiltrating T cells affecting their anti-tumor response

Fig. S7 Lainé et al. 2019

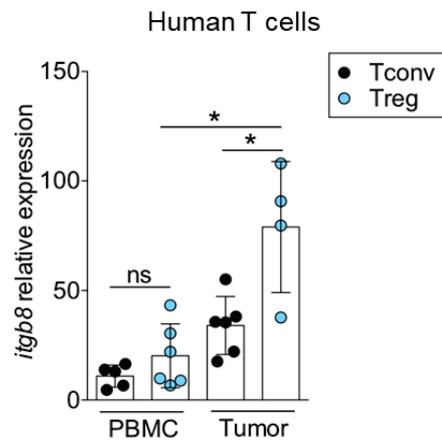


Fig S7: Human Tregs infiltrating tumor express high amount of Itgβ8

Fig. 4 Lainé *et al.* 2019

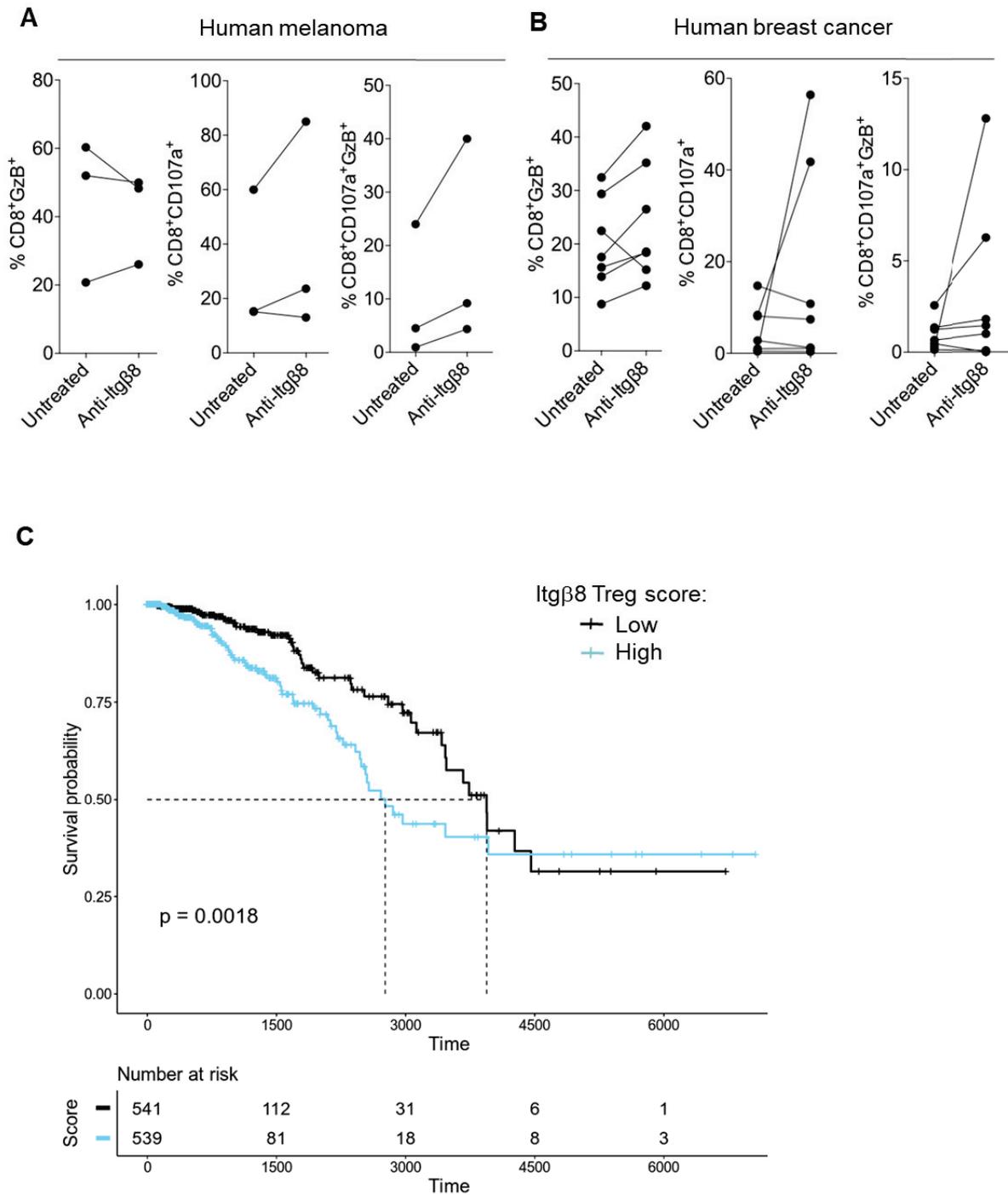


Fig. 4: Targeting Itgβ8 in human tumors increases effector T cells function and Itgβ8 Tregs gene signature correlates with poor survival

Fig. S8 Lainé et al. 2019

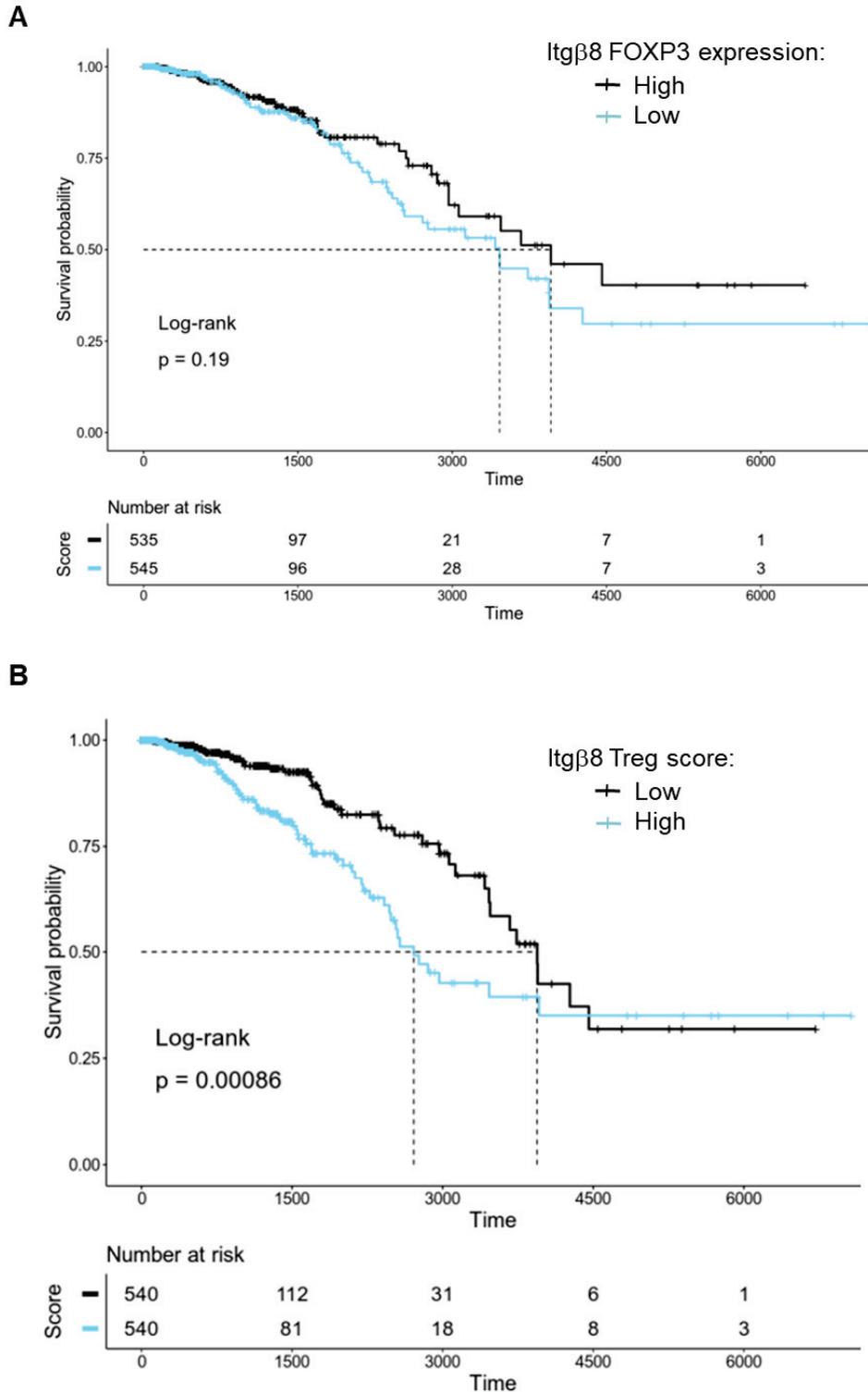


Fig S8: Foxp3 signature does not correlate with patient prognosis, whereas Itgβ8^{pos} Treg signature deprived of activation signature correlates with bad prognosis

Article 2: Origin and phenotypical analysis of Itgβ8⁺ regulatory T cells

Dans ce travail, je me suis intéressée à la différenciation des cellules Treg Itgβ8^{pos}. J'ai recherché (i) à identifier leur origine thymique ou périphérique, (ii) à caractériser leur cinétique de développement et (iii) à définir leur profil d'expression génique.

Résumé allongé en vue de la préparation de l'article:

L'expression de l'intégrine αβ8 (Itgβ8) à la surface des lymphocytes T régulateurs (Tregs) Foxp3^{pos}CD4^{pos} n'est pas associée à leur capacité à protéger de l'auto-immunité (**Edwards et al. 2014**) mais joue un rôle essentiel dans la suppression des réponses inflammatoires (**Worthington et al. 2015**) et anti-tumorales (**Article 1**). Si les Tregs Itgβ8^{pos} font partie de la population des Tregs chez l'Homme et la souris, leur origine est totalement inconnue. Les Tregs pouvant se différencier dans le thymus ou en périphérie, nous avons analysé la différenciation des Tregs Itgβ8^{pos} dans ces deux compartiments en utilisant les souris reportrices Itgβ8-Td-Tomato. Ainsi, nous avons pu observer des Tregs Itgβ8^{pos} dans le thymus de ces souris. Ces cellules sont caractérisées par CXCR4⁺CCR7⁺HSA^{low}Qa2⁺ et expriment de faibles niveaux de RAG2, suggérant qu'ils sont des Tregs recirculants plutôt que des Tregs générés dans le thymus. En lien avec une différenciation périphérique des Tregs Itgβ8^{pos}, nous avons démontré que les cellules Itgβ8^{neg}Foxp3^{neg}CD4^{pos} permettent de générer des Tregs Itgβ8^{pos} *in vivo*. L'expression de l'Itgβ8 par les Tregs est similaire entre les souris Foxp3^{Cre}TGF-βRII^{fl/fl} mice et leur contrôle, suggérant que la signalisation du TGF-β n'est pas requise pour leur différenciation périphérique *in vivo*. De plus, les Tregs périphériques provenant de souris Foxp3^{ΔCNS2} ou Foxp3^{ΔCNS3} expriment des niveaux similaires d'Itgβ8 par rapport aux souris contrôle. De façon intéressante, nous avons observé que la proportion des Tregs Itgβ8^{pos} en périphérie augmente avec l'âge. L'analyse transcriptionnelle des Tregs Itgβ8^{pos} révèle un croisement partiel avec les Tregs activés, suggérant que ces Tregs composent une sous-population particulière de Tregs activés. **En conclusion, ce travail révèle que les Tregs Itgβ8^{pos} proviennent de la périphérie à partir de cellules Itgβ8^{neg}Foxp^{neg}CD4^{pos} et constituent un sous-type de Tregs particulier.**

Extended abstract for article preparation:

Expression of the integrin $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ (Itg β8) at the surface of Foxp3^{pos}CD4^{pos} regulatory T cells (Tregs) is not associated to their ability to protect against autoimmunity (**Edwards et al. 2014**) but play an essential role in the repression of both inflammation (**Worthington et al. 2015**) and anti-tumor response (**Article 1**). If Itg β8 ^{pos} Tregs compose the pool of Tregs in mice and humans, their origin remains totally unknown. Given that Treg program can be acquired either in the thymus or in the periphery, we analyzed Itg β8 ^{pos} Treg differentiation in these two compartments, using Itg β8 -Td-Tomato reporter mice. Though Itg β8 ^{pos} Tregs were observed in the thymus, these cells were CXCR4⁺CCR7⁻HSA^{low}Qa2⁺ and expressed low levels of RAG2, suggesting they rather belong to recirculating Tregs from the periphery than to Tregs generated in the thymus. In line with a peripheral differentiation of Itg β8 ^{pos} Tregs, we found that Itg β8 ^{neg}Foxp3^{neg}CD4^{pos} cells gave rise to Itg β8 ^{pos} Tregs *in vivo*. The expression of Itg β8 by Tregs was similar between Foxp3^{Cre}TGF- β R11^{fl/fl} mice and their littermate control implying that TGF- β signaling was not required for their peripheral differentiation *in vivo*. Comforting this idea, peripheral Tregs from Foxp3 ^{Δ CNS2} or Foxp3 ^{Δ CNS3} mice expressed same levels of Itg β8 as their littermate controls. Interestingly, we observed that the peripheral proportion of Itg β8 ^{pos} Tregs increased as mice aged. The transcriptional analysis of Itg β8 ^{pos} Tregs revealed a partial overlap with that of activated Tregs, suggesting that they compose a distinct subset of activated Tregs. ***In sum, this work reveals that Itg β8 ^{pos} Tregs are derived from peripheral Itg β8 ^{neg}Foxp^{neg}CD4^{pos} cells and compose a distinct subset of Tregs.***

L'absence de l'Itgβ8 à la surface des Tregs n'engendre aucun phénotype dommageable chez la souris (**Worthington et al. 2015**). Néanmoins, cette intégrine est importante dans des contextes inflammatoires où les Tregs ont un rôle important comme la régulation de réponses inflammatoires ou lors de rejet de greffe (**Worthington et al. 2015; Stockis et al. 2017**). Nous démontrons aussi que, dans un contexte tumoral, les Tregs agissent en synergie avec les cellules tumorales en activant le TGF-β qu'elles produisent *via* l'Itgβ8 (**Article 1**). Cette synergie permet d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale avec un effet majoritaire sur LT CD8^{POS}. L'expression de l'Itgβ8 par les Tregs n'est donc pas importante dans l'homéostasie immunitaire mais dans le contrôle des réponses inflammatoires. Cependant, les Tregs Itgβ8^{POS} n'ont encore jamais été caractérisés. L'absence d'anticorps commercialisé permettant la détection de l'Itgβ8 par cytométrie rendait l'étude des Tregs Itgβ8^{POS} impossible chez la souris. Grâce à la création de la lignée reportrice murine Itgβ8-td-Tomato x Foxp3-IRES-GFP (appelée par la suite Itgβ8-Tomato) par Helena Païdassi, nous avons pu caractériser cette population. Nous avons pu ainsi réaliser des expériences par cytométrie afin de caractériser les Tregs Itgβ8^{POS} dans le thymus des souris Itgβ8-Tomato (**Figure 1**) nous permettant de mettre en évidence qu'il s'agit d'une population de Tregs générés en périphérie qui recirculent dans le thymus plutôt qu'une population de tTregs. Afin de valider leur origine périphérique, nous avons ensuite injecté des LT CD4^{POS} et CD8^{POS} dépourvus en Tregs et en Itgβ8 provenant de souris Itgβ8-Tomato dans des souris receveuses CD3ε-KO. Deux mois après transfert de ces cellules, nous avons évalué la présence de Tregs exprimant ou non l'Itgβ8 en périphérie (**Figure 2**). Nous avons ainsi pu démontrer que les Tregs Itgβ8^{POS} ont une origine périphérique, sans exclure totalement une potentielle origine thymique. L'analyse de souris Itgβ8-Tomato à 2 et 6 mois d'âge ont permis de montrer une augmentation des Tregs Itgβ8^{POS} avec l'âge (**Figure 3**). Les pTregs augmentant en périphérie avec l'âge, mais pas les tTregs, ce résultat est en accord avec une origine périphérique des Tregs Itgβ8^{POS}. Nous avons ensuite souhaité savoir le TGF-β pouvait être impliqué dans le développement des Tregs Itgβ8^{POS} en périphérie. Pour ce faire, nous avons évalué l'expression de l'Itgβ8 dans des Tregs dépourvus en récepteur au TGF-β et avons ainsi montré que la cytokine est dispensable au développement de ces Tregs (**Figure 4**). Nous avons également pu mettre en évidence que les CNS2 et 3 du locus de *Foxp3* ne sont pas associés au développement des Tregs Itgβ8^{POS}, en accord avec les résultats obtenus sur l'origine périphérique de ces cellules (**Figure 4**). Enfin, afin de caractériser la population

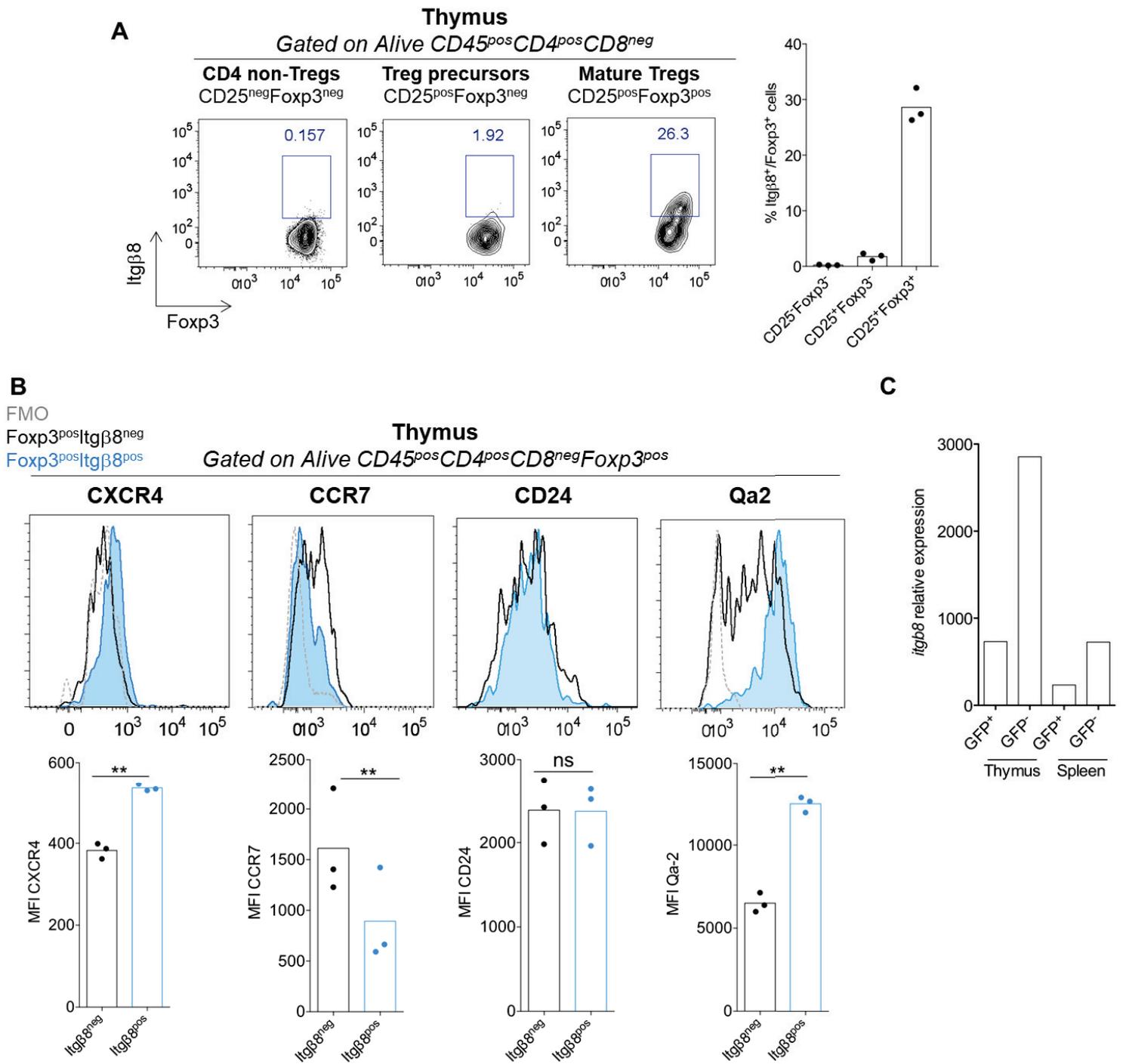


Figure 1: Thymic $Itg\beta8^{+}$ Tregs are not differentiated in the thymus.

de Tregs $Itg\beta 8^{pos}$, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur des Tregs $Itg\beta 8^{neg}$ et des $Itg\beta 8^{pos}$ (**Figure 5**). L'analyse transcriptionnelle indique que les Tregs $Itg\beta 8^{pos}$ sont une population de Tregs particulière avec un phénotype activé. Néanmoins, en s'affranchissant des molécules associées à un phénotype activé des Tregs, les Tregs $Itg\beta 8^{pos}$ représentent une population de Tregs aux caractéristiques qui leurs sont propres (**Figure 5**).

