



HAL
open science

Étude de l'ontogénie et de la stabilité des lymphocytes T régulateurs et du TNF sur leur fonction suppressive à l'homéostasie et en conditions pathologiques

Morgane Hilaire

► **To cite this version:**

Morgane Hilaire. Étude de l'ontogénie et de la stabilité des lymphocytes T régulateurs et du TNF sur leur fonction suppressive à l'homéostasie et en conditions pathologiques. Immunologie. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT: 2023SORUS572 . tel-04513606

HAL Id: tel-04513606

<https://theses.hal.science/tel-04513606>

Submitted on 20 Mar 2024

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie physiopathologie (ED394)

Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (CIMI)

Immunoregulation and therapies in autoimmunity and cancer (ITAC)

Etude de l'ontogénie et de la stabilité des lymphocytes T régulateurs et du TNF sur leur fonction suppressive à l'homéostasie et en conditions pathologiques

Morgane Hilaire

Thèse de doctorat d'immunologie

Présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2023 devant un jury composé de :

Bertrand BELLIER (*Professeur d'université, Sorbonne Université, i3*) : Président

Magali IRLA (*Directrice de recherche, CIML*) : Rapportrice

Anne DEJEAN (*Chargée de recherche, INFINITY*) : Rapportrice

Bruno LUCAS (*Directeur de recherche, Institut Cochin*) : Examineur

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

Table des matières

Table des matières	3
Remerciement	6
Liste des abréviations	9
RESUME	10
INTRODUCTION	14
I. Lymphocytes T et tolérance immunitaire	15
1. Développement des lymphocytes T	15
2. Tolérance immunitaire	17
2.1 <i>Tolérance centrale</i>	17
2.1.1 <i>Sélection négative</i>	18
2.1.2 <i>Evolution avec l'âge</i>	20
2.2 <i>Tolérance périphérique</i>	21
2.2.1 <i>Mécanismes passifs</i>	21
2.2.2 <i>Mécanismes actifs</i>	23
II. Développement et identité des lymphocytes T régulateurs (Tregs)	24
1. Ontogénie	24
1.1 <i>Différenciation des Tregs dans le thymus</i>	24
1.2 <i>Différenciation des Tregs en périphérie</i>	26
1.3 <i>Evolution avec l'âge</i>	28
2. Identité des Tregs	31
2.1 <i>Foxp3 : régulateur majeur des Tregs</i>	31
2.2 <i>Autres mécanismes de régulation</i>	33
2.3 <i>Rôles et mécanismes d'action de Foxp3</i>	34
2.4 <i>Différence entre la souris et l'Homme</i>	37
3. Stabilité des Tregs.....	38
3.1 <i>Définition</i>	38
3.2 <i>Etude des exTregs in vitro</i>	39
3.3 <i>Etude des exTregs in vivo</i>	40
3.3.1 <i>Principe du modèle CreLox</i>	41
3.3.2 <i>ExTregs étudiés avec le système CreLox ou par transfert adoptif</i>	42
3.3.3 <i>ExTregs étudiés avec le système CreLox inductible</i>	46
III. Fonctions et modes d'actions des Tregs	50
1. Modes d'actions des Tregs	50
1.1 <i>Mécanismes de suppressions</i>	50
1.1.1 <i>Cytokines suppressives</i>	50

1.1.2 Cytolyse	51
1.1.3 Perturbation métabolique	51
1.1.4 Interaction avec les CD	52
1.2 Plasticité	54
2. Tregs tissulaires	58
2.1 Précurseurs	58
2.2 Spécificité tissulaire	60
2.2.1 VAT.....	60
2.2.2 Peau	62
2.2.3 Tube digestif	63
2.2.4 Foie	66
IV. Les Tregs en conditions inflammatoires	68
1. Auto-immunité	68
2. Cancer	69
3. Rôle du TNFR2 et de 4-1BB.....	71
3.1. TNFR2	72
3.2.1 Généralités.....	72
3.1.2 Auto-immunité.....	73
3.1.3 Cancer	74
3.2. 4-1BB	75
3.2.1 Généralités.....	75
3.2.2 Auto-immunité.....	76
3.2.3 Cancer	77
PROJET DE THESE	79
RESULTATS	81
I. Résultats principaux	81
1. Biologie des Tregs.....	81
1.1 Ontogénie	81
1.2 Stabilité.....	117
2. TNFR2 et Cancer	127
II. Résultats supplémentaires	165
1. TNFR2 et VAT-Tregs.....	165
2. 4-1BB dans la biologie des Tregs	168
DISCUSSION.....	170
1. Biologie des Tregs.....	170
1.1 Ontogénie	170
1.2 Stabilité.....	173
2. Rôle du TNFR2 et de 4-1BB dans la biologie des Tregs	181

3. Les modèles CreLox	186
BIBLIOGRAPHIE	191
ANNEXE	212
TNFR2 et EAE	212

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie le Dr. Bertrand Bellier d'avoir accepté le rôle de président. Je remercie également mes deux rapportrices, les Dr. Magali Irla et Anne Dejean, pour leurs retours et leurs remarques sur mon manuscrit de thèse. Je remercie par ailleurs le Dr. Bruno Lucas pour son rôle d'examineur dans ce jury, mais aussi pour ses conseils lors de mes comités de suivi de thèse.

J'aimerais évidemment remercier mon directeur de thèse, le Dr. Benoit Salomon. Il m'a tout d'abord donné ma chance pour mon tout premier stage de M1, alors que je n'avais que peu d'expérience et de connaissances sur les Tregs. Il m'a ensuite donné l'opportunité de poursuivre cette aventure en M2 puis en thèse. Merci pour tout ce qu'il m'a appris au cours de ces années, pour sa patience et surtout la rigueur scientifique qu'il m'a inculquée. Merci pour sa confiance qui a grandement participé à ce que je puisse développer mon autonomie. Je le remercie enfin pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit.

La place suivante dans ces remerciements revient au Dr. Émilie Ronin, qui a eu un énorme impact sur mes choix et donc sur cette thèse. Émilie a été mon encadrante lors de mon stage de M1 chez Benoit, c'est avec elle que j'ai découvert le monde de la recherche fondamentale. Au-delà de sa patience et de sa pédagogie, Émilie est une personne humainement incroyable. Elle m'a non seulement donné le goût de la recherche, mais m'a également donné confiance en moi et en mes capacités à poursuivre en thèse. Je pense sincèrement que si je ne l'avais pas rencontrée, la suite de mon parcours n'aurait pas été la même.

Je remercie les membres de mon équipe qui ont participé de près ou de loin à mes projets de thèse, notamment Aris et le Dr Odile Devergne. Je remercie par ailleurs le Dr. David Gross pour sa bienveillance et ses remarques constructives lors de nos réunions. Durant ma thèse, j'ai eu la chance d'avoir d'incroyables stagiaires, je pense spécialement à Kimberley, merci pour sa bonne humeur et son énergie. Bien qu'elle ait essayé de m'apprendre à faire des pompes dans l'open space, je pense que j'en suis toujours incapable. Un grand merci à Léonie qui a d'abord fait son stage d'ingénieur chez nous et qui est ensuite restée quelques mois supplémentaires en tant qu'ingénieure. Léonie a été notre rayon de soleil pendant ces quelques mois, toujours de bonne humeur, toujours volontaire. Elle a grandement participé à faire avancer mes projets de thèse. Elle a rapidement gagné en autonomie et m'a soulagé d'une charge de travail immense pour que je puisse rédiger ce manuscrit. Je remercie également les anciens membres de mon équipe, Jordane, Pukar, Nicolas et Salomé, qui ont à tour de

rôle joué le rôle d'encadrant lors de mon stage de M2 puis lors de ma thèse. Chacun d'entre eux m'a transmis un savoir précieux qui m'a été utile tout au long de cette thèse.

Bien que je sois resté à Paris pour ma dernière année, je remercie l'équipe de Toulouse pour m'avoir permis d'assister à leur réunion et pour avoir enrichi mon environnement scientifique. Merci à notre bio informaticienne en herbe, Angéline, pour avoir relevé le défi d'analyser les données de scRNAseq sur le projet TNFR2 et cancer.

Je tiens à remercier le personnel de l'animalerie, notamment, Maria, Julianne et Oliver, pour leur travail et leur aide. Ils ont toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions et demandes.

Je remercie tous les membres du CIMI qui m'ont aidé et soutenu. Je remercie tout particulièrement la team AB pour m'avoir accueilli à leur table presque tous les midis au cours des derniers mois de ma thèse et pour avoir partagé leurs chocolats presque sans rechigner. Un merci particulier aux Dr. Christophe Combadière et Alexandre Boissonnas pour leurs conseils et leur écoute. Merci également à François et Marina pour leur bonne humeur et pour leurs blagues parfois pas drôles du tout. Merci à Noëline pour son honnêteté indispensable sur mes tenues vestimentaires et pour son rôle à l'interface entre celui de maman et d'amie précieuse. La fin du paragraphe AB est bien sûr pour Éléonore. Merci pour tous les moments que l'on a passés au CIMI et en dehors, merci de m'avoir fait autant rire, souvent à tes dépens, tu as été une des meilleures rencontres de cette thèse (désolée, je ne pouvais pas écrire la meilleure sinon Poupou sera jalouse). Prends confiance et je n'ai aucun doute, tu seras à ma place dans un an (maintenant que c'est écrit, tu n'as plus le choix !!).

Un grand merci également à tous les copains du CIMI et au jeudi bar/burger. Nous avons la chance d'avoir une ambiance incroyable et sans eux, cette thèse n'aurait pas été la même. L'amitié entre nous a été une bouffée d'oxygène tout au long de ces années, tant pour la rigolade que pour la détente, mais ce n'est pas tout. En effet, je souhaite tout particulièrement remercier Rémy, ou plutôt le Dr. Rémy Villette, d'avoir été mon professeur personnel pour comprendre et utiliser R. Il m'a poussé à apprendre pendant plusieurs années, malheureusement, je ne l'ai pas écouté tout de suite et je n'ai commencé à m'y mettre que 6 mois avant de rendre ma thèse. Sans lui et sans R, je ne sais pas comment j'aurais fait pour analyser mes données. Merci également à Clémence qui a soutenu sa thèse juste avant moi et qui a pris le temps de me guider dans ce processus. Je remercie aussi le reste de la team MCD, Marylou et Ana.

Merci à la team escalade d'avoir répondu présent chaque semaine pour que l'on puisse s'évader en ajoutant une panoplie de bleus à nos jambes, et à Antoine, toujours présent pour nous

motiver avec délicatesse. La personne qui a lancé cette team a également une place particulière dans mon cœur, merci à Amélia, mon petit boulet de canon. Elle a été une amie précieuse et à l'écoute et j'espère la garder auprès de moi pendant encore longtemps.

Je remercie ma famille de m'avoir soutenue durant ma thèse et durant toutes mes années d'études. Merci à ma maman, sa blanquette de veau et son filet mignon au roquefort qui m'ont accompagné du début à la fin. Merci également à ma Roro, ma petite sœur bien plus studieuse que moi. Merci de m'avoir motivée et poussée à travailler pendant mes années de master. Je pense sincèrement que je n'aurais pas eu d'aussi bons résultats si nous n'avions pas habité ensemble ces années-là. Ma sœur est une personne incroyable qui me sortait du lit le matin avec une tasse de café déjà prête, je regrette énormément cette époque, c'est bien plus dur de se lever le matin sans elle. Pour ne pas lui faire trop de compliments, je tenais quand même à préciser que bien que studieuse, elle n'est pas scientifique et m'a un jour demandé si c'était la cellule ou l'atome le plus petit. Je remercie également Françoise qui m'a accueillie chez elle au cours de mes stages de M1 et M2. Sans sa générosité, je n'aurais pas pu faire mes stages chez Benoit et donc cette thèse.

Je n'oublie pas mes amies de longue date, Tiphaine et bien sûr Axelle, qui a été mon binôme pour partir à la découverte de Paris et ses alentours. Merci d'avoir fait la touriste avec moi et pour tous ces moments passés ensemble.

Pour finir, merci à Daniel. Merci pour ta patience, pour m'avoir soutenu au cours de ces années et pour croire autant en moi. Merci également d'avoir pris autant de temps pour corriger mes textes en anglais, dont mes comités de suivi de thèse, mes présentations orales, mes posters et les manuscrits des papiers. Bien que tu ne sois pas biologiste, tu connais maintenant plutôt bien les Tregs. Notre relation a été marquée par le début de ma thèse, mais j'espère qu'elle continuera bien plus loin que la fin de cette thèse.

Liste des abréviations

ADCP	<i>Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis</i>	LP	Lamina Propria
Aire	<i>Autoimmune regulator</i>	LPS	Lipopolysaccharide
AMPc	<i>Adénosine monophosphate cyclique</i>	LT/LB	Lymphocytes T ou B
AREG	Amphiréguline	NF-κB	<i>Nuclear Factor kappaB</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	NOD	<i>Non-Obese Diabetic</i>
BAC	Chromosome Bactérien Artificiel	NRP1	Neuropiline-1
CD	Cellules Dendritiques	PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
CETc	Cellules Epithéliales Thymiques corticales	PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
CETm	Cellules Epithéliales Thymiques médullaires	PRC	<i>Polycomb Repressive Complex</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	pTreg	Lymphocytes T régulateurs périphériques
CNS	<i>Conserved Non-coding Sequences</i>	RAG	<i>Recombination-Activating Genes</i>
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes	RTE	<i>Recent Thymic Emigrants</i>
DN	Double Négatif	SNC	Système Nerveux Central
DP	Double Positif	SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale	SP	Simple Positif
EAU	<i>Experimental Autoimmune Uveoretinitis</i>	STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
EBI3	<i>Epstein-Barr virus induced gene 3</i>	TagTreg	<i>Tagged Tregs</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
Eomes	Eomesodermin	Tconv	Lymphocytes T conventionnels
EZH2	<i>Enhancer of Zeste Homologue 2</i>	TCR	<i>T Cell Receptor</i>
Fc	Fraction constante	TET	<i>Ten-Eleven Translocation family enzyme</i>
Fezf2	<i>Fez family zinc finger 2</i>	Tfh	<i>T follicular helper</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>	Tfr	<i>T follicular regulatory cells</i>
FR4	<i>Folate Receptor 4</i>	Th	Lymphocytes T helper
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	TIGIT	<i>T cell Ig and ITIM domain</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-Induced TNFR-Related</i>	TIL	<i>Tumor Infiltrated Lymphocytes</i>
GVH	Greffon contre l'hôte	TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
ICOS	<i>Inducible T-cell CO-stimulator</i>	TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase	TNFRSF	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family</i>
IEL	<i>Intra Epithelial Lymphocytes</i>	TNFSF	<i>Tumor Necrosis Factor Super Family</i>
IL	Interleukine	Tocky	<i>Timer of cell kinetics and activity</i>
IFN	Interféron	Tr1	<i>T regulatory cells 1</i>
IPEX	<i>Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i>	TRA	<i>Tissue Restricted self Antigens</i>
IRF4	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i>	Treg	Lymphocytes T régulateurs
Lag3	<i>Lymphocyte activation gene 3</i>	TSDR	<i>T cell Specific Demethylated Region</i>
LFA1	<i>Leukocyte Function Associated antigen 1</i>	tTreg	Lymphocytes T régulateurs thymiques
		VAT	<i>Visceral Adipose Tissue</i>

RESUME

En Français

Les lymphocytes T régulateurs Foxp3+CD4+ (Tregs) jouent un rôle majeur dans la régulation des réponses immunitaires, le maintien de l'homéostasie tissulaire et la tolérance périphérique. Ils jouent un rôle bénéfique dans les maladies auto-immunes alors qu'ils ont un rôle délétère dans les cancers. Comprendre la biologie des Tregs est donc indispensable pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à différents aspects du fonctionnement des Tregs chez la souris. Nous avons tout d'abord étudié leur ontogénie et la formation du pool de Tregs chez des souris nouveau-nés et jeunes adultes. Nous avons ainsi mis en évidence des différences majeures de cinétique en fonction des organes analysés. Dans les tissus lymphoïdes, le pool de Tregs est constitué tout au long de la vie, alors que dans certains tissus non-lymphoïdes, comme le tissu adipeux viscéral et la peau, ce pool se forme de façon majoritaire au cours des deux premières semaines de vie. Nous avons également montré que les Tregs générés pendant la période néonatale persistaient chez l'adulte dans différents tissus et qu'ils avaient un phénotype activé et exprimaient des marqueurs de Tregs tissulaires et d'une immunité de type 2.

Dans un second temps, nous avons étudié la stabilité des Tregs. En effet, les Tregs peuvent perdre l'expression de Foxp3, un facteur de transcription majeur pour réguler leur identité, et deviennent ainsi des « exTregs ». Ces cellules sont encore mal décrites dans la littérature et leur fonction n'est pas bien comprise. Nous avons cherché ici à mieux caractériser et décrire cette population. En utilisant un modèle de « fate mapping », nous avons identifié sans ambiguïté pour la première fois la population d'exTregs. Nous avons retrouvé cette population dans différents tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes. De manière surprenante, la présence d'exTregs était augmentée en condition inflammatoire dans un modèle de cancer, mais pas au cours d'une pathologie auto-immune. Nous avons également montré que les exTregs avaient une signature propre à la fois au niveau protéique et transcriptomique. Nos travaux ont permis de mettre au point une méthode fiable pour identifier les exTregs et permettront d'étudier les mécanismes de la stabilité des Tregs et le rôle des exTregs.

Nous avons finalement étudié les signaux environnementaux pouvant moduler la fonction des Tregs et nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle du TNF récepteur 2 (TNFR2) dans la biologie des Tregs dans certains contextes pathologiques. Pour étudier le rôle intrinsèque de ce

récepteur sur les Tregs nous avons généré un modèle murin permettant d'induire une délétion du TNFR2 uniquement sur les Tregs. Nous avons montré que l'expression du TNFR2 par les Tregs était nécessaire pour que ces cellules contrôlent l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, un modèle murin de sclérose en plaques. Nos données montrent également que la délétion du TNFR2 dans les Tregs augmente la réponse immunitaire antitumorale. Cet effet n'était pas dû à une diminution du nombre de Tregs mais plutôt à une altération de leur fonction suppressive conduisant à une forte augmentation de la production de cytokines inflammatoires et d'une activation de certaines cellules myéloïdes. Ces travaux permettent de mieux connaître la biologie des Tregs et leur rôle dans les maladies auto-immunes et les cancers, ce qui pourrait conduire à proposer de nouveaux traitements dans ces maladies.

En Anglais

Foxp3+CD4+ regulatory T cells (Treg) play a major role in regulating immune responses, maintaining tissue homeostasis and peripheral tolerance. They have a beneficial role in autoimmune diseases while they have a deleterious role in cancers. Therefore, understanding the biology of Tregs is essential for proposing new therapeutic strategies. In this work, we investigated several aspects of Treg biology in mice.

Firstly, we sought to understanding the kinetics of Treg-generation. We demonstrated that, in lymphoid organs, the Treg population is made up of cells that are formed progressively throughout the life of the mouse. In sharp contrast to this finding, the majority of the Treg pool is formed before the age of two weeks in the visceral adipose tissue and the skin. We also observed that Tregs generated in the neonatal period have a different phenotype than Tregs generated after 1-2 weeks of age, expressing higher levels of activation, tissue and type 2 immunity markers.

We were then interested in the stability of Tregs. Some studies propose that Tregs can lose the transcription factor Foxp3, their master regulator, and become so-called "exTregs". These studies suggest that exTregs would lose both their identity and suppressive function, adopting conventional T cell properties. However, the stability of the Treg lineage and the very existence of exTregs in vivo is subject to much debate. Using a fate mapping system and significant technological improvements, we have unambiguously identified exTregs in vivo in mice for the first time. The generation of exTregs in lymphoid and non-lymphoid tissues was observed at steady-state in young and adult mice. Notably, the presence of exTregs was found to increase significantly under inflammatory conditions in cancer models but not auto-immune disease models. Using multiparametric flow cytometry and scRNA-seq analyses, we revealed that exTregs have their own signature that differs from Tregs and conventional

T cells. Our research introduces methodological improvements for the identification of exTregs and will allow further investigations into the stability of Tregs.

Finally, we investigated signals from the environment that could modify the function of Tregs, in particular, the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in different pathological contexts. To study the intrinsic role of this receptor on Tregs, we generated a mouse model facilitating the deletion of TNFR2 only on Treg via the Cre-Lox recombination system. We showed that expression of TNFR2 by Treg was necessary for these cells to control experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. We also demonstrated that the deletion of TNFR2 in Treg increases the anti-tumor immune response. This effect was not due to a decrease in the number of Tregs, but rather an impact of their suppressive function, leading to a significant increase in the production of inflammatory cytokines and alteration of certain myeloid cells. This work has led to a better understanding of the role of Tregs in autoimmune diseases and cancers that can support the development of new treatments.

Grand Public

En Français

Les maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques, sont dues à une attaque de certains tissus par le système immunitaire. Nous travaillons sur une population de cellules appelée cellules régulatrices ou Treg. Ces cellules jouent un rôle bénéfique dans les maladies auto-immunes en inhibant le système immunitaire. Cependant, ces Treg ont un rôle néfaste dans les cancers en diminuant la réponse immunitaire contre les cellules tumorales. Stimuler ou au contraire inhiber les Treg pourrait conduire à de nouveaux traitements. Cependant, pour mettre au point de tels traitements, il est nécessaire de mieux comprendre la biologie des Tregs. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à différents aspects de la biologie et du fonctionnement de ces cellules. Nous avons tout d'abord étudié à quel âge les Tregs étaient formés dans différents organes. Nous avons observé des différences entre tissus. Pour certains, les Tregs sont formés plutôt chez les nouveau-nés et pour d'autres, ils sont formés tout au long de la vie. Dans un second temps, nous avons étudié la stabilité de cette population. En effet, les Tregs peuvent perdre leur identité et pourraient alors jouer un rôle délétère dans les maladies auto-immunes. Pour finir, nous nous sommes intéressés à une molécule, le TNFR2, dont le ciblage sur les Treg pourrait moduler leur activité. Chez des souris développant une sclérose en plaques, nous avons montré un effet thérapeutique d'un médicament capable de stimuler les Treg exprimant le TNFR2. Ces mêmes Treg exprimant le TNFR2 ont un rôle délétère dans la réponse immune contre les cancers. Ces travaux ont permis de mieux comprendre la

biologie des Tregs et leur rôle dans les maladies auto-immunes et les cancers et pourrait conduire à proposer de nouveaux traitements dans ces maladies.

En Anglais

Autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, are caused by an attack on certain tissues by the immune system. Our work concerns a population of cells called regulatory T cells or “Tregs” which play a beneficial role in fighting autoimmune diseases by regulating the immune system, inhibiting it from damaging itself. However, these Tregs play a detrimental role in combatting cancers by decreasing the immune response against tumor cells. Controlling the behavior Tregs can support the development of new treatments for these diseases. To that end, acquiring a better understand the biology of Tregs is paramount. In this work, we focused on several aspects of the biology and function of these cells. Firstly, we studied the age at which Tregs were formed in different organs and determined that it depends strongly on the organ. We found that, in some organs, the Tregs are formed shortly after birth and are then maintained into adulthood, whereas in others the Tregs are formed through the life of the mouse. Secondly, we studied the stability of Tregs. Tregs can lose their identity and then become harmful in auto immune diseases. Finally, we investigated molecules from the environment that could modify the function of Tregs, such as TNFR2. In mice with multiple sclerosis, we have demonstrated a therapeutic effect of a drug capable of stimulating Tregs expressing TNFR2. These same Tregs expressing TNFR2 have an adverse role in the immune response against cancers. This work has led to a better understanding of the Tregs biology and their role in autoimmune diseases and cancers and can support the development of new treatments for these diseases.

INTRODUCTION

Préface : L'histoire de cette thèse a débuté lorsque j'ai découvert l'immunologie durant mes années de licence. Nous avions à ce moment-là à peine entendu parler des lymphocytes T régulateurs Foxp3+ (Tregs). Ces cellules m'ont fortement intrigué et intéressé lorsque j'ai entamé mon stage au sein de l'équipe du Dr. Benoit Salomon. Dès ma première immersion dans l'équipe, j'ai pris conscience de la multitude d'aspects et d'angles sous lesquels ces cellules sont étudiées et explorées. La complexité de leur rôle et de leurs interactions avec l'organisme ne cesse de susciter l'attention des chercheurs. L'abondance de littérature scientifique et d'expérimentations consacrées aux Tregs reflète l'importance primordiale qu'elles ont dans la régulation des réponses immunitaires. Parmi les nombreuses recherches menées sur ces cellules, mon projet de thèse s'est petit à petit développé autour d'un sujet largement débattu dans la littérature : les exTregs.

Au commencement, mon projet était assez éloigné de l'étude des exTregs. J'en avais ponctuellement entendu parler par Benoit qui semblait contrarié de ne pas pouvoir les observer via le modèle expérimental que nous utilisions et qui en théorie était l'idéal pour les étudier. Je me souviens de son insistance pour essayer de comprendre l'impossibilité de détecter cette population dans mes données. Après une série d'essais, de tâtonnements et d'ajustements, nous avons finalement réussi à les observer, de manière nette, une réalisation jusqu'alors inédite dans la littérature scientifique. Cette avancée technique a ouvert nos perspectives de recherche sur le monde toujours assez mystérieux des exTregs. J'ai donc eu la chance durant mes dernières années de thèse de pouvoir participer à ce défi scientifique majeur.

I. Lymphocytes T et tolérance immunitaire

Le système immunitaire est complexe, il est composé de nombreux types cellulaires qui peuvent circuler dans l'organisme ou qui résident dans des tissus spécifiques. Toutes les cellules immunitaires ont un précurseur commun dans la moelle osseuse : les cellules souches hématopoïétiques se développeront en cellules matures via des processus variés qui auront lieu dans différentes parties du corps. Ces progéniteurs peuvent donner naissance à deux lignées distinctes : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Le progéniteur myéloïde sera le précurseur des cellules du système immunitaire inné. Le progéniteur lymphoïde donnera les lymphocytes B et T qui sont les acteurs principaux de l'immunité adaptative. La composante innée est à l'origine d'une réponse rapide qui sera la première ligne de front, par exemple lors d'une infection par un pathogène. La composante adaptative, quant à elle, génère une réponse immunitaire plus ciblée contre des structures antigéniques qui s'adapte constamment et est capable d'acquérir une mémoire. De nombreux sous types de cellules immunitaires sont maintenant décrits, ils ont des rôles spécifiques, et participent à un réseau complexe et coordonné permettant le développement de différents types de réponses immunitaires. Comprendre le fonctionnement de ces différents sous-types cellulaires et de leurs interactions est essentiel pour optimiser les thérapies ciblant le système immunitaire. En agissant sur ce réseau complexe, de nouvelles approches thérapeutiques peuvent être proposées pour traiter les maladies auto-immunes, les allergies, les infections et les cancers.

Les lymphocytes T (LT) sont des acteurs clefs de ces processus. Ils sont subdivisés en de nombreux sous types ayant des fonctions spécialisées. Leur génération et leur développement dépendent de mécanismes extrêmement contrôlés qui constituent une des premières bases de régulation du système immunitaire.

1. Développement des lymphocytes T

Les premiers stades de différenciation des LT se déroulent dans les organes lymphoïdes primaires, la moelle osseuse et le thymus. Leurs précurseurs, également appelés thymocytes, migrent de la moelle osseuse vers le thymus, pour poursuivre leur maturation en LT CD4+ (auxiliaire ou *helper*) ou en LT CD8+ (cytotoxique). A ce stade, ils n'expriment pas encore le récepteur à l'antigène des LT (TCR pour *T Cell Receptor*) et les corécepteurs CD4 et CD8, ils sont alors désignés comme étant des précurseurs double négatif (DN). Au cours de leur développement, ils acquièrent pour leur majorité l'expression d'un TCR constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β , capable d'interagir avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La faible proportion de LT ayant un TCR constitué d'une chaîne γ et d'une chaîne δ ne possède pas les corécepteurs CD4 et CD8. Le

réarrangement des chaînes du TCR permet de créer une grande diversité dans le répertoire des LT, indispensable pour reconnaître un large spectre d'antigènes et générer une réponse immunitaire efficace [1], [2]. Cette diversité est permise notamment grâce aux recombinaisons aléatoires des segments variables (V), jonction (J), et diversité (D) des gènes codant pour le TCR. Ce processus est médié par les protéines RAG (pour *Recombination-Activating Genes*).

Les thymocytes vont tout d'abord réarranger leur chaîne β pour passer au stade DN3 et former un pré-TCR. En cas d'engagement de ce récepteur, un signal est transmis via le complexe CD3 associé au TCR, permettant de recombinaison la chaîne α du TCR. L'association des chaînes α et β va former un TCR capable de passer au stade double positif (DP) coexprimant les corécepteurs CD4 et CD8. Ils subiront ensuite une sélection positive et négative basée sur l'affinité et l'avidité de leur TCR au CMH présentant des peptides du soi. La sélection positive est médiée dans le cortex thymique par les cellules épithéliales thymiques corticales (CETc) et les cellules dendritiques (CD) exprimant le CMH de type I (CMH-I) et de type II (CMH-II) associés avec des peptides du soi. Seuls les thymocytes ayant un TCR avec une affinité suffisante pour les complexes CMH-peptide seront sélectionnés. Cette sélection permet la maturation au stade simple positif (SP), soit de LT CD4 reconnaissant des CMH-II, soit de LT CD8 reconnaissant des CMH-I.

Une fois sortis du thymus, les LT ont besoin d'interagir avec les complexes CMH-peptide du soi en périphérie pour recevoir des signaux de survie, mais cette interaction ne doit pas être de forte affinité sinon il y a un risque de développement de maladies auto-immunes. La tolérance immunitaire englobe un ensemble de mécanismes qui seront décrits dans le chapitre suivant et qui permettent de limiter de telles situations pathologiques.

A la périphérie, les LT CD4+ vont pouvoir se différencier en sous types cellulaires en fonction de l'environnement rencontré. Les LT CD4+ sont divisés en sous-catégories de LT auxiliaires ou *helper* (Th) capables de participer à différents types de réponses immunitaires. Cela permettra de générer le large éventail de fonctions attribué aux LT. De nombreux sous types de Th sont aujourd'hui catégorisés en fonction des cytokines qu'ils sécrètent (Figure 1). Les quatre groupes majoritairement décrits sont les Th de type 1 (Th1) sécrétant de l'Interféron γ (IFN γ), les Th2 sécrétant les interleukines 4 (IL-4), IL-5 et IL-13, les Th17 sécrétant des IL-17 et les Th folliculaires sécrétant de l'IL-21. Cependant, leur rôle étant parfois complémentaire et redondant, il a été proposé un nouveau type de classification basé sur la fonction et l'aide qu'ils apportent plutôt que sur le type de cytokine qu'ils sécrètent. Cela permet de classer les Th en trois catégories basées sur leurs fonctions effectrices : l'immunité cellulaire, l'immunité humorale et l'immunité des barrières [3].

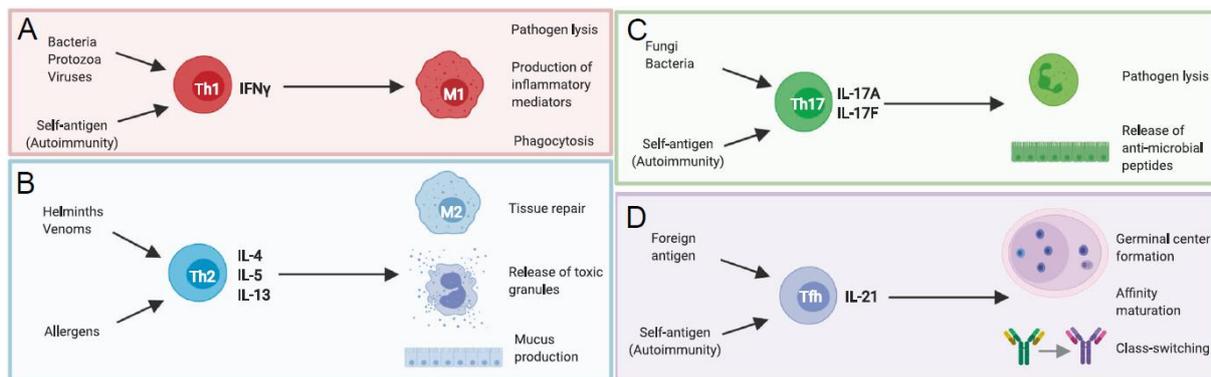


Figure 1 : les différents types de LT helper (Th), leur phénotype et les pathologies associés (tiré de [4]). (A) Les Th1 sécrétant de l'IFN γ sont associés avec les bactéries, les protozoaires, les virus, ils permettent de promouvoir l'activité des macrophages. Ils sont également capables de reconnaître des antigènes du soi ce qui leur confère un rôle dans l'auto-immunité. (B) Les Th2 sécrétant de l'IL-4, IL-5 et IL-13 peuvent être activés par les helminthes et les venins pour induire la libération de granules cytotoxiques, favorisent la sécrétion de mucus et la réparation tissulaire. Les Th2 sont également associés à l'allergie. (C) Les Th17 sécrétant de l'IL-17 sont stimulés par les bactéries extracellulaires et les champignons, ils permettent de promouvoir la libération de peptide anti-microbien et l'activité des neutrophiles. Les Th17 sont également associés avec certaines pathologies auto-immunes. (D) les Th folliculaire (Tfh) supportent la formation des centres germinatifs. Ils sont capables de reconnaître des antigènes étrangers ou du soi.

2. Tolérance immunitaire

La tolérance permet d'éviter ou de limiter les réponses immunitaires inadaptées contre des antigènes du soi, du fœtus, des flores commensales ou des allergènes. Elle est indispensable pour prévenir l'attaque des tissus sains de l'organisme par le système immunitaire. La tolérance au soi a tout d'abord lieu dans le thymus pour éliminer les LT les plus fortement auto-réactifs, c'est la tolérance centrale également appelée sélection négative. Bien que ce mécanisme permette d'éliminer de nombreux LT fortement auto-réactifs, un répertoire important y échappe et migre dans les tissus périphériques. La tolérance périphérique prend alors le relais via différents mécanismes passifs et actifs, incluant les lymphocytes T régulateurs (Tregs), une sous-population de LT CD4+.

2.1 Tolérance centrale

Lors du développement des LT dans le thymus, il est nécessaire de sélectionner les cellules selon l'affinité de leur TCR avec des CMH présentant des peptides du soi. Cette étape, appelée sélection positive, permet aux précurseurs des LT reconnaissant ces complexes CMH/soi, avec une affinité intermédiaire, de recevoir des signaux de survie. Cependant, si cette affinité est trop forte, les LT, alors considérés comme étant auto-réactifs, pourraient engendrer une réponse auto-immune inadaptée, nécessitant le besoin de les éliminer via le processus de sélection négative (Figure 2).

2.1.1 Sélection négative

La sélection négative qui a lieu dans la médulla implique les CET médullaires (CETm) et des cellules dendritiques exprimant les CMHs. Cette sélection a d'abord été mise en évidence grâce à un modèle de souris transgéniques pour un TCR reconnaissant spécifiquement un antigène mâle. Chez les mâles, une grande majorité des thymocytes transgéniques sont éliminés par apoptose [5]. Cet antigène n'existant pas chez les femelles, les LT transgéniques n'ont pas subi cette délétion clonale. Cependant, il a toujours été difficile de mettre en évidence une signature ou le répertoire TCR des LT sélectionnés négativement. Une étude a par exemple tenté d'utiliser des souris transgéniques permettant de suivre le stade de développement des LT et d'étudier leur répertoire aux différentes étapes de maturation, incluant les thymocytes qui ne passent pas la sélection [6]. Ils n'ont pas pu mettre en évidence des séquences spécifiquement éliminées par la sélection négative.

Le phénomène de sélection négative a été confirmé dans de nombreux autres modèles. Il a été montré que cette tolérance centrale ne concerne pas seulement les thymocytes reconnaissant des antigènes connus pour être exprimés par des cellules du thymus. En effet, les thymocytes spécifiques d'antigènes exprimés dans des tissus périphériques de l'organisme peuvent également subir cette sélection négative. Ce phénomène permet de prévenir la survenue de maladies auto-immunes. Par exemple, l'absence d'expression d'un des épitopes de la myéline dans le thymus entraîne le développement de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de la sclérose en plaques [7]. Ces antigènes du soi exprimés dans les tissus périphériques sont appelés TRAs (pour *Tissue Restricted self Antigens*). Ils sont exprimés à des niveaux faibles par les CETm et concerneraient plus de 18.000 gènes [8]. La diversité de ces antigènes est possible notamment grâce à l'expression du facteur de transcription Aire (pour *Autoimmune regulator*). Plus récemment, le rôle du facteur de transcription Fezf2 (pour *Fez family zinc finger 2*) a également été mis en avant. La perte de l'expression d'un antigène dépendant de Aire est suffisante pour induire une pathologie auto-immune, comme décrit dans un modèle murin déplété pour un antigène spécifique de l'œil [9]. Bien que beaucoup moins bien connu que Aire, Fezf2 agirait en complément et permettrait de réguler l'expression d'antigène indépendant de Aire. Une déficience en Fezf2 conduit aux développements de pathologies auto-immunes qui diffère de celles induites par une déficience en Aire [10].

Les thymocytes possèdent une forte mobilité leur permettant d'interagir avec de nombreux CETm pour tester l'affinité de leur TCR avec des antigènes du soi [11]. Des études quantitatives suggèrent que la proportion de peptide « vu » pour chaque LT ne représenterait en moyenne que 2 à 10% du peptidome exprimé par les CETm [12]. Ces chiffres suggèrent que le répertoire auto réactif des

thymocytes ne serait que très incomplètement éliminé dans le thymus, ce qui souligne la nécessité de mécanismes complémentaires de tolérance.

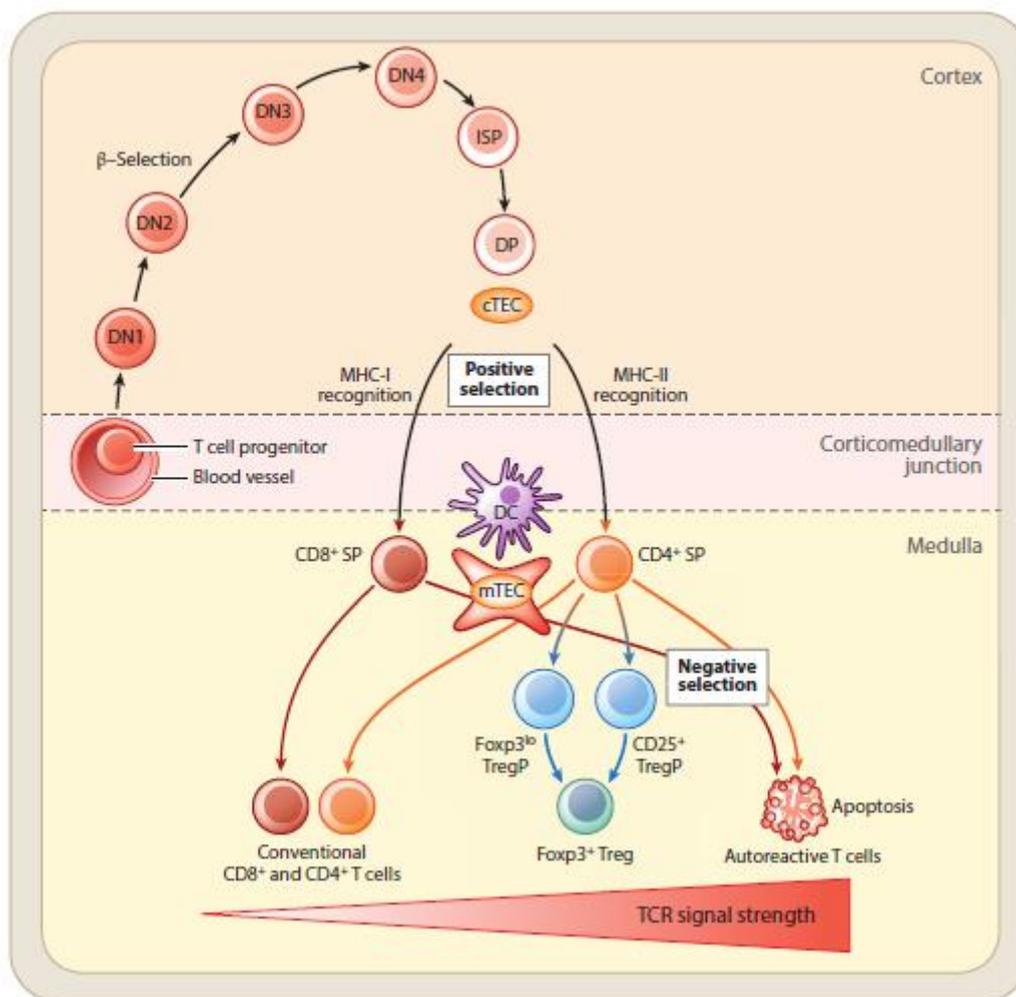


Figure 2 : Développement des lymphocytes T dans le thymus (tiré de [13]). Les précurseurs des LT entrant dans le thymus n'ont pas de TCR et son double négatif (DN) pour les corécepteurs CD4 et CD8. Le réarrangement des chaînes β puis α du TCR, qui a lieu dans le cortex, leur permet de passer au stade double positif (DP). Ils subiront ensuite une sélection positive médiée par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC), seuls les thymocytes reconnaissant les complexes CMH-I ou CMH-II peptide du soi avec une affinité suffisante passeront au stade simple positif (SP) exprimant respectivement CD8 et CD4. A la suite de cette sélection, ils migrent dans la médulla où l'affinité de leur TCR sera testée négativement par des cellules dendritiques (CD) et les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC). Le destin des LT est déterminé suivant un gradient de concentration basé sur la force du signal engendré, ils deviendront des LT conventionnels, des lymphocytes T régulateurs (Tregs) où seront éliminés si l'affinité est trop forte.

2.1.2 Evolution avec l'âge

La taille du thymus et le nombre de thymocytes changent en fonction de l'âge des souris. La taille augmente jusqu'à environ 4 semaines après naissance, puis commence à décroître progressivement avec l'âge [14]. Au-delà de ces données macroscopiques connues depuis longtemps, des résultats récents montrent des modifications cellulaires et moléculaires avec l'âge qui sont associés à des changements du répertoire des LT. Il est important de comprendre l'impact de ces changements sur le répertoire des LT. Il a été observé une diminution de l'expression des TRAs avec l'âge [14]. Les auteurs montrent également que les LT venant de sortir du thymus (RTE pour *Recent Thymic Emigrants*) ont des capacités fonctionnelles et prolifératives amoindries chez l'adulte.

La nature et la fonction des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) change avec l'âge [15]. Un même antigène, présenté par des CETm, entraîne chez le nouveau-né une différenciation en Tregs, alors qu'il conduit chez l'adulte à une sélection négative [16]. Il a également été observé une augmentation de la sélection négative contre un antigène de la myéline avec l'âge [17]. Cette augmentation était due à une accumulation de l'antigène dans l'organisme, pouvant être présenté par des CD périphériques circulant dans le thymus. Ces changements et d'autres encore non décrits concourent au remodelage du répertoire des LT avec l'âge. Ainsi, le répertoire des Tregs et des LT conventionnels (Tconv) serait plus auto-réactif chez des souris nouveau-nés que chez l'adulte, suggérant un niveau de sélection négative plus faible au début de la vie [18], [19]. De même, la première semaine de vie serait plus permissive au développement de LT diabétogènes chez la souris NOD (pour *Non-Obese Diabetic*), un modèle murin du diabète de type 1 [20]. Cette sélection plus permissive chez le nouveau-né permettrait une expansion plus rapide des LT dans un environnement lymphopénique qui n'a pas encore été colonisé.

2.2 Tolérance périphérique

Malgré la sélection négative qui a lieu dans le thymus, certains LT auto-réactifs peuvent y échapper et se retrouver en périphérie. Plusieurs mécanismes de tolérance périphérique peuvent alors intervenir. Ces mécanismes peuvent être passifs comme dans l'anergie ou l'ignorance ou actif via l'action de cellules régulatrices. Le stade de développement des cellules, l'environnement dans lequel elles interagissent et les signaux reçus auront un impact sur le mécanisme de tolérance qui prend le dessus.

2.2.1 Mécanismes passifs

Il existe plusieurs mécanismes qui peuvent avoir lieu tout au long de la vie d'un LT ou de manière dépendante à son statut d'activation (Figure 3). La quiescence et l'ignorance sont des mécanismes observés lorsque le LT est naïf. Lors de l'activation, d'autres mécanismes interviennent. Au stade précoce, on retrouve le mécanisme d'anergie, et au stade effecteur celui de l'épuisement (*Exhaustion* en anglais) et la senescence. De plus, le mécanisme de délétion clonale qui induit l'apoptose peut avoir lieu tout au long du statut d'activation du LT.

Quiescence. Les LT sont maintenus en phase G0 du cycle cellulaire, leur métabolisme est faible, ils sont au repos et n'ont pas de fonction effectrice. Le rôle majeur de Runx1 a été mis en évidence puisque sa perte réduit l'expression de facteur de transcription impliqué dans la quiescence comme Foxp1, Klf2 et Foxo1 [21]. Par exemple, Foxo1 est nécessaire pour maintenir l'homéostasie des LT naïfs, notamment en régulant l'expression de la molécule d'adhésion CD62L [22]. Ce mécanisme permet de maintenir un équilibre et de prévenir une réponse immunitaire non nécessaire.

Ignorance. Les LT sont incapables de s'activer, car ils n'ont pas accès à leur antigène. Soit parce que celui-ci n'est pas présent en quantité suffisante, soit parce qu'il est spatialement inaccessible. Une étude récente a montré que ce mécanisme était majoritaire pour les LT spécifiques d'antigènes du pancréas [23].

Anergie. Suite à la reconnaissance d'un antigène par le TCR, un défaut du signal de costimulation CD28, fourni par les CD exprimant CD80/86 et indispensable à l'activation d'un LT, induit cet état et empêche la cellule de devenir effectrice. A la suite de cette activation incomplète, des signaux vont induire la production de protéines impliquées dans l'établissement du statut d'anergie. Cet état persiste uniquement si l'exposition à l'antigène est maintenue [24]. Les LT anergique ont été définis par l'expression de CD73 et FR4 (pour *Folate Receptor 4*) [25]. Ces marqueurs permettent de les

différencier phénotypiquement, mais leurs implications fonctionnelles dans ce processus ne sont pas démontrées.

Épuisement. Cet état apparaît suite à une activation chronique du TCR. Bien que toujours fonctionnelle, la réponse de ces cellules est largement réduite. Le phénotype des LT dans cet état est caractérisé par l'expression de récepteurs inhibiteurs comme PD-1 (*Programmed cell death 1*) [26]. Cependant, il est à noter que ces mêmes récepteurs sont également exprimés par des LT effecteurs activés.

Senescence. Ce stade est décrit lorsque le LT a dépassé un seuil hypothétique de nombre de cycles de prolifération et est exposé à divers facteurs de stress. Contrairement au stade d'épuisement, les fonctions effectrices ne semblent pas impactées. Un LT sénéscent est caractérisé par l'érosion de ses télomères qui peut être causé par l'interféron α (IFN α) en inhibant la télomérase [27]. La senescence contribue à la tolérance en limitant l'action des LT vieillissants.

Délétion clonale. Ce mécanisme permet d'éliminer certains clones via une mort cellulaire programmée, l'apoptose. Le mécanisme extrinsèque, impliquant le récepteur de mort Fas, est induit lorsque que le TCR s'active de manière inappropriée. L'interaction avec son ligand, FasL, exprimé à la surface des CPA, va induire une cascade de signalisation conduisant à la mort du LT [28]. Un mécanisme intrinsèque, médié par le facteur pro-apoptotique Bim, a également été décrit. En effet, les LT déficient pour Bim son résistant à la délétion [29], [30].

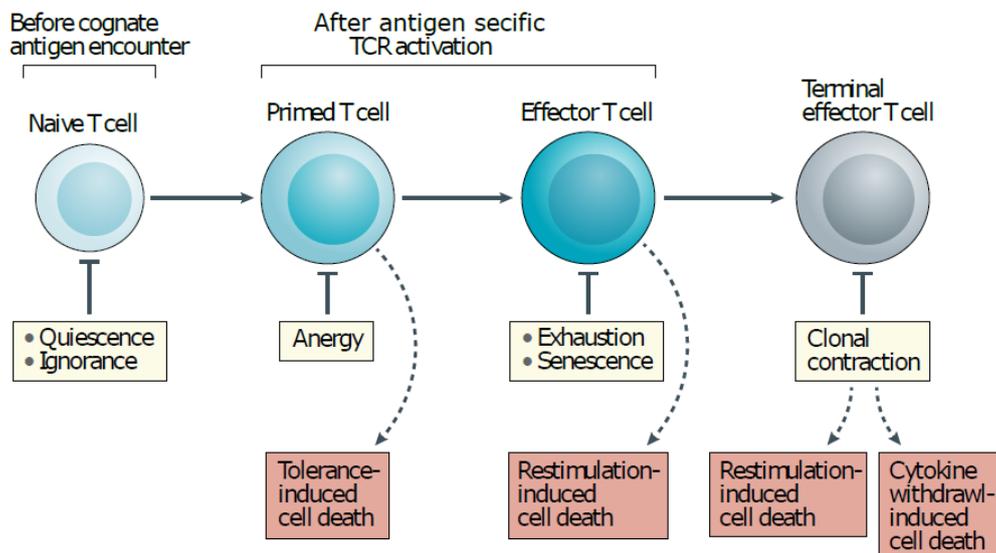


Figure 3 : Mécanismes de tolérance périphérique (tiré de [31]). Des mécanismes de tolérances sont mis en place aux différentes étapes d'activation des LT. Les LT naïf sont contrôlés par l'anergie et la quiescence. Après activation du TCR, l'anergie limite les réponses excessives des LT. La stimulation chronique du TCR par un antigène peut entraîner l'exhaustion et la sénescence du LT. Au différent stade d'activation, la délétion clonale induite par différents stimuli peut entraîner l'apoptose des LT.

2.2.2 Mécanismes actifs

En complément des mécanismes précédemment décrits, des sous types de cellules immunitaires ayant des capacités régulatrices interviennent dans la tolérance périphérique.

Les LT régulateurs CD4+Foxp3+ (Tregs). Les Tregs jouent un rôle majeur dans la prévention de l'auto-immunité. En effet, chez l'Homme, comme chez les souris, l'absence de cette population entraîne un syndrome auto-immun généralisé conduisant au décès [32], [33]. L'existence de marqueurs spécifiques de cette population et le développement de modèles murins transgéniques ont grandement favorisé l'étude de ces cellules régulatrices. Cependant, de nombreux aspects et fonctions des Tregs sont encore peu connus ou mal décrits, nécessitant de poursuivre les efforts de recherche dans ce domaine. Ces cellules seront plus amplement décrites dans les chapitres suivants.

Autres types de cellules régulatrices. D'autres sous types de cellules immunitaires ont été décrits comme possédant des propriétés suppressives permettant de réguler le système immunitaire. Des LT CD4+ appelé Tr1 (*T regulatory cells 1*) ont été caractérisés par la production de grandes quantités d'IL-10 et leur capacité à prévenir le développement de la colite [34]. Des homologues des Tregs chez les LT CD8+ sont également décrits comme une population hétérogène possédant divers mécanismes de suppressions. Récemment, il a également été montré, chez des patients atteints de sclérose en plaques, que la fonction de ces cellules était altérée [35]. Des populations de cellules régulatrices sont également décrites dans le compartiment des cellules myéloïdes et des lymphocytes B. L'altération de ces populations engendre également l'apparition de pathologies auto-immunes et inflammatoires [36], [37]. Il est intéressant de noter que les cellules suppressives du compartiment myéloïdes sont aussi décrites pour favoriser la différenciation des Tregs [38].

II. Développement et identité des lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les Tregs sont définis comme étant des cellules régulatrices permettant de maintenir un équilibre immunitaire. Leurs caractéristiques phénotypiques principales sont l'expression du facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box P3*) et la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2, le CD25.

1. Ontogénie

1.1 Différenciation des Tregs dans le thymus

L'affinité du TCR. Lors de la sélection négative dans le thymus, les LT présentant une affinité moyenne à forte pour le complexe CMH-peptide ne sont pas systématiquement éliminés. Suivant l'affinité du TCR, la sélection peut donner lieu à des Tregs (Figure 2). Ce fut démontré dans des modèles murins possédant des TCR transgéniques. Lorsque le TCR était spécifique d'un autoantigène, une augmentation de la génération des Tregs dans le thymus était observée [39], [40]. Le développement de ces Tregs est dépendant de la présence d'autoantigène et de mTEC exprimant Aire [41], [42]. La différence de répertoire TCR entre les Tregs et les Tconvs renforce le fait qu'ils ne sont pas sélectionnés de la même manière sur la base de l'affinité de leur TCR [43]. La question se pose alors de savoir comment les précurseurs des Tregs sont capables de survivre à une forte stimulation du TCR, contrairement aux Tconvs qui seront éliminés. Le groupe du Dr. Sakaguchi a proposé que cette survie passait par une atténuation de la signalisation en aval du TCR et du signal de costimulation CD28 [44]. Il a également été montré que la signalisation CD28 induisant la différenciation des Tregs était différente de celle induisant la délétion des LT auto réactifs [45].

Les précurseurs. La différenciation des Tregs a tout d'abord été décrite comme un processus en deux étapes [46]. Après l'engagement du TCR avec un complexe CMH-peptide du soi, un signal permet l'expression du CD25. Dans un second temps, le précurseur acquiert l'expression de Foxp3 suite à un signal favorisé par la présence du CD25. Par la suite, un deuxième type de précurseurs n'exprimant pas CD25 et faiblement Foxp3 a été décrit (CD25-Foxp3low) (Figure 4).

L'utilisation de souris transgénique exprimant la GFP (pour *Green Fluorescent Protein*) sous le contrôle du promoteur du gène codant pour RAG2, RAG2-GFP, permet de suivre les LT suite à la recombinaison de leur TCR. Le signal GFP va décroître progressivement, permettant de différencier les cellules ayant nouvellement généré leur TCR, de celles qui ont recombiné leur TCR plusieurs jours avant. Cela a permis de mettre en évidence que les précurseurs CD25-Foxp3low, par rapport

précurseurs CD25+Foxp3-, restaient plus longtemps à ce stade de différenciation avant d'évoluer vers le stade plus mature des Tregs CD25+Foxp3+ [47]. Le modèle murin transgénique Tocky (pour *Timer of cell kinetics and activity*) confirme ces données [48]. Ce modèle utilise une protéine fluorescente qui va changer spontanément et progressivement son émission du bleu vers le rouge suite à l'activation du TCR. Les précurseurs CD25+Foxp3- étant uniquement bleus, cela montre qu'ils restent peu de temps à ce stade avant de devenir CD25+Foxp3+. Les précurseurs CD25-Foxp3low étant bleu/rouge, cela indique qu'un certain temps est nécessaire après l'activation du TCR pour poursuivre leur maturation. De plus, les Tregs CD25+Foxp3+ étant également bleus et rouges, cela indique que le signal TCR persiste à ce stade.

Les deux types de précurseurs sont générés via des mécanismes différents et donnent naissance à des Tregs ayant des fonctions apparemment distinctes. Les CD25+Foxp3- qui sont sélectionnés avec une affinité du TCR plus importante, génèrent des Tregs qui permettent de prévenir l'apparition de l'EAE, contrairement aux CD25-Foxp3low. Les deux types de précurseurs ont un répertoire TCR distinct [47]. Dans les deux cas, ces précurseurs sont hautement dépendants de l'IL-2 pour poursuivre leur maturation [49].

La diversité des Tregs présent dans le thymus. Deux types de Tregs thymique ont été identifiés, ceux exprimant fortement PD-1, GITR (pour *Glucocorticoid-Induced TNFR-Related*) et CD25 et ceux exprimant faiblement ces marqueurs. Les premiers présentent une affinité pour le TCR plus importante et ont un répertoire distinct des seconds, bien qu'ils soient tous deux générés après interaction avec des antigènes du soi [50]. Ces deux populations ont également des rôles régulateurs distincts. Ceux exprimant fortement PD1, GITR et CD25 permettent de contrôler la prolifération des LT dans les organes lymphocytes secondaires alors que ceux exprimant faiblement ces marqueurs permettent de limiter le développement de la colite. Aucune donnée n'a pu mettre en lien ces deux populations et les deux types de précurseurs des Tregs.

En plus des Tregs nouvellement générés, des Tregs matures sont présents dans le thymus. Ils s'accumulent avec l'âge et représentent, chez une souris âgée de six mois, plus de 90% des Tregs. Cette forte proportion des Tregs matures résulte de la recirculation de Tregs périphérique et du fait qu'ils résident dans le thymus sur le long terme [51]. La grande majorité de ces Tregs expriment le marqueur CD73 [47]. Récemment, il a été montré qu'ils possédaient le répertoire TCR le plus diversifié de tous les CD4+ SP présents dans le thymus [52]. Ces Tregs recirculant auraient pour fonction de limiter le développement de nouveaux Tregs par consommation d'IL-2 [53].

Cette diversité dans la maturation des Tregs illustre l'hétérogénéité de cette population. En support de leur développement thymique, les Tregs peuvent aussi se développer en périphérie à partir

de LT CD4+ conventionnels, aussi appelé Tconvs. Les Tregs thymiques (tTregs) sont alors différenciés des Tregs développés en périphéries, les pTregs (Figure 5).

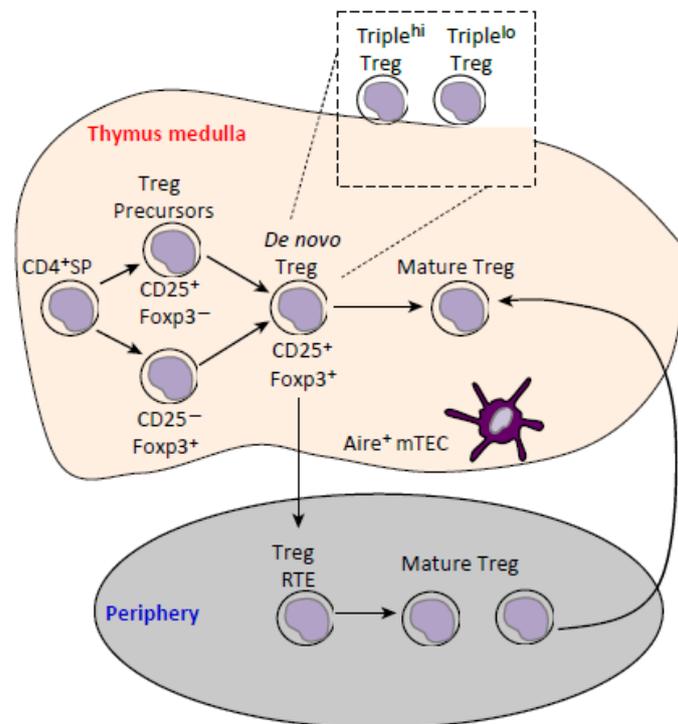


Figure 4. Développement des lymphocytes T régulateurs CD25+Foxp3+ dans le thymus (tiré de [54]). Les Tregs se différencient dans la médulla à partir de deux types de précurseurs : CD25+Foxp3- et CD25-Foxp3+. Ces Tregs sont hétérogènes et contiennent des sous-populations triples positives et triples négatives pour les marqueurs CD25, PD-1 et GITR. Les Tregs nouvellement générés rejoignent la périphérie en tant que RTE (*Recent Thymic Emigrants*). Des Tregs matures et provenant de la recirculation sont également présents dans le thymus.

1.2 Différenciation des Tregs en périphérie

Les pTregs se développent en périphérie à partir de Tconvs naïfs. Certains sous-types de Tconvs ont une plus grande tendance à se convertir en pTregs. C'est le cas des RTE [55], ainsi que des LT provenant de souris nouveau-nés, ce phénomène pouvant s'expliquer par une proportion élevée de RTE [56] ou par des LT fortement auto-réactifs [57]. Le TGF- β a un rôle majeur dans ce processus. En plus de son rôle pour la survie et la maturation des tTregs dans le thymus, il est indispensable pour former des pTregs et induire l'expression de Foxp3 [58], [59]. En complément, l'IL-2 appuie également cette différenciation. En effet, sans IL-2, le TGF- β , en synergie avec l'IL-6, induira la différenciation des Tconvs en Th17 RoR γ T+ [60]. Le TGF- β permet d'induire l'expression du facteur de transcription RoR γ T+, caractéristique du lignage Th17. Ce facteur est également exprimé par certains pTregs et son induction est médié par c-Maf [61], [62].

Les pTregs et les tTregs étant générés selon des mécanismes différents, il n'est pas surprenant que leur répertoire TCR soit distinct. Les tTregs ont un répertoire TCR dirigé préférentiellement contre des antigènes du soi. Les pTreg réagissent plutôt à des antigènes commensaux, alimentaires ou des allergènes [63]. Une modification de la flore commensale du colon peut par exemple impacter le développement des pTregs [64]. Cependant, il semble que les répertoires TCR des tTregs et des pTregs se chevauchent. En effet, des pTregs peuvent également être dirigés contre des antigènes du soi [65]. Ce mécanisme viendrait en complément de la sélection négative ; des LT auto-réactifs y ayant échappé rencontreraient leur autoantigène cognitif en périphérie et deviendraient alors des pTregs.

Les pTregs se différencient préférentiellement dans des environnements spécifiques comme les muqueuses du poumon et du tube digestif, ainsi que dans les structures lymphoïdes qui y sont associées comme les plaques de Peyer ou les ganglions mésentériques. On y trouve une population de cellules dendritiques (CD) CD103+ qui permet la présentation des antigènes commensaux et produisent du TGF- β ainsi que de l'acide rétinoïque, ce qui favorise la génération des pTregs [66]. Des études récentes montrent également un rôle majeur de CPA Ro γ T+ tolérogènes dans l'induction des pTregs [67]. Dans le poumon, la différenciation des pTregs est également médié par le TGF- β , l'acide rétinoïque et via les macrophages alvéolaires résidents [68].

Les tTregs et les pTregs ont un phénotype très proche. Cependant, ils peuvent être distingués par l'expression de la neuropiline-1 (NRP1) et Hélios, un membre de la famille des facteurs de transcription Ikaros, qui sont exprimés par les tTregs mais pas les pTregs. De nombreuses études ont décrit Hélios comme étant exclusivement exprimé par les tTregs [69]. Cependant, ce marqueur est sujet à débat et des résultats contradictoires ont été décrits. Par exemple, dans des modèles murins favorisant ou limitant le développement préférentiel des tTregs ou des pTregs, il n'a pas été observé de modification du ratio entre les Tregs exprimant ou non Hélios [70]. Bien que la majorité des tTregs expriment NRP1, celui-ci peut être induit après activation sur des pTregs, ce qui ne permet pas non plus de l'utiliser comme marqueur exclusif des tTregs [71], [72]. Malgré ces controverses, ces deux marqueurs sont régulièrement utilisés dans la littérature pour différencier ces deux populations. Ils restent assez fiables dans des contextes non inflammatoires et permettent de donner en première intention une indication sur l'origine des Tregs, mais ne peuvent pas servir pour des conclusions définitives, surtout en contexte inflammatoire.

Cas particulier des iTregs. Des Tregs différenciés à partir de Tconv, on distinguera ceux différenciés in vivo que l'on nomme pTregs, comme décrits précédemment, de ceux différenciés in vitro, appelés Tregs induits ou iTregs. L'induction de ces Tregs est hautement dépendante du TGF- β et de l'IL-2.

Cependant, les iTregs ne reproduisent pas toutes les caractéristiques des pTregs induit in vivo ; leur étude ne permet donc pas d'élucider les mécanismes d'induction et les fonctions des pTregs [73].

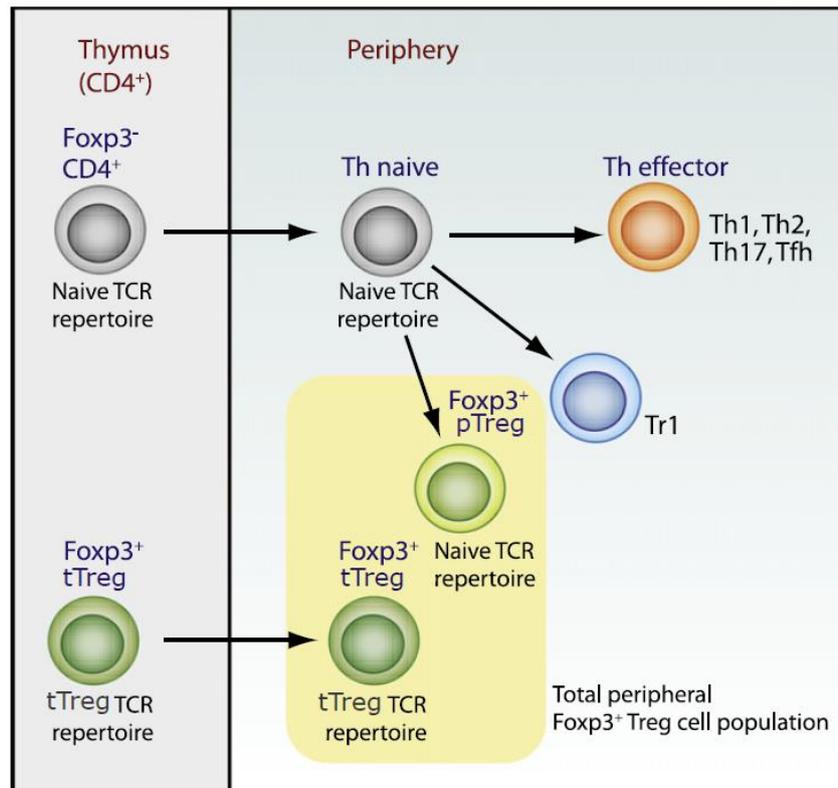


Figure 5. Lymphocytes T régulateurs thymiques et périphériques (tiré de [74]). Les Tregs thymiques (tTregs) se différencient dans le thymus et migrent ensuite dans les tissus périphériques. Les Tregs périphériques (pTregs) se différencient en périphérie à partir de LT conventionnels.

1.3 Evolution avec l'âge

L'environnement particulier chez le nouveau-né permettrait d'établir une tolérance immunitaire initiale dans divers tissus périphériques dépendant des Tregs. On observe tout d'abord une forte production de Tregs pendant les premières semaines de vie chez la souris. A la naissance, le pool de Tregs thymiques représente 0.09% des SP CD4⁺ ; ce pourcentage augmente avec l'âge pour atteindre 4% 21 jours après la naissance [75]. Les thymocytes SP CD4⁺ de nouveau-nés sont également plus susceptibles de générer des Tregs [56]. Par la suite, la génération de Tregs thymique chute avec l'âge, notamment du fait de la recirculation de Tregs de la périphérie vers le thymus qui vont inhiber cette différenciation [53], [51]. Bien que la génération de ces néo Tregs diminue avec l'âge, il n'y a pas de déclin en périphérie. Cela signifie qu'il y a des mécanismes compensatoires permettant de maintenir le pool de Tregs périphériques. Il a notamment été montré que les Tregs chez l'adulte avaient une meilleure survie, car ils exprimaient plus faiblement Bim, une molécule pro-apoptotique [76]. Les Tregs exprimant faiblement CD25 augmentent en proportion avec l'âge, tandis que les

niveaux d'IL-2 diminuent. Malgré cette diminution, ces cellules parviennent à assurer leur survie en devenant progressivement plus dépendantes de l'IL-15 plutôt que de l'IL-2 [76].

Au-delà de l'aspect quantitatif, le type de Tregs générés en fonction de l'âge des souris varie également. De la même manière que les Tconv, les Tregs néonataux sélectionnés dans le thymus sont plus auto-réactifs que ceux de l'adulte [18]. L'explication peut provenir d'une modification de la présentation des autoantigènes par les CPA thymique entre nouveau-nés et adultes, comme discuté précédemment [15], [16], [17]. Ou encore d'une diminution de l'expression des TRAs dans le thymus avec l'âge [14]. D'ailleurs, le développement des Tregs néonataux est très dépendant de l'expression de Aire. Son expression au cours des premières semaines de vie est suffisante pour protéger contre le développement de syndromes auto-immuns [15].

On peut alors se demander pour quelle raison ce pool important de Tregs fortement auto-réactifs est généré chez les souris nouveau-nées. Un travail important a montré que les Tregs générés chez les nouveaux nés sont retrouvés chez l'adulte dans la rate. Ils font donc partie du pool Tregs adultes bien qu'ils aient été développés précocement [15]. Ils expriment fortement la signature transcriptomique caractéristiques des Tregs, ont une signature de cellules activées, une meilleure capacité suppressive in vitro et seraient plus auto-réactifs que les Tregs générés chez l'adulte. Il a également été montré qu'ils exprimaient plus fortement des marqueurs associés à la fonction suppressive des Tregs [77]. La déplétion des Tregs générés dans les premières semaines de vie conduit au développement d'un syndrome auto-immun [15]. Une autre étude confirme la persistance chez l'adulte de Tregs générés chez les jeunes et leur capacité à contrôler l'auto-immunité chez l'adulte [78].

Durant les premières semaines suivant la naissance, l'exposition à des antigènes commensaux ou provenant de l'alimentation permettront le développement des Tregs spécifiques de ces antigènes dans les tissus en contact avec l'extérieur. Cette étape est indispensable pour établir une tolérance précoce dans certains types de tissus comme la peau ou le tube digestif. Dans la peau, il a été montré que la présentation d'antigènes commensaux par un sous type de CD était indispensable à la mise en place de Tregs tolérogène [79]. Ce mécanisme était beaucoup moins efficace chez l'adulte et ne permettait pas de mettre en place une tolérance suffisante contre les antigènes commensaux. De plus, la période néonatale semble cruciale pour la génération des Tregs de la peau qui seront indispensables pour établir une tolérance à long terme contre le microbiote colonisant ce tissu [80]. La période de sevrage qui s'accompagne d'une forte augmentation du microbiote intestinale est également une étape clef dans la mise en place de la tolérance intestinale, car elle permet le développement de Tregs ROR γ T+ indispensable à son maintien [61], [81]. Le type de pTregs se différenciant dans le colon est

également dépendant de l'âge de la souris. Chez les nouveau-nés, ces pTregs se caractérisent par l'expression du facteur de transcription GATA3, alors que ceux se différenciant après le sevrage expriment ROR γ T [82]. Ces différentes études montrent que la population de Tregs présente pendant la période néonatale a des caractéristiques et des fonctions particulières par rapport à celle générée après le sevrage et à l'âge adulte.

2. Identité des Tregs

Les Tregs sont essentiellement caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3, un membre de la famille des protéines de type FOX connues pour se fixer à l'ADN via leur motif « *forkhead* ». Chez l'homme, des mutations sur le chromosome X au niveau du gène codant pour *FOXP3*, entraîne une pathologie fatale appelée IPEX (pour *Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*) qui est associée à un déficit quantitatif ou fonctionnel des Tregs [33]. Un syndrome auto-immun similaire est également retrouvé chez les souris Scurfy qui ont une mutation dans *Foxp3* entraînant un défaut de développement des Tregs et causant la mort un mois après la naissance [32]. L'expression de Foxp3 est donc indispensable pour générer et maintenir l'identité des Tregs. Cependant, Foxp3 n'est pas le seul facteur nécessaire à l'acquisition de l'identité des Tregs. En effet, il a été mis en évidence que les patients présentant un syndrome caractéristique de l'IPEX ne possédaient pas toujours une mutation au niveau du gène codant pour *FOXP3* [83]. Cela suggère l'existence d'autres mécanismes clefs pour le développement des Tregs.

2.1 Foxp3 : régulateur majeur des Tregs

Foxp3 est défini comme étant le facteur de transcription essentiel au développement des Tregs. La régulation de son expression est finement contrôlée et est multifactorielle. Le locus *Foxp3* est constitué d'une région promotrice et de quatre régions enhancers connus (Figure 6). Au niveau de la région promotrice, les facteurs NFAT et AP-1 pourront se lier et participer à la régulation de Foxp3 à la suite d'un signal TCR [84].

Les quatre régions enhancers sont appelées séquences non codantes conservées : CNS0, CNS1, CNS2 et CNS3 (pour *Conserved Non-coding Sequences*). Il a été décrit que chacune de ces séquences avait un rôle dans l'induction et la maintenance de l'expression de Foxp3. Leur activité est régulée par la fixation de facteurs de transcription, et leur statut épigénétique, incluant l'ouverture de la chromatine, la méthylation de l'ADN et les modifications post-transcriptionnelles des histones. Satb1 est un facteur nucléaire qui a des propriétés de réorganisation de la chromatine. En se fixant sur le CNS0 dans les précurseurs thymiques des Tregs qui n'expriment pas encore Foxp3 ou CD25, il semble induire une modification de l'ouverture de la chromatine et aurait ainsi un rôle très précoce dans la différenciation des tTregs [85]. Puis, la sous-unité cRel du complexe NF- κ B (pour *Nuclear Factor kappaB*) se fixe sur le CNS3 [86]. Ce facteur participe au développement initial des Tregs suite à une activation TCR en remodelant la chromatine et en initiant la déméthylation des autres CNS, ce qui permettra aux facteurs de transcription de se lier au locus *Foxp3* [87]. Le CNS3 jouerait également un rôle précoce dans la différenciation des thymocytes en Tregs, en amont de l'expression de Foxp3. Une

étude récente suggère que le CNS0 et le CNS3 aurait un rôle coopératif ; en effet, la délétion du CNS0 ou du CNS3 n'impact que partiellement le développement des tTregs, alors que la délétion des deux empêche complètement la génération des tTregs [88].

Le CNS1 a majoritairement été décrit comme ayant un rôle dans l'induction des pTregs [86]. Le signal TGF β conduit à une translocation nucléaire de Smad3 qui se fixe sur cette région, induisant l'expression de Foxp3. De plus, l'acide rétinoïque permet également d'accroître la fixation de Smad3 sur cette région [89]. Cependant, un rôle dans la génération des Tregs thymique n'est pas exclu [59].

Le CNS2 a un rôle majeur dans le développement des Tregs et dans le maintien de l'expression de Foxp3. Il contient une région appelée TSDR (pour *T cell Specific Demethylated Region*) qui est retrouvée sous une forme déméthylée uniquement dans les Tregs [90]. La méthylation de l'ADN agit comme une marque répressive conduisant à la diminution de l'expression des gènes cibles. Il a été montré que les enzymes TET (pour *Ten-Eleven Translocation family enzyme*) permettent de médier la déméthylation de Foxp3, principalement au niveau du CNS2, pour permettre l'ouverture de la chromatine et le recrutement de protéines [91]. Foxp3 lui-même, en association avec d'autres facteurs, se fixe au CNS2 et permet de maintenir l'expression de Foxp3 au cours des divisions cellulaires [86]. Le CNS2 contient également des sites de fixation pour STAT5 (pour *Signal Transducers and Activators of Transcription 5*) qui est majoritairement activé par la signalisation IL-2 [92]. STAT5 faciliterait également l'action des enzymes TET au niveau du locus Foxp3. Pour maintenir ce statut déméthylé en condition inflammatoire, il a récemment été montré un rôle du facteur de transcription Blimp-1 par sa capacité à inhiber certaines enzymes responsables de la méthylation de l'ADN au niveau du CNS2 [93]. Le fonctionnement de CNS2 montre une régulation fine et nécessitant l'association de facteurs génétiques et épigénétiques sur le locus Foxp3.

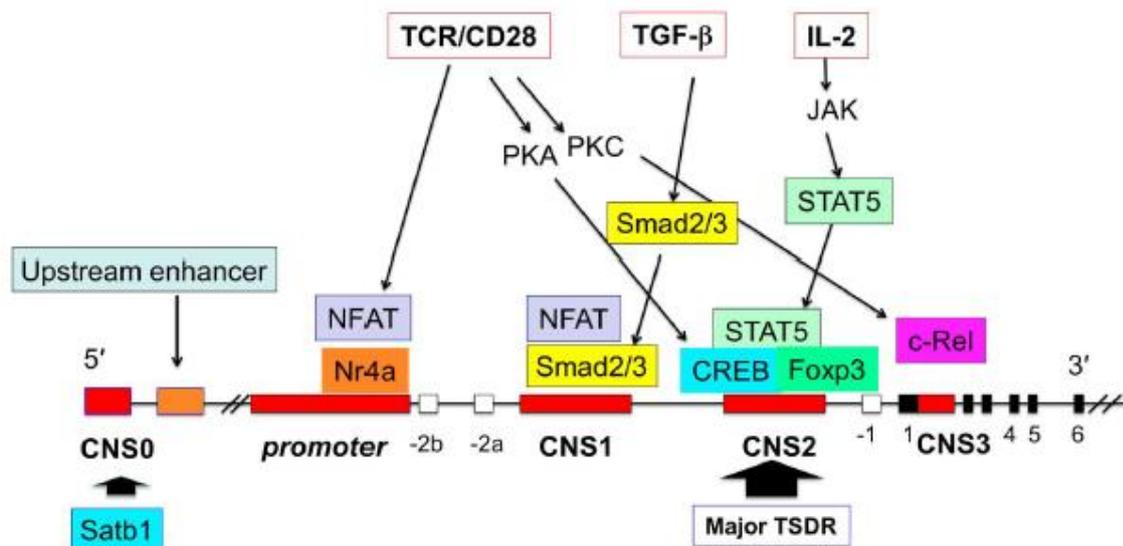


Figure 6. Partenaires intervenant dans la régulation du locus Foxp3 (tiré de [94]). Le locus Foxp3 est constitué d'une région promotrice et de quatre régions enhancers, connues comme des séquences non codantes conservées : CNS0, CNS1, CNS2 et CNS3 (pour *Conserved Non-coding Sequences*). Des signaux induits par la signalisation TCR ou par des cytokines comme le TGF- β et l'IL-2 permettront la fixation de facteurs de transcription sur les régions promotrices et enhancers. La méthylation de l'ADN participe à la régulation de Foxp3, notamment au niveau du CNS2 qui abrite une région déméthylée appelée TSDR (pour *T cell Specific Demethylated Region*).

2.2 Autres mécanismes de régulation

Le rôle clef de Foxp3 dans la biologie des Tregs a largement été décrit, cependant, plusieurs données montrent que ce facteur de transcription n'est pas le seul facteur permettant de définir l'identité des Tregs. Dans un modèle murin possédant une protéine Foxp3 non fonctionnelle, les Tregs alors appelés « Tregs wannabe », ne sont pas suppresseurs, mais présentent tout de même une signature transcriptionnelle qui leur est propre [95]. De plus, l'expression forcée de Foxp3 n'est pas suffisante pour acquérir et conserver une identité Tregs complète.

Les facteurs de transcriptions. De nombreux facteurs de transcription ont été décrits pour leur capacité à maintenir l'intégrité des Tregs [96], [97]. Certains par interaction avec Foxp3, on parle alors de Foxp3 interactome, d'autres en n'agissant pas directement avec Foxp3. Je décris ici certains travaux marquants montrant le rôle de facteurs de transcription, mais cette liste est loin d'être exhaustive. D'autres travaux sont également décrits dans d'autres chapitres de ce mémoire. L'acquisition de la signature Treg se ferait en coopération entre Foxp3 et l'un des cinq facteurs de transcriptions suivants : Eos, Irf4, Satb1, Lef1 et Gata1 [98]. Un seul de ces facteurs serait suffisant pour induire une signature presque complète des Tregs, soulevant la redondance de leurs actions. D'autres facteurs de transcription participent à l'identité des Tregs de manière indépendante à Foxp3. Foxo1, un facteur de

transcription de la même famille que Foxp3, est également important dans la biologie des Tregs [99]. Sa délétion induit un syndrome auto-immun fatal, similaire à celui observé chez les souris déficientes pour Foxp3. Il permet la suppression de gènes pro-inflammatoires incluant la voie de signalisation de l'interféron γ (IFN γ). SOCS1 (pour *Suppressor Of Cytokine Signaling 1*), un inhibiteur de la signalisation des cytokines, est également important pour maintenir la fonction des Tregs [100]. Les Tregs déplétés pour SOCS1 ont un phénotype pro-inflammatoire et sécrètent de grandes quantités d'IFN γ et d'IL-17.

La méthylation de l'ADN. L'activation du TCR induit une déméthylation sur des gènes importants dans l'identité des Tregs, comme CD25, CTLA-4, GITR et Eos, favorisant leur expression. Cette déméthylation est indépendante de Foxp3 et intervient de façon continue dans la vie des Tregs [101].

Les marques d'histones. PRC2 (pour *Polycomb Repressive Complexe 2*) permet de déposer une marque répressive au niveau de la lysine 27 de l'histone H3 de type triméthylation ; la marque prend alors le nom de H3K27me3. Son action est catalysée par l'enzyme EZH2 (pour *Enhancer of Zeste Homologue 2*). EZH2, qui est induit par la costimulation CD28, est nécessaire pour maintenir la répression de certains gènes faiblement exprimés dans les Tregs [102]. En condition inflammatoire, les Tregs s'activent et Foxp3 recrute le complexe PRC2 pour favoriser ce mécanisme de répression [103]. PRC1 (pour *Polycomb Repressive complexe 1*) reconnaît la marque H3K27 induite par PRC2 pour interagir à son tour avec la chromatine. Il est majoritairement décrit comme maintenant les marques répressives induites par PRC2. Récemment, il a été montré que PRC1 était également important dans la biologie des Tregs de manière indépendante à PRC2 [104]. Il permet de réprimer les gènes pro-inflammatoires associés au phénotype Th17.

Pour conclure, l'identité des Tregs est régulée de manière complexe et fait intervenir différents facteurs, qu'ils soient dépendants ou non de Foxp3. Elle n'est pleinement acquise que lorsque tous ces facteurs agissent de concert et coopèrent [105]. L'identité des Tregs est acquise progressivement au cours de leur développement, elle nécessite l'expression de Foxp3, mais aussi d'autres facteurs de transcription et des modifications épigénétiques. Elle est caractérisée par l'acquisition d'un phénotype suppresseur, mais également la répression de gènes impliqués dans des phénomènes inflammatoires.

2.3 Rôles et mécanismes d'action de Foxp3

Foxp3 est un régulateur majeur pour les Tregs et de nombreuses études ont cherché à comprendre ses mécanismes d'actions. Pourtant, tout n'est pas encore bien compris et des controverses persistent. Une difficulté majeure est de pouvoir distinguer les effets directs et indirects de Foxp3. Plusieurs études ont montré que Foxp3 pouvait agir de manière directe, indirecte ou en coopération avec d'autres facteurs pour activer ou réprimer des gènes (Figure 7).

Des expériences analysant la signature transcriptomique des Tregs dans différentes conditions ont mis en évidence des gènes impactés par l'expression de Foxp3. Parmi eux, on retrouve les gènes codants pour CD25, CTLA-4, NRP1 et GITR [106]. L'action de Foxp3 sur ces gènes est-elle directe ou non ? Une action directe semble possible pour les gènes codant pour NRP1 et CD25 qui possèdent un site de fixation à l'ADN reconnu par Foxp3, ce qui n'est pas le cas pour CTLA-4 et GITR. Plus largement, Foxp3 peut se lier sur les séquences régulatrices de nombreux gènes de la signature des Tregs [107]. Ces gènes étant sur-exprimés ou sous-exprimés par les Tregs, cela suggère que Foxp3 a une activité transcriptionnelle à la fois activatrice et répressive. Une étude récente corrobore ces données en démontrant que Foxp3 intervient dans différents complexes ayant des activités activatrices et répressives de la transcription [108].

La coopération de Foxp3 avec certains facteurs de transcription, comme NFAT, AML1 et Runx1, est à la fois impliquée dans la répression de l'IL-2 et de l'IFN γ , mais aussi dans l'augmentation d'expression des gènes codant pour CTLA-4, CD25 et GITR [109], [110]. Bien que Foxp3 participe à la régulation négative de gènes, il ne possède pas de domaine de répression actif de la transcription. Cette répression se ferait donc via d'autres facteurs. Il a été proposé que Foxp3 interagissait directement avec le facteur de transcription Eos, permettant de réprimer des gènes via des modifications épigénétiques au niveau des histones et de l'ADN [111]. Cette interaction est notamment nécessaire pour déposer des marques répressives sur le promoteur du gène codant l'IL-2 et supprimer son expression. L'axe IL-2/CD25 est très important et finement régulé dans les Tregs. Il joue un rôle crucial lors du développement des Tregs, dans le thymus et en périphérie, mais également tout au long de leur vie. Une boucle de régulation s'exerce entre les différents partenaires ; CD25 régule positivement l'expression de Foxp3 via STAT5 et Foxp3 lui-même régule positivement l'expression de CD25. Par ailleurs, Foxp3 étant également capable de réprimer la production d'IL-2, ce mécanisme fait des Tregs des cellules hautement dépendantes de l'IL-2 sans qu'elles en produisent.

Foxp3 exerce également un rôle indirect en agissant sur des facteurs de transcription qui régulent eux-mêmes de nombreux gènes. Par exemple, Foxp3 permet de diminuer directement l'expression de *Tcf7*, codant pour TCF1, un régulateur positif de l'accessibilité à la chromatine dans les Tconv [112]. Ce fut mis en évidence dans un modèle murin possédant une protéine Foxp3 non fonctionnelle. Les cellules résultantes sont appelées Tregs « *wannabe* » et sont identifiées grâce à l'expression de la protéine rapportrice GFP. Ces cellules perdent une partie de la signature des Tregs, associé à l'expression de Foxp3, mais conserve la part de la signature qui est indépendante de Foxp3.