Figure 1: Thymic $Itg\beta 8^+$ Tregs are not differentiated in the thymus.

(A) Density plot flow cytometry analysis illustrating $Itg\beta 8$ expression on non-Tregs ($CD4^{pos}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$), Treg precursors ($CD4^{pos}CD25^{pos}Foxp3^{neg}$) and differentiated Tregs ($CD4^{pos}CD25^{pos}Foxp3^{neg}$) from $Itg\beta 8$ -td-tomato reporter mice. Graph demonstrates the percentage of each subset. Data are representative of two independent experiments with three mice per experiments. **(B)** Flow cytometry analysis of the surface expression of CXCR4, CCR7, CD24 (HSA) and Qa2 at the surface of $Itg\beta 8^{pos}$ Tregs and $Itg\beta 8^{neg}$ Tregs. These markers are classically used to discriminate recirculating and thymic derived T lymphocytes. Graphs demonstrate the MFI of each marker. Data are representative of two independent experiments with three mice per experiments. **(C)** RAG2-GFP mice allow the follow thymic cells recently generated in the thymus, regarding the half life of 56 hours of the GFP. Graph illustrates the mean of *itgb8* expression on purified GFP^{pos} and GFP^{neg} Tregs from the thymus and the spleen, reanalyzed from **Thiault et al. 2015**.

Main results of Figure 1:

- Only mature Tregs expressed $Itg\beta 8$ in the thymus, suggesting that $Itg\beta 8$ expression is not acquired in the thymus;
- Thymic $Itg\beta 8^{pos}$ Tregs were $CXCR4^{pos}CCR7^{neg}CD24^{low}Qa2^{high}$, a phenotype usually associated with thymus recirculating lymphocytes ;
- Thymic RAG-GFP⁺ Tregs were not enriched in $Itg\beta 8^{pos}$ cells.

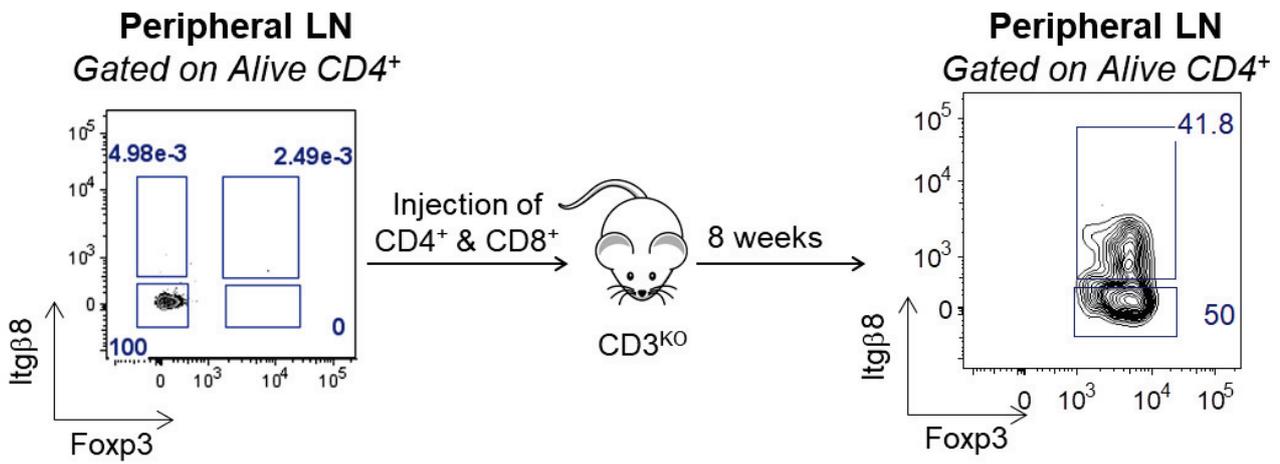


Figure 2: Peripheral Foxp3^{neg} CD4 T cells give rise to Itgb8^{pos} Tregs.

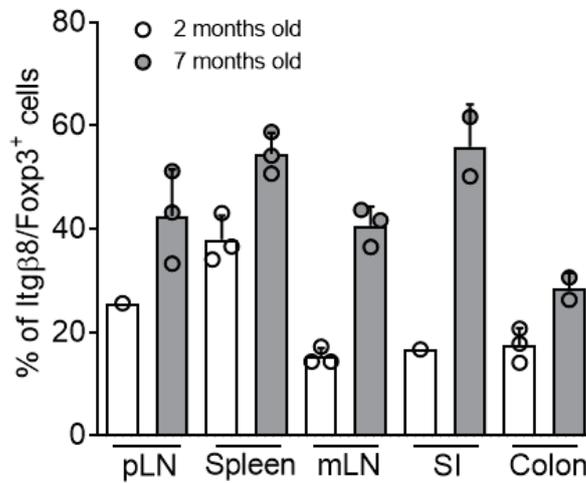


Figure 3: Kinetic analysis of the homeostasis of Itgb8^{pos} Tregs.

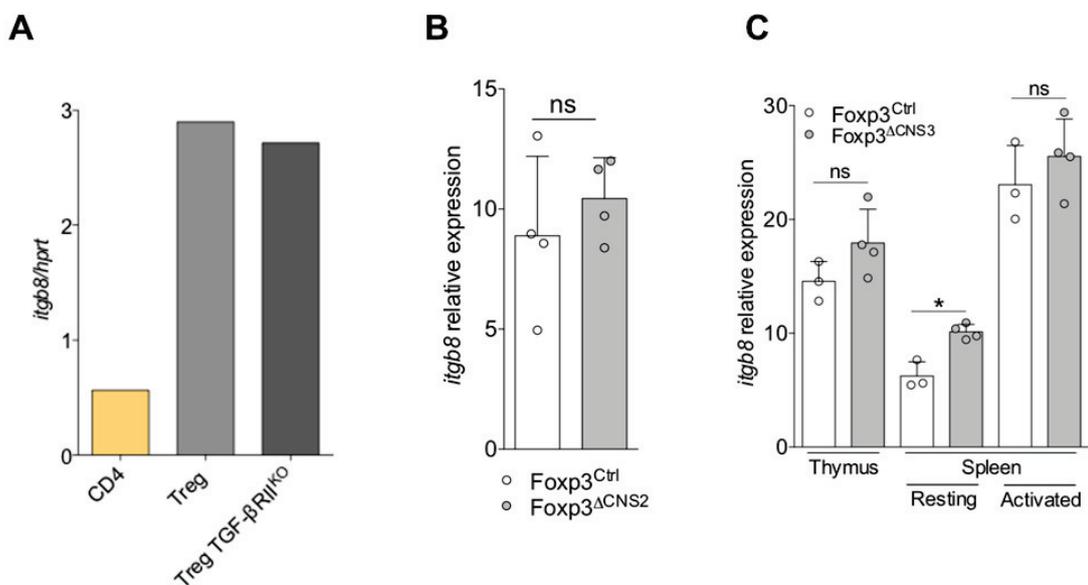


Figure 4: Importance of TGF-β signaling in Itgb8^{pos} Treg development.

Figure 2: Peripheral Foxp3^{neg} CD4 T cells give rise to Itgβ8^{pos} Tregs.

FACS sorted CD3^{pos}Foxp3^{neg}Itgβ8^{neg} from peripheral lymph nodes of Itgβ8-td-tomato reporter mice were adoptively transferred in CD3εKo mice. 8 weeks later the expression of Itgβ8 was analyzed on Foxp3^{pos} population by flow cytometry.

Main result of Figure 2:

- Itgβ8^{pos} Tregs are generated at the periphery from Itgβ8^{neg}Foxp3^{neg}CD4^{pos} T cells.

Figure 3: Kinetic analysis of the homeostasis of Itgβ8^{pos} Tregs.

Flow cytometry analysis was performed on Itgβ8-td-Tomato reporter mice at 2 and 7 months of age. Graph illustrates the percentage of Itgβ8^{pos}Tregs in different organs.

Main result of Figure 3:

- Itgβ8^{pos} Treg proportion increases as animals age.

Figure 4: Importance of TGF-β signaling in Itgβ8^{pos} Treg development.

(A) Graph demonstrates the expression of *itgb8* normalized on that of *hpert* obtained by RT-qPCR on purified Tregs from Foxp3^{Cre}TGFβRII^{fl/fl} mice and their controls littermate. Data are representative of two independent experiments. Graphs demonstrate the expression of *itgb8* in sorted peripheral Tregs from (B) Foxp3^{Ctrl} and Foxp3^{ΔCNS2} mice reanalyzed from Li et al. 2014 and (C) Foxp3^{Ctrl} and Foxp3^{ΔCNS3} mice, resting (CD44^{low}CD62L^{high}) and activated (CD44^{high}CD62L^{low}), reanalyzed from Feng et al. 2015.

Main results of Figure 4:

- TGF-β signaling is not required for the development of Itgβ8^{pos} Tregs *in vivo*.
- CNS2 and CNS3 do not contribute to the development of Itgβ8^{pos} Tregs.

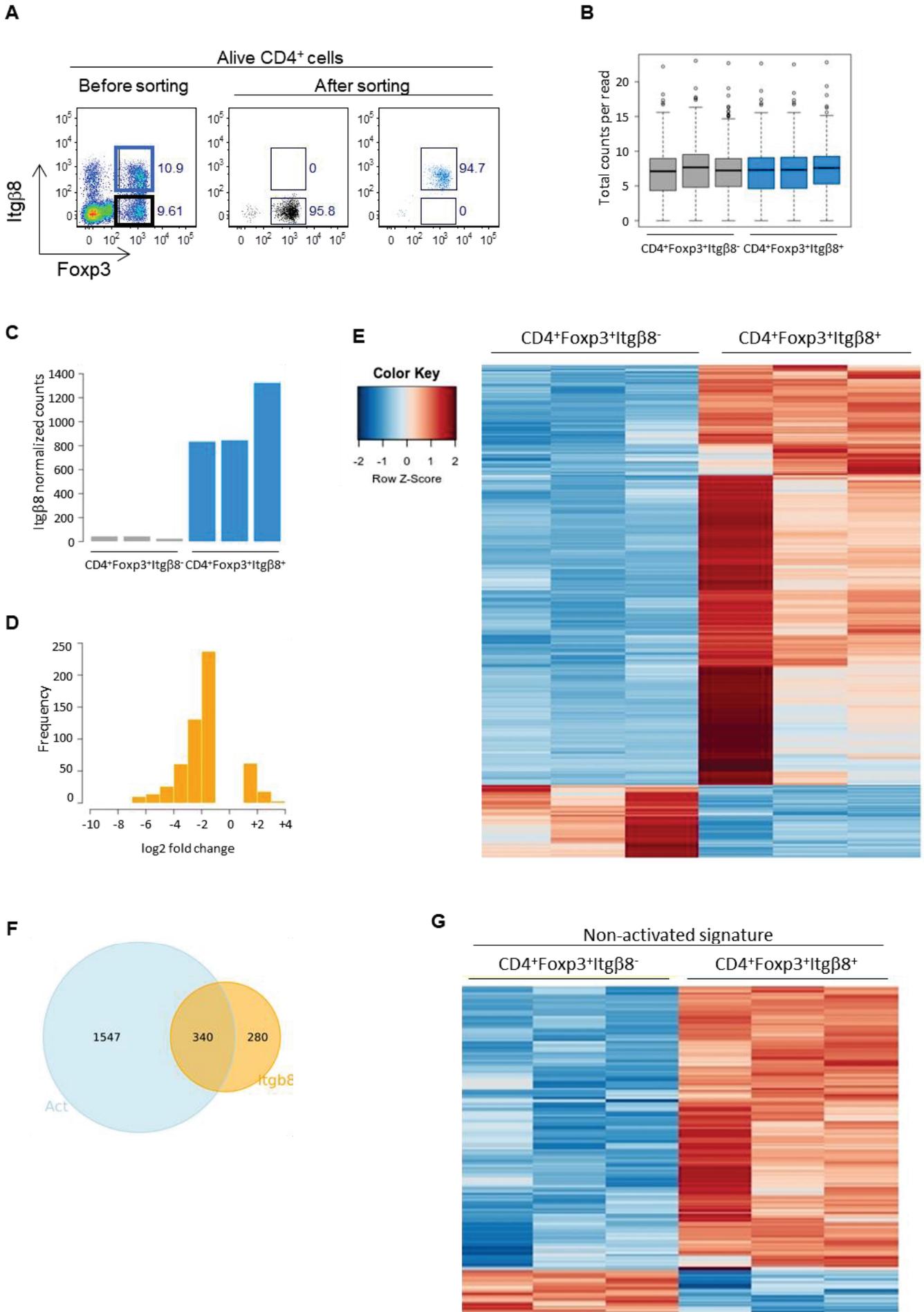


Figure 5: Transcriptomic analysis of Itgβ8^{POS} Tregs.

Figure 5: Transcriptomic analysis of Itgβ8^{pos} Tregs.

(A-G) Itgβ8^{neg} Tregs and Itgβ8^{pos} Tregs were sorted from peripheral lymph nodes of Itgβ-td-Tomato reporter mice at 2-5 months old and were submitted to RNA-sequencing (N=3 mice/group). **(A)** Illustration of the gating strategy and the purity of the sort. **(B, C)** Total counts per read validate same total amounts of gene expression between the two populations (B) and validate Itgβ8 expression (C). **(D)** Genes with a fold change > 2 and a *p* value > 0.05 between Itgβ8^{neg} and Itgβ8^{pos} Tregs were taken for RNA-seq analysis. **(E)** Heat-map analysis showed differential expression of 620 genes between Itgβ8^{pos} and Itgβ8^{neg} Tregs. A red-blue color scale depicts RNA expression levels (red: high expression; blue: low expression). **(F)** Overlap signatures between activated Tregs from Feng *et al.* 2015 and Itgβ8^{pos} Tregs. **(G)** Heat-map analysis showed differential expression of the 280 activation-independent genes between Itgβ8^{neg} and Itgβ8^{pos} Tregs.

Main result of Figure 5:

- Peripheral Itgβ8^{pos} Tregs expressed a different transcriptomic profile than Itgβ8^{neg} Tregs.

Main conclusion of the article 2:

Peripheral Itgβ8^{pos} Tregs compose a distinct subset of activated Tregs.