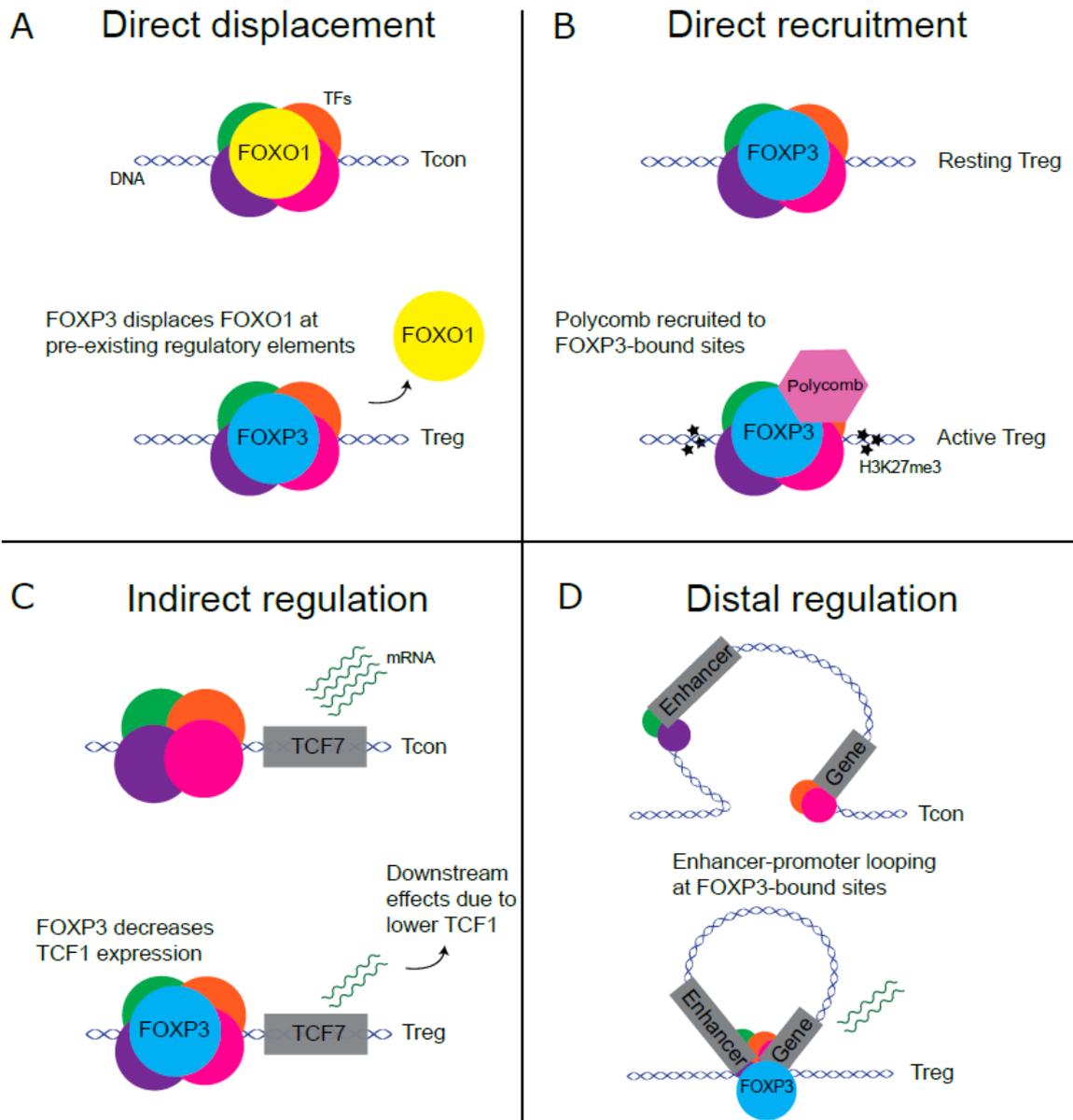


Figure 7. Mécanismes d'action de Foxp3 (tiré de [113]). (A) Foxp3 peut interagir avec des régions régulatrices déjà mises en place et remplacer un facteur de transcription comme Foxo1. (B) Foxp3 peut recruter le complexe Polycomb pour modifier les histones et déposer des marqueurs répressifs. (C) Foxp3 régule d'autres facteurs de transcription, agissant à leur tour sur de nombreux gènes. Il régule par exemple négativement le gène codant pour TCF1. (D) Foxp3 interagit pour créer des boucles entre les enhancers et les gènes cibles, facilitant leur transcription.

D'un point de vue mécanistique, plusieurs modes d'action de Foxp3 ont été décrits (Figure 7). Il a été montré qu'il se fixait à des régions précédemment occupées par Foxo1, suggérant qu'il agit sur des régions régulatrices qui étaient déjà fonctionnelles dans les précurseurs des Tregs avant l'expression de Foxp3 [114]. D'un autre côté, après activation des Tregs, Foxp3 peut recruter d'autres facteurs de transcription comme PRC2 pour déposer de nouvelles marques épigénétiques en cis [103]. Il a récemment été montré, dans une étude s'intéressant à la conformation de la chromatine, que

Foxp3 pouvait augmenter la transcription de certains gènes en favorisant la formation de boucles entre enhancers et promoteurs [115]. La régulation de l'identité des Tregs par Foxp3 est donc complexe, dynamique et implique des multiples interactions. Cette diversité d'actions pourrait contribuer à l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle de cette population cellulaire. Les mécanismes décrits ici ne sont pas exhaustifs et de nombreuses fonctions et mode d'action de Foxp3 demeurent encore méconnues.

Parmi les protéines faisant partie de la signature Tregs, il a été suggéré que l'expression de certaines n'est pas dépendante de l'expression de Foxp3, comme Hélios et Granzyme B [116]. Hélios par exemple est exprimé fortement par les précurseurs des Tregs n'exprimant pas encore Foxp3.

2.4 Différence entre la souris et l'Homme

Grâce aux nombreux outils et modèles génétiques disponibles chez la souris, la grande majorité des travaux s'intéressant aux aspects mécanistiques de la biologie des Tregs ont été faits dans des modèles murins. Cependant, les Tregs murins et humains présentent certaines différences, notamment au niveau de leur phénotype. Il a été établi que Foxp3 était un marqueur suffisant pour discriminer les Tregs des Tconv dans les modèles murins. Cette observation a été largement confirmée grâce à l'utilisation de modèles génétiques de souris rapporteuses de l'expression de Foxp3. Chez l'Homme, Foxp3 est bien entendu exprimé par les Tregs mais on peut également trouver une expression de ce facteur dans les Tconv après activation. Contrairement aux Tregs, cette expression est faible et transitoire [117]. Pour CD25, on retrouve le même problème chez l'Homme et la souris. Il est également exprimé par les Tconv après activation, ce qui n'en fait pas un marqueur exclusif. Comme pour Foxp3 chez l'Homme, le CD25 est exprimé faiblement et de façon transitoire dans les Tconv activés. Le récepteur à l'IL-7, le CD127, est faiblement exprimé par les Tregs humains par rapport aux Tconv [118]. Cette expression réduite de CD127 a été considérée comme une caractéristique des Tregs stables et fonctionnels. Cependant, d'autres études ont montré que les Tconv activés avaient également une expression réduite du CD127 dans certaines situations inflammatoires [119], [120]. Ainsi, bien qu'aucun de ces marqueurs ne soit pas exclusif des Tregs, l'analyse simultanée de CD25 (élevé), de CD127 (faible) et de Foxp3 permet de mieux définir la population des Tregs parmi les LT CD4+ humains. Il a été également proposé de combiner l'expression de CD25 (ou Foxp3) avec CD45RO ou CD45RA pour distinguer les Tregs des Tconv activés chez l'homme [121]. On a alors une population de Tregs activés qui expriment fortement le CD25 et Foxp3 et qui sont CD45RO+CD45RA-, une population des Tregs naïfs qui expriment des niveaux intermédiaires de CD25 et Foxp3 et qui sont CD45RO-CD45RA+ et enfin une population de Tconv activés qui expriment aussi des niveaux intermédiaires de CD25 et Foxp3 et qui sont CD45RO+CD45RA-.

3. Stabilité des Tregs

3.1 Définition

Nous venons de voir que l'identité des Tregs est très liée à l'expression de Foxp3. A cela, on peut y ajouter l'identité fonctionnelle qui pourrait se définir par leur activité suppressive. La stabilité des Tregs est souvent définie par leur capacité à maintenir l'expression de Foxp3 et leur fonction suppressive. Une autre définition serait leur maintien de leur seule capacité suppressive. En effet, il a été décrit des Tregs « fragiles » qui seraient des cellules qui ont perdu leur fonction suppressive tout en gardant l'expression de Foxp3 [122]. En revanche, des cellules qui auraient perdu Foxp3 tout en maintenant une fonction suppressive ne semble pas possible dans la mesure où Foxp3 est indispensable à cette fonction [123]. Ici, nous prendrons comme définition de la stabilité celle qui est la plus couramment étudiée et qui semble avoir le plus de sens biologique, à savoir le maintien de l'expression de Foxp3 qui est le plus souvent associé au maintien de leur fonction suppressive.

L'épigénétique est décrite comme un paramètre impactant fortement la stabilité. Les régions déméthylées du locus *Foxp3*, en particulier au niveau du CNS2, sont indispensables pour maintenir l'expression de Foxp3. En effet, lorsque cette région est méthylée, l'expression de Foxp3 n'est pas stable dans le temps. Les iTregs, générés in vitro à partir de Tconvs naïf et ayant acquis l'expression de Foxp3, sont largement décrits comme étant instables suite à leur transfert in vivo [101]. Ils perdent l'expression de Foxp3 ainsi que leur capacité suppressive. Ces Tregs générés artificiellement ne possèdent pas le profil de méthylation de l'ADN caractéristique des Tregs et qui leur confère leur identité complète en association avec l'expression de Foxp3. Le profil de méthylation de l'ADN peut également différer entre les tTregs et les pTregs. En effet, bien que la déméthylation des locus spécifiques des Tregs soit également observée dans les pTregs, elle n'est pas aussi appuyée [72]. De ce fait, il est souvent suggéré que les pTregs, dû à cette méthylation, seraient plus susceptibles à la perte de Foxp3 que les tTregs. L'importance de la méthylation, notamment du locus CNS2, est également soulevé par des études montrant que l'expression de Foxp3 peut être stabilisé dans les iTregs par la vitamine C qui active la fonction des enzymes TET [124].

Il est important de souligner qu'il semble que la stabilité de ces cellules soit acquise progressivement après leur différenciation quel que soit le type de Tregs (tTregs, pTregs ou iTregs). Ainsi, les Tregs les plus instables sont les cellules NRP1- qui sont à la fois des tTregs récemment différenciés et des pTregs [125]. Ce résultat est en accord avec le fait que les tTregs récemment différenciés ne sont que partiellement déméthylés au niveau du CNS2 de *Foxp3* [90]. Enfin, les pTregs

et les iTregs peuvent acquérir un niveau avancé de déméthylation au niveau du CNS2 de *Foxp3* après plusieurs cycles de stimulation ou à un stade avancé de différenciation [85], [90].

Les Tregs ayant perdu l'expression de *Foxp3* sont appelés exTregs. Cette appellation peut être discutée puisqu'en effet, d'un côté, l'expression de *Foxp3* ne suffit pas pour acquérir l'identité complète des Tregs [105] et de l'autre côté, l'absence de *Foxp3* dans les Tregs « *wannabe* » ne génère qu'une perte partielle de leur identité Treg. Cependant, ces cellules n'acquièrent pas de fonction suppressive [95]. Il devient alors nécessaire de comprendre ce que deviennent ces cellules et quel est leur rôle dans le système immunitaire. Cependant, l'origine, le phénotype, l'identité et la fonction de ces exTregs sont toujours débattus dans la littérature. Les tTregs possèdent un TCR avec une affinité moyenne à forte pour les antigènes du soi, ce qui ferait des exTregs des cellules auto-réactives. En théorie, ces cellules ayant perdu leur rôle de régulateur pourraient acquérir des propriétés pro-inflammatoires, ce qui serait d'une part délétère dans les pathologies auto-immunes, et d'autre part bénéfique dans les cancers en favorisant l'immunité antitumorale.

3.2 Etude des exTregs in vitro

L'approche la plus simple pour étudier la stabilité des Tregs reposait sur des modèles in vitro qui examinaient la perte de *Foxp3* dans diverses conditions. La stimulation CD3/CD28 de Tregs purifiés en présence d'IL-6 induisait la perte de *Foxp3* [126]. Ils produisaient alors de l'IL-17 et ont donc été décrits comme ayant un profil Th17. Ce mécanisme était dépendant du TGF- β endogène. En effet, en présence d'inhibiteur du récepteur de TGF- β , les Tregs ne se différenciaient plus en Th17. Une seconde étude a montré que cette conversion était limitée par l'ajout de TGF- β et d'IL-2 dans le milieu de culture [127]. Cela limitait la perte d'expression de *Foxp3* et la production d'IL-17, probablement via la modulation de l'expression du récepteur à l'IL-6 qui était diminuée. De plus, la délétion de STAT3, qui est un des facteurs de la signalisation de l'IL-6, limite également la perte d'expression de *Foxp3* [128]. Le CNS2 joue un rôle important dans ces mécanismes. Cette séquence agit comme un senseur des cytokines via les protéines STATs, qui vont respectivement promouvoir la stabilité des Tregs, comme avec l'IL-2, ou au contraire entraîner la perte *Foxp3*, comme avec l'IL-6 ou l'IL-4 [129]. En se basant sur ces études, la perte de *Foxp3* serait donc fortement dépendant de l'environnement cytokinique dans lequel se trouvent les Tregs. La question se pose alors de savoir comment réagissent ces cellules in vivo dans des environnements différents et où la disponibilité en cytokine varie en fonctions des tissus ou de certaines conditions pathologiques.

3.3 Etude des exTregs in vivo

Les études sur les exTregs sont compliquées, car à l'exception d'un article récemment publié [130], il n'y a pas de marqueur connu permettant de les distinguer sans équivoque des Tregs et des Tconvs. A l'heure actuelle, le rôle et l'existence même des exTregs sont toujours controversés. Une première approche pour les étudier in vivo consiste à réaliser des transferts adoptifs dans des modèles murins. Les Tregs du donneur seront identifiés dans les souris receveuses en utilisant des marqueurs congéniques. Les Tregs ayant perdu Foxp3 après leur transfert in vivo pourront donc facilement être suivis chez les souris receveuses. Cependant, cette technique pose plusieurs limitations.

Premièrement, la population de Tregs du donneur doit être purifiée, ce qui peut compromettre l'intégrité de la cellule et altérer leurs propriétés. De plus, les Tregs transférés chez des souris non lymphopéniques constituent des cellules très rares, compliquant fortement la caractérisation de leur phénotype et leur fonction. Le nombre de Tregs du donneur est de l'ordre de quelques milliers dans une rate entière [131] et ils sont quasi indétectables dans les tissus non-lymphoïdes. Le contexte n'est donc pas favorable à voir si une fraction de ces cellules a perdu l'expression de Foxp3.

Pour contourner cette limitation majeure, les travaux publiés utilisent des receveurs lymphopéniques. Cependant, cette condition s'éloigne de la physiologie d'une souris à l'homéostasie. En effet, les Tregs du donneur, lorsqu'ils sont transférés seuls, subissent d'une part une forte prolifération, appelée prolifération induit par la lymphopénie, et d'autre part sont dans un contexte très appauvri en IL-2 du fait de l'absence de Tconvs. C'est donc une situation très peu physiologique, mais qui est en même temps très favorable à la formation d'exTregs, notamment du fait de la faible concentration en IL-2 [129], [132]. Il a été montré que les Tregs purifiés perdaient ainsi l'expression de Foxp3 de manière spontanée après transfert adoptif [133]. Les exTregs ainsi générés avaient un phénotype de Tconvs effecteurs et produisaient des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2, l'IL-17 et l'IFN γ [134]. Ils perdaient également l'expression de marqueurs clefs de la signature Tregs comme le CD25, GITR et CTLA-4, ainsi que leur capacité régulatrice. Ils pourraient alors favoriser l'apparition de pathologies auto-immunes [135].

Des travaux ont cherché à savoir si un type de Tregs avait une plus forte propension à perdre Foxp3 dans ces conditions. Un travail suggère que les Tregs exprimant faiblement CD25 seraient plus aptes à devenir exTregs [135], ce qui n'a pas été confirmé dans une autre étude [136]. Comme déjà décrit plus haut, les tTregs les plus récemment différenciés et les pTregs, identifiés par l'absence d'expression de NRP1, seraient les cellules les plus susceptibles de devenir exTregs [125]. Bien que ces

études soient un premier pas dans la compréhension des exTregs, il est nécessaire de les étudier dans des modèles plus physiologiques.

3.3.1 Principe du modèle CreLox

Les exTregs sont définis comme étant des cellules qui ont exprimé Foxp3 à un moment puis ont perdu cette expression. Ainsi, pour pouvoir identifier in vivo les exTregs dans des conditions physiologiques, il est nécessaire de pouvoir visualiser l’empreinte de l’expression de Foxp3. C’est sur ce principe que reposent les modèles dits de « *fate mapping* », qui permettent de suivre et de retracer le destin de cellules spécifiques in vivo. Le modèle majoritairement utilisé dans la littérature est le modèle CreLox. Il se base sur les propriétés de la recombinaise Cre, une enzyme dérivée du bactériophage P1 permettant de recombiner des séquences d’ADN pour faciliter son cycle de vie dans l’hôte. La Cre est capable de recombiner des séquences d’ADN comprises entre deux sites de reconnaissances « LoxP » de 34 paires de bases [137]. De nombreux modèles de souris génétiquement modifiées ont donc été construits pour manipuler le génome et induire la délétion de certains segments d’ADN d’intérêt.

Le système CreLox dans l’étude des Tregs repose sur l’utilisation de souris génétiquement modifiées dans lesquels la Cre est exprimée sous le contrôle des séquences régulatrices de *Foxp3* dont l’expression est spécifique des Tregs chez la souris. Une protéine fluorescente rapportrice de l’expression de Foxp3 est également insérée. Ce modèle est normalement conditionnel, la Cre et la protéine fluorescente rapportrices ne seront exprimées que dans les cellules exprimant Foxp3. Pour pouvoir suivre les cellules ayant exprimé à un moment donné Foxp3, une seconde protéine fluorescente rapportrice est utilisée. Elle est insérée dans le locus du gène *Rosa26*, un ARN non codant exprimé de façon ubiquitaire [138]. L’expression de cette seconde protéine est bloquée par une cassette stop, encadrée de deux sites LoxP, en amont du gène. Lorsque Foxp3 est exprimé, la Cre recombinera les sites LoxP et la seconde protéine fluorescente sera exprimée. La délétion des séquences LoxP étant au niveau de l’ADN, elle sera maintenue tout au long de la vie de la cellule et de ses cellules filles. Si l’expression de Foxp3 est perdue, la seconde protéine rapportrice de la fluorescence sera toujours exprimée.

Ce système permet la visualisation par cytométrie en flux de trois sous population de LT CD4+ en se basant sur l’expression des deux protéines fluorescentes rapportrices (Figure 8) : Les Tconv, n’ayant jamais exprimé Foxp3, les Tregs exprimant Foxp3 et la seconde protéine fluorescente rapportrice, que l’on peut appeler TagTreg (pour *Tagged Tregs*), et les exTregs ayant exprimé Foxp3, recombinant l’ADN situé entre les sites LoxP, exprimant alors seulement la deuxième protéine

fluorescente. Dans la littérature, différentes combinaisons de ces deux protéines fluorescentes ont été utilisées.

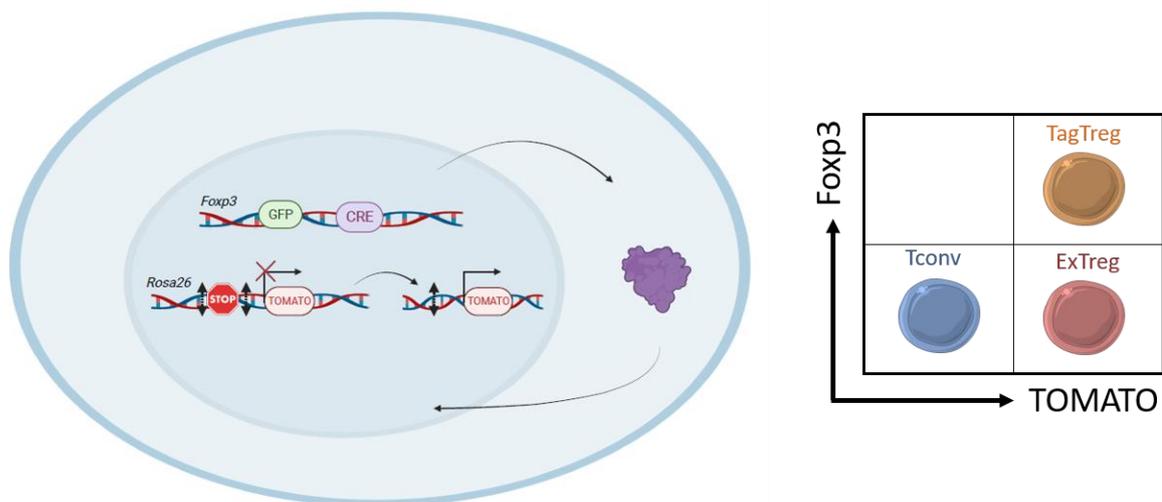


Figure 8. Le système CreLox. La recombinaise Cre est sous le contrôle du promoteur Foxp3, la GFP reflète l'expression de Foxp3. Lorsque la Cre est active, elle permettra de recombiner une cassette STOP située entre deux sites LoxP et bloquant la transcription de la protéine fluorescente TOMATO. Trois sous populations pourront alors être détectées par cytométrie en flux : les LT conventionnels (Tconv) n'exprimant ni Foxp3 ni la TOMATO. Les Tregs exprimant Foxp3 et la TOMATO, alors appelés TagTreg. Pour finir, les ExTreg ayant exprimés Foxp3 et recombines la cassette STOP, mais ayant perdu l'expression de Foxp3. Créé avec BioRender.

3.3.2 ExTregs étudiés avec le système CreLox ou par transfert adoptif

Les études utilisant le modèle CreLox montrent que les exTregs sont présents à l'état basal et qu'ils s'accumulent avec le temps ou en conditions inflammatoires [133], [139]. La figure 9 récapitule les différents modèles CreLox utilisés dans la littérature. Il est à noter que certaines études ont été générées en utilisant un modèle de souris transgénique dans lequel la Cre, sous le contrôle du promoteur de Foxp3, est insérée via un chromosome bactérien artificiel (BAC-Cre^{GFP}). Il a été montré que ce modèle permettait de marquer préférentiellement les tTregs [140]. Ces différentes études semblent s'accorder sur la description de leur phénotype et leur statut pro-inflammatoire. Cependant, leur origine et les mécanismes conduisant à leur induction sont souvent contradictoires.

Phénotype. Les exTregs ont un phénotype à l'interface entre celui des Tregs et des Tconvs [135]. Ils perdent l'expression de marqueurs majeurs décrits dans la signature des Tregs comme CD25, GITR, CTLA-4, OX40 et CD103 [139], [141]. Ils acquièrent également un phénotype de Tconvs activés, par exemple, dans les plaques de Payer, les exTregs acquièrent un phénotype similaire aux LT helper folliculaires exprimant CCR5 et PD-1 [142]. En étudiant le profil transcriptomique d'exTregs venant d'être générés par rapport à ceux générés depuis une plus longue période, trois types de signatures

ont pu être mises en évidence [125]. Une signature rapidement acquise et incluant des marqueurs directement régulés par Foxp3, une signature transitoire qui permettrait la reprogrammation des exTregs et une signature plus tardive incluant des marqueurs d'activation et des cytokines pro-inflammatoires.

Fonction. Les exTregs analysés par transfert adoptif ou avec le système CreLox produiraient des cytokines pro-inflammatoires caractéristiques des Tconvs effecteurs, comme l'IL-17, l'INF γ et l'IL-2 [125], [139], [142]. Certaines études montrent qu'ils produisent ces cytokines à des niveaux plus importants que les Tconvs [133]. Ces données suggèrent un rôle pro-inflammatoire des exTregs. En effet, ils ont une capacité similaire à celle des Tconvs pour induire une EAE passive après transfert adoptif [143]. Les exTregs seraient des cellules fonctionnelles et donc potentiellement pathogènes dans des immuno-pathologies.

Contexte inflammatoire. Bien que les exTregs soient présents à l'homéostasie, leur génération serait accrue dans différents contextes inflammatoires et pathologiques. Les exTregs ont un phénotype similaire au Th1, Th2 ou Th17, dépendamment du contexte inflammatoire dans lequel ils sont générés [135], [141]. La proportion et le nombre d'exTregs sont augmentés à la fois dans des pathologies auto-immunes et dans des modèles de cancer [133], [143], [144].

Origines.

Statut d'activation. Les exTregs venant d'être générés expriment le transcrite du gène codant pour CD62L, un marqueur de cellules naïves. Cependant, la stabilité après transfert adoptif de Tregs naïfs exprimant CD62L ou de Tregs activés exprimant CD44 était similaire, suggérant que les exTregs ne dérivent pas préférentiellement d'une de ces populations [125]. Au contraire, d'autres études suggèrent que les Tregs effecteurs et activés auraient une plus grande disposition à générer des exTregs [142]. De plus, une proportion d'exTregs plus importante est observée dans certains tissus non lymphoïdes où les Tregs sont plus activés.

pTregs ou tTregs. La distinction entre pTregs et tTregs peut se faire suivant plusieurs critères comme leur répertoire TCR, l'expression de NRP1 et la méthylation de l'ADN associé à la signature Tregs. L'étude du répertoire TCR des exTregs montrent des similitudes à la fois avec les Tregs et les Tconvs [133]. L'étude de la méthylation de l'ADN des exTregs suggère également une origine à la fois des tTregs et pTregs, puisqu'elle a des similitudes avec celle des Tregs et des Tconvs [135]. Dans des modèles murins transgéniques permettant de suivre préférentiellement les tTregs, il a été montré que ces Tregs étaient plus stables, suggérant que les exTregs sont générés majoritairement à partir des pTregs [142]. De plus, après transfert adoptif dans des souris receveuses lymphopéniques, une

proportion plus importante de pTreg ou de Tregs n'exprimant pas NRP1 forme des exTregs par rapport aux tTregs ou aux Tregs exprimant NRP1 [125], [145]. Les mêmes auteurs ont également montré que parmi les tTregs générant des exTregs, une proportion provenait des RTE. De manière contradictoire, d'autres études montrent que le niveau d'expression de NRP1 et d'Hélios est similaire entre les exTregs et les Tregs [135], [139]. Il semblerait donc que les exTregs peuvent être générés à la fois à partir des pTregs et des tTregs. L'étude de l'origine des exTregs dans des contextes inflammatoires montrent une forte instabilité des pTregs, suggérant que l'origine des exTregs est dépendante du contexte inflammatoire. Cependant, les conclusions de ces études se basent majoritairement sur la stabilité des pTregs après un transfert adoptif dans des souris receveuses lymphopénique ou ayant une inflammation.

Modèle génétique	Proportion d'exTregs	Age des souris	Date	Papier
BAC-Cre ^{GFP} Rosa ^{YFP}	LN : 10% Rate : 17%	6-9 Semaines	2009	[133]
Cre ^{YFP} Rosa ^{RFP}	Thymus : 5% Rate : 20% LN : 15% Intestin : 20% Colon : 12%	7 Semaines	2012	[139]
BAC-Cre ^{GFP} Rosa ^{YFP ou RFP}	? : 6% CNS (EAE) : 8% (non spécifique du MOG) 20% (spécifique du MOG)	6 semaines	2013	[143]
BAC-Cre ^{GFP} Rosa ^{YFP}	Rate : 5% (Parmi CD4+) LN : 2,5% (Parmi CD4+)	-	2014	[135]
Cre ^{YFP} Rosa ^{RFP}	-	-	2017	[141]
BAC-Cre ^{GFP} Rosa ^{RFP}	Cancer : dLN : 17% Tumeur : 25%	-	2018	[144]
BAC-Cre ^{GFP} Rosa ^{RFP}	LN : 10%	-	2018	[145]
Cre ^{YFP} Rosa ^{RFP}	Rate : 25%	> 8 Semaines	2021	[125]

Figure 9. Tableau Récapitulatif des études utilisant le modèle CreLox.

Expression transitoire de Foxp3. Il a été proposé de revoir l'interprétation des données obtenues par transfert adoptif ou en utilisant le modèle CreLox en suggérant au contraire que la population de Tregs serait stable dans son ensemble même en condition inflammatoire [134], [139]. Ces auteurs proposent le modèle suivant : Les exTregs seraient en fait un état transitoire à la fois pour des Tconvs exprimant transitoirement Foxp3 et pour des Tregs perdant l'expression de Foxp3 mais ayant la capacité de la réacquérir (Figure 10). Après stimulation, les exTregs redevenant Foxp3 positifs expriment Hélios, ont une région TSDR déméthylé et des capacités suppressives. Au contraire, ceux restant des exTregs sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et ont une région TSDR méthylé. Ils suggèrent également que ces exTregs proviennent majoritairement des cellules n'exprimant pas CD25.

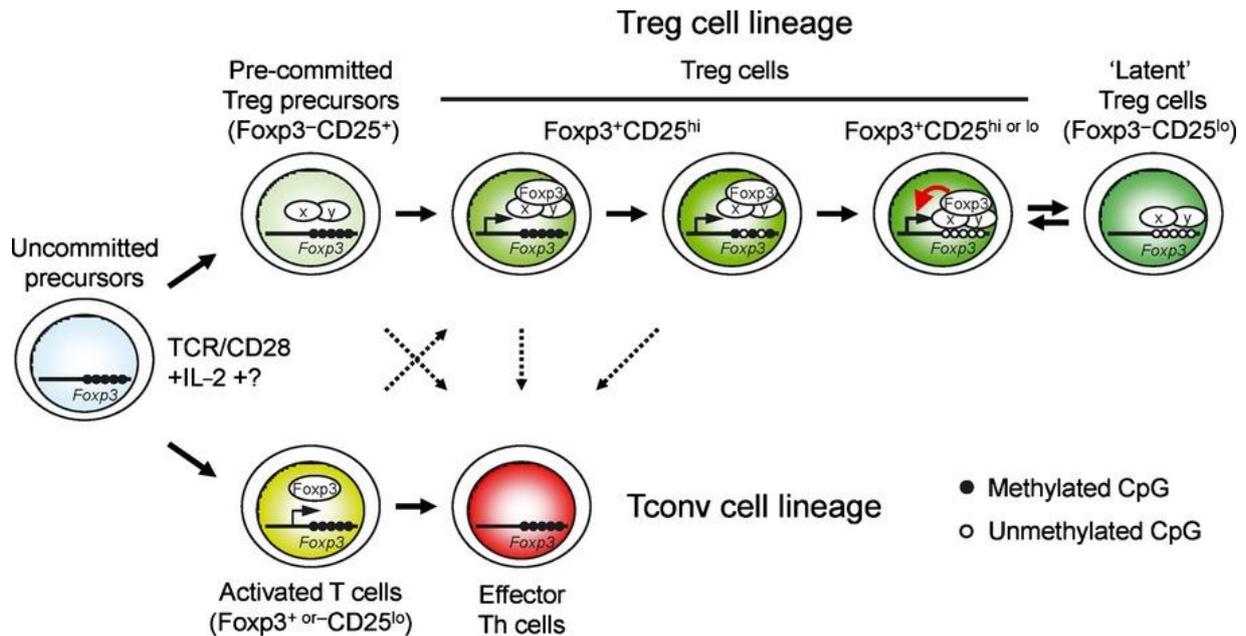


Figure 10. Modèle proposé expliquant l'état transitoire des exTregs (tiré de [146]). Les précurseurs des LT se développent en LT conventionnels (Tconv) ou en Tregs suivant plusieurs signaux fournis par leur environnement. L'appartenance au lignage Tregs serait déterminé avant l'expression de Foxp3 dans les précurseurs. Les Tregs acquièrent progressivement les différentes caractéristiques de leur lignage comme l'expression de Foxp3, d'autres facteurs de transcription et des marques épigénétiques. Une fois impliqué dans cette voie, les Tregs y restent engagés et gardent en mémoire les caractéristiques qu'ils ont déjà acquises. D'un autre côté, des Tconvs activés exprimant Foxp3 ne peuvent pas s'engager pleinement dans le lignage Tregs, car ils n'arborescent pas les autres caractéristiques nécessaires et perdront donc rapidement l'expression de Foxp3.

Cependant, ce modèle est débattu dans la littérature et des données plus récentes contredisent ces résultats [125]. Via des transferts adoptifs successifs, il est montré que parmi la population de Tregs une fraction des cellules est instable pouvant devenir des exTregs et qu'une autre fraction est stable, restant des Tregs même après plusieurs challenges. Les exTregs ne provenaient pas préférentiellement de cellules n'exprimant pas CD25. Tous les Tregs n'auraient pas le même niveau de stabilité. Certains seraient stables alors qu'une sous-population de Tregs serait prédisposée à perdre Foxp3. En revanche, ils révèlent via un modèle mathématique que les exTregs ne proviennent pas de Tconvs exprimant transitoirement Foxp3. Ils ont utilisé un modèle murin génétiquement modifié, *Foxp3^{DTR}*, dans lequel les cellules exprimant Foxp3 peuvent être éliminées de manière spécifique en administrant de la toxine diphtérique. Après transfert adoptif dans un hôte lymphopénique, une proportion de Tregs se différencie en exTregs. L'administration de la toxine permet d'éliminer les Tregs sans toucher aux exTregs. Ils reconstituent ensuite ces souris via des Tregs CreLox et montrent que l'environnement lymphopénique favorable à la formation d'exTregs est atténué. Dans ce modèle, les exTregs n'avaient pas la capacité de regagner l'expression de Foxp3. De plus, même si l'expression de Foxp3 ou le statut d'exTregs n'est que transitoire, ces cellules sont fonctionnelles et potentiellement

pathologiques. Elles apparaissaient clairement distinctes à la fois des Tregs et des Tconvs, appuyant l'intérêt de comprendre leur rôle dans les réponses immunitaires.

Le système CreLox a fourni des résultats intéressants sur l'étude des exTregs. Cependant, depuis la publication de ces articles, il est maintenant reconnu que ce modèle a un problème de fuite d'expression de la Cre. L'expression de la protéine fluorescente rapportrice indiquant la délétion de la cassette STOP a été observée dans des cellules non Tregs et même non immunitaires, montrant que le modèle n'est pas spécifique des Tregs [147]. Les causes de cette fuite sont mal connues. Il pourrait s'agir d'une expression transitoire et aléatoire de Foxp3 durant le développement embryonnaire dans différents sous types cellulaires. Néanmoins, ce problème conduit à l'apparition de cellules non Tregs exprimant la protéine fluorescente rapportrice de l'activité de la Cre. Les LT CD4+ affectés par cette fuite seraient alors confondus avec des exTregs. Cela remet grandement en cause l'identification des exTregs étudiés dans le modèle CreLox et remet en cause l'interprétation de la plupart de ces résultats.

3.3.3 ExTregs étudiés avec le système CreLox inducible

Pour contrecarrer ce problème, un second modèle peut être utilisé : Le système CreLox inducible (Figure 11) [137]. La Cre est fusionnée avec un récepteur aux œstrogènes qui est modifié pour ne reconnaître qu'un analogue exogène, le tamoxifène. La conformation de cette Cre inducible entraîne sa rétention dans le cytoplasme de la cellule. En présence de tamoxifène, la Cre change de conformation, libérant une séquence d'import nucléaire pour qu'elle puisse migrer dans le noyau où elle pourra exercer son rôle de recombinaison. La protéine fluorescente rapportrice de l'activité de la Cre est exprimée uniquement lorsque les souris sont traitées au tamoxifène.

Ce modèle est spécifique des Tregs, mais plusieurs paramètres supplémentaires y sont ajoutés. Tout d'abord, le tamoxifène n'est pas hydrosoluble, il doit être administré dans une solution lipidique. Différentes concentrations et voies d'administrations ont été utilisées dans la littérature avec des efficacités variables en termes d'induction d'activité de la Cre. Lorsque cette activation n'est pas suffisante, une proportion non négligeable de Tregs n'aura pas recombinaison de la cassette STOP et donc n'exprimera pas la protéine rapportrice, ce qui est souvent observé dans la littérature. Ces Tregs n'ayant pas eu accès au tamoxifène sont dits « non tagués » et peuvent être confondus avec des Tregs qui seraient générés après le traitement tamoxifène, appelé nouveau ou néoTregs. Les sous-populations de LT CD4+ que l'on peut observer par cytométrie en flux sont identifiées selon l'expression des protéines fluorescentes reflétant l'expression de Foxp3 ou l'activité de la Cre (Figure 10). Dans la littérature, plusieurs modèles génétiques sont proposés avec différentes combinaisons de ces protéines. Ce paramètre est également important, car il peut impacter la qualité de la détection

des exTregs. De plus, ce système étant inducible, il offre de nombreuses possibilités pour suivre l'évolution de la population de Tregs au cours du temps.

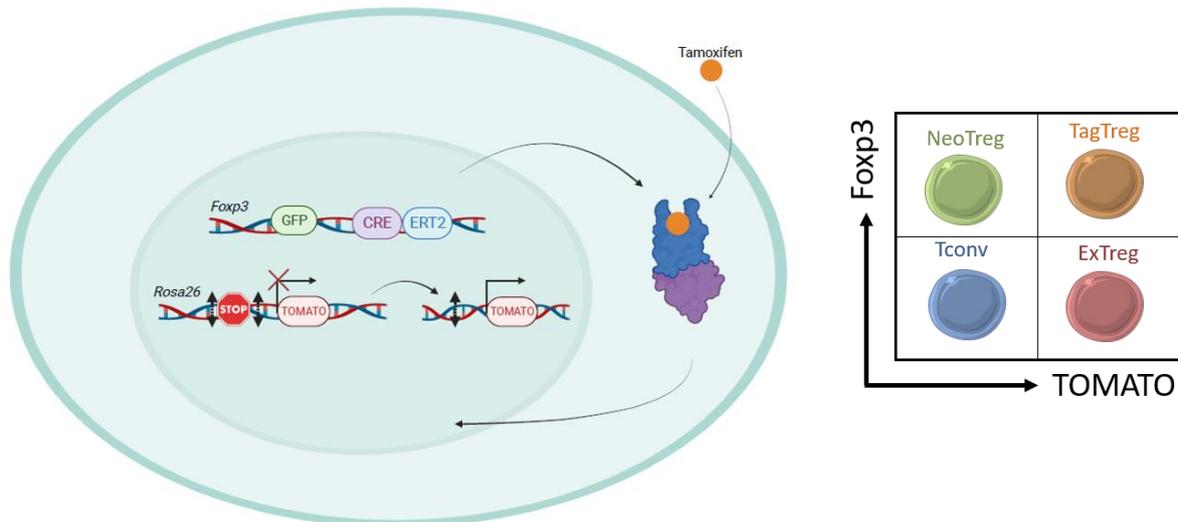


Figure 11. Le modèle CreLox inducible. La recombinaise Cre-ERT2 et la GFP sont sous le contrôle du promoteur de *Foxp3*. La Cre-ERT2 est maintenue dans le cytoplasme. Lorsque le tamoxifène est administré, elle change de conformation ce qui lui permet de migrer dans le noyau. Elle permet alors de recombiner une cassette STOP située entre deux sites LoxP et bloquant la transcription de la protéine fluorescente TOMATO. Quatre sous populations pourront alors être détectées par cytométrie en flux. Les LT conventionnels (Tconv) n'expriment ni *Foxp3* ni la TOMATO. Les Tregs exprimant *Foxp3* et la TOMATO, alors appelé TagTreg. Les ExTreg ayant exprimé *Foxp3* qui expriment alors la TOMATO mais ayant perdu l'expression de *Foxp3*, et pour finir, les NeoTreg exprimant uniquement *Foxp3* et la GFP car ils se sont développés après le traitement tamoxifène. Créé avec BioRender.

Les différents paramètres nécessitant d'être contrôlés dans ce modèle compliquent l'interprétation des résultats et donnent lieu à des données ambivalentes dans la littérature (Figure 12). En effet, en utilisant ce modèle, l'existence et le rôle des exTregs sont toujours très débattus. On peut alors distinguer deux types de recherche ; des travaux montrant que les Tregs sont relativement stables et ceux démontrant que les Tregs sont instables.

Plusieurs études s'accordent sur le fait que les Tregs sont stables au cours du temps et dans différentes conditions inflammatoires [15], [148], [149]. La proportion d'exTregs observés est très faible, ce qui remet en question les données précédemment observées en utilisant le modèle CreLox. Cependant, le traitement tamoxifène ne semblait pas efficace ; des proportions significatives de Tregs non tagués peuvent être observées. Cela peut expliquer en partie la faible proportion d'exTregs, en effet, ils représentent une petite proportion des Tregs totaux et il serait difficile de les détecter à cause de la faible efficacité du traitement.

Modèle génétique	Traitement tamoxifène	Efficacité du Tag	Temps post traitement	Proportion exTreg	Date	Papier
Cre ^{GFP} Rosa ^{YFP}	Gavage 3*8mg	Mauvais	5 jours et 5 mois	Très faible	2010	[149]
Cre ^{GFP} Rosa ^{YFP}	Gavage 3*8mg	Mauvais	1 jour, 1 et 8 semaines	Très faible	2015	[15]
Cre ^{GFP} Rosa ^{RFP}	IP 4*1.5mg	Intermédiaire	10 semaines	Très faible	2018	[148]
Cre ^{GFP} Rosa ^{YFP}	IP 5*2mg	Bon	Jusqu'à 20 semaines	Sang : 10%	2015	[150]
Cre ^{GFP} Rosa ^{ZsGreen}	Gavage 3*8mg	Bon	7 et 14 jours	Rate : 20% Colon : 10% PP : 30%	2020	[151]
Cre ^{GFP} Rosa ^{RFP}	4*8mg ou croquettes	Bon	2, 11 et 22 semaines	Rate : 10%	2020	[152]
Cre ^{GFP} Rosa ^{Tomato}	Croquettes	-	4 semaines	Rate : 20%	2020	[153]
Cre ^{GFP} Rosa ^{Tomato}	Gavage	Bon	5 jours	Rate : 12% Colon : 5%	2023	[154]
Cre ^{GFP} Rosa ^{Tomato} Apoe ^{-/-}	IP 5*75mg/kg (2 fois, espacé de 6 semaines)	Bon	12 semaines	Rate : 30-50% LN : 12-30%	2023	[130]

Figure 12. Tableau Récapitulatif des études utilisant le modèle CreLox inducible et les différents paramètres utilisés et observés

D'autres études, présentant une meilleure efficacité du traitement tamoxifène, ont pu observer une population plus significative d'exTregs dans différents tissus. La proportion d'exTregs parmi toutes les cellules taguées est résumée dans la figure 12. Ces études se sont principalement intéressées à l'impact de la délétion d'un gène d'intérêt sur la stabilité des Tregs [150]–[152]. Il a ainsi été démontré que l'instabilité des Tregs était augmenté lorsqu'un gène impliqué dans le contrôle de la méthylation de l'ADN était délété, montrant l'implication de facteurs épigénétiques dans la stabilité des Tregs [153]. Cette même étude analyse également les exTregs chez des souris sauvages. De manière similaire avec ce qui avait été observé dans le modèle CreLox, au niveau transcriptomique, les exTregs perdent l'expression des gènes codant pour CD25, CTLA-4, GITR, OX40 et CD103. Les transcrits des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ et l'IL-2 étaient augmentés. Pour finir, ils montrent également que la méthylation de l'ADN des exTregs est similaire à celle des Tregs. Malgré cela, les méthodes de détection utilisées jusqu'à présent ne permettaient pas de bien identifier les exTregs. En effet, dans ces études, la population d'exTregs analysée par cytométrie en flux n'était pas clairement distinguée (Figure 13).

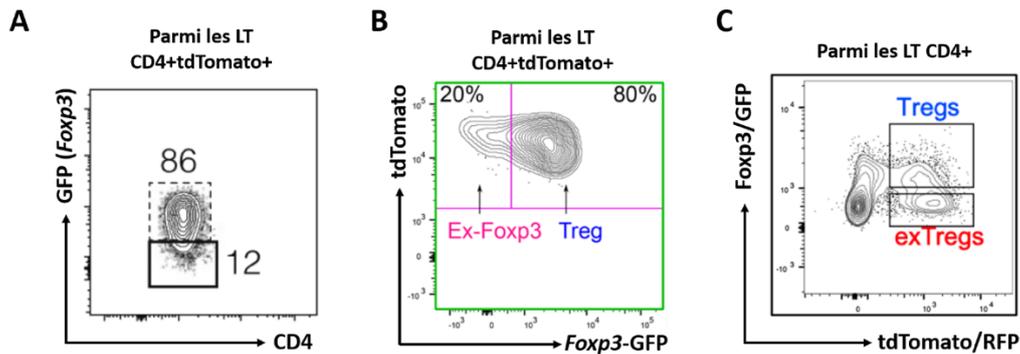


Figure 13. Visualisation de la population d'exTregs par cytométrie en flux en utilisant les modèles CreLox inducible. Les dotplot sont respectivement tirés des références suivantes : (A) [154], (B) [153] et (C) [130]. Ils permettent de visualiser, par cytométrie en flux et via la combinaison des protéines rapportrices du modèle CreLox inducible, la population d'exTregs dans la rate.

Une étude récemment publiée identifie pour la première fois des exTregs chez l'Homme [130]. Ils ont utilisé un modèle murin CreLox inducible, croisé avec un modèle d'athérosclérose, cela permettrait de créer un environnement inflammatoire plus favorable à la génération d'exTregs. La signature transcriptomique des exTregs murins a permis d'identifier une population similaire présente chez l'Homme. Ils mettent ainsi en évidence deux marqueurs qui permettraient d'isoler les exTregs chez l'Homme : CD16 et CD56. Ils utilisent ensuite ces deux marqueurs pour visualiser et trier la population d'exTreg humain, qui serait cytotoxique. Cependant, ces marqueurs peuvent difficilement être utilisés chez la souris et aucune donnée ne présente les exTregs murins en condition physiologique.

Les données obtenues jusqu'à présent sur les exTregs ont été générées via différents modèles et dans différentes conditions physiologiques ou pathologiques. Cela explique en partie les incohérences entre les articles. De plus, il est possible qu'il existe des exTregs aux origines et fonctions variées et qu'ils puissent être générés de différentes manières.

III. Fonctions et modes d'actions des Tregs

Les Tregs jouent un rôle essentiel en tant que régulateurs du système immunitaire, exerçant leur influence via divers mécanismes de suppression. Parmi ces mécanismes, on trouve la sécrétion de cytokines inhibitrices, la cytolysse, la perturbation métabolique et le ciblage des CD (Figure 12). En outre, les Tregs démontrent une certaine plasticité qui leur permet d'adopter des caractéristiques de LT helper en fonction de l'environnement et de la réponse immunitaire qu'ils doivent réguler. Ils s'adaptent également à l'environnement tissulaire dans lequel ils résident. En conséquence, ils exécuteront diverses fonctions selon le contexte tissulaire. L'environnement a donc un impact majeur sur le fonctionnement de ces cellules.

1. Modes d'actions des Tregs

1.1 Mécanismes de suppressions

L'étude des mécanismes de suppressions par les Tregs est d'une importance capitale pour comprendre les processus régulant la tolérance immunitaire et être capables de les moduler via diverses stratégies thérapeutiques. Ces mécanismes peuvent être regroupés en quatre fonctions de bases déterminantes pour les Tregs (Figure 14).

1.1.1 Cytokines suppressives

Les Tregs agissent à distance des cellules qu'ils doivent réguler via la production de cytokines suppressives. L'IL-10, le TGF- β et l'IL-35 sont impliquées dans ce processus.

IL-10. Cette cytokine exerce son action en se liant à son récepteur, IL10R, exprimé par divers sous types de cellules immunitaires comme les LT, les LB, les macrophages et les CD. La liaison ligand/récepteur entraîne la formation d'un complexe de signalisation qui régule notamment l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-10 est essentiel à la fonction suppressive des Tregs ; sa délétion spécifiquement dans les Tregs entraîne une inflammation au niveau du poumon, du colon et de la peau [155]. La délétion ne conduisant pas à une auto-immunité systémique, cela suggère que l'IL-10 joue un rôle primordial dans les tissus nécessitant une tolérance aux antigènes commensaux et/ou que d'autres mécanismes de suppressions prennent le relais dans les autres tissus. Le rôle des Tregs producteur d'IL-10 a été mis en évidence dans différentes pathologies incluant l'allergie [156], la colite [157] et également des modèles de cancer [158].

TGF- β . En plus de son rôle dans la différenciation des Tregs, le TGF- β est également décrit comme une cytokine clef dans la fonction suppressive des Tregs. Sa délétion entraîne une pathologie auto-immune comparable à celle observée dans les modèles murins ayant une déficience de Foxp3 [159]. Le rôle suppresseur du TGF- β a également été mis en évidence dans diverses pathologies telles que l'allergie [160], des pathologies inflammatoires de l'intestin [161] et dans des modèles de cancer [162]. Mais, plus encore que la production de TGF- β , il semble que ce soit l'activation de sa forme latente par l'intégrine $\alpha\beta 8$, fortement exprimée par les Tregs, qui permet à ces cellules d'avoir une action suppressive forte médiée par cette cytokine [163].

IL-35. Cette cytokine appartient à la famille de l'IL-12, elle est composée de la sous unité EB13 (*Epstein-Barr virus induced gene 3*) et p35 (aussi appelé IL-12 α). Elle est majoritairement exprimée par les Tregs et contribue à leur fonction suppressive [164]. La délétion de la sous unité EB13 ou p35 altère la fonction suppressive des Tregs qui ont une capacité réduite pour contrôler une maladie inflammatoire de l'intestin.

1.1.2 Cytolyse

Les Tregs sont capables d'induire la mort cellulaire des cellules qu'ils doivent réguler via le mécanisme Perforine/granzyme, également décrit dans les cellules T cytotoxiques. Ce système fonctionne par contact cellulaire direct, la perforine va permettre de créer des pores dans la cellule cible ce qui entraîne une augmentation de la pression osmotique et conduit à la mort cellulaire. Les molécules granzymes participent également au processus en activant les voies de signalisation de mort cellulaire programmée à l'intérieur de la cellule cible [165]. Il a été montré que les Tregs étaient capables de réguler la fonction des LB présentatrices d'antigène en induisant leur mort cellulaire, et cela, de manière dépendante aux molécules granzymes et partiellement à la perforine [166]. L'importance de ce mécanisme a été mise en évidence dans diverse pathologies incluant des modèles de cancers [167], [168] et dans l'EAE [169].

1.1.3 Perturbation métabolique

Les Tregs peuvent également altérer la quantité de certaines molécules dans l'environnement, ce qui perturbe le métabolisme des Tconv.

IL2. Les Tregs expriment fortement le CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, et sont fortement dépendants de cette cytokine pour maintenir leur survie, bien qu'ils ne la produisent pas. Ils captent l'IL-2 environnant, ce qui crée une pénurie pour les Tconv. Ces derniers expriment moins fortement le CD25, mais sont aussi dépendants de l'IL-2 dans leur biologie. En effet, in vitro, la quantité d'IL-2

présente dans un milieu contenant des Tregs et des Tconvs est diminuée sans altération de sa production par les Tconvs [170]. Cette privation d'IL-2 induit la mort cellulaire des Tconvs de manière dépendante à la protéine pro-apoptotique Bim. De plus, lorsque l'IL-2 est ajouté dans un milieu de culture contenant des Tregs et des Tconvs, la suppression de ces derniers est limitée [171].

ATP (Adenosine triphosphate). L'ATP est une source d'énergie primordiale pour les LT activés. La production de ce métabolite est indispensable pour le bon fonctionnement de divers processus comme la transcription ou la traduction de protéine qui sont accrus lors de l'activation des cellules. Les Tregs sont capables de moduler la quantité d'ATP présente dans l'environnement [172]. Ils expriment fortement CD39 et CD73, des ectoenzymes capables de transformer l'ATP en adénosine dans le milieu extracellulaire. En plus de priver les Tconvs de l'ATP, l'adénosine peut se fixer sur son récepteur A2A exprimé par les Tconvs ce qui diminue leur prolifération. D'un autre côté, l'adénosine inhibe la production d'IL-6 et induit celle du TGF- β ce qui permet de promouvoir la génération de pTregs [173]. Il a également été montré que les Tregs délétés pour CD39 ont une capacité suppressive altérée in vivo et ne sont pas capables de contrôler une réponse immunitaire après transfert adoptif [172].

AMPc (adénosine monophosphate cyclique). L'accumulation de l'AMPc dans la cellule a un rôle inhibiteur sur la prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires [174]. Les Tregs produisent de fortes quantités d'AMPc et sont capables de le transférer aux Tconvs via des jonctions cellulaires [175].

1.1.4 Interaction avec les CD

Les Tregs modulent les signaux de costimulation fournis par les CD pour réguler leurs cellules cibles.

CTLA-4. Cette molécule de surface est majoritairement exprimée par les Tregs. C'est un analogue du CD28 qui peut également interagir avec les molécules de costimulation CD80/86 exprimé à la surface des CD [176]. L'interaction de ces deux molécules présente une plus forte affinité pour CTLA-4 que CD28, ce qui crée une compétition entre les deux. Les Tregs privent ainsi les Tconvs de leurs signaux de costimulation. L'interaction des Tregs avec les CD via CTLA-4 entraîne également des signaux pour ces dernières, cela permet de les diriger vers un phénotype tolérogène en inhibant leur production de cytokine pro-inflammatoire et en induisant l'expression d'inhibiteur des réponses immunitaires [177], [178]. La délétion de CTLA-4 spécifiquement sur les Tregs dans un modèle murin entraîne une pathologie auto-immune sévère et induit une forte immunité antitumorale [179]. Cette déficience impacte la fonction suppressive des Tregs et plus particulièrement leur capacité à diminuer l'expression de CD80/86 sur les CD.

Interaction avec les CD. La molécule de surface Lag3 (*Lymphocyte activation gene 3*) est un analogue du CD4 qui peut se lier avec une plus forte affinité au CMH-II. Son expression est nécessaire pour la fonction suppressive des Tregs et permet de réguler la maturation et les capacités de stimulation des CD [180]. Les Tregs peuvent donc non seulement interagir directement avec les CD, mais cette interaction est également facilitée par certaines molécules. Il a été montré, *in vitro*, que les Tregs avaient une mobilité accrue par rapport aux Tconv, et interagissaient de manière plus fréquente avec les CD [181]. Ce mécanisme était indépendant de CTLA-4 et dépendant de l'expression de LFA1 (*Leukocyte Function Associated antigen 1*) par les Tregs. Il permettrait de limiter la maturation des CD et de diminuer l'expression de CD80/86 à leur surface. En absence de stimulation pro-inflammatoire, NRP1 participent également à l'interaction prolongée entre les Tregs et les CD [182]. Cela permet de donner un avantage supplémentaire aux Tregs pour moduler les CD, car ils expriment plus fortement NRP1 que les Tconv.

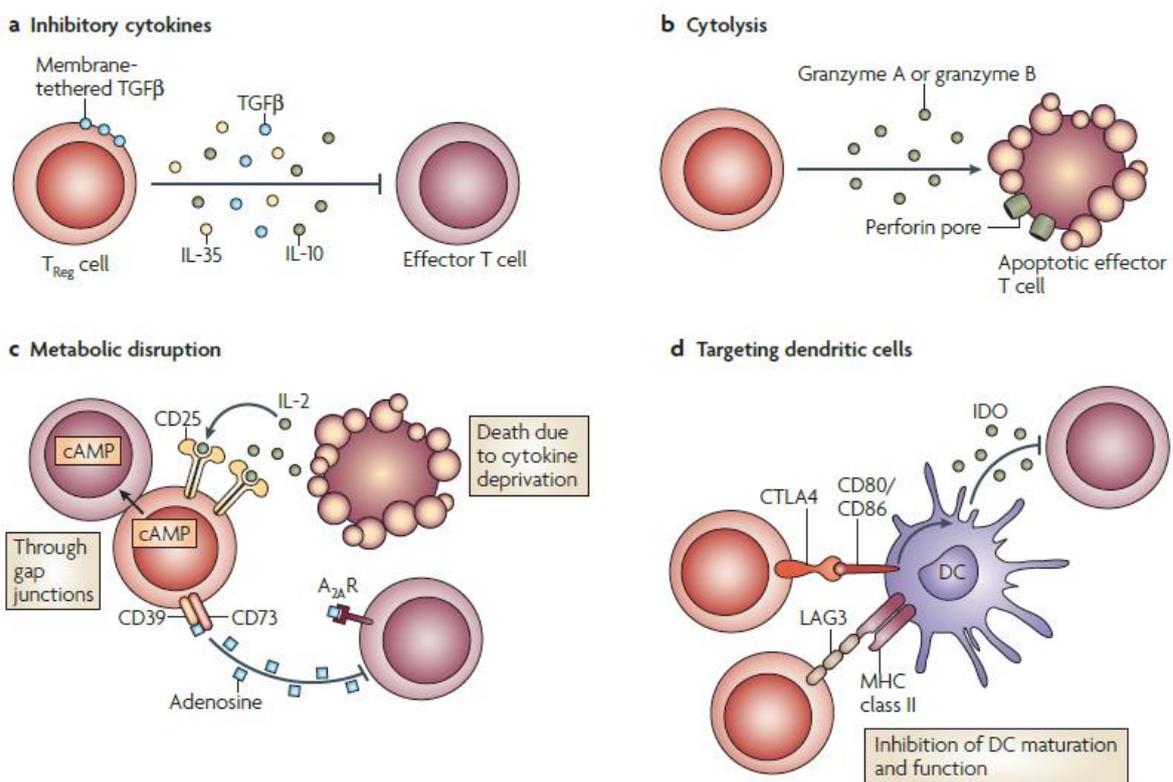


Figure 14 : Mécanismes de régulations utilisés par les Tregs (tiré de [183]). La fonction des Tregs est médiée par quatre mécanismes majeurs. (A) Ils sécrètent des cytokines inhibitrices pour agir à distance sur leurs cellules cibles. (B) Les Tregs sont capables d'induire la mort cellulaire via le mécanisme Perforine/granzyme. (C) Les Tregs peuvent également altérer la disponibilité de certaines molécules dans l'environnement, ce qui perturbe le métabolisme des cellules cibles. (D) Les Tregs modulent les signaux de costimulation fournis par les cellules dendritiques (DC) pour réguler leurs cellules cibles.

1.2 Plasticité

Les Tregs ont un certain niveau de plasticité qui leur permet d'acquérir des facteurs de transcription spécifique de sous types de LT helper (Figure 14). Cette fonction leur permet de s'adapter à l'environnement et de réguler spécifiquement les sous types de LT helper dans différents contextes inflammatoires. Les Tregs pourraient ainsi exprimer une partie des programmes transcriptionnelles similaires au LT qu'ils doivent réguler, ils vont réagir aux mêmes stimuli environnementaux. Ils expriment des molécules impliquées dans la migration cellulaire, comme les récepteurs aux chimiokines ou des intégrines, leur permettant de rejoindre les mêmes sites d'inflammations que les cellules qu'ils doivent contrôler. Cette plasticité doit être soigneusement régulée. En cas de perte de Foxp3 par des Tregs, les exTregs ainsi formés pourraient se transformer en LT helpers et deviendraient pro-inflammatoires avec un fort potentiel pathologique. Il est essentiel de maintenir un équilibre entre les Tregs et les LT helpers pour éviter cette hypothétique transition vers des cellules immunitaires potentiellement pathogènes (Figure 15).

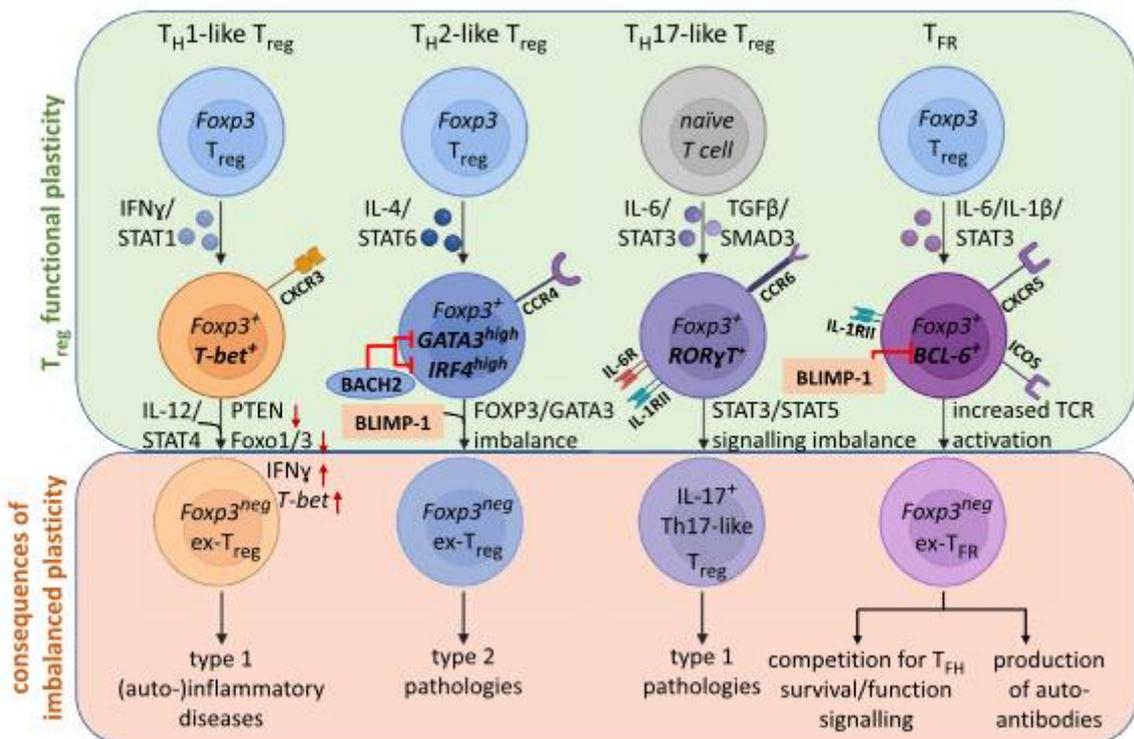


Figure 15 : Plasticité des Tregs et conséquences théoriques de leur instabilité (tiré de [184]). La signalisation de certaines cytokines permet aux Tregs d'acquérir des fonctions spécialisées et des caractéristiques similaires aux Th qu'ils doivent réguler. Ils expriment ainsi des facteurs de transcription, des récepteurs aux chimiokines et sécrètent des cytokines spécifiques à chaque lignage. Cette plasticité participe à l'instabilité des Tregs et peut conduire à la perte de Foxp3 et à leur fonction suppressive, les rendant ainsi potentiellement pathogènes dans les différentes pathologies qu'ils devaient contrôler.

Tregs de type 1. Les Tregs de type 1 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-bet (*T-box expressed in T cells*) qui détermine leur lignage et leur identité. Les Tregs vont exprimer T-bet en réponse à l'IFN γ via une signalisation dépendante du récepteur à l'IFN γ et de STAT1 [185]. L'expression de STAT1 nécessite d'être contrôlé négativement par SOCS1 pour ne pas dériver vers le développement de pathologie de type Th1 [186]. Ils acquièrent également l'expression du récepteur de chémokine CXCR3 caractéristiques des Th1 et s'accumulent au site d'inflammation pour contrôler la réponse [187]. Lorsque les Tregs sont déficients pour T-bet, ils ne sont plus capables de s'accumuler et de contrôler une réponse Th1 [185]. L'utilisation d'un modèle CreLox inducible permettant de suivre le destin de Tregs exprimant T-bet suggère une forte stabilité de ces cellules. Parmi les Tregs ayant exprimé T-bet, la majorité conserve cette expression au cours du temps, même en condition inflammatoire. Cependant, ce modèle ne donne pas d'information sur le devenir de Tregs de type 1 ayant perdu l'expression de Foxp3. Les auteurs ont en revanche décrit que l'ablation artificielle de Foxp3 dans les Tregs exprimant T-bet conduisait au développement de pathologies auto-immunes de type Th1 sévère. Cela suggère également que d'autres sous types de Tregs ne sont pas capables de contrôler l'inflammation dans un environnement spécifique de la réponse Th1. Une autre étude a montré un enrichissement d'exTregs dans la population exprimant CXCR3, suggérant une certaine instabilité des Tregs CXCR3⁺ de type 1 [142]. Cependant, ce travail a été fait avec un système CreLox dans lequel la Cre est exprimée de façon constitutive dans les Tregs avec le risque d'erreur dans l'identification des exTregs comme décrit précédemment.

Tregs de type 17. Les Tregs sont également capables de réguler les réponses de type Th17 via l'expression de STAT3, un facteur de transcription critique impliqué dans la différenciation des Th17 [188]. La délétion de STAT3 dans les Tregs, utilisant le système CreLox, entraîne un défaut de contrôle de la réponse Th17, notamment visible par l'augmentation de la production d'IL-17, ce qui conduit à une inflammation fatale au niveau de l'intestin. STAT3 induit l'expression du récepteur aux chimiokines CCR6, ce qui permet la migration dans les sites d'inflammation Th17 [189], [190]. Il induit également l'expression de ROR γ T, un facteur de transcription également impliqué dans le développement des Th17. Tout comme les cellules qu'ils doivent réguler, les Tregs de type 17 sont capables de produire de l'IL-17 [191]. L'engagement dans le lignage Th17 ou Tregs de type 17 est déterminé par la quantité de TGF β et d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire présente dans l'environnement [192], [193]. Il a été montré dans l'intestin que les Tregs exprimant ROR γ T étaient générés à partir de Tconv, ce qui suggère que les Tregs de type 17 sont majoritairement des pTregs [82]. Cette sous-population de Tregs présente un profil de méthylation de l'ADN similaire aux autres types de Tregs, suggérant une stabilité équivalente [194]. Le transfert adoptif de Tregs de type 17 a montré qu'ils étaient stables in vivo et capables de réguler l'inflammation induite dans un modèle de colite.

Tregs de type 2. De la même manière que pour les réponses Th1 et Th17, les Tregs contrôlent les réponses de type 2 en exprimant les facteurs de transcription IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) et GATA3 impliqués dans le lignage Th2. Ces deux facteurs de transcription sont intimement liés à l'expression de Foxp3. Il a d'une part été montré qu'IRF4 était directement régulé par Foxp3 [195]. Les Tregs déplétés pour IRF4 ont une altération au niveau transcriptionnel et expriment plus faiblement les gènes codants pour l'IL-10, granzyme B et CCR8, un récepteur aux chimiokines impliqué dans la migration vers une inflammation de type 2. Cette délétion conduit à un échec du contrôle de la réponse Th2 et à l'augmentation de la production d'IL-4 et d'IL-5. Cela entraîne le développement d'une pathologie auto-immune létale. D'autre part, GATA3 est capable de se lier à la région CNS2 de *Foxp3* pour renforcer son expression [196]. Sa délétion entraîne une diminution des fonctions suppressives et de l'expression de Foxp3 ainsi que de la signature Tregs associée, et conduit à un syndrome auto-immun observé dans divers organes. Cependant, dans ces deux études, la délétion d'IRF4 ou de GATA3 au sein des Tregs est réalisée à l'aide du modèle CreLox. GATA3 est exprimé à un niveau de base dans les Tregs et l'augmentation de son expression est dépendante de la signalisation IL-4/STAT6 [197]. L'expression de GATA3 à des niveaux élevés est exclusive avec celle des facteurs de transcription T-bet et ROR γ T [198]. Il a été proposé que GATA3 permettait de restreindre l'expression d'autres facteurs de transcription comme ROR γ T pour maintenir l'expression de Foxp3 et limiter leur transition vers un phénotype Th17 dans certains contextes inflammatoires [199].

Tregs folliculaire ou Tfr (pour T follicular regulatory cells). Cette sous-population est localisée dans les centres germinatifs et participe à la régulation de la réponse humorale en contrôlant la maturation des LB. Ils acquièrent des caractéristiques des LT helper folliculaire (Tfh pour *T follicular helper*) en exprimant le facteur de transcription Bcl6 et le récepteur aux chimiokines CXCR5, impliqué dans la migration vers les follicules B des tissus lymphoïdes [200]. Une délétion de CXCR5 dans les Tregs, en utilisant le modèle CreLox, entraîne une production non régulée d'autoanticorps, démontrant le rôle critique de ce sous type de Tregs dans la régulation des LB auto-réactifs [201]. Il a été suggéré que les Tfr se développaient à partir de tTregs et non de Tfh [202]. En effet, le transfert adoptif de Tfh n'induisait pas leur différenciation en Tfr ; en revanche, les Tregs Foxp3⁺ transférés étaient capables de se différencier en Tfr. Certaines études ont étudié la stabilité de ces Tfr. Il a été montré, dans un modèle murin transgénique permettant de suivre préférentiellement les tTregs, via une combinaison du système CreLox et une délétion de CNS1, que les exTregs étaient enrichis dans la population PD-1⁺CXCR5⁺, un phénotype caractéristique des Tfr [142]. Cela suggère une instabilité accrue dans la population de Tfr. Une seconde étude utilisant également le modèle CreLox rapporte la présence d'exTregs dérivés de Tfr [203]. Ils perdent le programme transcriptionnel caractéristique des Tfr et la perte de Foxp3 est suffisante pour induire un phénotype d'ex-Tfr, notamment caractérisé par la perte

d'expression du CD25, de CTLA-4 et d'ICOS. Les mêmes auteurs ont également montré qu'EZH2 jouait un rôle indispensable dans la fonction suppressive des Tfr. Une dernière étude a montré que la fonction et la stabilité des Tfr était dépendante de l'expression du facteur de transcription Blimp1 [204]. En utilisant un modèle CreLox inductible, les ex-Tfr générés après transfert adoptif et délétés pour Blimp1 avaient une production accrue de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17 et l'IFN γ et une diminution de la production d'IL-10. Ils ont également suggéré que cette dépendance à Blimp1 pour le maintien de la stabilité était nécessaire pour les Tfr mais pas pour les Tregs non Tfr.

2. Tregs tissulaires

Le rôle et le phénotype des Tregs présents dans les organes lymphoïdes secondaires a été largement étudié. Ils permettent de maintenir une tolérance immunitaire et contrôlent les réactions inflammatoires excessives. Plus récemment, un intérêt croissant s'est porté sur les Tregs présents dans les tissus non lymphoïdes, appelés Tregs tissulaires. En effet, ils possèdent un phénotype et des fonctions qui leur sont propres. Ces caractéristiques leur permettent de s'adapter et de survivre dans le tissu dans lequel ils vont exercer leurs fonctions. En plus de leur fonction immunitaire, ils participent également à la régulation du métabolisme, la réparation et régénération tissulaire et agissent sur la différenciation de précurseurs non lymphoïdes [205]. Il a été suggéré que ces Tregs tissulaires provenaient d'un précurseur commun présent dans les tissus lymphoïdes [206]. Ils poursuivent cette différenciation dans leur tissu cible pour se spécialiser et acquérir un programme transcriptionnel qui leur est propre. Les Tregs tissulaires sont ainsi capables de moduler les réponses spécifiques à chaque tissu, permettant de garantir une tolérance immunitaire dans ces environnements variés. La compréhension des Tregs tissulaires est indispensable pour proposer de nouvelles voies thérapeutiques ciblant spécifiquement ces populations.

2.1 Précurseurs

Les fonctions et les phénotypes des Tregs tissulaires sont diverses, cependant ils présentent quelques caractéristiques communes. Certaines études suggèrent qu'une partie du compartiment des Tregs dans le tissu adipeux viscéral (VAT pour *Visceral Adipose Tissue*), la peau, le colon, et le foie proviendrait de Tregs néonataux. De plus, en se basant sur leur phénotype, une forte proportion de Tregs d'origine thymique sont retrouvés dans les tissus, incluant le tube digestif qui abrite également la plus large population de pTregs [207]. Au vu de ces similitudes, l'origine de ces Tregs tissulaires se pose. Un modèle de différenciation en deux étapes propose qu'ils proviendraient d'un précurseur commun évoluant depuis le thymus vers les organes lymphoïdes secondaires puis vers les tissus périphériques (Figure 16). Après leur différenciation dans le thymus, les précurseurs des Tregs tissulaires subiraient une première étape d'activation dans les organes lymphoïdes avant de migrer dans leur tissu cible pour s'adapter définitivement. Bien qu'ils aient une spécificité à chaque tissu, une signature commune a pu être mise en évidence via une étude comparative analysant des données publiées sur les transcriptomes de Tregs tissulaires, elle inclue IRF4, NFIL3, ST2, des récepteurs aux chimiokines, des molécules effectrices (IL-10, Granzyme B et amphiréguline) et des molécules d'inhibition comme CTLA-4 [205].

Ce processus en deux étapes a tout d'abord été identifié dans le VAT dans un modèle murin dans lequel les LT expriment un TCR transgénique spécifique d'un antigène de ce tissu [208]. Cela permet d'enrichir cette population pour étudier plus facilement leur origine. Les auteurs ont mis en évidence la présence d'une population de Tregs exprimant faiblement PPAR γ (Pour *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*) dans la rate. Cette population se différencie tout d'abord à partir de Tregs n'exprimant pas PPAR γ et donne ensuite naissance aux Tregs du VAT (ou VAT-Tregs) exprimant fortement ce facteur de transcription. Ces précurseurs exprimant faiblement PPAR γ ont une partie de leur profil transcriptomique en commun avec les VAT-Tregs, notamment associé avec leur activation.

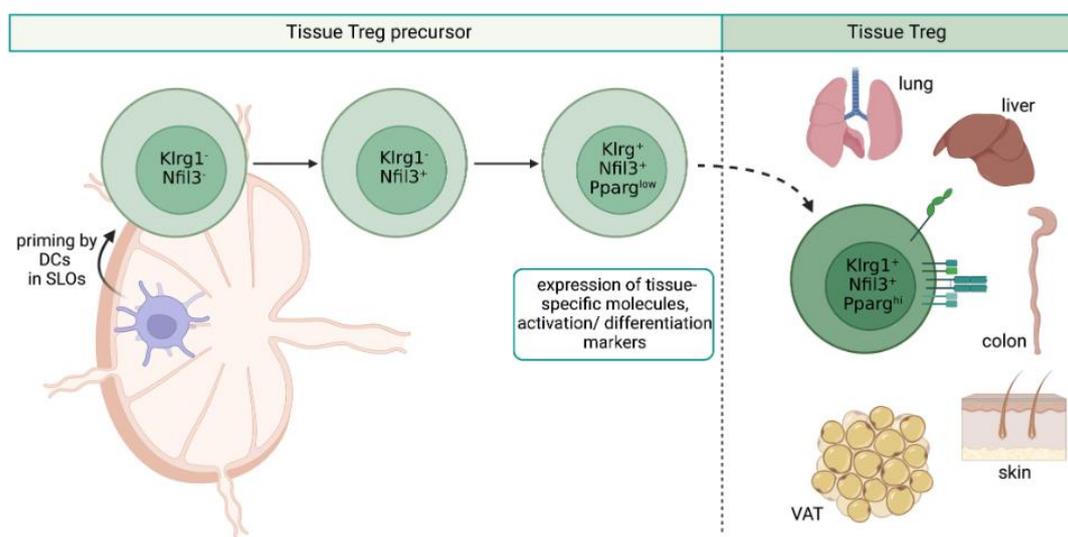


Figure 16. Développement des Tregs tissulaires à partir de précurseurs présents dans les organes lymphoïdes (tiré de [207]). Les Tregs tissulaires se développent en deux étapes à partir de précurseurs présents dans les organes lymphoïdes secondaires (SLOs) qui expriment progressivement KlrG1, Nfil3, Pparg et des marqueurs caractéristiques des Tregs tissulaires. Les précurseurs KlrG1+Nfil3+ migrent ensuite dans les organes non lymphoïdes pour poursuivre leur différenciation.

Des données de transcriptomes ont mis en évidence la présence de précurseurs dans les organes lymphoïdes drainant la peau et le colon [209]. Ils suggèrent que l'adaptation des Tregs dans ces deux tissus serait rendue possible grâce à un programme transcriptionnel similaire, indiquant ainsi une similitude dans les mécanismes d'adaptation des Tregs entre la peau et le colon. Une autre étude a permis d'élargir ce modèle aux Tregs tissulaires dans le VAT, la peau, le colon, le foie et les poumons [206]. Ils ont tout d'abord montré que l'accessibilité de la chromatine était similaire entre les Tregs de ces différents tissus par rapport à ceux des organes lymphoïdes comme la rate et les ganglions lymphatiques. Ils décrivent une signature commune incluant PPAR γ , GATA3, BATF, NFIL3 et KLRG1. Ils identifient les précurseurs des Tregs tissulaires dans les organes lymphoïdes sur la base de l'expression de NFIL3 et KLRG1. A la suite de transfert adoptif, seuls les Tregs exprimant NFIL3 sont capables

d'acquérir l'expression de KLRG1 et de coloniser les tissus périphériques. Ils proposent que le facteur de transcription BATF serait un acteur clef dans la différenciation des précurseurs en Tregs tissulaires. En effet, dans un modèle murin déficient pour BATF, une forte diminution des précurseurs et des Tregs tissulaires sont observés. Ces précurseurs peuvent également être identifiés par l'absence d'expression de ID3 [210].

2.2 Spécificité tissulaire

Une partie du compartiment des Tregs tissulaires proviendrait de précurseurs communs et ont des similitudes au niveau de leur profil transcriptomique. Cependant, ils ont également des signatures qui leur sont propres et qui sont associées avec leur fonction spécifique aux tissus dans lesquels ils résident. Au-delà de leur fonction de régulation du système immunitaire, les Tregs ont également des rôles plus atypiques. Dans le muscle, les Tregs résidents sont largement étudiés pour leur rôle sur la réparation et la régénération tissulaire. A la suite d'une lésion, cette population de Tregs s'accumule rapidement au site d'inflammation [211]. Ils participent au processus de régénération à la fois en contrôlant l'inflammation, mais aussi en sécrétant des facteurs de croissance [211], [212]. En effet, les Tregs produisent une forte quantité d'amphiréguline (AREG) qui se lie au récepteur EGFR (pour *Epidermal Growth Factor Receptor*), présent sur les progéniteurs des cellules musculaires et qui permet d'activer leur différenciation. Dans les poumons, les Tregs participent également à la régénération des cellules épithéliales pulmonaires en sécrétant des facteurs de croissance [213]. Suivant les tissus, les Tregs réguleront aussi certains aspects du métabolisme, agiront sur la différenciation de cellules souches et participeront à la régulation du microbiote.

2.2.1 VAT

Le tissu adipeux est composé d'adipocytes, de cellules stromales et de populations immunitaires. On retrouve différents types de tissus adipeux suivant leur localisation dans le corps, le tissu adipeux viscéral ou VAT est localisé dans la cavité abdominale, il est entouré par les organes internes. Il joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme global et de l'inflammation, il est impliqué dans diverses pathologies métaboliques et inflammatoires.

Une première étude réalisée par le groupe du Dr. Diane Mathis a décrit les VAT-Tregs comme étant une population unique, spécifique de ce tissu [214]. Ils ont mis en évidence, dans un modèle murin, qu'ils représentaient une forte proportion des LT CD4+ et qu'ils continuaient d'augmenter fortement pour atteindre un pic à 25 semaines d'âge chez les mâles, avant de décroître progressivement [215]. Leur profil transcriptomique est également distinct de celui des Tregs présent dans les organes lymphoïdes. Des marqueurs clef pour définir la signature des VAT-Tregs ont donc pu

être mis en évidence : ils expriment fortement PPAR γ , GATA3, CCR2, KLRG1 et ST2. Le maintien et la survie de la population de VAT-Tregs sont dépendants de plusieurs signaux incluant des cytokines, des facteurs de transcription et la signalisation TCR.

Cytokines. L'IL-33 est une alarmine impliquée dans le contrôle de réponse immunitaire dans les tissus adipeux. La délétion de l'IL-33, ou de son récepteur ST2, conduit à la délétion du compartiment des VAT-Tregs ; au contraire l'injection d'IL-33 augmente leur proportion [216], [217]. La délétion de ST2 spécifiquement dans les Tregs, en utilisant le modèle CreLox, impacte drastiquement sur leur proportion dans le VAT [208]. Cela suggère que l'IL-33 agit directement sur les Tregs, ce qui n'exclut pas un rôle indépendant de leur expression de ST2.

Facteurs de transcriptions. PPAR γ , tout d'abord connu comme étant le régulateur majeur de la différenciation des adipocytes, joue également un rôle dans l'accumulation, le phénotype et la fonction des VAT-Tregs [218]. Une délétion spécifique de PPAR γ dans les Tregs conduit à l'altération de leur proportion dans le VAT sans impacter ceux de la rate. Les VAT-Tregs résiduels ne présentent pas la signature transcriptomique qui leur est propre. PPAR γ et ST2 sont donc deux facteurs clés régissant l'accumulation des VAT-Tregs. L'induction de leur expression dans des Tconvs n'est pas suffisante pour induire une identité de VAT-Tregs [208]. En effet, ce mécanisme est également hautement dépendant de l'expression de Foxp3. Les facteurs BATF et IRF4 sont également nécessaires, il a été montré qu'ils régulaient directement PPAR γ et ST2 [217].

Signal TCR. Les VAT-Tregs ont un répertoire TCR restreint qui diverge de celui des Tregs présent dans les tissus lymphoïdes [214]. Cela suggère qu'ils se développent préférentiellement à partir de certains clones spécifiques du VAT. Cette théorie est appuyée par le fait que dans un modèle murin où le répertoire TCR est biaisé en faveur d'un clone spécifique des VAT-Tregs, l'accumulation de la population dans le VAT est accrue [208]. De plus, après un transfert adoptif, ces Tregs s'accumulent préférentiellement dans le VAT. D'autres études ont également montré que l'accumulation des VAT-Tregs était dépendante du signal TCR et de sa liaison au complexe CMHII-peptides [219], [220]. Cette accumulation proviendrait de la prolifération de clones spécifiques in situ et non majoritairement de Tregs circulant. Le répertoire TCR des VAT-Tregs présente peu de similitudes avec celui des Tconvs du VAT, ce qui suggère qu'ils ne proviennent pas de pTregs différenciés dans le VAT. En accord avec ces données, les Tregs du VAT expriment fortement NRP1, et le transfert adoptif de Tconvs ne permet pas d'induire des Tregs dans le VAT [219]. Cette étude suggère également que la population de Tregs est mise en place de manière précoce, dès la première semaine de vie. Ces résultats ont été obtenus via des expériences de thymectomies ou utilisant le modèle le modèle *Foxp3^{DTR}*.

Fonctions et pathologies. L'inflammation du VAT est modulée par différentes populations immunitaires. Les VAT-Tregs jouent un rôle majeur dans cette régulation puisque leur déplétion entraîne une augmentation des médiateurs de l'inflammation et une insulino-résistance [214]. L'obésité est caractérisée par une inflammation chronique de bas grade du tissu adipeux et notamment une sécrétion accrue de facteur pro-inflammatoire comme l'IFN γ et le TNF α [221], [222]. Dans cette pathologie, la proportion et le profil transcriptomiques des Tregs sont largement impactés et ils ne sont plus capables de contrôler l'inflammation locale [215]. L'injection d'agoniste de PPAR γ , d'IL-33 ou d'IL-2 permet à la fois de restaurer la population de VAT-Tregs et d'améliorer certains paramètres métaboliques perturbés dans cette pathologie [215], [216], [218]. Les Tregs effecteurs expriment fortement ICOS (pour *Inducible T-cell CO-stimulator*) qui est induit par les signaux TCR et de costimulation CD28. Il participe au renforcement des fonctions suppressives des Tregs [223]. De manière surprenante, l'expression d'ICOS semble avoir un rôle délétère sur la proportion, le phénotype et la fonction des VAT-Tregs [224]. En effet, la perte d'expression d'ICOS entraîne une réduction de l'inflammation du tissu adipeux et une meilleure sensibilité à l'insuline.

Il est important de noter que certaines caractéristiques attribuées aux VAT-Tregs ne sont visibles que chez les mâles. L'expansion des VAT-Tregs avec l'âge ainsi que leur profil transcriptomique diffère chez les femelles [225]. Dans un modèle murin d'obésité, la proportion des VAT-Tregs chez la femelle est augmentée [226]. Ces différences sont majoritairement dépendantes des hormones ; l'ablation des ovaires ou l'injection d'estrogènes sont capables de moduler les VAT-Tregs au cours de cette pathologie.

2.2.2 Peau

La peau forme une barrière physique avec l'environnement, ce qui protège l'organisme de diverses agressions extérieures. Le système immunitaire de la peau participe activement à cette protection. Il est constitué de différentes cellules immunitaires, dont les Tregs, qui jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie et de la tolérance immunitaire dans la peau.

Développement. Les premières semaines après la naissance semblent cruciales pour le développement et la fonction des Tregs de la peau. Ils s'accumulent rapidement dans le tissu et représentent jusqu'à 80% des LT CD4+ deux semaines après la naissance [80]. Cette proportion semble ensuite diminuer progressivement avec l'âge, bien qu'elle reste élevée par rapport aux tissus lymphoïdes secondaires [227]. La colonisation du tissu par la flore commensale est indispensable pour mettre en place la tolérance de ce tissu médiée par les Tregs [79], [80]. Lorsque la migration ou la colonisation des Tregs autour de cette période sont inhibées, la tolérance ne peut pas être mise en place correctement, même chez l'adulte. Ce mécanisme est dépendant de la présentation d'antigènes commensaux par un sous

type de CD. Les Tregs provenant d'adultes ne sont pas capables de compenser ce défaut et de mettre en place une tolérance efficace, ce qui démontre l'importance des Tregs néonataux de la peau.

Phénotype. Les Tregs de la peau ont un phénotype très activé et expriment fortement CTLA-4 et ICOS [80]. Ils expriment également les récepteurs à l'IL-2 (CD25) et à l'IL-7 [228]. Ces deux cytokines sont nécessaires pour le développement et la survie de ces Tregs. Cependant, à l'homéostasie, seule l'IL-7 semble être primordiale pour le maintien des Tregs dans la peau. Ils ont un profil transcriptionnel particulier avec une forte expression du transcrite codant pour GATA3 ainsi que de nombreux gènes régulés par ce facteur de transcription [229]. Il apparaît donc que les Tregs de la peau ont un profil de différenciation plutôt Th2. La délétion de GATA3 spécifiquement dans les Tregs, en utilisant le système CreLox inducible, entraîne une production de cytokines pro-inflammatoire de type Th2, préférentiellement dans la peau. Cela conduit à une augmentation de l'activation des fibroblastes et à l'accumulation pathologique de tissu conjonctif.

Fonctions et pathologies. En plus de leur rôle tolérogène et régulateur précédemment décrit, les Tregs possèdent également d'autres fonctions spécialisées au niveau de la peau. Ils participent au renouvellement des fibres capillaires, en régulant la différenciation et la prolifération de cellules souches des follicules pileux [227]. Ils ont également un rôle dans la régénération tissulaire à la suite de lésions cutanées [230]. Ils régulent la production d'IFN γ et contrôlent l'accumulation de macrophages pro-inflammatoire au site de la lésion. Leur fonction de réparation est dépendante de leur expression d'EGFR, un récepteur d'un facteur de croissance jouant un rôle majeur dans la réparation tissulaire. En effet, la délétion de ce récepteur au sein des Tregs altère leur fonction réparatrice en cas de lésions cutanées. De plus, les Tregs produisent un de ses ligands, AREG, largement décrit comme jouant un rôle dans la réparation tissulaire au niveau des muscles et des poumons. Pour finir, il a également été décrit que les Tregs de la peau participaient à sa régénération après une lésion en régulant la réponse de type Th17, en facilitant la différenciation de cellules souches des follicules pileux en cellules épithéliales nécessaires à la reformation de l'épiderme [231].

2.2.3 Tube digestif

Le tube digestif est composé de muqueuses exposées à l'environnement extérieur, ce qui comprend des antigènes provenant de la nutrition et de la flore commensale. Il est composé du petit et du gros intestin, également appelés respectivement intestin grêle et colon. Dans ces organes, les cellules immunitaires et tissulaires sont en constante interaction avec les composantes provenant de la nutrition et du microbiote. Les cellules immunitaires sont principalement localisées dans le tissu conjonctif appelé lamina propria (LP). Les études différencient alors les cellules résidentes de la LP du colon (cLP) de celles de la LP de l'intestin grêle (iLP). La tolérance de ces tissus est maintenue par

différents mécanismes, incluant une barrière physique composé de mucus et de cellules épithéliales, la production d'immunoglobuline sécrétoire de type IgA et des Tregs. Ces derniers sont indispensables pour maintenir la tolérance, en régulant localement l'activation des LT, à la fois contre les antigènes du soi, mais aussi contre ceux de la nutrition et de la flore commensale.

Origines, développements et phénotypes. Les Tregs du tube digestif proviennent à la fois des tTregs produit dans le thymus et des pTregs développés en périphérie en réponse à des antigènes locaux provenant de l'alimentation et du microbiote (Figure 17). Leur proportion augmente fortement quatre semaines après la naissance, ce qui correspond à la période de sevrage, suggérant ainsi l'influence du changement de l'alimentation et de la flore intestinale sur leur développement [64]. La proportion des Tregs de la cLP était fortement impactée dans des modèles murins dépourvus de germes ou exemptes de certains pathogènes, suggérant une forte dépendance aux microbiotes pour leur développement. Au contraire, les Tregs de l'iLP n'étaient que partiellement impactés dans ces modèles murins. Une autre étude a en revanche décrit qu'ils étaient majoritairement dépendants de la présence d'antigènes provenant de l'alimentation [232].

Les tTregs du tube digestif sont définis comme exprimant GATA3, Hélios et NRP1. Ils représentent 15 à 20% des Tregs dans ce tissu chez l'adulte. Ils expriment des marqueurs caractéristiques des Tregs tissulaires comme ST2 et AREG et pourraient favoriser la réparation tissulaire en cas de lésion [233]. L'IL-33 permet de promouvoir leur fonction et leur maintien au site d'inflammation. Une étude utilisant un modèle murin ne possédant pas de CMH-II et de Tregs développés en périphérie a montré que les tTregs migraient dans l'iLP au cours des premières semaines de vie [234]. Leur maintien dans le tissu, bien qu'indépendant de la signalisation TCR, nécessitait la présence d'antigènes du microbiote. Les auteurs suggèrent également que cette population est résidente et peu renouvelée par les Tregs provenant de la circulation chez l'adulte.

Les pTregs expriment majoritairement ROR γ T mais pas Hélios ou NRP1. Ils représentent jusqu'à 65% des Tregs de la cLP et 35% des Tregs de l'iLP chez l'adulte. Leur développement est permis grâce à la forte quantité de TGF- β présent dans l'environnement. Cette cytokine induit la fixation de Smad3 sur le locus CNS1 de *Foxp3* pour induire son expression. Ils expriment fortement c-Maf, un facteur de transcription connu pour réguler positivement le lignage Th17 [235]. La délétion de c-Maf au sein des Tregs impacte drastiquement leur portion et leur fonction suppressive, conduisant au développement d'une inflammation au niveau du colon. La signature transcriptomique des Tregs ROR γ T montre des similitudes avec celle des Th17, bien qu'elle soit plus proche de la signature commune des Tregs [194]. Ils présentent également une déméthylation caractéristique des Tregs sur les locus des gènes codant pour *Foxp3*, *CTLA-4*, *GITR*, *Eos*, et Hélios. Les Tregs ROR γ T étant dépendant

de la présence d'antigènes de la flore commensale, ils commencent à se développer uniquement deux semaines après la naissance [62], [82]. Cette dernière étude montre d'autre part que les Tconv peuvent se différencier en pTregs exprimant Hélios chez les nouveau-nés. La différenciation des Tconv en Tregs Hélios+ ou ROR γ T+, en plus d'être dépendante du microbiote, serait influencé par l'âge intrinsèque des cellules. Ils suggèrent ainsi que, chez les nouveau-nés, les LT étant naïfs et le microbiote peu développé, ils se différencient majoritairement en Tregs Hélios+. Chez l'adulte en revanche, ce sont des Tregs ROR γ T+ qui sont majoritairement générés.

Une étude s'est également intéressée à la population de Tregs n'exprimant ni ROR γ T ni GATA3. Ils dériveraient de pTregs, car ils n'expriment pas non plus Hélios et NRP1 [232]. Leur proportion est plus élevée dans l'iLP que dans la cLP et ils sont dépendants de la présence d'antigènes provenant de l'alimentation.

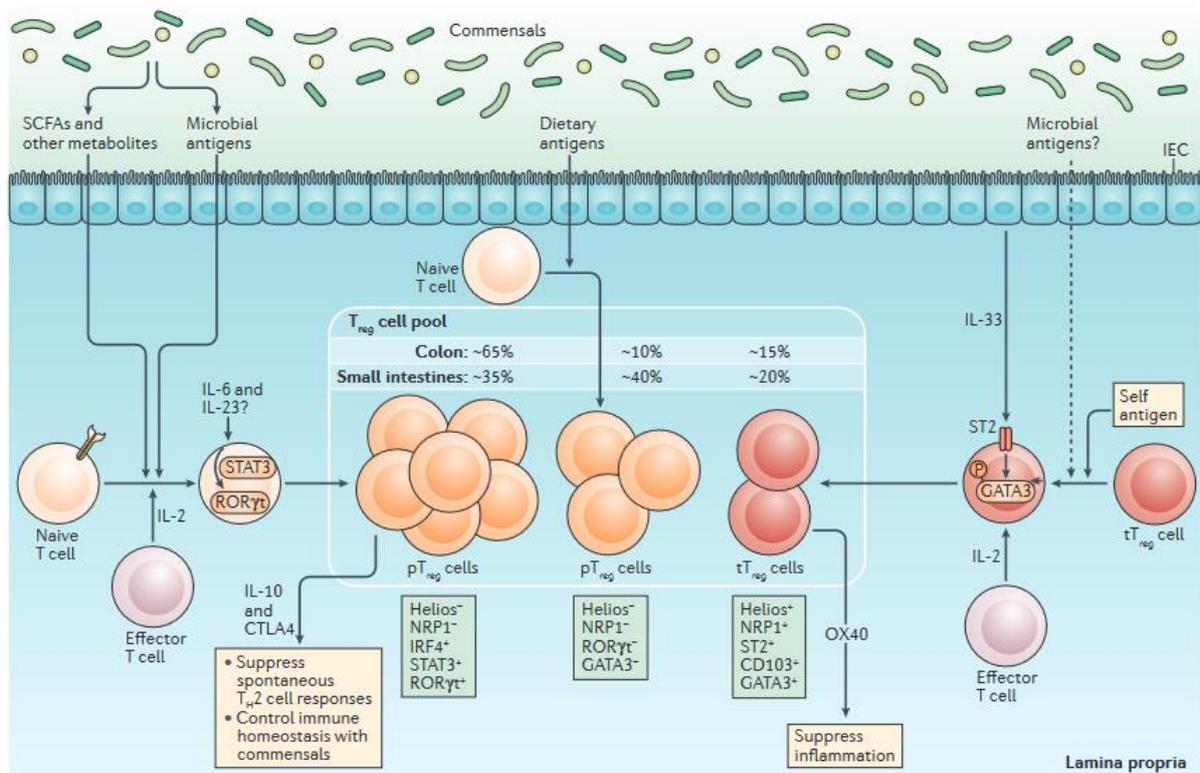


Figure 17 : Origines des populations de Tregs présentes dans le tube digestif (tiré de [236]). La population de Tregs présente dans le tube digestif peut être divisée en trois sous-populations sur la base de l'expression des facteurs de transcription GATA3 et ROR γ T. La proportion de ces sous-populations varie entre le colon et l'intestin grêle. Les Tregs ROR γ T+ n'expriment pas les marqueurs Hélios et NRP1 et sont considérés comme des Tregs périphériques (pTregs) induit par des antigènes provenant du microbiote. L'expression de ROR γ T est induite par STAT3, lui-même activé par des cytokines comme l'IL-6. L'IL-2 contribue également à la différenciation des LT en pTregs. Les Tregs GATA3-ROR γ T- sont décrits comme des pTregs, car ils se différencient grâce à des antigènes provenant de l'alimentation. Les Tregs GATA3+ expriment Hélios et NRP1 et sont considérés comme des Tregs thymiques (tTregs) reconnaissant des antigènes du soi. Ils expriment fortement ST2 ce qui leur permet de répondre rapidement à l'IL-33. L'IL-33 et l'IL-2 participent à l'induction de GATA3 dans les Tregs.

Fonctions et pathologies. La délétion du locus CNS1 de *Foxp3* entraîne un blocage de la différenciation des Tregs en périphérie [237]. Dans ce modèle murin, l'impact majeur sur la proportion des pTregs est observé dans le tube digestif. Cette déficience en pTregs conduit au développement de pathologies inflammatoires de type Th2 au niveau des muqueuses, dont le tube digestif. Cela s'accompagne d'une altération du microbiote [238].

Certaines fonctions atypiques ont également été attribuées aux Tregs présents dans l'intestin grêle et le colon. Le groupe du Dr. Mucida s'intéresse à une population lymphocytaire intraépithéliale (IEL) CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + dépendante du TGF- β et de l'acide rétinoïque pour leur différenciation et ayant des propriétés anti-inflammatoires [239]. Cette population est localisée dans l'épithélium de l'intestin grêle, un site qui abrite peu de Tregs. En utilisant le modèle CreLox, ils ont montré qu'une forte proportion de cellules ayant exprimé *Foxp3*, définis comme étant des exTregs, se trouvaient dans l'épithélium intestinal. Ils suggèrent ainsi qu'une partie des IEL serait en réalité des exTregs provenant de la LP. Leur migration et leur profil transcriptionnel spécifique du tissu serait induit suite à la perte du facteur de transcription ThPoK [240]. Ces données suggèrent pour la première fois que le Tregs ayant perdu *Foxp3* joue un rôle actif dans la régulation de la réponse immunitaire de l'intestin.

Récemment, une étude a mis en évidence la présence de Tregs ROR γ T+ au niveau du muscle après une lésion. Ces cellules proviennent de l'intestin et sont dépendant du microbiote [241]. Elles participeraient à la régénération du muscle en contrôlant la production locale d'IL-17. Les auteurs suggèrent ainsi que ces Tregs ROR γ T+ aurait un rôle dans l'homéostasie tissulaire à distance du site où ils sont générés.

2.2.4 Foie

Le foie est un organe vital connu pour être impliqué notamment dans le métabolisme et la détoxification. Etant en contact direct avec les substances étrangères provenant de l'intestin, il a aussi un rôle immuno-régulateur. Le rôle et l'implication des Tregs du foie ont été décrits dans diverses pathologies hépatiques.

Développement et phénotype. Chez les nouveaux nés, le foie subit diverses modifications dues aux changements dans la nutrition. Il est également en contact avec les substances provenant de l'intestin, ce qui l'expose aux antigènes commensaux. Cependant, l'activation des Tregs du foie ne semble que partiellement dépendante de ces antigènes. Les Tregs s'accumulent rapidement dans le foie durant les deux premières semaines de vie avant de décroître en proportion [242]. Ces Tregs proviendraient d'une différenciation thymique, car ils expriment majoritairement Hélios. La délétion des Tregs pendant cette période entraîne une réponse inflammatoire de type Th1 dans le foie. En utilisant le

modèle CreLox comme système de « *fate mapping* », peu d'exTregs semblaient générés dans le foie par rapport à la rate au cours des deux premières semaines de vie, ce qui suggère une plus grande stabilité. Chez l'adulte, les Tregs représentent une plus faible proportion des LT CD4+ dans le foie par rapport à d'autres tissus lymphoïdes et non lymphoïdes [243]. Leur profil transcriptomique diffère de celui des Tregs présents dans la rate, avec notamment une plus faible expression de CD25 et un profil de type Th1. De manière similaire aux autres types de Tregs tissulaires, ils ont une expression augmentée de certains récepteurs aux chimiokines, de ST2 et un profil de Tregs activés par rapport aux tissus lymphoïdes [242], [243]. Ils ont également une expression augmentée des facteurs de transcription PPAR γ et Tbet.

Fonctions et pathologies. De nombreuses pathologies hépatiques se traduisent par une transformation du parenchyme en tissu fibrotique. Cela entraîne une perte des fonctions hépatiques normales et l'accumulation de divers symptômes. Les Tregs participent à la régulation de la fibrose. Ils ont un rôle opposé suivant le contexte et le tissu puisqu'ils peuvent d'un côté favoriser la formation de fibrose et de l'autre l'inhiber [244]. La réduction du nombre de Tregs est associée à la régression de la fibrose chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire [245]. Le rôle des Tregs dans la stimulation des mécanismes impliqués dans la fibrose serait dépendant de leur sécrétion de TGF- β [246]. Dans le cas d'une infection par le virus de l'hépatite B, le TGF- β produit par les Tregs est au contraire associé à une diminution de l'inflammation au niveau du foie et de la fibrose [247].

IV. Les Tregs en conditions inflammatoires

Il est primordial que la fonction et l'activation des Tregs soient équilibrées pour prévenir l'apparition de maladies auto-immunes, mais aussi pour générer une réponse immunitaire efficace contre les cellules tumorales (Figure 18). Pour cela, les Tregs doivent s'adapter aux différents environnements et affiner leur fonction suivant le contexte. Leur plasticité leur permet cette adaptation. Cependant, elle peut également être la cause de leur instabilité et de leur dysfonctionnement dans certaines pathologies. Comprendre les facteurs influençant sur ces paramètres devient donc indispensable pour améliorer l'efficacité des traitements ciblant les Tregs. Certaines stratégies thérapeutiques cherchent à restaurer la balance qui est perturbée, ce qui consiste à stimuler les Tregs dans les pathologies auto-immunes et à les inhiber dans le cadre des cancers.

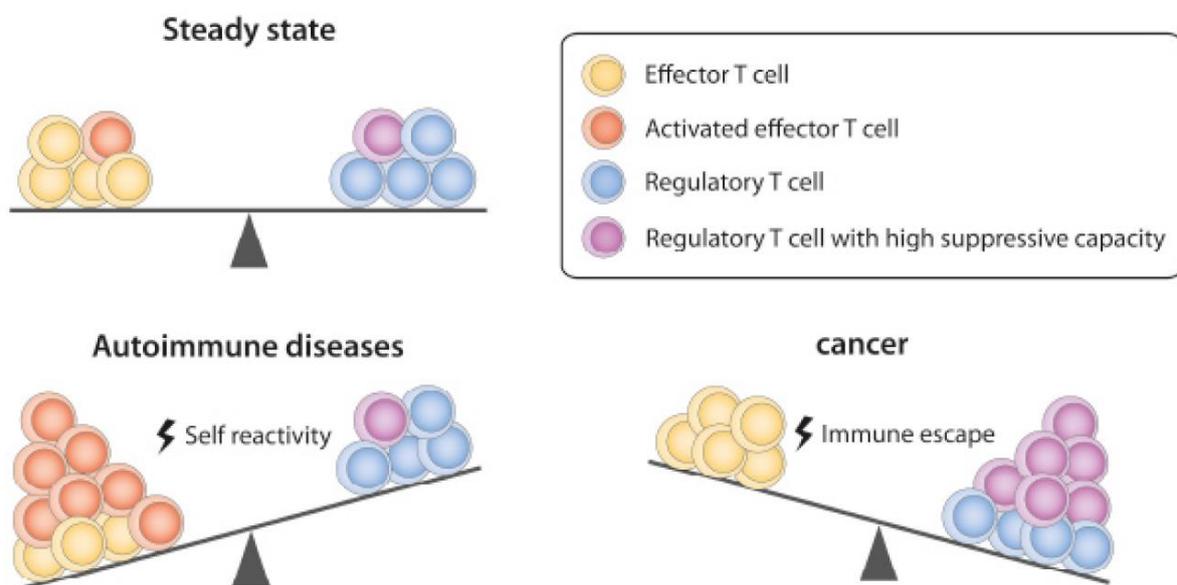


Figure 18 : dérégulation de la balance entre les Tregs et les Tconv dans les maladies auto-immunes et les cancers (tiré de [248]). Dans les pathologies auto-immunes, la tolérance au soi est rompue, ce qui conduit à l'expansion des LT effecteurs activés et à l'altération des Tregs. Au contraire, dans les cancers, l'environnement tumoral inhibe les LT et favorise l'expansion des Tregs.

1. Auto-immunité

L'importance des Tregs dans le contrôle du développement de pathologies auto-immunes est mis en évidence chez les patients IPEX ayant une altération du gène codant pour FOXP3 et donc des Tregs. Ils développent une pathologie auto-immune généralisée dans divers tissus [33]. De façon similaire, les souris « *scurfy* » présentant une mutation de *Foxp3* perturbant la génération des Tregs développent un syndrome auto-immun fatal conduisant à la mort un mois après la naissance [32].

L'ablation des Tregs chez l'adulte entraîne rapidement le développement d'un syndrome auto-immun et conduit à la mort en quelques semaines, démontrant leur rôle tout au long de la vie [249]. L'absence de Tregs conduisait dans ce modèle à une hyper activation des CD. L'altération de mécanismes suppresseurs majeurs de la fonction des Tregs, comme le CTLA-4, conduit également au développement de pathologies auto-immunes [250]. Ces données montrent l'importance des Tregs pour contrôler en permanence l'activation des LT auto-réactifs, mais également leur contrôle sur le compartiment myéloïde.

Dans différentes maladies auto-immunes chez l'homme, il a été observé un défaut quantitatif ou fonctionnel des Tregs qui pourrait participer à la physiopathologie de la maladie [251]. Les patients atteints de sclérose en plaques, par exemple, présenteraient une altération du nombre et de l'efficacité des Tregs [252]. Cela était associé à une réduction de l'expression de Foxp3 et de CTLA-4 [253]. Dans ce contexte, certains Tregs adoptent un profil similaire au Th1, produisent de grandes quantités d'IFN γ , mais ont une capacité suppressive altérée [254]. Ces anomalies se manifestent également chez les individus atteints de diabète insulino-dépendant et de lupus [255], [256].

Dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, on observe une accumulation de Tregs aux sites d'inflammation, cependant ils ne sont pas capables de contrôler efficacement la production de cytokines pro-inflammatoires [257], [258]. Il semblerait que les Tregs adoptent un profil Th17 et produisent de l'IL-17 après re-stimulation, tout en conservant leur capacité de régulation [259]. La distinction et la limite entre le moment où ils exercent normalement leur fonction suppressives grâce à leur plasticité et le moment où ils deviennent pathogènes et participent au développement de la maladie devient complexe. Pour rétablir l'équilibre, des approches prometteuses émergent. Par exemple, bloquer l'IL-6 pourrait permettre de rééquilibrer la balance entre les Tregs et les Th17 [260]. De plus, des expériences menées sur des modèles murins ont montré que l'injection de Tregs pouvait améliorer certaines de ces maladies [261], [262]. En somme, l'étude des Tregs dans ces différentes maladies révèle la complexité de leur rôle. Cela ouvre de nouvelles pistes pour le traitement et la compréhension de leur rôle au sein de notre système immunitaire.

2.Cancer

Le système de surveillance du système immunitaire permet de limiter l'apparition de cellules anormales dans l'organisme. Cependant, les cellules tumorales échappent parfois à ce système et conduisent aux développements de cancers. L'un des mécanismes d'échappement implique des cellules régulatrices comme les Tregs. A l'opposé de leur rôle bénéfique dans le contrôle des pathologies auto-immunes, les Tregs ont donc un rôle le plus souvent délétère dans les cancers. Ils

vont participer à la suppression de la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur, favorisant sa croissance.

Les Tregs infiltrant les tumeurs représentent souvent une forte proportion des TIL (pour *Tumor Infiltrated Lymphocytes*) [263]. Chez les patients, leur présence est souvent corrélée avec un mauvais pronostic pour leur survie. Les tumeurs sécrètent certaines chimiokines ce qui entraîne le recrutement massif de Tregs qui eux expriment fortement les récepteurs correspondants. Le couple chimiokine/récepteur impliqué varie suivant le type de cancers. Au sein de la tumeur, les Tregs participent ensuite à créer un environnement immunosuppresseur via divers mécanismes. Expriment fortement CD25, ils permettent de supprimer la réponse des LT cytotoxiques en capturant l'IL-2 disponible dans l'environnement [264].

Les cellules tumorales échappent également au système immunitaire en exprimant les ligands de molécules contrôlant négativement la réponse immunitaire, appelé « *immune checkpoint* », permettant ainsi de limiter l'activation des LT. D'un autre côté, les Tregs expriment également fortement ces molécules, notamment le CTLA-4 qui joue un rôle important dans leur fonction suppressive. En thérapie, des inhibiteurs de ces molécules sont utilisés pour tenter de rétablir la réponse antitumorale [265], [266]. Ils agiraient alors sur deux versants, rétablir l'activation des cellules effectrices et bloquer celle des Tregs. Cela a également été montré avec la molécule TIGIT (pour *T cell Ig and ITIM domain*) qui participe à la suppression de la réponse, majoritairement en agissant sur les Tregs [267]. Pour les anticorps ciblant le CTLA-4, il a également été montré qu'ils permettaient d'induire la déplétion des Tregs au sein de la tumeur [268].

Les Tregs sont donc capables d'exercer leur fonction dans différents environnements, ce qui est possible du fait de leur diversité. Suivant le contexte et le tissu, les Tregs vont recevoir différents signaux et devoir supprimer différents types cellulaires, ce qui signifie qu'ils doivent s'adapter et exercer différents mécanismes de suppression. Par exemple, dans un modèle murin de délétion spécifique de NRP1 dans les Tregs, ces cellules maintenaient leur capacité à réguler le développement d'une pathologie auto-immune, mais avaient un défaut dans l'inhibition d'une réponse antitumorale [269].

3. Rôle du TNFR2 et de 4-1BB

Les membres de la superfamille du TNF (TNFSF pour *Tumor Necrosis Factor Super Family*) sont composés de protéines qui permettent de réguler le développement des structures lymphoïdes, participent à l'activation des lymphocytes et agissent sur leur survie. Leurs actions sont permises via leur interaction avec leurs récepteurs appelés TNFRSF (pour *Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family*). Le TNF est le premier membre de cette famille à avoir été découvert, c'est une cytokine pro-inflammatoire majeure qui permet d'initier et de réguler divers versants de la réponse immunitaire. A l'origine, il a été mis en évidence comme étant produit suite à une infection bactérienne et permettant d'induire la nécrose de cellules tumorales, ce qui a conduit à son nom « *Tumor Necrosis Factor* » [270]. Depuis, de nombreuses autres partenaires de la famille ont été découverts. Elle est composée de 19 ligands et de 29 récepteurs répondant à plusieurs de ces ligands. Certains récepteurs ont un domaine de mort et peuvent induire l'apoptose ou la nécrose. Les membres de la famille TNFRSF sont également capables d'induire des voies de signalisation, la voie NF- κ B jouant un rôle majeur [271]. Son activation conduit notamment à la transcription de facteurs anti-apoptotiques permettant de promouvoir la survie ainsi que la division.

Certains récepteurs de la famille TNFRSF font partie de la signature clef permettant d'identifier les Tregs, comme le TNFR2, GITR, OX40 et 4-1BB [272]. Ils sont fortement exprimés par les Tregs et pour certains sont également retrouvés au stade des précurseurs dans le thymus, suggérant un rôle dans leur développement [273]. Les équipes des Drs. Oppenheim et Benoit Salomon ont montré que la stimulation du TNFR2 permettait d'accroître la prolifération et la survie des Tregs ([274], [275], [276]). L'engagement de plusieurs membres du TNFRSF permettait d'induire des voies de signalisation similaire impliquant fortement la voie canonique de NF- κ B. Parmi les récepteurs étudiés, le TNFR2 et 4-1BB ont démontré la plus grande efficacité pour stimuler les Tregs [274]. En outre, les résultats ont montré que les Tregs stimulés par des agonistes de 4-1BB et TNFR2 présentaient un profil transcriptomique similaire, se distinguant des profils des autres récepteurs étudiés (OX40, GITR, DR3). Cela suggère que 4-1BB et TNFR2 pourraient jouer un rôle particulièrement important dans la biologie des Tregs.

3.1. TNFR2

3.2.1 Généralités

Le TNF est une cytokine inflammatoire majeure dont la production est fortement augmentée lors d'inflammations ou d'infections. Par son action pléiotrope, le TNF a un rôle central dans différentes composantes de la réponse inflammatoire et immune [277]. Il est majoritairement produit par les LT et les cellules myéloïdes. L'action du TNF est médiée par deux récepteurs fonctionnellement différents, le TNFR1 et le TNFR2. Le TNFR1, exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, est responsable de la composante inflammatoire, cytotoxique et apoptotique du TNF. Le TNFR2, exprimé surtout à la surface des LT et de cellules endothéliales activées, serait quant à lui responsable de la composante régulatrice de la cytokine. Ainsi, suite à une administration létale de LPS (pour Lipopolysaccharide) provoquant une inflammation massive chez des souris sauvages, les souris déficientes pour le TNFR1 sont protégées de cette maladie, mais pas les souris déficientes pour le TNFR2 [278]. Certaines données suggèrent que l'effet immuno-régulateur de l'interaction TNF/TNFR2 implique les Tregs.

Le TNF permet *in vitro* de stimuler la prolifération et la fonction suppressive des Tregs [275]. L'expression de CD25 et Foxp3 est également augmentée sur les Tregs humains suite à cette stimulation [279]. Les Tregs constituent le type cellulaire exprimant le plus fortement le TNFR2 [280]. *In vivo* dans un modèle murin, l'injection d'un agoniste du TNFR2 permet l'expansion des Tregs et permet de réduire la sévérité de la pathologie induite par la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) [281]. Il a également été montré que les Tregs exprimant fortement le TNFR2 avaient une meilleure capacité suppressive *in vitro* et s'accumulaient aux sites d'inflammation *in vivo* [280]. Au contraire, les Tregs n'exprimant pas le TNFR2 avaient un phénotype de cellules naïves et des capacités suppressives réduites. Ce marqueur permet d'identifier une population de Tregs ayant un phénotype activé et exprimant notamment les marqueurs CD44, CD69, GITR et CTLA-4. Enfin, l'expansion des Tregs induite par l'injection de LPS ou par un choc septique est abolie suite à l'administration d'un anticorps neutralisant le TNF ou chez les souris déficientes pour le TNFR2 [275], [282]. Ainsi, le TNFR2 serait impliqué dans l'expansion des Tregs dans certains contextes inflammatoires. Il pourrait également jouer un rôle dans la fonction suppressive des Tregs. En effet, dans un modèle de colite, le transfert adoptif de Tregs déficient pour le TNFR2 ne permet pas de contrôler la pathologie par rapport à des Tregs l'exprimant [283]. De plus, le TNFR2 aurait également un rôle sur la stabilité des Tregs. Dans un environnement compétitif, les Tregs n'exprimant pas le TNFR2 auraient une survie diminuée par rapport aux Tregs exprimant ce récepteur. Parmi les Tregs transférés, ceux n'exprimant pas le TNFR2 perdent majoritairement l'expression de Foxp3. Il est à noter que le TNFR2 est également exprimé par

les Tconv et que l'activation et le signal TCR permettent d'augmenter son expression [284]. Son expression sur les Tconv est associée à une résistance à leur suppression par les Tregs.

3.1.2 Auto-immunité

Le TNF étant une cytokine pro-inflammatoire, elle peut avoir un rôle délétère dans certaines maladies auto-immunes. Chez l'Homme, des biothérapies utilisant des anticorps bloquant l'action du TNF sont utilisées pour le traitement de certaines maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou le psoriasis [285]. Cependant, chez les patients atteints de sclérose en plaques, ce même traitement peut aggraver la maladie, mettant en avant le rôle immunorégulateur du TNF [286], [287]. De plus, la déficience en TNF conduit à l'exacerbation de l'EAE [288]. Dans un modèle murin de diabète de type 1, la surexpression du TNF permet de limiter le développement de lymphocytes auto-réactifs T responsables de la pathologie [289]. Cet effet pourrait être dû au TNFR2 exprimé par les Tregs et à son rôle dans leur fonction suppressive.

Au cours de l'EAE, les souris déficientes pour le TNFR1 ont une maladie diminuée alors que les souris déficientes pour le TNFR2 ont une maladie plus sévère par rapport aux souris sauvages [290]. Cette pathologie plus sévère était associée à une plus faible proportion de Tregs dans le système nerveux central (SNC), le site cible de l'attaque auto-immune. Dans un modèle de souris génétiquement modifiées, exprimant le TNF et TNFR2 humain et présentant une délétion du TNFR2 dans les Tregs, l'EAE était également plus sévère, suggérant un rôle important de l'axe TNF/TNFR2 dans le contrôle de cette pathologie par les Tregs [291].

L'équipe du Dr. Benoit Salomon s'est également intéressé à cet axe et a confirmé que l'injection d'antagoniste du TNF ou du TNFR2 conduisait à une EAE plus sévère [292]. Pour aller plus loin dans cette étude, des modèles murins possédant une délétion du TNFR2 spécifiquement dans les Tregs ont été générés. Ces modèles reposent sur les systèmes CreLox et CreLox inducible, les souris *Foxp3^{Cre}Tnfrsf1b^{fl/fl}* et *Foxp3^{Cre-ERT2}Tnfrsf1b^{fl/fl}* possèdent une délétion du gène *Tnfrsf1b*, codant pour le TNFR2, spécifiquement dans les Tregs et de manière inducible suite à une administration de tamoxifène pour le second modèle. Dans ces modèles, l'EAE était exacerbée et accompagnée d'une diminution de l'expression de certains marqueurs d'activation des Tregs dans le SNC. De manière intéressante, nous avons pu mettre en évidence que l'expression du TNFR2 par les Tregs était indispensable pour contrôler la pathologie au pic de la maladie dans le SNC mais n'avait pas d'impact sur l'activation des LT dans les ganglions drainant le site d'inflammation. Ces données montrent l'importance de l'axe TNF/TNFR2 dans les mécanismes de suppression des Tregs dans un contexte d'auto-immunité. Ce travail auquel j'ai participé est mis en annexe de ce mémoire.

3.1.3 Cancer

Le TNF a à l'origine été mis en évidence pour ses propriétés capables d'induire la nécrose tumorale. Cependant, il est maintenant connu qu'il a un rôle complexe dans le cancer et l'immunité anti-tumorale. Plusieurs études montrent que neutraliser le TNF permet de diminuer la croissance tumorale dans différents types de cancer, démontrant son effet pro-tumoral [293], [294]. Cette action semble être médiée par l'axe TNF/TNFR2, qui peut agir à travers différents mécanismes. Tout d'abord, il peut avoir un effet direct sur les cellules tumorales, étant donné que certains types de cellules tumorales expriment également le TNFR2 [295]. Ensuite, il peut avoir un effet immunosuppresseur en agissant sur les Tconv en induisant leur mort cellulaire, ou en stimulant les cellules myéloïdes suppressives ou les Tregs [294]. Il est à noter que ce dernier mécanisme, impliquant la stimulation des Tregs exprimant le TNFR2, semble jouer un rôle primordial dans ce processus de régulation.

Chez l'homme, dans le cas du cancer du côlon, la majorité des Tregs infiltrant la tumeur exprime le TNFR2 [296]. D'autres études ont obtenu des résultats similaires sur différents types de cancer et ont montré que les Tregs circulant chez ces patients exprimaient également fortement le TNFR2 [297]. Les Tregs exprimant le TNFR2, infiltrant la tumeur dans un modèle murin ou recirculant chez des patients, montrent une capacité suppressive accrue [298]. Le TNF permet de promouvoir la croissance tumorale et le développement de métastases [299]. Cela était accompagné d'une augmentation de la proportion de Tregs. Au contraire, dans des modèles murins délétés pour le TNFR2, la croissance tumorale et le développement de métastases étaient réduits [300]. Une diminution du nombre de Tregs infiltrant la tumeur était également observée. In vitro, cette expansion des Tregs était dépendant du TNFR2.

Des thérapies bloquant le TNFR2 montrent un effet bénéfique en diminuant la croissance tumorale [301]. Ce traitement induit une réduction du nombre de Tregs exprimant le TNFR2 et une augmentation des LT CD8+ produisant de l'IFN γ . Cependant, le ciblage de l'axe TNF/TNFR2 semble être complexe car l'utilisation d'agonistes du TNFR2 permet également de réduire la croissance tumorale [301]. Il a été proposé que cela stimulait les LT CD8+, permettant leur infiltration dans la tumeur et la sécrétion d'IFN γ . Cette complexité dans le ciblage du TNFR2 réside dans le type d'anticorps utilisés. Les anticorps peuvent avoir un rôle agoniste ou antagoniste sur leur cible, mais peuvent également induire des signaux via leur partie constante en se liant aux récepteurs présents majoritairement sur les cellules myéloïdes [302]. Cette liaison peut à son tour avoir des propriétés agonistes ou inhibitrices en médiant la déplétion des cellules ciblées par l'anticorps.

En conclusion, ces données mettent en évidence l'importance cruciale du TNF et du TNFR2 dans la régulation des Tregs et leur implication dans la croissance tumorale. Le ciblage de l'axe

TNF/TNFR2 offre ainsi une piste intéressante pour développer des stratégies thérapeutiques visant à moduler l'immunité antitumorale et à réduire la progression des cancers. Il reste encore beaucoup à découvrir sur l'implication de cet axe dans l'immunité antitumorale. Une partie de mon travail de thèse a eu pour objectif de mieux comprendre le rôle du TNFR2 exprimé par les Tregs dans cette immunité.

3.2. 4-1BB

3.2.1 Généralités

4-1BB est exprimé par divers sous types de cellules immunitaires, incluant les LT CD4+, LT CD8+, LB, CD et les Tregs [303]. Son expression sur les LT est augmentée de manière transitoire suite à l'activation. Il permet de donner un puissant signal de costimulation pour promouvoir la prolifération, la survie et également la production de cytokine comme l'IL-2, l'IFN γ et le TNF. La stimulation de 4-1BB aurait un effet préférentiel sur les LT CD8+, en comparaison avec les LT CD4+, en stimulant leur prolifération et leur production d'IFN γ [304]. Il permet également d'induire l'expression de gènes anti-apoptotiques, comme Bcl-xL et Bfl-1, de manière dépendante à la voie de signalisation NF- κ B, pour promouvoir leur survie [305]. 4-1BB est fortement exprimé par les CD au cours de leur maturation [306]. Sa stimulation permet d'augmenter la production de cytokines et l'expression des molécules de costimulation CD80/86 à la surface des CD, indispensable pour l'activation des LT. Cette même étude a également montré que le signal 4-1BB au sein des CD permettait aussi d'induire l'expression de Bcl-xL et Bfl-1.

Au niveau des Tregs, la stimulation de 4-1BB, en combinaison avec un signal TCR, permet *in vitro* d'induire leur prolifération en absence de costimulation CD28 [307]. Les Tregs ainsi stimulés conservaient leur capacité suppressive et leur expression de Foxp3 [308]. Cette stimulation sur les Tregs augmente leur production d'IFN γ , mais pas de l'IL-2, contrairement aux Tconv. L'utilisation d'agoniste de 4-1BB permet également d'induire l'expansion des Tregs *in vivo* dans la rate [309]. Cela s'accompagne d'une augmentation de la production d'IL-2 par les LT, indispensable à cette expansion, car le blocage de l'IL-2, l'inhibe. Cette même étude a montré que la capacité suppressive des Tregs préliminairement stimulés par 4-1BB était accrue et qu'ils permettaient un meilleur contrôle de la maladie du greffon contre l'hôte.

Actuellement, 4-1BBL est le seul ligand décrit de 4-1BB. Il est majoritairement exprimé par les CPA et certaines cellules tumorales [303], [310]. L'interaction de 4-1BB avec 4-1BBL induit un signal bidirectionnel. En effet, il a été montré que 4-1BBL induisaient un signal permettant d'induire la prolifération des monocytes et des macrophages [311]. Ce mécanisme passait par une modulation de leur métabolisme pour augmenter leur demande en énergie et leur production de biomasse [312]. De

plus, certains LT expriment 4-1BBL, ce qui participerait à limiter l'inflammation [313]. 4-1BB serait séquestré et internalisé par son ligand dans les LT qui les expriment, limitant la stimulation induit par 4-1BB sur d'autres cellules cibles. Une étude récente a mis en avant un nouveau mécanisme de suppression utilisé par les Tregs et impliquant 4-1BB pour limiter l'activation des Tconv [314]. Les Tregs utiliseraient le mécanisme de trogocytose, permettant d'internaliser une partie de la membrane de la cellule cible pour capturer le ligand de 4-1BB à la surface des CPA et donc limiter les signaux de costimulation disponibles pour activer les Tconv.

Son expression et son action à la fois sur les LT mais aussi sur les autres types de cellules immunitaires, voire les cellules tumorales, font de 4-1BB une cible de choix en thérapie. En effet, l'utilisation d'agonistes de 4-1BB semble prometteuse, cependant, ils ont un rôle paradoxal, car les mêmes anticorps sont capables à la fois de diminuer la sévérité de certaines pathologies auto-immunes et de limiter la croissance tumorale.

3.2.2 Auto-immunité

L'utilisation d'agoniste de 4-1BB permet de réduire le développement et la sévérité de plusieurs pathologies auto-immunes. Dans un modèle murin d'une maladie auto-immune affectant l'œil (EAU pour *Experimental Autoimmune Uveoretinitis*), l'utilisation d'un agoniste de 4-1BB permet de contrôler la pathologie [315]. Ce contrôle est permis via l'expansion de LT CD8+ et de leur production d'IFN γ qui stimule à son tour la production d'IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) par les CD. L'IDO permet de réguler négativement les réponses immunitaires et son inhibition altère les propriétés bénéfiques de l'agoniste de 4-1BB dans cette pathologie. Ce mécanisme d'action a également été observé dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde [316].

Les effets bénéfiques des agonistes de 4-1BB ont été rapportés dans le modèle d'EAE. Ils permettaient de contrôler drastiquement le développement de la pathologie [317]. Cependant, ce traitement ne permettait pas de limiter le développement de l'EAE passive, induite par le transfert adoptif de LT CD4+ auto-réactifs pour la myéline. Cela suggère que les agonistes de 4-1BB agissent durant la phase d'activation primaire des LT et ont un effet limité sur leur réactivation dans le SNC. Une deuxième étude a confirmé ces données et montré que le mécanisme impliqué était seulement partiellement dépendant de l'IFN γ et des LT CD8+, suggérant d'autres mécanismes sous-jacents [318]. En effet, les agonistes de 4-1BB permettaient de moduler la balance Th17/Tregs en diminuant la production d'IL-6, une cytokine indispensable à la différenciation Th17.

Au premier abord, certaines études sur le rôle de 4-1BBL dans l'EAE semblent surprenantes. Les souris délétées pour 4-1BBL sont résistantes au développement de l'EAE [319]. La production de

cytokine pro-inflammatoire par les Th1 et Th17 étaient réduites, ainsi que leur migration dans le SNC. Une seconde étude a mis en évidence l'importance de l'expression de 4-1BBL par les cellules microgliales, les CPA résidents du cerveau [320]. La délétion de ce ligand sur les cellules de la microglie entraîne une diminution de leur activation, ce qui pourrait moduler la sévérité de l'EAE. Cela suggère que les agonistes de 4-1BB pourraient avoir des effets opposés, d'une part en stimulant les cellules cibles exprimant ce récepteur et d'autre part en limitant l'interaction de 4-1BB avec son ligand. De plus, chez l'Homme, les Tregs recirculant de patients atteints de sclérose en plaques expriment plus faiblement 4-1BB [321]. Ces données suggèrent que 4-1BB serait une cible intéressante dans le traitement de diverses pathologies auto-immunes. Cependant, depuis ces études, peu d'avancées dans la littérature ont été faites concernant le rôle des agonistes de 4-1BB dans le traitement des pathologies auto-immunes.

3.2.3 Cancer

La première démonstration de l'effet bénéfique des agonistes de 4-1BB dans le cancer remonte en 1997 [322]. Les auteurs ont montré que ce traitement permettait un puissant contrôle de la croissance tumorale et le développement d'une réponse mémoire. Par la suite, de nombreuses études ont confirmé ces données et montré que ces agonistes agissaient directement sur les LT [323]. Le mécanisme le mieux décrit implique la stimulation et la levée de l'anergie des LT CD8+ cytotoxiques, permettant ainsi de promouvoir l'immunité antitumorale [324]. A la suite du traitement, les LT CD8+ infiltrant la tumeur, et une proportion des LT CD4+, expriment fortement KLRG1 et Eomes (pour Eomesodermin) [325], [326]. Les cellules endothéliales des tumeurs peuvent également exprimer 4-1BB. Leur stimulation par un agoniste entraîne l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, permettant un meilleur recrutement des LT dans la tumeur [327].

4-1BB est fortement exprimé par les Tregs infiltrant les tumeurs, suggérant qu'un agoniste de ce récepteur pourrait également impacter cette population cellulaire. En effet, lorsque l'anticorps utilisé possède une fraction constante (Fc) capables d'activer des récepteurs Fc activateurs, cela module la croissance tumorale en induisant la déplétion des Tregs via un mécanisme d'ADCP (pour *Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis*) [328]. Lorsque l'anticorps a un effet déplétant fort sur les Tregs, il est très efficace pour diminuer la croissance tumorale. De plus, des agonistes de 4-1BB peuvent également stimuler les LT CD8+. La question se pose alors de savoir dans quel cas un anticorps va plutôt induire une déplétion des Tregs ou une activation des LT CD8+. Cet effet va dépendre de l'affinité de l'anticorps pour 4-1BB ainsi que de sa Fc. Il a été proposé que l'effet délétant sur les Tregs était dû au fait que ces cellules expriment plus fortement 4-1BB. Une seconde étude a également montré

l'importance de l'effet agoniste et du type de Fc d'un anticorps anti-4-1BB sur la modulation de la croissance tumorale [329].

Certaines de ces données précliniques ont conduit au développement de deux anticorps agonistes ciblant 4-1BB chez l'Homme : l'urelumab et l'utomilumab [330]. Cependant, les essais cliniques utilisant ces anticorps en monothérapies se sont montrés peu prometteurs, d'une part à cause de la toxicité engendrée au niveau du foie pour l'urelumab et d'autre part de la faible efficacité de l'utomilumab comme agoniste. Ces anticorps sont maintenant envisagés en combinaison avec d'autres immunothérapies ciblant PD-1 ou CTLA-4.

PROJET DE THESE

Mon projet de thèse s'organise autour de deux grands axes. Le premier concerne l'étude du rôle du TNFR2 et de 4-1BB dans la biologie des Tregs à l'état basal et en condition pathologique. Le second découle de certaines observations et avancées techniques mises au point dans le premier axe et s'intéresse à l'ontogénie et à la stabilité des Tregs.

1) Rôle du TNFR2 et de 4-1BB dans la biologie des Tregs

Dans un premier temps, mon projet thèse devait permettre de poursuivre les recherches de l'équipe sur le rôle du TNFR2 dans la biologie des Tregs en conditions pathologiques. En utilisant les modèles *Foxp3^{Cre}Tnfrsf1b^{fl/fl}* et *Foxp3^{Cre-ERT2}Tnfrsf1b^{fl/fl}*, les données de l'équipe montraient un rôle indispensable du TNFR2 exprimé par les Tregs pour réguler le développement de l'EAE [292] et la croissance tumorale. En parallèle, j'ai étudié l'impact de la délétion du TNFR2 au sein des Tregs en condition physiologique. En effet, l'équipe avait observé que cette délétion n'avait pas d'impact majeur, à l'exception du VAT qui présentait une réduction de la proportion des Tregs. Mon projet de thèse devait permettre de mieux caractériser la population de VAT-Tregs et leur dépendance au TNFR2.

Au vu de l'importance du TNFR2 pour la fonction des Tregs en condition pathologique et de la similitude du profil transcriptomique des Tregs obtenus après une stimulation par des agonistes TNFR2 ou 4-1BB précédemment observé dans l'équipe [274] ; nous avons généré un second modèle murin possédant une délétion de 4-1BB spécifiquement dans les Tregs grâce aux souris *Foxp3^{Cre-ERT2} Tnfrsf9^{fl/fl}*. Mon projet de thèse consistait à étudier le rôle de 4-1BB dans la biologie des Tregs, à la fois en condition physiologique, mais aussi pathologique, en utilisant le modèle d'EAE et de cancer.

Comme je le décrirai plus tard, les données sur le rôle du TNFR2 dans la biologie des VAT-Tregs et sur les souris *Foxp3^{Cre-ERT2} Tnfrsf9^{fl/fl}* n'ont pas donné de résultats intéressants ou reproductibles. Cela m'a conduit à réorienter le sujet de ma thèse au bout de 2 ans et demi pour m'intéresser à une étude plus fondamentale sur l'ontogénie et la stabilité des Tregs.

2) Ontogénie et stabilité des Tregs

L'utilisation et une meilleure maîtrise du modèle CreLox inducible nous ont permis de développer un modèle de choix pour étudier le développement des Tregs au cours du temps et leur stabilité. Dans une seconde partie de ma thèse, je me suis donc intéressée à ces questions, d'une part en étudiant l'ontogénie et la mise en place du pool de Tregs chez l'adulte dans différents tissus

lymphoïdes et non lymphoïdes. Et d'autre part en étudiant les caractéristiques et la fonction de la population d'exTregs mise en évidence par ce modèle murin. Ce projet était tout à fait nouveau pour l'équipe dans la mesure où ces questions n'avaient pas été abordées. Grâce aux avancées techniques que j'ai pu réaliser, nous avons pu aborder certaines questions importantes sur la biologie des Tregs. Nous avons pu étudier à quel âge le pool de Tregs se constitue dans différents tissus et quel est le phénotype de ces Tregs en fonction de l'âge auquel ils se développent. Nous avons également apporté des données sur la stabilité des Tregs en fonction de l'environnement tissulaire et de l'inflammation. Ces derniers résultats devraient permettre de mieux connaître la stabilité des Tregs qui est un sujet controversé dans la communauté scientifique.

Dans la partie résultats de ce mémoire, je présenterais dans un premier temps la partie de mon travail sur l'ontogénie et la stabilité des Tregs qui sont des données très fondamentales sur la biologie de ces cellules. Puis, je décrirai les données que nous avons obtenues sur l'étude du TNFR2 et de 4-1BB dans la biologie des Tregs à l'homéostasie et en contexte de pathologies. En fonction de l'état d'avancement du travail, celui-ci sera présenté sous la forme d'article publié, de manuscrits ou de résultats commentés.

RESULTATS

I. Résultats principaux

1. Biologie des Tregs

1.1 Ontogénie

Chez la souris, le système immunitaire des nouveau-nés présente des caractéristiques différentes de l'adulte [331]. Cette période est notamment favorable au développement des Tregs. Les Tregs générés chez les nouveau-nés ont un répertoire TCR plus auto-réactif. De plus, une proportion de Tregs spléniques persiste chez l'adulte où ils présentent un phénotype plus activé et suppresseur par rapport aux Tregs formés à l'âge adultes. Ils jouent un rôle essentiel dans le contrôle de pathologies auto-immunes [15], [78]. Certains tissus non-lymphoïdes, comme la peau, sont colonisés de manière précoce par les Tregs qui permettent d'établir une tolérance contre la flore commensale [79], [80].

Bien que le développement de Tregs chez les nouveau-nés soit primordial, la cinétique de formation du pool de Tregs dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes est peu connue. La persistance des Tregs des nouveau-nés chez l'adulte ainsi que leur phénotype sont également peu documentés. En utilisant un système de « fate mapping » développé grâce au modèle CreLox inducible, nous avons pu étudier si le pool de Tregs de différents tissus d'une souris de 8 semaines était généré de façon continue ou plus à certains âges. Nous nous sommes par ailleurs intéressés au phénotype des Tregs formés pendant le stade néonatal dans différents tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes chez l'adulte.

Nous avons montré que le pool de Tregs présent dans les tissus lymphoïdes secondaires était formé progressivement au cours de la vie. Au contraire, dans la peau et le VAT, le pool était majoritairement constitué deux semaines après la naissance. Les Tregs formés chez les nouveau-nés et persistant chez l'adulte dans différents tissus avaient un phénotype plus activé et exprimaient des marqueurs des Tregs tissulaires.

A neonatal regulatory T cell subset persists into adulthood with an activated phenotype and constitutes a large pool in the skin

Morgane Hilaire¹, Léonie Cagnet^{1,2}, Rémy Villette¹, Aristeidis Roubanis¹ and Benoît L Salomon^{1,2,3}

¹Sorbonne Université, INSERM U1135, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), F-75013, Paris, France.

²Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), INSERM UMR1291 - CNRS UMR5051 - University Toulouse III, Toulouse, France.

³To whom correspondence may be addressed: Benoit Salomon, benoit.salomon@inserm.fr. ORCID ID: 0000-0001-9673-5578.

ABSTRACT

Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) are present in secondary lymphoid organs and various nonlymphoid tissues where they participate in immune tolerance and tissue homeostasis and function. In mice, Tregs begin to colonize these tissues during the first weeks of life. Tregs generated in neonates participate in the maintenance of immune tolerance in adults. However, little is known about the kinetics of generation of the Treg-pool in different tissues. Here, we investigated the ontogenesis of Tregs from birth to adulthood in lymphoid and nonlymphoid tissues using a genetic fate mapping system. In secondary lymphoid organs, the Treg-pool of adult mice is composed of cells generated gradually at different ages. In contrast, a large portion of the adult Treg-pool develops in newborns in the skin and during the first two weeks of life in visceral adipose tissue. In the liver, lungs and colon, the kinetics of Treg development is intermediate between those of lymphoid organs and the skin. Compared to Tregs generated later in life, neonatal Tregs that persist into adulthood have a more activated phenotype, express markers of tissue-Tregs and type 2 immunity. Thus, we show significant differences in the Treg-pool generation kinetics between tissues, with an early development of skin Tregs. Furthermore, we reveal a major phenotypic shift between Tregs generated in neonates and afterwards.

INTRODUCTION

Mice are born lymphopenic and it is only after birth that T lymphocytes emerge from the thymus and colonize tissues. The mouse is therefore a convenient model for investigating the development of T cells and their gradual colonization of tissues, which takes place over several weeks. During this period, the immune system faces the challenge of rapidly establishing a functional system capable of controlling pathogens, while simultaneously tolerating antigens from the self, microbiota and food.

During the first weeks of life, the T cell immunity displays characteristics that differ from those of adult mice [1]. These include high lymphopenia-induced proliferation, a bias towards Th2 responses, and a more restricted but also more broadly reactive T cell receptor repertoire. The perinatal period is also favorable for the development of Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes (Tregs), which include both thymic- and peripherally-derived Tregs [2], [3]. Neonatal Tregs have a more autoreactive repertoire than those generated later in life and have a more activated phenotype. A portion of Tregs generated during the perinatal period persists into adulthood in the spleen. Although they constitute a minor fraction of the Treg-pool in adults in lymphoid tissues, these neonatally generated Tregs play an essential role in controlling autoimmunity [4], [5].

The unique environment and features of neonates provide the foundation for proper homeostasis and immune tolerance in nonlymphoid tissues. The early Treg-colonization seems to play a critical role in some tissues. The skin is massively colonized by a population of Tregs that reach 80% of the CD4⁺ cells at 2-weeks of age, which establish long-term tolerance to commensal microbes. Skin neonatal Tregs have a better ability to maintain this tolerance than Tregs produced in adulthood [6], [7]. Also, early colonization of the liver by Tregs is critical to limit local activation of conventional T cells (Tconvs) [8].

Despite the importance of Treg development in neonates for optimal tissue development and the proper functioning of the immune system even in adults, the ontogeny and kinetics of the generation of the Treg-pool in different lymphoid and nonlymphoid tissues is poorly known. We also have limited knowledge of the phenotype of Tregs that are formed in neonates and persist in adults, and whether it varies by organ. In this work, we sought to better understand the kinetics of Treg generation. This was done by exploiting a fate mapping system to characterize cells that were generated at different ages within the Treg-pool of adult mice. In lymphoid organs, the Treg population is made up of cells that are formed progressively throughout life. In sharp contrast, in the skin and visceral adipose tissue (VAT), the majority of the Treg-pool is constituted before the age of two weeks. In the liver, lungs and colon, the results are in between these two extremes. We also found that Tregs generated during the neonatal period have a different phenotype than Tregs generated later on, expressing higher levels of markers of activation, tissue and type 2 immunity.

MATERIALS AND METHODS

Mice. *Foxp3*^{tm9(EGFP/cre/ERT2)Ayr/J} (*Foxp3*^{Cre-ERT2}), B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J} (*Rosa26*^{tdTomato}) and *Foxp3*^{tm3(DTR/GFP)Ayr/J} (*Foxp3-DTR*) mice were purchased from the Jackson Laboratory. All mice were on a C57BL/6J background. They were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the “Comité d'éthique en expérimentation animal Charles Darwin N°5” under the numbers 02811.03 and 26677 and were in compliance with European Union guidelines.

Tamoxifen administration. The tamoxifen (MP Biomedical, Ref:11435161) was reconstituted at a final concentration of 40 mg/mL in peanut oil, obtained after 4 hours of vortex at 37°C. For mice older than 6-weeks, 8mg of tamoxifen were administered orally by gavage. For mice younger than 6-weeks, tamoxifen was administered by 2 intraperitoneal (IP) injections, three days apart. They received a dose adapted to their age (0.1 mg, 0.2 mg, 1 mg and 2 mg for 1-, 2-, 3-, and 4-6-week-old mice, respectively).

Preparation of cell suspensions. After cervical dislocation, mice were perfused intracardially with phosphate-buffered saline (PBS) to eliminate blood circulating cells. Lymphoid tissues and liver were collected in PBS complemented with 3% fetal calf serum (PBS-3%FCS). A single-cell suspension was obtained by mechanical dilaceration with a 70 µm cell-strainer. The single-cell suspension obtained from the liver was re-suspended in 40% Percoll, laid on an 80% Percoll and centrifuged for 20 min at 2 000 rpm at 20°C. Cells were collected at the 40%:80% Percoll interface and washed with PBS-3%FCS. The entire colon was collected, washed to remove feces, cut longitudinally and then into small pieces. The tissues were subjected to three consecutive baths in order to remove the epithelium and collect the lamina propria: twice with PBS-3%FCS EDTA 5mM and once with PBS-3%FCS, each lasting 20 minutes. After each bath, the tubes were vortexed 10 seconds and the pieces of tissue were transferred into the next tube. For the spleen and lungs, the red blood cells were lysed with ammonium chloride potassium for 1 min.

The VAT, lung and skin were collected in PBS and cut into small pieces prior to enzymatic digestion. Digestion kits specific to each tissue from Miltenyi were used. The gentleMACS™ Dissociator was used for the lungs (Ref: 130-095-927) and the VAT (Ref: 130-105-808) in accordance with the instructions provided by the supplier. For the skin (Ref: 130-110-201) and the lamina propria (Ref: 130-097-410) the protocol was adapted, and the cells were digested using 12-well plates at 37°C with constant agitation for 105 minutes and 30 minutes, respectively. After the digestion, the tissues were filtered with a 70 µm cell-strainer.

Antibodies and flow cytometry. Cells were stained in 96-well plates with the antibodies and fluorescent reagent listed in Table 1. The cells' viability was determined using a fixable live/dead dye

(LIVE/DEAD™ Blue, Invitrogen). Non-specific binding was limited by using the 2.4G2 hybridoma (anti-CD16/32). Membrane staining was performed for 20 min at 4°C in PBS-3%FCS. Fixation and permeabilization of the cells were performed using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set from eBioscience. Intracellular staining was performed for 45 min at 4°C using the buffer provided. Intracellular cytokine staining was assessed after 2.5 hours of Phorbol myristate acetate (PMA 50 ng/mL)–ionomycin (5 µg/ml) stimulation in RPMI 1640 containing 10%FCS, 2mM L-Glutamine, 20mM HEPES, 1mM Sodium Pyruvate, 1mM non-essential amino acids, Penicilline/Streptomycine, 55 µM beta-mercaptoethanol and Golgi-Plug (BD Biosciences). Cells were acquired on the spectral cytometer Aurora from Cytex and analyzed using the FlowJo software.

Treg adoptive transfer in *Foxp3^{DTR}* mice. Single-cell suspension obtained from the spleen and lymph nodes (LNs) of the *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* donor mice were stained with an anti-CD25 (7D4) biotin labeled antibody and were then coated with anti-biotin microbead (Miltenyi, Ref: 130-090-485). After magnetic sorting, cells of the CD25⁺ enriched positive fraction were labeled with the CFSE CellTrace kit from eBioscience and were intravenously injected into *Foxp3^{DTR}* recipient mice (10⁶ cells/mouse). The recipient mice were treated with tamoxifen and 3x1µg of diphtheria toxin in IP before the adoptive transfer. The donor cells were identified by flow cytometry in the spleen, LN, lungs, liver and colon based on the CFSE expression 5 days after the adoptive transfer.

Flow-cytometry analysis, biostatistic and data modelization

Raw FCS data from the Aurora were analyzed using FlowJo software to produce data tables. Following analysis were performed using R (version). Principal component analysis (PCA) were performed using factominer (v) and factoextra (v). Boxplots and line plots were generated using ggplot2. Statistical analyses were performed using rstatix (v) and ggpubr (x).

Target	Clone	Fluorochrome	Supplier	Reference
Bcl2	10C4	PE-Cy7	Invitrogen	25-6992-42
CCR2	475301	BUV661	BD Biosciences	750042
CD25	PC61	BV605	Biologend	102036
CD3	145-2C11	BUV563	BD Biosciences	749277
CD4	GK1.5	BUV496	BD Biosciences	612952
CD44	IM7	PerCP	Biologend	103035
CD45	30-F11	BUV395	BD Biosciences	564279
CD62L	MEL-14	BV650	BD Biosciences	564108
CD69	H1.2F3	BUV805	BD Biosciences	741927
CD73	TY/11.8	PerCP-Cy5.5	Biologend	127214
CD8	53-6.7	PE-Cy5.5	Invitrogen	35-0081-80
c-Maf	sym0F1	eF450	Invitrogen	48-9855-42
CTLA-4	UC10-4F10-11	PE-CF594	BD Biosciences	564332
EZH2	11/EZH2	BV421	BD Biosciences	562963
Foxp3	FJK-16s	FITC	Invitrogen	11-5773-82
GATA3	TWAJ	PE-Cy5	Invitrogen	15-9966-41
ICOS	7E.17G9	BV711	BD Biosciences	740763
Ki67	SolA15	AF532	Invitrogen	58-5698-82
KLRG1	2F1	BUV615	BD Biosciences	751191
NRP1	V46-1954	BV750	BD Biosciences	752452
PD-1	j43	BUV737	BD Biosciences	749422
ROR γ T	Q31-378	AF647	BD Biosciences	562682
ST2	U29-93	BV480	BD Biosciences	746701
TCF1	S33-966	R718	BD Biosciences	567587
TNFR2	REA228	APC	Miltenyi	130-123-275

Table 1. Antibodies used in flow cytometry.

RESULTS

Experimental set-up.

We bred *Foxp3^{Cre-ERT2}* mice to *Rosa26^{tdTomato}* mice to analyze Treg ontogeny using a fate mapping system. In *Foxp3^{Cre-ERT2}* mice, the CRE-ERT2 recombinase is specifically expressed in Tregs but retained in the cytoplasm. Tamoxifen treatment induces its nuclear translocation. In *Rosa26^{tdTomato}* mice, the *Rosa26* locus contains a loxP site-flanked STOP cassette followed by the *tdTomato* gene. In *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice, tamoxifen treatment leads to excision of the STOP cassette and permanent expression of tdTomato in Tregs. Tregs present at time of treatment are hereafter referred to as TagTregs. Tregs generated after tamoxifen treatment, identified by the absence of tdTomato expression, are hereafter referred to as NeoTregs. We used these mice to identify Tregs that were generated from birth to 6 weeks of age by treating *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice with tamoxifen at different ages. Subsequently, the Treg-pool was analyzed for all mice at 8 weeks of age in the spleen, lymph nodes (LNs), lung, liver, visceral adipose tissue (VAT), colon and skin (Fig 1A).

This is an effective approach for studying Treg ontogeny, but several parameters need to be controlled. Firstly, we must determine whether tamoxifen treatment is able to turn-on tdTomato expression in all Tregs at the different ages and tissues analyzed. Mice were analyzed 7 days after tamoxifen treatment to have optimal proportion of TagTregs (Fig S1A). The proportion of TagTregs was always high, ranging from 80% for the lowest (in the spleen and LNs in young mice) to nearly 100% (in the skin and sometimes the colon) (Fig S1B). Secondly, it was important to assess the duration of tamoxifen activity in different tissues to determine the window in which Tregs were tagged. This was addressed by transferring Tregs from *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice into recipient mice, depleted of their endogenous Tregs to favor tissue colonization of donor Tregs (Fig S2). Recipient mice were treated with tamoxifen at different times prior to adoptive Treg transfer. The proportion of TagTregs among donor Tregs was analyzed 5 days later. The tamoxifen activity was the highest 1 to 5 days after injection, then rapidly declined down to almost no activity 8 days after injection in all organs (Fig S2). We thus validated this approach as we were able to efficiently label the vast majority of Tregs in different tissues and at different ages, and the tamoxifen was quickly eliminated from the organism after injection.

Treg ontogeny in different tissues in 8-week-old mice.

Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato} mice were treated with tamoxifen during the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th or 6th weeks of age (Fig 1A). The proportions of TagTregs were then determined in 7 tissues at 8 weeks of age in all mice. The results were represented for the different organs in two ways (Fig 1B). Firstly, by

showing the proportion of TagTregs according to the age of tamoxifen treatment (left panels, graphs). Then, from these data, we inferred at what ages the pool of Tregs of 8-week-old mice were generated (right panels, 10 x 10 dot plots). In the spleen and LNs, the Treg-pool was made of cells generated gradually as the mice get older. In LNs, about 25% and 50% of the Treg-pool were tagged at week 2 and 4, respectively (Fig 1B). These values were similar but slightly higher in the spleen (35% and over 60%, respectively). In the colon, lungs and liver a similar progressive, though faster, generation of Tregs was observed with early Treg generation in the lungs (50% tagged at week 2) and a steep rise of the Treg-pool in the liver and colon (around 70% tagged at week 4) (Fig 1B). The rise in Treg generation was even starker in the VAT and skin. In the VAT, 75% of the Treg-pool was tagged by week 2. In the skin, 60% of the Treg-pool was already generated during the first week of life and 85% during the first two week. The summary of Treg-pool generation kinetics between tissues is shown in Figure 1C. This data provides valuable insight into the dynamic process of Treg generation at different stages of life and in different tissues. In lymphoid tissues, the Treg-pool of 8-week-old mice is constituted of cells generated at all ages, whereas in the skin and VAT, the Treg-pool of 8-week-old mice mostly contains cells generated before 2 weeks of age. The results in the lungs, liver and colon are between these two extremes.

We then assessed whether there the kinetics of generation of the Treg-pool in 8-week-old mice would match with the kinetics of colonization in the different tissues (Fig S3). In the spleen and LNs, the proportion of Tregs among CD4⁺ T cells was relatively stable between the ages of 1.5 to 6.5 weeks, in the range of 10-18%. In the liver, the Treg proportion is higher at 1.5 weeks of age than later on, ranging from 30% to 15-18% after 2.5 weeks. A similar, though less pronounced observation was made for the lungs. In the skin, the Treg proportion reached 70-80% between the ages of 1.5 and 3.5 weeks and dropped to 20-30% after 4.5 weeks of age (Fig S3). These values could not be determined for the VAT since the tissue is too small to be analyzed in perinatal mice. We thus see a correlation between the dynamics of tissue colonization and the dynamics of generation of the Treg-pool in 8-week-old mice.

We also assessed whether Neo and TagTregs would have different origins. This question was addressed by quantifying the proportion of Nrp1⁺ cells, a marker of thymic-derived Tregs in lymphoid tissues, and not expressed by peripheral-derived Tregs [9]. In mice treated with tamoxifen during the first week of life, over 80-90% of the NeoTregs and TagTregs expressed Nrp1 in the spleen, LNs, lung, liver and VAT, showing that most Tregs from the 2 populations had a thymic origin (Fig S4A). In the colon, only 40-60% of Tregs were Nrp1⁺, which was expected since a large fraction of Tregs in this tissue is of peripheral origin. In most tissues, the proportion of Nrp1⁺ cells was slightly higher in TagTregs than in NeoTregs, which could be explained by their higher origin from the thymus or by their more activated phenotype since Nrp1 can be acquired in peripheral Tregs upon activation [10]. In the skin, the

proportions of Nrp1⁺ cells among Neo and TagTregs were of only 25% and 50%, respectively, which might suggest that most of neonatal Tregs were of peripheral origin (Fig S4A). Alternatively, it is very possible that Nrp1 is not a relevant marker to distinguish thymic- from peripheral-derived Tregs in the skin since it was suggested that neonatal Tregs were of thymic origin [11].

We then assessed whether Neo and TagTregs have different proliferation levels in 8-week-old mice. In mice that were treated with tamoxifen during the first week of life, 25% of Neo and TagTregs express Ki67, a marker of cell proliferation, in the spleen (Fig S4B). Similar values were observed in NeoTregs of mice that were treated with tamoxifen at week 2 to week 5. This indicates that Tregs that were generated at different ages have the same level of proliferation when analyzed at 8 weeks of age. Similar findings were obtained in the LNs, lungs, liver and colon. However, in the VAT and skin, the proliferation of NeoTregs was increased compare to TagTregs (Fig S4C), further suggesting that the high proportion of TagTregs in 8-week-old mice in these tissues results from their long-term persistence rather than preferential expansion.

Tregs generated in neonates that persist into adulthood exhibit an activated phenotype.

To analyze Treg phenotypes generated at different ages and in different tissues, we set-up a mix of 25 antibodies for spectral flow cytometry analysis. We therefore characterized Treg subsets and different phenotypic features, such as activation, origin and expression of critical transcription factors. Using multi-parametric reduction, we compared the phenotypes of Tregs and Tconvs from the different tissues (Fig 2A). Tregs and Tconvs showed very different phenotypes where Tconvs were characterized by an anti-correlation with most of the markers used here (Fig 2A). Interestingly, Tregs from the skin and colon were segregated from other Tregs, mainly due to RoRyT, CCR2, CD44 and CD69 expression while Tregs from other tissues were characterized by Nrp1, CD25, TNFR2, Ki67, CD73, GATA3 or PD1 expression (Fig 2A). Since it has been reported that Tregs generated during the perinatal period that persist into adulthood have a different phenotype [4], we mainly focused our subsequent analyses on mice that were treated with tamoxifen at week 1. For each tissue, we observed that NeoTregs and TagTregs clustered separately (Fig 2B).

In the spleen, TagTregs preferentially expressed markers upregulated upon activation, such as CD44, CD69, CD73, CTLA4, ICOS, PD1 and TNFR2 whereas NeoTregs preferentially expressed markers of resting Tregs, such as CD62L, Bcl2 and TCF1 (Fig 3A-E). Similar findings were obtained for the LNs, liver and lungs (Fig 3D and Fig S5A-C). A similar trend was observed for the colon, VAT and skin but with less clarity since all Tregs of these tissues, including NeoTregs, had an activated phenotype (Fig 3D). We then compared the expression of CD44 and CD62L in TagTregs generated at week 1 with NeoTregs generated after weeks 1 through 6 in the spleen. Again, it was clear that Tregs generated during the

first week of life had a more activated phenotype than Tregs generated later on (Fig 3F). Similar findings were made when analyzing other markers such as Bcl2, PD1 and CTLA4 (Fig S5D). Our data shows that neonates Tregs persisting into adulthood exhibit an activated phenotype. The different Treg subsets and markers were spread out in the principal component analysis. The results indicate that our panel of antibodies was successfully characterizing these Treg subsets in lymphoid and nonlymphoid tissues.

Tregs generated in neonates that persist into adulthood express markers of tissue-Tregs.

We then assessed whether Neo and TagTregs differently express markers of tissue-Tregs. KLRG1, ST2 and CCR2 are well-described tissue-Treg markers [12]. They were expressed in 20-70% of Tregs in the skin, VAT and colon but in less than 10% of Tregs in the spleen and LNs (Fig S6A). In lymphoid tissues they have been described as markers of tissue-Treg precursors [13]. Again, the lungs and the liver are between these two extremes (Fig S6A). As previously observed for other organs, Tag and NeoTregs, generated respectively at week 1 and after week 1, segregated into different clusters when we analyzed their phenotype in the VAT and skin (Fig 4A). Besides activation markers that were previously analyzed, TagTregs were further characterized by increased expression of KLRG1 and ST2 compared to NeoTregs. We thus focused on these two markers. In the VAT, skin and colon, 60-80% of TagTregs expressed these markers versus only 10-30% for NeoTregs (except 50% for ST2 in the skin) (Fig 4B-C). Although attenuated, the same tendency was observed in other tissues. In the liver and lung, 30-60% of TagTregs and only 10-20% of NeoTregs expressed KLRG1 and ST2. In the spleen and LNs, 10-20% of TagTregs and less than 5% of NeoTregs expressed these 2 markers (Fig 4C). Finally, we compared the expression of these markers in Tregs generated at week 1 vs the ones generated after week 1 to 6 in the VAT. Again, KLRG1 and ST2 were expressed more strongly in Tregs generated during the perinatal period than later in life (Fig 4D). CCR2 expression was also higher in TagTregs generated at week 1 compared to Tregs generated later (Fig S7A-B). This data shows that, among the pool of tissue-Tregs of 8-week-old mice, Tregs generated the first week of life expressed much higher level of tissue-Treg markers than the ones generated later in life. In lymphoid tissues, Tregs generated in the perinatal period express precursors of tissue-Tregs more strongly compared to Tregs generated later on.

Tregs generated in neonates that persist into adulthood expressed more GATA3 and less ROR γ T.

Treg subsets that specialize in the control of different types of immune response (for instance type 1, 2 or 17) can be identified using transcription factors [14]. To assess whether these Treg subsets were generated at different ages in mice, we studied the expression of GATA3 and ROR γ T. Here, we focused on the colon since it is the main tissue where substantial populations of GATA3⁺ Tregs and ROR γ T⁺ Tregs

co-exist at steady state. In the other tissues, GATA3⁺ Tregs were present but RORγt⁺ Tregs are hardly detected (Fig S6B).

As observed for the other organs, Tag and NeoTregs, generated respectively at week 1 and after week 1, could be segregated into different clusters when analyzing their phenotype in the colon (Fig 5A). Importantly, TagTregs preferentially expressed GATA3 whereas NeoTregs preferentially expressed RORγT (Fig 5A-B). cMaf was also of interest since this transcription factor is essential for the development of RORγT⁺ Tregs in the colon [15]. As for RORγT, cMaf was preferentially expressed in NeoTregs in the colon (Fig 5A-B). In all the tissues except the skin, we found a higher proportion of TagTregs expressing GATA3 compared to NeoTregs (Fig 5B). Conversely, a higher proportion of NeoTregs expressed RORγT compared to TagTregs in all tissues except LNs. Therefore, the difference in expression of these two transcription factors between TagTregs and NeoTregs follows a consistent pattern. However, this was not the case for cMaf. Although it was more expressed in NeoTregs in the colon, its expression was also higher in TagTregs in the spleen, LNs, lungs and skin (Fig 5B).

Since GATA3⁺ and RORγT⁺ Tregs of the colon are considered as distinct cell subsets, we analyzed their generation kinetics in the pool of 8-week-old mice. As expected from the data presented above, the GATA3⁺ Treg-pool was mostly developed during the perinatal period since over 60% of them were generated before 2 weeks of age (Fig 5C). This is in sharp contrast to the RORγT⁺ Treg-pool, for which only 10% was generated before 2 weeks of age. The kinetics of development of the GATA3⁺ RORγT⁻ Treg-pool was similar to that of the GATA3⁺ Treg-pool (Fig 5C). In conclusion, Tregs generated during the perinatal period were more prone to acquiring higher expression of GATA3 and lower expression of RORγT in most analyzed tissues. This resulted in different developmental kinetics of the Treg subsets in the colon.

Tregs generated in neonates persist in aged mice.

Our previous data showed that Tregs generated in neonates persist in the Treg-pool of 8-week-old mice with major differences between organs. To address whether Tregs generated in neonates would be still present in older mice, we compared the proportion of neonatally generated Tregs in 8- and 28-week-old mice in different tissues (Fig 6A). In the spleen, LNs, lungs and liver, TagTregs represented 10% of the Treg-pool in both 8- and 28-week-old mice (Fig 6B). In the skin, TagTregs represented almost 60% of the Treg-pool in 8-week-old mice, and still 35% in 28-week-old mice. Thus, even in aged mice, a significant fraction of the skin Treg-pool was generated during the first week of life. In the VAT, TagTregs represented 35-40% of the Treg-pool in 8-week-old mice, which drop to only 10% in 28-week-old mice (Fig 6B). These results suggest that the VAT Treg-pool of aged mice was mostly constituted of cells that were generated after 1 week of age. In the colon, GATA3⁻ RORγT⁻ TagTregs comprised 25%

of the Treg-pool in both 8- and 28-week-old mice. Meanwhile, the proportion of GATA3⁺ RORγT⁻ TagTregs decreased from 40% to 25% in 28-week-old mice, while the proportion of GATA3⁻ RORγT⁺ TagTregs increased from 5% to 15% in 28-week-old mice. (Fig 6B). Thus, as the mice age, it seems that the environment of the colon is more in favor of RORγT⁺ Tregs.

Our data suggest that the composition of the Treg-pool in various tissues is changing between young adults (8-week-old) and aged (28-week-old) mice. To gain more insight into these modifications, we treated *Foxp3*^{Cre-ERT2} *Rosa26*^{tdTomato} mice at 10 weeks of age and analyzed Neo and TagTregs in 16-, 20- and 28-week-old mice (Fig S8A). We clearly observed a continuous increase and high proportion of newly generated Tregs (NeoTregs) among the Treg-pool as mice age in the spleen, LNs, lungs and liver and among the RORγT⁺ Treg-pool in the colon (Fig S8B). In contrast, much fewer NeoTregs were quantified in the VAT and skin and among GATA3⁺ Treg-pool in the colon. These data nicely confirm and fit our previous findings that the pool of adult Tregs would be mostly generated during the first weeks of life in the VAT, skin and among GATA3⁺ Treg-pool in the colon. Whereas in lymphoid tissues, lung, liver and among RORγT⁺ Tregs, the pool of adult Tregs would be progressively and continuously alimented by newly generated cells.

To further characterize the feature of neonatally generated Tregs that persist into adulthood, we compared the phenotype of TagTregs in 8- and 28-week-old mice. In the colon, lung and liver, TagTregs of young (8 week) and old (28 week) mice clustered together, suggesting that their phenotype was conserved (Fig 6C). In the VAT, in contrast, TagTregs of young and old mice clearly segregated separately. In the skin, LNs and the spleen, TagTregs of young and old mice clustered separately but in closed proximity, suggesting that their phenotype was alike but not identical. In the spleen and LNs, few markers were differentially expressed, notably activation molecules (CD44, PD1 and CD69) that were expressed at higher levels in TagTregs of old mice (Fig 6D and Fig S9). In the skin, most molecules, such as activation markers (CD44, PD1, Ki67), tissue markers (KLRG1, ST2) or transcription factors (GATA3, RORγT, cMaf) were expressed at similar levels in TagTregs between young and old mice (Fig 6D). Few molecules were differentially expressed between TagTregs of young and old mice and differences were usually minors (Fig 6D). These results suggest that, except in the VAT, neonatal Tregs that persist in adults maintained a similar phenotype between young and old mice.

DISCUSSION

Our data provides the first global analysis of the kinetics of Treg generation in different lymphoid and nonlymphoid tissues in adults. We observed major differences between tissues. In some, such as lymphoid organs, the Treg-pool is constituted progressively and continuously renewed, while in others, such as the skin, the majority of the Treg-pool is generated in neonates.

In the spleen and LNs, data obtained after tamoxifen treatment in neonates show that the Treg-pool is constituted of about 10% of cells that are generated the first week of life and that is stably maintained up to 28-weeks of age. The rest is made of cells that are generated at different ages, progressively entering the Treg-pool. Most Neo and TagTregs express Nrp1, a marker of thymic-derived Tregs, suggesting that the continuous supply of newly generated Tregs have mostly a thymic origin. The regular and continuous renewal of the Treg-pool is further supported by data obtained in mice treated with tamoxifen at 10 weeks of age since the proportion of NeoTregs increases continuously as the mice get older.

In the liver and lungs, we also observed a progressive accumulation of newly generated Tregs as the mice get older. But, compared to lymphoid organs, a higher fraction of the Treg-pool of 8-week-old mice is generated before 2 weeks of age (40-50% versus 25-35%). This earlier Treg generation may be related to their early Treg colonization with a peak of Treg proportion at weeks 2-3 of life in the liver and lungs [8], [13], [16], data that we confirm here. In the liver, it was shown that early Treg colonization results from thymic input the first week of age followed by high in-situ expansion to limit Tconv activation [8]. For the colon, it is important to consider the ontogeny of the three Treg subsets independently, which will be discussed below.

In the skin, the kinetics of Treg generation and colonization is unique. Here, we show that more than 55% and 85% of the Treg-pool of 8-week-old mice are generated during the first week and the first 2 weeks of age, respectively. This observation is interesting with regards to the colonization kinetics. In mice, there is an early and massive colonization of Tregs in the skin, which constitutes 60-80% of all CD4⁺ T cells in 2-to-3-week-old mice, and then drops below 50% later on ([6] and our data here). This early migration depends on the skin microbiota, which induces CCL20 expression by the hair follicles, enabling the attraction of CCR6⁺ Tregs, which are found in high proportion in the thymus of neonates [17]. Neonatal skin Tregs appear to be essential for inducing long-term tolerance to the microbiota, even in adults [6]. This long-term effect is likely explained by our observation that a high proportion of adult skin Tregs is generated during the neonatal period. Even in 28-week-old mice, the proportion of neonatally generated Tregs still represents 35% of the Treg-pool. The slow renewal of skin Tregs in

adults is further supported by the low proportion of NeoTregs in mice treated with tamoxifen at 10 weeks, even at 28 weeks of age.

In the VAT, we also observe an early generation of the Treg-pool, which is intriguing as this tissue is hardly formed in neonates. So, where is this cell pool located at this stage? Three non-mutually exclusive hypotheses can be proposed. (i) They might be precursors, retained in lymphoid organs in the first weeks of life, before colonizing the VAT since it has been shown that these precursors are localized in the spleen and LNs in young mice [10], [14], [15]. (ii) Alternatively, Tregs may colonize the tiny VAT in neonates followed by their high in-situ expansion as the tissue grows. (iii) Finally, the Treg-pool may first colonize other adipose tissues before recirculating into the VAT later. We also observed that neonatally generated Tregs constituted 35% of the Treg-pool in 8-week-old mice but only 10% in 28-week-old mice. Also, in 28-week-old mice treated with tamoxifen at 10 weeks of age, NeoTregs represented less than 20% of the Treg-pool, suggesting a slow renewal between 10 and 28 weeks of age. These results can be explained by the fact that, in 8-week-old mice, a large proportion of the Treg-pool is generated during the first week of life, whereas in 28-week-old mice, these cells have been replaced by Tregs generated between 1 and 8 weeks of age, probably around week 2 or 3, when we observe a stark increase of VAT-Treg generation.

Another main finding of our data is the phenotypic switch of Tregs between the ones that are generated during the neonatal life and the ones generated later. Our data clearly shows that neonatal Tregs that persist into adulthood have an activated phenotype ($CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}Bcl2^{\text{low}}$). This phenomenon is more apparent when the tissue contains a similar proportion of resting and activated Tregs, such as in the spleen, LNs and lungs. It is still noticeable in the liver and VAT and difficult to observe in the colon and skin, where resting Tregs are rare. This result is in line with what has been published, but only the spleen was analyzed in this study [4]. Here, we extend this observation in multiple tissues. The activated phenotype of neonatal Tregs that persist in adults may be explained by activation driven by the lymphopenia-induced proliferation that takes place in young mice or by their higher self-reactivity compared to Tregs generated in older mice [4]. The activation phenotype of neonatal Tregs that persist into adulthood maybe important for their capacity to control autoimmunity in the long-term, as it was shown for the ones of the spleen [4].

An additional phenotypic feature of Tregs generated in neonates is their type 2 profile. Compared to Tregs generated later, neonatally generated Tregs expressed higher levels of GATA3 and ST2, which are markers of type 2 immunity. In this regards, it is interesting to point out that the neonatal period is characterized by an overall type 2 immunity [1]. This may explain some of our findings and may have several implications. The first one concerns VAT-Tregs. Since the VAT is hardly detectable in neonates,

why would a pool of VAT-Tregs or their precursors be needed at this stage? This might be related to the Th2 profile (GATA3⁺ ST2⁺) of VAT-Tregs [18], which may require an environment that is biased toward type 2 immunity for their differentiation. Thus, the first weeks of life are likely favorable for the generation of VAT-Tregs. Later, the environment may no longer be favorable to such differentiation. This scenario is further supported by the fact that VAT-Tregs that differentiate after 1 week of age have reduced expression of GATA3 and ST2, compared to VAT-Tregs that differentiate in neonates. The same hypothesis may also apply for the generation of skin Tregs that also have a Th2 feature, is also compatible with their early generation. Actually, the increased expression of GATA3 in neonatal compared to Tregs generated later was observed in most analyzed tissues. Interestingly, we observed a correlation between the proportion of GATA3⁺ cells among all Tregs and the proportion of neonatally generated Tregs in the different tissues of 8-week-old mice (Fig S10). This further supports our hypothesis that type 2 immunity environment of neonates would favors the generation of Tregs strongly expressing type 2 makers.

The preferential differentiation of GATA3⁺ Tregs in neonates have likely an impact in the colon. This tissue contains GATA3⁺ (also characterized as Helios⁺) and RORγT⁺ Treg subsets. These two Treg subsets are well-characterized and have distinct functions. The former and the latter subsets have respectively a thymic and peripheral origin, at least after weaning [19]. However, it has been shown recently that, in neonates, the peripheral Tregs of the colon express GATA3 and Helios but not RORγT, contrary to what is observed in older mice [20]. Thus, the GATA3⁺/Helios⁺ Treg subset is dominant in the colon of neonates. This observation is in line with our findings that the neonatal period favors the differentiation GATA3⁺ Tregs. This differentiation bias appears to concern both thymic Tregs (for most tissues) and peripheral Tregs (for the colon). In line with these observations, we found that over 60% of the GATA3⁺ Treg-pool of adult mice is generated before 2 weeks of age versus only 10% for the RORγT⁺ Treg-pool. Thus, we conclude that the Th2 bias of neonates maybe critical to generate a proper balance of the two Treg subsets in the colon of adult mice.

It is interesting to consider our data in regards to patients that develop the immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked (IPEX) severe disease, which is due to a quantitative or functional Treg defect. Many of these patients develop a Th2-oriented immunopathology [21], for which drugs neutralizing IL-4 and IL-13 are effective [22]. As these patients are usually young children, this could be explained by a bias toward type 2 immunity in infants [1], which might be further exacerbated by the defect of Tregs that preferentially differentiate as GATA3⁺ cells. Indeed, GATA3-expressing Tregs are more efficient than other Tregs to control type 2 immunity [23]. Thus, the Th2-oriented immunopathology of IPEX patients may be explained by the deficiency of GATA3⁺ Tregs that we have shown here to be preferentially generated during the neonatal period. Also, it was shown that

Treg deletion in young mice induced a Th2 response bias in adults [24], [25], which is again consistent with our observation that the early life environment favors the development of type 2 Tregs that persist into adulthood.

Our data does not directly investigate Treg residency in nonlymphoid tissues. However, it strongly suggests that Tregs from certain tissues have a high level of residency. Indeed, if nonlymphoid tissue Tregs would recirculate continuously from one tissue to another one, we would have the same proportion of TagTregs in all tissues, which is clearly not the case. For instance, the fact that 75-85% of the Treg-pool of 8-week-old mice are neonatally generated cells in the skin and VAT versus less than 40% in the lymphoid tissues and liver strongly support their long-term residency in the former organs. Treg residency, which has been barely analyzed in the literature, has been assessed in the VAT by using parabiosis or cell adoptive transfer methods. These studies suggest that VAT-Tregs reside several weeks in the tissue but their level of residency is not as strong as the one of innate lymphoid cells that are permanently resident [26], [27].

In conclusion, our study provides a comprehensive analysis of the Treg generation kinetics in various lymphoid and nonlymphoid tissues of adult mice. Our findings highlight the importance of the neonatal period during which Tregs that are generated will colonize some tissues such as the skin on the long-term. These Tregs have an activated phenotype and express markers of type 2 immunity, suggesting that they play a special function. A deeper understanding of the mechanisms and functional implications of these observations will require further study.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE15-Trindi), Association de la recherche sur la sclérose en plaques, Fondation pour la recherche sur le cancer and Ligue contre le cancer. MH has received funding from the Fondation pour la recherche médicale and AR has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 955321. We are grateful to Martin Larsen for his help in biostatistical analyses, to Daniel Mazzone for critical reading of the manuscript and to Flora Issert, Olivier Bregerie, Maria Mihoc and Julianne Perronnet for their expert care of the mouse colony.