CONCLUSION

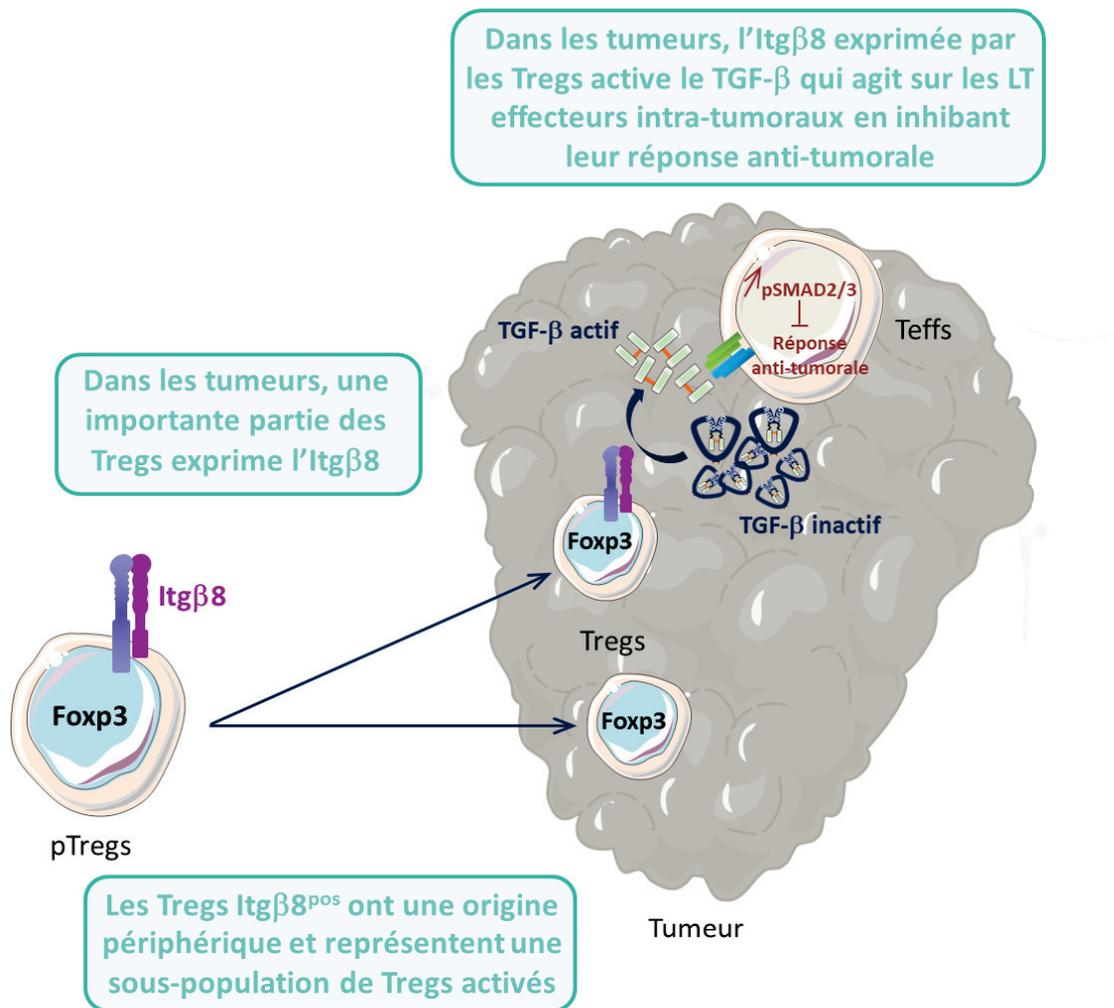


Figure 39: Schéma conclusif: Les Tregs Itgβ8^{pos} favorisent l'échappement tumoral au système immunitaire en activant le TGF-β produit dans le micro-environnement tumoral.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de comprendre le rôle de l'Itgβ8 exprimée par les Tregs sur le développement tumoral et de caractériser ces cellules (**Figure 39**).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'au sein des tumeurs, parmi les cellules immunitaires, l'Itgβ8 est majoritairement exprimée par les Tregs. La délétion spécifique de l'Itgβ8 dans les Tregs conduit à une forte diminution de la croissance tumorale chez la souris dans le mélanome ainsi que dans un modèle d'adénocarcinome mammaire. Cette diminution de la croissance tumorale n'est pas due à une augmentation du recrutement des cellules immunitaires au sein des tumeurs, mais à une diminution de la signalisation du TGF-β dans les LT effecteurs qui les infiltrent. Ainsi, ces cellules présentent une augmentation de leur programme cytotoxique qui permet une élimination efficace des cellules tumorales. La relevance de nos résultats obtenus chez la souris a pu être extrapolée chez l'Homme par l'inhibition de l'Itgβ8 sur des tumeurs fraîches de patients atteints de mélanome ou de cancers du sein où nous avons observé une augmentation du programme cytotoxique des LT CD8^{pos} intra-tumoraux. Nous avons également pu établir une signature des Tregs Itgβ8^{pos} présents dans les cancers du sein chez l'Homme et avons observé que cette signature corrèle fortement avec une diminution de la survie des patients.

Nous avons également pu montrer que les Tregs Itgβ8^{pos} ont une origine périphérique, indépendante du TGF-β, sans exclure pour le moment une origine thymique. Nous avons également pu démontrer que les Tregs Itgβ8^{pos} forment une population particulière de Tregs présentant un phénotype fortement activé.

Ainsi, nous pouvons conclure que les Tregs travaillent en synergie avec les cellules cancéreuses afin d'activer le TGF-β présent dans le micro-environnement tumoral en exprimant l'Itgβ8. Le TGF-β ainsi activé et l'expression de molécules suppressives par les Tregs Itgβ8^{pos} permettent d'inhiber efficacement la réponse immunitaire anti-tumorale. L'Itgβ8 exprimée par les Tregs constitue ainsi un nouveau marqueur de mauvais pronostic dans les cancers et pourrait être envisagée comme nouvelle cible thérapeutique.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Approfondissement du rôle du TGF- β activé par les Tregs Itg β 8^{pos} sur la fonction des CD8

Nous avons démontré que l'absence d'Itg β 8 dans les Tregs favorise l'établissement du programme cytotoxique des LT CD8^{pos} (**Article 1**). Il serait donc intéressant maintenant d'étudier plus en détail l'impact du TGF- β activé par les Tregs Itg β 8^{pos} sur la formation de la synapse et des lysosomes cytotoxiques.

L'interaction entre la cellule tumorale et les LT CD8^{pos}, spécifique ou non des antigènes tumoraux, active de nombreuses molécules menant à la dégranulation, et l'intensité de ces interactions est connue pour avoir une influence sur la dégranulation et par conséquent sur la croissance tumorale (**Janicki et al. 2008**). Il serait donc intéressant de regarder dans un premier temps l'expression d'ICAM-1 et de LFA-1 sur les LT CD8^{pos} issus de tumeurs de souris Foxp3^{Ctrl} et Foxp3 ^{Δ Itg β 8}. Ces molécules ont déjà été décrites comme étant augmentées sur les LT CD8^{pos} qui n'expriment pas de TGF- β RII et sont importantes dans le maintien des LT CD8^{pos} dans les tumeurs (**Marie et al. 2006; Yanguas et al. 2018**). Afin de compléter cette étude, on peut envisager une reconstitution de souris CD3 ϵ KO avec des Tregs ^{Δ Itg β 8} et des LT ICAM-1^{pos} ou ICAM-1^{neg} et/ou des LT LFA-1^{pos} ou LFA-1^{neg}. Après injection de cellules tumorales B16-F10, analyse de la croissance tumorale et de la cytotoxicité des LT CD8^{pos}, il sera possible de conclure sur le rôle du TGF- β activé par les Tregs dans l'interaction entre ces cellules et les cellules tumorales.

L'activation de la dégranulation des LT CD8^{pos} implique également la reconnaissance, par leur TCR, des antigènes tumoraux présentés par le CMHI exprimé par les cellules tumorales et les DC. Une étude récente démontre que les Tregs inhibent les LT CD8^{pos} cytotoxiques en diminuant la force du signal de leur TCR et ce, de façon dépendante du TGF- β (**Kim et al. 2017**). Afin de savoir si le TGF- β activé par les Tregs dans les tumeurs module l'intensité du signal donné aux LT lors de la présentation antigénique, il sera nécessaire d'utiliser un modèle TCR spécifique. Pour cela, au laboratoire, nous disposons d'une lignée de cellules B16-F10 exprimant un peptide NP (nucléoprotéine du virus de l'influenza) de forte (NP^{high}) et de faible (NP^{low}) affinité pour le TCR spécifique de cette NP (TCR F5) (**Cuff et al. 2010**). Il sera donc possible de reconstituer des souris CD3 ϵ KO avec des Tregs^{Ctrl} ou des Tregs ^{Δ Itg β 8} avec des LT CD8^{pos}F5^{pos}. Après injection des cellules tumorales exprimant le peptide de faible ou de forte affinité, l'analyse de la croissance tumorale et de la cytotoxicité des LT CD8^{pos} intra-tumoraux permettra de répondre à cette question.

L'augmentation de l'expression de CD107 à la surface des LT CD8^{pos} intra-tumoraux des

souris $Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$ et l'absence de différence de CD107 intracellulaire dans les LT CD8^{pos} dépourvus de signal au TGF- β , permettent de suggérer que le TGF- β activé par les Tregs affecte davantage le contrôle de la dégranulation que la formation des vésicules cytotoxiques (**Article 1, résultats non montrés**). L'analyse de l'expression des molécules impliquées dans la dégranulation par qRT-PCR comme Stx11, Munc13-4, Munc18-2 ou Rab27a, à partir de LT CD8^{pos} issus de tumeurs de souris $Foxp3^{Ctrl}$ et $Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$, permettra d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse (**Dieckmann et al. 2015**).

Les LT CD8^{pos} spécifiques des tumeurs sont souvent retrouvés épuisés avec une diminution de leurs fonctions effectrices et le rôle du TGF- β présenté à la surface des Tregs dans l'induction d'un tel phénotype a déjà été démontré (**Budhu et al. 2017; McLane et al. 2019**). Pour compléter notre étude sur le rôle du TGF- β activé par les Tregs, *via* l'Itg β 8, sur les fonctions des LT CD8^{pos}, nous pourrions analyser l'expression de molécules comme Tox, Tcf-1, Tcf-7 ou Eomes, connues pour être associées à un phénotype épuisé des LT CD8^{pos} (**Doedens et al. 2016; Li et al. 2018; Khan et al. 2019**). Dans les tumeurs des souris $Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$, nous avons déjà observé qu'en plus du programme cytotoxique, les LT CD8^{pos} surexpriment NKG2D. Un rôle inhibiteur du TGF- β sur l'expression de NKG2D avait déjà été démontré sur les LT CD8^{pos}, dont l'expression est associée à une forte réponse anti-tumorale (**Crane et al. 2010; Prajapati et al. 2018**).

Approfondissement du rôle du TGF- β activé par les Tregs Itg β 8^{pos} sur les cellules tumorales

Le rôle du TGF- β dans la participation au développement métastatique est connu (**Neel et al. 2012**). Étant donné le rôle important du TGF- β activé par les Tregs sur la réponse anti-tumorale par leur expression de l'Itg β 8 et par conséquent sur la croissance des tumeurs (**Article 1**), il est possible d'envisager également un rôle direct sur les cellules tumorales. Dans notre étude, nous avons utilisé la lignée tumorale de mélanome B16-F10. Cette lignée, injectée en orthotopique au cours de notre étude, peut aussi être injectée par voie veineuse permettant aux cellules de « métastaser » dans les poumons (**Overwijk and Restifo 2001**). Afin d'évaluer le potentiel métastatique des tumeurs injectées dans les souris $Foxp3^{Ctrl}$ et $Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$ il peut être envisagé de procéder à cette injection ectopique. Néanmoins, cette méthode ne représente pas un modèle métastatique « naturel ». Une autre méthode serait d'enlever chirurgicalement les mélanomes injectés dans le derme des souris qui, après quelques semaines, présentent des métastases pulmonaires. Cette méthode ne pouvant pas

être réalisée au laboratoire, il est néanmoins envisageable de cultiver les poumons issus des souris $Foxp3^{Ctrl}$ et $Foxp3^{\Delta Itg\beta 8}$ injectées orthotopiquement. L'utilisation d'antibiotique, permettant d'éliminer les cellules pulmonaires tout en maintenant des cellules souches tumorales B16-F10 potentielles, permettrait d'évaluer les micro-métastases en culture.

Une autre façon de répondre à cette question serait de réaliser une analyse par qRT-PCR ou Western-Blot de lysats tumoraux, issus de nos deux modèles murins, et d'apprécier l'expression des molécules impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse comme E-cadhérine, ZO-1, ZEB-1, Twist ou encore Snail (**Neel et al. 2012**).

Origine des Tregs $Itg\beta 8^{pos}$

Nous avons démontré que les Tregs $Itg\beta 8^{pos}$ ont une source périphérique (**Article 2**). En lien avec nos résultats, d'autres analyses transcriptomiques montrent également des niveaux similaires d' $Itg\beta 8$ entre les tTregs et les pTregs (**Haribhai et al. 2011; Schmitt et al. 2012**). Les Tregs $Itg\beta 8^{pos}$ retrouvés dans le thymus appartiennent à une population de cellules recirculantes par leur profil d'expression, par leur faible expression en RAG2 mais également par l'observation d'un chevauchement de la signature transcriptionnelle entre les Tregs $Itg\beta 8^{pos}$ et les cellules recirculantes (**Article 2 et résultats non montrés**). Néanmoins, ces résultats ne permettent pas d'exclure une origine également thymique. En effet, les animaux analysés étaient âgés de deux mois (**Article 2 et Thiault et al. 2015**). Comme il a été décrit au cours de l'introduction, les tTregs se développent très tôt chez la souris, à l'âge de 2,5 jours après leur naissance (**Asano 1996; Fontenot et al. 2005a**). Ainsi, il serait pertinent d'analyser l'expression de l' $Itg\beta 8$ dans les Tregs des thymus de souris reportrices $Itg\beta 8$ -td-Tomato à cet âge afin d'exclure une origine thymique des Tregs $Itg\beta 8^{pos}$. Dans ce sens, nous avons également mis au point des primers nous permettant d'analyser la méthylation des séquences régulatrices de *Foxp3*, les CNS0, CNS1, CNS2, CNS3 ainsi que son promoteur. Ainsi, à partir de tri cellulaire des populations $Foxp3^{pos}Itg\beta 8^{neg}$ et $Foxp3^{pos}Itg\beta 8^{pos}$ provenant du thymus ou des ganglions périphériques de souris $Itg\beta 8$ -Tomato à différents âges, nous pourrions analyser l'état de méthylation des différentes régions énoncées. La déméthylation des CNS1 et CNS3, connue pour intervenir dans le développement périphérique et thymique des Tregs, respectivement, nous permettra de valider la provenance des Tregs $Itg\beta 8^{pos}$.

Au sein des tumeurs, on retrouve une importante proportion de Tregs $Itg\beta 8^{pos}$ (**Article 1**). Dans les tumeurs, l'origine des Tregs est variée (**Figure 28**). Mais comment les Tregs $Itg\beta 8^{pos}$ sont-ils recrutés ou différenciés dans les tumeurs ? L'analyse transcriptomique montre que

ces Tregs surexpriment CCR4, CCR6, CCR8 et CXCR3 à l'état basal par rapport aux Tregs Itgβ8^{neg}. L'acquisition de l'expression de CXCR3 par les Tregs leur permet d'être dirigés vers des sites où a lieu une réponse immunitaire de type Th1, dans les tumeurs notamment, et d'inhiber ces cellules (**Koch et al. 2009; Redjimi et al. 2012**). Dans les tumeurs, par cytométrie, nous avons observé qu'ils surexpriment CXCR3, validant ainsi un des mécanismes potentiels de recrutement des Tregs Itgβ8^{pos} au sein des tumeurs (**Résultats non montrés**). Il serait intéressant d'analyser l'expression d'autres récepteurs aux chimiokines par cytométrie dans les Tregs issus des tumeurs implantées dans les souris Itgβ8-td-Tomato mais également dans les souris Foxp3^{Ctrl} et Foxp3^{ΔItgβ8}. Pour compléter cette étude, nous pourrions également évaluer le type de chimiokines sécrétées dans les modèles tumoraux utilisés au cours de ce projet. Nous pourrions ainsi identifier des récepteurs spécifiques de ces Tregs et les inhiber, *in vivo*, afin d'observer le recrutement des Tregs Itgβ8^{pos} au sein des tumeurs et l'effet sur la croissance tumorale comme il a été démontré dans diverses études (**Hoelzinger et al. 2010; Halvorsen et al. 2016; Su et al. 2017; Santagata et al. 2017**).

Les DC sont impliqués dans le développement des Tregs dans les tumeurs ainsi que dans d'autres organes comme l'intestin. Afin de savoir si, dans nos modèles, ces cellules participent au développement des Tregs Itgβ8^{pos} au sein des tumeurs, nous pourrions dans un premier temps réaliser des co-cultures de DC avec des Tregs Itgβ8^{neg}, des LT CD4^{pos} naïfs ou des Tregs Itgβ8^{pos} provenant de souris Itgβ8-td-Tomato et évaluer l'expression de l'Itgβ8 par cytométrie. Nous pourrions ensuite réaliser ces mêmes expériences en chargeant les DC avec un peptide reconnu spécifiquement par les Tregs grâce à un TCR transgénique, permettant de déterminer le rôle de la spécificité antigénique dans ces conditions. De ces expériences, nous pourrions également évaluer l'impact des Tregs Itgβ8^{pos} sur le phénotype et les fonctions des DC en regardant l'expression de PD-L1, de PD-L2, la sécrétion de TGF-β et d'IL-10 pour les DC tolérogènes; d'IL-12, de CD80/86 et de TNF-α pour les DC immunogènes (**Yoo and Ha 2016**). Enfin, *in vivo*, il serait intéressant d'analyser ces marqueurs dans les tumeurs et dans les ganglions drainants les tumeurs de souris déficientes ou non pour l'Itgβ8 dans les Tregs.

Enfin, il serait également intéressant d'analyser le profil de méthylation des régions régulatrices de *Foxp3*, seuls marqueurs connus à ce jour pour différencier les tTregs des pTregs, des Tregs Itgβ8^{pos} et Itgβ8^{neg} triés à partir des tumeurs murines.

Ces expériences permettront de connaître la provenance des Tregs Itgβ8^{pos} dans les tumeurs et de caractériser davantage cette population.

Stabilité des Tregs Itgβ8^{pos}

Dans le contrôle des rejets de greffe ou dans le traitement de maladies auto-immunes, pour lesquels les Tregs sont bénéfiques, ces cellules peuvent être amplifiées *in vitro* afin d'être injectées aux patients (**Perdigoto et al. 2016**). Dans ces conditions, ainsi que dans les tumeurs, les Tregs peuvent être instables, les rendant délétères pour l'organisme. Il est donc important de comprendre les mécanismes impliqués dans cette instabilité et les molécules qui y sont associées, permettant éventuellement la découverte de marqueurs spécifiques de Tregs stables. Des expériences *in vitro*, réalisées au laboratoire, ont permis de montrer que les Tregs Itgβ8^{pos} maintiennent l'expression de cette intégrine après plusieurs jours de culture, suggérant une stabilité de l'expression de l'Itgβ8 et potentiellement une stabilité de ces Tregs (**Résultats non montrés**). Récemment, une étude bioinformatique portant sur l'étude de la régulation des gènes dans les cellules Foxp3^{pos}, démontre que la régulation de gènes par la liaison de Foxp3 à leurs locus est indépendante de Foxp3 mais dépend de cinq autres gènes incluant l'*Itgb8* (**Vandenbon et al. 2016**). Ainsi, *Tiam1*, *Gbp3*, *Nrp1*, *Ikzf2* et *itgb8*, corrélient avec une expression spécifique de molécules associées aux Tregs. Dans cette étude, les auteurs montrent que les Tregs humains qui expriment l'Itgβ8 sont totalement méthylés au niveau du CNS2, connu pour être un marqueur de stabilité des Tregs. Cette observation suggère que les Tregs Itgβ8^{pos} sont stables *in vivo*. Ainsi, il serait possible d'envisager qu'un signal médié par l'Itgβ8 dans les Tregs participe aux modifications épigénétiques au cours de leur développement, avant l'induction de l'expression de *Foxp3*, permettant la stabilité de son expression. Néanmoins, l'expression de cette intégrine n'étant pas observée dans les préTregs (**Article 2**), davantage d'études seront nécessaires afin de connaître l'importance de l'Itgβ8 dans la stabilité et dans la régulation épigénétique de *Foxp3*. Une des expériences permettant d'apporter des éléments de réponse à cette question, serait d'injecter des Tregs Itgβ8^{pos} ou des Tregs Itgβ8^{neg} dans des souris

immunocompétentes, avec des marqueurs alléliques distincts, afin d'évaluer la stabilité de ces Tregs *in vivo* au cours du temps.