REFERENCES

- [1] B. D. Rudd, « Neonatal T Cells: A Reinterpretation », *Annu Rev Immunol*, vol. 38, p. 229-247, avr. 2020, doi: 10.1146/annurev-immunol-091319-083608.
- [2] J. E. Konkel, W. Jin, B. Abbatiello, J. R. Grainger, et W. Chen, « Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, n° 4, p. E465-473, janv. 2014, doi: 10.1073/pnas.1320319111.
- [3] G. Wang, Y. Miyahara, Z. Guo, M. Khatrar, S. M. Stepkowski, et W. Chen, « “Default” generation of neonatal regulatory T cells », *J Immunol*, vol. 185, n° 1, p. 71-78, juill. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0903806.
- [4] S. Yang, N. Fujikado, D. Kolodin, C. Benoist, et D. Mathis, « Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance », *Science*, vol. 348, n° 6234, p. 589-594, mai 2015, doi: 10.1126/science.aaa7017.
- [5] W. Hu *et al.*, « Regulatory T cells function in established systemic inflammation and reverse fatal autoimmunity », *Nat Immunol*, vol. 22, n° 9, p. 1163-1174, sept. 2021, doi: 10.1038/s41590-021-01001-4.
- [6] T. C. Scharschmidt *et al.*, « A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes », *Immunity*, vol. 43, n° 5, p. 1011-1021, nov. 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.10.016.
- [7] A. Weckel *et al.*, « Long-term tolerance to skin commensals is established neonatally through a specialized dendritic cell subgroup », *Immunity*, vol. 56, n° 6, p. 1239-1254.e7, juin 2023, doi: 10.1016/j.immuni.2023.03.008.
- [8] J. Tuncel, C. Benoist, et D. Mathis, « T cell anergy in perinatal mice is promoted by T reg cells and prevented by IL-33 », *J Exp Med*, vol. 216, n° 6, p. 1328-1344, juin 2019, doi: 10.1084/jem.20182002.
- [9] M. Yadav *et al.*, « Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo », *J Exp Med*, vol. 209, n° 10, p. 1713-1722, S1-19, sept. 2012, doi: 10.1084/jem.20120822.
- [10] E. Szurek *et al.*, « Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells », *PLoS One*, vol. 10, n° 10, p. e0141161, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0141161.
- [11] T. C. Scharschmidt *et al.*, « Commensal Microbes and Hair Follicle Morphogenesis Coordinately Drive Treg Migration into Neonatal Skin », *Cell Host Microbe*, vol. 21, n° 4, p. 467-477.e5, avr. 2017, doi: 10.1016/j.chom.2017.03.001.
- [12] M. Delacher *et al.*, « Genome-wide DNA-methylation landscape defines specialization of regulatory T cells in tissues », *Nat Immunol*, vol. 18, n° 10, p. 1160-1172, oct. 2017, doi: 10.1038/ni.3799.
- [13] M. Delacher *et al.*, « Precursors for Nonlymphoid-Tissue Treg Cells Reside in Secondary Lymphoid Organs and Are Programmed by the Transcription Factor BATF », *Immunity*, vol. 52, n° 2, p. 295-312.e11, févr. 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2019.12.002.
- [14] E. Cretney, A. Kallies, et S. L. Nutt, « Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells », *Trends Immunol*, vol. 34, n° 2, p. 74-80, févr. 2013, doi: 10.1016/j.it.2012.11.002.
- [15] M. Xu *et al.*, « c-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont », *Nature*, vol. 554, n° 7692, Art. n° 7692, févr. 2018, doi: 10.1038/nature25500.
- [16] M. Li *et al.*, « A wave of Foxp3+ regulatory T cell accumulation in the neonatal liver plays unique roles in maintaining self-tolerance », *Cell Mol Immunol*, vol. 17, n° 5, p. 507-518, mai 2020, doi: 10.1038/s41423-019-0246-9.
- [17] T. C. Scharschmidt *et al.*, « Commensal Microbes and Hair Follicle Morphogenesis Coordinately Drive Treg Migration into Neonatal Skin », *Cell Host Microbe*, vol. 21, n° 4, p. 467-477.e5, avr. 2017, doi: 10.1016/j.chom.2017.03.001.

- [18] A. Vasanthakumar *et al.*, « The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells », *Nature Immunology*, vol. 16, n° 3, Art. n° 3, mars 2015, doi: 10.1038/ni.3085.
- [19] T. Tanoue, K. Atarashi, et K. Honda, « Development and maintenance of intestinal regulatory T cells », *Nat Rev Immunol*, vol. 16, n° 5, p. 295-309, mai 2016, doi: 10.1038/nri.2016.36.
- [20] A. Pratama, A. Schnell, D. Mathis, et C. Benoist, « Developmental and cellular age direct conversion of CD4⁺ T cells into ROR γ ⁺ or Helios⁺ colon Treg cells », *J Exp Med*, vol. 217, n° 1, p. e20190428, nov. 2019, doi: 10.1084/jem.20190428.
- [21] T. A. Chatila *et al.*, « JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome », *J Clin Invest*, vol. 106, n° 12, p. R75-81, déc. 2000, doi: 10.1172/JCI11679.
- [22] C. Caruso *et al.*, « Case report: Dupilumab treatment improved type 2 disorders in a patient with IPEX syndrome diagnosis », *Front Immunol*, vol. 13, p. 995304, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.995304.
- [23] Y. Zheng *et al.*, « Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses », *Nature*, vol. 458, n° 7236, p. 351-356, mars 2009, doi: 10.1038/nature07674.
- [24] I. C. Boothby *et al.*, « Early-life inflammation primes a T helper 2 cell-fibroblast niche in skin », *Nature*, vol. 599, n° 7886, p. 667-672, nov. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-04044-7.
- [25] K. A. Knoop, K. G. McDonald, C.-S. Hsieh, P. I. Tarr, et R. D. Newberry, « Regulatory T Cells Developing Peri-Weaning Are Continually Required to Restrain Th2 Systemic Responses Later in Life », *Front Immunol*, vol. 11, p. 603059, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.603059.
- [26] D. Kolodin *et al.*, « Antigen- and Cytokine-Driven Accumulation of Regulatory T Cells in Visceral Adipose Tissue of Lean Mice », *Cell Metabolism*, vol. 21, n° 4, p. 543-557, avr. 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.03.005.
- [27] A. Vasanthakumar *et al.*, « Sex-specific adipose tissue imprinting of regulatory T cells », *Nature*, vol. 579, n° 7800, Art. n° 7800, mars 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2040-3.

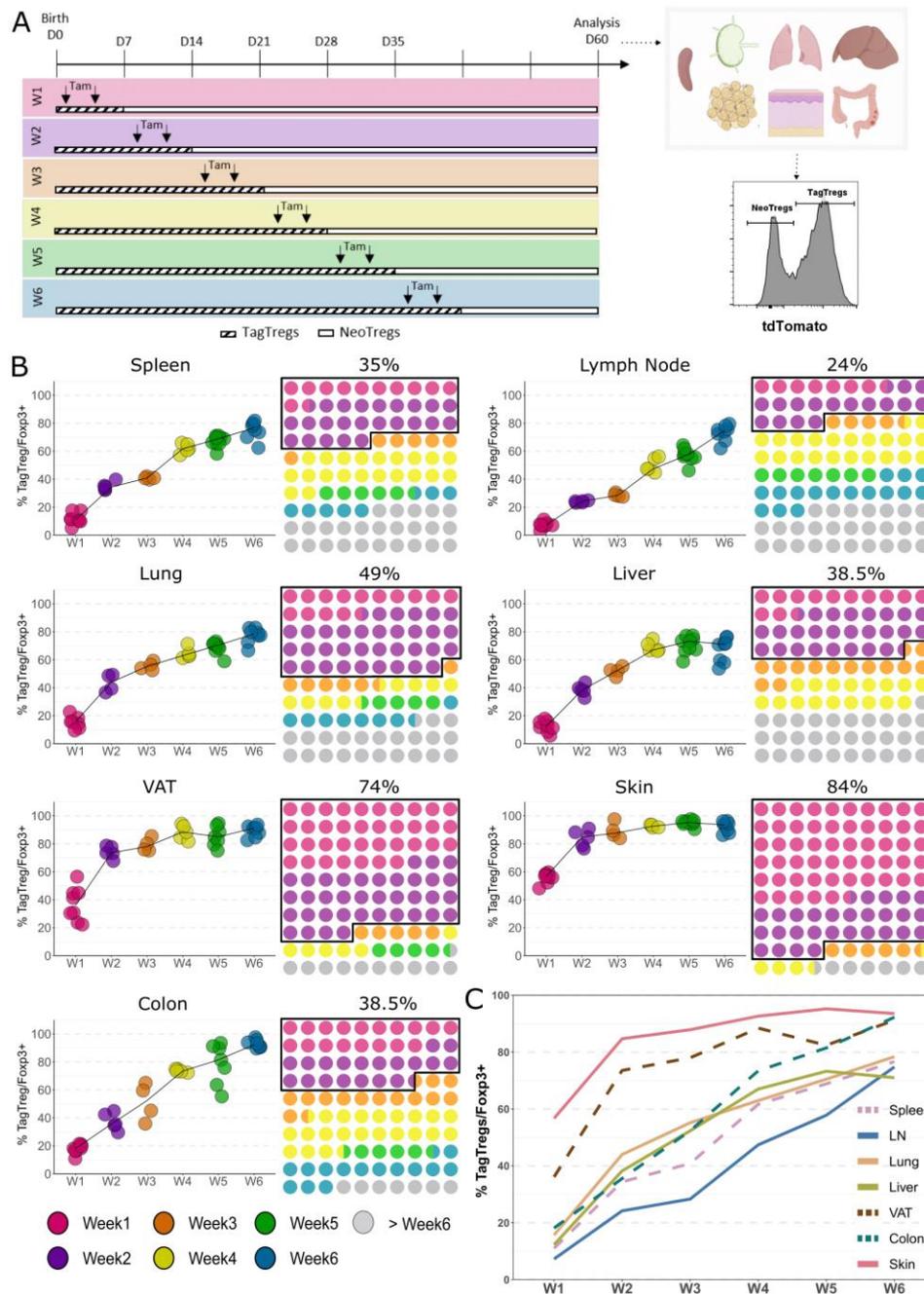


Figure 1. Dynamics of the generation of the Treg-pool in 8-week-old mice. *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen either at week 1 or 2 or 3 or 4 or 5 or 6 of life and were all euthanized at 8 weeks of age. In these 6 groups, the proportions of NeoTregs and TagTregs were assessed by flow cytometry in 7 different tissues (spleen, LNs, liver, lungs, colon, skin and VAT). The different colors correspond to the 6 groups of mice treated with tamoxifen at various ages. (A, left) Experimental design showing the different mouse groups. (A, right) Gating strategy used to discriminate NeoTregs (F_{oxp3}⁺Tomato⁻) and TagTregs (F_{oxp3}⁺Tomato⁺). (B) The graphs show the proportions of TagTregs among F_{oxp3}⁺ cells for each group determined in the 7 different tissues. Each colored symbol represents a mouse. These values enabled to calculate the proportion Tregs generated at week 1 to week 6 among the Treg-pool of 8-week-old mice (10 x 10 dot plots). The Treg-pool of cells generated before 2 weeks of life were outlined and their proportion indicated. (C) To highlight differences between organs, the different lines depicted in panel B were superimposed on one-another (without symbols) in a single graph. Colors are not related to the ones of panel B. Data were from 4-8 mice per group depending on the age of tamoxifen treatment.

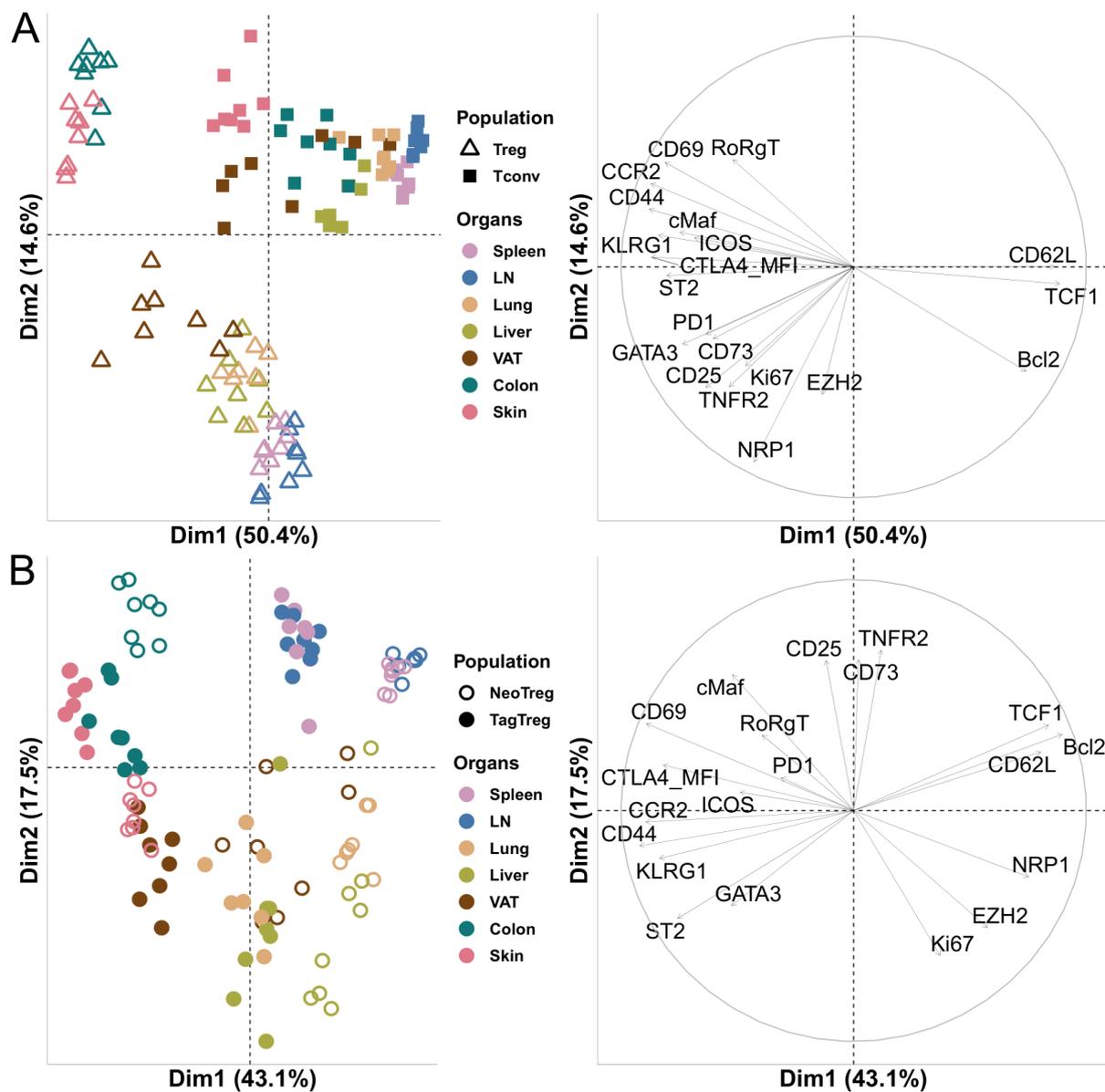


Figure 2. Phenotypic discrimination of Tconvs, NeoTregs and TagTregs from different tissues. Cells of 7 tissues (spleen, LNs, liver, lungs, colon, skin and VAT) were analyzed by flow cytometry using a mixed panel of mAbs designed to characterize Treg subsets and activation (see methods). *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 and analyzed at 8 weeks of age. Principal component analysis (PCA) showing the clusters of Tconvs and all Tregs (A) and the clusters of NeoTregs and TagTregs (B) in the different tissues. For the 20 markers that drive the PCA, the direction and size of each arrow show the contribution of each marker to the variance of the PCA (right panels).

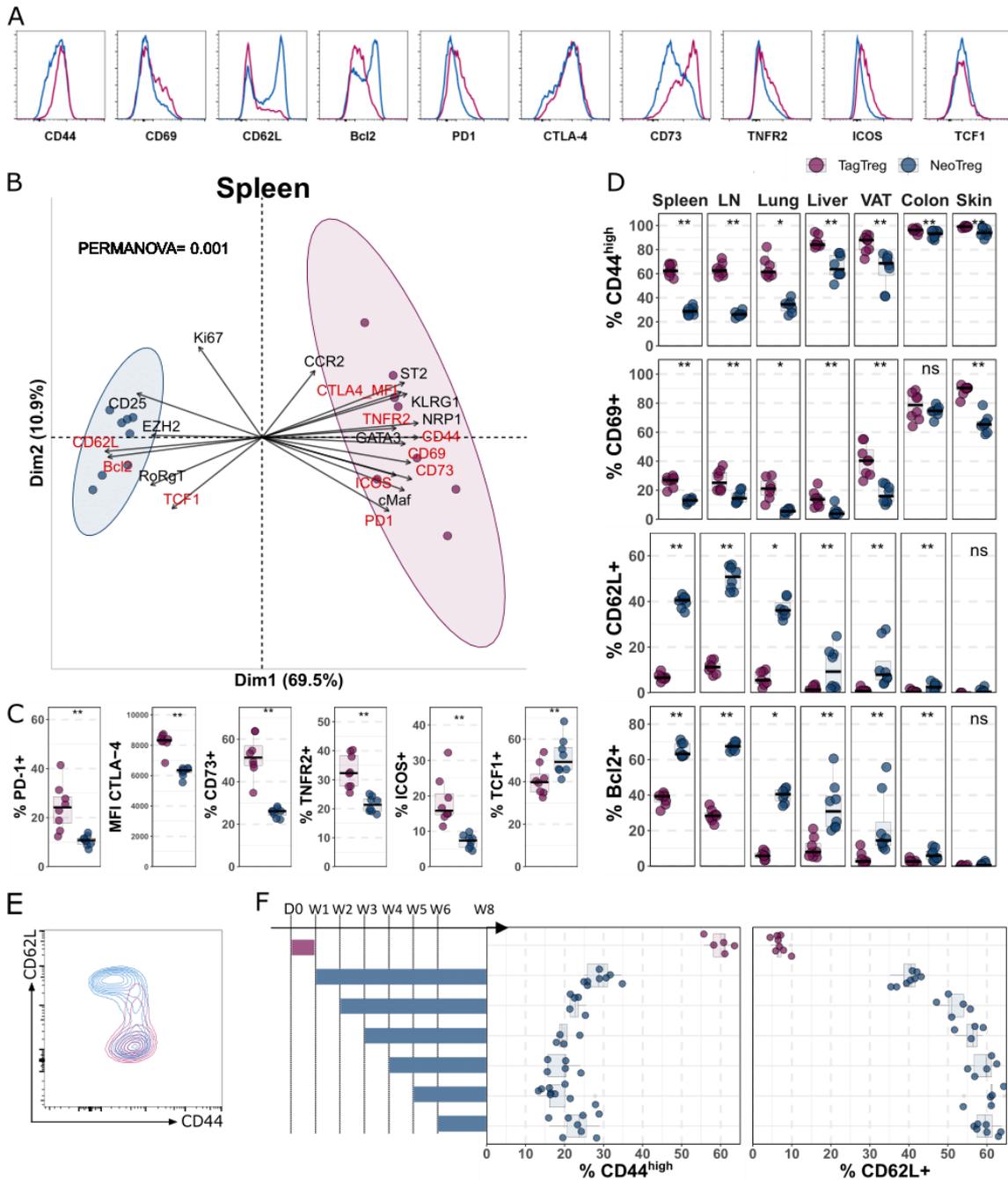


Figure 3. Tregs generated during the first week of life that persist into adulthood exhibit an activated phenotype. (A-E) *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 and analyzed at 8 weeks of age by flow cytometry to compare the expression of activation markers in Neo and TagTregs. (A) Representative expression of activation markers in Neo (in blue) and TagTregs (in purple) of the spleen. (B) PCA showing the Neo and TagTregs clusters in the spleen. Activation markers are in red. Proportion of the indicated activation markers among the Neo and TagTregs in the spleen (C) and in the 7 analysed tissues (D). (E) Representative density plot showing CD44 vs CD62L expression among NeoTregs (in blue) and TagTregs (in purple) in the spleen. (F) Proportions of CD44 and CD62L among TagTregs (purple dots) in mice treated with tamoxifen at week 1 and among NeoTregs (blue dots) in mice treated at different ages as in figure 1 and analyzed in the spleen at 8 weeks of age. Experimental design is shown in the left panel. Data were from 8 mice per group pooled from 2 independent experiments (A-E) or from 4-8 mice per group depending on the age of tamoxifen treatment (F). Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

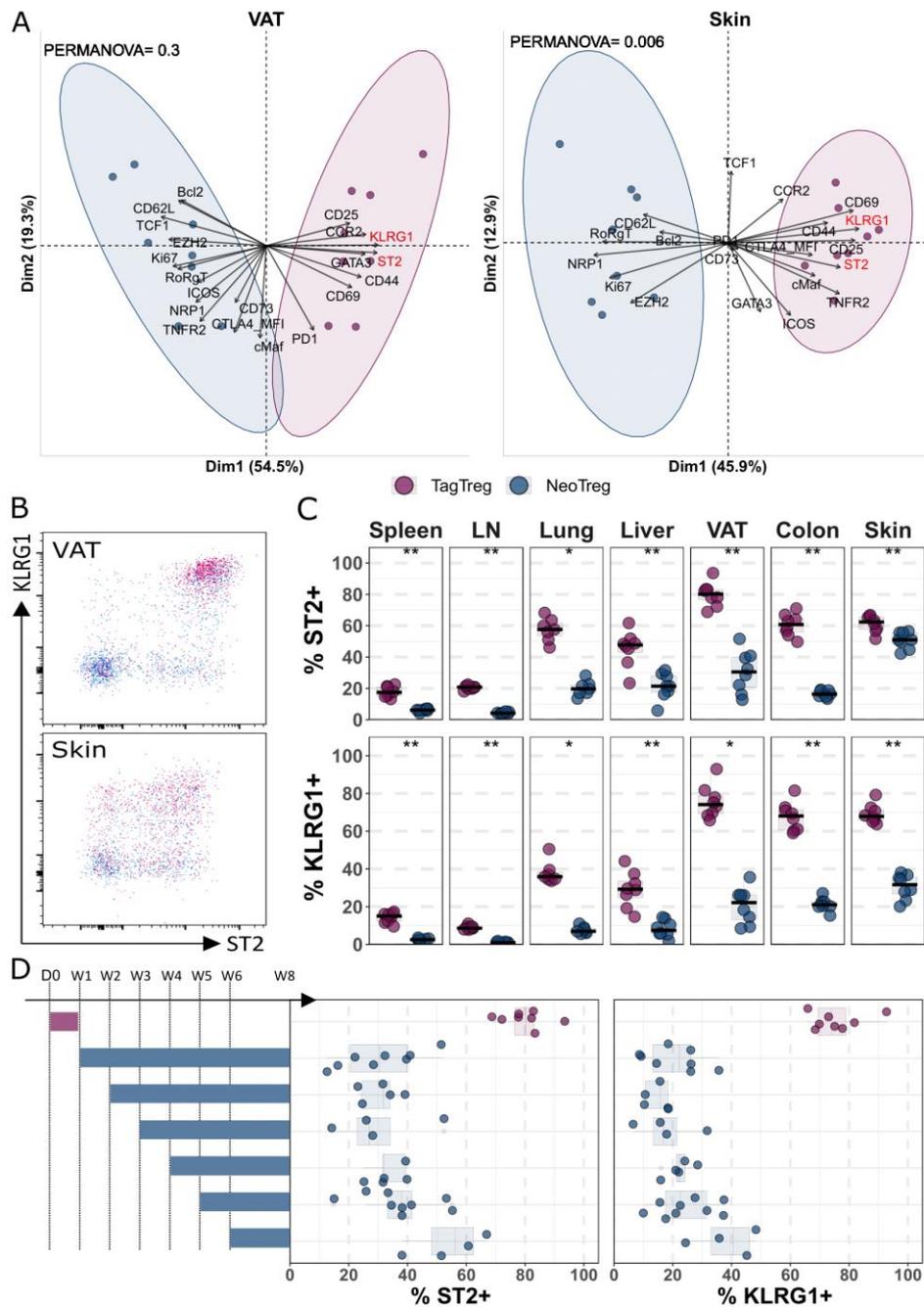


Figure 4. Tregs generated during the first week of life that persist into adulthood express tissue-Treg markers. (A-C) *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 and analyzed at 8 weeks of age by flow cytometry to compare the expression of tissue-Treg markers in Neo and TagTregs. (A) PCA showing the Neo and TagTreg clusters in the VAT and skin. Tissue-Treg markers (KLRG1 and ST2) are colored in red. (B) Representative dot plot showing ST2 vs KLRG1 expression among NeoTregs (in blue) and TagTregs (in purple) in the VAT and skin. (C) Proportion of cells expressing ST2 or KLRG1 among the Neo and TagTregs in the 7 analysed tissues. (D) Proportions of ST2⁺ or KLRG1⁺ cells among TagTregs (purple symbols) in mice treated with tamoxifen at week 1 and among NeoTregs (blue symbols) in mice treated at different ages as in figure 1 and analyzed in the VAT at 8 weeks of age. Experimental design is shown in the left panel. Data were from 8 mice per group pooled from 2 independent experiments (A-C) or from 4-8 mice per group depending on the age of tamoxifen treatment (D). Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

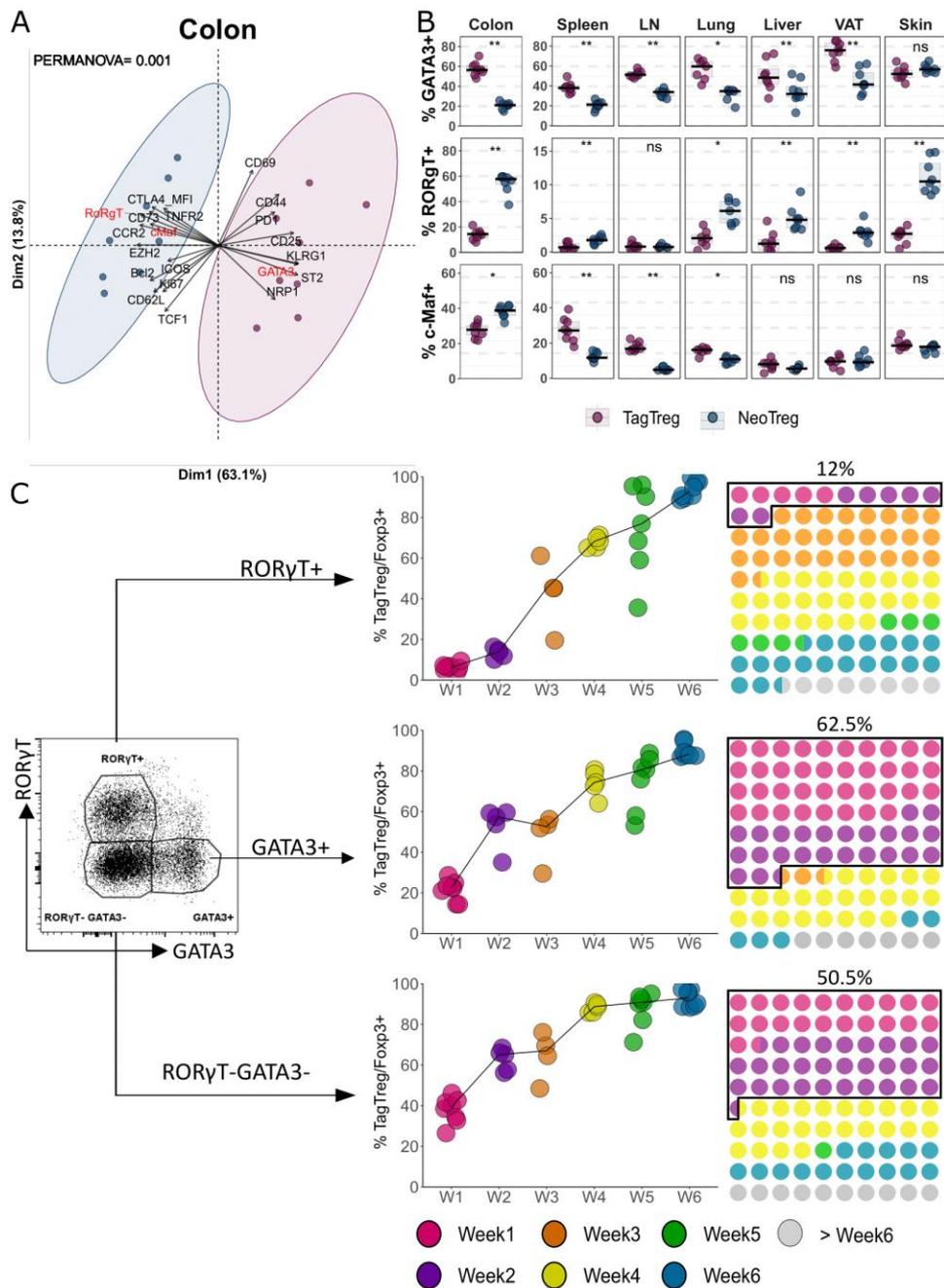


Figure 5. Tregs generated in neonates expressed more GATA3. (A, B) *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 and analyzed at 8 weeks of age by flow cytometry to compare the expression of transcription factors in Neo and TagTregs in the colon. (A) PCA showing the Neo and TagTreg clusters in the colon. Transcription factors are colored in red. (B) Proportion of GATA3, RORγT and c-Maf among Tag and NeoTregs in the 7 analysed tissues. (C) *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 to 6 and were all analyzed at 8 weeks of age as in figure 1. The graphs show the proportions of TagTregs among GATA3⁺, RORγT⁺ and GATA3⁻RORγT⁻ Tregs for each group. These values enabled to calculate the proportion Tregs generated at week 1 to week 6 among the 3 pools of colon Tregs of 8-week-old mice (10 x 10 dot plots). The Treg-pool of cells generated before 2 weeks of life were outlined and their proportion indicated. Data were from 8 mice per group pooled from 2 independent experiments (A, B) or from 4-8 mice per group depending on the age of tamoxifen treatment (C). Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

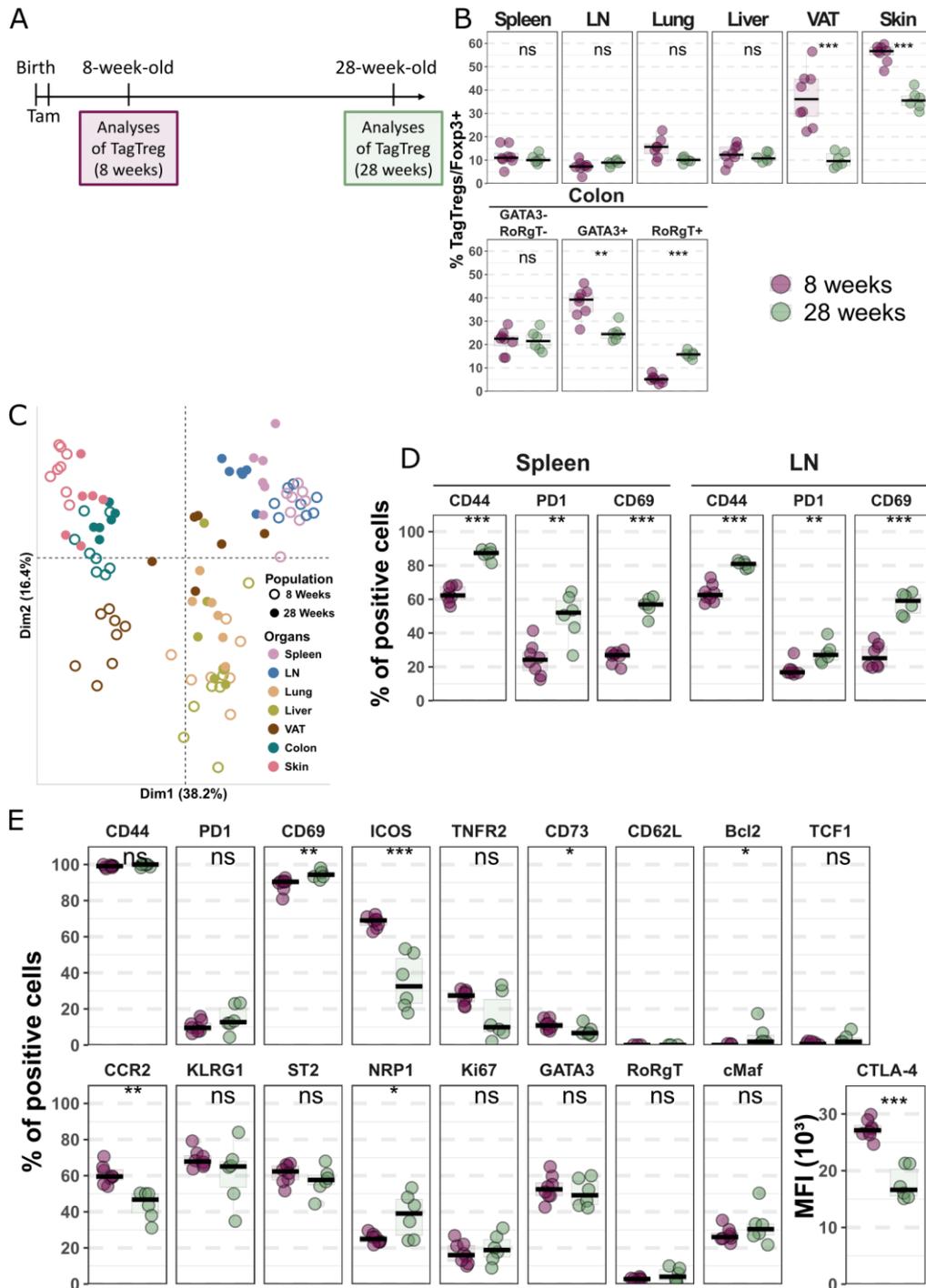


Figure 6. Proportion and phenotype of neonatal Tregs that persist in 28-week-old mice. *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 and analyzed at 8 or 28 weeks of age by flow cytometry. (A) Experimental design. (B) Proportion of TagTregs among *Foxp3*⁺ cells in the spleen, LNs, lungs, liver, VAT and skin (upper panels), and in the GATA3⁻RORγT⁻, GATA3⁺ and RORγT⁺ populations from the colon (lower panels). (C) PCA showing the clusters of TagTregs in the different tissues. (D) Proportion of activation markers expressed among TagTregs in the spleen and LNs. (E) Expression of the indicated markers among TagTregs of the skin. 6 to 8 mice, pooled from 2 independent experiments, were analyzed per group. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians. **P* < 0.05, ***P* < 0.01. ****P* < 0.001

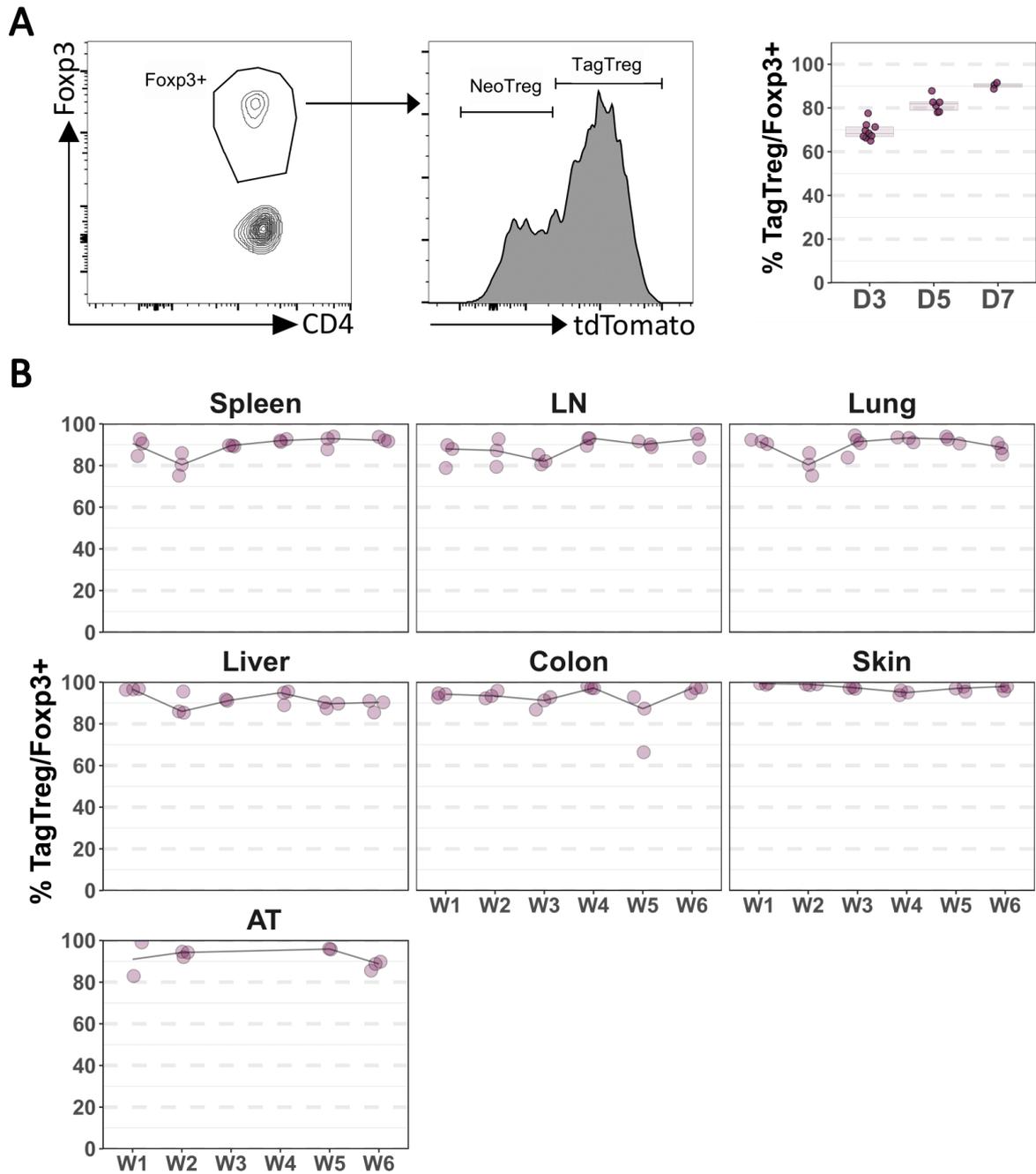


Figure S1. Efficiency of the tamoxifen treatment in *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice. (A) Gating strategy used to distinguish Neo and TagTregs (left panels) and proportion of TagTregs among Foxp3⁺ cells in *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice 3, 5 and 7 days after the tamoxifen treatment (right panel). (B) Proportion of TagTregs among Foxp3⁺ cells in *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice 7 days after the tamoxifen treatment from the spleen, LNs, lungs, liver, colon and skin of mice that were treated at 1 to 6 weeks after birth. Subcutaneous adipose tissues (AT) were used to infer the proportion of TagTregs in VAT in young mice, where VAT could not be found. Each symbol represents one mouse.

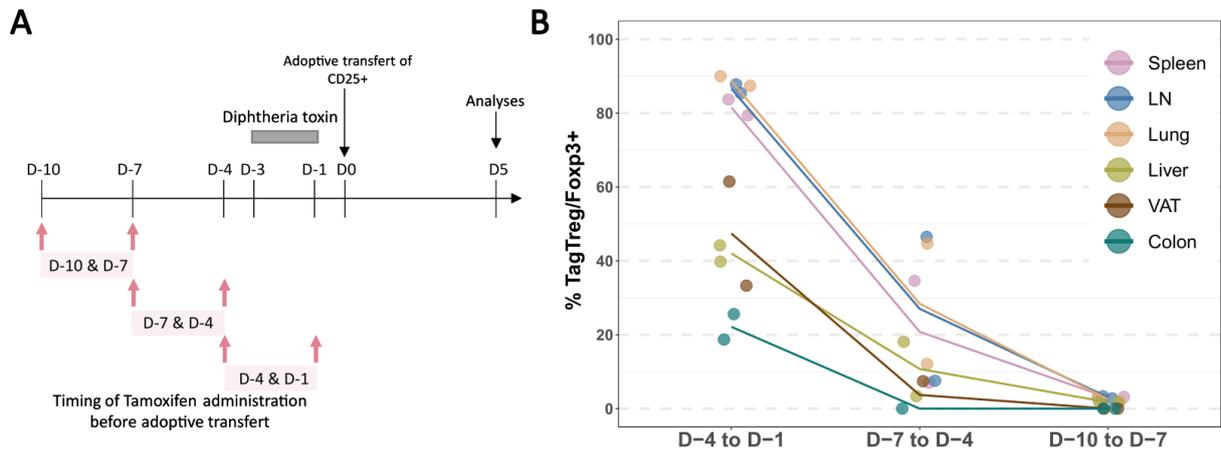


Figure S2. Duration of the tamoxifen activity in *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice. *Foxp3^{DTR}* recipient mice received 2 injections of tamoxifen at different times prior to the adoptive transfer of purified CD25⁺ cells from *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* donor mice. Recipient mice were treated with diphtheria toxin before the adoptive transfer. (A) Experimental design. (B) Proportions of TagTregs among the donor *Foxp3⁺* cells that were determined 5 days after the adoptive transfer in the spleen, LNs, lung, liver, VAT and colon.

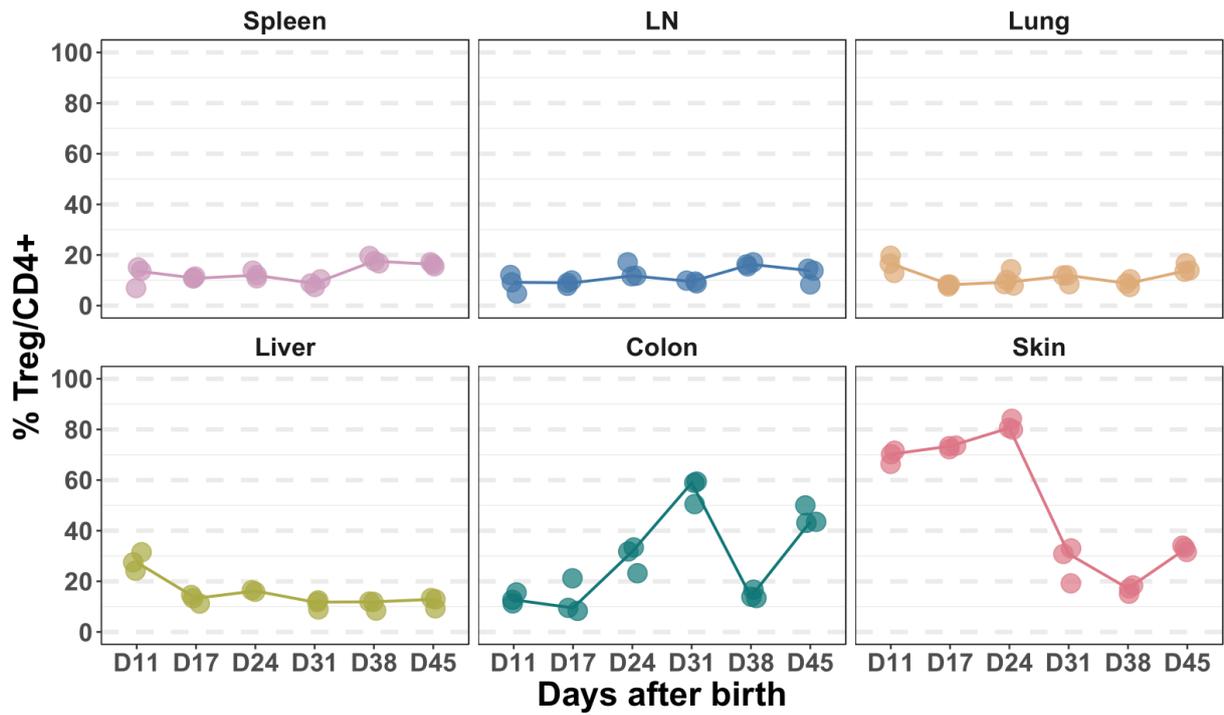


Figure S3. Treg proportions in lymphoid and nonlymphoid tissues during the first weeks of life. Treg proportion among CD4⁺ T cells determined in the spleen, LNs, lungs, liver, colon and skin in 11 to 45 days old mice. Each symbol represents one mouse.

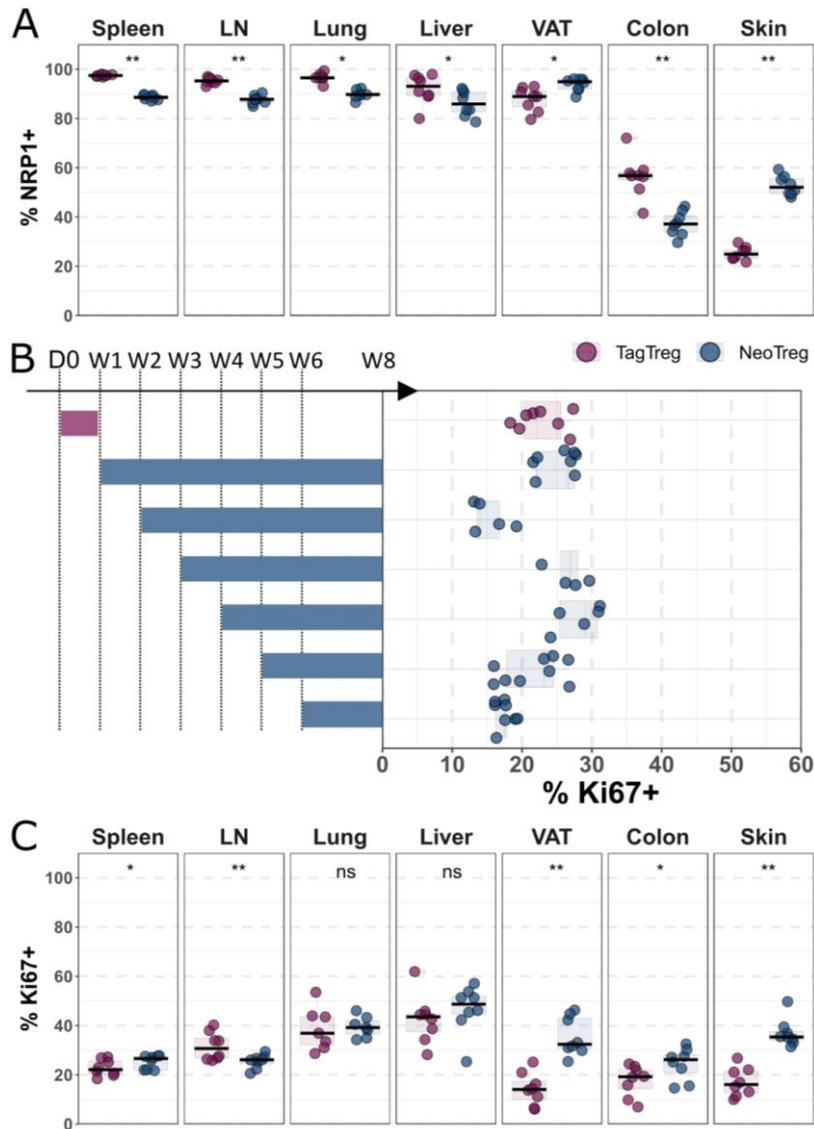


Figure S4. Expression of Nrp1 and Ki67 in Neo and TagTregs. *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen and analyzed at 8 weeks of age by flow cytometry. (A) Proportion of NRP1 among Neo and TagTregs in the spleen, LNs, lungs, liver, VAT, Colon and skin of mice treated with tamoxifen at week 1. (B) Proportions of Ki67 among TagTregs (purple symbols) in mice treated with tamoxifen at week 1 of age and among NeoTregs (blue symbols) or in mice treated at different ages as in figure 1 and analyzed in the spleen. Experimental design is shown in the left panel. (C) Proportion of Ki67 among Neo and TagTregs in the spleen, LNs, lungs, liver, VAT, Colon and skin of mice treated with tamoxifen at week 1. Data were from 8 mice per group, pooled from 2 independent experiments (A, C) or from 4-8 mice per group depending on the age of tamoxifen treatment (B). Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

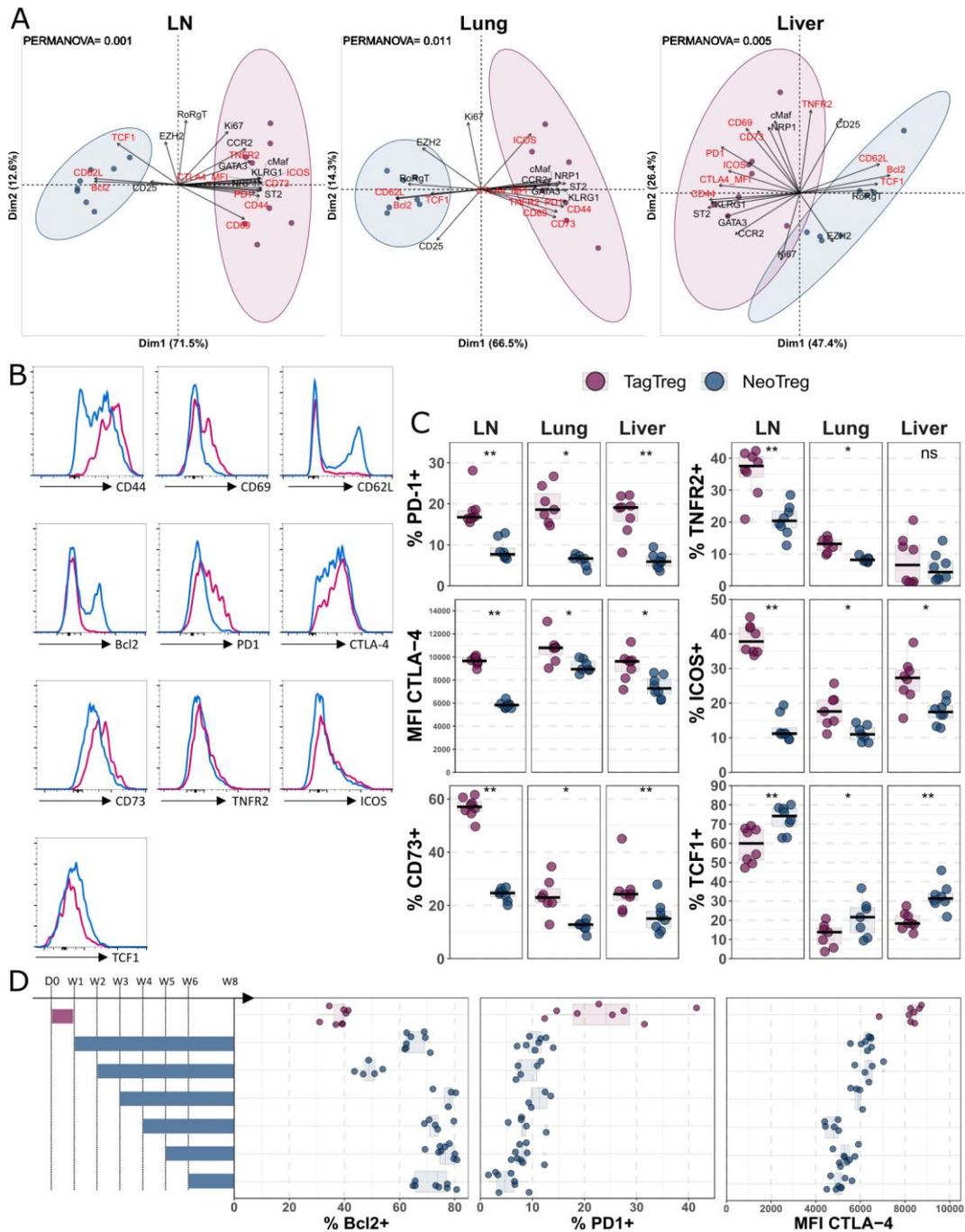


Figure S5. Expression of activation markers among TagTregs generated during the first week of life and persisting into adulthood in the spleen, LNs, Lung and Liver. (A-C) *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 and analyzed at 8 weeks of age by flow cytometry to compare the expression of activation markers in Neo and TagTregs. (A) PCA showing the Neo and TagTreg clusters in the LNs, lungs and liver. Activation markers are colored in red. Representative histograms in the lungs (B) and proportion (C) of the indicated activation markers among the Neo and TagTregs in the LNs, lungs and liver. (D) Proportions of Bcl2⁺, PD1⁺ cells and MFI of CTLA-4 among TagTregs (purple symbols) in mice treated with tamoxifen at week 1 and among NeoTregs (blue symbols) in mice treated at different ages as in figure 1 and analyzed in the spleen at 8 weeks of age. Experimental design is shown in the left panel. Data were from 8 mice per group, pooled from 2 independent experiments (A-C) or from 4-8 mice per group depending on the age of tamoxifen treatment (D). Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

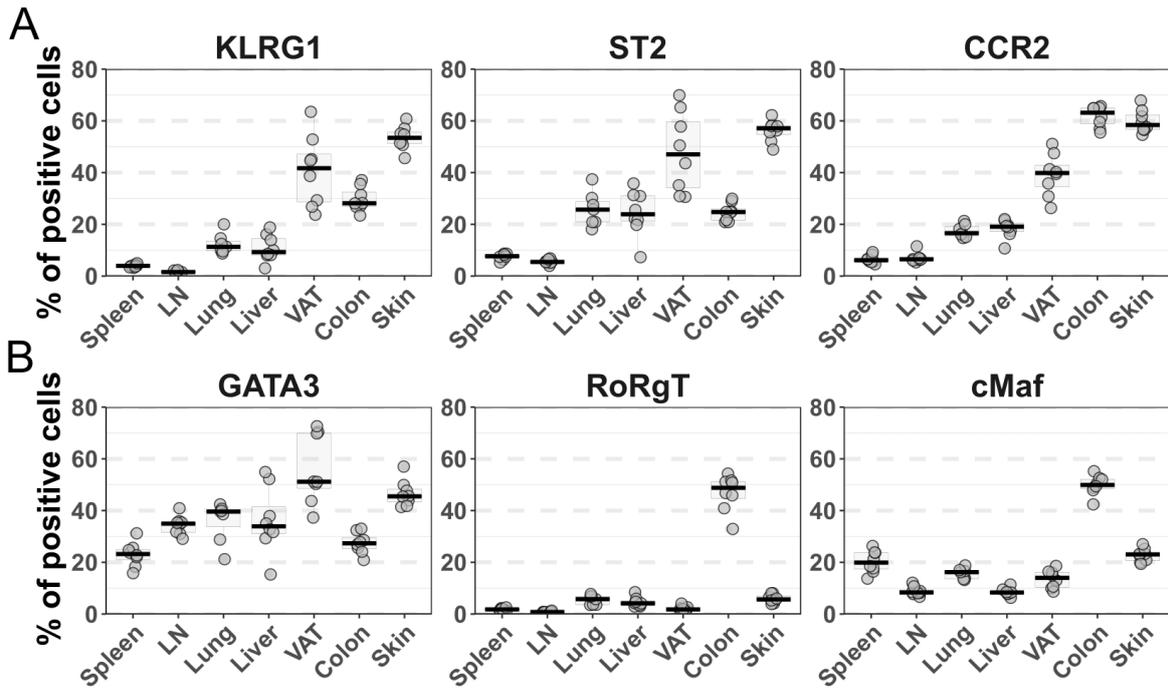


Figure S6. Expression of different Treg markers in 8-week-old mice. Proportion of Tregs expressing KLRG1, ST2, CCR2 (A) and GATA3, ROR γ T and cMaf (B) in the spleen, LNs, lungs, liver, VAT, colon and skin of 8-week-old mice. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians.

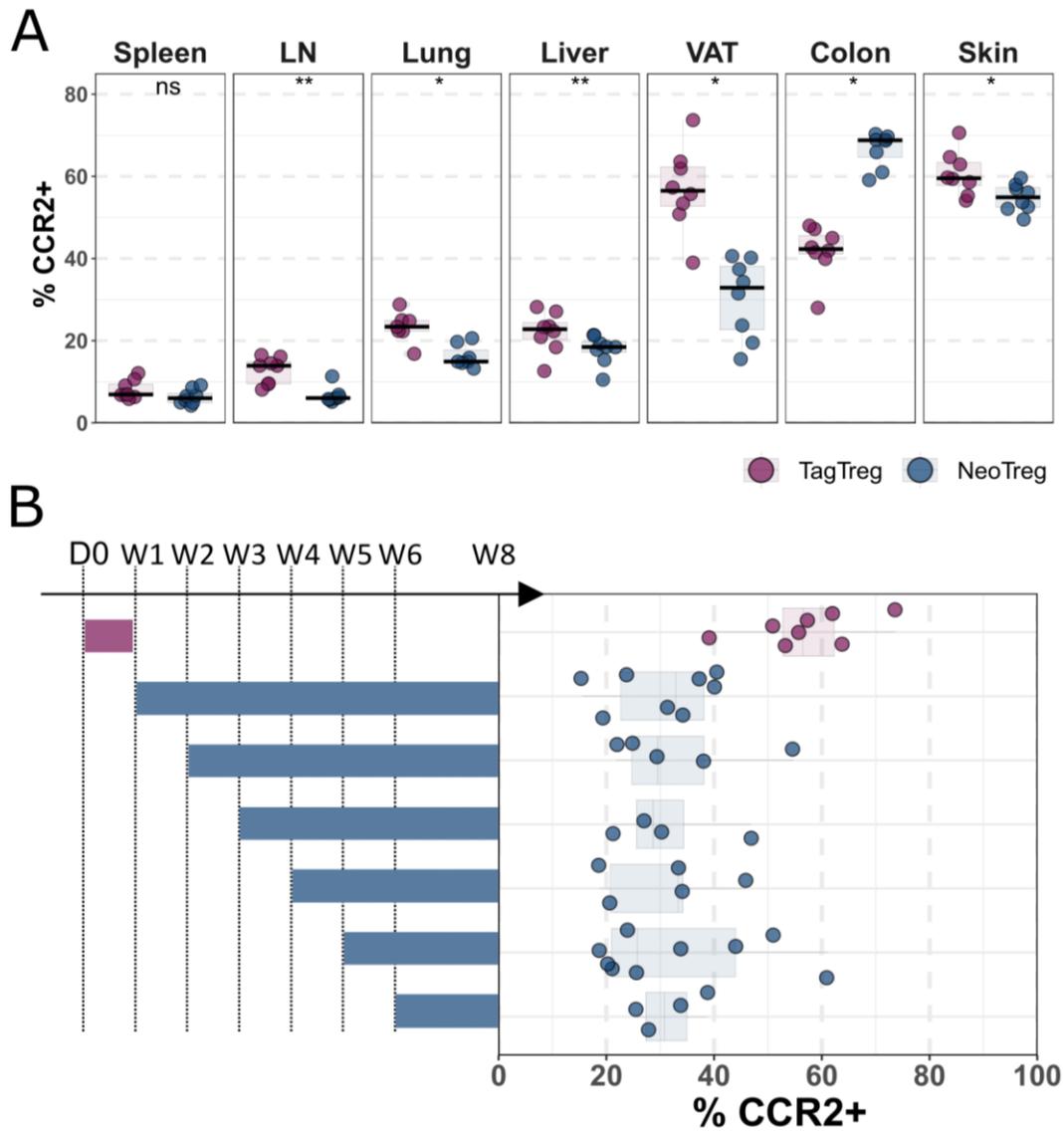


Figure S7. Expression of CCR2 in Neo and TagTregs. *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen and analyzed at 8 weeks of age by flow cytometry. (A) Proportion of CCR2 among Neo and TagTregs in the spleen, LNs, lungs, liver, VAT, Colon and skin of mice treated with tamoxifen at week 1. (B) Proportions of CCR2 among TagTregs (purple symbols) in mice treated with tamoxifen at week 1 of age and among NeoTregs (blue symbols) in mice treated at different ages as in figure 1 and analyzed in the VAT. Experimental design is shown in the left panel. Data were from 8 mice per group, pooled from 2 independent experiments (A) or from 4-8 mice per group depending on the age of tamoxifen treatment (B). Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

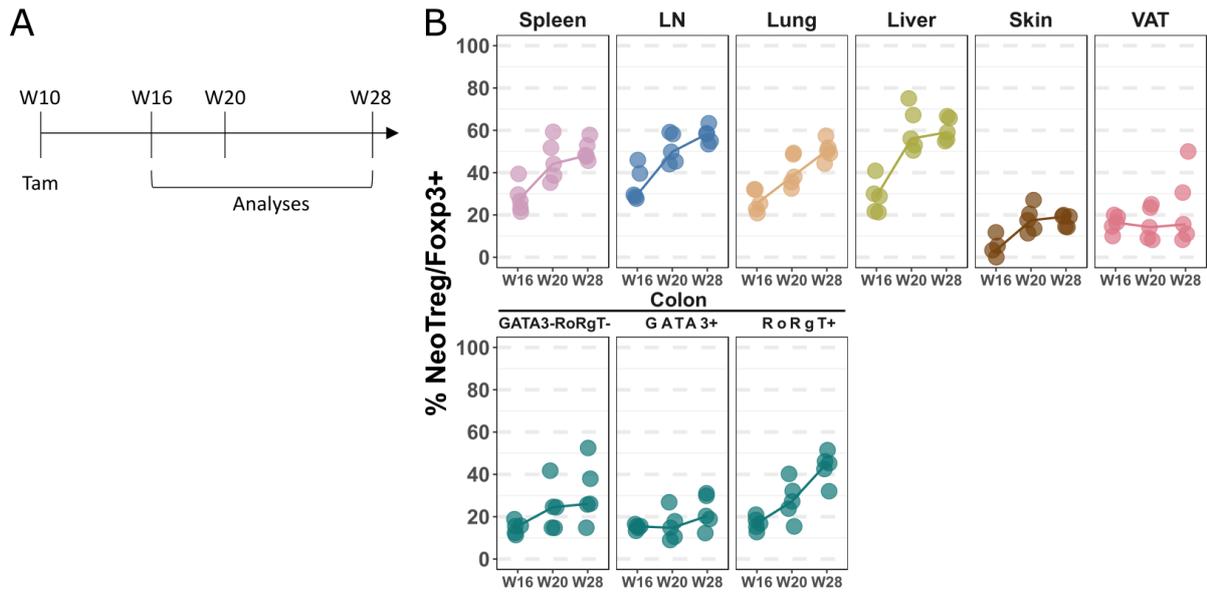


Figure S8. Treg renewal in adult mice. *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at 10 weeks of age and analyzed at 16, 20 and 28 weeks of age by flow cytometry. (A) Experimental design. (B) Proportions of NeoTregs among *Foxp3*⁺ cells in the spleen, LNs, lungs, liver, VAT and skin (upper panels), and in the GATA3⁺RORγT⁻, GATA3⁺ and RORγT⁺ populations of the colon (lower panels). Each symbol represents one mouse. Five mice were analyzed per group.

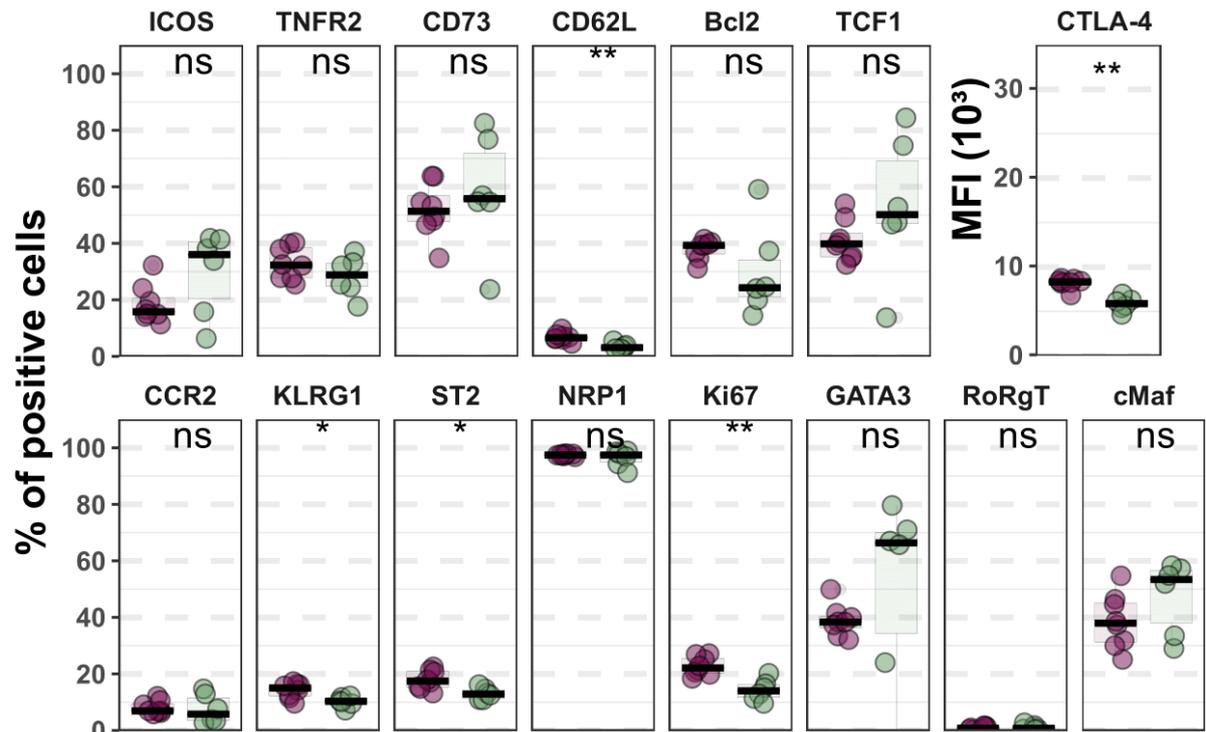


Figure S9. Phenotype of neonatal Tregs in 8- and 28-week-old mice in the spleen. *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 and analyzed at 8 or 28 weeks of age by flow cytometry. Expression of the indicated markers among TagTregs. 6 to 8 mice, pooled from 2 independent experiments, were analyzed per group. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. Each symbol represents one mouse and the bars represent the medians. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

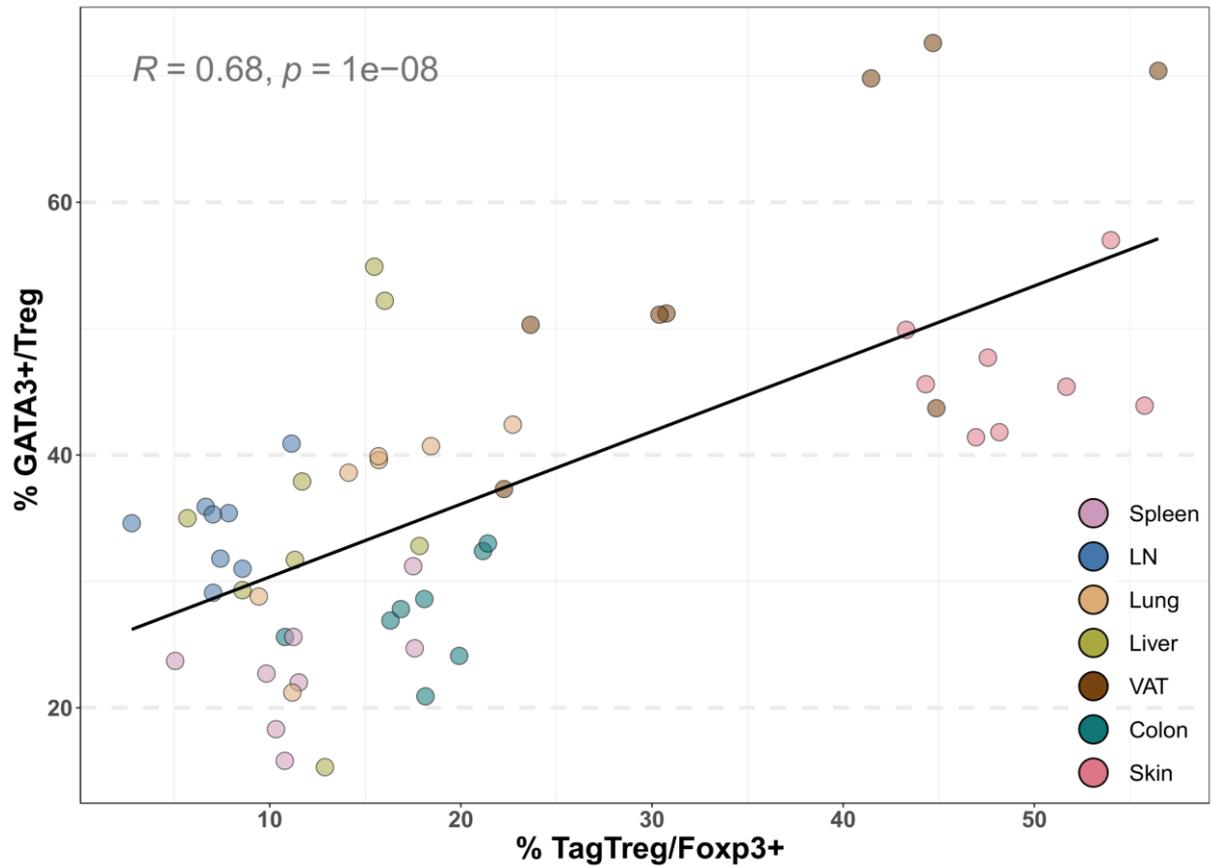


Figure S10. Correlation between GATA3⁺ Tregs and proportion of TagTreg. *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen at week 1 and analyzed at 8 weeks of age by flow cytometry. Correlation between the proportion TagTregs and GATA3⁺ among Foxp3⁺ cells in the indicated tissues. Each symbol represents one mouse. Statistical significance was determined using the Pearson correlation coefficient (R).

1.2 Stabilité

La stabilité des Tregs et l'existence même des exTregs sont des sujets qui font toujours débats dans la littérature. Comme discuté précédemment, le modèle CreLox inductible semble désormais le système permettant de les caractériser au mieux. Cependant, les données disponibles utilisant ce modèle ne permettent pas d'observer clairement la population d'exTreg. Suite à des améliorations technologiques, nous avons pu tirer avantage du modèle CreLox inductible (*Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}*) pour visualiser sans ambiguïté les exTregs par cytométrie en flux.

Proportion

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la proportion d'exTregs à l'état basal dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. La proportion d'exTregs parmi les cellules exprimant la tdTomato a été analysé chez des souris *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* de 8 semaines ou de 16 semaines, 6-7 semaines après le traitement tamoxifène (**Figure 1A**). Les exTregs représentaient une population distincte et non négligeable dans la rate, les ganglions lymphatiques (LN pour *Lymph nodes*), les poumons, le foie, le tissu adipeux viscéral (VAT) et le colon. La proportion d'exTregs variait suivant les tissus analysés (**Figure 1B**). Nous avons ainsi observé que les exTregs représentaient 20% des cellules tdTomato+ dans la rate chez les souris de 8 et 16 semaines. Dans les LN et le colon, cette proportion était autour de 5-10% aux deux âges analysés. Dans les poumons, le foie et le VAT, la proportion d'exTregs représentait 5-10% des cellules tdTomato+ chez les souris de 8 semaines, cette proportion semblait augmentée chez les souris de 16 semaines pour atteindre 20-30% (**Figure 1B**). Ces données confirment la présence de populations d'exTregs dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes au différent stade de la vie.

Dans la peau, nous avons observé une population *Foxp3^{low}tdTomato+* (**Figure 1C**). Chez les souris de 8 et de 16 semaines, environ 30% de cellules tdTomato+ sont représentées par des cellules *Foxp3^{low}tdTomato+* (**Figure 1C**). En considérant cette population comme étant des exTregs, la peau semble être le tissu dans lequel la proportion d'exTregs est la plus importante.

La proportion d'exTregs peut également être analysée parmi les *Foxp3-CD4+*. Cette donnée indique la proportion d'exTregs contenue dans les Tconv. Cette proportion représentait moins de 3% chez les souris de 8 semaines. En revanche, cette proportion était augmentée chez les souris de 16 semaines dans tous les organes analysés pour atteindre près de 5-10% dans le foie, le VAT et le colon (**Figure 1D**). Ainsi, une partie des cellules *CD4+Foxp3-* considérées comme étant des Tconv contiennent des exTregs. Les proportions obtenues ici sont bien en dessous des vraies valeurs dans la mesure où cette approche ne permet pas de détecter les exTregs qui se forment avant le traitement au tamoxifène ni les exTregs qui dérivent de Tregs qui se différencient après ce traitement.

Phénotype

Pour caractériser la population d'exTregs, nous avons développé un panel de cytométrie spectral permettant d'étudier différents aspects de leur phénotype. Ce panel inclut des marqueurs permettant d'étudier l'activation, l'origine, la prolifération et la localisation tissulaire des sous-populations de LT CD4+. Les exTregs étant une population provenant des Tregs, mais confondu avec les Tconvs lorsqu'ils ne sont pas identifiés avec un système de fate mapping, il est intéressant de comparer leur phénotype avec ces deux populations (**Figure 2A**). Les tagTregs et les exTregs sont des populations exprimant fortement CD44 par rapport aux Tconvs (**Figure 2B**). Pour pouvoir comparer au mieux le phénotype des exTregs avec les Tconvs nous sommes donc intéressés exclusivement à la population de Tconvs CD44+ dans la rate, les LN, les poumons, le foie, le VAT et le colon. La majorité des LT CD4+ dans la peau exprimaient CD44.

Une analyse PCA (pour *Principal Component Analysis*) a pu mettre en évidence que le phénotype des exTregs était distinct à la fois des tagTregs et des Tconvs dans la rate (**Figure 2C**). Cette distinction était observable dans les 7 tissus analysés (données non montrées). Les marqueurs permettant de différencier les exTregs, des tagTreg et des Tconvs dans la rate peuvent être divisés en trois catégories. Pour un premier groupe de marqueurs, les exTregs ont une expression proche des Tconvs et différentes des tagTregs. C'est le cas pour les marqueurs suivants : Bcl2, TCF1, CD25, CCR2, TNFR2, GATA3, CCR2, KLRG1 et ST2 (**Figure 2D**, entourés en bleu). L'expression d'NRP1 était forte et similaire dans les tagTregs et les exTregs, ce qui les distinguait des Tconvs (**Figure 2D**, entourés en jaune). Pour un dernier groupe de marqueurs on observe une expression différente dans les exTregs par rapport aux deux autres populations. C'est le cas pour le CTLA-4, PD-1, ICOS, CD73, Ki67, cMaf et ROR γ T (**Figure 2D**, entourés en rouge). Cela montre que les exTregs constituent une population phénotypiquement distincte des Tregs et des Tconvs dans la rate sur la base de ces marqueurs.

Bien que cette distinction soit également visible dans d'autres tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes, le phénotype des exTregs semble être dépendant du tissu. Leur phénotype était similaire dans les deux tissus lymphoïdes analysés (rate et LN). En revanche, leur phénotype dans les tissus non-lymphoïdes étaient plus éloignés et formaient des clusters individuels (**Figure 3A**). Les marqueurs de Tregs tissulaires, ST2 et KLRG1, permettaient de distinguer les exTregs des tagTregs dans les tissus lymphoïdes. Cela n'était plus le cas pour le colon et la peau (**Figure 3B**). De manière similaire, les expressions de GATA3, ROR γ T, CD25 et CTLA-4 variaient suivant les tissus au sein des tagTregs et des exTregs (**Figure 3C-D**). Les exTregs ont un phénotype qui leur est propre, cependant, tout comme les Tregs, ce phénotype varie en fonction de leur localisation tissulaire. Cette analyse n'a pas permis de mettre en évidence des marqueurs spécifiques des exTregs quel que soit le tissu analysé.

En condition pathologique

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude des exTregs en conditions pathologiques. En effet, comme discuté précédemment, certaines données de la littérature suggèrent que l'inflammation favorise l'instabilité des Tregs et la génération d'exTregs. Des souris *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* ont été traitées au tamoxifène 7 jours avant l'induction de l'EAE ou l'injection de cellules tumorales par voie sous-cutanée. Les analyses ont été réalisées à différents temps au cours du développement des pathologies : précoces, intermédiaires et tardifs (**Figures 4A**). Comme observé à l'état basal (**Figure 1B**), la proportion d'exTregs parmi les cellules tdTomato+ était faible dans les ganglions drainant le CNS ou la tumeur, le plus souvent inférieure à 5% (**Figure 4B**). Dans le CNS, cette proportion variait de 5-10% aux différents stades de la pathologie. Dans la tumeur, cette proportion était plus importante et atteignait un pic à 20-25% au temps intermédiaire, 15 jours après l'injection des cellules tumorales (**Figure 4B**). La stabilité des Tregs semble donc dépendante du contexte pathologique, l'environnement tumoral semble promouvoir la génération d'exTregs.

Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés au contexte tumoral et à la formation d'exTregs 15 jours après l'injection des cellules tumorales. Pour étudier cela, nous avons étudié les exTregs générés au pic de croissance tumoral en traitant des souris *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* par le tamoxifène 10 jours après l'inoculation de la tumeur et en regardant seulement 5 jours après (**Figure 5A**). La proportion d'exTregs dans les LN était également faible (**Figure 5B**). Dans la tumeur, la proportion d'exTregs parmi les cellules tdTomato+ atteignait 20% ou plus et la proportion d'exTregs parmi les cellules Foxp3-, représentait 10% (**Figure 5B**). On voit ainsi que cette période située entre 10 et 15 jours après l'inoculation de la tumeur est favorable à une très forte instabilité des Tregs dans la tumeur. Nous avons ensuite comparé le phénotype des exTregs à celui des tagTregs et des Tconvs CD44+ dans la tumeur en utilisant le panel décrit précédemment (**Figure 2**). Les exTregs semblent également avoir un phénotype qui leur est propre (**Figure 5C**). Cependant, sur la base des marqueurs utilisés, la distinction entre les tagTregs et les exTregs était moins visible qu'à l'état basal. En effet, les exTregs et les tagTregs avaient une expression similaire pour les marqueurs suivants : CD25, TNFR2, ICOS, CTLA-4, KLRG1, CD69, Bcl2 et TCF1 (**Figure 5D**, entourés en jaune). Les proportions d'exTregs et de tagTregs exprimant le TNF α , l'IL17, l'IL5/IL13 étaient également similaires et inférieures à celles des Tconvs (**Figure 5E**). Nous avons en revanche observé une augmentation de la production d'IFN γ au sein des exTregs par rapport aux tagTregs. Cette production restait tout de même plus faible que celle des Tconvs.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des exTregs présents dans la tumeur, nous avons réalisé un séquençage de l'ARN sur cellule unique (*Single cell RNA sequencing*) des LT CD4+ infiltrant

la tumeur. Nous avons pu définir 6 clusters, qui peuvent être visualisés en utilisant une UMAP (Pour *Uniform Manifold Approximation and Projection*) (**Figure 6A**). Le cluster 0, représentant les exTregs, a pu être défini grâce à l'expression du transcrite de la *tdTomato* et l'absence du transcrite de *Foxp3* (**Figure 6B**). Nous avons ensuite réalisé une analyse différentielle comparant les transcrits exprimés par les exTregs par rapport à ceux exprimés par les Tregs (Clusters 2) ou les Tconvs activés (Clusters 1) (**Figure 6C**). Cette étude devrait permettre de mettre en évidence une signature spécifique des exTregs au sein de la tumeur. Nous avons également réalisé un séquençage des TCR, cela devrait permettre d'étudier l'expansion clonale des différents clusters. La comparaison des clones entre clusters nous permettra également de déterminer l'origine de la population d'exTreg.

Ces résultats, bien que préliminaires, permettent d'avancer dans la caractérisation des exTregs. Une population d'exTreg a pu être observée en condition physiologique à la fois dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes. La proportion de cette population était variable suivant le tissu et l'âge des souris étudiées. Au niveau de leur phénotype, les exTregs présentaient des similitudes à la fois avec les Tregs et les Tconvs. Bien qu'ils aient un phénotype qui leur est propre, aucun marqueur étudié n'a permis de les distinguer clairement des Tregs et des Tconvs dans les différents tissus. L'impact de l'inflammation sur la stabilité des Tregs était dépendante du contexte pathologique. Ainsi, l'environnement tumoral favorisait la génération d'exTregs. Au sein de la tumeur, le phénotype des exTregs semblait plus proche de celui des Tregs. A l'exception de l'IFN γ , leur production de cytokines était également similaire. Une analyse plus approfondie des données de scRNAseq devrait permettre d'identifier une signature caractéristique des exTregs, déterminer leur origine et mieux comprendre leur fonction.