Régulation de l'expression de l'Itgβ8 exprimée par les Tregs

Nous avons caractérisé la population des Tregs Itgβ8^{pos} et montré qu'il s'agit d'une population particulière de Tregs activés (**Article 2**). Il serait maintenant très pertinent de comprendre par quels signaux est induite l'Itgβ8 dans ces cellules, afin de mieux comprendre et caractériser cette population mais également d'envisager un potentiel ciblage de cette molécule en thérapeutique.

Une des premières hypothèses concernant la régulation de l'expression de l'Itgβ8 provient de travaux publiés montrant que, dans les DC, l'expression de l'Itgβ8 est induite par le facteur de transcription IRF8 et par le TGF-β, et que dans les Tregs le TGF-β induit IRF8 (**Ouyang et al. 2011; Yoshida et al. 2014, p. 20; Boucard-Jourdin et al. 2016**). Les analyses par qRT-PCR de l'expression de l'Itgβ8 dans les Tregs issus de souris déficientes pour le TGF-βRII spécifiquement dans les Tregs, et des expériences *in vitro* démontrent que l'expression de l'Itgβ8 n'est pas dépendante du TGF-β ni d'IRF8 (**Article 2 et résultats non montrés**).

Nous avons observé qu'il est possible d'induire l'expression de l'Itgβ8 suite à une stimulation de Tregs déjà différenciés *in vitro* (**Résultats non montrés**). Une autre hypothèse de régulation de l'expression de cette intégrine serait donc en lien avec l'activation des Tregs. Afin de confirmer la nécessité d'une seconde stimulation du TCR des Tregs dans la régulation de l'expression de l'Itgβ8, nous pourrions réaliser des expériences *in vivo* mimant ce que nous avons réalisé *in vitro*. Pour ce faire, il sera nécessaire de réaliser un croisement des souris reportrices Itgβ8-td-Tomato avec des souris RAG2^{KO} qui expriment l'OT2, TCR exprimé par les LT CD4^{pos} spécifique de l'OVA. À l'issue de ce croisement, les souris ne développeraient que des LT CD4^{pos} spécifiques de l'OVA et le développement des Tregs ne sera possible que suite à l'administration de l'antigène. Ainsi, nous pourrions observer si de cette façon les Tregs expriment l'Itgβ8 *in vivo* après une première reconnaissance antigénique. Nous pourrions également trier ces Tregs exprimant ou non l'Itgβ8 et les injecter dans des souris immunodéficientes qui recevront de l'OVA ou des cellules tumorales exprimant l'OVA (B16-OVA). Ainsi, une deuxième rencontre avec un antigène spécifique du TCR, exprimé par les Tregs, permettrait de voir si, *in vivo*, l'expression de l'Itgβ8 est induite dans ces conditions et si dans les tumeurs cette expression est favorisée par une

reconnaissance antigénique. En 2011, une étude montre que dans des cellules fibroblastiques de poumon la voie AP-1/c-Jun permet d'induire l'expression de l'Itgβ8 (**Markovics et al. 2011**). Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'à l'état basal, l'activité du promoteur de l'Itgβ8 est réprimée par la présence d'HDAC qui empêche l'acétylation des histones et donc l'expression du gène. Dans ces cellules, il est montré que l'IL-1β active la voie NF-κB et p38 qui recrutent c-Jun, membre de la famille AP-1, et ATF2 au niveau du promoteur de l'Itgβ8. Ainsi, le promoteur perd sa liaison avec HDAC2, permettant une augmentation de l'acétylation des histones et donc l'induction de l'expression du gène. Les données obtenues par RNA-seq montrent que les Tregs Itgβ8^{pos} surexpriment *il1r2*, un récepteur qui inhibe la signalisation à l'IL-1β (**Résultat non montré**). Dans les Tregs, l'expression de l'Itgβ8 ne serait donc pas dépendante de cette voie. Mais suite à l'engagement du TCR, l'activité transcriptionnelle de NFAT et d'AP-1 est augmentée. Les Tregs Itgβ8^{pos} ayant un phénotype activé, il serait donc possible d'envisager que l'expression de l'Itgβ8 est induite après activation des Tregs (**Article 2**). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que l'engagement du TCR pourrait participer à la régulation de l'état d'ouverture chromatinienne du promoteur de l'*Itgb8*, favorisant l'induction de son expression dans les Tregs.

Enfin, une autre hypothèse concernant la régulation de l'expression de l'Itgβ8 met en avant le facteur de transcription Foxo1 et son influence sur la méthylation des gènes. La signature des Tregs Itgβ8^{pos} chez la souris, obtenues par analyse des résultats du RNA-seq, a mis en évidence une forte association avec Foxo1 suite à des analyses bio-informatiques de GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) (**Résultats non montrés**). Lors de la réanalyse de données de chIP-seq disponibles à partir du papier d'Ouyang *et al.*, nous avons pu observer une fixation de Foxo1 sur le promoteur de l'Itgβ8 qui participe positivement à l'induction de son activité transcriptionnelle (**Ouyang et al. 2012, Résultats non montrés**). De plus, dans les Tregs déficients pour Foxo1, il est observé une diminution de l'expression de l'Itgβ8 (**Ouyang et al. 2012, Résultats non montrés**). Il serait donc intéressant de valider ces observations en étudiant par Western-Blot ou par imagerie couplée à la cytométrie (ImageStream), la localisation subcellulaire de Foxo1 dans des Tregs exprimant ou non l'Itgβ8. En effet, la phosphorylation de Foxo1 entraîne son exclusion nucléaire, se retrouve alors dans le cytoplasme, empêchant sa liaison et sa régulation de gènes cibles. Ainsi, sa présence dans le noyau corrèle avec son activité transcriptionnelle. Afin de confirmer le rôle de Foxo1 dans la

régulation de l'expression de l'Itgβ8, un croisement entre les souris Itgβ8-Tomato et des souris Foxp3^{Cre}Foxo1^{fl/fl} permettrait de valider cette hypothèse.

Répondre à ces questions permettra donc de caractériser entièrement la population de Tregs Itgβ8^{pos}.

Nos résultats démontrent clairement que l'expression de l'Itgβ8 par les Tregs est défavorable dans un contexte tumoral par l'effet sur la réponse anti-tumorale mais également par le profil de cette population de Tregs activés (**Article1 et Article 2**). De plus, nos observations permettent d'envisager un ciblage de l'Itgβ8 dans le traitement des cancers. Le temps de demi-vie du TGF-β actif étant de l'ordre de 2 à 3 minutes (**Wakefield et al. 1990**), il apparait donc clair qu'inhiber son activation représente une stratégie prometteuse.

Publications issues de travaux collaboratifs

ERRa expression in bone metastases leads to exacerbated anti-tumor immune response.

M. Bouchet^{1,2,3*}, **A. Lainé**^{4*}, C. Boyault⁵, M. Proponnet-Guerault⁵, E. Meugnier⁶, L. Bouazza^{1,2}, C. Kan⁷, S. Geraci^{1,2}, H. Hernandez-Vargas⁴, C. Benetollo^{2,8}, Yuji Yoshiko⁹, P. Clézardin^{1,2}, J.C. Marie⁴ and E. Bonnelye^{1,2,10}

* Co-authors (soumis à Journal of Experimental Medicine le 27/09/2019)

Abstract:

Bone is the most common metastatic site for breast cancer. The estrogen-related receptor alpha (ERRa) has been implicated in breast cancer cell dissemination to the bone from the primary tumor. However, its role after tumor cell anchorage in the bone microenvironment remains elusive. Here, we reveal that ERRa inhibits the progression of bone metastases of breast cancer cells by increasing the immune-activity of the bone microenvironment. Over-expressing ERRa in breast cancer bone metastases induced the expression of some chemokines and repressed the production of Transforming Growth Factor Beta (TGF- β). The clinical relevance of our findings in mice was confirmed in over 248 breast cancer patients. Thus, this study reveals an unexpected role for ERRa in the bone microenvironment immune properties that contribute to decreasing metastatic growth.

Type 1 T_{REG} cells promote the generation of CD8⁺ tissue resident memory T cells.

Cristina Ferreira^{1 \pm} , Leandro Barros¹, Marta Baptista¹, Birte Blankenhaus¹, André Barros², Patrícia Figueiredo-Campos¹, Špela Konjar¹, **Alexandra Lainé**³, Nadine Kamenjarin⁴, Ana Stojanovic^{5,6}, Adelheid Cerwenka^{5,7}, Hans C. Probst⁴, Julien C. Marie^{3,8} and Marc Veldhoen^{1 \pm}
(en révision à Nature Immunology)

Abstract:

Immunity relies on tissue surveillance and efficient generation of memory T cells, with differences in recall ability and effector functions providing intersecting levels of immune protection. Tissue-resident memory T (T_{RM}) cells, functionally distinct from circulating memory T cells, have a critical role in protective immunity in tissues, are more efficacious when elicited after vaccination and yield more effective anti-tumour immunity. Yet, the signals that direct development of T_{RM} cells are incompletely understood. Here we show that type 1 regulatory T (T_{REG}) cells, which are able to integrate cues to adjust their transcriptional program in accordance with the tissue environment thereby influencing local immunity and tissue homeostasis and that are thought to reduce immune efficiency, promote the generation of CD8 T_{RM} cells. The absence of Tbet-expressing type 1 T_{REG} cells reduces the presence of T_{RM} cells in multiple tissues and increases pathogen burden upon infectious challenge. Using infection models we show that type 1 T_{REG} cells are specifically recruited to local inflammatory sites via the chemokine receptor CXCR3. Close proximity with effector CD8 T cells and T_{REG} cell expression of integrin- β 8 endows the bioavailability of tumour growth factor (TGF) β in the microenvironment, thereby promoting the generation of CD8 T_{RM} cells.

Présentation orales

2019:

Présentation poster: XIII WIRM Congress (World Immune Regulation Meeting), Davos - SUISSE

“Integrin $\alpha\beta8$ -mediated TGF- β activation by Foxp3^{pos} Treg cells leads to tumor progression”

Communication orale: 4th International Cancer Symposium of CRCL, Lyon - FRANCE

“Foxp3^{pos} regulatory T cells activate tumor-produced TGF- β : A key mechanism to prevent T cell anti-tumor immune response”

2018:

Présentation poster: Congrès du CRCL, Lyon – France /

Prix poster du CLARA (Cancéropôle Lyon Auvergne Région Rhône-Alpes)

“Integrin $\alpha\beta8$ -mediated TGF- β activation by Treg cells leads to tumor progression”

2017:

Participation à « Ma Thèse pour les Nuls »: Journée de la Science organisée par les Labex Cortex, DevWeCan, Ecofect, Lio et Primes de l’Université de Lyon

3ème prix de vulgarisation scientifique

“Ne pas donner de bonbons aux tumeurs, merci!!!! ”

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, et al (2013) Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 14:307–308. <https://doi.org/10.1038/ni.2554>
- Abdelouahed M, Ludlow A, Brunner G, Lawler J (2000) Activation of Platelet-transforming Growth Factor β -1 in the Absence of Thrombospondin-1. *J Biol Chem* 275:17933–17936. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.24.17933>
- Abe M, Harpel JG, Metz CN, et al (1994) An Assay for Transforming Growth Factor- β Using Cells Transfected with a Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promoter-Luciferase Construct. *Anal Biochem* 216:276–284. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1042>
- Acharya M, Mukhopadhyay S, Païdassi H, et al (2010) α v Integrin expression by DCs is required for Th17 cell differentiation and development of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Clin Invest* 120:4445–4452. <https://doi.org/10.1172/JCI43796>
- Ahamed J, Burg N, Yoshinaga K, et al (2008) In vitro and in vivo evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor-beta1. *Blood* 112:3650–3660. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-151753>
- Ahrends T, Spanjaard A, Pilzecker B, et al (2017) CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* 47:848-861.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.009>
- Akimova T, Beier UH, Wang L, et al (2011) Helios Expression Is a Marker of T Cell Activation and Proliferation. *PLoS ONE* 6:e24226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024226>
- Ali N, Rosenblum MD (2017) Regulatory T cells in skin. *Immunology* 152:372–381. <https://doi.org/10.1111/imm.12791>
- Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, et al (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19:345–354. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm014>
- Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J (2017) The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* 276:121–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12528>
- Aluwihare P, Mu Z, Zhao Z, et al (2009) Mice that lack activity of α v β 6- and α v β 8-integrins reproduce the abnormalities of Tgfb1- and Tgfb3-null mice. *J Cell Sci* 122:227–232. <https://doi.org/10.1242/jcs.035246>
- Anderson KG, Stromnes IM, Greenberg PD (2017) Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies. *Cancer Cell* 31:311–325. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.008>
- Angelin A, Gil-de-Gómez L, Dahiya S, et al (2017) Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab* 25:1282-1293.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.018>
- Annes JP, Chen Y, Munger JS, Rifkin DB (2004) Integrin α v β 6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J Cell Biol* 165:723–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312172>

- Apert C, Romagnoli P, van Meerwijk JPM (2017) IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein Cell*. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0425-3>
- Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H (2002) Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756–763. <https://doi.org/10.1038/ni816>
- Arnold TD, Ferrero GM, Qiu H, et al (2012) Defective Retinal Vascular Endothelial Cell Development As a Consequence of Impaired Integrin V 8-Mediated Activation of Transforming Growth Factor-. *J Neurosci* 32:1197–1206. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5648-11.2012>
- Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al (2013) Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504:451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Asano M (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 184:387–396. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.387>
- Aschenbrenner K, D’Cruz LM, Vollmann EH, et al (2007) Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 8:351–358. <https://doi.org/10.1038/ni1444>
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al (2011) Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science* 331:337–341. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
- Attisano L, Wrana JL (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296:1646–1647. <https://doi.org/10.1126/science.1071809>
- Baban B, Chandler PR, Sharma MD, et al (2009) IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like T Cells. *J Immunol* 183:2475–2483. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900986>
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001) CD4⁺ CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* 167:1245–1253. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1245>
- Barber T, Esteban-Pretel G, Marín M, Timoneda J (2014) Vitamin A Deficiency and Alterations in the Extracellular Matrix. *Nutrients* 6:4984–5017. <https://doi.org/10.3390/nu6114984>
- Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA (1994) Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 93:892–899. <https://doi.org/10.1172/JCI117045>
- Barcellos-Hoff MH, Dix TA (1996) Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 10:1077–1083. <https://doi.org/10.1210/mend.10.9.8885242>
- Baron U, Floess S, Wiczorek G, et al (2007) DNA demethylation in the humanFOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol* 37:2378–2389. <https://doi.org/10.1002/eji.200737594>
- Battaglia M (2005) Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105:4743–4748. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3932>
- Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U (1995) Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J Immunol Baltim Md* 1950 155:1066–1073

- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20–21. <https://doi.org/10.1038/83713>
- Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, et al (2001) Major Histocompatibility Complex Class II–Positive Cortical Epithelium Mediates the Selection of Cd4⁺ 25⁺ Immunoregulatory T Cells. *J Exp Med* 194:427–438. <https://doi.org/10.1084/jem.194.4.427>
- Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204:1765–1774. <https://doi.org/10.1084/jem.20070719>
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- Bettelli E, Dastrange M, Oukka M (2005) Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci* 102:5138–5143. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501675102>
- Bin Dhuban K, d’Hennezel E, Nagai Y, et al (2017) Suppression by human FOXP3⁺ regulatory T cells requires FOXP3-TIP60 interactions. *Sci Immunol* 2:eaai9297. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai9297>
- Bogdan C, Nathan C (1993) Modulation of Macrophage Function by Transforming Growth Factor β , Interleukin-4, and Interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci* 685:713–739. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb35934.x>
- Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, et al (2006) Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 7:1092–1100. <https://doi.org/10.1038/ni1385>
- Bono M, Tejon G, Flores-Santibañez F, et al (2016) Retinoic Acid as a Modulator of T Cell Immunity. *Nutrients* 8:349. <https://doi.org/10.3390/nu8060349>
- Bos PD, Plitas G, Rudra D, et al (2013) Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy. *J Exp Med* 210:2435–2466. <https://doi.org/10.1084/jem.20130762>
- Bossi G, Griffiths GM (1999) Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 5:90–96. <https://doi.org/10.1038/4779>
- Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, et al (2018) NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* 172:1022–1037.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.004>
- Boucard-Jourdin M, Kugler D, Endale Ahanda M-L, et al (2016) β 8 Integrin Expression and Activation of TGF- β by Intestinal Dendritic Cells Are Determined by Both Tissue Microenvironment and Cell Lineage. *J Immunol* 197:1968–1978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600244>
- Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, et al (2003) Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *J Immunol* 170:1257–1266. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1257>

- Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, et al (2004) Frontline: Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34:623–630. <https://doi.org/10.1002/eji.200324799>
- Brunet CL, Sharpe PM, Ferguson MW (1995) Inhibition of TGF-beta 3 (but not TGF-beta 1 or TGF-beta 2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int J Dev Biol* 39:345–355
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68–73. <https://doi.org/10.1038/83784>
- Budhu S, Schaer DA, Li Y, et al (2017) Blockade of surface-bound TGF- β on regulatory T cells abrogates suppression of effector T cell function in the tumor microenvironment. *Sci Signal* 10:eaak9702. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aak9702>
- Burchill MA, Yang J, Vang KB, et al (2008) Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire. *Immunity* 28:112–121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.022>
- Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA (2007) Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett* 114:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.08.005>
- Burkholder B, Huang R-Y, Burgess R, et al (2014) Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1845:182–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.004>
- Burmeister Y, Lischke T, Dahler AC, et al (2008) ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells. *J Immunol* 180:774–782. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.774>
- Burnet FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1–27
- Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, et al (2013) A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair. *Cell* 155:1282–1295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.054>
- Cambier S, Mu DZ, O'Connell D, et al (2000) A role for the integrin α v β 8 in the negative regulation of epithelial cell growth. *Cancer Res* 60:7084–7093
- Camisaschi C, Casati C, Rini F, et al (2010) LAG-3 Expression Defines a Subset of CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ Regulatory T Cells That Are Expanded at Tumor Sites. *J Immunol* 184:6545–6551. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903879>
- Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al (2007) Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity* 27:635–646. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.014>
- Cao Z, Wara AK, Icli B, et al (2009) Kruppel-like Factor KLF10 Targets Transforming Growth Factor- β 1 to Regulate CD4⁺ CD25⁻ T Cells and T Regulatory Cells. *J Biol Chem* 284:24914–24924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000059>
- Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, et al (2003) Transforming growth factor 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 100:4120–4125. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730640100>

- Cazac BB, Roes J (2000) TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 13:443–451
- Chang AL, Miska J, Wainwright DA, et al (2016) CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is Essential for the Recruitment of Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res* 76:5671–5682. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0144>
- Chaudhary B, Elkord E (2016) Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines* 4:28. <https://doi.org/10.3390/vaccines4030028>
- Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, et al (2009) CD4+ Regulatory T Cells Control TH17 Responses in a Stat3-Dependent Manner. *Science* 326:986–991. <https://doi.org/10.1126/science.1172702>
- Cheifetz S, Bellón T, Calés C, et al (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027–19030
- Chen C-R, Kang Y, Massague J (2001a) Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci* 98:992–999. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.992>
- Chen G, Deng C, Li Y-P (2012) TGF-β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8:272–288. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>
- Chen M-L, Pittet MJ, Gorelik L, et al (2005) Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 102:419–424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408197102>
- Chen Q, Kim YC, Laurence A, et al (2011) IL-2 Controls the Stability of Foxp3 Expression in TGF- - Induced Foxp3+ T Cells In Vivo. *J Immunol* 186:6329–6337. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100061>
- Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM (2001b) TGF-β Released by Apoptotic T Cells Contributes to an Immunosuppressive Milieu. *Immunity* 14:715–725. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00147-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00147-9)
- Chen W, Jin W, Hardegen N, et al (2003) Conversion of Peripheral CD4⁺ CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF-β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *J Exp Med* 198:1875–1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- Chen X, Subleski JJ, Kopf H, et al (2008) Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *J Immunol* 180:6467–6471. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6467>
- Chinen T, Kannan AK, Levine AG, et al (2016) An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol* 17:1322–1333. <https://doi.org/10.1038/ni.3540>
- Cho D, Kim T, Lee W, et al (2000) Interleukin-18 and the Costimulatory Molecule B7-1 Have a Synergistic Anti-Tumor Effect on Murine Melanoma; Implication of Combined Immunotherapy for Poorly Immunogenic Malignancy. *J Invest Dermatol* 114:928–934. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5600685>

- Choi BD, Gedeon PC, Herndon JE, et al (2013) Human Regulatory T Cells Kill Tumor Cells through Granzyme-Dependent Cytotoxicity upon Retargeting with a Bispecific Antibody. *Cancer Immunol Res* 1:163–167. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0049>
- Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, et al (2013) Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* 122:1411–1418. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441832>
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566–569. <https://doi.org/10.1038/nature06306>
- Cook KW, Letley DP, Ingram RJM, et al (2014) CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut* 63:1550–1559. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306253>
- Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN (2007) Regulatory T Cells and Human Disease. *Clin Dev Immunol* 2007:1–10. <https://doi.org/10.1155/2007/89195>
- Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo CV, et al (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204:1757–1764. <https://doi.org/10.1084/jem.20070590>
- Coquet JM, Ribot JC, Bąbała N, et al (2013) Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27–CD70 pathway. *J Exp Med* 210:715–728. <https://doi.org/10.1084/jem.20112061>
- Corbel C, Lemarchandel V, Thomas-Vaslin V, et al (2007) Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Dev Comp Immunol* 31:1082–1094. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.01.009>
- Courau T, Nehar-Belaid D, Florez L, et al (2016) TGF- β and VEGF cooperatively control the immunotolerant tumor environment and the efficacy of cancer immunotherapies. *JCI Insight* 1:1. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85974>
- Cowan JE, Parnell SM, Nakamura K, et al (2013) The thymic medulla is required for Foxp3⁺ regulatory but not conventional CD4⁺ thymocyte development. *J Exp Med* 210:675–681. <https://doi.org/10.1084/jem.20122070>
- Cozzo Picca C, Simons DM, Oh S, et al (2011) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell formation requires more specific recognition of a self-peptide than thymocyte deletion. *Proc Natl Acad Sci* 108:14890–14895. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103810108>
- Crane CA, Han SJ, Barry JJ, et al (2010) TGF- β downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8⁺ T cells in glioma patients. *Neuro-Oncol* 12:7–13. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop009>
- Cretney E, Leung PSK, Trezise S, et al (2018) Characterization of Blimp-1 function in effector regulatory T cells. *J Autoimmun* 91:73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.04.003>
- Cuende J, Liénart S, Dedobbeleer O, et al (2015) Monoclonal antibodies against GARP/TGF- β 1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo. *Sci Transl Med* 7:284ra56–284ra56. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1983>

- Cuff S, Dolton G, Matthews RJ, Gallimore A (2010) Antigen Specificity Determines the Pro- or Antitumoral Nature of CD8⁺ T Cells. *J Immunol* 184:607–614. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804089>
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942–949. <https://doi.org/10.1038/nm1093>
- Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, et al (2008) Adaptive Foxp3⁺ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. *Immunity* 29:114–126. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.010>
- Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ (2004) CD25⁻ T Cells Generate CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion. *J Immunol* 173:7259–7268. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7259>
- Dahmani A, Delisle J-S (2018) TGF- β in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers* 10:194. <https://doi.org/10.3390/cancers10060194>
- D'Ambrosio A, Cossu A, Amendola A, et al (2016) Lamina Propria CD4⁺LAP⁺ Regulatory T Cells Are Increased in Active Ulcerative Colitis but Show Increased IL-17 Expression and Reduced Suppressor Activity. *J Crohns Colitis* 10:346–353. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv216>
- Daniele T, Hackmann Y, Ritter AT, et al (2011) A Role for Rab7 in the Movement of Secretory Granules in Cytotoxic T Lymphocytes. *Traffic* 12:902–911. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01194.x>
- Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E (2018) Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med* 50:165. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0191-1>
- David CJ, Massagué J (2018) Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:419–435. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0007-0>
- Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM (2007) Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β -Mediated Induction of Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J Immunol* 178:4022–4026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4022>
- D'Cruz LM, Klein L (2005) Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6:1152–1159. <https://doi.org/10.1038/ni1264>
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>
- Deheuninck J, Luo K (2009) Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling. *Cell Res* 19:47–57. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.324>
- Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, et al (2009) The mTOR Kinase Differentially Regulates Effector and Regulatory T Cell Lineage Commitment. *Immunity* 30:832–844. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.014>

- Delgoffe GM, Woo S-R, Turnis ME, et al (2013) Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1–semaphorin-4a axis. *Nature* 501:252–256. <https://doi.org/10.1038/nature12428>
- De Simone M, Arrigoni A, Rossetti G, et al (2016) Transcriptional Landscape of Human Tissue Lymphocytes Unveils Uniqueness of Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *Immunity* 45:1135–1147. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.021>
- Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5:410–421. <https://doi.org/10.1038/ncb975>
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, et al (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Dev Camb Engl* 121:1845–1854
- Dieckmann NMG, Hackmann Y, Aricò M, Griffiths GM (2015) Munc18-2 is required for Syntaxin 11 Localization on the Plasma Membrane in Cytotoxic T-Lymphocytes: Localization of Endogenous STX11 & Munc18-2 in CTL. *Traffic* 16:1330–1341. <https://doi.org/10.1111/tra.12337>
- Doedens AL, Rubinstein MP, Gross ET, et al (2016) Molecular Programming of Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells and IL15 Resistance. *Cancer Immunol Res* 4:799–811. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0178>
- D'Orlando O, Zhao F, Kasper B, et al (2013) Syntaxin 11 is required for NK and CD8⁺ T-cell cytotoxicity and neutrophil degranulation: Immunomodulation. *Eur J Immunol* 43:194–208. <https://doi.org/10.1002/eji.201142343>
- Downs-Canner S, Berkey S, Delgoffe GM, et al (2017) Suppressive IL-17A+Foxp3+ and ex-Th17 IL-17AnegFoxp3+ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nat Commun* 8:14649. <https://doi.org/10.1038/ncomms14649>
- Duarte JH, Zelenay S, Bergman M-L, et al (2009) Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur J Immunol* 39:948–955. <https://doi.org/10.1002/eji.200839196>
- Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, et al (2001) Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* 158:305–316
- Dubois CM, Laprise M-H, Blanchette F, et al (1995) Processing of Transforming Growth Factor 1 Precursor by Human Furin Convertase. *J Biol Chem* 270:10618–10624. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10618>
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004a) The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004b) The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21:137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>

- Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, et al (2014) Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) Modulates the Ability of CD4 T-cells to Be Suppressed In Vivo. *PLoS ONE* 9:e109080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109080>
- Edwards JP, Fujii H, Zhou AX, et al (2013) Regulation of the Expression of GARP/Latent TGF- β 1 Complexes on Mouse T Cells and Their Role in Regulatory T Cell and Th17 Differentiation. *J Immunol* 190:5506–5515. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300199>
- Edwards JP, Thornton AM, Shevach EM (2014) Release of Active TGF- β 1 from the Latent TGF- β 1/GARP Complex on T Regulatory Cells Is Mediated by Integrin β ₈. *J Immunol* 193:2843–2849. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401102>
- Elstak ED, Neeft M, Nehme NT, et al (2011) The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood* 118:1570–1578. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-339523>
- Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, et al (2011) Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature* 475:226–230. <https://doi.org/10.1038/nature10169>
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, et al (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890–898. <https://doi.org/10.1172/JCI11112>
- Faget J, Biota C, Bachelot T, et al (2011) Early Detection of Tumor Cells by Innate Immune Cells Leads to Treg Recruitment through CCL22 Production by Tumor Cells. *Cancer Res* 71:6143–6152. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0573>
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al (2004) Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4⁺ CD25⁻ T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149–5153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5149>
- Fassett MS, Jiang W, D'Alise AM, et al (2012) Nuclear receptor Nr4a1 modulates both regulatory T-cell (Treg) differentiation and clonal deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3891–3896. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200090109>
- Fazilleau N, Bachelez H, Gougeon M-L, Viguier M (2007) Cutting Edge: Size and Diversity of CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ Regulatory T Cell Repertoire in Humans: Evidence for Similarities and Partial Overlapping with CD4⁺ CD25⁻ T Cells. *J Immunol* 179:3412–3416. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3412>
- Feng Y, Arvey A, Chinen T, et al (2014) Control of the Inheritance of Regulatory T Cell Identity by a cis Element in the Foxp3 Locus. *Cell* 158:749–763. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.031>
- Feng Y, van der Veecken J, Shugay M, et al (2015) A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature* 528:132–136. <https://doi.org/10.1038/nature16141>
- Flaumenhaft R, Abe M, Sato Y, et al (1993) Role of the latent TGF-beta binding protein in the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 120:995–1002. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.4.995>

- Floess S, Freyer J, Siewert C, et al (2007) Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e38. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050038>
- Foley EJ (1953) Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 13:835–837
- Fontana L, Chen Y, Prijatelj P, et al (2005) Fibronectin is required for integrin α v β 6-mediated activation of latent TGF- β complexes containing LTBP-1. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 19:1798–1808. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4134com>
- Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY (2005a) Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202:901–906. <https://doi.org/10.1084/jem.20050784>
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330–336. <https://doi.org/10.1038/ni904>
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY (2005b) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142–1151. <https://doi.org/10.1038/ni1263>
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al (2005c) Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity* 22:329–341. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.016>
- Fourcade J, Sun Z, Chauvin J-M, et al (2018) CD226 opposes TIGIT to disrupt Tregs in melanoma. *JCI Insight* 3:e121157. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121157>
- Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al (2009) PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206:3015–3029. <https://doi.org/10.1084/jem.20090847>
- Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, et al (2009) CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med* 206:421–434. <https://doi.org/10.1084/jem.20081811>
- Fujimura T, Kambayashi Y, Aiba S (2012) Crosstalk between regulatory T cells (Tregs) and myeloid derived suppressor cells (MDSCs) during melanoma growth. *Oncol Immunology* 1:1433–1434. <https://doi.org/10.4161/onci.21176>
- Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, et al (2001) Ligand-dependent Degradation of Smad3 by a Ubiquitin Ligase Complex of ROC1 and Associated Proteins. *Mol Biol Cell* 12:1431–1443. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1431>
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504:446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Gabrilovich DI (2017) Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5:3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>
- Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162–174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>

- Gao X, Zhu Y, Li G, et al (2012) TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. *PLoS One* 7:e30676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030676>
- Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, et al (2007) Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445:771–775. <https://doi.org/10.1038/nature05543>
- Geissmann F, Revy P, Regnault A, et al (1999) TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 162:4567–4575
- Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, Marquardt H (1988) Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 8:4162–4168. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.10.4162>
- Gershon RK, Kondo K (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723–737
- Gershon RK, Kondo K (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903–914
- Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MAE, et al (2011) Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity* 34:794–806. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.021>
- Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, et al (2005a) CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *J Exp Med* 202:1075–1085. <https://doi.org/10.1084/jem.20051511>
- Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al (2005b) Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202:919–929. <https://doi.org/10.1084/jem.20050463>
- Giancchetti E, Fierabracci A (2018) Inhibitory Receptors and Pathways of Lymphocytes: The Role of PD-1 in Treg Development and Their Involvement in Autoimmunity Onset and Cancer Progression. *Front Immunol* 9:2374. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02374>
- Glinka Y, Prud'homme GJ (2008) Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 84:302–310. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208090>
- Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N, Prud'homme GJ (2011) Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* 32:613–621. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq281>
- Gokhale AS, Gangaplara A, Lopez-Occasio M, et al (2019) Selective deletion of Eos (Ikzf4) in T-regulatory cells leads to loss of suppressive function and development of systemic autoimmunity. *J Autoimmun* S089684111930280X. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.06.011>
- Goldberg MV, Drake CG (2010) LAG-3 in Cancer Immunotherapy. In: Dranoff G (ed) *Cancer Immunology and Immunotherapy*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 269–278
- Gondek DC, Devries V, Nowak EC, et al (2008) Transplantation survival is maintained by granzyme B⁺ regulatory cells and adaptive regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 181:4752–4760. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4752>

- Gondek DC, Lu L-F, Quezada SA, et al (2005) Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4⁺ CD25⁺ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J Immunol* 174:1783–1786. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.1783>
- Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z (2018) Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* 32:1267–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>
- Gorelik L, Constant S, Flavell RA (2002) Mechanism of Transforming Growth Factor β -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *J Exp Med* 195:1499–1505. <https://doi.org/10.1084/jem.20012076>
- Gorelik L, Fields PE, Flavell RA (2000) Cutting Edge: TGF- β Inhibits Th Type 2 Development Through Inhibition of GATA-3 Expression. *J Immunol* 165:4773–4777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.4773>
- Gorelik L, Flavell RA (2000) Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12:171–181
- Gorelik L, Flavell RA (2001) Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells. *Nat Med* 7:1118–1122. <https://doi.org/10.1038/nm1001-1118>
- Gottschalk RA, Corse E, Allison JP (2010) TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J Exp Med* 207:1701–1711. <https://doi.org/10.1084/jem.20091999>
- Gottschalk RA, Corse E, Allison JP (2012) Expression of Helios in Peripherally Induced Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol* 188:976–980. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102964>
- Gourdin N, Bossennec M, Rodriguez C, et al (2018) Autocrine Adenosine regulates tumor polyfunctional CD73+CD4+ effector T cells devoid of immune checkpoints. *Cancer Res* canres.2405.2017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2405>
- Grainger JR, Smith KA, Hewitson JP, et al (2010) Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *J Exp Med* 207:2331–2341. <https://doi.org/10.1084/jem.20101074>
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, et al (2004) Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity* 21:589–601. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.09.002>
- Gulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM (2007) Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet* 370:59–67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61050-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61050-2)
- Gyori D, Lim EL, Grant FM, et al (2018) Compensation between CSF1R⁺ macrophages and Foxp3⁺ Treg cells drives resistance to tumor immunotherapy. *JCI Insight* 3:e120631. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120631>
- Hadis U, Wahl B, Schulz O, et al (2011) Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3⁺ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity* 34:237–246. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.016>

- Halvorsen EC, Hamilton MJ, Young A, et al (2016) Maraviroc decreases CCL8-mediated migration of CCR5⁺ regulatory T cells and reduces metastatic tumor growth in the lungs. *Oncol Immunology* 5:e1150398. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1150398>
- Han JM, Patterson SJ, Levings MK (2012) The Role of the PI3K Signaling Pathway in CD4⁺ T Cell Differentiation and Function. *Front Immunol* 3:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00245>
- Hannier S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F (1998) CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol Baltim Md* 1950 161:4058–4065
- Hannon GJ, Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 371:257–261. <https://doi.org/10.1038/371257a0>
- Hansen W, Hutzler M, Abel S, et al (2012) Neuropilin 1 deficiency on CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med* 209:2001–2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20111497>
- Harada Y, Harada Y, Elly C, et al (2010) Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *J Exp Med* 207:1381–1391. <https://doi.org/10.1084/jem.20100004>
- Haribhai D, Lin W, Edwards B, et al (2009) A Central Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Induction in Experimental Colitis. *J Immunol* 182:3461–3468. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802535>
- Haribhai D, Williams JB, Jia S, et al (2011) A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity. *Immunity* 35:109–122. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.029>
- Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM (2007) Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 319:41–52. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.008>
- Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C (2008) The AKT–mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺ Foxp3⁺ cells. *J Exp Med* 205:565–574. <https://doi.org/10.1084/jem.20071477>
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, et al (2006) Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1 γ and Smad4 Branches of the TGF β Pathway. *Cell* 125:929–941. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.045>
- Headley MB, Bins A, Nip A, et al (2016) Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature* 531:513–517. <https://doi.org/10.1038/nature16985>
- Hemmers S, Schizas M, Azizi E, et al (2019) IL-2 production by self-reactive CD4 thymocytes scales regulatory T cell generation in the thymus. *J Exp Med* jem.20190993. <https://doi.org/10.1084/jem.20190993>
- Hill JA, Hall JA, Sun C-M, et al (2008) Retinoic Acid Enhances Foxp3 Induction Indirectly by Relieving Inhibition from CD4⁺CD44^{hi} Cells. *Immunity* 29:758–770. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.018>