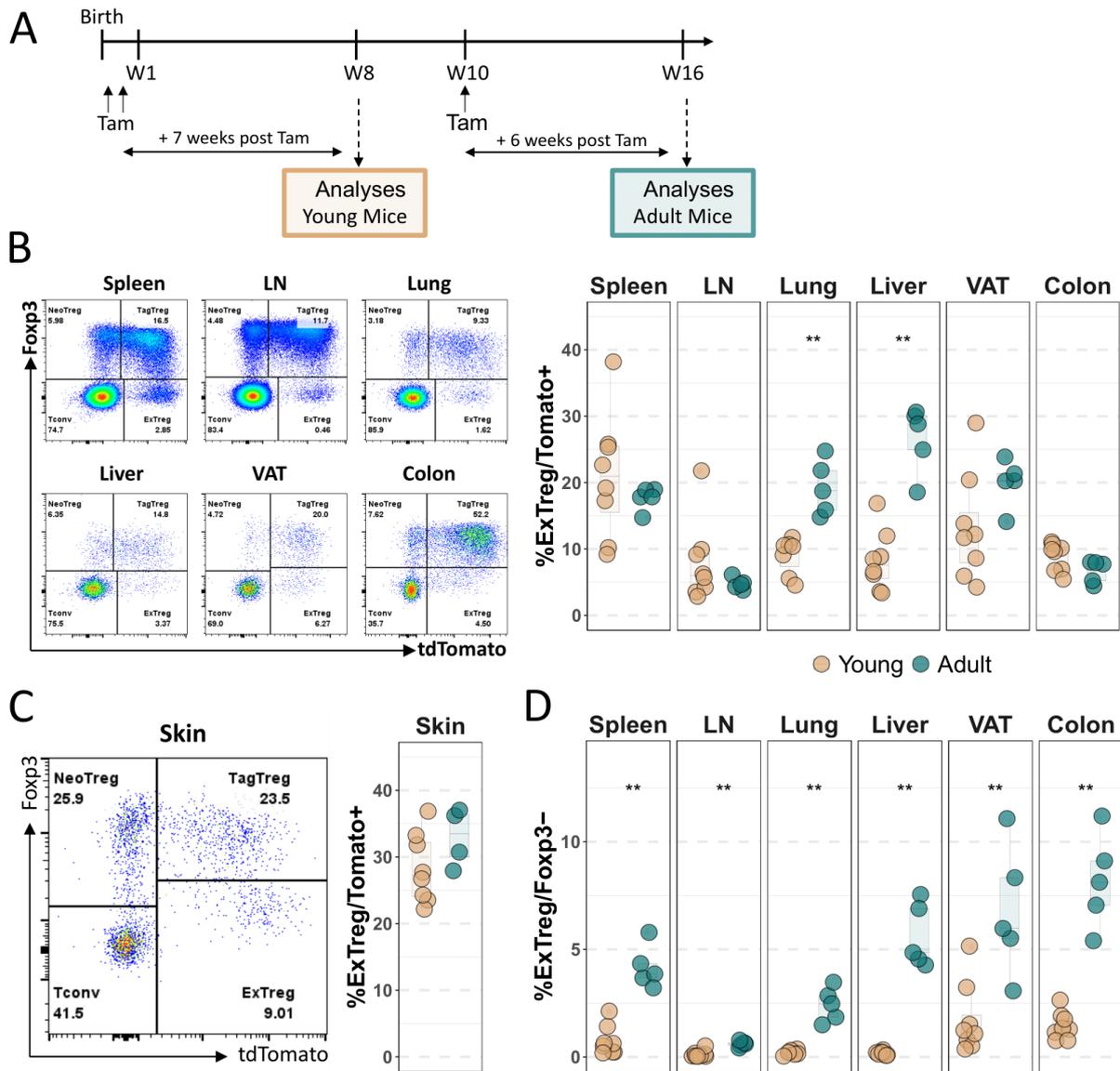


Figure 1. Proportion of exTregs at steady state in lymphoid and non-lymphoid tissues. (A) Experimental approach. *Foxp3^{Cre-ERT2}Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen either at the neonatal period (Young, 2 intraperitoneal (IP) injections at day 1 and 4 after birth) or when they were adults (gavage at 10-weeks of age). The proportion of exTregs was analysed 6-7 weeks after treatment in different tissues. (B, C) Representative dot plots (left panels) and proportions of exTregs among tdTomato+ cells (right panels) in the spleen, lymph nodes (LN), lung, liver, visceral adipose tissue (VAT) and colon (B) and in the skin (C). (D) Proportion of exTregs among Foxp3- cells in the indicated tissues. Each circle represents a mouse. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

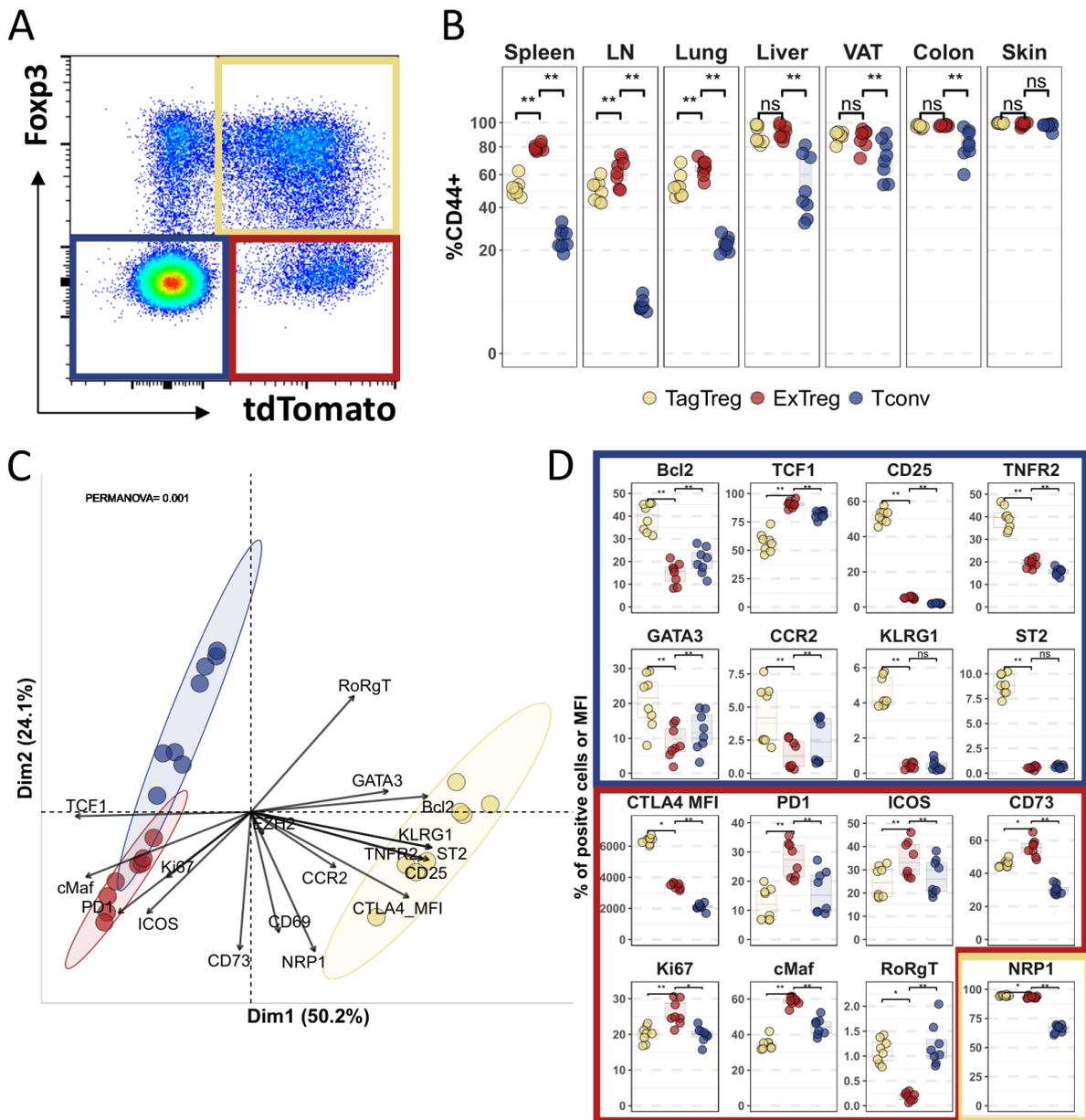


Figure 2. ExTregs have a distinct phenotype from Tregs and Tconvs at steady state in the spleen. 6-week-old *Foxp3^{Cre-ERT2}Rosa26^{tdTomato}* mice received two tamoxifen intraperitoneal (IP) injections and were analysed two weeks after using a mixed panel of markers by flow cytometry. (A) Representative dot plot of the gating strategy to identify tagTregs, exTregs and Tconvs in the spleen. (B) Proportion of CD44+ cells among tagTregs, exTregs and Tconvs in the indicated tissues. (C) Principal component analysis (PCA) based on markers expressed by tagTregs, exTregs and CD44+ Tconvs in the spleen. For the 22 markers that drive the PCA, the direction and size of each arrow show the contribution of each marker to the variance of the PCA. (D) Proportion and MFI (CTLA4) of the indicated markers expressed by tagTregs, exTregs and CD44+ Tconvs. The ones that are expressed at similar levels in exTregs and CD44+ Tconvs are outlined in blue, the one that is expressed at similar levels in exTregs and tagTregs is outlined in yellow and the ones that are differentially expressed by exTregs are outlined in red. Each circle represents a mouse. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

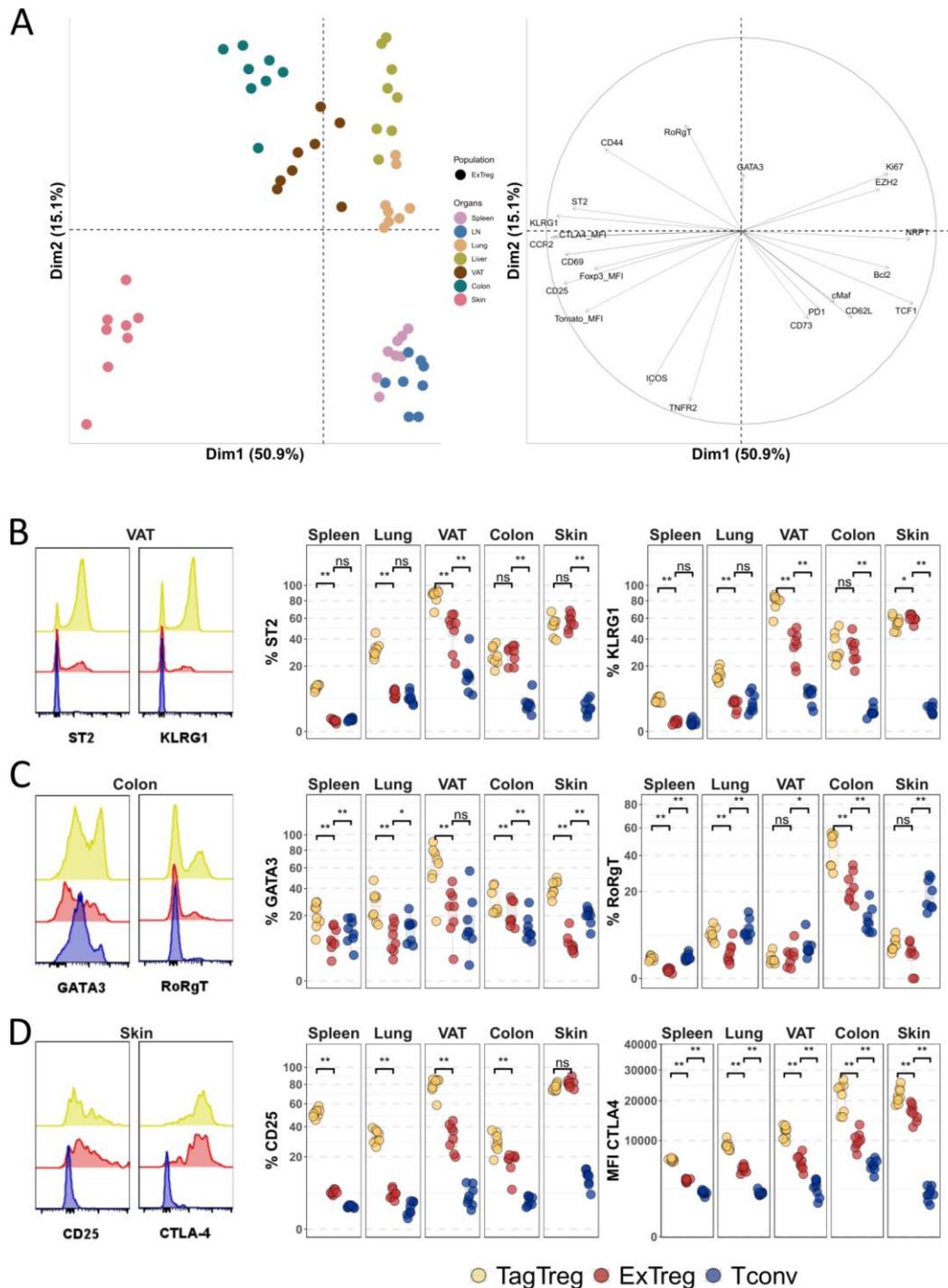


Figure 3. The phenotype of exTregs is tissue dependent at steady state. 6-week-old *Foxp3^{Cre-ERT2}Rosa26^{tdTomato}* mice received two tamoxifen intraperitoneal (IP) injections and were analysed two weeks after using a mixed panel of markers by flow cytometry. (A) PCA based on markers expressed by exTregs in 7 tissues (left panel) and direction and size of each arrow show the contribution of the 22 markers to the variance of the PCA (right panel). (B) Representative histogram in the VAT (left panels) and proportion of ST2 and KLRG1 (right panels) among tagTregs, exTregs and CD44+ Tconvs in the spleen, LNs, VAT, colon and Skin. (C) Representative histogram in the colon (left panels) and proportion of GATA3 and RORγT (right panels) among tagTregs, exTregs and CD44+ Tconvs in the spleen, LNs, VAT, colon and Skin. (D) Representative histogram in the colon (left panels) and proportion of CD25 and median fluorescence intensity (MFI) of CTLA-4 (right panels) among tagTregs, exTregs and CD44+ Tconvs in the spleen, LNs, VAT, colon and Skin. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

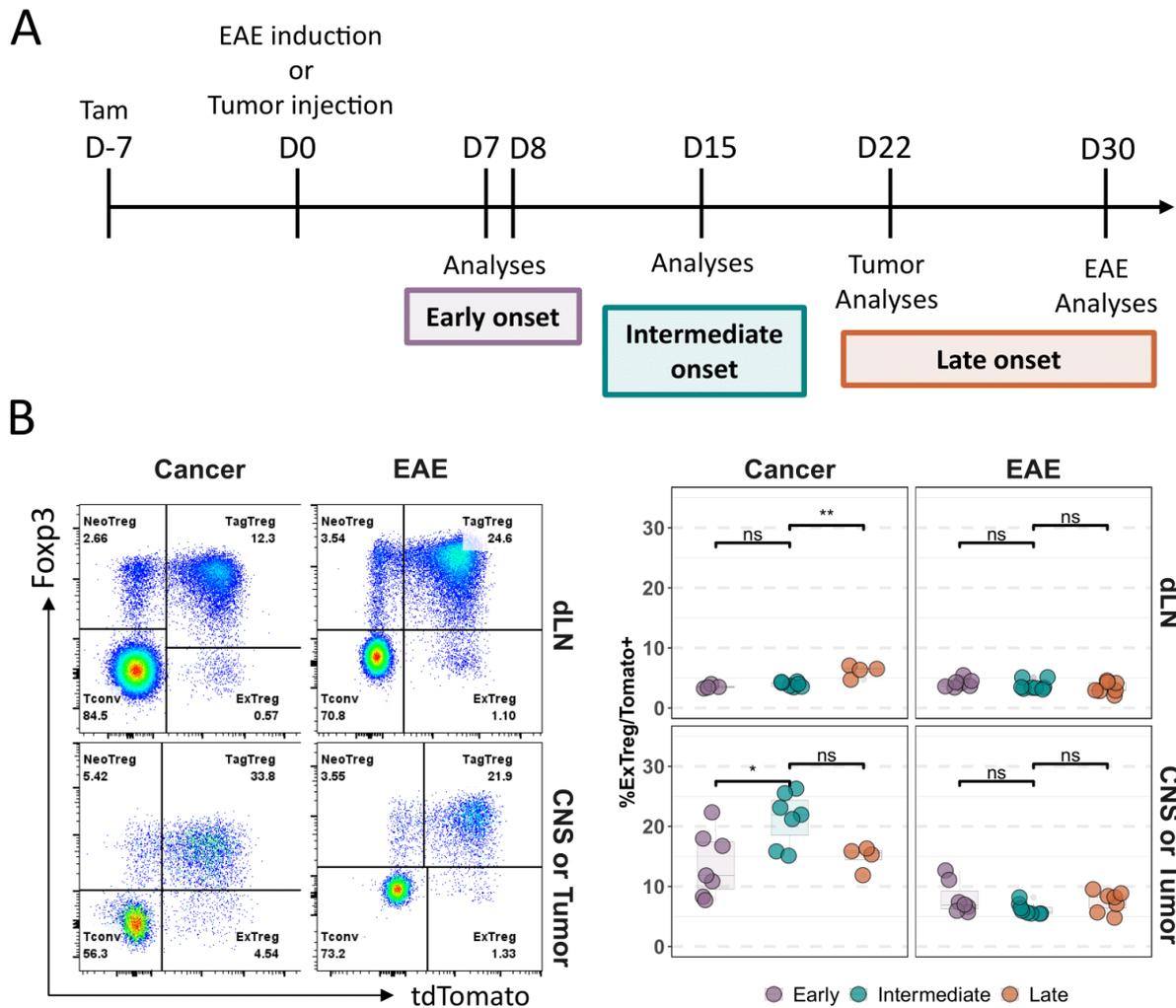


Figure 4. Tregs stability is impacted in a tumor environment. (A) *Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice were treated with tamoxifen (Tam) by gavage 7 days (D-7) prior to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) or the injection of MCA205 tumor cells. Analyses were performed at early onset (D7-D8), intermediate (D15) and late time points (D22-D30) of the disease development. (B) Representative dot plots showing exTregs (left panel) and the proportions of exTregs among tdTomato+ cells (right panels) in the dLN or the inflamed target tissue (CNS or tumor). Each circle represents a mouse. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

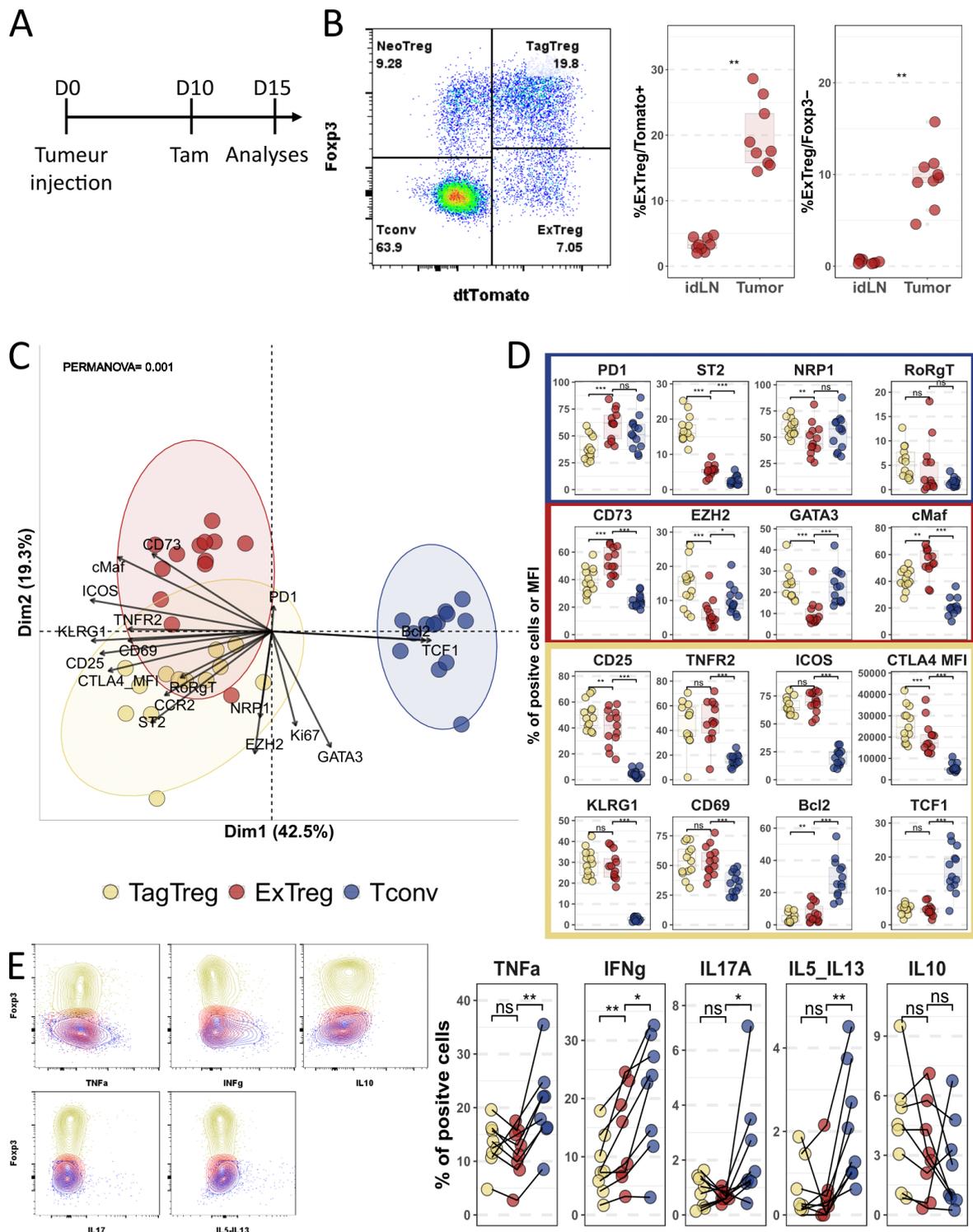


Figure 5. ExTregs phenotype in the tumor environment. MCA205 tumor cells were injected subcutaneously in *Fcpx3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}* mice at day 0. Mice were treated with tamoxifen by gavage at day 10. The tumor and the inguinal draining lymph node (dLN) were analysed at day 15 by flow cytometry. (A) Protocol scheme. (B) Representative dot plot showing exTregs (left panel) and proportion of exTregs among tdTomato+ cells (middle panel) or among Fcpx3- (right panel) in the tumor. (C) PCA showing the dispersion of tagTregs, exTregs and CD44+ Tconvs in the tumor. (D) Proportion of markers expressed by tagTregs, exTregs and CD44+ Tconvs in the tumor. (E) Representative density plots (left panels) and proportion of the indicated cytokines (right panels) among exTregs, tagTregs and Tconvs in the tumor after PMA/ionomycin stimulation. Each circle represents one mouse. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

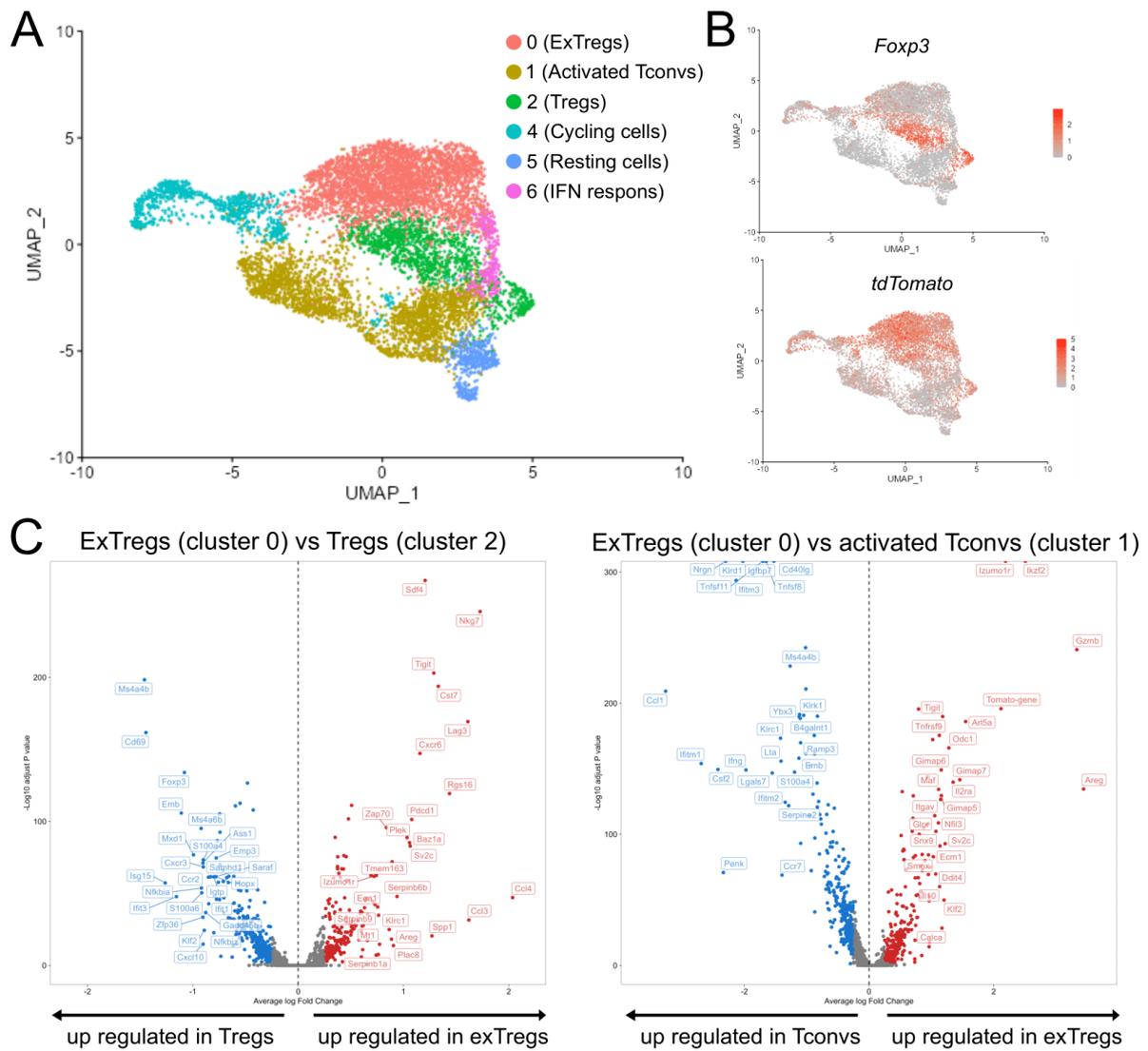


Figure 6. scRNASeq analysis of exTregs in tumors. MCA205 tumor cells were injected subcutaneously in *Foxp3^{Cre-ERT2}Rosa26^{tdTomato}* mice at day 0. Mice were treated with tamoxifen by gavage at day 10. CD4+ T cells infiltrating the tumors were sorted at day 15 and analysed by scRNASeq. (A) The different CD4+ compartments were identified by UMAP. (B) Projection of *Foxp3* and *tdTomato* expressions on the UMAP. (C) Volcano plot showing the differentially expressed genes in exTregs versus Tregs (left panel) and in exTregs versus activated Tconvs (right panel).

2. TNFR2 et Cancer

Le rôle pro tumoral du TNF a largement été étudié. De nombreux mécanismes ont été décrits, certains impliquant les Tregs. L'utilisation d'antagoniste du TNFR2 ou de modèle possédant une délétion du TNFR2, montrent une réduction de la croissance tumorale, ainsi qu'une diminution du nombre de Tregs [299], [332]–[334]. Chez des patients atteints de cancers, le TNFR2 est fortement exprimé par les Tregs circulants ou infiltrants les tumeurs [335], [336]. Il a également été montré que les Tregs infiltrant la tumeur et exprimant le TNFR2 étaient fortement suppresseurs et capables d'inhiber la réponse antitumorale après transfert adoptif [297].

Le TNFR2 étant un marqueur d'activation, ces données montrent que les Tregs infiltrant les tumeurs sont activés et suppresseurs. Cependant, le rôle du TNFR2 en lui-même pour la fonction des Tregs n'a pas été étudié. De plus, aucunes données ne démontrent un rôle pro-tumoral du TNF agissant directement sur les Tregs. Pour étudier cela, nous avons utilisé le modèle CreLox inducible dans lequel le TNFR2 est spécifiquement délété au sein des Tregs.

Nous avons montré que le TNFR2 exprimé par les Tregs jouait un rôle dans le contrôle de l'immunité antitumorale. En effet, lorsque les Tregs étaient déplétés pour le TNFR2, la croissance tumorale était réduite. Ces résultats ont été obtenus dans différents modèles de cancer. Pour comprendre les mécanismes sous-jacents, nous avons surtout étudié les effets de la délétion du TNFR2 après seulement 5 jours. Les études ultérieures sont difficiles à interpréter, car dans ce cas les tumeurs ont des tailles très différentes entre groupe expérimental et groupe témoin et car l'inflammation secondaire à l'ablation du TNFR2 sur les Tregs risque de « brouiller les pistes ». Cinq jours après le traitement au tamoxifène, nous n'avons pas observé de changement majeur au niveau de l'expression de marqueurs membranaires et de facteurs de transcription parmi les Tregs ou les Tconv. En revanche, la production de cytokines était fortement accrue lorsque que les Tregs étaient déplétés pour le TNFR2. Cela était visible au niveau de différentes populations incluant les Tregs, les Tconv et les ILC. Nous avons également observé un impact sur le compartiment myéloïde, avec une expression accrue d'INOS et de Ki67 dans certains sous types. Ces résultats montrent un mécanisme de suppression passant par le TNFR2 exprimé par les Tregs pour réguler l'inflammation.

TNFR2 expression by Tregs is critical for suppressing tumor immunity by regulating inflammatory cytokines

Morgane Hilaire^{1,2}, Maryam Koshravi^{1,2}, Angéline Mimoun⁴, Emilie Ronin¹, Wilfrid Richer³, Léonie Cagnet^{1,4}, Sahar Kassem¹, Alexandre Boissonnas¹, Elisa Bonnin³, Eliane Piaggio³ and Benoît L Salomon^{1,4,5}

¹Sorbonne Université, INSERM U1135, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), F-75013, Paris, France.

²Co-first authors

³Institut Curie, PSL Research University, F-75005, Paris, France.

⁴Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), INSERM UMR1291 - CNRS UMR5051 - University Toulouse III, Toulouse, France.

⁵To whom correspondence may be addressed: Benoit Salomon, benoit.salomon@inserm.fr. ORCID ID: 0000-0001-9673-5578.

ABSTRACT

Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) are immunosuppressive cells that inhibit tumor immunity. Their mechanism of action is complex and only partially known. Here, we show that the expression of tumor necrosis factor (TNF) receptor type 2 (TNFR2) by Tregs was critical for their capacity to limit tumor immunity. Genetic and inducible ablation of TNFR2 in Tregs led to reduced tumor growth within few days, which was associated with a rapid and by-stander effect on T cells and myeloid cells infiltrating the tumors. Tregs and conventional T cells produced more TNF and IFN γ whereas monocytes, macrophages and neutrophils were more activated and produced increased levels of iNOS. **To be continued based on the data we will generate by analyzing the scRNAseq and the effect of blocking TNF in icKO mice.**

INTRODUCTION

The role of tumor necrosis factor (TNF) and its two receptors, TNF receptor type 1 (TNFR1) and type 2 (TNFR2), in cancer have been studied in several reports. Initially described for its capacity to kill cancer cells [1], most studies have shown a pro-tumoral effect of the TNF/TNFR1/TNFR2 axis (reviewed in [2]–[7]). In several cancer models, tumor growth was reduced in mice deficient for the cytokine or one of its receptors. The pro-tumoral effect of this axis was further demonstrated by the fact that the administration of antibodies (Ab) blocking or neutralizing TNF, TNFR1 or TNFR2 led to reduced tumor growth. Several mechanisms have been proposed to explain these observations (reviewed in [2]–[7]). TNF may promote carcinogenesis and tumor growth by favoring DNA mutations, tumor cell proliferation, neovascularization or inflammation [8]–[13]. Alternatively, the pro-tumoral effect of TNF may be due to its capacity to inhibit anti-tumor immunity. Here again, several mechanisms have been described. TNF may kill CD8 conventional T cells (Tconvs) that have anti-tumoral action [14]–[16]. TNF may promote a tumoral immunosuppressive microenvironment by acting on myeloid suppressor cells [17]–[20] or Foxp3+ regulatory T cells (Tregs) [21]–[23]. The role of Tregs was based on the following observations. Targeting TNFR2 using a monoclonal Ab (mAb) induced tumor regression that was associated with reduced Treg numbers [24]–[26]. Mice deficient for TNF or TNFR2 in the hematopoietic system showed reduced lung metastasis in a melanoma model, associated with decreased Treg numbers in the lung [21]. In mouse models of colon or liver cancer, tumor-infiltrating Tregs expressing TNFR2, were highly suppressive and capable of inhibiting an anti-tumor response after adoptive transfer [22]. As TNFR2 is a marker of Treg activation, this work showed that infiltrating Tregs were highly activated and suppressive but did not address the role of TNFR2 expressed by Tregs. Human data confirmed these observations. TNF stimulated Treg proliferation and stability in vitro via TNFR2 [27]–[32]. In different types of human cancers, TNFR2 was highly expressed by blood Tregs or Tregs infiltrating the tumors [21], [22], [33]–[35]. TNF inhibitors have been tested in cancer patients in several clinical trials [36]. Very recently, drugs targeting specifically TNFR2 that have potentially a better therapeutic potential are being tested in cancer patients as well [4]. Overall, these studies showed that TNFR2 is expressed by activated Tregs that are present in high proportion in many tumors and that blocking TNFR2 may lead to tumor regression that was associated with decreased Treg numbers. However, these studies offered only correlative data and none of them provided any underlying mechanism. In other words, there was no evidence that the pro-tumoral effect of TNF was due to its capacity to act on Tregs.

The role of TNFR2 in Treg biology has been studied in greater detail in other contexts. By binding to TNFR2, TNF, rather in membrane form than soluble, stimulated Treg proliferation and survival [37].

NF- κ B activation plays a critical role in this phenomenon [38]. To provide clear evidence that the TNF/TNFR2-dependant Treg activation in vivo is due to a direct impact of TNF on Tregs, we generated mice that have a conditional knockout (KO) of TNFR2 only in Tregs. In a mouse model of multiple sclerosis, we showed that TNF acted directly on Tregs in the central nervous system to regulate the disease during the acute phase [39]. This effect was not due to an effect on Treg expansion, but rather on their suppressive function by a mechanism yet to be discovered [39].

Here, we have used the same conditional KO mouse model to determine whether TNFR2 expression on Tregs plays a role in anti-tumor immunity and studied the underlying mechanisms. In various cancer models, we showed that ablation of TNFR2 only in Tregs was sufficient to stimulate anti-tumor immunity and limit tumor growth. This effect was not due to an effect on Treg numbers but on their ability to block cytokine production.

MATERIALS AND METHODS

Mice. *Foxp3^{tm9(EGFP/cre/ERT2)Ayr/J}* (*Foxp3^{Cre-ERT2}*), *B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J}* (*Rosa26^{tdTomato}*), and RAG2 KO mice were purchased from the Jackson Laboratory. *Tnfrsf1b^{<tm1c(EUCOMM)Wtsi>/Ics}* (*Tnfrsf1b^{fl}*) mice were obtained from the EMMA Consortium. All mice were on a C57BL/6J background. *Foxp3^{Cre-ERT2}* and *Tnfrsf1b^{fl} Foxp3^{Cre-ERT2}* were treated with either food containing 400 mg/kg of tamoxifen (Envigo, Ref: TD.55125.I) or with a single dose of 8 mg administered by gavage. For the gavage, the tamoxifen (MP Biomedical, Ref:11435161) was reconstituted at a final concentration of 40 mg/mL in peanut oil, obtained after 4 hours of vortex at 37°C. The mice were housed under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the “Comité d'éthique en expérimentation animal Charles Darwin N°5” under the numbers 02811.03 and 26677 and were in compliance with European Union guidelines.

Preparation of cell suspensions. Lymph nodes were collected in PBS 1X complemented with 3% of fetal calf serum (PBS-3%FCS). A single-cell suspension was obtained by mechanical dilaceration with a 70 µm cell strainer. The tumors were collected in PBS 1X and cut into small pieces prior to enzymatic digestion. Digestion kit specific for tumor from Miltenyi and gentleMACS™ Dissociator were used (Ref: 130-096-730) according to the instructions provided by the supplier. After the digestion, the tissues were filtered with a 70 µm cell strainer. The single-cell suspension obtained was re-suspended in 40% Percoll, laid on an 80% Percoll and centrifuged for 20 min at 2 000 rpm at 20°C. Cells were collected at the interface of the 40:80% Percoll gradient and washed with PBS-3%FCS. The staining of myeloid cells was performed without the Percoll.

Antibodies and flow cytometry. Cells were stained in 96 well-plates with the antibodies and fluorescent reagent listed in Table 1. The cells' viability was determined using fixable live/dead dye (LIVE/DEAD™ Blue, Invitrogen). Non-specific binding was limited by using the 2.4G2 hybridoma (anti-CD16/32). Membrane staining was performed for 20 min at 4°C in PBS-3%FCS. Fixation and permeabilization of the cells were performed using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set from eBioscience. Intracellular staining was performed for 45 min at 4°C using the buffer provided. Intracellular cytokine staining was assessed after 2.5 hours of Phorbol myristate acetate (PMA 50 ng/mL)–ionomycin (5 µg/ml) stimulation in RPMI 1640 containing 10%FCS, 2mM L-Glutamine, 20mM HEPES, 1mM Sodium Pyruvate, 1mM non-essential amino acids, Penicilline/Streptomycine, 55µM beta-mercaptoethanol and Golgi plug (BD Biosciences). Cells were acquired on the spectral cytometer Aurora from Cytex and analyzed using the FlowJo or OMIQ software.

Tumor Model. For the subcutaneous model, mice were injected in the flank with 0.2 million of the MCA205 or MC38 tumor cell line. Anti-TNFR2 (TR7554.7) mAbs were purchased from BioXCell and were injected at a dose of 500 µg intraperitoneally 0, 3 and 6; 6, 9 and 12 or 10, 13 and 16 days after tumor inoculation. For colorectal cancer induced using AOM (Azoxy methane)/DSS (Dextran Sulfate Sodium), mice were injected intraperitoneally with 12.5 mg/kg of AOM (Sigma-Aldrich, Ref: A5486) on day 1. Mice were then treated with 3 rounds of 1.5% DSS (MP Biomedicals, Ref: 160110) contained in water for 7 days at days 7, 28 and 49 of the protocol. At day 70, mice were treated with food containing tamoxifen for one week. At the end of the protocol, mice were euthanized, and the colons were collected for tumor counting. To better visualize the tumors, the colons were cut longitudinally, washed with PBS 1X and fixed with formaldehyde for 45 minutes. The samples were then stained with 0.3% Methylene Blue for 3 minutes and washed with 70% methanol twice before tumors counting.

Single-cell RNA-sequencing. *Foxp3^{Cre-ERT2}* and *Tnfrsf1b^{fl} Foxp3^{Cre-ERT2}* mice were treated with a single dose of tamoxifen 10 days after MCA205 injections. The tumors were processed on day 15. After dissociation, to eliminate tumor cells, the cells were stained with CD45 microbeads (Miltenyi, Ref: 130-110-618) according to the instructions provided by the supplier. CD45+ cells were isolated from the positive fraction obtained in LS columns (Miltenyi, Ref: 130-042-401). The cells were then stained for Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) with live/dead, CD45 and CD4. The cells were sorted with a FACS-ARIAII (BD) based on the expression of CD45, CD4, GFP and tdTomato. The CD45+CD4-, CD45+CD4+GFP-tdTomato- and CD45CD4+GFP+tdTomato+ cells were collected in PBS 1X containing 0.04% of BSA (Bovine Serum Albumin). For the CD45+CD4+ fraction, 20,000 cells were loaded in a 10x Genomics Chromium chip (10X Genomics) according to the instructions provided by the supplier. For the CD45+CD4+ fraction, 10,000 GFP-tdTomato- and 10,000 GFP+tdTomato+ cells were mixed and equally loaded per group. The protocol used for the sequencing, data processing and analysis were previously described [40].

Antibody	Clone	Fluorochrome	Supplier	Reference
Bcl2	10C4	PE-Cy7	Invitrogen/eBioscience	25-6992-42
CCR2	475301	BUV661	BD Biosciences	750042
CD103	2E7	APC	BioLegend	121413
CD11b	M1/70	AF700	BD Biosciences	557960
CD11c	HL3	BV421	BD Biosciences	562782
CD206	C068C2	BV711	BioLegend	141727
CD25	PC61	BV605	BioLegend	102036
CD3	145-2C11	BUV563	BD Biosciences	749277
CD4	GK1.5	BUV496	BD Biosciences	612952
CD43	1B11	PE-Cy5	BioLegend	12126
CD44	IM7	PerCP	BioLegend	103036
CD45	30-F11	BUV395	BD Biosciences	564279
CD62L	MEL-14	BV650	BD Biosciences	564108
CD69	H1.2F3	BUV805	BD Biosciences	741927
CD73	TY/11.8	PerCP-Cy5.5	BioLegend	127213
CD8	53-6.7	PE-Cy5.5	Invitrogen/eBioscience	35-0081-80
CD8	53-6.7	BUV805	BD Biosciences	612898
c-Maf	symOF1	eFluor 450	Invitrogen/eBioscience	48-9855-42
CTLA-4	UC10-4F10-11	PE-CF594	BD Biosciences	564332
EZH2	11/EZH2	BV421	BD Biosciences	562963
F4/80	BM8	AF647	BioLegend	123122
Foxp3	FJK-16s	FITC	Invitrogen/eBioscience	11-5773-82
GATA3	TWAJ	PE-Cy5	Invitrogen/eBioscience	15-9966-41
Granzyme B	QA16A02	APC Fire 750	BioLegend	372210
IAIE	M5/114.15.2	v500	BD Biosciences	562366
ICOS	7E.17G9	BV711	BD Biosciences	740763
IFN γ	XMG1.2	BV605	BioLegend	505839
IL10	JES5-16E3	BV711	BD Biosciences	564081
IL13	eBio13A	eF450	Invitrogen/eBioscience	48-7133-80
IL17A	TC11-18H10.1	BV421	BioLegend	506925
IL5	TRFK5	eF450	Invitrogen/eBioscience	48-7052-82
INOS	CXNFT	PerCP-eF710	Invitrogen/eBioscience	46-5920-82
Ki67	SolA15	AF532	Invitrogen/eBioscience	58-5698-82
KLRG1	2F1	BUV563	BD Biosciences	751191
Ly6c	AL-21	PE-Cy7	BD Biosciences	560593
Ly6g	1A8	BV570	BioLegend	127629
NRP1	V46-1954	BV750	BD Biosciences	752452
PD1	J43	BUV737	BD Biosciences	749422
PDL1	10F.9G2	BV605	BioLegend	124321
ROR γ t	Q31-378	AF647	BD Biosciences	562894
SiglecF	E50-2440	BV480	BD Biosciences	746668
ST2	U29-93	BV480	BD Biosciences	746701
Tbet	4B10	Pecyn7	BioLegend	644824
TCF1	S33-966	R718	BD Biosciences	567587
TNF	MP6-XT22	BB700	BD Biosciences	566510
TNRF2	REA228	APC	Miltenyi	130-123-275

Table 1. Antibodies used in flow cytometry.

RESULTS

Blocking TNFR2 leads to reduced tumor growth.

Injection of an Ab with a TNFR2 antagonistic activity reduced tumor growth [24]–[26], [41], [42]. We tested when, during the progression of tumor growth, this effect could be observed using the fibrosarcoma MCA205 model. When injected between 10 and 16 days after tumor inoculation, the TNFR2 antagonist induced a rapid slowdown in tumor growth (Fig 1A). This effect was reduced and completely absent when the antagonist was injected between D6 and D12 and between D0 and D7 after tumor inoculation, respectively. The therapeutic effect of injecting the anti-TNFR2 antagonist was also observed with the MC38 line, a colon carcinoma (Fig. 1B). As TNFR2 is expressed by MCA205 and MC38 tumor cells (Fig S1A), we tested whether the therapeutic effect of this Ab was mediated by the adaptative immune system. This was indeed the case since this effect was absent when the experiment was performed in RAG2 KO lymphopenic mice (Fig S1B).

Specific ablation of TNFR2 in Tregs leads to reduced tumor growth.

To address the role of TNFR2 in Tregs, we crossed *Tnfrsf1b^{fl}* knock-in mice, carrying a floxed *Tnfrsf1b* (coding for TNFR2) allele, with *Foxp3^{Cre-ERT2}* knock-in mice, expressing a tamoxifen-inducible Cre under the control of *Foxp3* regulatory sequences. In these *Tnfrsf1b^{fl} Foxp3^{Cre-ERT2}* mice (hereafter named icKO mice for induced conditional KO mice), we showed previously that tamoxifen treatment induced a complete and specific ablation of TNFR2 in Tregs [39]. TNFR2 can thus be deleted in Tregs at a time when it is required. Data described above with the TNFR2 antagonist Ab suggest that TNFR2 has a regulatory effect 10 days after tumor inoculation in the MCA205 model. We therefore studied the effect of tamoxifen administration starting 10 days after tumor inoculation in icKO mice. We used *Foxp3^{Cre-ERT2}* mice treated with tamoxifen as control mice. The tamoxifen treatment induced a significant reduction of tumor growth compared with control mice (Fig 1C). The specific ablation of TNFR2 in Tregs upon tamoxifen treatment was confirmed in this cancer model (Fig S1C). The beneficial effect of TNFR2 ablation in Tregs was also observed in the MC38 model (Fig 1SD). Finally, we studied the role of TNFR2 expressed by Tregs in the colon tumor model induced by the administration of the azoxymethane carcinogen, followed by several rounds of dextran sodium sulfate that generate inflammation in the intestine (Fig S1E). Tumors develop in the colon after the 2nd and 3rd rounds of dextran sodium sulfate [43]. Here, tamoxifen was administered after the 3rd round of dextran sodium sulfate, thus after the inflammatory phase of the disease. Late ablation of TNFR2 in Tregs resulted in a significant reduction in tumor numbers (Fig 1D). Our data show for the first time, in 3 different cancer

models, that ablation of TNFR2 specifically in Tregs at an advanced stage of tumor progression is sufficient to slow tumor growth.

Late impact of TNFR2 ablation in Tregs on tumor-infiltrating Tregs and CD8 Tconvs.

Our goal was then to address the underlying cellular and molecular mechanisms of reduced tumor growth in TNFR2 icKO mice using the MCA205 model and tamoxifen administered starting from day 10. We studied the infiltrate at various times after tumor inoculation (from day 16 to 40). In agreement with volume measurements, tumor mass was significantly lower in icKO mice than in controls (Fig 1E). Conversely, the number of leukocytes per gram of tumor and the total leukocyte number were higher in icKO mice than in controls (Fig 1F and Fig S2A). There was also an inverse correlation between the number of infiltrating leukocytes and the tumor mass (Fig S2B). The Treg proportion among CD4⁺ cells was similar in icKO and control mice at day 18 but was subsequently reduced in icKO mice compared to controls at later time points (Fig 1G and Fig S2C). On day 18, the CD8/Treg ratio was similar in icKO and control mice (Fig S2C). Among Tregs, there was a decrease in PD1 and 4-1BB expression and an increase in TNF and Ki67 expression in icKO mice compared to controls (Fig S3A). Expression of these markers (PD1, 4-1BB, Ki67) was similarly altered in CD8⁺ Tconvs (Fig S3B). We also observed increased expression of effector molecules, such as IFN γ , granzyme B or Eomes, in CD8⁺ Tconvs from icKO mice. Expression of some of these markers was correlated in CD8⁺ Tconvs. Cells co-expressing PD1 and 4-1BB, which were abundant in control mice, were poorly represented in icKO mice (Fig. S3C). The majority of CD8⁺ Tconvs expressed Eomes but not PD1 in icKO mice, whereas the majority of them expressed PD1 but not Eomes in control mice (Fig S3C). Expression of the exhaustion markers Tim3 and Tox was unchanged or weakly decreased in icKO mice (Fig S3B). These data suggest that both Tregs and CD8⁺ Tconvs have overall a more activated phenotype in icKO mice compared with controls at day 18, probably due to greater inflammation at this stage. This time point was not optimal to reveal the initial mechanism that was taking place before subsequent inflammation. Also, to pinpoint the direct impact of TNFR2 ablation in Tregs on the immune system, we treated icKO mice with a single administration of a high dose of tamoxifen at day 10 and focused our analysis on day 15 (5 days after TNFR2 ablation in Tregs). Under these conditions that will be used for the rest of the analysis, we improve the chances to analyze the early mechanisms of TNFR2 ablation on Tregs before major inflammation, confounding the interpretation of the data. Under this condition, we also observed a rapid reduction of tumor growth in icKO mice compared with controls (Fig S4).

To assess the cell composition and phenotype of tumor infiltrating lymphoid cells, we studied the expression of 27 markers characterizing Treg subtypes and different aspects of Treg activation and function. In control mice, the combination of these markers easily discriminated Tregs from CD4⁺

Tconvs and CD8+ Tconvs infiltrating the tumor (Fig S5A). Tregs expressed higher levels of activation markers and markers of the Treg signature (CD25, ICOS, CTLA4, NRP1, CD73, CCR2, KLRG1, ST2) as well as some transcription factors (GATA3, cMaf and RORgt) and lower level of markers of resting cells (TCF7, CD62L, Bcl2) as well as Eomes. The same marker combination also discriminated tumor Tregs from lymph node Tregs (both draining the tumor or of unmanipulated mice) (Fig S5B). Compared to lymph node Tregs, tumor Tregs expressed higher levels of activation markers and lower levels of resting markers as well as NRP1 and Eomes. Similar findings were observed in CD4+ and CD8+ Tconvs in control mice, for which there is clear discrimination between tumor-infiltrating cells and lymph node cells (Fig S5C). Here again, tumor Tconvs expressed higher levels of activation markers and lower levels of resting markers.

We then analyzed the cell subset composition of tumor-infiltrating lymphoid cells in icKO compared to control mice (Fig S6A). At this early stage (5 days after tamoxifen treatment), we observed the same proportion of Tregs among CD4+ T cells (Fig S6B) and the same numbers per tumor mass of CD45+ cells, Tregs, CD4+ Tconvs, CD8+ Tconvs and innate lymphoid cells (ILCs) (Fig S6C) in icKO mice compared to controls. Among CD45+ cells, the proportion of Tconvs, Tregs and ILCs were increased in icKO mice compared to controls.

TNFR2-deficient Tregs rapidly produced high amounts of TNF in the tumors.

The phenotype of Tregs was analyzed using the combination of 27 lymphoid markers described above. By principal component analysis (PCA) and uniform manifold approximation and projection (UMAP) we observed that Tregs from icKO and control mice clustered together and were evenly distributed, showing that they have a comparable phenotype (Fig 2A, B). Taken individually, most markers were expressed at the same level in the 2 groups of mice (Fig 2C, Fig S7). Only 4 out of the 22 markers were differentially expressed and differences were minor for 3 of the 4. Expression of Foxp3, TCF1 and NRP1 very slightly lower in icKO mice than in controls. The difference was more obvious for granzyme B which was expressed at a significantly increased level in icKO mice than in controls (Fig 2C, Fig S7). We also analyzed expression of TNF, IFN γ , IL-10, IL-5, IL-13 and IL-17A because of their role in anti-tumor immunity. We observed that TNFR2 ablation in Tregs induced major increase of TNF produced by Tregs (Fig 2D). IFN γ , IL-10, IL-5/IL-13 and IL-17A that were expressed at very low level in Tregs of control mice, were slightly increased after TNFR2 ablation (Fig 2D, Fig S8A). Among the different analyzed markers, TNFR2 ablation in Tregs led to increased expression mostly of granzyme B and TNF.

TNFR2 ablation in Tregs promotes inflammatory cytokine production by tumor-infiltrating Tconvs.

We also studied the impact of TNFR2 ablation on Tregs on Tconvs, which are potential targets of Tregs. As with Tregs, the PCA that included the 27 lymphoid markers showed that CD4⁺ Tconvs clustered together in icKO and control mice (Fig 3A). The same findings were obtained with CD8⁺ Tconvs. When studied separately, most markers were expressed at the same level in the 2 groups of mice and in both CD4⁺ and CD8⁺ Tconvs (Fig S9, 10). For CD4⁺ Tconvs, only 3 (TCF1, Bcl2 and granzyme B) out of 22 markers were differentially expressed and differences were minor. For CD8⁺ Tconvs, only granzyme B was slightly increased in icKO mice compared to controls. When we studied cytokine production, we observed that TNF and IFN γ were strongly increased in CD8⁺ Tconvs of icKO mice compared with controls (Fig 3B). These two cytokines were also increased in CD4⁺ Tconvs of icKO mice but to a lesser extent. A slight increased expression of IL-10 and IL-17A in CD8⁺ Tconvs and of IL-5/13 in CD4⁺ Tconvs were also observed (Fig 3B, S8A). Also, TNF and IFN γ were significantly increased in ILCs of icKO mice compared with controls (Fig S8B).

As we saw a comparable increased expression of TNF and IFN γ in cells from icKO mice, we assessed whether these 2 cytokines would be co-expressed. For Tconvs and ILCs, there was a marked increase of cells co-expressing TNF and IFN γ in icKO mice compared with controls (Fig S11). In Tregs, on the other hand, there was an increase in cells expressing TNF but not IFN γ , probably because of their intrinsic defect of producing this latter cytokine [45]. We then looked at the expression of Tbet as it plays a major role in IFN γ production [46]. Tbet expression was strongly increased in Tconvs and Tregs from the tumors compared with cells from draining lymph nodes (Fig S12A). There was a slight increased expression in cMaf and GATA3 in CD4⁺ Tconvs and Tregs from tumors compared with lymph nodes. Eomes and ROR γ t remain unchanged. Ablation of TNFR2 in Tregs had no impact on the expression of these transcription factors. Interestingly, the increased expression in TNF, IFN γ and IL-10 observed in Tregs and Tconvs only concerns the fraction of cells that expressed high levels of Tbet (Fig S12B). The phenotypic modifications of cells were restricted to the tumors since expression of lymphoid markers and cytokines in draining lymph nodes were similar in icKO and control mice (except minor differences for TCF1 and CD69 in Tregs) (Fig S13, S14). In conclusion, within a few days after TNFR2 ablation in Tregs, there was a sharp increased expression of TNF in Tregs and Tconvs, as well as of IFN γ in CD8⁺ Tconvs in the tumors. These increases only concern cells expressing high levels of Tbet.

TNFR2 ablation in Tregs promotes iNOS in tumor-infiltrating myeloid cells.

Because TNF and IFN γ can modify the function of myeloid cells that play a major role in tumoral immunity, we analyzed the impact of Treg-specific TNFR2 ablation on myeloid cells. Using markers to identify myeloid cell subsets (Fig S15A), we found that the proportion of neutrophils among CD45⁺ cells and their numbers per gram of tumors were increased in icKO mice compared to controls (Fig

S15B). The proportion and numbers of the other myeloid cell subsets were not or marginally modified. We also analyzed expression of iNOS and Ki67 that characterize the activation and function of myeloid cells. Expression of iNOS and Ki67 was significantly increased in macrophages, monocytes and a subset of myeloid cells that has been described in the literature as monocytes derived dendritic cells (moDC) [44] in icKO mice compared to controls (Fig 4A, B). Interestingly, in contrast to what was observed in lymphocytes, we did not find any increased expression of TNF or IFN γ in myeloid cells in icKO mice compared to controls (Fig 4C). Thus, TNFR2 ablation in Tregs led to a rapid increased expression of TNF and IFN γ by lymphoid cells and of myeloid cell activation.

Transcriptomic analyses reveal CD4⁺ T cell and myeloid cell activation in the tumors after TNFR2 ablation in Tregs.

To gain more insight into the mechanism of T and myeloid cell activation, we performed a scRNA-Seq analysis of CD45⁺CD4⁺ and CD45⁺CD4⁻ purified at day 15 from icKO and control mice, inoculated with MCA205 at day 0 and treated with tamoxifen at day 10. Ten and 12 clusters were characterized in CD45⁺CD4⁺ and CD45⁺CD4⁻, respectively (Fig 5A). We did not see major differences of the proportion of these different clusters between icKO and control mice, showing that TNFR2 ablation in Tregs did not lead to a significant increase or decrease of a cell subset (not shown). Among the CD45⁺CD4⁺ cells, the main clusters were characterized as Tregs, Th1 and early activated and among the CD45⁺CD4⁻ cells, the main clusters were characterized as CD8⁺ T cells, Macro MHCII⁺ and Pre-Macro/Mono (Fig 5A). Interestingly, we found that iNOS was upregulated in icKO compared to control mice in 4 clusters of myeloid cells (Macro MHCII⁺, Pre-Macro/Mono, Mono and Macro MHC Inos⁺), showing that increased expression of iNOS was observed at the mRNA level (not shown). In contrast, the increased expression of TNF and IFN γ in Tregs and CD8 T cells were not seen at the mRNA level (not shown).

Differential expression of these clusters showed that more genes were up- than down-regulated in icKO mice compared to controls in the Treg, Th1, early activated, Macro MHCII⁺ and Pre-Macro/Mono subsets, whereas more genes were down- than up-regulated in CD8⁺ T cells (Fig 5B, Fig S16). Over-representation (also known as gene ontology) analysis was performed on these clusters showing significant different results. Among the gene sets that were part of the cytokine and cytokine receptor, metabolic and major (MAPK, PI3K, NF κ B and TCR) signaling pathways, Treg, Th1 and early activated clusters had positive z-scores for most of them, suggesting that they were highly activated at the transcriptional level in icKO mice compared to controls (Fig 5C). The exact opposite was observed for CD8⁺ T cells. Interestingly, most of gene sets that had a positive z-score in these latter cells were part of the translation group, suggesting that CD8⁺ T cell activation may be downregulated at the transcriptional level but upregulated at the translational level. Concerning the Pre-Macro/Mono and

Macro MHCII populations, it seems that gene sets belonging to the cytokine and cytokine receptor signaling pathways were somewhat upregulated whereas the other gene sets were downregulated for most of them. To further understand the underlying mechanisms, we applied the “upstream regulator” algorithm of Ingenuity pathway analysis. To assess the major driving biological factors responsible for differential gene expression between ickO and control mice, we focused on the upstream regulators that had a z-score > 2 in at least 5 out of the 12 main clusters identified in the UMAP. Among all, TNF and RelA were the upstream regulator that came first with a z-score > 2 in 9 of the 12 cell clusters. NFkB (complex) came the fourth with a z-score > 2 in 7 of the 12 cell clusters (Fig 5D). These data suggest that TNF and its downstream NFkB signaling pathway play a major role in activating CD4+ T cells and myeloid cells, with the notable exception of CD8+ T cells (Fig 5D). Other upstream regulators seem to have a positive impact on myeloid cells by acting on cell metabolism and major signaling pathways (MAPK1, HIF1a, NPM1, ECSIT or LARP1) or by stimulating myeloid cells (ETV and TREM1). Other cytokines and signaling pathways triggered by cytokines (IL1, STAT3) were upstream regulators with positive impact on Tregs and myeloid cells. In conclusion, transcriptomic analyses suggest that the TNF/TNFR/NFkB axis play a major role in activating CD4+ T cells and myeloid cells infiltrating the tumor after TNFR2 ablation in Tregs. These latter cells may be activated by additional pathways involving IL-1, STAT3, MAPK and cellular metabolism leading to increased expression of iNOS at the mRNA level. The increased expression of TNF and IFNg in CD8+ T cells from ickO mice compared to controls cannot be explained by this transcriptomic analysis, except an upregulation of translation.

DISCUSSION

TNF is a pleiotropic cytokine with both inflammatory and regulatory features, essentially due to TNFR1 and TNFR2 triggering, respectively. Several mechanisms have been proposed to explain the immunoregulatory component of the TNF/TNFR2 axis. One of these is that TNF can stimulate Tregs via TNFR2. In this work, we demonstrate for the first time a non-redundant effect of TNF that directly and very rapidly increased the suppressive action of Tregs in a tumoral context. Only a few days after TNFR2 ablation in Tregs, we observed a decrease in tumor growth. This was associated with two major phenomena: firstly, a change in the proportion of certain myeloid cells (more neutrophils and fewer macrophages) and increased levels of iNOS and Ki67; and secondly, an increase in TNF and IFN γ produced by Tregs, Tconv and, to a lesser extent, ILCs. There was also an increase in IL-10 and IL-5/13, but levels remained low.

The fact that TNFR2 ablation on Tregs has a more visible impact on myeloid than lymphoid cells may suggest a mechanism involving cytokines that may impact myeloid cells. How can we explain the underlying mechanisms? The fact that TNFR2 ablation in Tregs had an impact on different types of tumor-infiltrating cells in just a few days suggests an indirect effect. Among the many mechanisms of action of Tregs, it has been shown in vitro that Tregs are able to limit the activity of TNF by the shedding of soluble TNFR2 [47]. In this way, Tregs could deprive other cells of TNF in the same way as IL-2, a major and well-described mechanism of Treg-mediated suppression [48]. By deleting TNFR2 expression in Tregs, we may then no longer have TNF neutralization in the tumor microenvironment, leading to an excess of TNF, which could rapidly have a bystander effect on many cells. We are currently analyzing scRNASeq data to determine if we have an impact on pathways involved in TNF signaling.

To test this hypothesis, we will investigate whether TNF neutralization in tamoxifen-treated icKO mice abolishes the effects of TNFR2 ablation in Tregs in terms of tumor growth or effect on myeloid cells and cytokine production.

To be continued based on the data we will generate by analyzing the scRNAseq and the effect of blocking TNF in icKO mice.

REFERENCES

- [1] E. A. Carswell, L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, et B. Williamson, « An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, n° 9, p. 3666-3670, sept. 1975, doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
- [2] G. Sethi, B. Sung, A. B. Kunnumakkara, et B. B. Aggarwal, « Targeting TNF for Treatment of Cancer and Autoimmunity », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 647, p. 37-51, 2009, doi: 10.1007/978-0-387-89520-8_3.
- [3] Y. Sheng, F. Li, et Z. Qin, « TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors », *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 1170, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01170.
- [4] M. Li, X. Zhang, X. Bai, et T. Liang, « Targeting TNFR2: A Novel Breakthrough in the Treatment of Cancer », *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 862154, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.862154.
- [5] É. S. Vanamee et D. L. Faustman, « TNFR2: A Novel Target for Cancer Immunotherapy », *Trends Mol. Med.*, vol. 23, n° 11, p. 1037-1046, nov. 2017, doi: 10.1016/j.molmed.2017.09.007.
- [6] P. Szlosarek, K. A. Charles, et F. R. Balkwill, « Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 42, n° 6, p. 745-750, avr. 2006, doi: 10.1016/j.ejca.2006.01.012.
- [7] F. Balkwill, « Tumour necrosis factor and cancer », *Nat Rev Cancer*, vol. 9, n° 5, Art. n° 5, mai 2009, doi: 10.1038/nrc2628.
- [8] B. Yan *et al.*, « Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 24, p. 11565-11570, déc. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2540.
- [9] B. Li, A. Vincent, J. Cates, D. M. Brantley-Sieders, D. B. Polk, et P. P. Young, « Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site », *Cancer Res.*, vol. 69, n° 1, p. 338-348, janv. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1565.
- [10] B. K. Popivanova *et al.*, « Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis », *J. Clin. Invest.*, vol. 118, n° 2, p. 560-570, févr. 2008, doi: 10.1172/JCI32453.
- [11] H. Kulbe *et al.*, « A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment », *Cancer Res.*, vol. 72, n° 1, p. 66-75, janv. 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2178.
- [12] K. A. Charles *et al.*, « The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans », *J. Clin. Invest.*, vol. 119, n° 10, p. 3011-3023, oct. 2009, doi: 10.1172/JCI39065.
- [13] R. J. Moore *et al.*, « Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis », *Nat. Med.*, vol. 5, n° 7, p. 828-831, juill. 1999, doi: 10.1038/10552.
- [14] E. Perez-Ruiz *et al.*, « Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy », *Nature*, vol. 569, n° 7756, p. 428-432, mai 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1162-y.
- [15] F. Bertrand *et al.*, « TNF α blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma », *Nat. Commun.*, vol. 8, n° 1, p. 2256, déc. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-02358-7.
- [16] E. Y. Kim, S. J. Teh, J. Yang, M. T. Chow, et H. S. Teh, « TNFR2-deficient memory CD8 T cells provide superior protection against tumor cell growth », *J Immunol*, vol. 183, n° 10, Art. n° 10, nov. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0803482.
- [17] H. Ba *et al.*, « Transmembrane tumor necrosis factor- α promotes the recruitment of MDSCs to tumor tissue by upregulating CXCR4 expression via TNFR2 », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 44, p. 143-152, mars 2017, doi: 10.1016/j.intimp.2016.12.028.
- [18] X. Zhao *et al.*, « TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation », *J Clin Invest*, vol. 122, n° 11, Art. n° 11, nov. 2012, doi: 10.1172/JCI64115.
- [19] X. Hu *et al.*, « Transmembrane TNF-alpha promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2 », *J Immunol*, vol. 192, n° 3, Art. n° 3, févr. 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1203195.

- [20] B. Ham *et al.*, « TNF Receptor-2 Facilitates an Immunosuppressive Microenvironment in the Liver to Promote the Colonization and Growth of Hepatic Metastases », *Cancer Res*, vol. 75, n° 24, Art. n° 24, déc. 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3173.
- [21] M. Chopra *et al.*, « Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis », *Carcinogenesis*, vol. 34, n° 6, p. 1296-1303, juin 2013, doi: 10.1093/carcin/bgt038.
- [22] L. Y. Chang *et al.*, « Blockade of TNF-alpha signaling benefits cancer therapy by suppressing effector regulatory T cell expansion », *Oncoimmunology*, vol. 4, n° 10, Art. n° 10, oct. 2015, doi: 10.1080/2162402X.2015.1040215.
- [23] B. L. Salomon, M. Leclerc, J. Tosello, E. Ronin, E. Piaggio, et J. L. Cohen, « Tumor Necrosis Factor alpha and Regulatory T Cells in Oncoimmunology », *Front Immunol*, vol. 9, p. 444, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00444.
- [24] M. Jiang *et al.*, « A TNFR2 antibody by countering immunosuppression cooperates with HMG1 and R848 immune stimulants to inhibit murine colon cancer », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 101, n° Pt A, p. 108345, déc. 2021, doi: 10.1016/j.intimp.2021.108345.
- [25] K. Case, L. Tran, M. Yang, H. Zheng, W. M. Kuhlreiber, et D. L. Faustman, « TNFR2 blockade alone or in combination with PD-1 blockade shows therapeutic efficacy in murine cancer models », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 107, n° 6, p. 981-991, juin 2020, doi: 10.1002/JLB.5MA0420-375RRRRR.
- [26] Y. Nie *et al.*, « Blockade of TNFR2 signaling enhances the immunotherapeutic effect of CpG ODN in a mouse model of colon cancer », *Sci Signal*, vol. 11, n° 511, Art. n° 511, janv. 2018, doi: 10.1126/scisignal.aan0790.
- [27] X. He, S. Landman, S. C. Bauland, J. van den Dolder, H. J. Koenen, et I. Joosten, « A TNFR2-Agonist Facilitates High Purity Expansion of Human Low Purity Treg Cells », *PLoS One*, vol. 11, n° 5, Art. n° 5, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0156311.
- [28] D. X. Nguyen et M. R. Ehrenstein, « Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis », *J Exp Med*, vol. 213, n° 7, Art. n° 7, juin 2016, doi: 10.1084/jem.20151255.
- [29] B. Zaragoza *et al.*, « Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF », *Nat Med*, vol. 22, n° 1, Art. n° 1, janv. 2016, doi: 10.1038/nm.4019.
- [30] H. Torrey *et al.*, « Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs », *Sci Signal*, vol. 10, n° 462, Art. n° 462, janv. 2017, doi: 10.1126/scisignal.aaf8608.
- [31] P. C. M. Urbano, H. Koenen, I. Joosten, et X. He, « An Autocrine TNFalpha-Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Loop Promotes Epigenetic Effects Inducing Human Treg Stability In Vitro », *Front Immunol*, vol. 9, p. 573, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00573.
- [32] N. Skartsis *et al.*, « IL-6 and TNF α Drive Extensive Proliferation of Human Tregs Without Compromising Their Lineage Stability or Function », *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 783282, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.783282.
- [33] J. He, R. Li, Y. Chen, Y. Hu, et X. Chen, « TNFR2-expressing CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer immunology and immunotherapy », *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 164, p. 101-117, 2019, doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.03.010.
- [34] F. Yan *et al.*, « Expression of TNFR2 by regulatory T cells in peripheral blood is correlated with clinical pathology of lung cancer patients », *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 64, n° 11, p. 1475-1485, nov. 2015, doi: 10.1007/s00262-015-1751-z.
- [35] C. Govindaraj *et al.*, « Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2⁺ Tregs within the tumor microenvironment », *Clin. Immunol. Orlando Fla*, vol. 149, n° 1, p. 97-110, oct. 2013, doi: 10.1016/j.clim.2013.07.003.
- [36] D. J. Propper et F. R. Balkwill, « Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy », *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 19, n° 4, p. 237-253, avr. 2022, doi: 10.1038/s41571-021-00588-9.
- [37] B. L. Salomon, « Insights into the biology and therapeutic implications of TNF and regulatory T cells », *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 17, n° 8, Art. n° 8, août 2021, doi: 10.1038/s41584-021-00639-6.

- [38] M. Lubrano di Ricco *et al.*, « Tumor necrosis factor receptor family costimulation increases regulatory T-cell activation and function via NF-kappaB », *Eur J Immunol*, vol. 50, p. 972-985., févr. 2020, doi: 10.1002/eji.201948393.
- [39] E. Ronin *et al.*, « Tissue-restricted control of established central nervous system autoimmunity by TNF receptor 2-expressing Treg cells », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, n° 13, Art. n° 13, mars 2021, doi: 10.1073/pnas.2014043118.
- [40] R. Nalio Ramos *et al.*, « Tissue-resident FOLR2+ macrophages associate with CD8+ T cell infiltration in human breast cancer », *Cell*, vol. 185, n° 7, p. 1189-1207.e25, mars 2022, doi: 10.1016/j.cell.2022.02.021.
- [41] G. S. Williams *et al.*, « Phenotypic screening reveals TNFR2 as a promising target for cancer immunotherapy », *Oncotarget*, vol. 7, n° 42, Art. n° 42, oct. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11943.
- [42] X. Zhang *et al.*, « Combination cancer immunotherapy targeting TNFR2 and PD-1/PD-L1 signaling reduces immunosuppressive effects in the microenvironment of pancreatic tumors », *J. Immunother. Cancer*, vol. 10, n° 3, p. e003982, mars 2022, doi: 10.1136/jitc-2021-003982.
- [43] B. Parang, C. W. Barrett, et C. S. Williams, « AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1422, p. 297-307, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-3603-8_26.
- [44] S. Menezes *et al.*, « The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS+ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells », *Immunity*, vol. 45, n° 6, p. 1205-1218, déc. 2016, doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.001.
- [45] M. A. Koch, K. R. Thomas, N. R. Perdue, K. S. Smigiel, S. Srivastava, et D. J. Campbell, « T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor $\beta 2$ », *Immunity*, vol. 37, n° 3, p. 501-510, sept. 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.031.
- [46] S. A. Miller et A. S. Weinmann, « Molecular mechanisms by which T-bet regulates T-helper cell commitment », *Immunol. Rev.*, vol. 238, n° 1, p. 233-246, nov. 2010, doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00952.x.
- [47] G. J. D. van Mierlo *et al.*, « Cutting Edge: TNFR-Shedding by CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Inhibits the Induction of Inflammatory Mediators », *J. Immunol.*, vol. 180, n° 5, p. 2747-2751, mars 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.5.2747.
- [48] P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, et M. J. Lenardo, « CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells », *Nat. Immunol.*, vol. 8, n° 12, p. 1353-1362, déc. 2007, doi: 10.1038/ni1536.

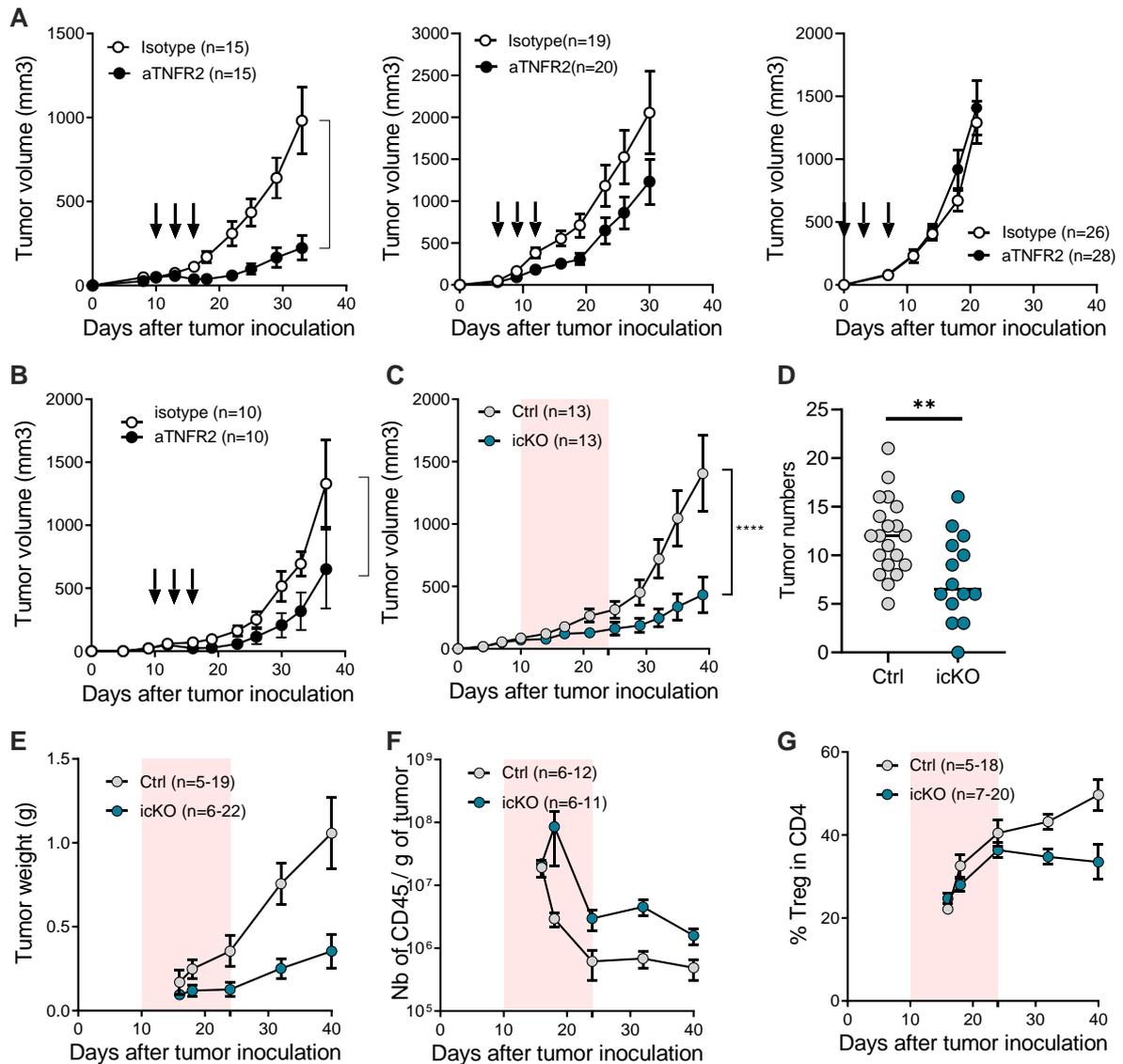


Figure 1. TNFR2 expression by Tregs control tumor immunity. MCA205 (A) and MC38 (B) tumor cells were inoculated at day 0 in wild type mice that were treated with anti-TNFR2 (aTNFR2) or isotype control mAb at days 10, 13, 16 (A, left panel and B), days 6, 9, 12 (A, middle panel) or days 0, 3, 7 (A, right panel). (C) Tumor growth in icKO and control (Ctrl) mice, inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen from day 10 to day 24. (D) Number of colon tumors in icKO and Ctrl mice treated with AOM/DSS and tamoxifen after the third round of DSS. (E-G) icKO and Ctrl mice, inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen from day 10 to day 24 were analyzed at different times to measure tumor mass (E), numbers of infiltrating CD45⁺ / gram of tumor (F) and Tregs proportion in tumors (G). Data were pooled from at least 4 independent experiments.

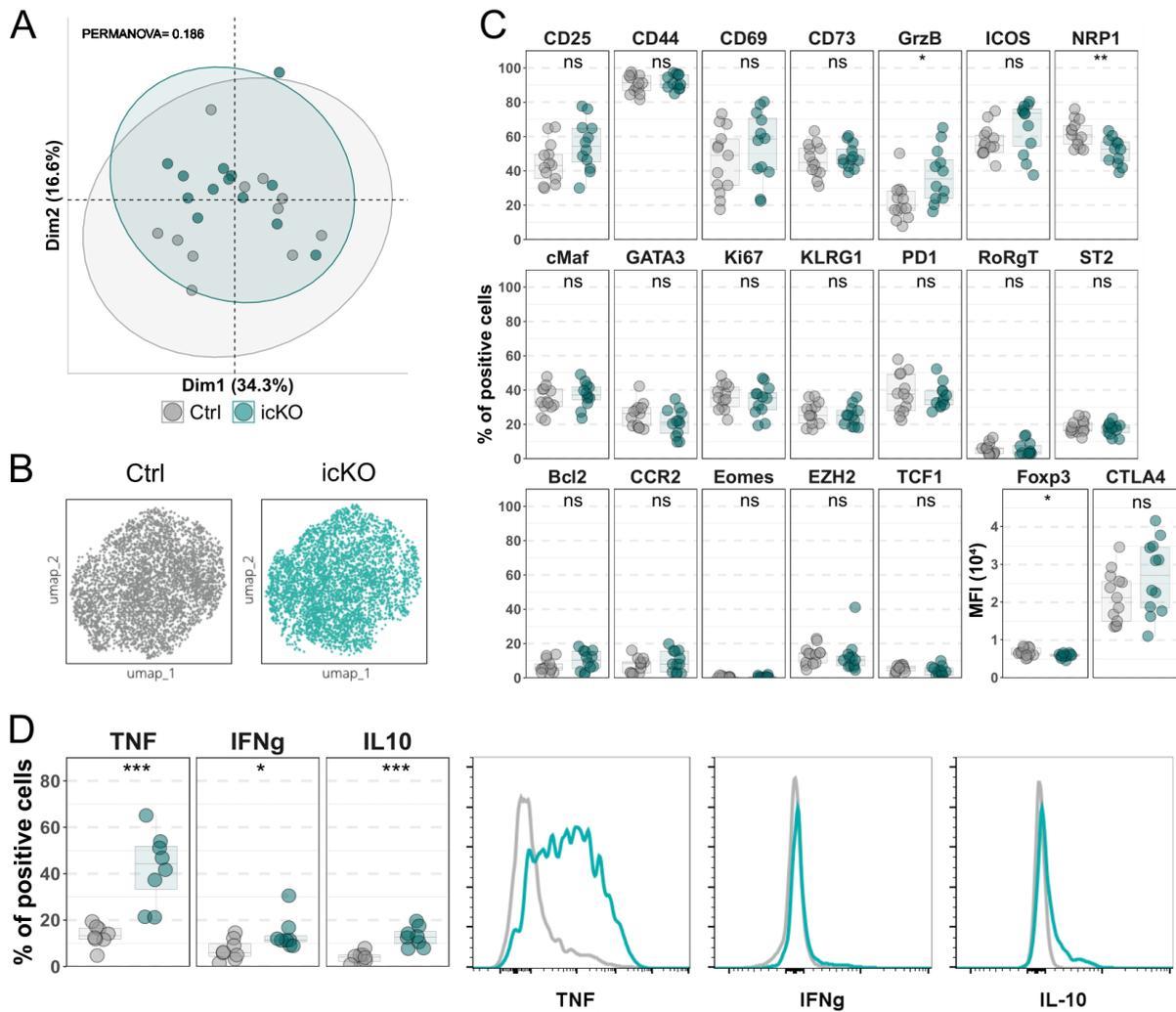


Figure 2. Impact of TNFR2 ablation in Tregs on the phenotype of tumor-infiltrating Tregs. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Principal component analysis (PCA) showing the clusters (A), uniform manifold approximation and projection (UMAP) (B), and proportion and MFI of the indicated markers of tumor-infiltrating Tregs. (C) Proportion of cytokine (left) and representative histogram (right) among tumor-infiltrating Tregs after PMA/ionomycin stimulation. Each circle represents one mouse. 8 to 13 mice were analyzed per group, pooled from 3 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

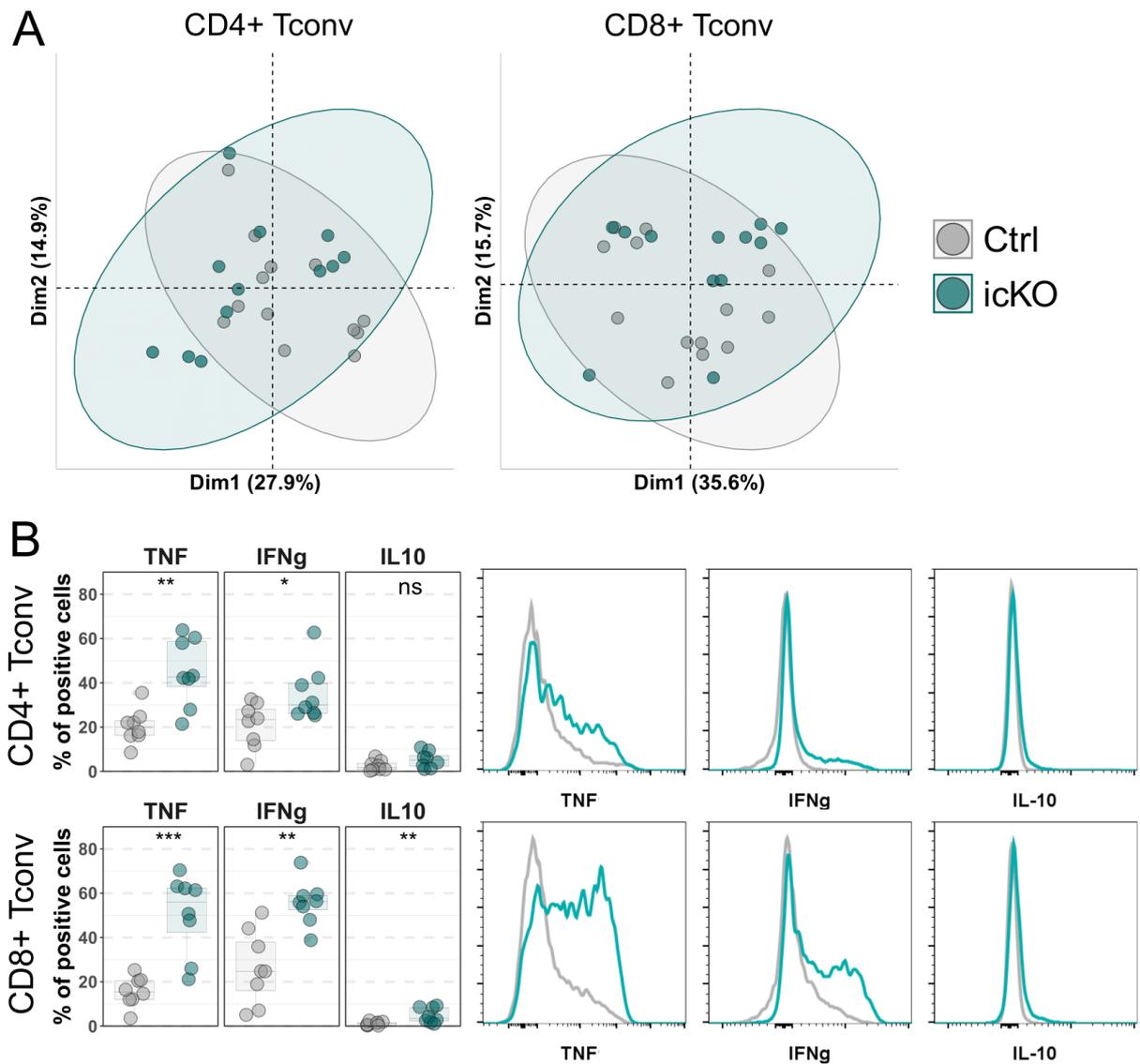


Figure 3. Impact of TNFR2 ablation in Tregs on tumor-infiltrating Tconvs. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. (A) Principal component analysis (PCA) showing the clusters of tumor-infiltrating CD4+ and CD8+ Tconvs. (C) Proportion of cytokine (left) and representative histogram (right) among tumor-infiltrating CD4+ and CD8+ Tconvs after PMA/ionomycin stimulation. Each circle represents one mouse. 8 to 13 mice were analyzed per group, pooled from 3 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

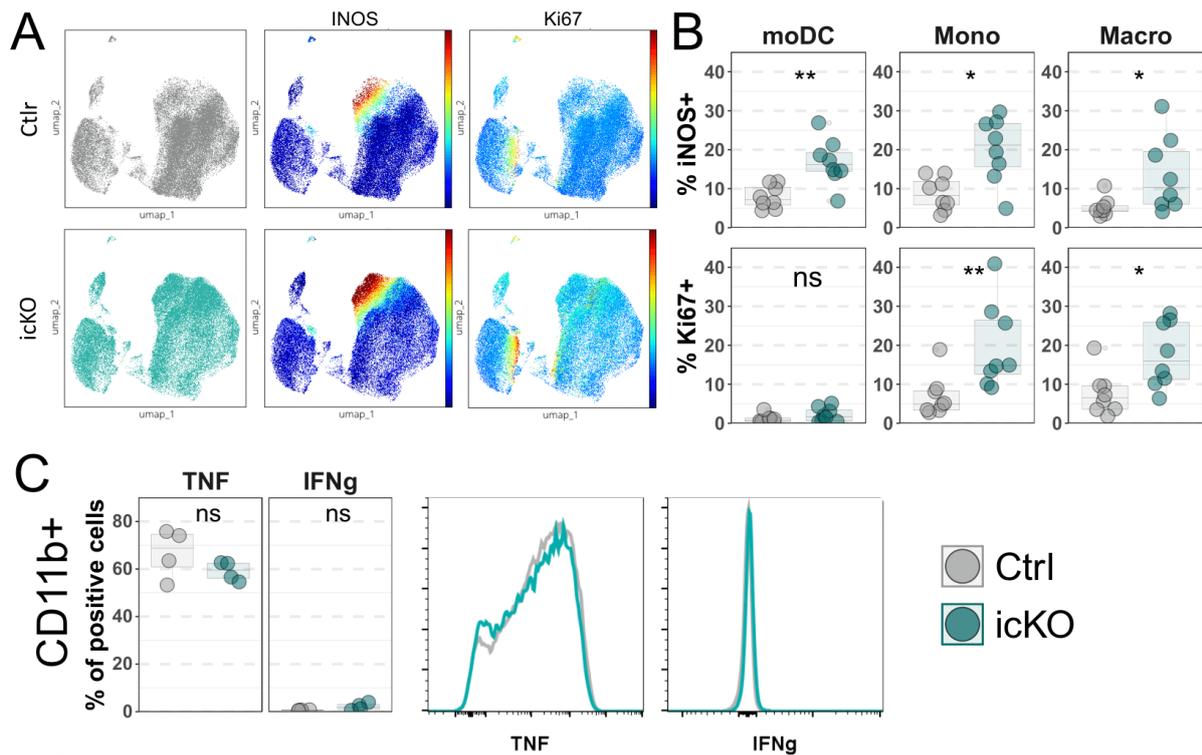


Figure 4. Impact of TNFR2 ablation in Tregs on tumor-infiltrating myeloid cells. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. (A) Uniform manifold approximation and projection (UMAP) representing the CD45+CD3- compartment infiltrating the tumors (left) and projection of the expression of iNOS and Ki67 (right). (B) Proportion of iNOS and Ki67 among monocytes derived dendritic cells (moDC), monocytes (Mono) and macrophages (Macro) infiltrating the tumors. (C) Proportion of cytokine (left) and representative histogram (right) among tumor-infiltrating CD11b+ cells after PMA/ionomycin stimulation. Each circle represents one mouse. 4 to 8 mice were analyzed per group, pooled from 2 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

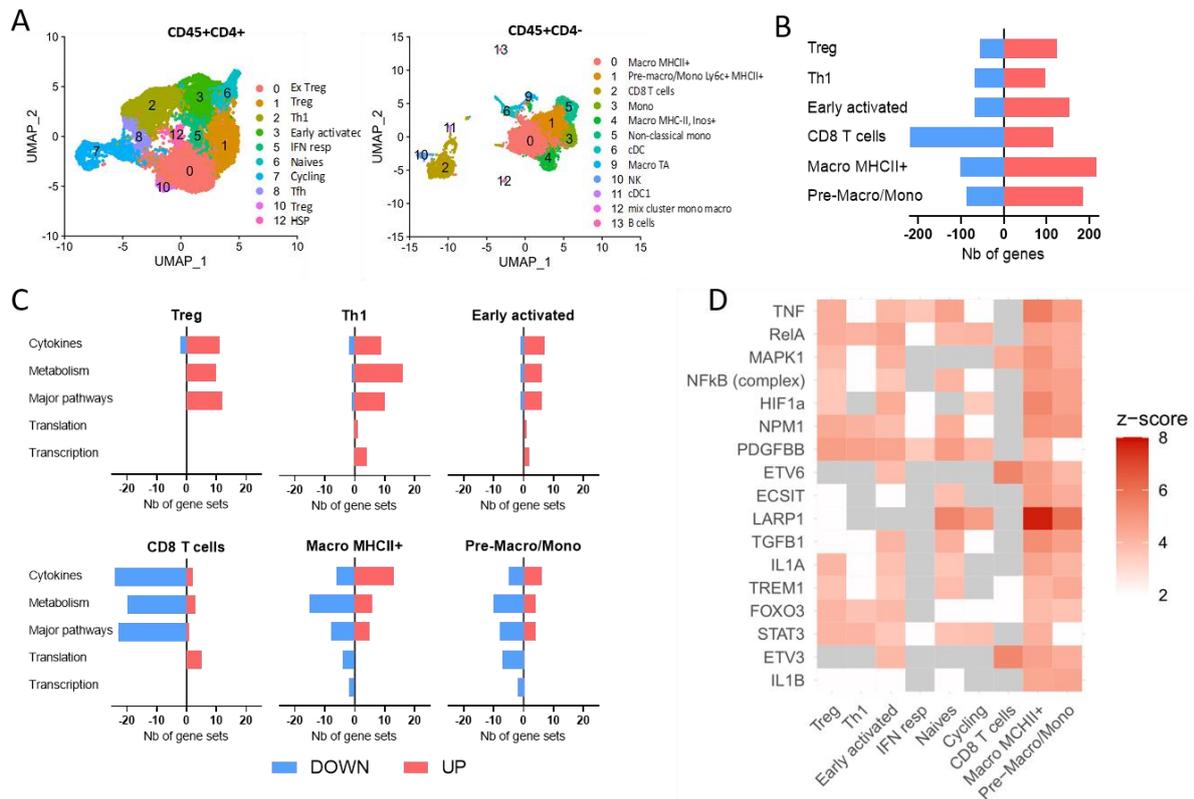


Figure 5. TNFR2 ablation in Tregs leads to activation of tumor-infiltrating CD4+ T cells and myeloid cells, inferred from transcriptomic analyses. We performed scRNA-Seq analyses on CD4+CD45+ or CD4-CD45+ cells, purified at day 15 from icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. (A) UMAP representations of the CD4+CD45+ or CD4-CD45+ cells showing the major different clusters. (B) The histogram represents the number of differentially expressed genes between icKO and Ctrl mice among the main clusters identified on the UMAP. The UP and DOWN regulated genes in icKO vs Ctrl mice are represented respectively in red and blue. (C) Ingenuity pathway analysis (IPA) software was used to analyze the major gene sets that were enriched in icKO vs Ctrl mice on the main clusters. The histograms show the number of genes sets that were identified with a positive (UP in icKO mice) or negative (DOWN in icKO mice) z-score among cytokine or cytokine receptor signaling pathways (Cytokines), metabolic pathways (Metabolism), MAPK, PI3K, NFkB, TCR signalings (Major pathways), translation pathways (Translation) and transcription pathways (Transcription). (D) The upstream regulator algorithm of IPA was used to identify upstream regulators impacting the genes differentially expressed between icKO and Ctrl mice. We selected the upstream regulators that had a z-score > 2 in at least 5 out of the 12 main clusters (clusters 1, 2, 3, 5, 6 and 7 of the CD4+CD45+ cells and clusters 0, 1, 2, 3, 4 and 5 of the CD4-CD45+ cells). The heatmap shows the z-score of these upstream regulators in various CD4+ T cells (Treg, Th1, early activated, IFN responding cells, naïve and cycling), CD8+ cells and MHC-II+ macrophages and pre-macro/mono. Squares in grey represent upstream regulators with p value of overlap > 0.05.

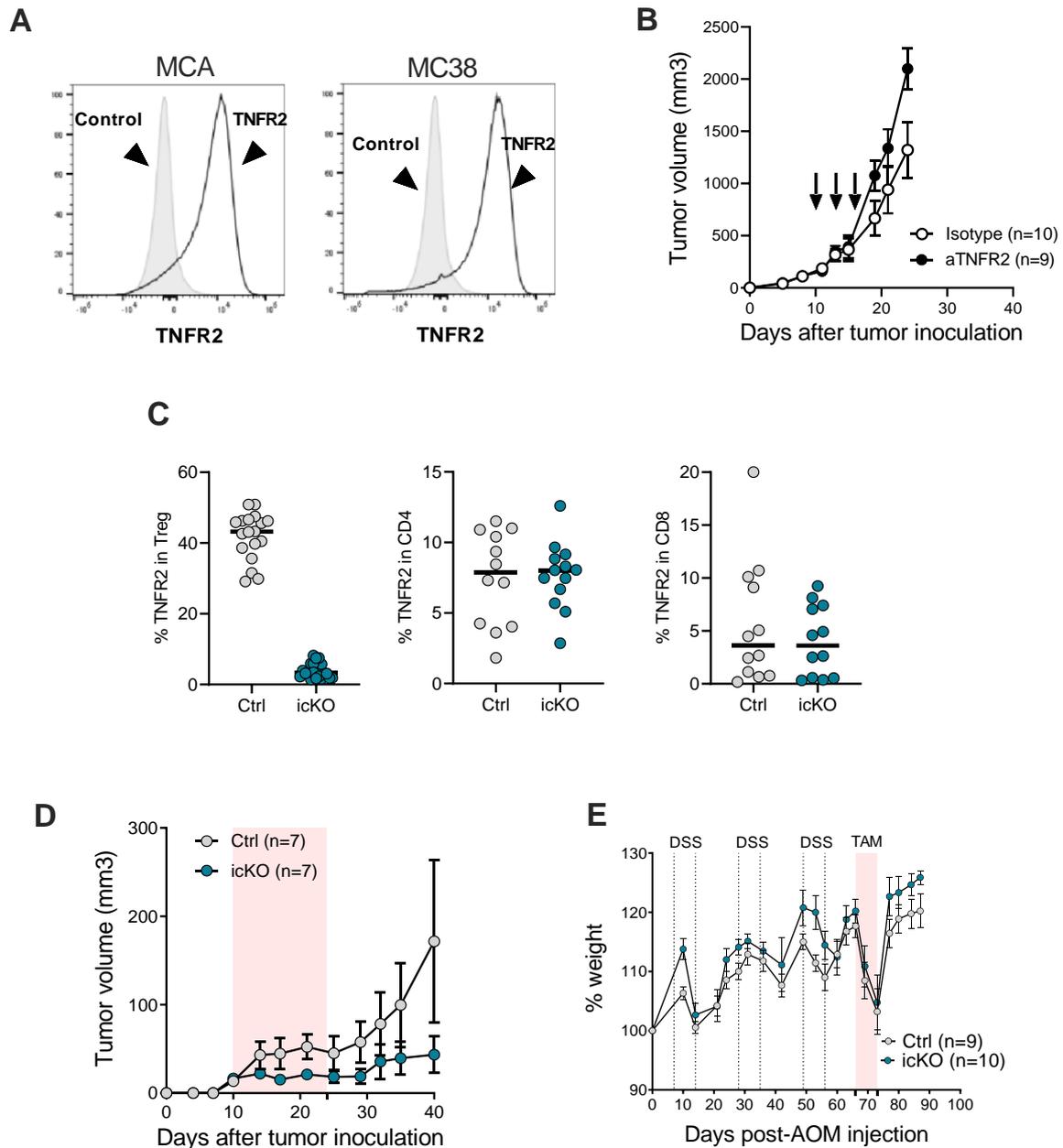


Figure S1. Role of TNFR2 in tumor immunity. (A) Representative TNFR2 expression in MCA205 and MC38 tumor cells. Control is the staining with an isotypic control mAb. (B) Tumor growth in RAG2 KO mice treated with anti-TNFR2 (aTNFR2) or isotype control mAb at days 10, 13, 16. Data obtained from 2 independent experiments. (C) Proportion of Tregs, CD4+ Tconvs and CD8+ Tconvs expressing TNFR2 in icKO and control (Ctrl) mice treated with tamoxifen. (D) Tumor growth in icKO and Ctrl mice, inoculated at day 0 with MC38 tumor cells and treated with tamoxifen from day 10 to day 24. (E) Percentage of the weight of mice compared to day 0 (AOM injection) in icKO and Ctrl mice treated with three rounds of DSS and tamoxifen after the third round of DSS.

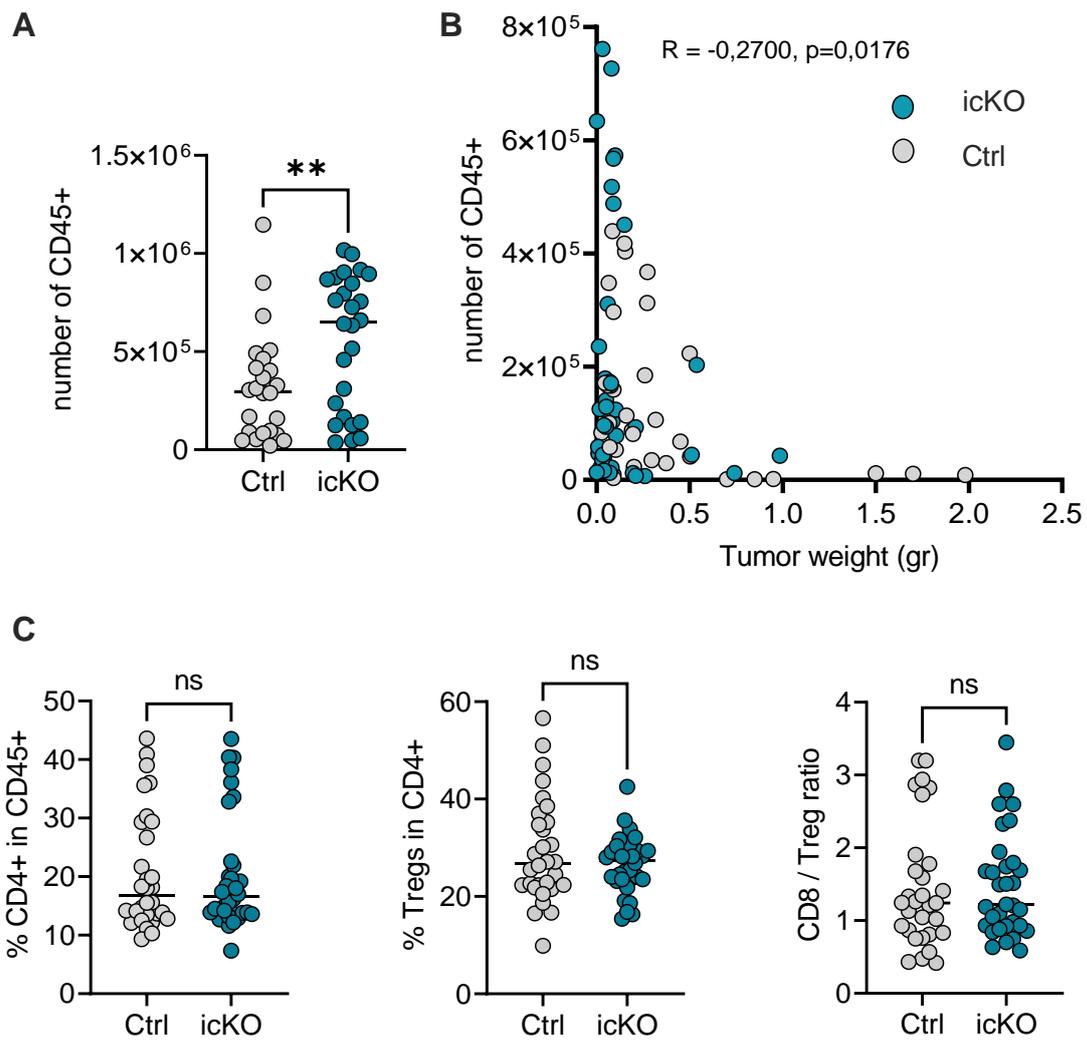


Figure S2. Late impact of TNFR2 ablation in Tregs on tumor infiltration. Cell numbers and proportion of tumor-infiltrating cells at day 18 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen from day 10 to 18. (A) Numbers of CD45+ cells. (B) Correlation between numbers of CD45+ cells and tumor mass. (C) % of CD4+ among CD45+ cells (left panel), % of Tregs among CD4+ cells (middle panel) and CD8/Treg ratio (right panel). Each circle represents one mouse. Data were pooled from at least 5 independent experiments.

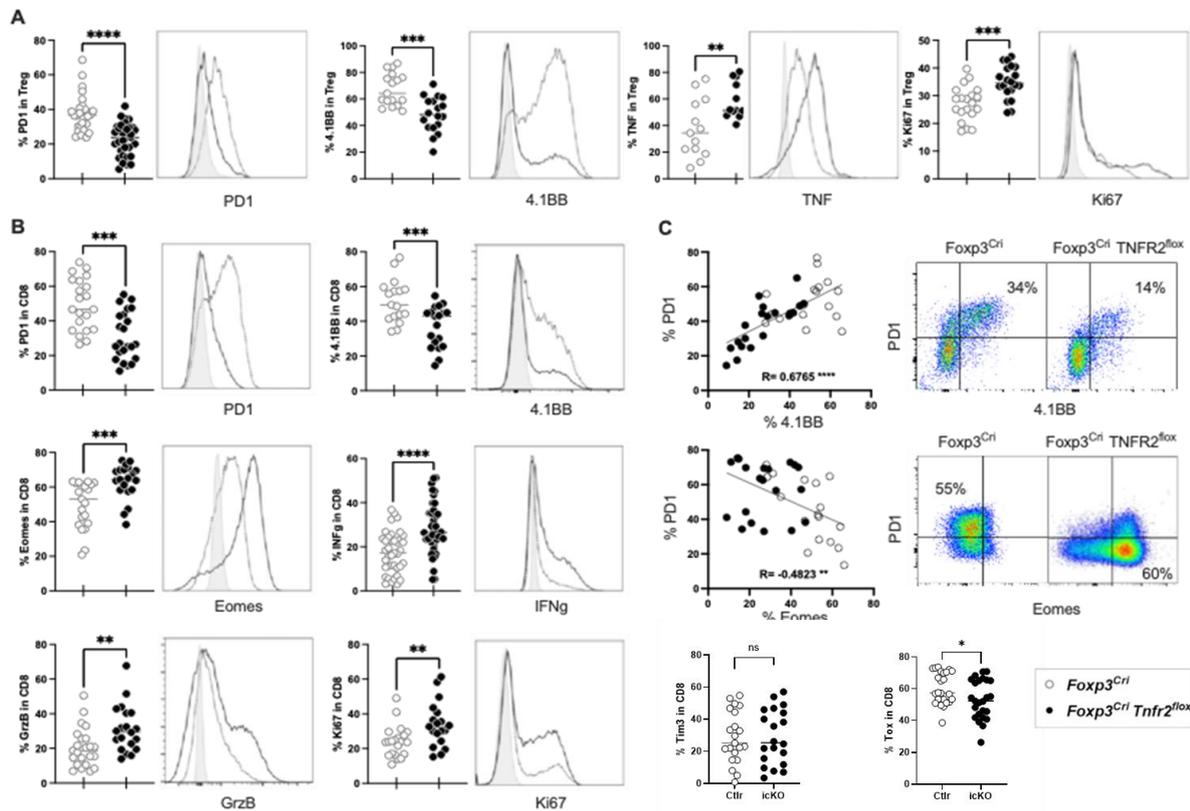


Figure S3. Late impact of TNFR2 ablation in Tregs on the phenotype of tumor-infiltrating Tregs and CD8 Tconvs. Phenotype of tumor-infiltrating Tregs and CD8+ Tconvs at day 18 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen from day 10 to 18. (A) Expression of PD1, 4-1BB, TNF and Ki67 in Tregs. (B) Expression of PD1, 4-1BB, Eomes, IFNg, granzyme B (GrzB), Ki67, Tim3 and Tox in CD8+ Tconvs. Histograms show representative expressions with control staining (shaded), staining in icKO mice (grey lines) and Ctrl mice (back lines). (C) Correlative expression between 4-1BB and PD1 and between Eomes and PD1 in CD8+ Tconvs. The density plots show representative expressions. Each circle represents one mouse. Data were pooled from at least 5 independent experiments.

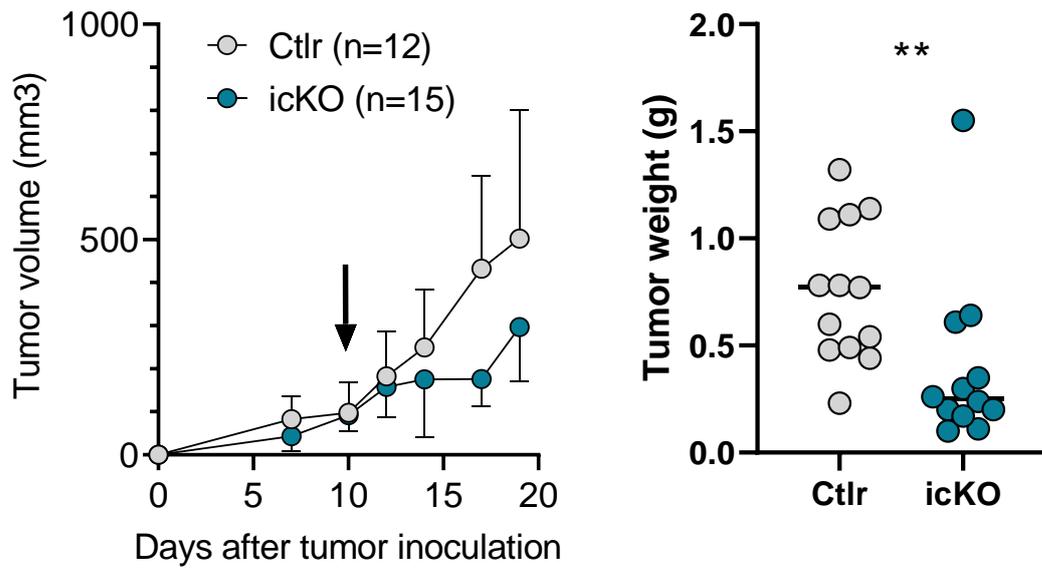


Figure S4. TNFR2 ablation in Tregs has a rapid impact on tumor growth. Tumor growth (left) and tumor mass at day 15 (right) in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10.

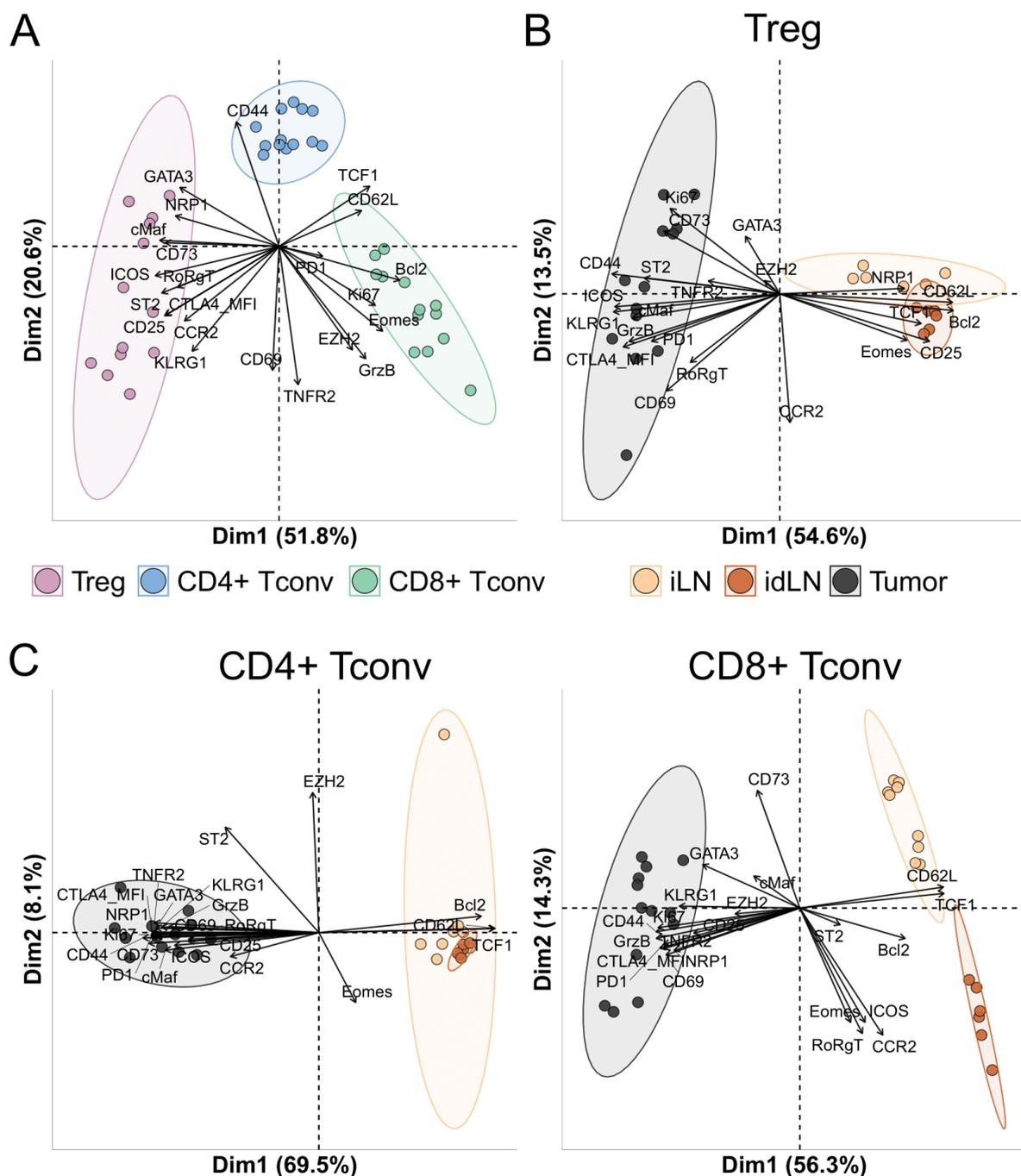


Figure S5. Markers discriminating the tumor-infiltrating lymphocytes populations. Flow cytometry analyses at day 15 in control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10 (except for the inguinal lymph nodes (iLNs) in B and C). (A) Principal component analysis (PCA) showing the clusters of tumor-infiltrating Tregs, CD4+ and CD8+ Tconvs in Ctrl mice. PCA showing the clusters of Tregs (B), CD4+ and CD8+ Tconvs (C) in iLNs at steady state, LNs draining the tumors (idLNs) and the tumors.

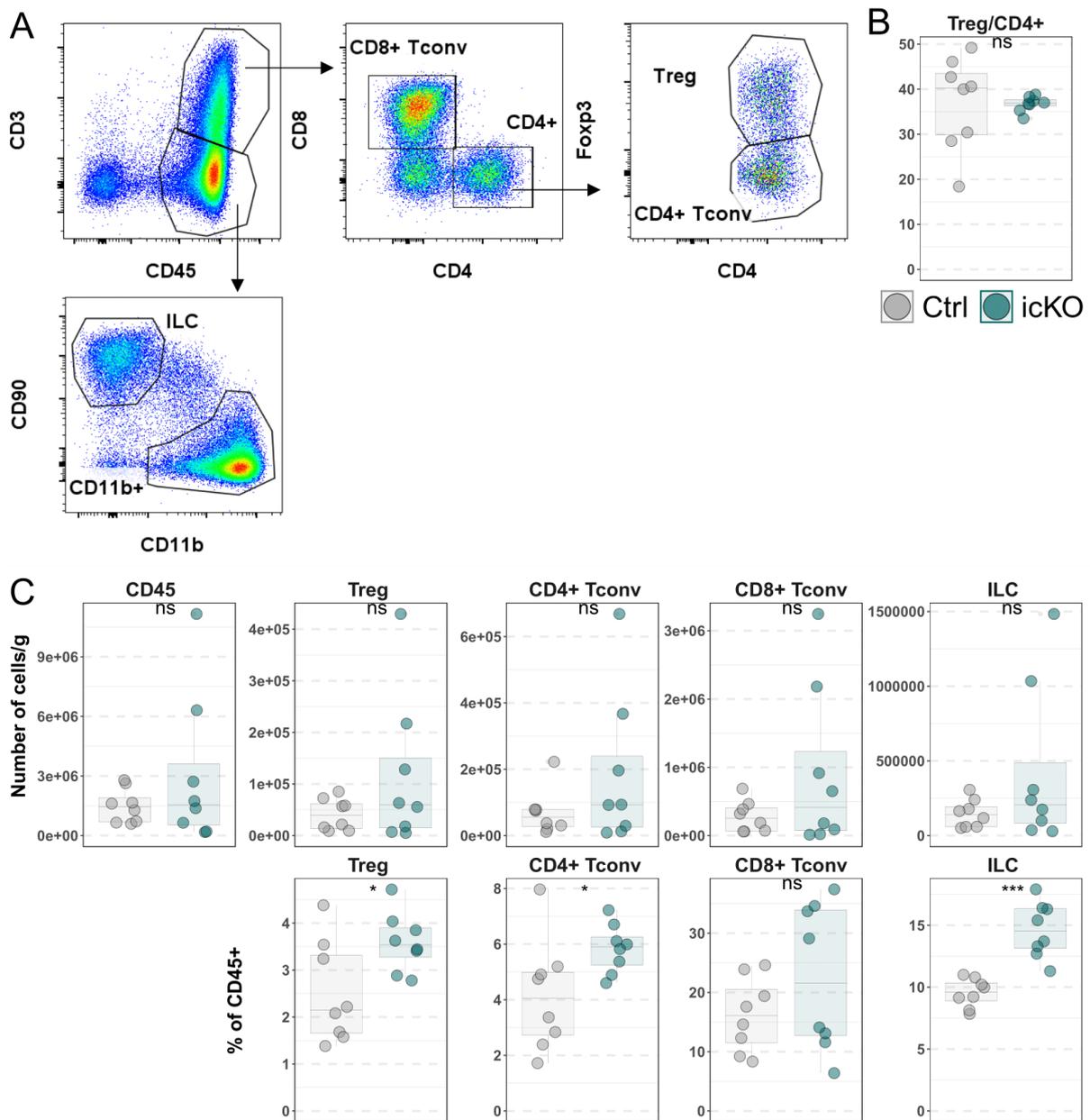


Figure S6. Impact of TNFR2 ablation on the proportion and numbers of tumor-infiltrating lymphocytes. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. (A) Gating strategy used to analyze Treg, CD4+ Tconvs, CD8+ Tconvs and innate lymphoid cells (ILC). (B) Proportion of Treg among CD4+ T cells. (C) Number per grams of tumor and proportion among CD45+ cells and of the indicated populations. Each circle represents one mouse. 4 to 8 mice were analyzed per group. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

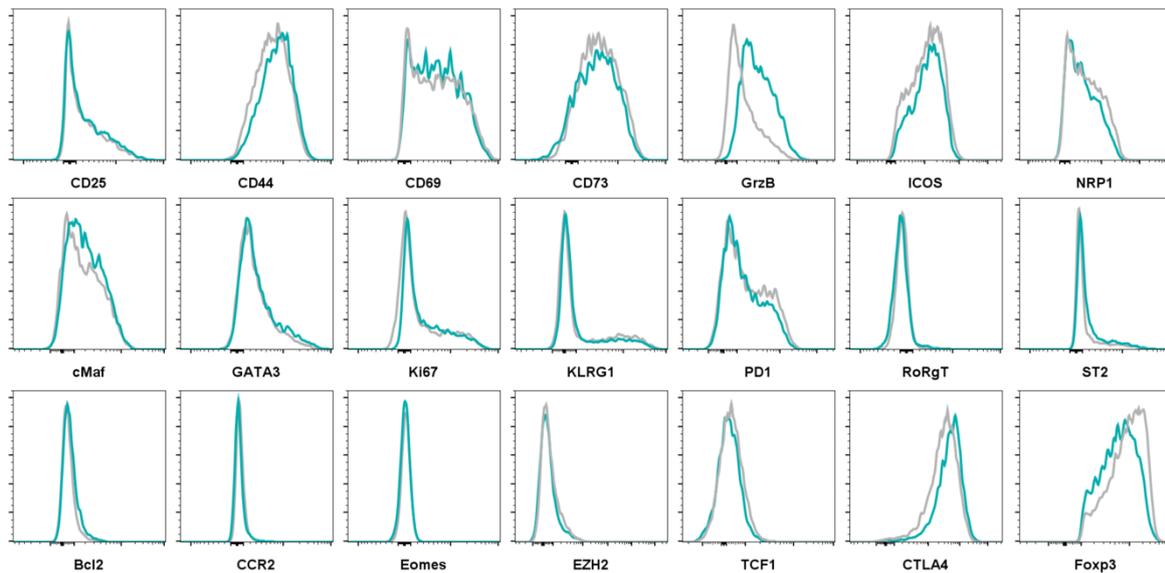


Figure S7. Representative histograms of markers expressed by tumor-infiltrating Tregs. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Representative histograms from control (gray) or icKO (bleu) mice.

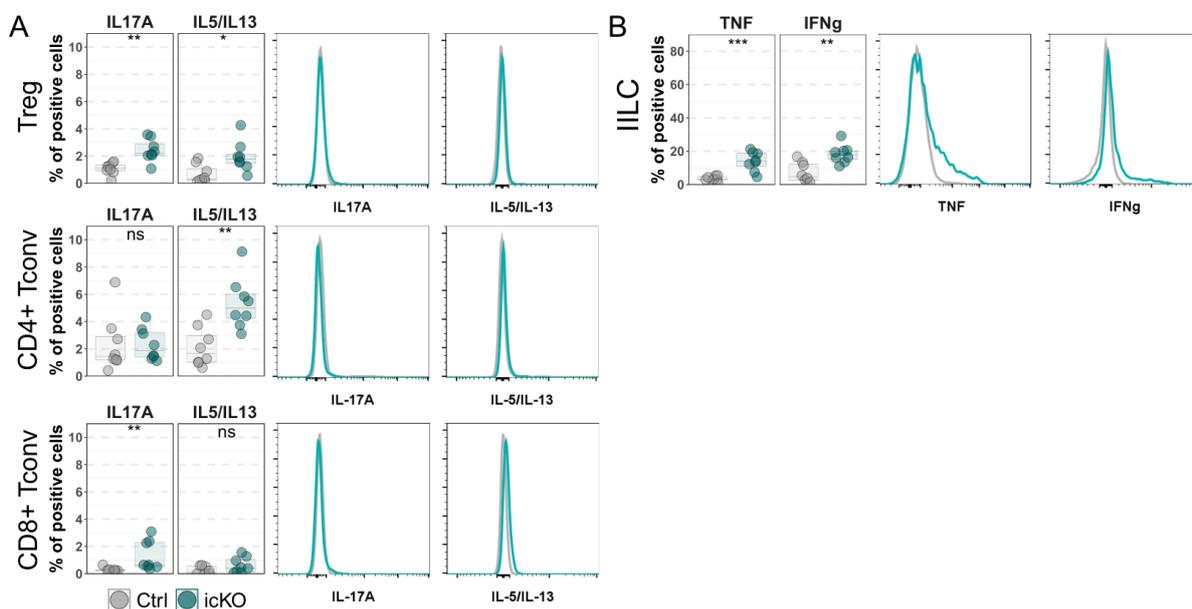


Figure S8. Impact of TNFR2 ablation on cytokine production by tumor-infiltrating cells. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Proportion of cytokine (left panels) and representative histogram (right panels) among Tregs CD4+ and CD8+ Tconvs (A) or innate lymphoid cells (ILC) (B). Each circle represents one mouse. 8 mice were analyzed per group from 2 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

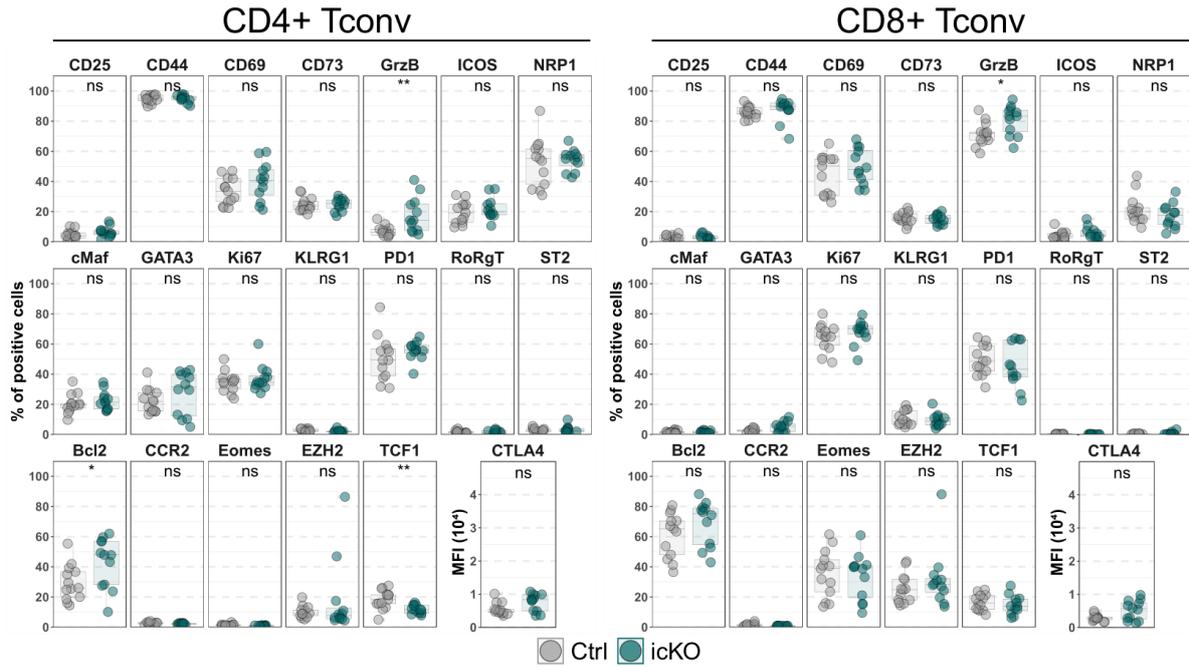


Figure S9. TNFR2 ablation in Tregs does not impact the phenotype of tumor-infiltrating Tconv. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Proportion of the indicated markers among CD4+ Tconv (left panels) or CD8+ Tconv (right panel). Each circle represents one mouse. 12 to 13 mice were analyzed per group from 3 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

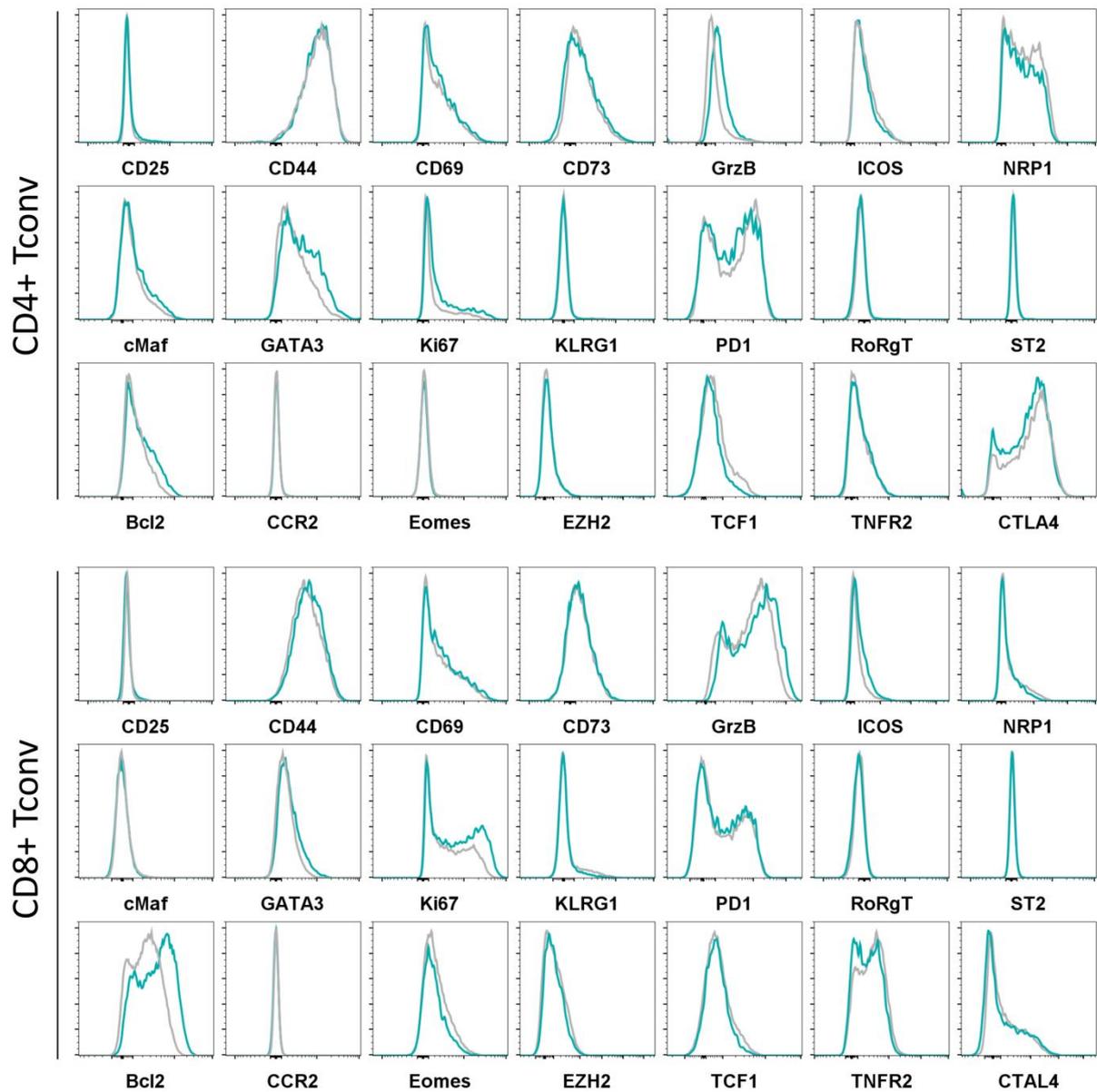


Figure S10. Representative histograms of markers expressed by Tconvs infiltrating the tumor. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Representative histograms of the indicated markers among CD4+ Tconvs (upper panels) or CD8+ Tconvs (lower panels) in control (gray) or icKO (bleu) mice.

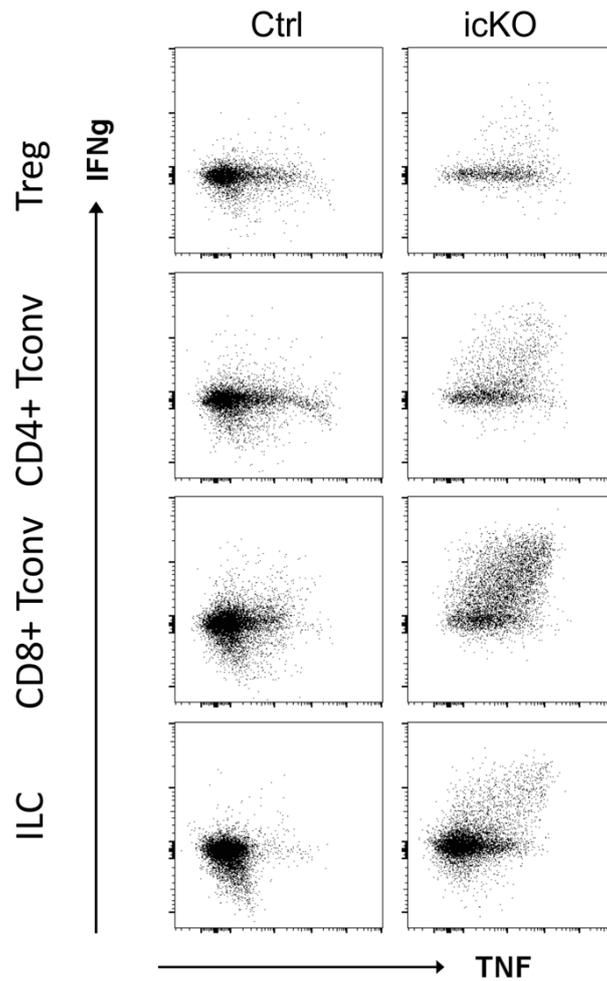


Figure S11. Co-expressions of cytokines in different immune subsets in the tumors. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Representative dot plots showing co-expressions of the indicated cytokines among Tregs, CD4⁺ Tconvs, CD8⁺ Tconvs and innate lymphoid cells (ILC).

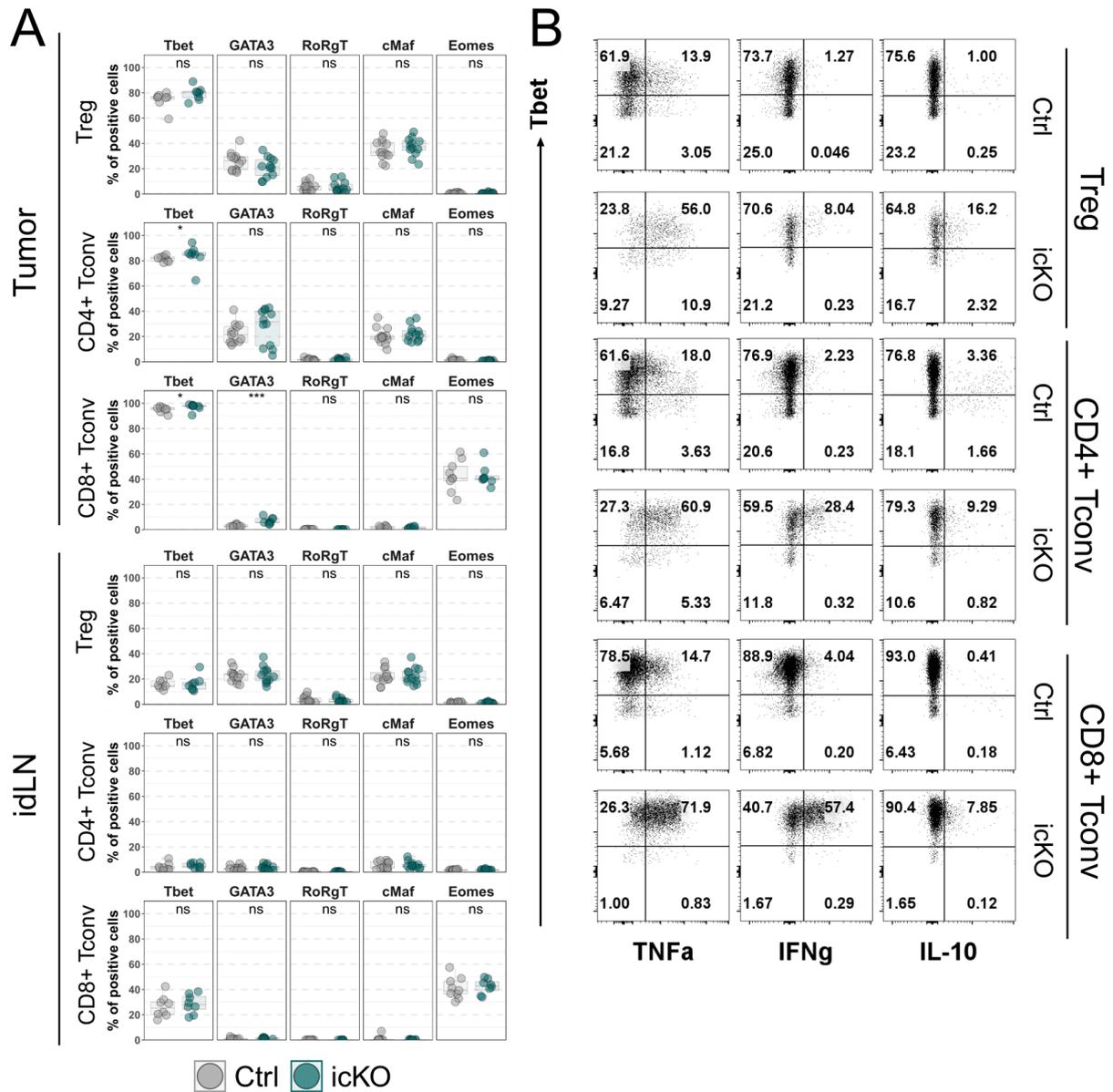


Figure S12. Increased expression of TNF and IFNg in Tbet+ lymphocytes infiltrating the tumors after TNFR2 ablation in Tregs. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. (A) Proportion of the indicated transcription factors among Tregs, CD4+ and CD8+ Tconvs infiltrating the tumor (upper panels) or in the idLNs (lower panels). Each circle represents one mouse. 8 mice were analyzed per group from 2 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test. (B) Representative dot plots showing the expressions of Tbet vs the indicated cytokines among Tregs, CD4+ and CD8+ Tconvs.

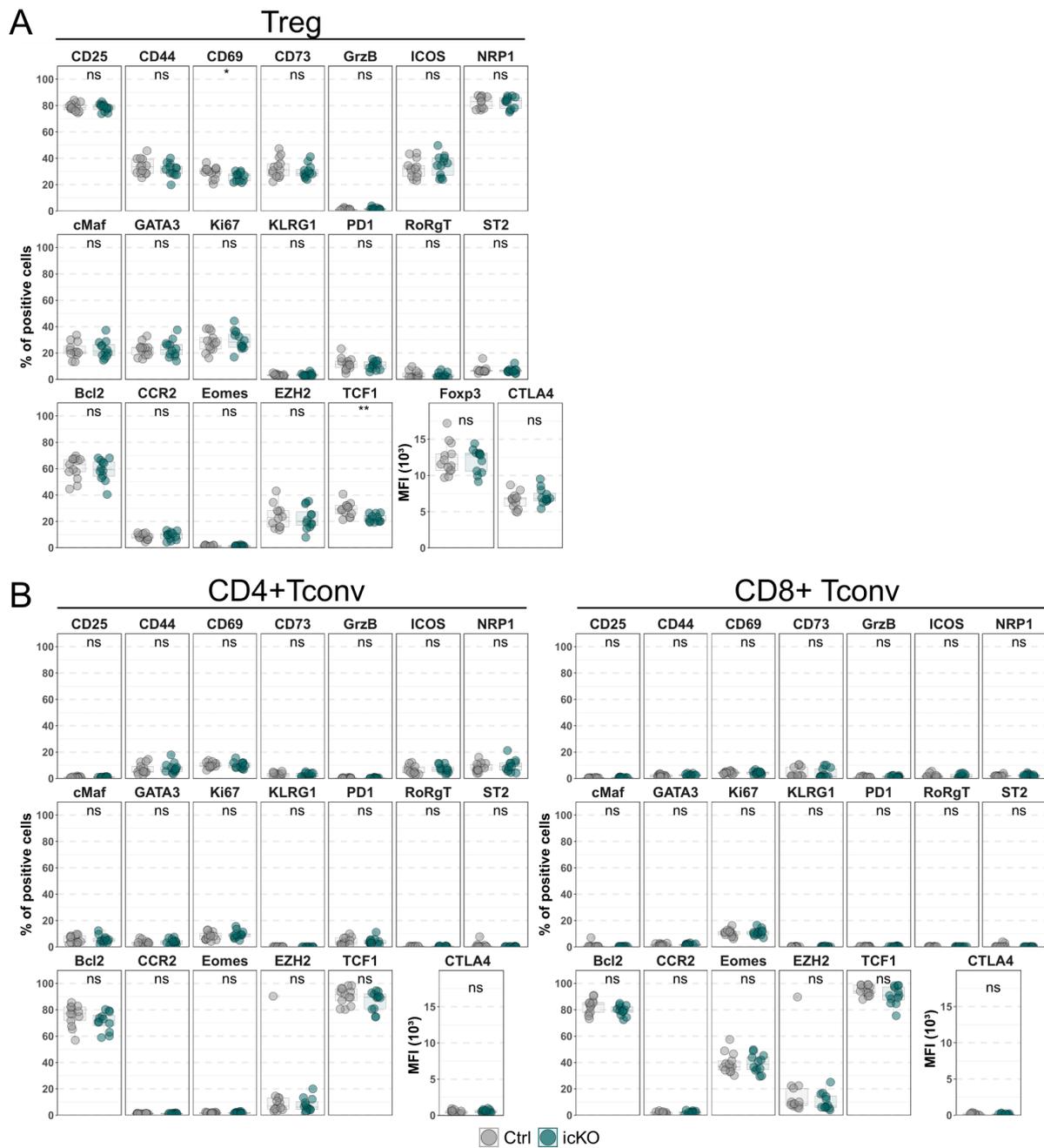


Figure S13. TNFR2 ablation in Tregs does not impact the phenotype of Tregs and Tconvs in tumor draining LNs. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Proportion of the indicated markers among Tregs (A) CD4+ Tconvs (B, left panels) or CD8+ Tconvs (B, right panels). Each circle represents one mouse. 12 to 13 mice were analyzed per group from 3 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

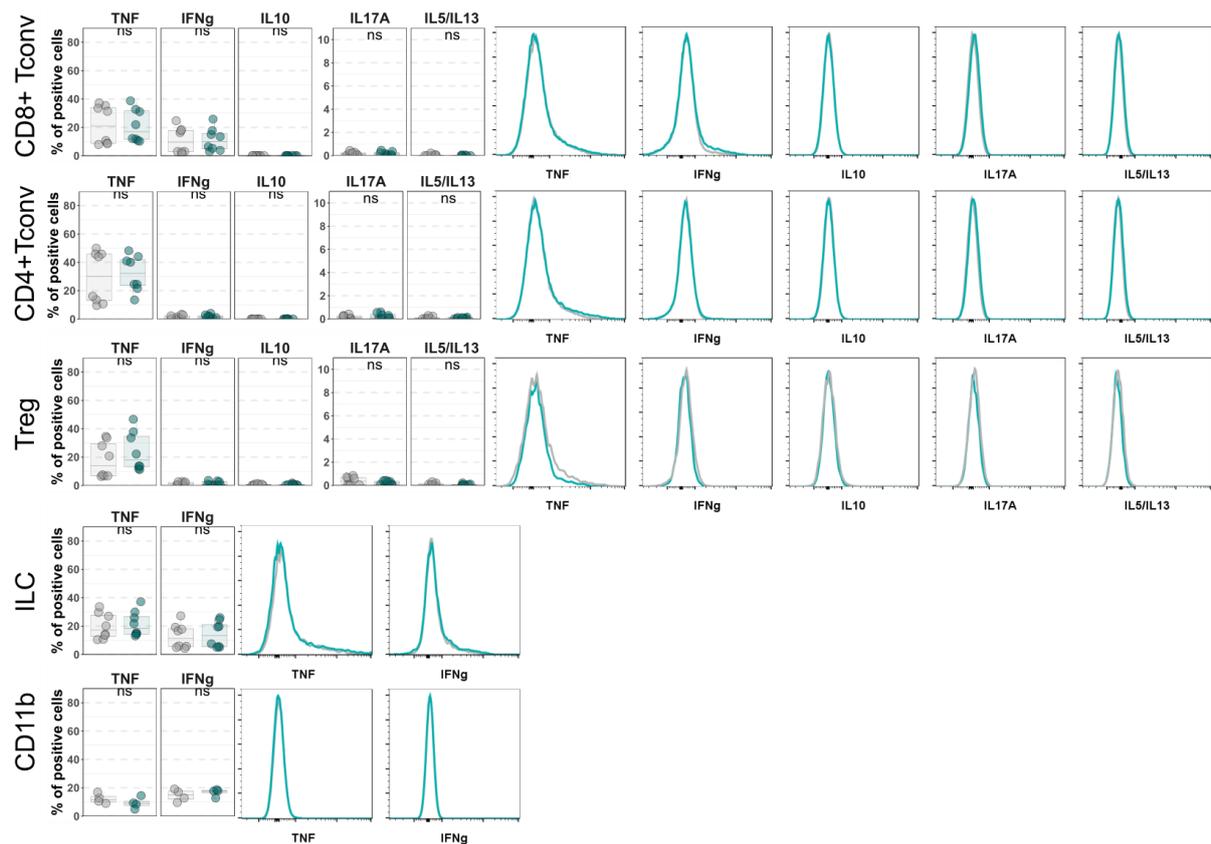


Figure S14. TNFR2 ablation in Tregs does not impact cytokine production in tumor draining LNs. Flow cytometry analyses at day 15 in iCKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Proportion of cytokine (left panels) and representative histograms (right panels) among CD8+ Tconvs, CD4+ Tconvs, Tregs, ILC and CD11b+ cells. Each circle represents one mouse. 4 to 8 mice were analyzed per group from 2 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

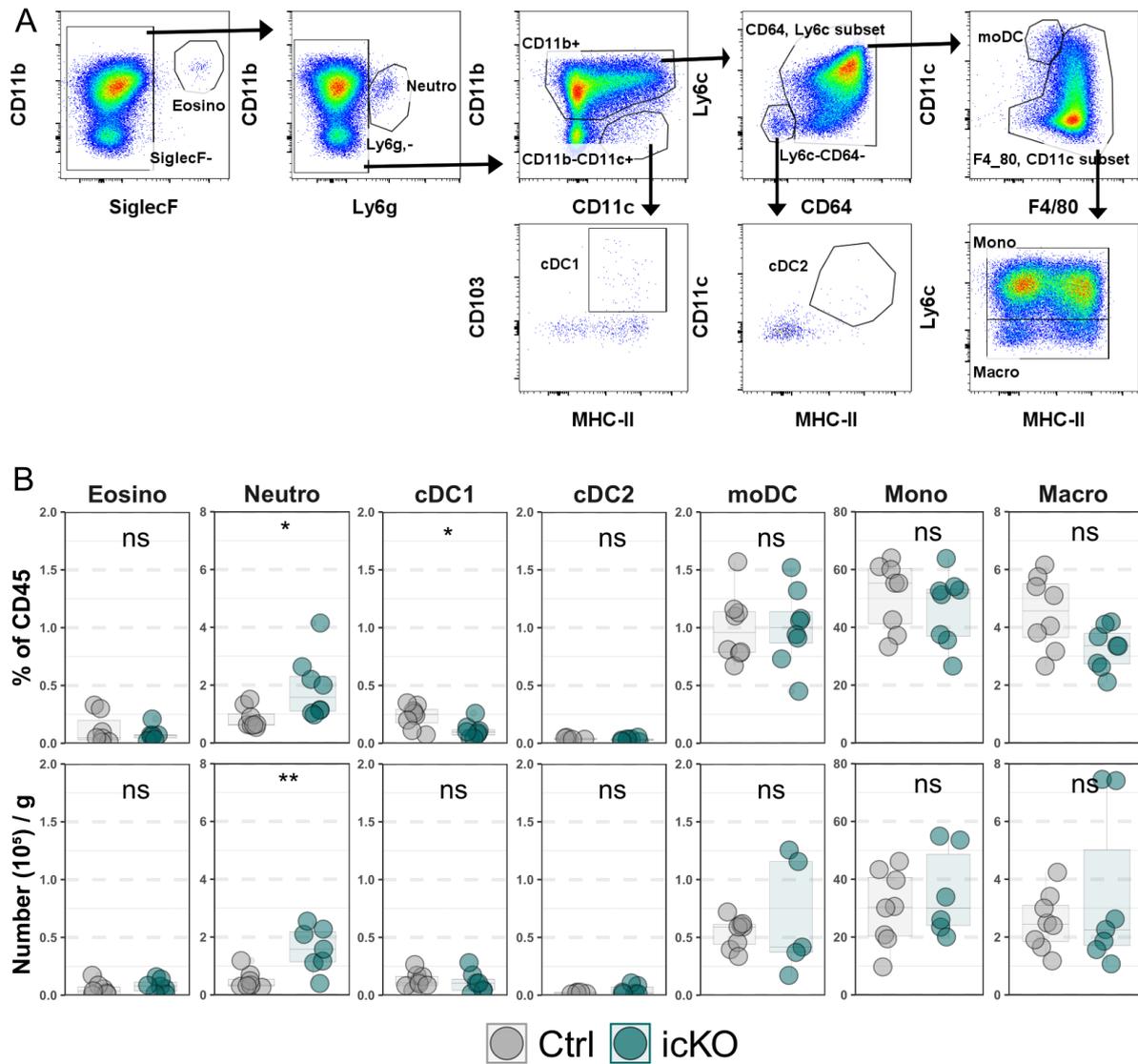


Figure S15. Impact of TNFR2 ablation on the proportion and numbers of tumor-infiltrating myeloid cells. Flow cytometry analyses at day 15 in icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. (A) Gating strategy used to analyze myeloid cell subsets. (B) Proportion among CD45+ cells and total number per grams of tumor of the indicated populations. Each circle represents one mouse. 8 mice were analyzed per group from 2 independent experiments. Statistical significance was calculated using a non-parametric Wilcoxon test.

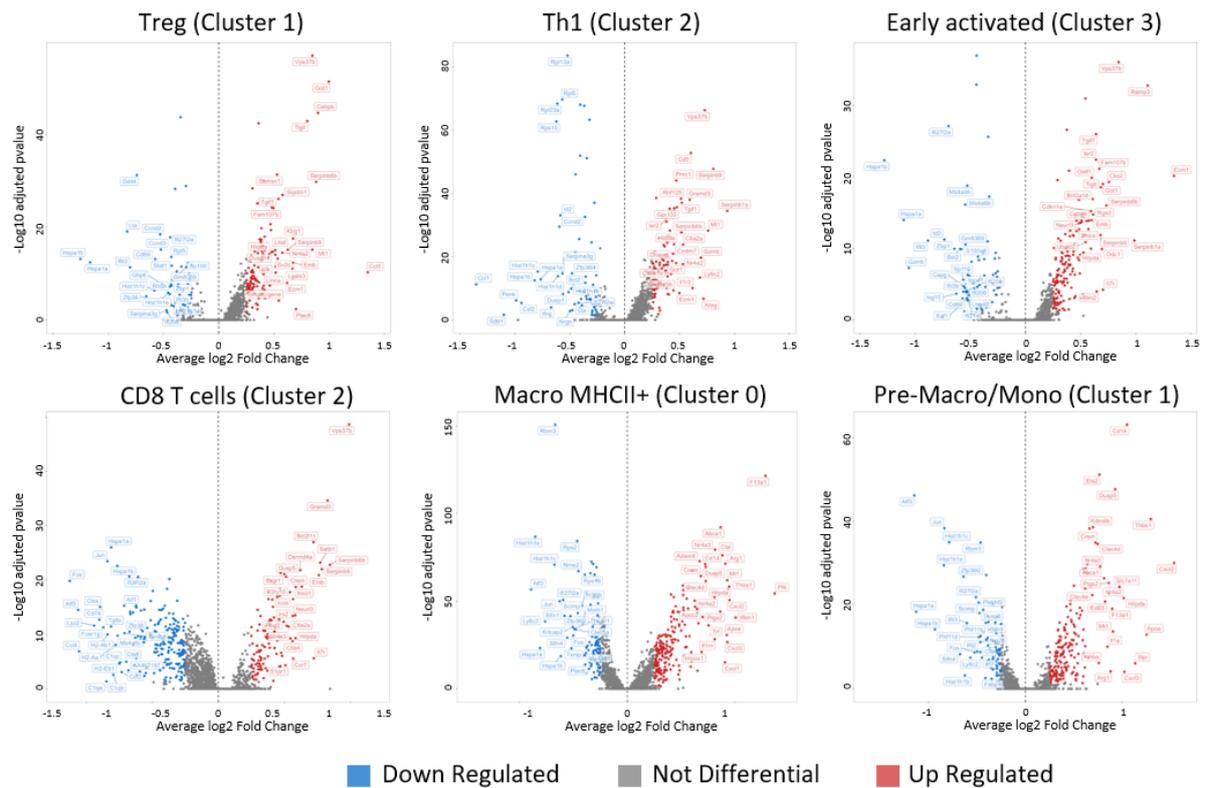


Figure S16. Impact of TNFR2 ablation in Tregs on differential gene expression in main tumor infiltrating cell clusters. We performed scRNA-Seq analyses on CD4+CD45+ or CD4-CD45+ cells, purified at day 15 from icKO and control (Ctrl) mice, which were inoculated at day 0 with MCA205 tumor cells and treated with tamoxifen at day 10. Volcano plots showing the differentially expressed genes in icKO vs Ctrl mice in the main clusters from CD4+CD45+ (Treg, Th1, Early activated) and CD4-CD45+ (CD8 T cells, Mochrophages CMHII and Pre-Macro/Mono). UP and DOWN regulated genes in icKO mice compared to Ctrl mice are respectively represented in red and blue.

II. Résultats supplémentaires

1. TNFR2 et VAT-Tregs

Durant les 2.5 premières années de ma thèse, mon projet principal était centré sur l'impact de la délétion du TNFR2 dans la biologie des Tregs du tissu adipeux viscéral (VAT-Tregs). A l'état basal, les souris *Foxp3^{Cre-ERT2}Tnfrsf1b^{fl}*, délétées pour le TNFR2 spécifiquement dans les Tregs à la suite d'un traitement tamoxifène, ne présentaient pas d'altération majeure, à l'exception du VAT. Les Tregs de ce tissu contribuent au maintien de l'homéostasie et au métabolisme du glucose [214]. Les VAT-Tregs s'accumulent progressivement avec l'âge et atteignent un pic autour de 25 semaines où ils représentent 40% des LT CD4+ chez les males [219]. Leur accumulation est dépendante de divers facteurs, comme l'IL-33 ou le CCR2 [225], [337]. Les données de l'équipe suggéraient que le TNFR2 jouait un rôle également. En effet, la délétion du TNFR2 impactait drastiquement la proportion de Tregs au sein des LT CD4+. Ces données semblaient prometteuses, car bien que le TNFR2 soit important pour la biologie des Tregs, aucune donnée ne décrivait son rôle sur les VAT-Tregs. De plus, au cours de l'obésité, une pathologie caractérisée par une inflammation chronique de bas grade du tissu adipeux, la sécrétion de TNF est augmentée et conduirait à une résistance à l'insuline [338]. La proportion de VAT-Tregs est fortement réduite et ils perdent leur signature phénotypique caractéristique de ce tissu [215]. Stimuler les Tregs dans ce contexte, via l'IL-2 ou l'IL-33, permet de restaurer leur proportion, leur phénotype et améliore certains paramètres métaboliques perturbés au cours de la pathologie. Des données publiées d'analyse transcriptomique montrent que les VAT-Tregs expriment fortement le transcrite du gène codant pour le TNFR2 [215]. Il apparaissait alors intéressant d'étudier le rôle du TNFR2 sur la biologie des VAT-Tregs et les implications thérapeutiques qui pouvaient en découler.

Nous avons tout d'abord confirmé que la délétion du TNFR2 sur les Tregs induite entre 10 et 12 semaines d'âge impactait sur la proportion des VAT-Tregs à 25 semaines (**Figure 1A**). Cet impact n'était pas retrouvé dans d'autres tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (non montré). Certains marqueurs caractéristiques de la signature des VAT-Tregs, comme ST2 et KLRG1 étaient également diminués suite à la délétion du TNFR2 (**Figure 1A**). Des transferts de moelle osseuse ont permis de montrer que la délétion du TNFR2 impactait les VAT-Tregs de manière intrinsèque (données non montrées). Le VAT et la population de Tregs résidant jouent un rôle dans le métabolisme du glucose. Des expériences permettant d'étudier ce paramètre ont été réalisées et nous n'avons pas observé d'impact de la délétion du TNFR2 sur la sensibilité à l'insuline, sa production et sur la tolérance au glucose (données non montrées). Nous avons étudié le rôle du TNFR2 sur la biologie des VAT-Tregs en

contexte pathologique en utilisant un modèle murin de l'obésité. La proportion de VAT-Tregs étant diminuée en cours de cette pathologie, il était compliqué d'étudier le rôle de la délétion du TNFR2, impactant également la proportion des Tregs. Il apparaissait alors plus judicieux d'utiliser une stratégie pour stimuler les VAT-Tregs plutôt que d'impacter d'autant plus leur proportion. Nous avons utilisé des agonistes du TNFR2 pour tenter de restaurer la population de VAT-Tregs au cours de l'obésité. Ce traitement n'a pas eu d'impact sur la proportion des VAT-Tregs et nous n'avons pas observé d'amélioration des paramètres métaboliques (**Figure 1C**).

En parallèle, pour mieux caractériser la population de VAT-Tregs et l'impact de la délétion du TNFR2, nous avons développé un panel de cytométrie spectral incluant des marqueurs permettant d'étudier la prolifération, l'activation, la survie, la fonction suppressive, la stabilité et les précurseurs des VAT-Tregs. Cependant, de manière surprenante, nous n'avons pas pu reproduire les résultats précédemment observés sur la proportion et l'expression réduite de KLRG1 et ST2 au sein des VAT-Tregs suite à la délétion du TNFR2. Nous avons exploré différentes pistes pour essayer de comprendre ces résultats. Était-ce dû à des changements dans les protocoles d'isolement des cellules provenant du VAT, dans le régime alimentaire, dans l'environnement des souris, ou encore une dérive des lignées génétiques. Pour écarter ce dernier point, des lignées dites « littermate » ont été développées. Cela permet de réaliser des expériences avec des souris contrôles et des souris délétées pour le TNFR2 provenant de portées proches. Malheureusement, dans ce modèle, la délétion du TNFR2 n'impactait pas la proportion ou l'expression de KLRG1 et ST2 au sein des VAT-Tregs (**Figure 1B**). En conséquence, nous avons décidé de ne pas poursuivre ce projet. Chaque expérience nécessitait plusieurs mois de travail puisque le TNFR2 était délété à 10 semaines et que le VAT était analysé à 25 semaines. La deuxième partie de ma thèse s'est donc concentrée sur d'autres projets (ontogénie et stabilité des Tregs, rôle du TNFR2 et de 4-1BB dans la biologie des Tregs).

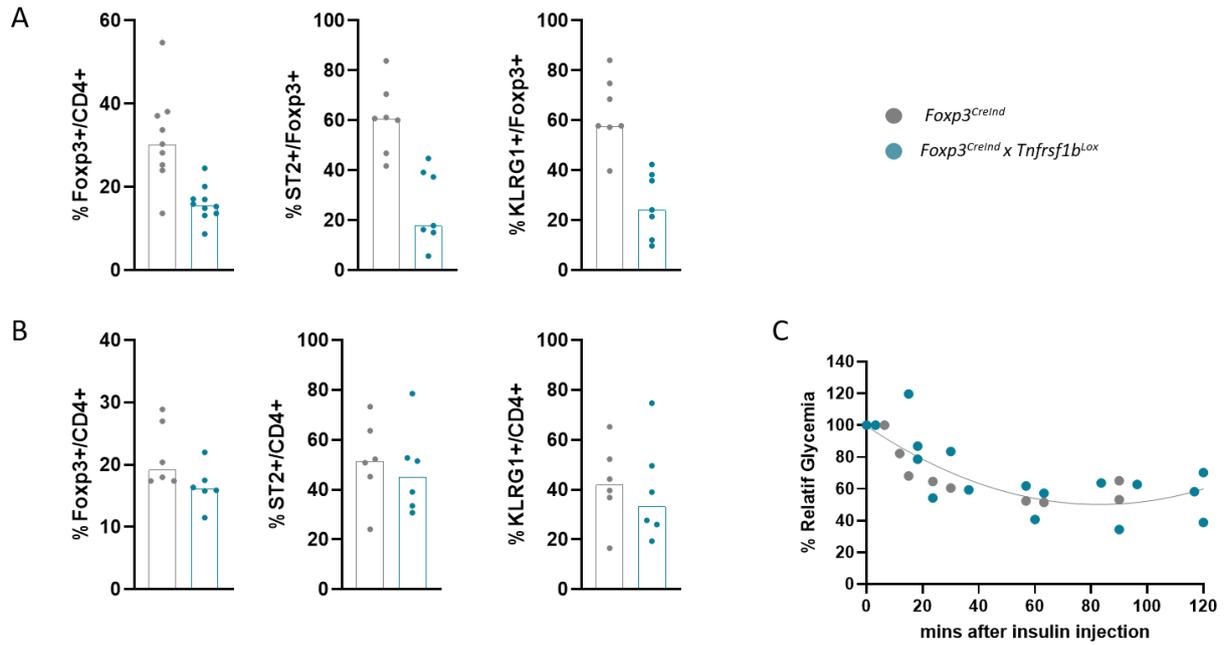


Figure 1. Involvement of the TNFR2 expressed by Tregs in the biology of VAT-Tregs. Proportion of *Foxp3*⁺ Tregs among *CD4*⁺ and proportion of *ST2*⁺ and *KLRG1*⁺ among Tregs from the VAT of 25-30-week-old *Foxp3^{CreInd} x Tnfrsf1b^{Lox}* and *Foxp3^{CreInd}* mice from (A) separated lineages or (B) the same lineage (littermate mice), after two weeks of tamoxifen treatment at the age of 10-12 weeks. (C) Insulin tolerance test performed on 9-month-old-mice that received a high fat diet during 16 weeks and were treated with TNFR2 agonist twice a week during four weeks. Representative experiments are shown.

2. 4-1BB dans la biologie des Tregs

Nous avons tout d'abord validé la délétion de 4-1BB chez les souris *Foxp3^{Cre-ERT2} Tnfrsf9^{fl/fl}* après un traitement tamoxifène. La délétion au sein des Tregs était efficace et spécifique suite à un traitement tamoxifène administré par gavage ou par voie intrapéritonéale (**Figure 1A**). Nous avons ensuite étudié l'impact de cette délétion à l'état basal en utilisant un panel de cytométrie spectral permettant de visualiser divers marqueurs de l'inflammation. Nous n'avons pas observé d'impact majeur de la délétion de 4-1BB au sein des Tregs sur les populations de cellules immunitaires présentes dans différents tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (données non montrées).

Pour étudier le rôle de 4-1BB exprimé par les Tregs en contexte inflammatoire, nous avons suivi la progression de l'EAE (Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale), un modèle murin de sclérose en plaques, et la croissance tumorale chez les souris *Foxp3^{Cre-ERT2} Tnfrsf9^{fl/fl}*. La délétion de 4-1BB au sein des Tregs ne semblait pas impacter le développement de l'EAE ou la croissance tumorale (**Figure 1B**). Plusieurs temps de délétion et de modèles de lignées tumorales ont été testés et les mêmes résultats ont été obtenus (données non montrées). Ces résultats nous ont permis de conclure que la délétion de 4-1BB au sein des Tregs n'avait pas d'impact majeur en condition physiologique et dans les pathologies étudiées.

En parallèle, nous étions également intéressés par le mécanisme d'action des agonistes de 4-1BB qui ont un rôle paradoxal puisqu'un même agoniste a des effets bénéfiques à la fois dans l'EAE et sur la croissance tumorale [317], [322]. Le modèle murin *Foxp3^{Cre-ERT2} Tnfrsf9^{fl/fl}* devait permettre d'indiquer si l'effet des agonistes dans l'une ou l'autre des pathologies agissait directement via le 4-1BB exprimé par les Tregs. Nous avons tout d'abord tenté de reproduire les résultats de littérature concernant l'effet thérapeutique d'un agoniste de 4-1BB sur l'EAE. De manière surprenante, nous n'avons pas observé d'amélioration des symptômes suite au traitement par un agoniste de 4-1BB (**Figure 1C**). Au vu de l'absence d'impact de la délétion de 4-1BB sur les Tregs et de l'absence d'effet de l'agoniste de 4-1BB sur l'EAE, nous avons décidé de ne pas poursuivre ce projet.

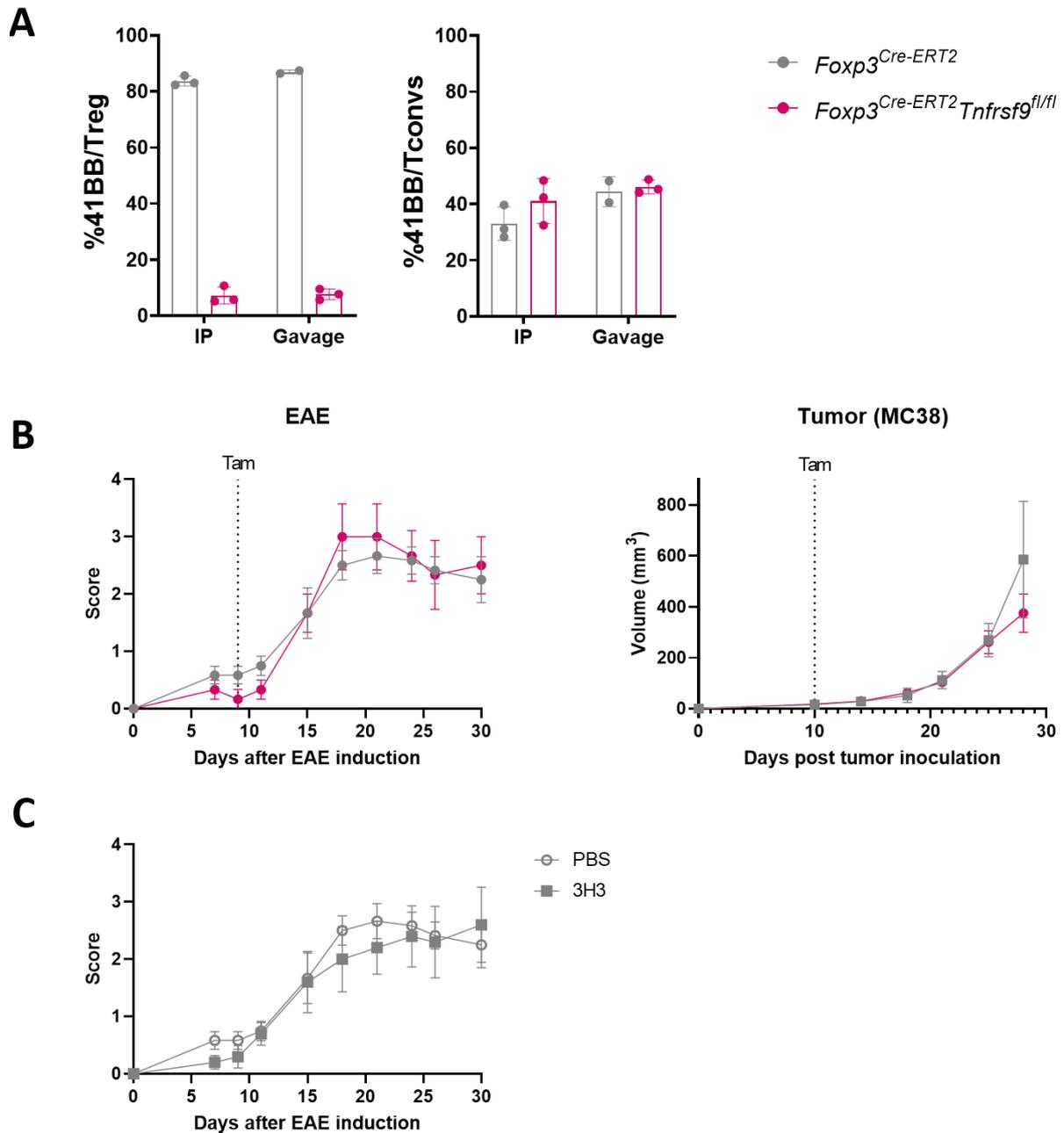


Figure 1. Involvement of 4-1BB expressed by Tregs. (A) Proportion of Tregs (left panel) and Tconv (right panel) expressing 4-1BB after 48h of stimulation with anti-CD3 and IL-2 of splenocytes from *Foxp3^{Cre-ERT2}* and *Foxp3^{Cre-ERT2} Tnfrsf9^{fl/fl}* mice treated with tamoxifen (IP or gavage) 4 weeks before. (B) EAE and tumor progression in *Foxp3^{Cre-ERT2}* and *Foxp3^{Cre-ERT2} Tnfrsf9^{fl/fl}* mice. Tamoxifen (Tam) was administered respectively 7 and 10 days after diseases inductions. (C) Score of EAE in mice treated with 4-1BB agonists (3H3) or PBS at day 0, 2 and 9 after EAE induction.

DISCUSSION

1. Biologie des Tregs

1.1 Ontogénie

Nous avons montré que l'utilisation des souris CreLox inducible (*Foxp3^{Cre-ERT2} Rosa26^{tdTomato}*) permettait d'établir un système de « fate mapping » pour analyser la cinétique de formation du pool de Tregs dans divers tissus. Nous avons ainsi observé des différences de cinétiques majeures dans la formation des pools suivants les tissus. Dans les organes lymphoïdes, comme la rate et les ganglions, le pool est formé continuellement et progressivement de la naissance à l'âge de 8 semaine. Au contraire, dans certains tissus non-lymphoïdes, comme la peau et le VAT, le pool est majoritairement constitué au cours des deux premières semaines de vie. De plus, au sein des Tregs adultes, ceux générés durant la période néonatale et ceux générés plus tardivement ont des phénotypes distincts. Les Tregs formés de manière précoce ont un phénotype plus activé et expriment des marqueurs de Tregs tissulaires et caractéristiques d'une immunité de type 2.

Dans la peau, les Tregs néonataux colonisent rapidement le tissu au cours deux premières semaines de vie. La proportion de Tregs parmi les LT CD4+ atteint jusqu'à 80%, 2-3 semaines après la naissance, avant de diminuer [80]. Nos données confirment ces observations. Il a été montré que cette colonisation dépend de la flore commensale, laquelle induit l'expression de CCL20 au niveau des follicules pileux. Cette expression permet de recruter les Tregs exprimant CCR6, lesquels sont présents dans le thymus des souris nouveau-nés [339]. Les Tregs présents dans la peau pendant la période néonatale sont indispensables pour établir une tolérance contre la flore commensale sur le long terme, à l'âge adulte [80]. En effet, les Tregs formés chez l'adulte ne sont pas capables de mettre en place ce mécanisme de manière efficace. Bien que nous n'ayons pas d'information quant à la résidence des Tregs dans ce tissu, nos données, en association avec celles de la littérature, suggèrent que le pool de Tregs de la peau est majoritairement résident, et ce, dès les premières semaines de vie. Un travail récent suggère que les Tregs des tissus non-lymphoïdes recirculent de façon continue entre différents tissus chez l'adulte [340]. Nos données suggèrent que les Tregs qui colonisent la peau chez les nouveau-nés résident dans le long terme dans ce tissu. Ainsi, il est envisageable que la résidence de ces cellules soit différente pour les cellules qui colonisent ce tissu chez les nouveau-nés et chez les adultes. Dans notre modèle, un traitement au tamoxifène au niveau de la peau au cours des premières semaines de vies permettrait de répondre à cette question sans ambiguïté. En effet, si les Tregs néonataux présents dans la peau était déjà dans ce tissu lors du traitement, ils pourront être identifiés

grâce à la tdTomato. Nous verrions alors si ces mêmes cellules seraient encore retrouvées dans ce tissu chez l'adulte.

Dans le VAT, nos données montrent également qu'une majorité du pool présent chez l'adulte est déjà formé au cours des deux premières semaines de vie. Cependant, la question de résidence dans ce tissu est plus complexe. Elle a majoritairement été étudiée chez l'adulte où des expériences de parabiose et de transfert adoptif suggéraient que les VAT-Tregs présentaient une résidence de quelques semaines [219], [225]. Or ce tissu est peu développé chez des souris de 2 semaines, ce qui est intrigant au vu des données que nous avons obtenues sur la cinétique de formation du pool. Il se pourrait que les Tregs colonisent le VAT, ou d'autre tissu adipeux, de manière précoce, et que le pool de Tregs se maintient localement par une expansion des Tregs déjà résidents. En accord avec cela, des données de la littérature montrent que l'expansion des VAT-Tregs chez l'adulte résultent d'une accumulation locale et d'une expansion clonale [208], [219], [220]. D'autre part, les précurseurs des VAT-Tregs sont présents dans les organes lymphoïdes secondaires [206]. Une partie du pool de VAT-Tregs présent chez l'adulte pourrait provenir de précurseurs déjà formés au cours des deux premières semaines de vie qui viendraient coloniser le tissu adipeux de façon progressive à différents âges. Bien sûr ces deux hypothèses ne sont pas exclusives. Au contraire, les données s'alignent pour suggérer une association de ces deux mécanismes. Les VAT-Tregs montrent une résidence partielle, une accumulation et une expansion locale, mais des précurseurs des VAT-Tregs sont retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires chez l'adulte. Une partie du pool serait donc résident de manière précoce dans le VAT et une autre partie coloniserait le tissu plus tardivement via des précurseurs présents dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces précurseurs seraient alors formés en majorité dans les premières semaines de vie.

Dans le foie et les poumons, 60% du pool de Tregs était formé 3 semaines après la naissance. Ces résultats sont intermédiaires par rapport aux situations observées d'un côté dans les organes lymphoïdes secondaires, où le pool est progressivement constitué, et de l'autre dans la peau et le VAT, où il est constitué de manière précoce. Le foie et les poumons subissent également une vague de colonisation précoce, autour des 2-3 premières semaines de vie [206], [242], [341]. Nos données confirment ces observations. Dans le foie, cette colonisation provient des Tregs thymiques et est nécessaire pour limiter l'activation des Tconv [341]. Le foie et les poumons étant deux tissus dont le niveau de perfusion sanguine est élevé, il se peut que les Tregs résidents soient en partie contaminés par des Tregs circulant, probablement constitués de Tregs formés plus récemment.

Nos données montrent que les Tregs néonataux persistant chez l'adulte ont un phénotype activé dans les différents tissus que nous avons étudiés. Cela est en accord avec ce qui avait été observé

pour les Tregs spléniques en utilisant une approche expérimentale un peu différente [15]. Cette étude avait montré que les cellules qui acquéraient l'identité Tregs lors des 2 premières semaines de vie et persistaient à l'âge adulte, avaient un phénotype plus activé et étaient plus suppressives que les Tregs qui se différenciaient à l'âge adulte. Ce phénotype peut s'expliquer par le fait que les Tregs néonataux ont un répertoire plus auto-réactif, par rapport à ceux générés plus tardivement [15]. Cela peut également s'expliquer par le fait qu'ils sont mis en place lors d'une période où les tissus sont peu colonisés par les cellules immunitaires, reproduisant un environnement lymphopénique qui induit une forte activation et prolifération.

Au vu du phénotype des Tregs générés chez les nouveau-nés par rapport à ceux générés plus tardivement, l'intérêt de les conserver à l'âge adulte pourrait s'expliquer par le fait qu'ils ont des fonctions différentes, comme ça a été décrit dans la rate. Cependant, pourquoi certains tissus comme la peau et le VAT en sont majoritairement constitués ? Comme discuté précédemment, dans la peau, cela s'explique d'un point de vue fonctionnel par le fait qu'il semble important de pouvoir coloniser ce tissu précocement pour établir une tolérance à long terme, notamment vis-à-vis du microbiote. Dans le VAT, les raisons d'une différenciation précoce sont moins claires. Ces deux tissus ont peu de chose en commun. En revanche, dans les deux cas, les Tregs de ces tissus ont un fort profil Th2, ce qui se voit par l'expression forte de ST2 et de GATA3. De manière intéressante, la période néonatale est caractérisée par une immunité de type 2 [331]. Ces Tregs pourraient donc majoritairement se développer durant les premières semaines de vie car ils ont besoin d'un environnement Th2 pour se différencier. Après la période néonatale, l'environnement ne serait peut-être plus favorable à une telle différenciation. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les VAT-Tregs générés après cette période ont une expression fortement réduite de GATA3 et de ST2. De manière similaire, dans tous les tissus, les Tregs différenciés au cours de la première semaine de vie exprimaient plus fortement GATA3 et ST2.

La formation de Tregs GATA3+ au cours des premières semaines de vie semble également avoir un impact sur l'ontogénie des Tregs du colon. Dans ce tissu, deux populations ayant des rôles distincts cohabitent : les Tregs GATA3+ ayant une origine thymique et les Tregs ROR γ T+ ayant une origine périphérique [236]. Cependant, une étude récente a montré que les pTregs générés chez les nouveaux nés exprimaient GATA3 et non ROR γ T, comme c'est le cas chez des souris plus âgées [82]. Cela est en accord avec nos données qui suggèrent que la période néonatale est plus favorable à la formation de Tregs GATA3+.

1.2 Stabilité

Les Tregs : une population instable ?

Les premières publications utilisant le modèle CreLox inducible n'observaient pas de population d'exTregs et suggéraient donc que les Tregs étaient une population stable [15], [148], [149]. D'autres articles utilisant également ce modèle montraient au contraire une instabilité des Tregs [151]–[154]. Cependant, l'identification par cytométrie en flux de la population d'exTregs restait peu convaincante (Figure 12). Grâce à des améliorations technologiques et une meilleure compréhension du modèle, nous avons identifié pour la première fois la population d'exTregs sans ambiguïté. Nos données permettent de confirmer l'existence d'une population d'exTregs et attestent donc de l'instabilité des Tregs. Une étude publiée récemment identifiait également les exTregs via ce système et proposait une combinaison de marqueurs permettant de les identifier chez l'Homme [130]. Une fois de plus, le marquage par cytométrie en flux ne permettait pas de visualiser une séparation nette de la population d'exTregs. Je comparerais les résultats de cette étude aux nôtres dans les sections suivantes. Il a également été suggéré que les exTregs proviendraient d'une expression transitoire de Foxp3 au sein des Tconvs [139]. Des expériences de transfert adoptif nous ont également permis d'écarter cette hypothèse (données non montrées).

Maintenant que l'on sait que les exTregs existent, plusieurs questions se posent concernant la stabilité des Tregs. Nous avons observé des proportions variables d'exTregs suivant les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes étudiés. Dans les ganglions, la proportion d'exTregs restait faible quel que soit l'âge des souris ou le contexte inflammatoire. En revanche, dans la rate, la proportion d'exTregs parmi les cellules tdTomato+ était de 20% chez les souris jeunes ou adultes. Nous avons étudié les tissus à un instant précis, ce qui ne nous permet pas de savoir dans quel(s) tissu(s) les exTregs sont apparus. Sont-ils devenus exTregs dans le tissu analysé ? Recirculent-ils préférentiellement vers d'autres tissus ? Le CD62L est une molécule d'adhésion qui joue un rôle essentiel dans la circulation des LT dans les ganglions lymphatiques. Il permet aux LT d'adhérer aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins qui se trouvent dans les ganglions lymphatiques, ce qui facilite leur entrée dans les ganglions [342]. Or les exTregs sont des cellules activées qui n'expriment pas le CD62L. La faible proportion d'exTregs dans les ganglions peut alors s'expliquer soit car les Tregs sont plus stables dans ce tissu, soit car la migration des exTregs vers les ganglions est difficile au vu de l'expression faible de CD62L. L'âge semble également avoir un impact sur la stabilité. En effet, la proportion d'exTregs semblait augmentée dans les poumons, le foie et le VAT des souris adultes par rapport aux souris jeunes.

Nos données ne permettant pas d'analyser la recirculation des exTregs suite à leur formation, il est donc compliqué de conclure quant à la stabilité de ces cellules dans un tissu en particulier. Cependant, lors de l'étude de l'ontogénie des Tregs nous avons observé que les Tregs présents dans la peau étaient générés de manière précoce. Nos données, en association avec celle de la littérature [79], [80], suggéraient que ces Tregs générés chez les nouveau-nés ont un niveau élevé de résidence dans ce tissu. C'est dans la peau que nous avons observé la plus forte proportion d'exTregs parmi tous les tissus analysés. Il semblerait donc que l'instabilité des Tregs soient accrues au niveau de la peau par rapport à d'autres tissus. Cependant, ces « exTregs » sont définis comme étant Foxp3^{low} et non Foxp3. Ils présentent des caractéristiques phénotypiques qui diffèrent des exTregs observés dans d'autres tissus, ce qui en fait une population particulière. Des données de la littérature suggèrent également que les Tregs présents dans le VAT sont en partie résidents [219], ce qui permet également d'avoir des indications sur la stabilité des Tregs au sein de ce tissu. Il est à noter que la proportion d'exTregs peut également être impactée par une survie ou une prolifération différente par rapport à la population de tagTreg ou au sein des différents tissus. En conclusion, nos données donnent des indications sur la stabilité des Tregs dans différents tissus mais ne permettent pas de tirer des conclusions définitives. De nombreux facteurs confondants ne permettent pas de connaître de façon précise la stabilité des Tregs dans les différents tissus étudiés. Des études complémentaires seront nécessaires pour avancer sur cette question.

Certaines données de la littérature suggèrent que l'inflammation favorise le développement des exTregs [130], [133]. Nous avons en effet observé une forte proportion d'exTregs au sein de la tumeur, cette population apparaissait rapidement puisque 5 jours après le traitement tamoxifène, 20% des cellules tdTomato+ étaient des exTregs. En revanche, la proportion d'exTregs présents dans le système nerveux central au cours de l'EAE était beaucoup plus faible et ne dépassait pas 5% aux différents temps étudiés. Ces données suggèrent que le contexte pathologique a une influence sur la stabilité des Tregs. Cependant, nous ne pouvons pas non plus contrôler les paramètres de migration, survie et prolifération discutés précédemment. Par la suite, il sera intéressant de comparer différents contextes inflammatoires pour identifier ceux qui sont les plus favorables à la génération des exTregs. Ce travail pourrait alors permettre ultérieurement de pouvoir caractériser les facteurs impliqués dans cette instabilité.