- Hinck AP, Mueller TD, Springer TA (2016) Structural Biology and Evolution of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a022103. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022103>
- Hindley JP, Ferreira C, Jones E, et al (2011) Analysis of the T-Cell Receptor Repertoires of Tumor-Infiltrating Conventional and Regulatory T Cells Reveals No Evidence for Conversion in Carcinogen-Induced Tumors. *Cancer Res* 71:736–746. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1797>
- Hinterberger M, Wirnsberger G, Klein L (2011) B7/CD28 in Central Tolerance: Costimulation Promotes Maturation of Regulatory T Cell Precursors and Prevents Their Clonal Deletion. *Front Immunol* 2:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00030>
- Hirota S, Liu Q, Lee HS, et al (2011) The astrocyte-expressed integrin α 8 governs blood vessel sprouting in the developing retina. *Development* 138:5157–5166. <https://doi.org/10.1242/dev.069153>
- Hoelzinger DB, Smith SE, Mirza N, et al (2010) Blockade of CCL1 Inhibits T Regulatory Cell Suppressive Function Enhancing Tumor Immunity without Affecting T Effector Responses. *J Immunol* 184:6833–6842. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904084>
- Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, et al (1999) MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to Inadequate Collagen Turnover. *Cell* 99:81–92. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80064-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80064-1)
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057–1061. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>
- Horowitz A, Newman KC, Evans JH, et al (2010) Cross-Talk between T Cells and NK Cells Generates Rapid Effector Responses to *Plasmodium falciparum* - Infected Erythrocytes. *J Immunol* 184:6043–6052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000106>
- Hsieh C-S, Liang Y, Tzgnik AJ, et al (2004) Recognition of the Peripheral Self by Naturally Arising CD25+ CD4+ T Cell Receptors. *Immunity* 21:267–277. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.009>
- Hsieh C-S, Zheng Y, Liang Y, et al (2006) An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7:401–410. <https://doi.org/10.1038/ni1318>
- Huang C-T, Workman CJ, Flies D, et al (2004) Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* 21:503–513. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.010>
- Huang XZ (1996) Inactivation of the integrin β 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin. *J Cell Biol* 133:921–928. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.4.921>
- Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D (2006) Inhibitory Effects of B Cells on Antitumor Immunity. *Cancer Res* 66:7741–7747. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3766>
- Isomura I, Palmer S, Grumont RJ, et al (2009) c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J Exp Med* 206:3001–3014. <https://doi.org/10.1084/jem.20091411>
- Ito T, Hanabuchi S, Wang Y-H, et al (2008) Two Functional Subsets of FOXP3+ Regulatory T Cells in Human Thymus and Periphery. *Immunity* 28:870–880. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.018>

- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol Baltim Md* 1950 162:5317–5326
- Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, et al (2018) Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunol* 19:3. <https://doi.org/10.1186/s12865-018-0241-4>
- James KD, Jenkinson WE, Anderson G (2018) T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go? *J Leukoc Biol* 104:275–284. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MR1217-496R>
- Janicki CN, Jenkinson SR, Williams NA, Morgan DJ (2008) Loss of CTL Function among High-Avidity Tumor-Specific CD8+ T Cells following Tumor Infiltration. *Cancer Res* 68:2993–3000. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5008>
- Janson PCJ, Winerdal ME, Marits P, et al (2008) FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One* 3:e1612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001612>
- Jiang H, Hegde S, Knolhoff BL, et al (2016) Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med* 22:851–860. <https://doi.org/10.1038/nm.4123>
- Joller N, Lozano E, Burkett PR, et al (2014) Treg Cells Expressing the Coinhibitory Molecule TIGIT Selectively Inhibit Proinflammatory Th1 and Th17 Cell Responses. *Immunity* 40:569–581. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.012>
- Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2:301–306. <https://doi.org/10.1038/86302>
- Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY (2012a) Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol* 30:531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, et al (2012b) Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 482:395–399. <https://doi.org/10.1038/nature10772>
- Josefowicz SZ, Wilson CB, Rudensky AY (2009) Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *J Immunol Baltim Md* 1950 182:6648–6652. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803320>
- Kang SG, Lim HW, Andrisani OM, et al (2007) Vitamin A Metabolites Induce Gut-Homing FoxP3+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 179:3724–3733. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3724>
- Kehrl JH, Thevenin C, Rieckmann P, Fauci AS (1991) Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J Immunol Baltim Md* 1950 146:4016–4023
- Kerdiles YM, Stone EL, Beisner DL, et al (2010) Foxo Transcription Factors Control Regulatory T Cell Development and Function. *Immunity* 33:890–904. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.002>

- Khan O, Giles JR, McDonald S, et al (2019) TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature* 571:211–218. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1325-x>
- Khattari R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337–342. <https://doi.org/10.1038/ni909>
- Khong HT, Wang QJ, Rosenberg SA (2004) Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 27:184–190
- Kim H-P, Leonard WJ (2007) CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med* 204:1543–1551. <https://doi.org/10.1084/jem.20070109>
- Kim J, Lahl K, Hori S, et al (2009) Cutting Edge: Depletion of Foxp3⁺ Cells Leads to Induction of Autoimmunity by Specific Ablation of Regulatory T Cells in Genetically Targeted Mice. *J Immunol* 183:7631–7634. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804308>
- Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY (2007) Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8:191–197. <https://doi.org/10.1038/ni1428>
- Kim K-D, Bae S, Capece T, et al (2017) Targeted calcium influx boosts cytotoxic T lymphocyte function in the tumour microenvironment. *Nat Commun* 8:15365. <https://doi.org/10.1038/ncomms15365>
- Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, et al (2017) Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol* 18:173–183. <https://doi.org/10.1038/ni.3646>
- Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S (2015) Epigenetic control of thymic Treg-cell development. *Eur J Immunol* 45:11–16. <https://doi.org/10.1002/eji.201444577>
- Kitamura H, Cambier S, Somanath S, et al (2011) Mouse and human lung fibroblasts regulate dendritic cell trafficking, airway inflammation, and fibrosis through integrin $\alpha\beta 8$ -mediated activation of TGF- β . *J Clin Invest* 121:2863–2875. <https://doi.org/10.1172/JCI45589>
- Kitani A, Fuss I, Nakamura K, et al (2003) Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta 1$ -producing Regulatory T Cells Induce Smad-mediated Interleukin 10 Secretion That Facilitates Coordinated Immunoregulatory Activity and Amelioration of TGF- $\beta 1$ -mediated Fibrosis. *J Exp Med* 198:1179–1188. <https://doi.org/10.1084/jem.20030917>
- Klarquist J, Tobin K, Farhangi Oskuei P, et al (2016) Ccl22 Diverts T Regulatory Cells and Controls the Growth of Melanoma. *Cancer Res* 76:6230–6240. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0618>
- Knoechel B, Lohr J, Kahn E, et al (2005) Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med* 202:1375–1386. <https://doi.org/10.1084/jem.20050855>
- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, et al (2006) T Regulatory and Primed Uncommitted CD4 T Cells Express CD73, Which Suppresses Effector CD4 T Cells by Converting 5'-Adenosine Monophosphate to Adenosine. *J Immunol* 177:6780–6786. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6780>

- Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, et al (2009) The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10:595–602. <https://doi.org/10.1038/ni.1731>
- Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450:903–907. <https://doi.org/10.1038/nature06309>
- Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, et al (2009) Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci* 106:1903–1908. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811556106>
- Konkel JE, Jin W, Abbatiello B, et al (2014) Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci* 111:E465–E473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320319111>
- Kouo T, Huang L, Pucsek AB, et al (2015) Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8⁺ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res* 3:412–423. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0150>
- Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, et al (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6:1219–1227. <https://doi.org/10.1038/ni1265>
- Krneta T, Gillgrass A, Poznanski S, et al (2017) M2-polarized and tumor-associated macrophages alter NK cell phenotype and function in a contact-dependent manner. *J Leukoc Biol* 101:285–295. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A1215-552R>
- Krzewski K, Coligan JE (2012) Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol* 3:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00335>
- Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, et al (2014) Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* 345:1623–1627. <https://doi.org/10.1126/science.1255904>
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, et al (1993) Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci* 90:770–774. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.770>
- Kurtulus S, Sakuishi K, Ngiow S-F, et al (2015) TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest* 125:4053–4062. <https://doi.org/10.1172/JCI81187>
- Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al (2007) Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 204:57–63. <https://doi.org/10.1084/jem.20061852>
- Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA (2005) Transforming growth factor- β controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon- γ . *Nat Immunol* 6:600–607. <https://doi.org/10.1038/ni1197>
- Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, et al (2011) Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478:250–254. <https://doi.org/10.1038/nature10434>
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al (2007) Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity* 26:371–381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009>

- Lawler J, Sunday M, Thibert V, et al (1998) Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest* 101:982–992. <https://doi.org/10.1172/JCI1684>
- Lee C-R, Lee W, Cho S, Park S-G (2018) Characterization of Multiple Cytokine Combinations and TGF- β on Differentiation and Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Int J Mol Sci* 19:869. <https://doi.org/10.3390/ijms19030869>
- Lee J-C, Lee K-M, Kim D-W, Heo DS (2004) Elevated TGF- β 1 Secretion and Down-Modulation of NKG2D Underlies Impaired NK Cytotoxicity in Cancer Patients. *J Immunol* 172:7335–7340. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7335>
- Lee YJ, Han Y, Lu HT, et al (1997) TGF-beta suppresses IFN-gamma induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J Immunol Baltim Md* 158:2065–2075
- Lettau M, Kabelitz D, Janssen O (2015) Lysosome-Related Effector Vesicles in T Lymphocytes and NK Cells. *Scand J Immunol* 82:235–243. <https://doi.org/10.1111/sji.12337>
- Levin SD, Taft DW, Brandt CS, et al (2011) Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol* 41:902–915. <https://doi.org/10.1002/eji.201041136>
- Lewis CE, Pollard JW (2006) Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res* 66:605–612. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4005>
- Li B, Samanta A, Song X, et al (2007) FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci* 104:4571–4576. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700298104>
- Li J, He Y, Hao J, et al (2018) High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8+ T Cells. *Front Immunol* 9:2981. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02981>
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA (2006a) Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455–471. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.011>
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, et al (2006b) TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β REGULATION OF IMMUNE RESPONSES. *Annu Rev Immunol* 24:99–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>
- Li R, Li H, Sun Q, et al (2017) Indoleamine 2,3-dioxygenase regulates T cell activity through Vav1/Rac pathway. *Mol Immunol* 81:102–107. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.11.018>
- Li X, Liang Y, LeBlanc M, et al (2014) Function of a Foxp3 cis -Element in Protecting Regulatory T Cell Identity. *Cell* 158:734–748. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.030>
- Liang B, Workman C, Lee J, et al (2008) Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J Immunol* 180:5916–5926. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5916>
- Liao G, Detre C, Berger SB, et al (2012) Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family-Related Protein Regulates CD4+T Cell-Mediated Colitis in Mice. *Gastroenterology* 142:582-591.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.031>

- Lieberman J (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3:361–370. <https://doi.org/10.1038/nri1083>
- Liénart S, Merceron R, Vanderaa C, et al (2018) Structural basis of latent TGF- β 1 presentation and activation by GARP on human regulatory T cells. *Science* 362:952–956. <https://doi.org/10.1126/science.aau2909>
- Lin W, Haribhai D, Relland LM, et al (2007) Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 8:359–368. <https://doi.org/10.1038/ni1445>
- Linden J (2011) Regulation of Leukocyte Function by Adenosine Receptors. In: *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp 95–114
- Linterman MA, Pierson W, Lee SK, et al (2011) Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 17:975–982. <https://doi.org/10.1038/nm.2425>
- Lio C-WJ, Hsieh C-S (2008) A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* 28:100–111. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.021>
- Liston A, Farr AG, Chen Z, et al (2007) Lack of Foxp3 function and expression in the thymic epithelium. *J Exp Med* 204:475–480. <https://doi.org/10.1084/jem.20062465>
- Liston A, Nutsch KM, Farr AG, et al (2008) Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci* 105:11903–11908. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801506105>
- Liu B, Tahk S, Yee KM, et al (2010) The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. *Science* 330:521–525. <https://doi.org/10.1126/science.1193787>
- Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, et al (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701–1711. <https://doi.org/10.1084/jem.20060772>
- Liu Y, Zhang P, Li J, et al (2008) A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 9:632–640. <https://doi.org/10.1038/ni.1607>
- Long M, Park S-G, Strickland I, et al (2009) Nuclear Factor- κ B Modulates Regulatory T Cell Development by Directly Regulating Expression of Foxp3 Transcription Factor. *Immunity* 31:921–931. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.022>
- Lyons RM (1988) Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106:1659–1665. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.5.1659>
- Ma Q, Liu J, Wu G, et al (2018) Co-expression of LAG3 and TIM3 identifies a potent Treg population that suppresses macrophage functions in colorectal cancer patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 45:1002–1009. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12992>
- Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, et al (2013) Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells. *Immunity* 38:729–741. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.003>
- Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, et al (1996) Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter

- protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J Clin Invest* 98:1633–1641. <https://doi.org/10.1172/JCI118958>
- Mahalingam J, Lin C-Y, Chiang J-M, et al (2014) CD4+ T Cells Expressing Latency-Associated Peptide and Foxp3 Are an Activated Subgroup of Regulatory T Cells Enriched in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 9:e108554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108554>
- Maj T, Wang W, Crespo J, et al (2017) Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nat Immunol* 18:1332–1341. <https://doi.org/10.1038/ni.3868>
- Malchow S, Leventhal DS, Lee V, et al (2016) Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity* 44:1102–1113. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.009>
- Malchow S, Leventhal DS, Nishi S, et al (2013) Aire-Dependent Thymic Development of Tumor-Associated Regulatory T Cells. *Science* 339:1219–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1233913>
- Maldonado RA, von Andrian UH (2010) How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells. In: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp 111–165
- Mangan PR, Harrington LE, O’Quinn DB, et al (2006) Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441:231–234. <https://doi.org/10.1038/nature04754>
- Mantel P-Y, Ouaked N, Rückert B, et al (2006) Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 176:3593–3602. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3593>
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23:549–555
- Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, et al (2018) TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* 554:544–548. <https://doi.org/10.1038/nature25501>
- Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY (2005) TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:1061–1067. <https://doi.org/10.1084/jem.20042276>
- Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY (2006) Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor. *Immunity* 25:441–454. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.012>
- Markovics JA, Araya J, Cambier S, et al (2011) Interleukin-1 β Induces Increased Transcriptional Activation of the Transforming Growth Factor- β -activating Integrin Subunit β 8 through Altering Chromatin Architecture. *J Biol Chem* 286:36864–36874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.276790>

- Marks BR, Nowyhed HN, Choi J-Y, et al (2009) Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat Immunol* 10:1125–1132. <https://doi.org/10.1038/ni.1783>
- Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, et al (2007) Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445:931–935. <https://doi.org/10.1038/nature05478>
- Martinvalet D (2015) ROS signaling during granzyme B-mediated apoptosis. *Mol Cell Oncol* 2:e992639. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.992639>
- Massagué J, Chen YG (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14:627–644
- Mathis D, Benoist C (2009) Aire. *Annu Rev Immunol* 27:287–312. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141532>
- Mazanet MM, Hughes CCW (2002) B7-H1 Is Expressed by Human Endothelial Cells and Suppresses T Cell Cytokine Synthesis. *J Immunol* 169:3581–3588. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3581>
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al (2002) CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311–323
- McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ (2019) CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol* 37:457–495. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055318>
- Melton AC, Bailey-Bucktrout SL, Travis MA, et al (2010) Expression of $\alpha\beta 8$ integrin on dendritic cells regulates Th17 cell development and experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Clin Invest* 120:4436–4444. <https://doi.org/10.1172/JCI43786>
- Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, et al (2003) Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol* 160:875–885. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210158>
- Miller G, Pillarisetty VG, Shah AB, et al (2002) Endogenous Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Overexpression In Vivo Results in the Long-Term Recruitment of a Distinct Dendritic Cell Population with Enhanced Immunostimulatory Function. *J Immunol* 169:2875–2885. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.2875>
- Miyao T, Floess S, Setoguchi R, et al (2012) Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36:262–275. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.012>
- Miyazawa K, Miyazono K (2017) Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9:a022095. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022095>
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH (1991) A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J* 10:1091–1101
- Molinero LL, Yang J, Gajewski T, et al (2009) CARMA1 Controls an Early Checkpoint in the Thymic Development of FoxP3⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol* 182:6736–6743. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900498>

- Moran AE, Holzapfel KL, Xing Y, et al (2011) T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* 208:1279–1289. <https://doi.org/10.1084/jem.20110308>
- Morris DG, Huang X, Kaminski N, et al (2003) Loss of integrin $\alpha\beta6$ -mediated TGF- β activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 422:169–173. <https://doi.org/10.1038/nature01413>
- Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D, et al (2016) Cancers Related to Immunodeficiencies: Update and Perspectives. *Front Immunol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00365>
- Mouly E, Chemin K, Nguyen HV, et al (2010) The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells. *J Exp Med* 207:2113–2125. <https://doi.org/10.1084/jem.20092153>
- Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, et al (2002) The integrin $\alpha\beta8$ mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- β 1. *J Cell Biol* 157:493–507. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109100>
- Mueller BU, Pizzo PA (1995) Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies. *J Pediatr* 126:1–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(95\)70491-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(95)70491-4)
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, et al (1999) The integrin $\alpha v \beta 6$ binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96:319–328
- Murphy-Ullrich JE, Poczatek M (2000) Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:59–69
- Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Höök M (1992) Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell* 3:181–188. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.2.181>
- Nair VS, Oh KI (2014) Down-regulation of Tet2 prevents TSDR demethylation in IL2 deficient regulatory T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 450:918–924. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.110>
- Nakagawa H, Sido JM, Reyes EE, et al (2016) Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci* 113:6248–6253. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604765113>
- Nakamura K, Kitani A, Strober W (2001) Cell Contact-Dependent Immunosuppression by $Cd4^+ Cd25^+$ Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-Bound Transforming Growth Factor β . *J Exp Med* 194:629–644. <https://doi.org/10.1084/jem.194.5.629>
- Nam J-S, Terabe M, Mamura M, et al (2008) An Anti-Transforming Growth Factor Antibody Suppresses Metastasis via Cooperative Effects on Multiple Cell Compartments. *Cancer Res* 68:3835–3843. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0215>
- Neeft M, Wieffer M, de Jong AS, et al (2005) Munc13-4 Is an Effector of Rab27a and Controls Secretion of Lysosomes in Hematopoietic Cells. *Mol Biol Cell* 16:731–741. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-10-0923>
- Neel J-C, Humbert L, Lebrun J-J (2012) The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Mol Biol* 2012:1–28. <https://doi.org/10.5402/2012/381428>

- Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, et al (2001) Human CD4⁺ CD25⁺ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98:2736–2744. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.9.2736>
- Nishikawa H, Sakaguchi S (2014) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.12.005>
- Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, et al (1997) A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 94:6216–6221. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6216>
- Noy R, Pollard JW (2014) Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 41:49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- Oh H, Grinberg-Bleyer Y, Liao W, et al (2017) An NF- κ B Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* 47:450–465.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.010>
- Oh-Hora M, Komatsu N, Pishyareh M, et al (2013) Agonist-selected T cell development requires strong T cell receptor signaling and store-operated calcium entry. *Immunity* 38:881–895. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.008>
- Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, et al (2012) T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 37:785–799. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.010>
- Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S (2013) Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38:414–423. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.002>
- Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, et al (1999) Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59:3128–3133
- Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, et al (2007) Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446:685–689. <https://doi.org/10.1038/nature05673>
- Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LF (1989) Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 158:817–823
- Ortaldo JR (2006) Regulation of ITAM-positive receptors: role of IL-12 and IL-18. *Blood* 107:1468–1475. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1579>
- Östman S, Rask C, Wold AE, et al (2006) Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *Eur J Immunol* 36:2336–2346. <https://doi.org/10.1002/eji.200535244>
- Ouyang W, Beckett O, Ma Q, et al (2010a) Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 11:618–627. <https://doi.org/10.1038/ni.1884>
- Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO (2010b) Transforming Growth Factor- β Signaling Curbs Thymic Negative Selection Promoting Regulatory T Cell Development. *Immunity* 32:642–653. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.012>
- Ouyang W, Liao W, Luo CT, et al (2012) Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* 491:554–559. <https://doi.org/10.1038/nature11581>

- Ouyang X, Zhang R, Yang J, et al (2011) Transcription factor IRF8 directs a silencing programme for TH17 cell differentiation. *Nat Commun* 2:314. <https://doi.org/10.1038/ncomms1311>
- Overacre-Delgoffe AE, Chikina M, Dadey RE, et al (2017) Interferon- γ Drives T reg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* 169:1130-1141.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.005>
- Overwijk WW, Restifo NP (2001) B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. In: Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, et al. (eds) *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p im2001s39
- Païdassi H, Acharya M, Zhang A, et al (2011) Preferential expression of integrin $\alpha\beta 8$ promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103+ dendritic cells. *Gastroenterology* 141:1813–1820. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.076>
- Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, et al (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 12:870–878. <https://doi.org/10.1038/ni.2077>
- Pan F, Yu H, Dang EV, et al (2009) Eos Mediates Foxp3-Dependent Gene Silencing in CD4+ Regulatory T Cells. *Science* 325:1142–1146. <https://doi.org/10.1126/science.1176077>
- Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, et al (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8:1353–1362. <https://doi.org/10.1038/ni1536>
- Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Park HJ, Kusnadi A, Lee E-J, et al (2012) Tumor-infiltrating regulatory T cells delineated by upregulation of PD-1 and inhibitory receptors. *Cell Immunol* 278:76–83. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.07.001>
- Park SS, Dong H, Liu X, et al (2015) PD-1 Restrains Radiotherapy-Induced Abscopal Effect. *Cancer Immunol Res* 3:610–619. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0138>
- Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al (2005) CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol* 25:9543–9553. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005>
- Paul S, Kulkarni N, Shilpi, Lal G (2016) Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells. *Oncol Immunology* 5:e1235106. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1235106>
- Peng SL (2008) Foxo in the immune system. *Oncogene* 27:2337–2344. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.26>
- Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, et al (2018) Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci* 115:E4041–E4050. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720948115>
- Perdigoto AL, Chatenoud L, Bluestone JA, Herold KC (2016) Inducing and Administering Tregs to Treat Human Disease. *Front Immunol* 6:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00654>

- Plitas G, Konopacki C, Wu K, et al (2016) Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity* 45:1122–1134. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.032>
- Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al (2008) DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 38:1654–1663. <https://doi.org/10.1002/eji.200838105>
- Polansky JK, Schreiber L, Thelemann C, et al (2010) Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *J Mol Med Berl Ger* 88:1029–1040. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0642-1>
- Powrie F, Mason D (1990) OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med* 172:1701–1708. <https://doi.org/10.1084/jem.172.6.1701>
- Prajapati K, Perez C, Rojas LBP, et al (2018) Functions of NKG2D in CD8+ T cells: an opportunity for immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 15:470–479. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.161>
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, et al (1995) Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 11:409–414. <https://doi.org/10.1038/ng1295-409>
- Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, et al (2008) Limited tumor infiltration by activated T effector cells restricts the therapeutic activity of regulatory T cell depletion against established melanoma. *J Exp Med* 205:2125–2138. <https://doi.org/10.1084/jem.20080099>
- Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al (2011) Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science* 332:600–603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>
- Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, et al (2006) Regulated Compartmentalization of Programmed Cell Death-1 Discriminates CD4⁺ CD25⁺ Resting Regulatory T Cells from Activated T Cells. *J Immunol* 176:2808–2816. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.2808>
- Ranges GE (1987) Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 166:991–998. <https://doi.org/10.1084/jem.166.4.991>
- Rauch KS, Hils M, Lupar E, et al (2016) Id3 Maintains Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by Controlling a Transcriptional Network of E47, Spi-B, and SOCS3. *Cell Rep* 17:2827–2836. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.045>
- Read S, Greenwald R, Izcue A, et al (2006) Blockade of CTLA-4 on CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Abrogates Their Function In Vivo. *J Immunol* 177:4376–4383. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4376>
- Read S, Malmström V, Powrie F (2000) Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25⁺ Cd4⁺ Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation. *J Exp Med* 192:295–302. <https://doi.org/10.1084/jem.192.2.295>
- Redjimi N, Raffin C, Raimbaud I, et al (2012) CXCR3+ T Regulatory Cells Selectively Accumulate in Human Ovarian Carcinomas to Limit Type I Immunity. *Cancer Res* 72:4351–4360. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0579>

- Redpath SA, van der Werf N, Cervera AM, et al (2013) ICOS controls Foxp3⁺ regulatory T-cell expansion, maintenance and IL-10 production during helminth infection: Immunity to infection. *Eur J Immunol* 43:705–715. <https://doi.org/10.1002/eji.201242794>
- Reed NI, Jo H, Chen C, et al (2015) The $\alpha_v\beta_1$ integrin plays a critical in vivo role in tissue fibrosis. *Sci Transl Med* 7:288ra79-288ra79. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa5094>
- Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9:1831–1845. <https://doi.org/10.1101/gad.9.15.1831>
- Ribeiro SMF, Poczatek M, Schultz-Cherry S, et al (1999a) The Activation Sequence of Thrombospondin-1 Interacts with the Latency-associated Peptide to Regulate Activation of Latent Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem* 274:13586–13593. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13586>
- Ribeiro SMF, Poczatek M, Schultz-cherry S, et al (1999b) The Activation Sequence of Thrombospondin-1 Interacts with the Latency-associated Peptide to Regulate Activation of Latent Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem* 274:13586–13593. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13586>
- Ribot J, Enault G, Pilipenko S, et al (2007) Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J Immunol Baltim Md* 1950 179:6741–6748. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6741>
- Ribot J, Romagnoli P, van Meerwijk JPM (2006) Agonist Ligands Expressed by Thymic Epithelium Enhance Positive Selection of Regulatory T Lymphocytes from Precursors with a Normally Diverse TCR Repertoire. *J Immunol* 177:1101–1107. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1101>
- Rieder SA, Metidji A, Glass DD, et al (2015) Eos Is Redundant for Regulatory T Cell Function but Plays an Important Role in IL-2 and Th17 Production by CD4⁺ Conventional T Cells. *J Immunol* 195:553–563. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500627>
- Rifkin DB (2005) Latent Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Binding Proteins: Orchestrators of TGF- β Availability. *J Biol Chem* 280:7409–7412. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400029200>
- Rissiek B, Haag F, Boyer O, et al (2015) P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol* 6:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00204>
- Ronchetti S (2002) Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 100:350–352. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0276>
- Round JL, Mazmanian SK (2010) Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci* 107:12204–12209. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
- Ruan Q, Kameswaran V, Tone Y, et al (2009) Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* 31:932–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.006>
- Saharinen J, Keski-Oja J (2000) Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell* 11:2691–2704. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.8.2691>

- Sainz-Perez A, Lim A, Lemercier B, Leclerc C (2012) The T-cell Receptor Repertoire of Tumor-Infiltrating Regulatory T Lymphocytes Is Skewed Toward Public Sequences. *Cancer Res* 72:3557–3569. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0277>
- Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345–352. <https://doi.org/10.1038/ni1178>
- Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T (1985) Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161:72–87. <https://doi.org/10.1084/jem.161.1.72>
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md* 1950 155:1151–1164
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133:775–787. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>
- Sakuishi K, Ngiow SF, Sullivan JM, et al (2013) TIM3+FOXP3+ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology* 2:e23849. <https://doi.org/10.4161/onci.23849>
- Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, et al (2019) PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy: SALMANINEJAD ET AL. *J Cell Physiol* 234:16824–16837. <https://doi.org/10.1002/jcp.28358>
- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al (2000) B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431–440
- Samid MAA, Chaudhary B, Khaled YS, et al (2016) Combining FoxP3 and Helios with GARP/LAP markers can identify expanded Treg subsets in cancer patients. *Oncotarget* 7:. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7334>
- Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, et al (2012) Extrathymic Generation of Regulatory T Cells in Placental Mammals Mitigates Maternal-Fetal Conflict. *Cell* 150:29–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.031>
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, et al (1997) TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Dev Camb Engl* 124:2659–2670
- Santagata S, Napolitano M, D'Alterio C, et al (2017) Targeting CXCR4 reverts the suppressive activity of T-regulatory cells in renal cancer. *Oncotarget* 8:. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20363>
- Sarris M, Andersen KG, Randow F, et al (2008) Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity* 28:402–413. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.012>

- Sasidharan Nair V, Song MH, Oh KI (2016) Vitamin C Facilitates Demethylation of the Foxp3 Enhancer in a Tet-Dependent Manner. *J Immunol Baltim Md 1950* 196:2119–2131. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502352>
- Sato Y (1989) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 109:309–315. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.1.309>
- Sauer S, Bruno L, Hertweck A, et al (2008) T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci* 105:7797–7802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800928105>
- Sawant DV, Yano H, Chikina M, et al (2019) Adaptive plasticity of IL-10+ and IL-35+ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nat Immunol* 20:724–735. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0346-9>
- Scharschmidt TC, Vasquez KS, Pauli ML, et al (2017) Commensal Microbes and Hair Follicle Morphogenesis Coordinately Drive Treg Migration into Neonatal Skin. *Cell Host Microbe* 21:467-477.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.001>
- Scharschmidt TC, Vasquez KS, Truong H-A, et al (2015) A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity* 43:1011–1021. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.016>
- Schliesser U, Chopra M, Beilhack A, et al (2013) Generation of highly effective and stable murine alloreactive Treg cells by combined anti-CD4 mAb, TGF- β , and RA treatment: Immunomodulation. *Eur J Immunol* 43:3291–3305. <https://doi.org/10.1002/eji.201243292>
- Schmitt EG, Haribhai D, Williams JB, et al (2012) IL-10 produced by induced regulatory T cells (iTregs) controls colitis and pathogenic ex-iTregs during immunotherapy. *J Immunol Baltim Md 1950* 189:5638–5648. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200936>
- Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, et al (1995) Regulation of Transforming Growth Factor- β Activation by Discrete Sequences of Thrombospondin 1. *J Biol Chem* 270:7304–7310. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7304>
- Scurr M, Ladell K, Besneux M, et al (2014) Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP+ Foxp3– T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3+ regulatory T cells. *Mucosal Immunol* 7:428–439. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.62>
- Sebastian M, Lopez-Ocasio M, Metidji A, et al (2016) Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *J Immunol* 196:144–155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501704>
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693–1700. <https://doi.org/10.1084/jem.20060468>
- Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, et al (2011) The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat Commun* 2:269. <https://doi.org/10.1038/ncomms1272>
- Semple K, Nguyen A, Yu Y, et al (2011) Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood* 117:3096–3103. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301275>

- Serrels A, Lund T, Serrels B, et al (2015) Nuclear FAK Controls Chemokine Transcription, Tregs, and Evasion of Anti-tumor Immunity. *Cell* 163:160–173.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.001>
- Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S (2005) Homeostatic maintenance of natural *Foxp3*⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201:723–735. <https://doi.org/10.1084/jem.20041982>
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107–1111.
<https://doi.org/10.1038/35074122>
- Sharma A, Rudra D (2018) Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis. *Front Immunol* 9:883. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00883>
- Shen DT, Ma JSY, Mather J, et al (2006) Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4⁺ and CD8⁺ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8⁺ T cells. *J Leukoc Biol* 80:827–837.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0603298>
- Shi M, Zhu J, Wang R, et al (2011) Latent TGF- β structure and activation. *Nature* 474:343–349.
<https://doi.org/10.1038/nature10152>
- Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685–700
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al (2002) Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through G_ITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135–142.
<https://doi.org/10.1038/ni759>
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693–699.
<https://doi.org/10.1038/359693a0>
- Siegel PM, Massagué J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3:807–820. <https://doi.org/10.1038/nrc1208>
- Simonetta F, Chiali A, Cordier C, et al (2010) Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 40:2528–2538. <https://doi.org/10.1002/eji.201040531>
- Soroosh P, Doherty TA, Duan W, et al (2013) Lung-resident tissue macrophages generate *Foxp3*⁺ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med* 210:775–788.
<https://doi.org/10.1084/jem.20121849>
- Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, et al (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol Baltim Md* 159:4772–4780
- Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM (2001) The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges. *Immunity* 15:751–761.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00234-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00234-5)
- Stinchcombe JC, Griffiths GM (2007) Secretory Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:495–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123521>

- Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S (2009) Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF- β on the surface of activated human Treg: Cellular immune response. *Eur J Immunol* 39:3315–3322. <https://doi.org/10.1002/eji.200939684>
- Stockis J, Liénart S, Colau D, et al (2017) Blocking immunosuppression by human Tregs in vivo with antibodies targeting integrin α V β 8. *Proc Natl Acad Sci* 114:E10161–E10168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710680114>
- Strauss L, Bergmann C, Szczepanski MJ, et al (2008) Expression of ICOS on Human Melanoma-Infiltrating CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ T Regulatory Cells: Implications and Impact on Tumor-Mediated Immune Suppression. *J Immunol* 180:2967–2980. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2967>
- Su S, Liao J, Liu J, et al (2017) Blocking the recruitment of naive CD4⁺ T cells reverses immunosuppression in breast cancer. *Cell Res* 27:461–482. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.34>
- Sugimoto K, Kudo M, Sundaram A, et al (2012) The α V β 6 integrin modulates airway hyperresponsiveness in mice by regulating intraepithelial mast cells. *J Clin Invest* 122:748–758. <https://doi.org/10.1172/JCI58815>
- Sun C-M, Hall JA, Blank RB, et al (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204:1775–1785. <https://doi.org/10.1084/jem.20070602>
- Sun W, Wei F-Q, Li W-J, et al (2017) A positive-feedback loop between tumour infiltrating activated Treg cells and type 2-skewed macrophages is essential for progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 117:1631–1643. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.329>
- Surh CD, Sprent J (1994) T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100–103. <https://doi.org/10.1038/372100a0>
- Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, et al (2006) Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 203:505–511. <https://doi.org/10.1084/jem.20050783>
- Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A (2005) CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6:152–162. <https://doi.org/10.1038/ni1160>
- Taipale J (1994) Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol* 124:171–181. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.1.171>
- Takahama Y, Letterio JJ, Suzuki H, et al (1994) Early progression of thymocytes along the CD4/CD8 developmental pathway is regulated by a subset of thymic epithelial cells expressing transforming growth factor beta. *J Exp Med* 179:1495–1506. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1495>
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al (2000) Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25⁺ Cd4⁺ Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J Exp Med* 192:303–310. <https://doi.org/10.1084/jem.192.2.303>

- Takasaka N, Seed RI, Cormier A, et al (2018) Integrin $\alpha\beta 8$ -expressing tumor cells evade host immunity by regulating TGF- β activation in immune cells. *JCI Insight* 3:e122591. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122591>
- Tan MCB, Goedegebuure PS, Belt BA, et al (2009) Disruption of CCR5-Dependent Homing of Regulatory T Cells Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer. *J Immunol* 182:1746–1755. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1746>
- Tanaka A, Sakaguchi S (2017) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res* 27:109–118. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>
- Teicher BA (2007) Transforming Growth Factor- and the Immune Response to Malignant Disease. *Clin Cancer Res* 13:6247–6251. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1654>
- Thiault N, Darrigues J, Adoue V, et al (2015) Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat Immunol* 16:628–634. <https://doi.org/10.1038/ni.3150>
- Thomas DA, Massagué J (2005) TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8:369–380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>
- Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al (2010) Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J Immunol* 184:3433–3441. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904028>
- Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4⁺ CD25⁺ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp Med* 188:287–296. <https://doi.org/10.1084/jem.188.2.287>
- Tischner D, Gaggi I, Peschel I, et al (2012) Defective cell death signalling along the Bcl-2 regulated apoptosis pathway compromises Treg cell development and limits their functionality in mice. *J Autoimmun* 38:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.12.008>
- Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H (2019) Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 16:356–371. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0175-7>
- Toker A, Engelbert D, Garg G, et al (2013) Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J Immunol Baltim Md* 1950 190:3180–3188. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203473>
- Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, et al (2008) Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9:194–202. <https://doi.org/10.1038/ni1549>
- Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM (2016) Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16:275–287. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36>
- Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, et al (2002) A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3:477–482. <https://doi.org/10.1038/ni789>
- Tran DQ, Andersson J, Hardwick D, et al (2009a) Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T

- cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113:5125–5133. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199950>
- Tran DQ, Andersson J, Wang R, et al (2009b) GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci* 106:13445–13450. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901944106>
- Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM (2007) Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor- dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 110:2983–2990. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094656>
- Travis, M. A. & Sheppard D (2014) NIH Public Access. *Annu Rev Immunol* 32:51–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257.TGF->
- Travis MA, Reizis B, Melton AC, et al (2007) Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449:361–365. <https://doi.org/10.1038/nature06110>
- Travis MA, Sheppard D (2014) TGF-β Activation and Function in Immunity. *Annu Rev Immunol* 32:51–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>
- Tsuji-Takayama K, Suzuki M, Yamamoto M, et al (2008) The Production of IL-10 by Human Regulatory T Cells Is Enhanced by IL-2 through a STAT5-Responsive Intronic Enhancer in the *IL-10* Locus. *J Immunol* 181:3897–3905. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3897>
- Turnis ME, Sawant DV, Szymczak-Workman AL, et al (2016) Interleukin-35 Limits Anti-Tumor Immunity. *Immunity* 44:316–329. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.013>
- van Loosdregt J, Vercoulen Y, Guichelaar T, et al (2010) Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization. *Blood* 115:965–974. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-207118>
- van Mierlo GJD, Scherer HU, Hameetman M, et al (2008) Cutting Edge: TNFR-Shedding by CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Inhibits the Induction of Inflammatory Mediators. *J Immunol* 180:2747–2751. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2747>
- van Santen H-M, Benoist C, Mathis D (2004) Number of T Reg Cells That Differentiate Does Not Increase upon Encounter of Agonist Ligand on Thymic Epithelial Cells. *J Exp Med* 200:1221–1230. <https://doi.org/10.1084/jem.20041022>
- Vandenbon A, Dinh VH, Mikami N, et al (2016) Immuno-Navigator, a batch-corrected coexpression database, reveals cell type-specific gene networks in the immune system. *Proc Natl Acad Sci* 113:E2393–E2402. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604351113>
- Vang KB, Yang J, Mahmud SA, et al (2008) IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol Baltim Md* 1950 181:3285–3290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3285>
- Velasco-Loyden G, Arribas J, López-Casillas F (2004) The Shedding of Betaglycan Is Regulated by Pervanadate and Mediated by Membrane Type Matrix Metalloprotease-1. *J Biol Chem* 279:7721–7733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306499200>

- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al (2006) TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* 24:179–189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.001>
- Vial T, Descotes J (2003) Immunosuppressive drugs and cancer. *Toxicology* 185:229–240
- Viel S, Marçais A, Guimaraes FS-F, et al (2016) TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal* 9:ra19–ra19. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad1884>
- Visekruna A, Huber M, Hellhund A, et al (2010) c-Rel is crucial for the induction of Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells but not T_H 17 cells. *Eur J Immunol* 40:671–676. <https://doi.org/10.1002/eji.200940260>
- Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, et al (2010) Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 126:280-289.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.05.022>
- Vodovotz Y, Bogdan C (1994) Control of nitric oxide synthase expression by transforming growth factor-beta: implications for homeostasis. *Prog Growth Factor Res* 5:341–351
- Volpe E, Sambucci M, Battistini L, Borsellino G (2016) Fas–Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00382>
- Waight JD, Takai S, Marelli B, et al (2015) Cutting Edge: Epigenetic Regulation of *Foxp3* Defines a Stable Population of CD4⁺ Regulatory T Cells in Tumors from Mice and Humans. *J Immunol* 194:878–882. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402725>
- Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, et al (1990) Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J Clin Invest* 86:1976–1984. <https://doi.org/10.1172/JCI114932>
- Waldmann TA (1989) The Multi-Subunit Interleukin-2 Receptor. *Annu Rev Biochem* 58:875–905. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.004303>
- Walker LSK, Sansom DM (2011) The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 11:852–863. <https://doi.org/10.1038/nri3108>
- Wan M, Cao X, Wu Y, et al (2002) Jab1 antagonizes TGF- signaling by inducing Smad4 degradation. *EMBO Rep* 3:171–176. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf024>
- Wan M, Tang Y, Tytler EM, et al (2004) Smad4 Protein Stability Is Regulated by Ubiquitin Ligase SCF ^{β -TRCP1}. *J Biol Chem* 279:14484–14487. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400005200>
- Wan YY, Flavell RA (2007) Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766–770. <https://doi.org/10.1038/nature05479>
- Wang B, Dolinski BM, Kikuchi N, et al (2007) Role of $\alpha\beta$ 6 integrin in acute biliary fibrosis. *Hepatology* 46:1404–1412. <https://doi.org/10.1002/hep.21849>
- Wang D, Yang L, Yu W, et al (2019) Colorectal cancer cell-derived CCL20 recruits regulatory T cells to promote chemoresistance via FOXO1/CEBPB/NF- κ B signaling. *J Immunother Cancer* 7:215. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0701-2>

- Wang L, Liu Y, Han R, et al (2013) Mbd2 promotes foxp3 demethylation and T-regulatory-cell function. *Mol Cell Biol* 33:4106–4115. <https://doi.org/10.1128/MCB.00144-13>
- Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, et al (2008a) Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci* 105:9331–9336. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710441105>
- Wang R, Kozhaya L, Mercer F, et al (2009) Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci* 106:13439–13444. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901965106>
- Wang R, Wan Q, Kozhaya L, et al (2008b) Identification of a Regulatory T Cell Specific Cell Surface Molecule that Mediates Suppressive Signals and Induces Foxp3 Expression. *PLoS ONE* 3:e2705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002705>
- Wang R, Zhu J, Dong X, et al (2012) GARP regulates the bioavailability and activation of TGF β . *Mol Biol Cell* 23:1129–1139. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-12-1018>
- Wang S-D, Li H-Y, Li B-H, et al (2016) The role of CTLA-4 and PD-1 in anti-tumor immune response and their potential efficacy against osteosarcoma. *Int Immunopharmacol* 38:81–89. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.05.016>
- Wang X, Lang M, Zhao T, et al (2017) Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3+Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 36:3048–3058. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.458>
- Ward ST, Li KK, Hepburn E, et al (2015) The effects of CCR5 inhibition on regulatory T-cell recruitment to colorectal cancer. *Br J Cancer* 112:319–328. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.572>
- Weber R, Fleming V, Hu X, et al (2018) Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol* 9:1310. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01310>
- Wei T, Zhang J, Qin Y, et al (2015) Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients. *Am J Cancer Res* 5:2190–2201
- Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, et al (2012) Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* 209:1723–1742, S1. <https://doi.org/10.1084/jem.20120914>
- Welsh RM (2009) Blimp Hovers over T Cell Immunity. *Immunity* 31:178–180. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.005>
- Wieczorek G, Asemissen A, Model F, et al (2009) Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* 69:599–608. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2361>
- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, et al (2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18–20. <https://doi.org/10.1038/83707>
- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al (2008) CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* 322:271–275. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>

- Wipff P-J, Rifkin DB, Meister J-J, Hinz B (2007) Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 179:1311–1323. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704042>
- Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, et al (2011) Regulation of the Germinal Center Reaction by Foxp3⁺ Follicular Regulatory T Cells. *J Immunol* 187:4553–4560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101328>
- Wong JL, Muthuswamy R, Bartlett DL, Kalinski P (2013) IL-18-based combinatorial adjuvants promote the intranodal production of CCL19 by NK cells and dendritic cells of cancer patients. *Oncol Immunology* 2:e26245. <https://doi.org/10.4161/onci.26245>
- Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, et al (2002) Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur J Immunol* 32:2255–2263. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200208\)32:8<2255::AID-IMMU2255>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200208)32:8<2255::AID-IMMU2255>3.0.CO;2-A)
- Worthington JJ, Czajkowska BI, Melton AC, Travis MA (2011) Intestinal Dendritic Cells Specialize to Activate Transforming Growth Factor-β and Induce Foxp3⁺ Regulatory T Cells via Integrin αβ8. *Gastroenterology* 141:1802–1812. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.057>
- Worthington JJ, Kelly A, Smedley C, et al (2015) Integrin αβ8-Mediated TGF-β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 42:903–915. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.012>
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, et al (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341–347. <https://doi.org/10.1038/370341a0>
- Wu M-H, Chen Y-L, Lee K-H, et al (2017) Glycosylation-dependent galectin-1/neuropilin-1 interactions promote liver fibrosis through activation of TGF-β- and PDGF-like signals in hepatic stellate cells. *Sci Rep* 7:11006. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11212-1>
- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, et al (2006) FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* 126:375–387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.042>
- Würfel FM, Winterhalter C, Trenkwalder P, et al (2019) European Patent in Immunoncology: From Immunological Principles of Implantation to Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* 20:1830. <https://doi.org/10.3390/ijms20081830>
- Xiao Y, Li B, Zhou Z, et al (2010) Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function. *Curr Opin Immunol* 22:583–591. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.013>
- Xiao YQ, Freire-de-Lima CG, Schiemann WP, et al (2008) Transcriptional and Translational Regulation of TGF-β Production in Response to Apoptotic Cells. *J Immunol* 181:3575–3585. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3575>
- Xiong Y, Khanna S, Grzenda AL, et al (2012) Polycomb antagonizes p300/CREB-binding protein-associated factor to silence FOXP3 in a Kruppel-like factor-dependent manner. *J Biol Chem* 287:34372–34385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325332>
- Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W (2007) Cutting Edge: Regulatory T Cells Induce CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ T Cells or Are Self-Induced to Become Th17 Cells in the Absence of Exogenous TGF-β. *J Immunol* 178:6725–6729. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6725>

- Xu L, Kitani A, Stuelten C, et al (2010) Positive and Negative Transcriptional Regulation of the Foxp3 Gene is Mediated by Access and Binding of the Smad3 Protein to Enhancer I. *Immunity* 33:313–325. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.001>
- Yadav M, Louvet C, Davini D, et al (2012) Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 209:1713–1722. <https://doi.org/10.1084/jem.20120822>
- Yagi K, Furuhashi M, Aoki H, et al (2002) *c-myc* Is a Downstream Target of the Smad Pathway. *J Biol Chem* 277:854–861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104170200>
- Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K (1997) Contrasting Effects of TGF β 1 and TNF α on the Development of Dendritic Cells from Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Stem Cells* 15:144–153. <https://doi.org/10.1002/stem.150144>
- Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, et al (2002) Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J Immunol* 169:5538–5545. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5538>
- Yan M, Jene N, Byrne D, et al (2011) Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. *Breast Cancer Res* 13:R47. <https://doi.org/10.1186/bcr2869>
- Yang E, Zou T, Leichner TM, et al (2014) Both retention and recirculation contribute to long-lived regulatory T-cell accumulation in the thymus: Immunomodulation. *Eur J Immunol* 44:2712–2720. <https://doi.org/10.1002/eji.201444529>
- Yang R, Qu C, Zhou Y, et al (2015) Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis. *Immunity* 43:251–263. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.017>
- Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, et al (2008) Molecular Antagonism and Plasticity of Regulatory and Inflammatory T Cell Programs. *Immunity* 29:44–56. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.007>
- Yang Z, Mu Z, Dabovic B, et al (2007) Absence of integrin-mediated TGF β 1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGF β 1-null mice. *J Cell Biol* 176:787–793. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611044>
- Yanguas A, Garasa S, Teijeira Á, et al (2018) ICAM-1-LFA-1 Dependent CD8⁺ T-Lymphocyte Aggregation in Tumor Tissue Prevents Recirculation to Draining Lymph Nodes. *Front Immunol* 9:2084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02084>
- Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, et al (2007) Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109:4368–4375. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-055756>
- Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, et al (2010) Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. *Immunity* 33:326–339. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.006>
- Yoo S, Ha S-J (2016) Generation of Tolerogenic Dendritic Cells and Their Therapeutic Applications. *Immune Netw* 16:52. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.1.52>

- Yoshida Y, Yoshimi R, Yoshii H, et al (2014) The transcription factor IRF8 activates integrin-mediated TGF- β signaling and promotes neuroinflammation. *Immunity* 40:187–198. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.022>
- Yu A, Snowwhite I, Vendrame F, et al (2015) Selective IL-2 Responsiveness of Regulatory T Cells Through Multiple Intrinsic Mechanisms Supports the Use of Low-Dose IL-2 Therapy in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 64:2172–2183. <https://doi.org/10.2337/db14-1322>
- Yu N, Li X, Song W, et al (2012) CD4+CD25+CD127low/- T Cells: A More Specific Treg Population in Human Peripheral Blood. *Inflammation* 35:1773–1780. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9496-8>
- Yu Q, Stamenkovic I (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14:163–176
- Yu X, Harden K, C Gonzalez L, et al (2009) The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 10:48–57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>
- Yue X, Trifari S, Äijö T, et al (2016) Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *J Exp Med* 213:377–397. <https://doi.org/10.1084/jem.20151438>
- Zhang C, Qi Y, Li X, et al (2015) The role of CCL20/CCR6 axis in recruiting Treg cells to tumor sites of NSCLC patients. *Biomed Pharmacother* 69:242–248. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.12.008>
- Zhang R, Huynh A, Whitcher G, et al (2013) An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *J Clin Invest* JCI65013. <https://doi.org/10.1172/JCI65013>
- Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, et al (2001) Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci* 98:974–979. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.974>
- Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res* 19:128–139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
- Zhao D-M (2006) Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107:3925–3932. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4502>
- Zheng SG, Wang JH, Stohl W, et al (2006) TGF- Requires CTLA-4 Early after T Cell Activation to Induce FoxP3 and Generate Adaptive CD4+CD25+ Regulatory Cells. *J Immunol* 176:3321–3329. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3321>
- Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, et al (2009) Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature* 458:351–356. <https://doi.org/10.1038/nature07674>
- Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, et al (2010) Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463:808–812. <https://doi.org/10.1038/nature08750>
- Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, et al (2007) Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936–940. <https://doi.org/10.1038/nature05563>

- Zhou G (2006) Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood* 107:628–636. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2737>
- Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, et al (2009) Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10:1000–1007. <https://doi.org/10.1038/ni.1774>
- Zhou Z, Apte SS, Soininen R, et al (2000) Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci* 97:4052–4057. <https://doi.org/10.1073/pnas.060037197>
- Zhu C, Anderson AC, Kuchroo VK (2010) TIM-3 and Its Regulatory Role in Immune Responses. In: Ahmed R, Honjo T (eds) *Negative Co-Receptors and Ligands*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–15
- Zhu J, Motejlek K, Wang D, et al (2002) beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Dev Camb Engl* 129:2891–2903
- Zhu L, Kong Y, Zhang J, et al (2017) Blimp-1 impairs T cell function via upregulation of TIGIT and PD-1 in patients with acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 10:124. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0486-z>
- Zhuo C, Li Z, Xu Y, et al (2014) Higher FOXP3-TSDR demethylation rates in adjacent normal tissues in patients with colon cancer were associated with worse survival. *Mol Cancer* 13:153. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-153>
- Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al (2006) IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108:1571–1579. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004747>

RÉSUMÉ

Afin de se maintenir dans l'organisme et d'échapper au système immunitaire, les tumeurs solides emploient diverses stratégies. Un des mécanismes les plus puissants est la production de la cytokine Transforming Growth Factor Beta (TGF- β). Cependant, cette cytokine est sécrétée dans le micro-environnement tumoral sous sa forme inactive, incapable de se lier à son récepteur et donc d'exercer ses fonctions hautement immunosuppressives. Mes travaux de thèse démontrent qu'une population de lymphocytes T (LT) CD4⁺ dite T régulateurs (Tregs), qui exprime le facteur de transcription Forkhead box P3 (Foxp3), est responsable de l'activation du TGF- β au sein de la tumeur. Nos travaux démontrent que parmi les cellules du système immunitaire, les Tregs constituent la principale population exprimant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ (Itg β8), protéine responsable de l'activation du TGF- β . L'absence de l'Itg β8 spécifiquement à la surface des Tregs entraîne une forte diminution de la croissance tumorale. L'activation de la signalisation du TGF- β est ainsi réduite dans les LT CD8⁺ qui infiltrent la tumeur, conduisant à une exacerbation de leurs fonctions cytotoxiques et donc à une élimination efficace des cellules tumorales. La pertinence de ces données obtenues chez la souris a été confirmée chez l'Homme à la fois par des approches *ex vivo* sur des tumeurs fraîches ainsi que par l'analyse de données de single-cell RNA-seq de tumeurs et des études biostatistiques de cohortes de patients. Nous proposons donc que les Tregs et les cellules tumorales travaillent de concert pour fournir au micro-environnement tumoral une source bioactive de TGF- β capable de réprimer efficacement la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par les LT CD8⁺ et donc de permettre à la tumeur d'être maintenue.

Mots-clés: TGF- β , Tregs, Itg β8 , LT CD8⁺, cancer.

ABSTRACT

Solid tumors employ diverse strategies to be maintained in the organism and escape the suppression mediated by the immune system. One of the most powerful mechanisms they use is through the production of Transforming Growth Factor Beta (TGF- β). However, this cytokine is secreted within the tumor microenvironment in its inactive form, unable to bind to its receptor and exert its highly immunosuppressive functions. The present PhD work demonstrates that a population of CD4⁺ T lymphocytes called regulatory T cells (Tregs), which express the transcription factor Forkhead box P3 (Foxp3), is responsible for TGF- β activation in tumors. We showed that among the cells of the immune system, Tregs constituted the main population expressing the integrin $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ (Itg β8) which was responsible for TGF- β activation. The absence of Itg β8 specifically on Tregs surface leads to strong decrease of tumor growth. As a result, TGF- β signaling pathway was impaired in tumor infiltrating CD8⁺ T lymphocytes leading to exacerbation of their cytotoxic and efficient elimination of tumor cells. The relevance of these data obtained in mice was confirmed in the human pathology by *ex vivo* approaches using fresh tumors as well as by Single-cell RNA-seq analysis of tumors and biostatistics approaches on patient cohorts. We propose that Tregs and tumor cells cooperate to provide to the tumor microenvironment a bioactive source of TGF- β which is able to efficiently repress the CD8 T-cell anti-tumor response and thus allowing tumors to maintenance.

Keywords: TGF- β , Tregs, Itg β8 , CD8⁺ T lymphocytes, tumor.