Les exTregs : une contamination des Tconvs ?

Sans modèle de « fate mapping », il n'est pas possible de faire la différence entre des exTregs et des Tconvs. Le système CreLox inducible permet seulement de regarder les exTregs provenant d'une population de Tregs déjà formé au moment du traitement par le tamoxifène. Les exTregs

généérés avant ce traitement ne sont pas identifiés par cette approche, de même que ceux provenant de Tregs qui se différencient après ce traitement. En fonction de l'âge des souris au moment du traitement par le tamoxifène et de l'organe étudié, les exTregs représentent jusqu'à 10% de la population de LT CD4+Foxp3-, qui sont classiquement considérées comme étant des Tconvs. Cette proportion est donc largement sous-estimée. Dans la peau, les exTregs définis comme étant Foxp3^{Low} représenteraient jusqu'à 40% des Tconvs. Il serait intéressant de regarder si ces exTregs peuvent être visualisés dans ce tissu uniquement sur la base de la faible expression de Foxp3 et de pouvoir ainsi les identifier sans « fate mapping ». Pour connaître précisément la contamination de la population de Tconvs par les exTregs via le système de fate mapping, il faudrait pouvoir traiter au tamoxifène tout au long de la vie de la souris. Un tel traitement est cependant compliqué à mettre en place dû à la toxicité du tamoxifène. Nous avons cherché à la faire sans succès jusqu'à maintenant.

L'analyse de nos données de scRNASeq devrait permettre de mettre en évidence une signature spécifique des exTregs. Identifier des marqueurs exclusivement exprimés par les exTregs permettrait de déterminer sans équivoque leur contamination parmi les Tconvs. Cependant, l'identification de ces marqueurs est délicate. En effet, les exTregs ont un phénotype à l'interface entre celui des Tregs et des Tconvs. Des marqueurs permettant de les distinguer des deux autres populations semblent donc compliqués. Sans modèle de fate mapping, il serait intéressant d'identifier des marqueurs permettant de les distinguer des Tconvs, Foxp3 étant suffisant pour les distinguer des Tregs. Le ligand de CD40 (CD40L) semble prometteur. En effet, le transcrite du gène codant pour CD40L n'était pas exprimé par le cluster d'exTregs présent dans la tumeur alors qu'il est exprimé par les Tconvs (données non montrées). Cependant, il est probable qu'on ait besoin d'une combinaison de marqueurs pour pouvoir identifier les exTregs.

Les données de scRNASeq générées dans la tumeur donnent certains avantages. Comme discuté plus haut, tous les exTregs ne pourront pas être identifiés et certains seront indistinguables des Tconvs. Mais nous pensons que ce contexte, dans lequel les exTregs sont générés rapidement et en grande quantité, est favorable pour mieux identifier la population d'exTreg et éviter une trop forte contamination des Tconvs. Nous allons donc utiliser nos données de scRNASeq sur les LT CD4+ infiltrant la tumeur 5 jours après le traitement tamoxifène pour faire cette caractérisation phénotypique des exTregs. Les marqueurs qui semblent être exprimés préférentiellement par les exTregs seront ensuite validés par cytométrie de flux. Nous serons particulièrement intéressés par ceux exprimés à la membrane et pour lesquels nous pouvons obtenir des anticorps spécifiques pour pouvoir ensuite trier des cellules vivantes permettant de faire des analyses fonctionnelles. Cependant, les marqueurs identifiés dans un contexte pathologique ne refléteront peut-être pas leur expression en condition

physiologique. Il faudra vérifier que ces marqueurs peuvent également être utilisés pour identifier les exTregs à l'homéostasie.

Il est nécessaire de proposer à la communauté scientifique une méthode de distinction entre ces deux populations puisqu'elles sont phénotypiquement distinctes. Les exTregs expriment des marqueurs fortement exprimés par les Tregs, mais aussi par les Tconvs les plus effecteurs. Cette contamination biaise le phénotype des Tconvs étudiés sans modèle de fate mapping. Bien que la fonction des exTregs ne soit pas encore bien comprise, au vu de leur phénotype et de leurs profils cytokiniques, nous pensons qu'elles diffèrent de celle des Tconvs, appuyant l'importance de devoir distinguer ces deux populations. Pour finir, nous avons fait le choix de comparer le phénotype des exTregs à celui des Tconvs activés exprimant CD44. Cette comparaison pourrait donc être biaisée par le fait que les Tconvs sont contaminés par des exTregs non tagués.

ExTregs ou exFoxp3 ?

Nous avons défini les exTregs sur la base de la perte de Foxp3. Cependant, l'expression seule de Foxp3 ne permet pas de conférer ou de perdre complètement une identité Tregs. Les iTregs, formés après induction de Foxp3 dans les Tconvs in vitro, ne sont pas une population stable et ne récapitulent pas toutes les caractéristiques des Tregs formés in vivo [73]. A l'opposé, les Tregs « wannabe », ne possédant pas de Foxp3 fonctionnel, ont tout de même une signature ressemblant fortement à celle des Tregs [95], [112]. Ces Tregs « wannabe » sont retrouvés par exemple chez des souris dans lesquelles le gène *Foxp3* est remplacé par un allèle codant pour une molécule fluorescente mais dont la fonction Foxp3 est abolie. On obtient alors des cellules fluorescentes qui sont proches au niveau transcriptomique et épigénétique des Tregs mais qui n'ont pas de Foxp3 fonctionnel. Ces études permettent de connaître les gènes dont l'expression est dépendant directement de Foxp3. Il serait alors intéressant de savoir si les exTregs que nous avons observé perdent uniquement leur signature de Tregs associé avec l'expression de Foxp3 ou si les changements qu'ils ont subis sont plus profonds.

Les Tregs « wannabe » perdent l'expression de certains marqueurs caractéristiques des Tregs comme CTLA-4, CD25, GITR, CD73, CD103, CD69. Ils ont également une expression augmentée d'IFN γ et de TCF-1. En effet, il a été montré que Foxp3 permettait de réprimer l'expression du gène codant pour TCF-1 [112]. Les exTregs que nous avons observé dans la rate perdaient l'expression de CTLA-4, CD25, et avaient une expression plus forte de TCF-1. Nous avons également observé une augmentation de la production d'IFN γ à l'état basale au sein des exTregs par rapport aux Tregs présent dans la rate, les ganglions, les poumons, le VAT et le colon (données non montrées). En revanche, l'expression de CD69 et CD73 semblait conservée, voire augmentée pour ce dernier. Ces données suggèrent que le phénotype des exTregs ne serait pas uniquement dépendant de la perte de Foxp3.

Dans les tissus non-lymphoïdes que nous avons étudiés, certains de ces marqueurs ne permettaient plus une distinction nette entre les tagTregs et les exTregs. L'expression de CD25 et de CTLA-4 était plus faible dans les exTregs des poumons, du VAT et du colon, mais elle était tout de même en partie conservée et ne rejoignait pas le niveau d'expression des Tconv. Nous avons observé un phénomène similaire pour TCF-1 dans la mesure où son expression était augmentée au sein des exTregs mais de manière moins visible dans ces trois tissus non-lymphoïdes. L'expression de CD69 et de CD73 ne semblait pas permettre de distinguer les tagTregs des exTregs dans les tissus non-lymphoïdes également (données non montrées). Dans la peau, où nous avons identifié les exTregs comme étant Foxp3^{low} et non Foxp3-, l'expression de CD25 et de CTLA-4 était conservée au sein des exTregs. De la même manière, l'expression de TCF-1 n'était pas augmenté (données non montrées). Ces résultats suggèrent que l'expression de ces marqueurs est dépendante de l'expression de Foxp3 puisqu'elle est conservée dans les exTregs Foxp3^{low} de la peau.

Le phénotype des exTregs au sein de la tumeur était similaire à ceux présents dans la peau dans la mesure où les expressions de CD25, CTLA-4 et TCF-1 étaient conservées entre les exTregs et les tagTregs. Ces résultats peuvent être interprétés de plusieurs manières. Premièrement, les marqueurs cités précédemment seraient en partie dépendants de l'expression de Foxp3, mais également de l'environnement tissulaire. En effet, ces marqueurs sont également en partie conservés dans les organes non-lymphoïdes comme les poumons, le VAT et le colon. Il semblerait que dans les environnements où les Tregs sont plus activés, comme dans les tissus non lymphoïdes ou la tumeur, les exTregs conservent davantage une signature de Tregs. C'était également le cas pour l'expression des marqueurs tissulaires KLRG1 et ST2. Deuxièmement, bien que les exTregs soient définis comme étant Foxp3- (à l'exception de la peau), l'intensité d'expression de Foxp3 (observé via la MFI) est tout le même plus importante dans les exTregs que dans les Tconv, notamment dans les tissus non lymphoïdes (données non montrées). Cela est en accord avec le fait qu'ils conservent des marqueurs dépendant de l'expression de Foxp3. Troisièmement, les temps auxquels les exTregs sont analysés étaient différents entre l'état basal dans les différents tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes et au sein de la tumeur. Les exTregs ont été analysés à l'état basal, deux semaines après le traitement tamoxifène. Au sein de la tumeur, les exTregs ont été analysés 5 jours après le traitement tamoxifène. Il se pourrait alors que la perte de Foxp3 au sein des exTregs de la tumeur soit trop récente et que leur phénotype soit toujours en transition vers un phénotype final d'exTreg. Des expériences de cinétique analysant le phénotype des exTregs dans la tumeur plus tardivement permettraient de répondre à cette question. Cependant, une expérience préliminaire, analysant le phénotype des exTregs provenant de Tregs tagués avant l'injection de cellules tumorales, suggère que le phénotype des exTregs évolue peu au cours de la croissance tumorale (données non montrées).

Etudier la méthylation de l'ADN des exTregs permettrait également de faire la distinction entre des cellules ayant perdu l'expression de Foxp3 ou l'identité complète des Tregs. Des données utilisant le modèle CreLox ont montré que la méthylation des exTregs présentait des similitudes avec celle des Tregs et des Tconvs [135]. Les auteurs avaient conclu que les exTregs provenaient donc à la fois de tTregs et de pTregs. Cependant, étant donné la fuite de l'expression de la Cre constitutive dans ce modèle, ces données sont remises en question puisque les exTregs analysés pourraient être un mélange de véritable exTregs et de Tconvs dans lesquels la Cre a été exprimée à un moment ou un autre. Une étude utilisant le modèle CreLox inducible avait montré que les exTregs avaient un profil de méthylation de l'ADN similaire aux Tregs [133]. Cependant, le marquage obtenu en cytométrie en flux pour distinguer les exTregs semblait peu convaincant et laissait penser à une contamination des exTregs par les tagTregs.

Les exTregs semblent perdre en partie la signature dépendante de Foxp3 et conserver certaines caractéristiques des Tregs. La question se pose alors de savoir si les exTregs sont un état transitoire et ont la capacité de regagner l'expression de Foxp3. L'équipe du Dr. Hori a proposé une hypothèse d'un état transitoire [139]. Cependant, ces données ont par la suite été réfutées par l'équipe du Dr. Schlenner qui a montré, grâce à des expériences de transfert adoptif successif, que les exTregs produits ne pouvaient pas regagner l'expression de Foxp3 [125].

L'expression de CD25 semble être un élément clef dans la stabilité des Tregs, notamment via son action au niveau du CNS2 du locus de *Foxp3* [92]. En conséquence, un environnement pauvre en IL-2 pourrait favoriser la génération d'exTregs. Le foie est un tissu où l'IL-2 est moins disponible et où les Tregs expriment plus faiblement CD25 [243]. Chez des souris adultes (16 semaines), la proportion d'exTregs dans le foie était de 25-30% ce qui était plus important que les observations faites dans d'autres tissus (à l'exception de la peau) et au sein de la tumeur. Cela n'était pas le cas lorsque les analyses étaient réalisées chez des souris plus jeunes (8 semaines). Ces résultats suggèrent qu'un des facteurs impactant la stabilité des Tregs serait l'IL-2, mais de manière dépendante à l'âge.

ExTregs : rôle et fonction

Les données de la littérature décrivent les exTregs comme une population ayant des propriétés pro-inflammatoires. Ils sécrètent notamment plus d'IL-17 et d'IFN γ que les Tregs [133]. Bien que nos données ne permettent pas directement de comprendre le rôle des exTregs, nous n'avons pas observé d'augmentation de la sécrétion d'IL-17 à l'état basal dans les différents tissus étudiés ou dans la tumeur. Les niveaux d'IL-17 étaient cependant très faibles, il serait intéressant de réaliser cette étude dans un modèle pathologique à dominante Th17.

Pour déterminer la fonction des exTregs sans ambiguïté, il serait nécessaire de pouvoir trier cette population par cytométrie en flux. Cependant, le marquage nous permettant de clairement visualiser la population d'exTreg est obtenu grâce à la fixation et perméabilisation des cellules. Cette technique permet d'un côté de pouvoir marquer Foxp3 avec un anti-Foxp3, un marquage plus fort que la GFP endogène, et de réduire l'intensité de fluorescence de la tdTomato. La qualité du marquage est également permise grâce à la sensibilité de détection du cytomètre spectral. Sans ces améliorations, le marquage des exTregs ne permet pas de bien les distinguer des tagTregs. Nous pensons que les études réalisées précédemment ne sont pas faites sur une population purifiée de vrais exTregs. Ces différents paramètres font donc du tri d'exTregs un véritable défi. Pour remédier à cet obstacle, nous cherchons à identifier des marqueurs spécifiques de cette population en utilisant nos données de scRNASeq générées sur les LT CD4+ infiltrant la tumeur. Comme discuté précédemment, identifier des marqueurs distinguant les exTregs des Tconv serait compliqué. Nous cherchons donc à mettre en évidence une signature et une combinaison de marqueurs capables de distinguer les exTregs des tagTregs dans les modèles de fate mapping.

Une étude récente a permis d'identifier pour la première fois des exTregs chez l'Homme [130]. Pour ce faire, ils ont analysé la signature transcriptomique des exTregs chez la souris en utilisant le système CreLox inducible. Ils ont ensuite utilisé la signature obtenue chez la souris pour identifier une population similaire chez l'Homme. Ils isolent alors les exTregs humains sur la base de l'expression de CD16 et CD56, deux marqueurs normalement caractéristiques des cellules NK, et montrent qu'ils auraient une activité cytotoxique. Cependant, le modèle murin CreLox utilisé était également croisé avec un modèle d'athérosclérose, leur permettant de créer un environnement inflammatoire plus favorable à la génération d'exTregs. Il est difficile de comparer la proportion d'exTregs dans notre modèle avec celle observée dans cette étude car certaines informations ne sont pas connues. Cependant, leur proportion de Tregs et d'exTregs sont plus basses que ce que nous avons obtenu dans notre étude. Concernant le phénotype, ils ont observé une baisse du CD25 chez la souris et chez l'Homme, une augmentation de PD-1 et de la production de granzyme B et d'IFN γ chez l'Homme. Nous retrouvons également une baisse du CD25, une augmentation de PD-1 et d'IFN γ à l'état basal et en condition inflammatoire dans un modèle de cancer. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de granzyme B dans ces différents contextes. Nos données en comparaison avec celles de cette étude ne permettent donc pas de conclure sur la cytotoxicité des exTregs. De plus, le marquage leur permettant de purifier les exTregs pour analyser leur signature transcriptomique était fait sur des cellules non fixées, en utilisant la GFP et la tdTomato, une combinaison, qui selon nous, ne permet pas d'obtenir une population pure et complète d'exTregs. Nous allons étudier avec attention

les marqueurs qu'ils identifient comme permettant de caractériser les exTregs pour voir si nos données sont en accord avec les leurs.

De nombreuses questions sur le rôle des exTregs demeurent donc ouvertes. Quel est le rôle des exTregs ? Est-ce un défaut du lignage des Tregs ? Est-ce une sous-population de Tregs en particulier qui est prédestinée à devenir des exTregs ? Bien que nous ayons montré que les Tregs peuvent perdre l'expression de Foxp3, nous ne savons pas si ce phénomène concerne toute la population des Tregs ou seulement une partie. Cependant, une étude utilisant le modèle CreLox avait suggéré que seul une partie de la population de Treg pouvait être sujette à la perte de Foxp3 [125]. Cette même étude suggérait que les exTregs proviendrait majoritairement d'une population de Treg susceptibles d'être instable et n'exprimant pas NRP1. Comprendre l'origine des exTregs est également un élément clef pour pouvoir répondre à ces différentes questions. Nous avons observé que les exTregs était plus enrichis dans la population de LT CD4+ activées que les LT CD4 effecteurs (données non montrées), en se basant sur la combinaison d'expression des marqueurs CD62L et TCF-1 précédemment décrit dans la littérature [343]. Il semblait également que les exTregs était enrichis dans les populations de LT CD4+ exprimant NRP1 et non ROR γ T (données non montrées). Ces données suggèrent que les exTregs proviendraient de Tregs activés mais non effecteurs et majoritairement des tTregs. Néanmoins, il est possible que l'expression des marqueurs que nous utilisons pour parvenir à ces conclusions ait été acquise ou perdue en réponse à la perte d'expression de Foxp3.

2. Rôle du TNFR2 et de 4-1BB dans la biologie des Tregs

Rôle du TNFR2 en condition physiologique.

Le TNFR2 fait partie de la signature clef permettant d'identifier les Tregs [272]. Le stimuler permet d'accroître la survie et la prolifération des Tregs [274]–[276]. Pour étudier son rôle dans la biologie des Tregs, l'équipe du Dr. Salomon a généré des modèles murins possédant une délétion spécifique du TNFR2 dans les Tregs (*Foxp3^{Cre}Tnfrsf1b^{fl/fl}* et *Foxp3^{Cre-ERT2}Tnfrsf1b^{fl/fl}*). A l'état basal, la délétion du TNFR2 au sein des Tregs ne semblait pas avoir d'impact majeur sur l'homéostasie tissulaire et sur la balance immunitaire.

Nous avons cependant observé, dans un premier temps, une perturbation des Tregs présents dans le VAT. Cette observation était à la fois intéressante et intrigante. D'un côté, au vu de la place du TNFR2 dans la signature des Tregs et de son rôle pour stimuler leur fonction et prolifération, il était peu surprenant qu'une population de Tregs tissulaires puisse être dépendante de son expression pour leur maintien. En revanche, cela était surprenant au regard du contexte d'obésité. Dans cette pathologie, une inflammation chronique du VAT est constatée, ainsi qu'une augmentation du TNF [279] et une chute de la proportion de Tregs [215].

Etudier l'axe TNF/TNFR2 dans la biologie des VAT-Tregs semblait donc être une recherche novatrice pour mieux comprendre leur fonctionnement, notamment dans le cadre de l'obésité. En revanche, nous nous sommes heurtés à un problème de taille. Les résultats que nous avons précédemment obtenus n'ont pas pu être reproduits par la suite. Nous avons tout d'abord pensé à une dérive génétique du modèle. Pour écarter cette hypothèse, nous avons développé un modèle dit « littermate » qui permet de réaliser les expériences sur des souris de la même portée. Malheureusement, les observations faites précédemment n'étaient pas non plus reproduites dans ce modèle. L'hypothèse la plus probable est donc qu'un changement dans l'environnement des souris a impacté la biologie du VAT. En effet, l'environnement peut avoir un fort impact sur ce tissu ainsi que sur les Tregs. Un stress chronique ou un changement dans le microbiote intestinal peuvent impacter la fonction du tissu adipeux et le métabolisme [344], [345]. De la même manière, ces deux paramètres peuvent également avoir un impact sur la population de Treg [346], [347].

La question se pose alors de savoir si cet impact a créé la dépendance au TNFR2 que nous avons précédemment observée, ou l'a masquée lorsque que nous n'avons pas pu reproduire nos résultats. En étudiant des données publiées d'analyse transcriptomique des VAT-Tregs nous avons observé que le transcrite du TNFR2 était fortement exprimé par cette population, par rapport au Tconv présents dans le même tissu ou aux Tregs présents dans d'autres tissus [215]. Il serait donc intéressant

de poursuivre cet axe de recherche en prenant en compte l'impact que les changements environnementaux peuvent avoir sur la biologie du VAT et des Tregs.

Rôle du TNFR2 en condition pathologique.

Bien que le rôle du TNFR2 dans la biologie des Tregs à l'état basal ne soit pas encore clair, son rôle dans différents contextes pathologiques est indéniable. Nous avons montré que le TNFR2 exprimé par les Tregs jouait un rôle fondamental dans le contrôle de l'EAE [292]. Sa délétion au sein des Tregs induisait une augmentation de l'inflammation dans le SNC et une aggravation de la pathologie. La fonction, plutôt que le nombre et la proportion, des Tregs était impactée. Une diminution de l'expression de CTLA-4 et de Blimp1 avait notamment été observée au niveau protéique mais pas au niveau de l'ARN. Leur fonction serait ainsi impactée ne permettant plus de réguler l'activation des Tconvs dont la production de GM-CSF était augmentée, participant au développement de la pathologie. Cette étude avait permis de mettre en évidence le rôle des Tregs exprimant le TNFR2 dans la suppression de l'inflammation dans le tissu cible au cours de la phase aiguë du développement de l'EAE. De plus, cela a démontré la dépendance des Tregs aux signaux environnementaux dans le tissu qu'ils doivent contrôler pour maintenir leur fonction. Dans le cadre de l'EAE, le rôle du TNF a été mis en évidence. Dans d'autres tissus, comme le VAT ou l'intestin, des études ont montré que les Tregs étaient dépendants de l'IL-33 [217], [219], [233]. Au vu de nos données sur le rôle du TNFR2 dans la biologie des VAT-Tregs, il se pourrait que le TNF ait également un rôle dans le VAT.

Nous nous sommes par la suite intéressés au rôle des Tregs exprimant le TNFR2 dans le contrôle de la croissance tumorale. La délétion du TNFR2 au sein des Tregs au cours de la croissance tumorale permettait de réduire le développement de la tumeur. Pour comprendre les mécanismes impliqués, nous avons surtout étudié la réponse immunitaire peu de temps après la déplétion du TNFR2 sur les Tregs (5 jours après l'administration de tamoxifène). Cela permet d'étudier les effets directs de cette déplétion et être moins impacté par les effets secondaires induits par l'inflammation. A ce moment-là, nous n'avions pas initialement observé d'impact majeur de l'ablation du TNFR2 aussi bien sur le phénotype des Tregs que sur celui des cellules cibles comme les LT CD4+ ou CD8+, à l'exception d'une augmentation de la production de granzyme B. Nous avons également étudié l'impact sur le compartiment myéloïde. Le nombre de neutrophiles était augmenté mais pas celui des autres cellules myéloïdes au sein des tumeurs. En revanche, les expressions d'INOS et de Ki67 étaient augmentées au sein de certains sous types de cellules myéloïdes. L'augmentation d'INOS suggère que les neutrophiles, les macrophages et les monocytes infiltrants la tumeur ont un profil très inflammatoire [348]. Un impact majeur sur la production de cytokine a également pu être mis en évidence. La production de TNF par les Tregs, les LT CD4+ et CD8+ infiltrant les tumeurs était

augmentée lorsque les Tregs étaient déplétés pour le TNFR2. Nous avons également observé une augmentation d'autres cytokines comme l'IFN γ , l'IL-17, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-10. Cet impact était observé uniquement au niveau des cellules infiltrant la tumeur et non dans les ganglions drainants, suggérant une fois de plus que les Tregs exprimant le TNFR2 agissent majoritairement dans le tissu cible au cours de la pathologie. Nous pouvons alors formuler l'hypothèse suivante : En absence de TNFR2 sur les Tregs, il y a très rapidement une augmentation de cytokines inflammatoires, essentiellement de TNF produit par les Tregs et les Tconv et d'IFN γ produit par les LT CD8+ qui pourraient alors activer les cellules myéloïdes. Cette activation semble concerner les neutrophiles, retrouvés en plus grande quantité. Il y a sans doute une augmentation du recrutement des monocytes inflammatoires dont la mesure où l'augmentation de cellules Ki67 suggère une arrivée récente de la moelle osseuse où elles s'expandent. Cette activation entraînerait une augmentation de la production d'iNOS par plusieurs types de cellules myéloïdes qui pourraient alors participer au rejet des cellules tumorales. Des études scRNAseq sont en cours pour essayer de valider ce schéma physiopathologique. Reste à comprendre pourquoi la perte du TNFR2 sur les Tregs entraîne une augmentation de production de cytokines inflammatoires. Nous voulons ici discuter l'hypothèse « TNF sink ».

En effet, ces résultats suggèrent que le TNFR2 exprimé par les Tregs agirait pour capturer et neutraliser le TNF environnant. Cette théorie du « TNF sink » propose que les Tregs permettraient de supprimer les réponses immunitaires dans les tissus inflammés via le TNFR2 en limitant les effets du TNF. Ce mécanisme rappelle celui utilisé par le CD25 pour capturer l'IL-2 dans l'environnement [170]. Cela serait permis à la fois par la liaison du TNF au TNFR2 membranaire, mais aussi par le TNFR2 libéré dans l'environnement par les Tregs. En effet, le TNFR2 membranaire peut subir un clivage, ce mécanisme est communément appelé « shedding » [349]. Cette étude avait suggéré que cela pourrait représenter un nouveau mécanisme permettant aux Tregs d'inhiber l'action du TNF. De manière intéressante, il a été observé qu'il y avait une corrélation entre la concentration de TNFR2 soluble dans la circulation et le développement du cancer chez les patients [350]. Cette étude suggérait que le TNFR2 soluble pouvait être utilisé comme biomarqueurs dans différents types de cancer. Nous proposons ici, qu'en plus d'être un biomarqueur, il participerait activement à la suppression de la réponse immunitaire antitumorale. Pour aller plus loin, des expériences utilisant des anti-TNF dans un modèle de cancer seront réalisées. En effet, si nous observons que les anti-TNF suppriment les effets observés de la délétion du TNFR2 sur les Tregs (en termes de croissance tumorale, augmentation des cytokines inflammatoires et activation des cellules myéloïdes), cela appuiera cette théorie.

Le TNFR2 aurait alors un double rôle pour les Tregs. D'un côté, sa signalisation intrinsèque permettrait de simuler la prolifération, la survie et la fonction des Tregs. De l'autre, il servirait aux Tregs de mécanisme de suppression en capturant le TNF produit par les cellules effectrices et en limitant son

action pro-inflammatoire. Cette théorie ne semble cependant pas compatible avec nos résultats concernant le rôle des Tregs exprimant le TNFR2 dans l'EAE. En effet, l'utilisation d'anti-TNF, bien qu'ayant des propriétés bénéfiques dans certaines maladies auto-immunes [284]–[288], ont des effets néfastes dans l'EAE ou chez des patients atteints de sclérose en plaques. Dans ce contexte, le TNFR2 semble préférentiellement jouer un rôle de stimulation pour les Tregs plutôt que de participer à leur fonction suppressive en capturant le TNF.

Cette théorie est néanmoins compatible avec les observations que nous avons faites sur le rôle du TNFR2 pour les VAT-Tregs. L'impact sur la population de Tregs pourrait être un effet indirect dû à l'augmentation du TNF présent dans le milieu. En effet, au cours de l'obésité, le TNF est présent en grande quantité et un impact sur la population de Treg est également observé. De plus, bien que le transcrite du TNFR2 soit fortement exprimé par les VAT-Tregs, nous n'avons pas retrouvé cette forte expression au niveau protéique (données non montrées). Cela est également en accord avec une théorie où le TNFR2 membranaire serait libéré par « shedding » pour capturer le TNF. Ajouté à cela, l'utilisation d'agoniste du TNFR2 n'avait pas permis de stimuler et de restaurer la population de VAT-Treg impactée dans un modèle murin d'obésité, suggérant que dans ce contexte, l'action du TNFR2 comme stimulateur des Tregs ne serait pas le mécanisme principal.

Pour finir, des données préliminaires suggèrent également que l'expression du TNFR2 serait primordial pour que les Tregs puissent contrôler l'inflammation induite dans un modèle de colite (données non montrées). En effet, lorsque le TNFR2 était délété au sein des Tregs, la survie des souris était drastiquement impactée. Le rôle fondamental du TNFR2 dans la fonction de régulation des Tregs, fait de ce récepteur une cible de choix dans ces différentes pathologies. Le développement de thérapie ciblant spécifiquement le TNFR2 et modulant l'activité des Tregs permettrait de mettre au point de nouveaux traitements.

Rôle de 4-1BB

4-1BB fait aussi partie de la signature clef des Tregs [272]. Sa stimulation par des agonistes semble aussi efficace que celle par le TNFR2 pour induire la prolifération et la survie des Tregs [274]. Le profil transcriptomique des Tregs stimulés par des agonistes du TNFR2 ou de 4-1BB est similaire. Cependant, la délétion de 4-1BB au sein des Tregs n'engendrait pas d'impact majeur que soit en condition physiologique ou pathologique. Ces données paraissent surprenantes au vu du rôle que des agonistes de 4-1BB ont dans l'EAE et dans le cancer.

Dans le cadre du cancer, il semblerait donc que les Tregs ne soient pas la cible préférentielle des agonistes permettant de réduire la croissance tumorale. Une étude avait en effet montré que les

agonistes de 4-1BB avait majoritairement un effet sur la stimulation des LT CD8+ cytotoxique infiltrant la tumeur [328]. Dans le cadre de l'EAE, l'interprétation semble plus complexe. En effet, nous avons tenté de reproduire les résultats de la littérature montrant un effet spectaculaire des agonistes de 4-1BB sur la sévérité de la pathologie [317]. Cependant, comme décrit précédemment, nous n'avons pas pu reproduire cet effet et l'utilisation d'agoniste de 4-1BB n'a eu aucun impact sur la sévérité de l'EAE. Cela remet en question les résultats précédemment décrits dans la littérature.

Au vu du rôle fondamental du TNFR2, il aurait été surprenant qu'un deuxième récepteur de la famille ait les mêmes conséquences sur le fonctionnement des Tregs. Cela suggère que le rôle du TNFR2 est unique et non redondant. Il se peut également que la délétion de 4-1BB ait peu d'impact car le TNFR2 pourrait compenser sa fonction. De plus, au vu du rôle du TNFR2 en lien avec les niveaux de TNF présent dans les différentes pathologies, l'absence d'impact que nous avons observé pourrait être dû au fait de la faible disponibilité du ligand de 4-1BB dans les différents contextes que nous avons étudiés. Pour conclure, le ciblage des Tregs par des thérapies utilisant des agonistes ou antagonistes de 4-1BB semblent moins prometteuses. Cependant, il semble peu probable que le 4-1BB faisant partie de la signature clef n'ait pas de rôle dans Tregs. Il se pourrait donc que nous n'ayons pas réussi à identifier les contextes dans lesquels 4-1BB aurait un rôle important dans la biologie des Tregs.

3. Les modèles CreLox

Les modèles murins génétiquement modifiés ont permis de faire de grandes avancées dans le domaine de la recherche en immunologie. Le rôle et l'impact de nombreuses voies de signalisation ont pu être étudiées en développant des modèles déficients pour différents récepteurs, facteur de transcription etc ... Cependant, ces délétions ciblaient toutes les cellules exprimant les gènes cibles, rendant parfois l'interprétation des résultats complexe. Par exemple, dans le cadre du TNFR2, ce dernier est exprimé par différents sous types de cellules immunitaires et même par des cellules non immunitaires comme les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins [351]. Une délétion globale du TNFR2 ne permettait donc pas de savoir quelle population l'exprimant jouait un rôle dans les différents contextes étudiés.

Le développement du modèle CreLox a permis la délétion spécifique d'un gène au sein d'une population d'intérêt, comme pour les Tregs en insérant la recombinaison Cre sous le contrôle des séquences régulatrices de *Foxp3*. Il a largement été utilisé pour étudier l'impact de la délétion d'un gène au sein des Tregs dans diverses conditions physiologiques ou pathologiques. Par exemple, l'équipe du Dr. Salomon a utilisé ce modèle pour mieux comprendre le rôle de la voie de signalisation NFκB, l'expression du TNFR2 ou de mTOR au sein des Tregs [292], [352], [353]. L'insertion d'une cassette STOP et de la tdTomato dans le locus *Rosa26* a permis de créer un modèle de « *fate mapping* » permettant de suivre la destinée des Tregs. Ce modèle a permis de nombreuses découvertes sur la population d'exTregs. Néanmoins, ce système présentait plusieurs limitations.

L'expression de la Cre en elle-même a un impact sur le développement, la proportion et le phénotype des LT [354]. Nous avons également pu observer un désavantage des Tregs exprimant la Cre par rapport aux Tregs sauvages chez des souris femelles *Foxp3^{Cre/+}*, hétérozygotes pour l'insertion de la Cre. Dans ce modèle, il devrait y avoir 50% de Tregs exprimant la Cre et 50% de Tregs sauvages, car l'inactivation aléatoire du chromosome X porteur du gène *Foxp3* conduit à cette répartition équilibrée. Cependant, nous avons observé une proportion plus faible, un phénotype et une prolifération altérée des Tregs exprimant la Cre, suggérant qu'ils avaient un désavantage (données non montrées). Il a par ailleurs été rapporté que l'insertion de la Cre conduisait à une réduction du niveau d'expression de *Foxp3* [355]. Il apparaît alors primordial d'utiliser les bons contrôles lors de l'utilisation des modèles CreLox. En effet, dans de nombreux articles, des souris qui n'expriment pas la Cre sont utilisées comme groupe témoin. Cela crée un désavantage supplémentaire pour l'autre groupe, qui exprime la Cre, en plus de la délétion d'un gène.

Comme discuté précédemment, ce modèle à un problème de fuite d'expression de la Cre. L'expression de la protéine fluorescente rapportrice résultant de la délétion de la cassette STOP a été observée dans des cellules non Tregs et même non immunitaires, montrant que le modèle n'est pas spécifique des Tregs [147]. Cela pose un problème à la fois pour l'étude des exTregs, mais aussi pour les modèles ciblant la délétion d'un gène au sein des Tregs. L'équipe a mis en évidence que la délétion du TNFR2 dans le modèle *Foxp3^{Cre}Tnfrsf1b^{fl}*, impacte également les Tconv, rendant l'interprétation des résultats délicate [292].

Le développement du modèle CreLox inducible a permis de remédier à cette limitation. En effet, le modèle *Foxp3^{Cre-ERT2}* est spécifique des Tregs. En plus de cet avantage, le modèle étant inducible, l'action de la Cre peut être induite à un temps voulu. Ce modèle remplace maintenant le modèle CreLox pour étudier l'impact de la délétion d'un gène. Il nous a permis de confirmer les résultats précédemment obtenus sur l'impact de la délétion du TNFR2 au sein des Tregs au cours de l'EAE [292] et de poursuivre nos recherches. Nous avons ainsi pu étudier l'impact de cette délétion au cours de la progression tumorale.

Ce modèle est également largement utilisé comme système de « fate mapping » dans l'étude des exTregs. La possibilité d'induire l'expression de la Cre à un temps voulu en fait un système de choix pour l'étude de l'ontogénie des Tregs. Cependant, comme discuté auparavant, les données de la littérature utilisant ce modèle sont assez disparates. L'induction de l'activité de la Cre par le tamoxifène donne naissance à de nombreux nouveaux paramètres qui nécessitent d'être finement contrôlés. En effet, le tamoxifène est utilisé comme traitement dans le cancer du sein, car il se lie sur les récepteurs aux œstrogènes des cellules cancéreuses, bloquant ainsi les effets stimulant des œstrogènes sur la croissance tumorale. Cependant, le tamoxifène présente certaines caractéristiques qui peuvent le rendre toxique. Il n'est pas hydrosoluble. Cette propriété peut entraîner une absorption intestinale inefficace et une biodisponibilité limitée. Il est administré sous une forme qui nécessite d'être métabolisée par le foie en des composés actifs. Le foie convertit le tamoxifène en plusieurs métabolites, dont le plus important est le 4-hydroxytamoxifène, mais d'autres métabolites toxiques peuvent également être générés. Finalement, la technologie utilisée pour détecter par cytométrie en flux les populations de Tregs et d'exTregs est un paramètre clef.

Administration du tamoxifène.

Le tamoxifène était tout d'abord administré par voie orale sous forme de croquettes. Cependant, ce régime alimentaire était peu appétant pour les souris, ce qui les conduisait à jeûner. Cela entraînait une forte perte de poids et l'impossibilité de contrôler la dose de tamoxifène administré. Des traitements par voie intrapéritonéale (IP) ou par gavage permettent de contrôler

précisément la dose administrée. Ils ont de plus l'avantage de pouvoir être adaptés en fonction de l'âge ou du poids des souris.

Le tamoxifène n'étant pas hydrosoluble, il était nécessaire de le diluer avec de l'éthanol puis dans une solution d'huile pour pouvoir l'administrer aux souris. Après plusieurs mises au point, nous avons finalement pu développer un protocole permettant de resurprendre le tamoxifène directement dans de l'huile d'arachide. Cela a permis de limiter en partie la toxicité du traitement administré aux souris. Cependant, quelle que soit la voie d'administration, le tamoxifène a un impact sur l'organisme, que nous avons principalement observé au niveau du VAT pour les administrations en IP, et au niveau du foie pour les administrations en gavage. Au niveau du VAT, le traitement induit une augmentation de la cellularité, de la proportion de Tregs et une altération de leur phénotype. Au niveau du foie, l'administration de deux doses de tamoxifène par gavage entraîne une altération du tissu. De plus, nous avons observé que le traitement tamoxifène induisait une descente d'organes, visible chez les mâles. Ce phénomène a précédemment été décrit dans la littérature, il s'agirait d'une hernie [356]. Le tamoxifène induirait l'expression de métalloprotéinase dans les fibroblastes, perturbant ainsi le collagène de la paroi abdominale. Ces paramètres nécessitent d'être pris en compte lors de l'interprétation des résultats. Une partie de la toxicité du traitement proviendrait de la qualité et du type d'huile utilisé. Des expériences comparant différentes huiles pourraient permettre d'améliorer le traitement et limiter la toxicité.

Le modèle CreLox inducible nous a permis d'étudier l'ontogénie des Tregs de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Pour aller plus loin dans cette étude, il serait intéressant de pouvoir distinguer les Tregs générés au cours de la gestation de ceux générés après la naissance. Traiter les mères gestantes au tamoxifène permettrait de distinguer les Tregs tagués pendant la gestation de ceux générés à posteriori. Cependant, le tamoxifène étant un antagoniste des œstrogènes, le traitement au cours de la gestation conduit à la mort des embryons. Le traitement des mères durant la gestation avec de la progestérone permet le développement de l'embryon en présence d'un traitement tamoxifène. Une mise bas classique n'est néanmoins pas possible, ce qui nécessite de réaliser une césarienne et l'accueil des nouveaux nés par des femelles en lactation [357]. Bien que l'utilisation de ce système soit délicate, il a permis de réaliser des avancées majeures concernant la colonisation des tissus par des populations immunitaires aux stades embryonnaires et persistantes chez l'adulte [358].

Nous avons mis en évidence la formation précoce du pool de Tregs présent dans la peau. Notre modèle ne nous permettait pas de déterminer à quel âge ces Tregs ont colonisé le tissu. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de pouvoir cibler uniquement les Tregs déjà présent au niveau de la peau deux semaines après la naissance. Des études utilisent des traitements cutanés avec du

tamoxifène pour induire l'expression de la Cre au niveau des cellules de la peau [359]. Dans ces modèles, le tamoxifène utilisé nécessite d'être sous forme active, le 4-hydroxytamoxifène (HO-Tam), car il ne sera pas métabolisé par le foie. Le HO-tam est reconstitué dans de l'acétone et directement appliqué sur les tissus. Nous avons utilisé cette approche pour taguer les Tregs au niveau de la peau deux semaines après la naissance. Bien que 80-90% des Tregs résidant exprimaient la tdTomato, nous avons également observé une forte proportion de Tregs positifs dans les ganglions et la rate (données non montrées). Cela suggère que le traitement n'était pas localisé et s'est répandu dans l'organisme, probablement via la circulation. De nouvelles mises au point devrait permettre d'obtenir un traitement qui reste localisé au niveau de la peau.

Durée et efficacité du traitement tamoxifène.

L'intérêt du modèle CreLox inducible réside notamment dans la possibilité d'induire l'activation de la Cre à un moment donné. Nous avons cherché à déterminer la durée d'activité du tamoxifène dans l'organisme, ce qui s'est avéré être entre 4 et 7 jours. En évaluant la proportion de Tregs taguées, nous avons observé une plus forte proportion 7 jours après le traitement par rapport à 5 jours. L'évaluation de l'efficacité du traitement au tamoxifène se fait soit en considérant le pourcentage de Tregs tagués, soit en examinant l'efficacité de la délétion du gène d'intérêt. Dans les deux cas, il semble exister des paramètres que nous ne comprenons pas encore complètement.

Concernant la proportion de Tregs tagués à la suite du traitement, elle est d'environ 80-90% suivant les tissus. On considère que les cellules qui n'expriment pas la tdTomato sont des cellules « non Tag ». Ces cellules peuvent être confondues avec la population que l'on nomme neoTreg et qui a été générée à la suite du traitement. Nous avons montré que la population de neoTregs était constituée de cellules ayant un phénotype naïf et non effecteur. Nous nous sommes également intéressés au phénotype de ces Tregs non tagués que nous analysons quelques jours après le traitement. De manière surprenante, leur phénotype était aussi celui de cellules naïves. La population de Tregs résistante au traitement tamoxifène pourrait donc être spécifique. Ces Tregs pourraient provenir d'une population de cellules quiescentes, par exemple, ayant une conformation ne permettant pas un accès de la recombinase Cre à l'ADN. En effet, nous retrouvons moins de cellules non Tag dans les organes non lymphoïdes où il y a peu de cellules ayant un phénotype naïf. Par exemple, la proportion de cellules Tag est plus importante dans la peau que dans tous les autres tissus, qui est l'organe où nous retrouvons les Tregs ayant le phénotype le plus activé. Leur phénotype étant similaire, il devient alors compliqué de faire la différence entre des Tregs non Tag de ceux qui se différencient après le traitement (les neoTregs). Cependant, si ces Tregs sont bien des cellules quiescentes et non activés, il

est peu probable qu'elles aient pu donner naissance à toute la population de neoTregs que nous observons plusieurs semaines après le traitement.

La délétion d'un gène d'intérêt, comme celui codant pour le TNFR2 ou 4-1BB, est extrêmement efficace suite au traitement tamoxifène. Cette délétion a lieu dans les tagTregs où la Cre a également permis l'expression de la tdTomato. Cependant, nous avons observé une baisse d'expression du TNFR2 dans les neoTregs n'exprimant pas la tdTomato. Cela peut donner lieu à deux hypothèses. Premièrement, cette observation pourrait provenir d'un défaut du modèle. Les Tregs que l'on nomme non Tag, n'aurait pas recombinaison la cassette stop permettant l'expression de la tdTomato. Cependant, la Cre serait tout de même active et aurait recombinaison les sites LoxP présents au niveau du gène codant pour TNFR2. Cette hypothèse serait surprenante, car cela implique qu'au sein d'une même cellule, la Cre a pu avoir accès au gène codant pour TNFR2 mais pas au locus *Rosa26*. Deuxièmement, la baisse d'expression du TNFR2 observé était au niveau protéique. Il serait intéressant de savoir si ces neoTregs n'exprimant pas le TNFR2 ont recombinaison les sites loxP du gène. Cela permettrait de déterminer si cette baisse est un phénomène intrinsèque dû à l'activité de la Cre, ou extrinsèque dû à l'environnement. En effet, si c'est neoTregs n'ont pas de délétion de la cassette stop présente au niveau du locus *Rosa26*, cela signifie que la délétion du TNFR2 au sein des tagTregs a impacté l'expression du TNFR2 au sein des neoTregs.

Les modèles CreLox inducible ont permis de faire de nombreuses découvertes. Cependant, ce sont des modèles complexes dont l'utilisation nécessite une gestion minutieuse pour éviter de mauvaises interprétations des résultats. Il est important de noter que bien que nous maîtrisons de mieux en mieux ces modèles, il subsiste encore des aspects que nous ne comprenons pas pleinement. Pour exploiter tout leur potentiel, il est essentiel de continuer à explorer et à approfondir notre compréhension.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Nikolich-Žugich, M. K. Slifka, et I. Messaoudi, « The many important facets of T-cell repertoire diversity », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, n° 2, Art. n° 2, févr. 2004, doi: 10.1038/nri1292.
- [2] V. I. Zarnitsyna, B. D. Evavold, L. N. Schoettle, J. N. Blattman, et R. Antia, « Estimating the Diversity, Completeness, and Cross-Reactivity of the T Cell Repertoire », *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 485, déc. 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00485.
- [3] S. Tuzlak *et al.*, « Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help », *Nat. Immunol.*, vol. 22, n° 10, Art. n° 10, oct. 2021, doi: 10.1038/s41590-021-01009-w.
- [4] K. L. Hilligan et F. Ronchese, « Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses », *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 17, n° 6, p. 587-599, juin 2020, doi: 10.1038/s41423-020-0465-0.
- [5] P. Kisielow, H. Blüthmann, U. D. Staerz, M. Steinmetz, et H. von Boehmer, « Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes », *Nature*, vol. 333, n° 6175, Art. n° 6175, juin 1988, doi: 10.1038/333742a0.
- [6] F. Camaglia *et al.*, « Quantifying changes in the T cell receptor repertoire during thymic development », *eLife*, vol. 12, p. e81622, janv. 2023, doi: 10.7554/eLife.81622.
- [7] L. Klein, M. Klugmann, K. A. Nave, V. K. Tuohy, et B. Kyewski, « Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells », *Nat. Med.*, vol. 6, n° 1, p. 56-61, janv. 2000, doi: 10.1038/71540.
- [8] S. N. Sansom *et al.*, « Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia », *Genome Res.*, vol. 24, n° 12, p. 1918-1931, déc. 2014, doi: 10.1101/gr.171645.113.
- [9] J. DeVoss *et al.*, « Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen », *J. Exp. Med.*, vol. 203, n° 12, p. 2727-2735, nov. 2006, doi: 10.1084/jem.20061864.
- [10] H. Takaba *et al.*, « Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance », *Cell*, vol. 163, n° 4, p. 975-987, nov. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.10.013.
- [11] C. M. Witt, S. Raychaudhuri, B. Schaefer, A. K. Chakraborty, et E. A. Robey, « Directed Migration of Positively Selected Thymocytes Visualized in Real Time », *PLoS Biol.*, vol. 3, n° 6, p. e160, juin 2005, doi: 10.1371/journal.pbio.0030160.
- [12] T. Mora et A. M. Walczak, « Towards a quantitative theory of tolerance », *Trends Immunol.*, mai 2023, doi: 10.1016/j.it.2023.04.008.
- [13] M. Irla, « Instructive Cues of Thymic T Cell Selection », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 40, n° 1, p. 95-119, avr. 2022, doi: 10.1146/annurev-immunol-101320-022432.
- [14] J. Baran-Gale *et al.*, « Ageing compromises mouse thymus function and remodels epithelial cell differentiation », *eLife*, vol. 9, p. e56221, août 2020, doi: 10.7554/eLife.56221.
- [15] S. Yang, N. Fujikado, D. Kolodin, C. Benoist, et D. Mathis, « Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance », *Science*, vol. 348, n° 6234, p. 589-594, mai 2015, doi: 10.1126/science.aaa7017.
- [16] B. D. Stadinski *et al.*, « A temporal thymic selection switch and ligand binding kinetics constrain neonatal Foxp3+ Treg cell development », *Nat. Immunol.*, vol. 20, n° 8, p. 1046-1058, août 2019, doi: 10.1038/s41590-019-0414-1.
- [17] E. S. Huseby, B. Sather, P. G. Huseby, et J. Goverman, « Age-dependent T cell tolerance and autoimmunity to myelin basic protein », *Immunity*, vol. 14, n° 4, p. 471-481, avr. 2001, doi: 10.1016/s1074-7613(01)00127-3.
- [18] M. Dong *et al.*, « Alterations in the Thymic Selection Threshold Skew the Self-Reactivity of the TCR Repertoire in Neonates », *J. Immunol.*, vol. 199, n° 3, p. 965-973, août 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1602137.
- [19] K. Signorelli, C. Benoist, et D. Mathis, « Why is clonal deletion of neonatal thymocytes defective? », *Eur. J. Immunol.*, vol. 22, n° 10, p. 2487-2493, oct. 1992, doi: 10.1002/eji.1830221004.

- [20] Q. He *et al.*, « Thymic development of autoreactive T cells in NOD mice is regulated in an age-dependent manner », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 191, n° 12, p. 5858-5866, déc. 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1302273.
- [21] W. F. Wong *et al.*, « The artificial loss of Runx1 reduces the expression of quiescence-associated transcription factors in CD4+ T lymphocytes », *Mol. Immunol.*, vol. 68, n° 2, Part A, p. 223-233, déc. 2015, doi: 10.1016/j.molimm.2015.08.012.
- [22] Y. M. Kerdiles *et al.*, « Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor », *Nat. Immunol.*, vol. 10, n° 2, p. 176-184, févr. 2009, doi: 10.1038/ni.1689.
- [23] D. Malhotra *et al.*, « Polyclonal CD4+ T cell tolerance is established by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns », *Nat. Immunol.*, vol. 17, n° 2, p. 187-195, févr. 2016, doi: 10.1038/ni.3327.
- [24] « Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen », *J. Exp. Med.*, vol. 177, n° 5, p. 1517-1521, mai 1993.
- [25] R. J. Martinez *et al.*, « Arthritogenic self-reactive CD4+ T cells acquire an FR4hiCD73hi anergic state in the presence of Foxp3+ regulatory T cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 188, n° 1, p. 170-181, janv. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1101311.
- [26] S. D. Blackburn *et al.*, « Coregulation of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection by multiple inhibitory receptors », *Nat. Immunol.*, vol. 10, n° 1, p. 29-37, janv. 2009, doi: 10.1038/ni.1679.
- [27] J. R. Reed *et al.*, « Telomere erosion in memory T cells induced by telomerase inhibition at the site of antigenic challenge in vivo », *J. Exp. Med.*, vol. 199, n° 10, p. 1433-1443, mai 2004, doi: 10.1084/jem.20040178.
- [28] J. Dhein, H. Walczak, C. Bäuml, K.-M. Debatin, et P. H. Krammer, « Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95) », *Nature*, vol. 373, n° 6513, Art. n° 6513, févr. 1995, doi: 10.1038/373438a0.
- [29] D. A. Hildeman, Y. Zhu, T. C. Mitchell, J. Kappler, et P. Marrack, « Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo », *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, n° 3, p. 354-359, juin 2002, doi: 10.1016/s0952-7915(02)00335-7.
- [30] L. Barron, B. Knoechel, J. Lohr, et A. K. Abbas, « Cutting edge: contributions of apoptosis and anergy to systemic T cell tolerance », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 180, n° 5, p. 2762-2766, mars 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.5.2762.
- [31] M. A. ElTanbouly et R. J. Noelle, « Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 21, n° 4, Art. n° 4, avr. 2021, doi: 10.1038/s41577-020-00454-2.
- [32] M. E. Brunkow *et al.*, « Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse », *Nat. Genet.*, vol. 27, n° 1, p. 68-73, janv. 2001, doi: 10.1038/83784.
- [33] C. L. Bennett *et al.*, « The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3 », *Nat. Genet.*, vol. 27, n° 1, p. 20-21, janv. 2001, doi: 10.1038/83713.
- [34] H. Groux *et al.*, « A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis », *Nature*, vol. 389, n° 6652, p. 737-742, oct. 1997, doi: 10.1038/39614.
- [35] N. Benallegue *et al.*, « Patients With Severe Multiple Sclerosis Exhibit Functionally Altered CD8+ Regulatory T Cells », *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation*, vol. 9, n° 6, p. e200016, oct. 2022, doi: 10.1212/NXI.000000000200016.
- [36] S. Ostrand-Rosenberg, T. J. Lamb, et G. Pawelec, « Here, There, and Everywhere: Myeloid-Derived Suppressor Cells in Immunology », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 210, n° 9, p. 1183-1197, mai 2023, doi: 10.4049/jimmunol.2200914.
- [37] D. Catalán *et al.*, « Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells », *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 611795, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.611795.

- [38] C. C. Brown et A. Y. Rudensky, « Spatiotemporal regulation of peripheral T cell tolerance », *Science*, vol. 380, n° 6644, p. 472-478, mai 2023, doi: 10.1126/science.adg6425.
- [39] J. Larkin *et al.*, « CD4+CD25+ Regulatory T Cell Repertoire Formation Shaped by Differential Presentation of Peptides from a Self-Antigen », *J. Immunol.*, vol. 180, n° 4, p. 2149-2157, févr. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2149.
- [40] K. Kawahata *et al.*, « Generation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells from Autoreactive T Cells Simultaneously with Their Negative Selection in the Thymus and from Nonautoreactive T Cells by Endogenous TCR Expression », *J. Immunol.*, vol. 168, n° 9, p. 4399-4405, mai 2002, doi: 10.4049/jimmunol.168.9.4399.
- [41] K. Aschenbrenner *et al.*, « Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells », *Nat. Immunol.*, vol. 8, n° 4, p. 351-358, avr. 2007, doi: 10.1038/ni1444.
- [42] J. Lin *et al.*, « Increased generation of Foxp3+ regulatory T cells by manipulating antigen presentation in the thymus », *Nat. Commun.*, vol. 7, n° 1, p. 10562, févr. 2016, doi: 10.1038/ncomms10562.
- [43] C.-S. Hsieh, Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot, et A. Y. Rudensky, « An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires », *Nat. Immunol.*, vol. 7, n° 4, p. 401-410, avr. 2006, doi: 10.1038/ni1318.
- [44] H. Morikawa et S. Sakaguchi, « Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells », *Immunol. Rev.*, vol. 259, n° 1, p. 192-205, 2014, doi: 10.1111/imr.12174.
- [45] M. Watanabe, Y. Lu, M. Breen, et R. J. Hodes, « B7-CD28 co-stimulation modulates central tolerance via thymic clonal deletion and Treg generation through distinct mechanisms », *Nat. Commun.*, vol. 11, p. 6264, déc. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-20070-x.
- [46] C.-W. J. Lio et C.-S. Hsieh, « A two-step process for thymic regulatory T cell development », *Immunity*, vol. 28, n° 1, p. 100-111, janv. 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.021.
- [47] D. L. Owen *et al.*, « Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs », *Nat. Immunol.*, vol. 20, n° 2, p. 195-205, févr. 2019, doi: 10.1038/s41590-018-0289-6.
- [48] D. Bending *et al.*, « A timer for analyzing temporally dynamic changes in transcription during differentiation in vivo », *J. Cell Biol.*, vol. 217, n° 8, p. 2931-2950, août 2018, doi: 10.1083/jcb.201711048.
- [49] X. Tai *et al.*, « Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals », *Immunity*, vol. 38, n° 6, p. 1116-1128, juin 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.022.
- [50] L. Wyss *et al.*, « Affinity for self antigen selects Treg cells with distinct functional properties », *Nat. Immunol.*, vol. 17, n° 9, p. 1093-1101, sept. 2016, doi: 10.1038/ni.3522.
- [51] E. Yang, T. Zou, T. M. Lechner, S. L. Zhang, et T. Kambayashi, « Both retention and recirculation contribute to long-lived regulatory T cell accumulation in the thymus », *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, n° 9, p. 2712-2720, sept. 2014, doi: 10.1002/eji.201444529.
- [52] D. L. Owen, R. S. La Rue, S. A. Munro, et M. A. Farrar, « Tracking Regulatory T Cell Development in the Thymus Using Single-Cell RNA Sequencing/TCR Sequencing », *J. Immunol.*, vol. 209, n° 7, p. 1300-1313, oct. 2022, doi: 10.4049/jimmunol.2200089.
- [53] N. Thiault *et al.*, « Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors », *Nat. Immunol.*, vol. 16, n° 6, p. 628-634, juin 2015, doi: 10.1038/ni.3150.
- [54] « Rethinking Thymic Tolerance: Lessons from Mice », *Trends Immunol.*, vol. 40, n° 4, p. 279-291, avr. 2019, doi: 10.1016/j.it.2019.01.011.
- [55] R. S. Paiva *et al.*, « Recent thymic emigrants are the preferential precursors of regulatory T cells differentiated in the periphery », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, n° 16, p. 6494-6499, avr. 2013, doi: 10.1073/pnas.1221955110.

- [56] G. Wang, Y. Miyahara, Z. Guo, M. Khattar, S. M. Stepkowski, et W. Chen, « “Default” generation of neonatal regulatory T cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 185, n° 1, p. 71-78, juill. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0903806.
- [57] B. Martin *et al.*, « Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells », *Nat. Commun.*, vol. 4, n° 1, Art. n° 1, juill. 2013, doi: 10.1038/ncomms3209.
- [58] W. Chen *et al.*, « Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3 », *J. Exp. Med.*, vol. 198, n° 12, p. 1875-1886, déc. 2003, doi: 10.1084/jem.20030152.
- [59] Y. Liu, P. Zhang, J. Li, A. B. Kulkarni, S. Perruche, et W. Chen, « A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells », *Nat. Immunol.*, vol. 9, n° 6, p. 632-640, juin 2008, doi: 10.1038/ni.1607.
- [60] A. Laurence *et al.*, « Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation », *Immunity*, vol. 26, n° 3, p. 371-381, mars 2007, doi: 10.1016/j.immuni.2007.02.009.
- [61] C. Neumann *et al.*, « c-Maf-dependent Treg cell control of intestinal TH17 cells and IgA establishes host-microbiota homeostasis », *Nat. Immunol.*, vol. 20, n° 4, Art. n° 4, avr. 2019, doi: 10.1038/s41590-019-0316-2.
- [62] E. Sefik *et al.*, « Individual intestinal symbionts induce a distinct population of RORγ+ regulatory T cells », *Science*, vol. 349, n° 6251, p. 993-997, août 2015, doi: 10.1126/science.aaa9420.
- [63] S. K. Lathrop *et al.*, « Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota », *Nature*, vol. 478, n° 7368, p. 250-254, sept. 2011, doi: 10.1038/nature10434.
- [64] K. Atarashi *et al.*, « Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species », *Science*, vol. 331, n° 6015, p. 337-341, janv. 2011, doi: 10.1126/science.1198469.
- [65] S. K. Lathrop, N. A. Santacruz, D. Pham, J. Luo, et C.-S. Hsieh, « Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population », *J. Exp. Med.*, vol. 205, n° 13, p. 3105-3117, déc. 2008, doi: 10.1084/jem.20081359.
- [66] D. Esterházy, J. Loschko, M. London, V. Jove, T. Y. Oliveira, et D. Mucida, « Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and tolerance », *Nat. Immunol.*, vol. 17, n° 5, p. 545-555, mai 2016, doi: 10.1038/ni.3408.
- [67] B. Akagbosu *et al.*, « Novel antigen-presenting cell imparts Treg-dependent tolerance to gut microbiota », *Nature*, vol. 610, n° 7933, p. 752-760, oct. 2022, doi: 10.1038/s41586-022-05309-5.
- [68] P. Soroosh *et al.*, « Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance », *J. Exp. Med.*, vol. 210, n° 4, p. 775-788, avr. 2013, doi: 10.1084/jem.20121849.
- [69] A. M. Thornton *et al.*, « Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 184, n° 7, p. 3433-3441, avr. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0904028.
- [70] E. Szurek *et al.*, « Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells », *PLoS One*, vol. 10, n° 10, p. e0141161, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0141161.
- [71] J. M. Weiss *et al.*, « Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells », *J. Exp. Med.*, vol. 209, n° 10, p. 1723-1742, S1, sept. 2012, doi: 10.1084/jem.20120914.
- [72] M. Yadav *et al.*, « Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo », *J. Exp. Med.*, vol. 209, n° 10, p. 1713-1722, S1-19, sept. 2012, doi: 10.1084/jem.20120822.
- [73] C. Koenecke *et al.*, « Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3+ Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD », *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, n° 11, p. 3091-3096, nov. 2009, doi: 10.1002/eji.200939432.
- [74] M. A. Curotto De Lafaille et J. J. Lafaille, « Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? », *Immunity*, vol. 30, n° 5, p. 626-635, mai 2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.002.

- [75] J. D. Fontenot, J. L. Dooley, A. G. Farr, et A. Y. Rudensky, « Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny », *J. Exp. Med.*, vol. 202, n° 7, p. 901-906, oct. 2005, doi: 10.1084/jem.20050784.
- [76] J. Raynor, A. Sholl, D. R. Plas, P. Bouillet, C. A. Chougnet, et D. A. Hildeman, « IL-15 Fosters Age-Driven Regulatory T Cell Accrual in the Face of Declining IL-2 Levels », *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 161, 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00161.
- [77] Y. Elyahu *et al.*, « Aging promotes reorganization of the CD4 T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes », *Sci. Adv.*, vol. 5, n° 8, p. eaaw8330, août 2019, doi: 10.1126/sciadv.aaw8330.
- [78] W. Hu *et al.*, « Regulatory T cells function in established systemic inflammation and reverse fatal autoimmunity », *Nat. Immunol.*, vol. 22, n° 9, p. 1163-1174, sept. 2021, doi: 10.1038/s41590-021-01001-4.
- [79] A. Weckel *et al.*, « Long-term tolerance to skin commensals is established neonatally through a specialized dendritic cell subgroup », *Immunity*, vol. 56, n° 6, p. 1239-1254.e7, juin 2023, doi: 10.1016/j.immuni.2023.03.008.
- [80] T. C. Scharschmidt *et al.*, « A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes », *Immunity*, vol. 43, n° 5, p. 1011-1021, nov. 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.10.016.
- [81] Z. Al Nabhani *et al.*, « A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult », *Immunity*, vol. 50, n° 5, p. 1276-1288.e5, mai 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.02.014.
- [82] A. Pratama, A. Schnell, D. Mathis, et C. Benoist, « Developmental and cellular age direct conversion of CD4+ T cells into ROR γ + or Helios+ colon Treg cells », *J. Exp. Med.*, vol. 217, n° 1, p. e20190428, nov. 2019, doi: 10.1084/jem.20190428.
- [83] E. Gambineri *et al.*, « Clinical, Immunological, and Molecular Heterogeneity of 173 Patients With the Phenotype of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked (IPEX) Syndrome », *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 2411, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02411.
- [84] P.-Y. Mantel *et al.*, « Molecular Mechanisms Underlying FOXP3 Induction in Human T Cells1 », *J. Immunol.*, vol. 176, n° 6, p. 3593-3602, mars 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.6.3593.
- [85] Y. Kitagawa *et al.*, « Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment », *Nat. Immunol.*, vol. 18, n° 2, Art. n° 2, févr. 2017, doi: 10.1038/ni.3646.
- [86] Y. Zheng, S. Josefowicz, A. Chaudhry, X. P. Peng, K. Forbush, et A. Y. Rudensky, « Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate », *Nature*, vol. 463, n° 7282, p. 808-812, févr. 2010, doi: 10.1038/nature08750.
- [87] A. Raugh, D. Allard, et M. Bettini, « Nature vs. nurture: FOXP3, genetics, and tissue environment shape Treg function », *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 911151, août 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.911151.
- [88] R. Kawakami *et al.*, « Distinct Foxp3 enhancer elements coordinate development, maintenance, and function of regulatory T cells », *Immunity*, vol. 54, n° 5, p. 947-961.e8, mai 2021, doi: 10.1016/j.immuni.2021.04.005.
- [89] L. Xu, A. Kitani, C. Stuelten, G. McGrady, I. Fuss, et W. Strober, « Positive and Negative Transcriptional Regulation of the Foxp3 Gene is Mediated by Access and Binding of the Smad3 Protein to Enhancer I », *Immunity*, vol. 33, n° 3, p. 313-325, sept. 2010, doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.001.
- [90] S. Floess *et al.*, « Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells », *PLoS Biol.*, vol. 5, n° 2, p. e38, févr. 2007, doi: 10.1371/journal.pbio.0050038.
- [91] J. Li *et al.*, « Control of Foxp3 induction and maintenance by sequential histone acetylation and DNA demethylation », *Cell Rep.*, vol. 37, n° 11, p. 110124, déc. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.110124.
- [92] R. Yang *et al.*, « Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3 Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis », *Immunity*, vol. 43, n° 2, p. 251-263, août 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.017.

- [93] G. Garg *et al.*, « Blimp1 Prevents Methylation of Foxp3 and Loss of Regulatory T Cell Identity at Sites of Inflammation », *Cell Rep.*, vol. 26, n° 7, p. 1854-1868.e5, févr. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.070.
- [94] M. Ito, M. Iizuka-Koga, M. Ando, et A. Yoshimura, « Development and Functional Modulation of Regulatory T Cells by Transcription Factors and Epigenetics », *Cornea*, vol. 37, p. S42, nov. 2018, doi: 10.1097/ICO.0000000000001720.
- [95] W. Lin *et al.*, « Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3 », *Nat. Immunol.*, vol. 8, n° 4, Art. n° 4, avr. 2007, doi: 10.1038/ni1445.
- [96] S. Koizumi et H. Ishikawa, « Transcriptional Regulation of Differentiation and Functions of Effector T Regulatory Cells », *Cells*, vol. 8, n° 8, p. 939, août 2019, doi: 10.3390/cells8080939.
- [97] K. Schumann *et al.*, « Functional CRISPR dissection of gene networks controlling human regulatory T cell identity », *Nat. Immunol.*, vol. 21, n° 11, p. 1456-1466, nov. 2020, doi: 10.1038/s41590-020-0784-4.
- [98] W. Fu *et al.*, « A multiple redundant genetic switch locks in the transcriptional signature of T regulatory cells », *Nat. Immunol.*, vol. 13, n° 10, p. 972-980, oct. 2012, doi: 10.1038/ni.2420.
- [99] W. Ouyang *et al.*, « Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control Treg cell function », *Nature*, vol. 491, n° 7425, Art. n° 7425, nov. 2012, doi: 10.1038/nature11581.
- [100] R. Takahashi *et al.*, « SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production », *J. Exp. Med.*, vol. 208, n° 10, p. 2055-2067, sept. 2011, doi: 10.1084/jem.20110428.
- [101] N. Ohkura *et al.*, « T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development », *Immunity*, vol. 37, n° 5, p. 785-799, nov. 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.010.
- [102] M. DuPage *et al.*, « The Chromatin-Modifying Enzyme Ezh2 Is Critical for the Maintenance of Regulatory T Cell Identity after Activation », *Immunity*, vol. 42, n° 2, p. 227-238, févr. 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.007.
- [103] A. Arvey, J. van der Veecken, R. M. Samstein, Y. Feng, J. A. Stamatoyannopoulos, et A. Y. Rudensky, « Inflammation-induced repression of Foxp3-bound chromatin in regulatory T cells », *Nat. Immunol.*, vol. 15, n° 6, p. 580-587, juin 2014, doi: 10.1038/ni.2868.
- [104] M. M. Gonzalez *et al.*, « BMI1 maintains the Treg epigenomic landscape to prevent inflammatory bowel disease », *J. Clin. Invest.*, vol. 131, n° 12, p. e140755, doi: 10.1172/JCI140755.
- [105] C. Kressler *et al.*, « Targeted De-Methylation of the FOXP3-TSDR Is Sufficient to Induce Physiological FOXP3 Expression but Not a Functional Treg Phenotype », *Front. Immunol.*, vol. 11, 2021, Consulté le: 4 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.609891>
- [106] J. A. Hill *et al.*, « Foxp3 Transcription-Factor-Dependent and -Independent Regulation of the Regulatory T Cell Transcriptional Signature », *Immunity*, vol. 27, n° 5, p. 786-800, nov. 2007, doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.010.
- [107] Y. Zheng, S. Z. Josefowicz, A. Kas, T.-T. Chu, M. A. Gavin, et A. Y. Rudensky, « Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells », *Nature*, vol. 445, n° 7130, p. 936-940, févr. 2007, doi: 10.1038/nature05563.
- [108] H.-K. Kwon, H.-M. Chen, D. Mathis, et C. Benoist, « Different molecular complexes that mediate transcriptional induction and repression by FoxP3 », *Nat. Immunol.*, vol. 18, n° 11, p. 1238-1248, nov. 2017, doi: 10.1038/ni.3835.
- [109] Y. Wu *et al.*, « FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT », *Cell*, vol. 126, n° 2, p. 375-387, juill. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.05.042.
- [110] M. Ono *et al.*, « Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1 », *Nature*, vol. 446, n° 7136, p. 685-689, avr. 2007, doi: 10.1038/nature05673.
- [111] F. Pan *et al.*, « Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in regulatory T cells », *Science*, vol. 325, n° 5944, p. 1142-1146, août 2009, doi: 10.1126/science.1176077.

- [112] J. van der Veeke *et al.*, « The Transcription Factor Foxp3 Shapes Regulatory T Cell Identity by Tuning the Activity of trans-Acting Intermediaries », *Immunity*, vol. 53, n° 5, p. 971-984.e5, nov. 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.010.
- [113] G. A. Dolsten et Y. Pritykin, « Genomic Analysis of Foxp3 Function in Regulatory T Cells », *J. Immunol.*, vol. 210, n° 7, p. 880-887, avr. 2023, doi: 10.4049/jimmunol.2200864.
- [114] R. M. Samstein *et al.*, « Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification », *Cell*, vol. 151, n° 1, p. 153-166, sept. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.053.
- [115] R. N. Ramirez, K. Chowdhary, J. Leon, D. Mathis, et C. Benoist, « FoxP3 associates with enhancer-promoter loops to regulate Treg-specific gene expression », *Sci. Immunol.*, vol. 7, n° 67, p. eabj9836, janv. 2022, doi: 10.1126/sciimmunol.abj9836.
- [116] N. Sugimoto *et al.*, « Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis », *Int. Immunol.*, vol. 18, n° 8, p. 1197-1209, août 2006, doi: 10.1093/intimm/dxl060.
- [117] J. Wang, A. Ioan-Facsinay, E. I. H. van der Voort, T. W. J. Huizinga, et R. E. M. Toes, « Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells », *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, n° 1, p. 129-138, janv. 2007, doi: 10.1002/eji.200636435.
- [118] N. Seddiki *et al.*, « Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells », *J. Exp. Med.*, vol. 203, n° 7, p. 1693-1700, juill. 2006, doi: 10.1084/jem.20060468.
- [119] N. E. Aerts, E. J. Dombrecht, D. G. Ebo, C. H. Bridts, W. J. Stevens, et L. S. De Clerck, « Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis », *Cell. Immunol.*, vol. 251, n° 2, p. 109-115, févr. 2008, doi: 10.1016/j.cellimm.2008.04.008.
- [120] M. D. M. Del Pozo-Balado, M. Leal, G. Méndez-Lagares, et Y. M. Pacheco, « CD4(+)CD25(+)/hiCD127(lo) phenotype does not accurately identify regulatory T cells in all populations of HIV-infected persons », *J. Infect. Dis.*, vol. 201, n° 3, p. 331-335, févr. 2010, doi: 10.1086/649840.
- [121] M. Miyara *et al.*, « Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor », *Immunity*, vol. 30, n° 6, p. 899-911, juin 2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019.
- [122] A. E. Overacre-Delgoffe *et al.*, « Interferon- γ drives Treg fragility to promote anti-tumor immunity », *Cell*, vol. 169, n° 6, p. 1130-1141.e11, juin 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.005.
- [123] L. M. Williams et A. Y. Rudensky, « Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3 », *Nat. Immunol.*, vol. 8, n° 3, p. 277-284, mars 2007, doi: 10.1038/ni1437.
- [124] V. Sasidharan Nair, M. H. Song, et K. I. Oh, « Vitamin C Facilitates Demethylation of the Foxp3 Enhancer in a Tet-Dependent Manner », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 196, n° 5, p. 2119-2131, mars 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1502352.
- [125] S. Junius *et al.*, « Unstable regulatory T cells, enriched for naïve and Nrp1neg cells, are purged after fate challenge », *Sci. Immunol.*, vol. 6, n° 61, p. eabe4723, juill. 2021, doi: 10.1126/sciimmunol.abe4723.
- [126] L. Xu, A. Kitani, I. Fuss, et W. Strober, « 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. Baltim. Md 1950*, vol. 178, n° 11, p. 6725-6729, juin 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.11.6725.
- [127] S. G. Zheng, J. Wang, et D. A. Horwitz, « Cutting Edge: Foxp3+CD4+CD25+ Regulatory T Cells Induced by IL-2 and TGF- β Are Resistant to Th17 Conversion by IL-61 », *J. Immunol.*, vol. 180, n° 11, p. 7112-7116, juin 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7112.
- [128] A. Laurence *et al.*, « STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease », *Immunity*, vol. 37, n° 2, p. 209-222, août 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.027.

- [129] Y. Feng, A. Arvey, T. Chinen, J. van der Veecken, G. Gasteiger, et A. Y. Rudensky, « Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus », *Cell*, vol. 158, n° 4, p. 749-763, août 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.07.031.
- [130] A. Freuchet *et al.*, « Identification of human exTreg cells as CD16+CD56+ cytotoxic CD4+ T cells », *Nat. Immunol.*, août 2023, doi: 10.1038/s41590-023-01589-9.
- [131] S. Fisson *et al.*, « Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state », *J. Exp. Med.*, vol. 198, n° 5, p. 737-746, sept. 2003, doi: 10.1084/jem.20030686.
- [132] J. H. Duarte, S. Zelenay, M.-L. Bergman, A. C. Martins, et J. Demengeot, « Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions », *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, n° 4, p. 948-955, avr. 2009, doi: 10.1002/eji.200839196.
- [133] X. Zhou *et al.*, « Foxp3 instability leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo », *Nat. Immunol.*, vol. 10, n° 9, p. 1000-1007, sept. 2009, doi: 10.1038/ni.1774.
- [134] N. Komatsu, M. E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann, et S. Hori, « Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n° 6, p. 1903-1908, févr. 2009, doi: 10.1073/pnas.0811556106.
- [135] N. Komatsu *et al.*, « Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis », *Nat. Med.*, vol. 20, n° 1, p. 62-68, janv. 2014, doi: 10.1038/nm.3432.
- [136] E. Yurchenko *et al.*, « Inflammation-Driven Reprogramming of CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells into Pathogenic Th1/Th17 T Effectors Is Abrogated by mTOR Inhibition in vivo », *PLOS ONE*, vol. 7, n° 4, p. e35572, avr. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0035572.
- [137] A. Nagy, « Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring », *genesis*, vol. 26, n° 2, p. 99-109, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B.
- [138] B. P. Zambrowicz, A. Imamoto, S. Fiering, L. A. Herzenberg, W. G. Kerr, et P. Soriano, « Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, n° 8, p. 3789-3794, avr. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.8.3789.
- [139] T. Miyao *et al.*, « Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells », *Immunity*, vol. 36, n° 2, p. 262-275, févr. 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.012.
- [140] C. Petzold *et al.*, « Fluorochrome-based definition of naturally occurring Foxp3(+) regulatory T cells of intra- and extrathymic origin », *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, n° 12, p. 3632-3645, déc. 2014, doi: 10.1002/eji.201444750.
- [141] V. S. Pelly *et al.*, « Interleukin 4 promotes the development of ex-Foxp3 Th2 cells during immunity to intestinal helminths », *J. Exp. Med.*, vol. 214, n° 6, p. 1809-1826, juin 2017, doi: 10.1084/jem.20161104.
- [142] Z. Zhang, W. Zhang, J. Guo, Q. Gu, X. Zhu, et X. Zhou, « Activation and Functional Specialization of Regulatory T Cells Lead to the Generation of Foxp3 Instability », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 198, n° 7, p. 2612-2625, avr. 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1601409.
- [143] S. L. Bailey-Bucktrout *et al.*, « Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response », *Immunity*, vol. 39, n° 5, p. 949-962, nov. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.016.
- [144] D. Wang *et al.*, « Targeting EZH2 Reprograms Intratumoral Regulatory T Cells to Enhance Cancer Immunity », *Cell Rep.*, vol. 23, n° 11, p. 3262-3274, juin 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.050.
- [145] J. Hua *et al.*, « Pathological conversion of regulatory T cells is associated with loss of allotolerance », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 7059, mai 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25384-x.
- [146] S. Hori, « Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3+ regulatory T cells », *Immunol. Rev.*, vol. 259, n° 1, p. 159-172, mai 2014, doi: 10.1111/imr.12175.
- [147] P. D. Bittner-Eddy, L. A. Fischer, et M. Costalonga, « Cre-loxP Reporter Mouse Reveals Stochastic Activity of the Foxp3 Promoter », *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 2228, sept. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02228.

- [148] M. Y. Fan *et al.*, « Differential Roles of IL-2 Signaling in Developing versus Mature Tregs », *Cell Rep.*, vol. 25, n° 5, p. 1204-1213.e4, oct. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.002.
- [149] Y. P. Rubtsov *et al.*, « Stability of the regulatory T cell lineage in vivo », *Science*, vol. 329, n° 5999, p. 1667-1671, sept. 2010, doi: 10.1126/science.1191996.
- [150] A. Huynh *et al.*, « Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability », *Nat. Immunol.*, vol. 16, n° 2, p. 188-196, févr. 2015, doi: 10.1038/ni.3077.
- [151] J. D. Wheaton et M. Ciofani, « JunB Controls Intestinal Effector Programs in Regulatory T Cells », *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 444, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00444.
- [152] F. M. Grant *et al.*, « BACH2 drives quiescence and maintenance of resting Treg cells to promote homeostasis and cancer immunosuppression », *J. Exp. Med.*, vol. 217, n° 9, p. e20190711, juin 2020, doi: 10.1084/jem.20190711.
- [153] K. A. Helmin *et al.*, « Maintenance DNA methylation is essential for regulatory T cell development and stability of suppressive function », *J. Clin. Invest.*, vol. 130, n° 12, p. 6571-6587, déc. 2020, doi: 10.1172/JCI137712.
- [154] J. Jacobse *et al.*, « Interleukin-23 receptor signaling impairs the stability and function of colonic regulatory T cells », *Cell Rep.*, vol. 42, n° 2, p. 112128, févr. 2023, doi: 10.1016/j.celrep.2023.112128.
- [155] Y. P. Rubtsov *et al.*, « Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces », *Immunity*, vol. 28, n° 4, p. 546-558, avr. 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.017.
- [156] J. Kearley, J. E. Barker, D. S. Robinson, et C. M. Lloyd, « Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent », *J. Exp. Med.*, vol. 202, n° 11, p. 1539-1547, déc. 2005, doi: 10.1084/jem.20051166.
- [157] C. Asseman, S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, et F. Powrie, « An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation », *J. Exp. Med.*, vol. 190, n° 7, p. 995-1004, oct. 1999, doi: 10.1084/jem.190.7.995.
- [158] K. Loser *et al.*, « IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 179, n° 1, p. 365-371, juill. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.1.365.
- [159] M. M. Shull *et al.*, « Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease », *Nature*, vol. 359, n° 6397, p. 693-699, oct. 1992, doi: 10.1038/359693a0.
- [160] A. Joetham *et al.*, « Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 178, n° 3, p. 1433-1442, févr. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.3.1433.
- [161] M. O. Li, Y. Y. Wan, et R. A. Flavell, « T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation », *Immunity*, vol. 26, n° 5, p. 579-591, mai 2007, doi: 10.1016/j.immuni.2007.03.014.
- [162] L. Strauss, C. Bergmann, M. Szczepanski, W. Gooding, J. T. Johnson, et T. L. Whiteside, « A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 13, n° 15 Pt 1, p. 4345-4354, août 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0472.
- [163] J. J. Worthington *et al.*, « Integrin $\alpha\beta 8$ -Mediated TGF- β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation », *Immunity*, vol. 42, n° 5, p. 903-915, mai 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.012.
- [164] L. W. Collison *et al.*, « The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function », *Nature*, vol. 450, n° 7169, p. 566-569, nov. 2007, doi: 10.1038/nature06306.
- [165] J. Lieberman, « The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, n° 5, p. 361-370, mai 2003, doi: 10.1038/nri1083.
- [166] D.-M. Zhao, A. M. Thornton, R. J. DiPaolo, et E. M. Shevach, « Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes », *Blood*, vol. 107, n° 10, p. 3925-3932, mai 2006, doi: 10.1182/blood-2005-11-4502.

- [167] A. Boissonnas *et al.*, « Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes », *Immunity*, vol. 32, n° 2, p. 266-278, févr. 2010, doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.015.
- [168] X. Cao *et al.*, « Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance », *Immunity*, vol. 27, n° 4, p. 635-646, oct. 2007, doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.014.
- [169] T. Beeston, T. R. F. Smith, I. Maricic, X. Tang, et V. Kumar, « Involvement of IFN- γ and perforin, but not Fas/FasL interactions in regulatory T cell-mediated suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis », *J. Neuroimmunol.*, vol. 229, n° 1-2, p. 91-97, déc. 2010, doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.07.007.
- [170] P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, et M. J. Lenardo, « CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells », *Nat. Immunol.*, vol. 8, n° 12, p. 1353-1362, déc. 2007, doi: 10.1038/ni1536.
- [171] A. M. Thornton et E. M. Shevach, « CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production », *J. Exp. Med.*, vol. 188, n° 2, p. 287-296, juill. 1998, doi: 10.1084/jem.188.2.287.
- [172] S. Deaglio *et al.*, « Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression », *J. Exp. Med.*, vol. 204, n° 6, p. 1257-1265, juin 2007, doi: 10.1084/jem.20062512.
- [173] P. E. Zarek *et al.*, « A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells », *Blood*, vol. 111, n° 1, p. 251-259, janv. 2008, doi: 10.1182/blood-2007-03-081646.
- [174] J. Bodor, L. Feigenbaum, J. Bodorova, C. Bare, M. S. Reitz, et R. E. Gress, « Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER) », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 69, n° 6, p. 1053-1059, juin 2001.
- [175] T. Bopp *et al.*, « Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression », *J. Exp. Med.*, vol. 204, n° 6, p. 1303-1310, juin 2007, doi: 10.1084/jem.20062129.
- [176] T. Yokosuka *et al.*, « Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation », *Immunity*, vol. 33, n° 3, p. 326-339, sept. 2010, doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.006.
- [177] A. S. Dejean *et al.*, « Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells », *Nat. Immunol.*, vol. 10, n° 5, p. 504-513, mai 2009, doi: 10.1038/ni.1729.
- [178] U. Grohmann *et al.*, « CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo », *Nat. Immunol.*, vol. 3, n° 11, p. 1097-1101, nov. 2002, doi: 10.1038/ni846.
- [179] K. Wing *et al.*, « CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function », *Science*, vol. 322, n° 5899, p. 271-275, oct. 2008, doi: 10.1126/science.1160062.
- [180] B. Liang *et al.*, « Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 180, n° 9, p. 5916-5926, mai 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5916.
- [181] Y. Onishi, Z. Fehervari, T. Yamaguchi, et S. Sakaguchi, « Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n° 29, p. 10113-10118, juill. 2008, doi: 10.1073/pnas.0711106105.
- [182] M. Sarris, K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, et A. G. Betz, « Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition », *Immunity*, vol. 28, n° 3, p. 402-413, mars 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2008.01.012.
- [183] D. A. A. Vignali, L. W. Collison, et C. J. Workman, « How regulatory T cells work », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, n° 7, p. 523-532, juill. 2008, doi: 10.1038/nri2343.

- [184] V. Malviya, L. Yshii, S. Junius, A. D. Garg, S. Humblet-Baron, et S. M. Schlenner, « Regulatory T-cell stability and functional plasticity in health and disease », *Immunol. Cell Biol.*, vol. 101, n° 2, p. 112-129, févr. 2023, doi: 10.1111/imcb.12613.
- [185] M. A. Koch, G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, et D. J. Campbell, « The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation », *Nat. Immunol.*, vol. 10, n° 6, p. 595-602, juin 2009, doi: 10.1038/ni.1731.
- [186] L.-F. Lu *et al.*, « Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses », *Cell*, vol. 142, n° 6, p. 914-929, sept. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.08.012.
- [187] M. Müller *et al.*, « CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 179, n° 5, p. 2774-2786, sept. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.5.2774.
- [188] A. Chaudhry *et al.*, « CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner », *Science*, vol. 326, n° 5955, p. 986-991, nov. 2009, doi: 10.1126/science.1172702.
- [189] M. Kleinewietfeld, F. Puentes, G. Borsellino, L. Battistini, O. Röttschke, et K. Falk, « CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset », *Blood*, vol. 105, n° 7, p. 2877-2886, avr. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-07-2505.
- [190] T. Yamazaki *et al.*, « CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 181, n° 12, p. 8391-8401, déc. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.12.8391.
- [191] X. O. Yang *et al.*, « Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs », *Immunity*, vol. 29, n° 1, p. 44-56, juill. 2008, doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.007.
- [192] E. Bettelli *et al.*, « Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells », *Nature*, vol. 441, n° 7090, p. 235-238, mai 2006, doi: 10.1038/nature04753.
- [193] L. Zhou *et al.*, « TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function », *Nature*, vol. 453, n° 7192, p. 236-240, mai 2008, doi: 10.1038/nature06878.
- [194] B.-H. Yang *et al.*, « Foxp3(+) T cells expressing RORγt represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation », *Mucosal Immunol.*, vol. 9, n° 2, p. 444-457, mars 2016, doi: 10.1038/mi.2015.74.
- [195] Y. Zheng *et al.*, « Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses », *Nature*, vol. 458, n° 7236, p. 351-356, mars 2009, doi: 10.1038/nature07674.
- [196] Y. Wang, M. A. Su, et Y. Y. Wan, « An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells », *Immunity*, vol. 35, n° 3, p. 337-348, sept. 2011, doi: 10.1016/j.immuni.2011.08.012.
- [197] Y. Wang, A. Souabni, R. A. Flavell, et Y. Y. Wan, « An intrinsic mechanism predisposes Foxp3-expressing regulatory T cells to Th2 conversion in vivo », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 185, n° 10, p. 5983-5992, nov. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.1001255.
- [198] E. A. Wohlfert *et al.*, « GATA3 controls Foxp3⁺ regulatory T cell fate during inflammation in mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 121, n° 11, p. 4503-4515, nov. 2011, doi: 10.1172/JCI57456.
- [199] F. Yu, S. Sharma, J. Edwards, L. Feigenbaum, et J. Zhu, « Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance », *Nat. Immunol.*, vol. 16, n° 2, p. 197-206, févr. 2015, doi: 10.1038/ni.3053.
- [200] Y. Chung *et al.*, « Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 8, p. 983-988, juill. 2011, doi: 10.1038/nm.2426.
- [201] R. L. Clement *et al.*, « Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses », *Nat. Immunol.*, vol. 20, n° 10, p. 1360-1371, oct. 2019, doi: 10.1038/s41590-019-0472-4.
- [202] M. A. Linterman *et al.*, « Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 8, p. 975-982, juill. 2011, doi: 10.1038/nm.2425.

- [203] S. Hou *et al.*, « FoxP3 and Ezh2 regulate Tfr cell suppressive function and transcriptional program », *J. Exp. Med.*, vol. 216, n° 3, p. 605-620, mars 2019, doi: 10.1084/jem.20181134.
- [204] E. Shen *et al.*, « Control of Germinal Center Localization and Lineage Stability of Follicular Regulatory T Cells by the Blimp1 Transcription Factor », *Cell Rep.*, vol. 29, n° 7, p. 1848-1861.e6, nov. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.10.012.
- [205] A. R. Muñoz-Rojas et D. Mathis, « Tissue regulatory T cells: regulatory chameleons », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 21, n° 9, p. 597-611, sept. 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00519-w.
- [206] M. Delacher *et al.*, « Precursors for Nonlymphoid-Tissue Treg Cells Reside in Secondary Lymphoid Organs and Are Programmed by the Transcription Factor BATF », *Immunity*, vol. 52, n° 2, p. 295-312.e11, févr. 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2019.12.002.
- [207] K. L. Braband, T. Kaufmann, S. Floess, M. Zou, J. Huehn, et M. Delacher, « Stepwise acquisition of unique epigenetic signatures during differentiation of tissue Treg cells », *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 1082055, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1082055.
- [208] C. Li *et al.*, « TCR Transgenic Mice Reveal Stepwise, Multi-site Acquisition of the Distinctive Fat-Treg Phenotype », *Cell*, vol. 174, n° 2, p. 285-299.e12, juill. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.05.004.
- [209] R. J. Miragaia *et al.*, « Single-Cell Transcriptomics of Regulatory T Cells Reveals Trajectories of Tissue Adaptation », *Immunity*, vol. 50, n° 2, p. 493-504.e7, févr. 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.01.001.
- [210] J. M. Sullivan, B. Höllbacher, et D. J. Campbell, « Dynamic expression of Id3 defines the stepwise differentiation of tissue-resident regulatory T cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 202, n° 1, p. 31-36, janv. 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1800917.
- [211] D. Burzyn *et al.*, « A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair », *Cell*, vol. 155, n° 6, p. 1282-1295, déc. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.054.
- [212] M. Panduro, C. Benoist, et D. Mathis, « Treg cells limit IFN- γ production to control macrophage accrual and phenotype during skeletal muscle regeneration », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, n° 11, p. E2585-E2593, mars 2018, doi: 10.1073/pnas.1800618115.
- [213] C. F. Dial, M. K. Tune, C. M. Doerschuk, et J. R. Mock, « Foxp3+ Regulatory T Cell Expression of Keratinocyte Growth Factor Enhances Lung Epithelial Proliferation », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 57, n° 2, p. 162-173, août 2017, doi: 10.1165/rcmb.2017-0019OC.
- [214] M. Feuerer *et al.*, « Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters », *Nat. Med.*, vol. 15, n° 8, Art. n° 8, août 2009, doi: 10.1038/nm.2002.
- [215] D. Cipolletta, P. Cohen, B. M. Spiegelman, C. Benoist, et D. Mathis, « Appearance and disappearance of the mRNA signature characteristic of Treg cells in visceral adipose tissue: Age, diet, and PPAR γ effects », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, n° 2, p. 482-487, janv. 2015, doi: 10.1073/pnas.1423486112.
- [216] J. M. Han, D. Wu, H. C. Denroche, Y. Yao, C. B. Verchere, et M. K. Levings, « IL-33 Reverses an Obesity-Induced Deficit in Visceral Adipose Tissue ST2⁺ T Regulatory Cells and Ameliorates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance », *J. Immunol.*, vol. 194, n° 10, p. 4777-4783, mai 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1500020.
- [217] A. Vasanthakumar *et al.*, « The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells », *Nat. Immunol.*, vol. 16, n° 3, Art. n° 3, mars 2015, doi: 10.1038/ni.3085.
- [218] D. Cipolletta *et al.*, « PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells », *Nature*, vol. 486, n° 7404, p. 549-553, juin 2012, doi: 10.1038/nature11132.
- [219] D. Kolodin *et al.*, « Antigen- and Cytokine-Driven Accumulation of Regulatory T Cells in Visceral Adipose Tissue of Lean Mice », *Cell Metab.*, vol. 21, n° 4, p. 543-557, avr. 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.03.005.
- [220] R. A. Fernandes *et al.*, « Discovery of surrogate agonists for visceral fat Treg cells that modulate metabolic indices in vivo », *eLife*, vol. 9, août 2020, doi: 10.7554/eLife.58463.

- [221] X.-Y. Zhao *et al.*, « The obesity-induced adipokine sST2 exacerbates adipose Treg and ILC2 depletion and promotes insulin resistance », *Sci. Adv.*, vol. 6, n° 20, p. eaay6191, mai 2020, doi: 10.1126/sciadv.aay6191.
- [222] T. Deng *et al.*, « Adipocyte adaptive immunity mediates diet-induced adipose inflammation and insulin resistance by decreasing adipose Treg cells », *Nat. Commun.*, vol. 8, p. 15725, juill. 2017, doi: 10.1038/ncomms15725.
- [223] M. Busse, M. Krech, A. Meyer-Bahlburg, C. Hennig, et G. Hansen, « ICOS mediates the generation and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells conveying respiratory tolerance », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 189, n° 4, p. 1975-1982, août 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1103581.
- [224] K. L. Mittelsteadt, E. T. Hayes, et D. J. Campbell, « ICOS signaling limits regulatory T cell accumulation and function in visceral adipose tissue », *J. Exp. Med.*, vol. 218, n° 6, p. e20201142, juin 2021, doi: 10.1084/jem.20201142.
- [225] A. Vasanthakumar *et al.*, « Sex-specific adipose tissue imprinting of regulatory T cells », *Nature*, vol. 579, n° 7800, Art. n° 7800, mars 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2040-3.
- [226] A. Ishikawa *et al.*, « Estrogen regulates sex-specific localization of regulatory T cells in adipose tissue of obese female mice », *PLoS One*, vol. 15, n° 4, p. e0230885, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0230885.
- [227] N. Ali *et al.*, « Regulatory T Cells in Skin Facilitate Epithelial Stem Cell Differentiation », *Cell*, vol. 169, n° 6, p. 1119-1129.e11, juin 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.002.
- [228] I. K. Gratz *et al.*, « Cutting Edge: memory regulatory t cells require IL-7 and not IL-2 for their maintenance in peripheral tissues », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 190, n° 9, p. 4483-4487, mai 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1300212.
- [229] L. A. Kalekar *et al.*, « Regulatory T cells in skin are uniquely poised to suppress profibrotic immune responses », *Sci. Immunol.*, vol. 4, n° 39, p. eaaw2910, sept. 2019, doi: 10.1126/sciimmunol.aaw2910.
- [230] A. Nosbaum *et al.*, « Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 196, n° 5, p. 2010-2014, mars 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1502139.
- [231] A. N. Mathur *et al.*, « Treg cell control of a CXCL5-IL-17 Inflammatory Axis Promotes Hair Follicle Stem Cell Differentiation into Epithelial Cells for Skin Barrier Repair », *Immunity*, vol. 50, n° 3, p. 655-667.e4, mars 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.02.013.
- [232] K. S. Kim *et al.*, « Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine », *Science*, vol. 351, n° 6275, p. 858-863, févr. 2016, doi: 10.1126/science.aac5560.
- [233] C. Schiering *et al.*, « The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine », *Nature*, vol. 513, n° 7519, p. 564-568, sept. 2014, doi: 10.1038/nature13577.
- [234] L. L. Korn, H. G. Hubbeling, P. M. Porrett, Q. Yang, L. G. Barnett, et T. M. Laufer, « Regulatory T cells occupy an isolated niche in the intestine that is antigen independent », *Cell Rep.*, vol. 9, n° 5, p. 1567-1573, déc. 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.006.
- [235] M. Xu *et al.*, « c-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont », *Nature*, vol. 554, n° 7692, Art. n° 7692, févr. 2018, doi: 10.1038/nature25500.
- [236] T. Tanoue, K. Atarashi, et K. Honda, « Development and maintenance of intestinal regulatory T cells », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, n° 5, p. 295-309, mai 2016, doi: 10.1038/nri.2016.36.
- [237] S. Z. Josefowicz *et al.*, « Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation », *Nature*, vol. 482, n° 7385, p. 395-399, févr. 2012, doi: 10.1038/nature10772.
- [238] C. Campbell *et al.*, « Extrathymically Generated Regulatory T Cells Establish a Niche for Intestinal Border-Dwelling Bacteria and Affect Physiologic Metabolite Balance », *Immunity*, vol. 48, n° 6, p. 1245-1257.e9, juin 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.013.
- [239] T. Sujino *et al.*, « Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4⁺ T cells controls gut inflammation », *Science*, vol. 352, n° 6293, p. 1581-1586, juin 2016, doi: 10.1126/science.aaf3892.

- [240] M. London, A. M. Bilate, T. B. R. Castro, T. Sujino, et D. Mucida, « Stepwise chromatin and transcriptional acquisition of an intraepithelial lymphocyte program », *Nat. Immunol.*, vol. 22, n° 4, p. 449-459, avr. 2021, doi: 10.1038/s41590-021-00883-8.
- [241] B. S. Hanna *et al.*, « The gut microbiota promotes distal tissue regeneration via RORγ+ regulatory T cell emissaries », *Immunity*, vol. 56, n° 4, p. 829-846.e8, avr. 2023, doi: 10.1016/j.immuni.2023.01.033.
- [242] M. Li *et al.*, « A wave of Foxp3+ regulatory T cell accumulation in the neonatal liver plays unique roles in maintaining self-tolerance », *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 17, n° 5, p. 507-518, mai 2020, doi: 10.1038/s41423-019-0246-9.
- [243] A. S. Kurt *et al.*, « IL-2 availability regulates the tissue specific phenotype of murine intra-hepatic Tregs », *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 1040031, oct. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1040031.
- [244] K. Wu *et al.*, « Regulatory T cells (Tregs) in liver fibrosis », *Cell Death Discov.*, vol. 9, 2023, doi: 10.1038/s41420-023-01347-8.
- [245] L. A. Ormandy, T. Hillemann, H. Wedemeyer, M. P. Manns, T. F. Greten, et F. Korangy, « Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 6, p. 2457-2464, mars 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3232.
- [246] M. Feng, Q. Wang, F. Zhang, et L. Lu, « Ex vivo induced regulatory T cells regulate inflammatory response of Kupffer cells by TGF-beta and attenuate liver ischemia reperfusion injury », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 12, n° 1, p. 189-196, janv. 2012, doi: 10.1016/j.intimp.2011.11.010.
- [247] J. Li *et al.*, « Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis », *PLoS One*, vol. 7, n° 6, p. e39307, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039307.
- [248] N. Rakebrandt, K. Littringer, et N. Joller, « Regulatory T cells: balancing protection versus pathology », *Swiss Med. Wkly.*, vol. 146, p. w14343, 2016, doi: 10.4414/smw.2016.14343.
- [249] J. M. Kim, J. P. Rasmussen, et A. Y. Rudensky, « Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice », *Nat. Immunol.*, vol. 8, n° 2, Art. n° 2, févr. 2007, doi: 10.1038/ni1428.
- [250] H. Ueda *et al.*, « Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease », *Nature*, vol. 423, n° 6939, p. 506-511, mai 2003, doi: 10.1038/nature01621.
- [251] S. A. Long et J. H. Buckner, « CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 187, n° 5, p. 2061-2066, sept. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1003224.
- [252] K. Venken *et al.*, « Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level », *Immunology*, vol. 123, n° 1, p. 79-89, janv. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02690.x.
- [253] F. Sellebjerg, M. Krakauer, M. Khademi, T. Olsson, et P. S. Sørensen, « FOXP3, CBLB and ITCH gene expression and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression on CD4(+) CD25(high) T cells in multiple sclerosis », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 170, n° 2, p. 149-155, nov. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04654.x.
- [254] M. Dominguez-Villar, C. M. Baecher-Allan, et D. A. Hafler, « Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease », *Nat. Med.*, vol. 17, n° 6, p. 673-675, juin 2011, doi: 10.1038/nm.2389.
- [255] E. Y. Lyssuk, A. V. Torgashina, S. K. Soloviev, E. L. Nasonov, et S. N. Bykovskaia, « Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 601, p. 113-119, 2007.
- [256] S. Lindley, C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman, et T. I. M. Tree, « Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes », *Diabetes*, vol. 54, n° 1, p. 92-99, janv. 2005, doi: 10.2337/diabetes.54.1.92.

- [257] D. Cao, R. van Vollenhoven, L. Klareskog, C. Trollmo, et V. Malmström, « CD25^{bright}CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 6, n° 4, p. R335-346, 2004, doi: 10.1186/ar1192.
- [258] M. R. Ehrenstein *et al.*, « Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy », *J. Exp. Med.*, vol. 200, n° 3, p. 277-285, août 2004, doi: 10.1084/jem.20040165.
- [259] B. Afzali *et al.*, « CD161 expression characterizes a subpopulation of human regulatory T cells that produces IL-17 in a STAT3-dependent manner », *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, n° 8, p. 2043-2054, août 2013, doi: 10.1002/eji.201243296.
- [260] M. Samson *et al.*, « Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 64, n° 8, p. 2499-2503, août 2012, doi: 10.1002/art.34477.
- [261] K. V. Tarbell, S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy, et R. M. Steinman, « CD25⁺ CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes », *J. Exp. Med.*, vol. 199, n° 11, p. 1467-1477, juin 2004, doi: 10.1084/jem.20040180.
- [262] A. P. Kohm, P. A. Carpentier, H. A. Anger, et S. D. Miller, « Cutting Edge: CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis », *J. Immunol.*, vol. 169, n° 9, p. 4712-4716, nov. 2002, doi: 10.4049/jimmunol.169.9.4712.
- [263] Y. Takeuchi et H. Nishikawa, « Roles of regulatory T cells in cancer immunity », *Int. Immunol.*, vol. 28, n° 8, p. 401-409, août 2016, doi: 10.1093/intimm/dxw025.
- [264] P. A. Antony *et al.*, « CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 174, n° 5, p. 2591-2601, mars 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2591.
- [265] G. K. Philips et M. Atkins, « Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies », *Int. Immunol.*, vol. 27, n° 1, p. 39-46, janv. 2015, doi: 10.1093/intimm/dxu095.
- [266] C. I. Liakou *et al.*, « CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4⁺ICOS^{hi} cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n° 39, p. 14987-14992, sept. 2008, doi: 10.1073/pnas.0806075105.
- [267] S. Kurtulus *et al.*, « TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells », *J. Clin. Invest.*, vol. 125, n° 11, p. 4053-4062, nov. 2015, doi: 10.1172/JCI81187.
- [268] T. R. Simpson *et al.*, « Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma », *J. Exp. Med.*, vol. 210, n° 9, p. 1695-1710, août 2013, doi: 10.1084/jem.20130579.
- [269] G. M. Delgoffe *et al.*, « Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis », *Nature*, vol. 501, n° 7466, p. 252-256, sept. 2013, doi: 10.1038/nature12428.
- [270] E. A. Carswell, L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, et B. Williamson, « An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, n° 9, p. 3666-3670, sept. 1975, doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
- [271] P. J. W. Naudé, J. A. den Boer, P. G. M. Luiten, et U. L. M. Eisel, « Tumor necrosis factor receptor cross-talk », *FEBS J.*, vol. 278, n° 6, p. 888-898, avr. 2011, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08017.x.
- [272] A. Arvey, J. van der Veeken, G. Plitas, S. S. Rich, P. Concannon, et A. Y. Rudensky, « Genetic and epigenetic variation in the lineage specification of regulatory T cells », *eLife*, vol. 4, p. e07571, oct. 2015, doi: 10.7554/eLife.07571.
- [273] S. A. Mahmud *et al.*, « Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells », *Nat. Immunol.*, vol. 15, n° 5, p. 473-481, mai 2014, doi: 10.1038/ni.2849.
- [274] M. Lubrano di Ricco *et al.*, « Tumor necrosis factor receptor family costimulation increases regulatory T-cell activation and function via NF- κ B », *Eur. J. Immunol.*, vol. 50, n° 7, p. 972-985, juill. 2020, doi: 10.1002/eji.201948393.

- [275] X. Chen, M. Bäümel, D. N. Männel, O. M. Z. Howard, et J. J. Oppenheim, « Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 179, n° 1, p. 154-161, juill. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.1.154.
- [276] Y. Grinberg-Bleyer *et al.*, « Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs », *J. Clin. Invest.*, vol. 120, n° 12, p. 4558-4568, déc. 2010, doi: 10.1172/JCI42945.
- [277] B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, et J. H. Kim, « Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey », *Blood*, vol. 119, n° 3, p. 651-665, janv. 2012, doi: 10.1182/blood-2011-04-325225.
- [278] J. J. Peschon *et al.*, « TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 160, n° 2, p. 943-952, janv. 1998.
- [279] B. Zaragoza *et al.*, « Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF », *Nat. Med.*, vol. 22, n° 1, p. 16-17, janv. 2016, doi: 10.1038/nm.4019.
- [280] X. Chen, J. J. Subleski, H. Kopf, O. M. Z. Howard, D. N. Männel, et J. J. Oppenheim, « 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. Baltim. Md 1950*, vol. 180, n° 10, p. 6467-6471, mai 2008.
- [281] M. Chopra *et al.*, « Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion », *J. Exp. Med.*, vol. 213, n° 9, p. 1881-1900, août 2016, doi: 10.1084/jem.20151563.
- [282] R. Hamano, J. Huang, T. Yoshimura, J. J. Oppenheim, et X. Chen, « TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40 », *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, n° 7, p. 2010-2020, juill. 2011, doi: 10.1002/eji.201041205.
- [283] X. Chen, X. Wu, Q. Zhou, O. M. Z. Howard, M. G. Netea, et J. J. Oppenheim, « TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 190, n° 3, p. 1076-1084, févr. 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1202659.
- [284] X. Chen, R. Hamano, J. J. Subleski, A. A. Hurwitz, O. M. Z. Howard, et J. J. Oppenheim, « Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4+FoxP3- conventional T cells to suppression by CD4+FoxP3+ regulatory T cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 185, n° 1, p. 174-182, juill. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0903548.
- [285] A. Klinkhoff, « Biological agents for rheumatoid arthritis: targeting both physical function and structural damage », *Drugs*, vol. 64, n° 12, p. 1267-1283, 2004, doi: 10.2165/00003495-200464120-00001.
- [286] B. W. van Oosten *et al.*, « Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2 », *Neurology*, vol. 47, n° 6, p. 1531-1534, déc. 1996, doi: 10.1212/wnl.47.6.1531.
- [287] « TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group », *Neurology*, vol. 53, n° 3, p. 457-465, août 1999.
- [288] G. Kassiotis et G. Kollias, « Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination », *J. Exp. Med.*, vol. 193, n° 4, p. 427-434, févr. 2001, doi: 10.1084/jem.193.4.427.
- [289] « Local expression of transgene encoded TNF alpha in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells », *J. Exp. Med.*, vol. 184, n° 5, p. 1963-1974, nov. 1996.
- [290] K. Akassoglou, E. Douni, J. Bauer, H. Lassmann, G. Kollias, et L. Probert, « Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 2, p. 709-714, janv. 2003, doi: 10.1073/pnas.0236046100.

- [291] K.-S. N. Atrekhany *et al.*, « Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, n° 51, p. 13051-13056, déc. 2018, doi: 10.1073/pnas.1807499115.
- [292] E. Ronin *et al.*, « Tissue-restricted control of established central nervous system autoimmunity by TNF receptor 2-expressing Treg cells », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 118, n° 13, mars 2021, doi: 10.1073/pnas.2014043118.
- [293] K.-S. N. Atrekhany *et al.*, « TNF Neutralization Results in the Delay of Transplantable Tumor Growth and Reduced MDSC Accumulation », *Front. Immunol.*, vol. 7, p. 147, 2016, doi: 10.3389/fimmu.2016.00147.
- [294] B. L. Salomon, M. Leclerc, J. Tosello, E. Ronin, E. Piaggio, et J. L. Cohen, « Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology », *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 444, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00444.
- [295] H. Takahashi, G. Yoshimatsu, et D. L. Faustman, « The Roles of TNFR2 Signaling in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment and the Potency of TNFR2 Targeted Therapy », *Cells*, vol. 11, n° 12, p. 1952, juin 2022, doi: 10.3390/cells11121952.
- [296] M. Chopra *et al.*, « Tumor necrosis factor induces tumor promoting and anti-tumoral effects on pancreatic cancer via TNFR1 », *PLoS One*, vol. 8, n° 9, p. e75737, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0075737.
- [297] L.-Y. Chang *et al.*, « Blockade of TNF- α signaling benefits cancer therapy by suppressing effector regulatory T cell expansion », *Oncoimmunology*, vol. 4, n° 10, p. e1040215, avr. 2015, doi: 10.1080/2162402X.2015.1040215.
- [298] C. X, S. Jj, H. R, H. Om, W. Rh, et O. Jj, « Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood », *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, n° 4, avr. 2010, doi: 10.1002/eji.200940022.
- [299] M. Chopra *et al.*, « Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis », *Carcinogenesis*, vol. 34, n° 6, p. 1296-1303, juin 2013, doi: 10.1093/carcin/bgt038.
- [300] B. Ham *et al.*, « TNF Receptor-2 Facilitates an Immunosuppressive Microenvironment in the Liver to Promote the Colonization and Growth of Hepatic Metastases », *Cancer Res.*, vol. 75, n° 24, p. 5235-5247, déc. 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3173.
- [301] G. S. Williams *et al.*, « Phenotypic screening reveals TNFR2 as a promising target for cancer immunotherapy », *Oncotarget*, vol. 7, n° 42, p. 68278-68291, sept. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11943.
- [302] E. M. Tam *et al.*, « Antibody-mediated targeting of TNFR2 activates CD8+ T cells in mice and promotes antitumor immunity », *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, n° 512, p. eaax0720, oct. 2019, doi: 10.1126/scitranslmed.aax0720.
- [303] D. S. Vinay et B. S. Kwon, « 4-1BB signaling beyond T cells », *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 8, n° 4, p. 281-284, juill. 2011, doi: 10.1038/cmi.2010.82.
- [304] W. W. Shuford *et al.*, « 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses », *J. Exp. Med.*, vol. 186, n° 1, p. 47-55, juill. 1997, doi: 10.1084/jem.186.1.47.
- [305] H.-W. Lee, S.-J. Park, B. K. Choi, H. H. Kim, K.-O. Nam, et B. S. Kwon, « 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1 », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 169, n° 9, p. 4882-4888, nov. 2002, doi: 10.4049/jimmunol.169.9.4882.
- [306] Y. Kuang, X. Weng, X. Liu, H. Zhu, Z. Chen, et H. Chen, « Effects of 4-1BB signaling on the biological function of murine dendritic cells », *Oncol. Lett.*, vol. 3, n° 2, p. 477-481, févr. 2012, doi: 10.3892/ol.2011.506.
- [307] G. Zheng, B. Wang, et A. Chen, « The 4-1BB Costimulation Augments the Proliferation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells », *J. Immunol.*, vol. 173, n° 4, p. 2428-2434, août 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2428.

- [308] P. Zhang *et al.*, « Agonistic Anti-4-1BB Antibody Promotes the Expansion of Natural Regulatory T Cells While Maintaining Foxp3 Expression », *Scand. J. Immunol.*, vol. 66, n° 4, p. 435-440, 2007, doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01994.x.
- [309] J. Kim *et al.*, « Host CD25+CD4+Foxp3+ regulatory T cells primed by anti-CD137 mAbs inhibit graft-versus-host disease », *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, vol. 18, n° 1, p. 44-54, janv. 2012, doi: 10.1016/j.bbmt.2011.09.004.
- [310] H. Zhang *et al.*, « Tumor expression of 4-1BB ligand sustains tumor lytic T cells », *Cancer Biol. Ther.*, vol. 2, n° 5, p. 579-586, 2003, doi: 10.4161/cbt.2.5.545.
- [311] S.-W. Ju *et al.*, « A functional anti-human 4-1BB ligand monoclonal antibody that enhances proliferation of monocytes by reverse signaling of 4-1BBL », *Hybrid. Hybridomics*, vol. 22, n° 5, p. 333-338, oct. 2003, doi: 10.1089/153685903322538872.
- [312] T. H. Tu *et al.*, « 4-1BBL signaling promotes cell proliferation through reprogramming of glucose metabolism in monocytes/macrophages », *FEBS J.*, vol. 282, n° 8, p. 1468-1480, avr. 2015, doi: 10.1111/febs.13236.
- [313] S.-Y. Eun, S.-W. Lee, Y. Xu, et M. Croft, « 4-1BB Ligand Signaling to T Cells Limits T Cell Activation », *J. Immunol.*, vol. 194, n° 1, p. 134-141, janv. 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1401383.
- [314] K. Luu, M. V. Patwardhan, Q. Zeng, S. L. Wickström, A. Lundqvist, et H. Schwarz, « Regulatory T Cells Inhibit T Cell Activity by Downregulating CD137 Ligand via CD137 Trogocytosis », *Cells*, vol. 10, n° 2, p. 353, févr. 2021, doi: 10.3390/cells10020353.
- [315] B. K. Choi, T. Asai, D. S. Vinay, Y. H. Kim, et B. S. Kwon, « 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms », *Cytokine*, vol. 34, n° 5, p. 233-242, juin 2006, doi: 10.1016/j.cyto.2006.04.008.
- [316] S. K. Seo *et al.*, « 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis », *Nat. Med.*, vol. 10, n° 10, p. 1088-1094, oct. 2004, doi: 10.1038/nm1107.
- [317] Y. Sun *et al.*, « Administration of Agonistic Anti-4-1BB Monoclonal Antibody Leads to the Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis », *J. Immunol.*, vol. 168, n° 3, p. 1457-1465, févr. 2002, doi: 10.4049/jimmunol.168.3.1457.
- [318] Y. H. Kim *et al.*, « 4-1BB Triggering Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Modulating the Balance between Th17 and Regulatory T Cells », *J. Immunol.*, vol. 187, n° 3, p. 1120-1128, août 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1002681.
- [319] J. M. Martínez Gomez, J. L. Croxford, K. P. Yeo, V. Angeli, H. Schwarz, et S. Gasser, « Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Critically Depends on CD137 Ligand Signaling », *J. Neurosci.*, vol. 32, n° 50, p. 18246-18252, déc. 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2473-12.2012.
- [320] Y. A. Yeo, J. M. Martínez Gómez, J. L. Croxford, S. Gasser, E.-A. Ling, et H. Schwarz, « CD137 ligand activated microglia induces oligodendrocyte apoptosis via reactive oxygen species », *J. Neuroinflammation*, vol. 9, n° 1, p. 173, juill. 2012, doi: 10.1186/1742-2094-9-173.
- [321] G.-Z. Liu, A. C. Gomes, L.-B. Fang, X.-G. Gao, et P. Hjelmstrom, « Decreased 4-1BB expression on CD4+CD25high regulatory T cells in peripheral blood of patients with multiple sclerosis », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 154, n° 1, p. 22-29, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03730.x.
- [322] I. Melero *et al.*, « Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors », *Nat. Med.*, vol. 3, n° 6, Art. n° 6, juin 1997, doi: 10.1038/nm0697-682.
- [323] G. H. Y. Lin, Y. Liu, T. Ambagala, B. S. Kwon, P. S. Ohashi, et T. H. Watts, « Evaluating the Cellular Targets of Anti-4-1BB Agonist Antibody during Immunotherapy of a Pre-Established Tumor in Mice », *PLOS ONE*, vol. 5, n° 6, p. e11003, juin 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0011003.
- [324] R. A. Wilcox *et al.*, « Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo », *Blood*, vol. 103, n° 1, p. 177-184, janv. 2004, doi: 10.1182/blood-2003-06-2184.
- [325] M. A. Curran *et al.*, « Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin », *J. Exp. Med.*, vol. 210, n° 4, p. 743-755, avr. 2013, doi: 10.1084/jem.20121190.

- [326] B. Weigel *et al.*, « Focusing and sustaining the antitumor CTL effector killer response by agonist anti-CD137 mAb », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, n° 24, p. 7551-7556, juin 2015, doi: 10.1073/pnas.1506357112.
- [327] A. Palazón *et al.*, « Agonist Anti-CD137 mAb Act on Tumor Endothelial Cells to Enhance Recruitment of Activated T Lymphocytes », *Cancer Res.*, vol. 71, n° 3, p. 801-811, févr. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1733.
- [328] S. L. Buchan *et al.*, « Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function », *Immunity*, vol. 49, n° 5, p. 958-970.e7, nov. 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.09.014.
- [329] X. Qi *et al.*, « Optimization of 4-1BB antibody for cancer immunotherapy by balancing agonistic strength with FcγR affinity », *Nat. Commun.*, vol. 10, n° 1, p. 1-11, mai 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10088-1.
- [330] I. Etxeberria, J. Glez-Vaz, Á. Teijeira, et I. Melero, « New emerging targets in cancer immunotherapy: CD137/4-1BB costimulatory axis », *ESMO Open*, vol. 4, n° Suppl 3, p. e000733, juill. 2020, doi: 10.1136/esmooopen-2020-000733.
- [331] B. D. Rudd, « Neonatal T Cells: A Reinterpretation », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 38, p. 229-247, avr. 2020, doi: 10.1146/annurev-immunol-091319-083608.
- [332] M. Jiang *et al.*, « A TNFR2 antibody by countering immunosuppression cooperates with HMGN1 and R848 immune stimulants to inhibit murine colon cancer », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 101, n° Pt A, p. 108345, déc. 2021, doi: 10.1016/j.intimp.2021.108345.
- [333] K. Case, L. Tran, M. Yang, H. Zheng, W. M. Kuhlreiber, et D. L. Faustman, « TNFR2 blockade alone or in combination with PD-1 blockade shows therapeutic efficacy in murine cancer models », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 107, n° 6, p. 981-991, juin 2020, doi: 10.1002/JLB.5MA0420-375RRRRR.
- [334] Y. Nie *et al.*, « Blockade of TNFR2 signaling enhances the immunotherapeutic effect of CpG ODN in a mouse model of colon cancer », *Sci. Signal.*, vol. 11, n° 511, p. eaan0790, janv. 2018, doi: 10.1126/scisignal.aan0790.
- [335] F. Yan *et al.*, « Expression of TNFR2 by regulatory T cells in peripheral blood is correlated with clinical pathology of lung cancer patients », *Cancer Immunol. Immunother. Clin.*, vol. 64, n° 11, p. 1475-1485, nov. 2015, doi: 10.1007/s00262-015-1751-z.
- [336] C. Govindaraj *et al.*, « Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2+ Tregs within the tumor microenvironment », *Clin. Immunol. Orlando Fla*, vol. 149, n° 1, p. 97-110, oct. 2013, doi: 10.1016/j.clim.2013.07.003.
- [337] S. Hemmers, M. Schizas, et A. Y. Rudensky, « T reg cell–intrinsic requirements for ST2 signaling in health and neuroinflammation », *J. Exp. Med.*, vol. 218, n° 2, oct. 2020, doi: 10.1084/jem.20201234.
- [338] S. E. Borst, « The role of TNF-α in insulin resistance », *Endocrine*, vol. 23, n° 2, p. 177-182, mars 2004, doi: 10.1385/ENDO:23:2-3:177.
- [339] T. C. Scharshmidt *et al.*, « Commensal Microbes and Hair Follicle Morphogenesis Coordinately Drive Treg Migration into Neonatal Skin », *Cell Host Microbe*, vol. 21, n° 4, p. 467-477.e5, avr. 2017, doi: 10.1016/j.chom.2017.03.001.
- [340] O. Burton *et al.*, « The tissue-resident regulatory T cell pool is shaped by transient multi-tissue migration and a conserved residency program ». *bioRxiv*, p. 2023.08.14.553196, 14 août 2023. doi: 10.1101/2023.08.14.553196.
- [341] J. Tuncel, C. Benoist, et D. Mathis, « T cell anergy in perinatal mice is promoted by T reg cells and prevented by IL-33 », *J. Exp. Med.*, vol. 216, n° 6, p. 1328-1344, juin 2019, doi: 10.1084/jem.20182002.
- [342] M. L. Tang, D. A. Steeber, X. Q. Zhang, et T. F. Tedder, « Intrinsic differences in L-selectin expression levels affect T and B lymphocyte subset-specific recirculation pathways », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 160, n° 10, p. 5113-5121, mai 1998.
- [343] B.-H. Yang *et al.*, « TCF1 and LEF1 Control Treg Competitive Survival and Tfr Development to Prevent Autoimmune Diseases », *Cell Rep.*, vol. 27, n° 12, p. 3629-3645.e6, juin 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.061.

- [344] K. Y. Yam *et al.*, « Exposure to chronic early-life stress lastingly alters the adipose tissue, the leptin system and changes the vulnerability to western-style diet later in life in mice », *Psychoneuroendocrinology*, vol. 77, p. 186-195, mars 2017, doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.12.012.
- [345] A. T. Virtue *et al.*, « The gut microbiota regulates white adipose tissue inflammation and obesity via a family of microRNAs », *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, n° 496, p. eaav1892, juin 2019, doi: 10.1126/scitranslmed.aav1892.
- [346] M. Khedri, A. Samei, M. Fasihi-Ramandi, et R. A. Taheri, « The immunopathobiology of T cells in stress condition: a review », *Cell Stress Chaperones*, vol. 25, n° 5, p. 743-752, sept. 2020, doi: 10.1007/s12192-020-01105-0.
- [347] Y. Liu, D. Q. Tran, J. W. Lindsey, et J. M. Rhoads, « The Association of Gut Microbiota and Treg Dysfunction in Autoimmune Diseases », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1278, p. 191-203, 2021, doi: 10.1007/978-981-15-6407-9_10.
- [348] D. G. DeNardo et B. Ruffell, « Macrophages as regulators of tumor immunity and immunotherapy », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 19, n° 6, p. 369-382, juin 2019, doi: 10.1038/s41577-019-0127-6.
- [349] G. J. D. van Mierlo *et al.*, « Cutting Edge: TNFR-Shedding by CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Inhibits the Induction of Inflammatory Mediators », *J. Immunol.*, vol. 180, n° 5, p. 2747-2751, mars 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.5.2747.
- [350] A. E. R. Kartikasari *et al.*, « Elevation of circulating TNF receptor 2 in cancer: A systematic meta-analysis for its potential as a diagnostic cancer biomarker », *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 918254, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.918254.
- [351] S. Naserian *et al.*, « The TNF/TNFR2 signaling pathway is a key regulatory factor in endothelial progenitor cell immunosuppressive effect », *Cell Commun. Signal. CCS*, vol. 18, p. 94, juin 2020, doi: 10.1186/s12964-020-00564-3.
- [352] E. Ronin *et al.*, « The NF- κ B RelA Transcription Factor Is Critical for Regulatory T Cell Activation and Stability », *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 2487, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02487.
- [353] R. Vallion *et al.*, « Regulatory T Cell Stability and Migration Are Dependent on mTOR », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 205, n° 7, p. 1799-1809, oct. 2020, doi: 10.4049/jimmunol.1901480.
- [354] B. Carow, Y. Gao, J. Coquet, M. Reilly, et M. E. Rottenberg, « Ick-Driven Cre Expression Alters T Cell Development in the Thymus and the Frequencies and Functions of Peripheral T Cell Subsets », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 197, n° 6, p. 2261-2268, sept. 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1600827.
- [355] D. Franckaert *et al.*, « Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3⁺ and Foxp3⁻ T cells », *Immunol. Cell Biol.*, vol. 93, n° 4, p. 417-423, avr. 2015, doi: 10.1038/icb.2014.108.
- [356] X. Ma *et al.*, « Tamoxifen induces the development of hernia in mice by activating MMP-2 and MMP-13 expression », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1852, n° 5, p. 1038-1048, mai 2015, doi: 10.1016/j.bbadis.2015.02.006.
- [357] B. Lizen, M. Claus, L. Jeannotte, F. M. Rijli, et F. Gofflot, « Perinatal induction of Cre recombination with tamoxifen », *Transgenic Res.*, vol. 24, n° 6, p. 1065-1077, déc. 2015, doi: 10.1007/s11248-015-9905-5.
- [358] C. Sparano *et al.*, « Embryonic and neonatal waves generate distinct populations of hepatic ILC1s », *Sci. Immunol.*, vol. 7, n° 75, p. eabo6641, sept. 2022, doi: 10.1126/sciimmunol.abo6641.
- [359] R. Moreno, D. Buehler, et P. F. Lambert, « MmuPV1-Induced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Arises Preferentially from Lgr5⁺ Epithelial Progenitor Cells », *Viruses*, vol. 14, n° 8, p. 1751, août 2022, doi: 10.3390/v14081751.
- [360] S. Z. Josefowicz, L.-F. Lu, et A. Y. Rudensky, « Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, p. 531-564, 2012, doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.

ANNEXE

TNFR2 et EAE

Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire pouvant jouer un rôle délétère dans certaines maladies auto-immunes. Des biothérapies utilisant des anticorps bloquant l'action du TNF sont donc utilisées pour le traitement de certaines maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou le psoriasis [285]. Cependant, chez les patients atteints de sclérose en plaques, ce même traitement peut aggraver la maladie [286], [287] suggérant un rôle immuno-régulateur du TNF.

Cet effet pourrait être dû à une stimulation des Tregs. En effet, les Tregs jouent un rôle central dans le contrôle des maladies auto-immunes et la tolérance immunitaire [32], [360]. De plus, il a été montré que le TNF pouvait augmenter la prolifération des lymphocytes T régulateurs en se fixant sur son récepteur de type 2, le TNFR2 [274], [275].

L'équipe a travaillé sur cette hypothèse en utilisant le modèle murin de la sclérose en plaques, l'EAE. Les systèmes CreLox et CreLox inducible ont été utilisés afin d'obtenir des souris possédant une délétion du TNFR2 spécifiquement dans les Tregs. J'ai participé à ces travaux qui ont permis de mettre en évidence le rôle fondamental du TNFR2 exprimé par les Tregs dans le contrôle de cette pathologie. Comme observé avec le traitement bloquant l'action du TNF, les souris possédant une délétion du TNFR2 au sein des Tregs ont développé une EAE plus sévère. Les résultats ont permis de montrer que les Tregs exerçaient leur rôle suppresseur dans le tissu cible, le SNC, au cours de l'inflammation. De plus, cela a permis d'expliquer certains effets indésirables des anti-TNF utilisé chez les patients atteint de sclérose en plaques. Ce travail n'a cependant pas permis de comprendre les mécanismes responsables de l'aggravation de la maladie en absence de TNFR2 sur les Tregs. Par la suite, nous avons travaillé avec ces mêmes souris pour chercher à comprendre si le TNFR2 exprimé par les Tregs avaient également un rôle dans le contrôle de l'immunité antitumorales.



Tissue-restricted control of established central nervous system autoimmunity by TNF receptor 2–expressing Treg cells

Emilie Ronin^{a,1}, Charlotte Pouchy^{a,1}, Maryam Khosravi^a, Morgane Hilaire^a, Sylvie Grégoire^a, Armanda Casrouge^a, Sahar Kassem^a, David Sleurs^a, Gaëlle H. Martin^a, Noémie Chanson^a, Yannis Lombardi^a, Guilhem Lalle^b, Harald Wajant^c, Cédric Auffray^d, Bruno Lucas^d, Gilles Marodon^a, Yenkel Grinberg-Bleyer^{b,2,3}, and Benoît L. Salomon^{a,2,3}

^aSorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI)–Paris, F-75013 Paris, France; ^bCentre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Labex DEVveCAN, INSERM, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; ^cDivision of Molecular Internal Medicine, Department of Internal Medicine II, University Hospital Würzburg, 97070 Würzburg, Germany; and ^dInstitut Cochin, CNRS, INSERM, Paris Université, F-75014 Paris, France

Edited by Shimon Sakaguchi, Osaka University, Osaka, Japan, and approved February 17, 2021 (received for review July 4, 2020)

CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells are central modulators of autoimmune diseases. However, the timing and location of Treg cell-mediated suppression of tissue-specific autoimmunity remain undefined. Here, we addressed these questions by investigating the role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 (TNFR2) signaling in Treg cells during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model of multiple sclerosis. We found that TNFR2-expressing Treg cells were critical to suppress EAE at peak disease in the central nervous system but had no impact on T cell priming in lymphoid tissues at disease onset. Mechanistically, TNFR2 signaling maintained functional Treg cells with sustained expression of CTLA-4 and Blimp-1, allowing active suppression of pathogenic T cells in the inflamed central nervous system. This late effect of Treg cells was further confirmed by treating mice with TNF and TNFR2 agonists and antagonists. Our findings show that endogenous Treg cells specifically suppress an autoimmune disease by acting in the target tissue during overt inflammation. Moreover, they bring a mechanistic insight to some of the adverse effects of anti-TNF therapy in patients.

Treg cells | autoimmune diseases | TNF

CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells play a pivotal role in the control of immune responses. In particular, the effector Treg cell subset, controlled in part by the master transcription factor Blimp-1 (1–3), exerts a critical role in the protection against autoimmune diseases by inhibiting autoreactive cells. Perturbations in Treg cell numbers or function trigger or exacerbate autoimmune diseases in mice and humans, such as type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, or experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a mouse model of multiple sclerosis (MS) (4, 5). In line with this latter observation, Treg cell depletion increased EAE symptoms (6), while transfer of polyclonal or myelin-reactive Treg cells limited the disease (7, 8). However, it is still unknown whether Treg cells suppress the priming of pathogenic conventional T (Tconv) cells in the draining lymph nodes (dLNs) at disease onset, and/or inhibit their function directly in the central nervous system (CNS) in the phase of ongoing inflammation.

Our group and others have reported that tumor necrosis factor (TNF) increased the proliferation of Treg cells via TNF receptor 2 (TNFR2) while maintaining or enhancing their suppressive function in vitro and in different immunopathologies (9–13). This intriguing immunoregulatory facet of TNF is clearly exemplified in EAE. Mice deficient for TNFR2 exhibited aggravated symptoms of EAE, which were associated with lower Treg cell proportions in the CNS (14). In the same line, mice genetically engineered to express the human version of TNF, and in which TNFR2 was ablated in Treg cells, developed severe EAE symptoms (15). These studies suggested that the TNF/TNFR2

axis is central in Treg cell–mediated suppression of autoimmunity. However, the location and timing of this Treg cell–mediated suppression are currently unknown. Here, we addressed these questions by using constitutive and inducible ablation of TNFR2 in mature Treg cells. We showed that TNFR2-expressing Treg cells suppressed EAE locally in the inflamed CNS on established disease, without affecting pathogenic T cell priming in the dLN.

Results

TNFR2 Expression by Hematopoietic Cells Is Required to Limit EAE Severity and Promotes Treg Cell–Intrinsic Expansion in the CNS. Since TNFR2 is up-regulated in Treg cells upon activation (9), we analyzed its expression after EAE induction. The receptor was highly and preferentially expressed in Treg cells at all time points in dLN and from day 10 in the inflamed CNS (*SI Appendix, Fig. S1*). To study the role of the TNF/TNFR2 axis in Treg cells during EAE, we first performed experiments with mice carrying germline deletion of TNFR2 (*Tnfrsf1b*^{−/−}, hereafter named

Significance

Regulatory T (Treg) cells have been highlighted for their central function in limiting the severity of autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS). To date, the anatomical location and timing of this Treg cell–mediated suppression are unknown. In this report, in a mouse model of MS, we demonstrate that Treg cells inhibit the pathogenic process directly in the central nervous system during established disease, rather than in the pre-symptomatic phase. This protective function requires the surface expression of TNF receptor 2 by Treg cells, as its genetic ablation or antibody-mediated blockade worsens disease symptoms. Our data reveal a unique function of Treg cells in autoimmunity and highlight TNFR2 as a promising therapeutic target.

Author contributions: Y.G.-B. and B.L.S. designed research; E.R., C.P., M.K., M.H., S.G., A.C., S.K., D.S., G.H.M., N.C., Y.L., C.A., B.L., and Y.G.-B. performed research; H.W. and B.L.S. contributed new reagents/analytic tools; E.R., C.P., M.K., M.H., S.G., S.K., G.L., C.A., B.L., G.M., Y.G.-B., and B.L.S. analyzed data; and E.R., C.P., Y.G.-B., and B.L.S. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

¹E.R. and C.P. contributed equally to this work.

²Y.G.-B. and B.L.S. contributed equally to this work.

³To whom correspondence may be addressed. Email: yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr or benoit.salomon@inserm.fr.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2014043118/-DCSupplemental>.

Published March 25, 2021.

“KO”). As previously observed (16–18), KO mice exhibited normal CD4⁺ T cell numbers but had reduced Treg cell numbers in the spleen at steady state (SI Appendix, Fig. S2). These mice developed more severe EAE than wild-type (WT) controls, which was associated with reduced Treg cell accumulation in the inflamed CNS (SI Appendix, Fig. S3 A and B). We then generated bone marrow chimeric mice to assess the role of TNFR2 expression by hematopoietic and nonhematopoietic cells. Ablation of TNFR2 in the immune system, but not in the nonhematopoietic compartment, led to exacerbated EAE and reduced Treg cell numbers in the CNS (SI Appendix, Fig. S3 C–F). This role of TNFR2 in Treg cell expansion was a cell-autonomous mechanism, as revealed by their reduced numbers in the competitive environment of mixed bone marrow chimeras (SI Appendix, Fig. S3G).

TNFR2 Signaling in Treg Cells Mediates Disease Suppression during Overt CNS Inflammation. To further delineate the cell-autonomous role of TNFR2 in Treg cell biology, we generated mice with conditional ablation of TNFR2 in Treg cells by crossing mice expressing the CRE-recombinase in Treg cells (*Foxp3^{Cre}*) with mice carrying floxed *Tnfrsf1b* alleles (*Tnfrsf1b^{fl}*). It was critical to compare these *Foxp3^{Cre}Tnfrsf1b^{fl}* (hereafter named conditional knockout or “cKO”) mice with their proper controls, the *Foxp3^{Cre}* mice, because of putative toxic effect of Cre expression, as recently reported (19, 20). As expected, Treg cells of cKO mice had complete ablation of TNFR2 expression (SI Appendix, Fig. S4A). However, a partial decreased TNFR2 expression was also observed on Tconv cells, which was likely due to leakiness of Cre expression in non-Treg cells in *Foxp3^{Cre}* mice, previously reported in other mouse models (21, 22). cKO mice had no sign of spontaneous autoimmunity and displayed normal body weight (SI Appendix, Fig. S4B). Treg cell proportion, numbers, and expression of Foxp3, CD25, and CTLA-4 in lymphoid tissues were unaltered (SI Appendix, Fig. S4 C and D). Also, the in vitro suppressive capacity of Treg cells was not or slightly reduced by TNFR2 ablation (SI Appendix, Fig. S4 E and F). Therefore, TNFR2 is mainly dispensable for Treg cell homeostasis at steady state.

Next, we explored the cell-autonomous function of TNFR2 in Treg cells during CNS inflammation. Strikingly, compared with controls, cKO mice developed a very severe EAE leading to death in almost half of the mice by day 15 (Fig. 1A). This was not associated with increased total leukocyte infiltration in the CNS or dLN (SI Appendix, Fig. S5A). Treg cell proportions were only transiently reduced at day 10 in the CNS of cKO mice (Fig. 1B and SI Appendix, Fig. S5B), and the overall level of Foxp3, Ki67, CD25, or Helios was unaltered (SI Appendix, Fig. S5D). Also, TNFR2-deficient Treg cells did not acquire the capacity to produce pathogenic cytokines, such as IFN γ , IL-17A, or GM-CSF after phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ionomycin stimulation in the CNS (SI Appendix, Fig. S5 E and F). However, further examination showed that these Treg cells in the CNS of cKO mice exhibited lower expression of CTLA-4, Blimp-1, and ICOS (Fig. 1 C and D and SI Appendix, Fig. S5C), which are markers of effector Treg cells (1, 23, 24). Interestingly, these quantitative and phenotypic Treg cell alterations in the CNS were not observed in the spleen or dLN. To further investigate whether TNFR2⁺ Treg cell-mediated suppression of EAE occurs during the priming or effector phase, we used an inducible Cre system allowing TNFR2 ablation in Treg cells upon tamoxifen treatment. We thus generated *Foxp3^{Cre-ERT2}Tnfrsf1b^{fl}* (hereafter named induced conditional KO or “icKO”) mice. Importantly, in most of these mice, tamoxifen administration induced TNFR2 ablation in Treg cells as efficiently as in cKO mice but not at all in Tconv cells (SI Appendix, Fig. S6A). This icKO model is thus of great interest since TNFR2 ablation is Treg cell-specific contrary to cKO mice. To assess whether EAE control by TNFR2-expressing Treg cells is taking place in the CNS after disease onset, we administered tamoxifen from day 7 to 14 after disease induction. Remarkably, EAE severity was dramatically increased in icKO when compared

with *Foxp3^{Cre-ERT2}* control animals, similarly to what we observed with cKO mice (Fig. 2A). At day 14, total leukocyte numbers, Treg cell proportions and numbers as well as their Foxp3 expression remained unaltered in CNS and dLN of icKO mice (Fig. 2B and SI Appendix, Fig. S6 B–D). Treg cell proportion was also normal at day 10 (SI Appendix, Fig. S6E). The proportion of activated CD44^{high}CD62L^{low} Treg cells was unchanged in dLN and CNS between icKO and control mice (SI Appendix, Fig. S7A). Also, Treg cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein 35–55 peptide (MOG)_{35–55}, the immunizing antigen in EAE, were present in similar proportions in icKO and control mice in both dLN and CNS (SI Appendix, Fig. S7B). However, TNFR2-deficient Treg cells expressed lower levels of CTLA-4 and Blimp-1 in the CNS (Fig. 2 C and D), as observed in cKO mice. Once again, this altered Treg cell phenotype was not observed in the dLN, which is compatible with a disease control by TNFR2⁺ Treg cells in the inflamed CNS rather than in the dLN. Moreover, this suggests that TNFR2 was not involved in the initial activation steps but rather in the acquisition of an optimal immunosuppressive state by Treg cells after day 7.

To further address the mechanism of EAE exacerbation, we performed RNA-sequencing on Treg cells from the CNS and dLN of icKO and control mice at day 14. In the inflamed CNS, a number of important genes exhibited altered expression in mutant Treg cells (Fig. 2 E and F). For instance, the expression of several genes associated with the highly suppressive effector Treg cell subset, such as *Myb*, *Ccr8*, and *Cd177* (25), was downregulated in TNFR2-deficient Treg cells. Surprisingly, mRNA expression of *Ctla4* and *Prdm1* (Blimp-1) remained unchanged, suggesting that TNFR2 ablation in Treg cells may lead to post-transcriptional modifications. Conversely, genes usually associated with Tconv cell effector function, such as granzymes and perforin, and even *Cd8a* and *Cd8b* genes, displayed augmented expression in mutant Treg cells. Gene set enrichment analyses (GSEA) revealed an enrichment of the CD8⁺ Tconv cell signature in mutant Treg cells (SI Appendix, Fig. S8A). This was not due to cell contamination of the samples as mutant Treg cells expressed normal amounts of *Cd4* and *Zbtb7b* (ThPOK), as well as *Tbx21*, *Runx1*, or *Runx3*, compared with WT Treg cells (SI Appendix, Fig. S8B). To confirm these data, some of the differentially expressed genes were analyzed at protein level in the CNS. *CD8a*, *Thy1* (coding for CD90), and *Eomes* that had higher level of mRNA in TNFR2-deficient Treg cells (SI Appendix, Fig. S8C), also displayed increased protein expression (SI Appendix, Fig. S8D). Importantly, the increased CD8 α expression was due to a slight shift of the whole Treg cell population and not to the presence of few cells expressing high level of CD8, definitively ruling out the hypothesis of the presence of CD8⁺ Tconv cell contaminants. Interestingly, expression of the long noncoding RNA *Flicr*, which was described to negatively regulate *Foxp3* expression and Treg cell function (26), was increased in the absence of TNFR2. GSEA further confirmed that TNFR2-deficient Treg cells were less activated and did not acquire the full identity of Treg cells from the inflamed CNS, when compared with control Treg cells (Fig. 2G). Importantly, the differential expression of these genes in TNFR2-deficient Treg cells was not seen in dLNs, in which only subtle decrease in genes involved in homing such as *Ccr1*, *Itga5*, or *Itgam* was observed (SI Appendix, Fig. S9 A and B). Altogether, these results show that the loss of TNFR2 expression by Treg cells induces alteration of their activation and identity during EAE, specifically in the CNS and not in the dLN.

TNFR2 Expression by Treg Cells Limits the Activation and Pathogenic Function of Tconv Cells in the CNS. We then characterized the pathogenic profile of CD4 Tconv cells. Quite surprisingly, they acquired a similar CD44^{high}CD62L^{low} activated phenotype in icKO and control mice and expressed equivalent amounts of the

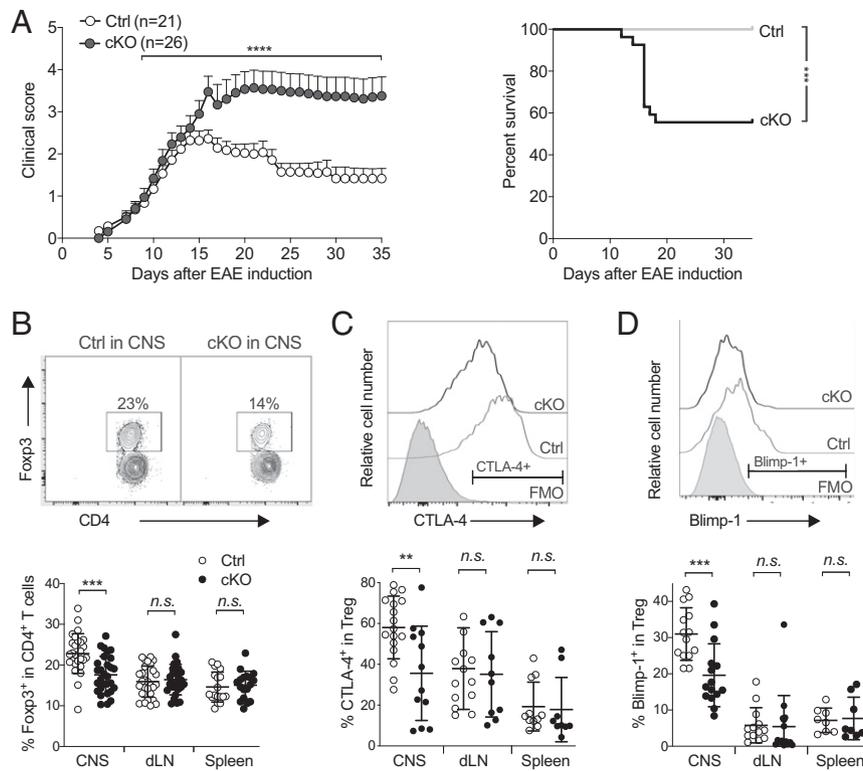


Fig. 1. Exacerbated EAE and impaired CNS Treg cell homeostasis in mice with constitutive ablation of TNFR2 in Treg cells. EAE was induced in *Foxp3^{Cre}Tnfrsf1b^{fl}* (cKO) and *Foxp3^{Cre}* control (Ctrl) mice. (A) EAE clinical score and disease survival. (B–D) FACS phenotyping at D10. Proportion of Treg cells (B) and of CTLA-4 (C) and Blimp-1 (D) expression among Treg cells is shown as mean \pm SD from four independent experiments with each symbol representing a mouse. Upper panels show representative dot plots and histograms of CNS Treg cells. Two-tailed, unpaired Mann–Whitney *U* (A, for EAE scores, and B–D), and log-rank (Mantel–Cox, A, for survival curves) were used; ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001; *n.s.*, nonsignificant.

pathogenic GM-CSF after strong polyclonal PMA ionomycin restimulation in dLN and CNS (SI Appendix, Fig. S10A and B). Also, MOG_{35–55}-specific Tconv cells were present in similar proportions in both types of mice in dLN and CNS (SI Appendix, Fig. S10C). More informative data were obtained when we performed transcriptomic analyses at day 14. In line with the aggravated EAE symptoms and the impairment of the Treg cell gene expression profile in icKO mice, transcriptomic analyses of CD4⁺ Tconv cell counterparts in the CNS showed major alterations. The expression of 185 and 229 genes was respectively down- and up-regulated in Tconv cells isolated from mutant animals, compared with controls (Fig. 3A). Tconv cells from icKO mice displayed a highly activated phenotype. Notably, mRNA of cytokines and chemokines (*Csf2*, *Il22*, *Ifng*, *Tnf*, *Il2*, *Lta*, *Ccl3*, *Ccl4*) and cytokine receptors and chemokine receptors as well as other activation markers (*Il2ra*, *Il12r*, *Ifngr*, *Ccr2*, *Ccr5*, *Icos*, *Fasl*, *Ctla4*, *Gzmb*) were significantly increased in these cells (Fig. 3B and SI Appendix, Fig. S9C). They also expressed increased levels of genes of signaling pathways (such as MAPK and NF- κ B), interferon signature (*Ifit*, *Isg*), and transcription factors (*Prdm1*, *Bhlhe40*, *Rora*, *Egr1*, *Fosl2*, *Junb*), known to be up-regulated in activated T cells. Accordingly, the expression of genes characterizing resting T cells were down-regulated in Tconv cells from the CNS of icKO mice, such as *Sell* (CD62L), *Ly6c1*, *Ccr7*, *Klf2*, *Bach2*, *Tcf7*, or *Lef1* (Fig. 3B). Among genes up-regulated in Tconv cells of icKO mice, network analysis of putative protein–protein interactions connected two nodes, one regrouping genes coding for activation markers with the other one belonging to an interferon signature. Interestingly, these two nodes were connected by the *Tnf* and *Ifng* genes (SI Appendix, Fig. S9D). The metabolic profile icKO Tconv cells further supports their activated status with increased expression of most genes of the glycolytic pathway as well as of *Slc2a1* (Glut1),

the main glucose transporter in T cells, and *Hif1a*, a master positive regulator of glycolysis (Fig. 3C and SI Appendix, Fig. S9C). GSEA further confirmed that these icKO Tconv cells had an activated status (Fig. 3D). Not only these Tconv cells have an activated status, but also their transcriptome suggests a Th1/Th17 pathogenic profile with increased expression of *Csf2* (GM-CSF), *Il22*, *Ifng*, *Ifngr*, or *Il12r*. We confirmed some of these results at the protein level by measuring cytokines produced by CNS-infiltrating cells isolated at day 14 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). GM-CSF, which is the major pathogenic cytokine produced by Tconv cells in EAE (27), was significantly increased in icKO mice compared with control mice after both anti-CD3 and immunizing myelin antigen stimulation (Fig. 3E). IL-17A and IFN- γ production were slightly increased in icKO Tconv cells as well but not significantly. All these modified expression patterns (gene expression and cytokine expression) were not observed—or at a much lower extent—in the dLN (SI Appendix, Fig. S9E–G). Altogether, these data strongly suggest that TNFR2 expression by Treg cells is involved in the local suppression of activated and pathogenic Tconv cells in the CNS after disease onset, but not in their initial priming in lymphoid tissues.

TNF/TNFR2 Signaling in Treg Cells Enables Local Suppression of EAE in the Inflamed CNS. We then conducted experiments to further confirm the CNS-restricted role of TNFR2-expressing Treg cells. In the course of active EAE, the disease is initiated in dLN and spleen. Then, from day 5, pathogenic Tconv cells migrate to the CNS where they are reactivated, leading to their progressive accumulation and increased inflammation, perpetuating locally the disease process (28). We first analyzed the phenotype of T cells during priming in lymphoid tissues to evaluate their capacity to acquire pathogenic features. We assessed expression of

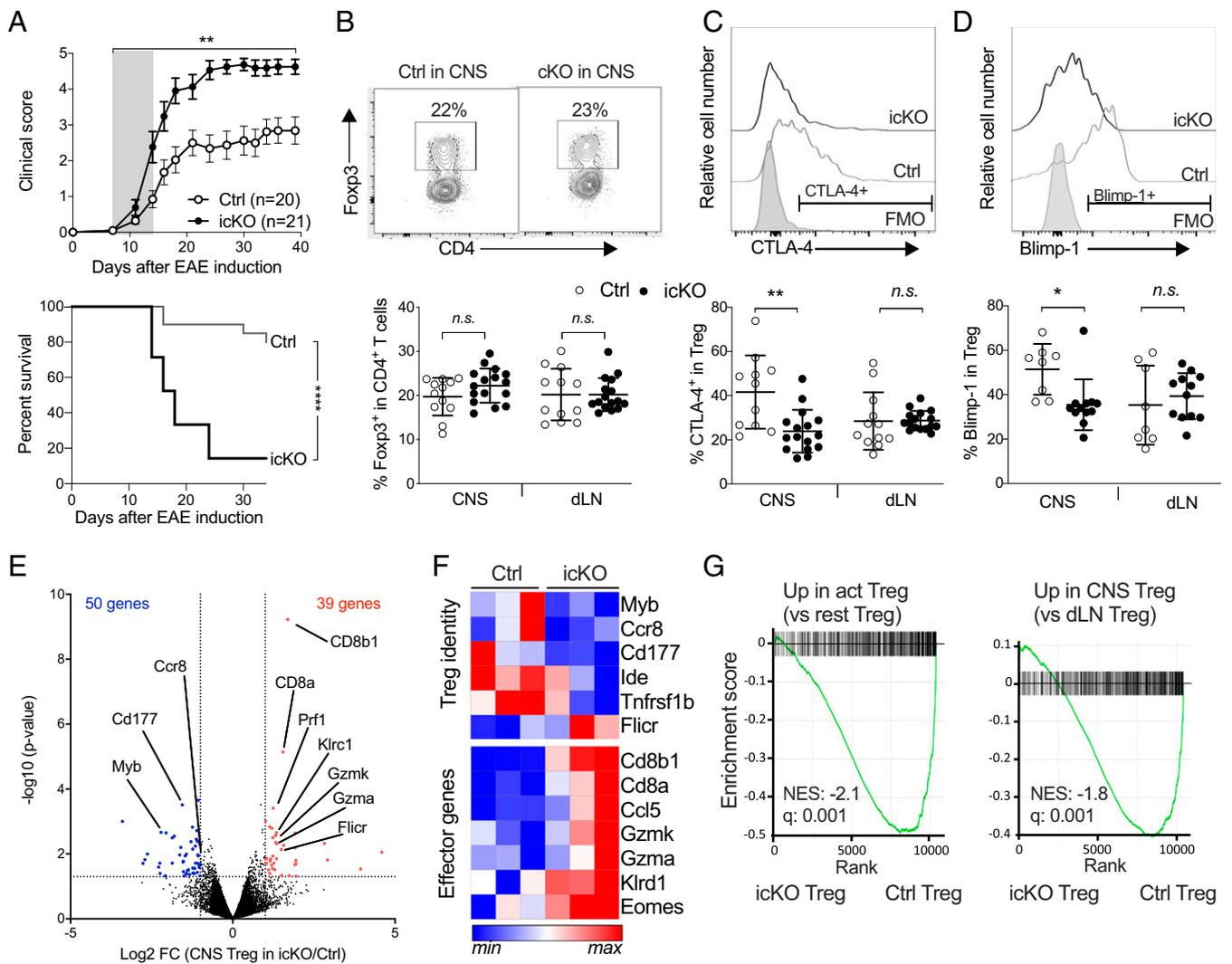


Fig. 2. Ablation of TNFR2 in Treg cells after disease onset induced exacerbated EAE and impaired Treg cell activation in the CNS. *Foxp3^{Cre-ERT2}Tnfrsf1b^{fl}* (icKO) and *Foxp3^{Cre-ERT2}* control (Ctrl) mice were immunized to induce EAE at day 0 and treated with tamoxifen from day 7 to 14. (A) EAE clinical score and disease survival. (B–D) FACS phenotyping at D14. Proportion of Treg cells (B) and of CTLA-4 (C) and Blimp-1 (D) expression among Treg cells is shown as mean \pm SD from four independent experiments with each symbol representing a mouse. Upper panels show representative dot plots and histograms of CNS Treg cells. (E–G) Gene expression analysis of CNS-infiltrating Treg cells at day 14. (E) Volcano plot depicting differentially expressed genes. (F) Heatmap showing expression of selected genes. (G) GSEA plots of icKO Treg cells compared with genes up-regulated in 36-h culture in vitro activated vs. resting Treg cells (Left) or with genes up-regulated in CNS vs. dLN Treg cells (Right). Two-tailed, unpaired Mann–Whitney *U* (A, for EAE scores, and B–D) and log-rank (Mantel–Cox, A, for survival curve) were used; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001; n.s., nonsignificant.

CD11a (LFA-1 α chain), CXCR3, CCR6, and CD49d (VLA-4 α chain) because of their involvement in T cell migration from lymphoid tissues to inflamed CNS during EAE (29, 30). Ten days after EAE induction, these molecules were expressed at the same levels in control and cKO mice, suggesting unaltered migration capacity into the CNS (SI Appendix, Fig. S11). To more directly quantify priming of MOG-reactive T cells, we transferred T cell receptor-transgenic Tconv cells specific for this antigen in cKO and control mice. Then, mice were immunized with MOG_{35–55} peptide, and we measured the activation of donor cells in dLN and spleen 3 and 7 d later. The level of T cell proliferation and expansion was high and comparable in the two groups of mice (Fig. 4A and SI Appendix, Fig. S12 A and B). Donor MOG-specific T cells expressed similar levels of CD11a and CD49d and of the IFN γ , IL-17A, and GM-CSF pathogenic cytokines after PMA–ionomycin stimulation in cKO mice compared with controls (SI Appendix, Fig. S12 C and D). Together with the unchanged proportions of MOG-reactive T cells we

detected in icKO animals (SI Appendix, Fig. S10C), these data suggest a normal priming of MOG-specific Tconv cells in lymphoid tissues in both cKO and icKO mice. To further assess the pathogenicity of polyclonal MOG-specific T cells primed in dLN, we measured their capacity to induce EAE after adoptive transfer in naive mice. Remarkably, cells primed in cKO and control mice, and restimulated ex vivo, induced similar passive EAE (Fig. 4B). Thus, all these data concur to show that exacerbation of EAE in cKO mice was not due to enhanced initial priming of MOG-specific T cells in spleen and dLN. Then, to further confirm that TNFR2-expressing Treg cells selectively controlled EAE severity within the inflamed CNS, we transferred WT pathogenic T cells to cKO or control naive mice. In this setting, injected cells rapidly migrated into the CNS to damage the neural tissue during passive EAE, without being primed in the dLN. Strikingly, EAE was much more severe in cKO than control recipients (Fig. 4C). We obtained similar findings when we transferred pathogenic T cells in WT recipients that were treated with an anti-TNF blocking mAb

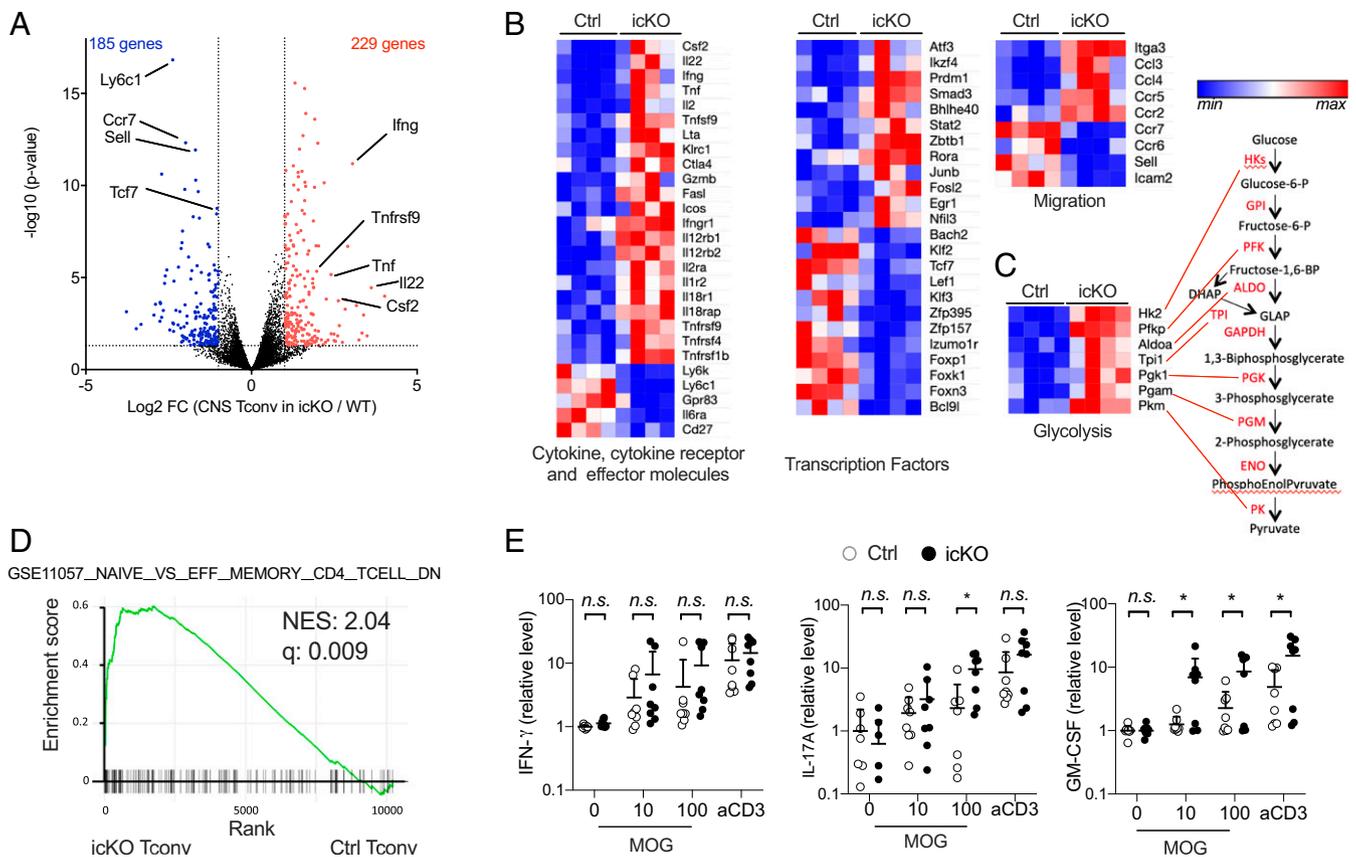


Fig. 3. TNFR2 expression by Treg cells limits the activation and pathogenic function of Tconv cells in the CNS. EAE was induced in *Foxp3^{Cre-ERT2}Tnfrsf1b^{fl}* (icKO) and *Foxp3^{Cre-ERT2}* control (Ctrl) mice that were treated with tamoxifen as in Fig. 2, and cells were analyzed at day 14. (A–D) Transcriptomic analyses on purified CD4⁺Foxp3[−] Tconv cells, isolated from the CNS. (A) Volcano plot depicting differentially expressed genes. (B) Heatmaps showing expression of selected genes (FDR < 0.05) coding for cytokine, cytokine receptor, and T cell effector molecules (Left), transcription factors (Middle), and molecules involved in T cell migration (Right). (C) Heatmaps showing expression of selected genes (FDR < 0.05) coding enzymes of the glycolytic pathway (Left) and their position in the pathway (Right). (D) GSEA plots of icKO Tconv cells compared with genes up-regulated in effector memory versus naive CD4 T cells from the indicated GSE pathway. (E) Cytokines produced by CNS-infiltrating leukocytes restimulated ex vivo by the immunizing MOG antigen (10 or 100 μg/mL) or an anti-CD3 mAb were measured by ELISA in the supernatants. Graphs show the fold change concentration over control unstimulated cells (No Stim). Pool of two independent experiments with each symbol representing an individual mouse. Two-way unpaired ANOVA test with Sidak correction for multiple comparisons. *P < 0.05; n.s., nonsignificant.

(Fig. 4D). Taken together, these results confirm our earlier findings that TNFR2 signaling in Treg cells is critical to control EAE within the inflamed CNS, rather than limiting the priming of pathogenic T cells in lymphoid tissues.

Systemic Modulation of the TNF/TNFR2 Axis Affects EAE Severity. The protective facet of TNF in CNS autoimmunity relied originally on observations made in patients. Indeed, anti-TNF therapies are formally contraindicated in MS patients because of disease exacerbation (31, 32). The mechanism of this long-term conundrum, well known to clinicians, remains essentially unexplained. To investigate whether our earlier findings could bring a mechanistic insight to this adverse effect of anti-TNF treatments, we assessed the effect of this therapy on EAE severity and Treg cell phenotype in EAE. WT mice were treated with a blocking anti-TNF mAb from day 10—a time when they developed the first clinical signs—until day 18. As observed in MS patients, these mice exhibited an aggravated form of EAE compared with isotype-control treated mice (Fig. 5A). Similar findings were obtained when using the clinically approved soluble TNFR2-Fc fusion receptor (Etanercept) to block TNF (Fig. 5B). Interestingly, TNF-blockade at earlier time points (from day 0) did not significantly modify the course of the disease (Fig. 5C),

highlighting once more the protective role of TNF during established disease and not during Tconv cell priming. We next analyzed the Treg cell compartment in the inflamed CNS of these mice. In anti-TNF-treated mice, Treg cell proportion was significantly reduced in the CNS compared with control animals, whereas it was unchanged in dLN. These observations are similar to the ones we previously made in TNFR2 conditional KO mice and further support the CNS-restricted role of TNF on Treg cells (Fig. 5D). This protective effect of TNF was most likely due to TNFR2 triggering since blocking this receptor with a specific mAb worsened EAE (Fig. 5E), similarly to anti-TNF mAb treatment or TNFR2 ablation in Treg cells. Finally, from a therapeutic perspective, we investigated whether stimulating TNFR2 signaling in the course of the disease could improve disease outcome. Remarkably, the use of a TNFR2-specific agonist from day 4 to 18 significantly reduced EAE severity (Fig. 5F). This therapeutic effect was lost in icKO animals, suggesting that this agonist functions by stimulating TNFR2-expressing Treg cells (SI Appendix, Fig. S13). Collectively, these data are in line with our previous findings, highlighting the protective role of TNF in CNS during EAE and providing a mechanistic explanation for the deleterious events following anti-TNF administration in patients with MS.

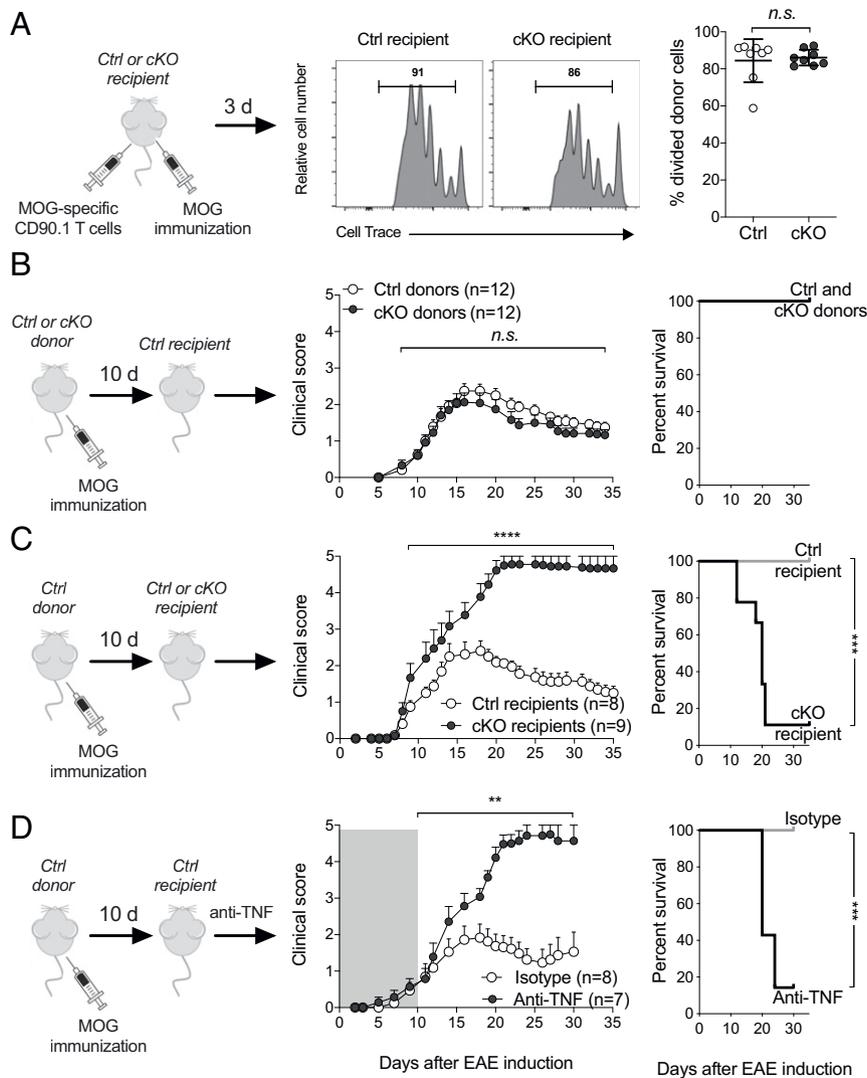


Fig. 4. TNF/TNFR2 signaling in Treg cells enables local suppression of EAE in the inflamed CNS. (A) Representative division profile (Left) and cumulative percentages of divided cells (Right) of MOG-specific CD90.1⁺ Tconv cells 3 d after transfer in *Foxp3^{Cre}Tnfrsf1b^{fl}* and *Foxp3^{Cre}* mice immunized to induce EAE. (B) Clinical score and disease survival of passive EAE induced in WT recipients transferred with pathogenic cells obtained from dLN of *Foxp3^{Cre}Tnfrsf1b^{fl}* (cKO) or *Foxp3^{Cre}* control (Ctrl) mice immunized 10 d earlier to induce EAE. (C) Clinical score and disease survival of passive EAE induced in cKO or control recipients transferred with pathogenic cells obtained from dLN of WT mice immunized 10 d earlier to induce EAE. (D) Clinical score and disease survival of passive EAE induced in WT recipients transferred with pathogenic cells obtained from dLN of WT mice immunized 10 d earlier to induce EAE. Recipients were treated with an anti-TNF or isotype control (Ctrl) mAb from day 0 to 8 after cell transfer. Data are from four (A) and two (B–D) independent experiments. In A, mean (\pm SD) from four experiments is shown; each dot represents a mouse. Unpaired *t* test was used. In B–D, mean (\pm SEM) from two experiments is shown. Two-tailed, unpaired Mann–Whitney *U* (for EAE scores and FACS analyses) and log-rank tests (Mantel–Cox, for survival curves) were used; ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001; *n.s.*, nonsignificant.

Discussion

The protective properties of Treg cells in autoimmune diseases are clearly established. However, when and where do endogenous Treg cells control these diseases remain unknown. Some published works provided indirect evidence that Treg cells may suppress an autoimmune disease in the target organ. Indeed, late accumulation of Treg cells was observed in the inflamed CNS during EAE (6, 33, 34). Systemic Treg cell deletion precipitated established autoimmune diseases but at the expense of massive and multifocal inflammation, precluding a proper evaluation of physiological function of Treg cells (6, 35). Administration of Treg cells specific for the target tissue had a therapeutic efficacy in organ-specific autoimmune diseases, suggesting a capacity to suppress pathogenic cells locally (36, 37). However, these studies did not address the role of endogenous Treg cells during the

natural course of the disease. Here, we found that TNFR2 ablation in Treg cells after EAE induction had no systemic impact but led to increased CNS inflammation and disease severity. This suggested that Treg cells suppressed EAE at peak of disease in the inflamed CNS and not during T cell priming in the dLN. This hypothesis was further supported by the following cumulative proofs. 1) Treg cell phenotype, and their proportion in some models, were altered in the CNS but not in the dLN in cKO mice, icKO mice, or WT mice treated with anti-TNF drugs. 2) Increased expression of activation molecules and pathogenic GM-CSF by Tconv cells could be observed in the CNS of icKO mice but not in dLN. The increased production of GM-CSF in icKO mice was no longer observed after PMA–ionomycin stimulation, probably because this strong and nonphysiological activation could outweigh the difference observed with more physiological

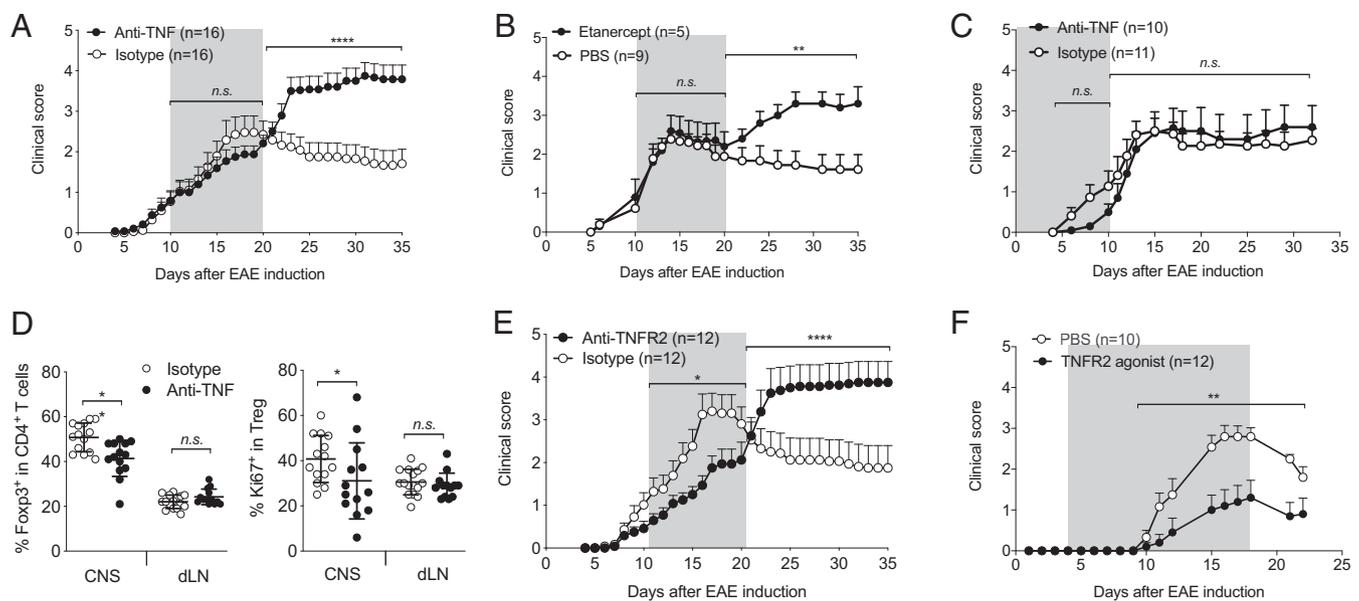


Fig. 5. Systemic modulation of the TNF/TNFR2 axis affects EAE severity. (A–C) EAE clinical score in C57BL/6 mice immunized to induce EAE (day 0) and treated with anti-TNF, or isotype control mAbs or Etanercept for the indicated periods of time (gray boxes). Mean (+SEM) from two (B) or three (A and C) independent experiments. (D) Proportions of Treg cells and of dividing Treg cells in the CNS and dLN of mice treated with anti-TNF mAb as in A, and analyzed at days 29 to 45. Mean (\pm SD) from five experiments; each dot represents a mouse. (E) EAE clinical score in mice treated with a blocking anti-TNFR2 or isotype control mAbs from day 10 to 18. Mean from two independent experiments. (F) EAE clinical score in mice treated from day 4 to 18 with a TNFR2 agonist. Mean (+SEM) from two independent experiments. Two-tailed unpaired Mann–Whitney *U* test was used. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001; *n.s.*, nonsignificant.

T cell receptor stimulation. 3) Activation and expansion in lymphoid tissues and migration into the CNS of polyclonal and MOG-specific T cells appeared normal in cKO and icKO mice, compared with control mice. 4) Blocking TNF in WT mice from day 10, but not from day 0, after disease induction led to EAE exacerbation, suggesting that the early autoimmune process that was primed in dLN was not altered by the absence of TNFR2 in Treg cells. In the same line, disease exacerbation following TNFR2 ablation in Treg cells was obtained when this deletion obtained by tamoxifen administration was performed 7 d after disease induction. 5) Cell transfer experiments showed that the activation of myelin-specific T cells in spleen and dLN, as well as their capacity to induce passive EAE, were largely similar in cKO and control mice. However, it remains possible that the ex vivo restimulation protocol, which is required to induce disease, may have skewed the potential differences between Tconv cells from the two strains. 6) Finally, pathogenic T cells from WT mice that were reactivated in the CNS after their injection induced a more severe disease in cKO than in control recipients. Thus, the control of EAE by TNFR2-expressing Treg cells is regulated in the inflamed CNS and not in the dLN. Together, our work strongly supports the concept that endogenous Treg cells suppress an autoimmune disease in the target tissue.

Our findings also provide some insight into the mechanism of EAE control by Treg cells in the CNS. Indeed, TNFR2 expression by Treg cells appears to control their function rather than their numbers. We did find a decreased proportion of Treg cells in the CNS at day 10 in cKO mice, but this was no more observed earlier (day 7) or later (day 15) in these mice or in the icKO animals. More importantly, TNFR2-deficient Treg cells have lower mRNA expression of several Treg cell–signature genes and increased expression of genes normally expressed by Tconv cells. Also, TNFR2-deficient Treg cells expressed a lower level of *Myb* that was shown to be essential for differentiation of effector Treg cells (25). The lack of TNFR2 expression in Treg cells seems to have an additional impact on protein expression, as observed for

CTLA-4 and Blimp-1, whose protein levels were decreased in CNS of icKO mice. This may alter Treg cell suppressive activity, as CTLA-4 is one of the major mechanisms of Treg cell–mediated suppression and Blimp-1 is critical to promote IL-10 production (1, 23, 24). Also, Blimp-1 is expressed by the fraction of highly suppressive effector Treg cells and is up-regulated in CNS Treg cells during EAE. Moreover, its ablation in Treg cells led to exacerbated EAE, reduced Treg cell identity, and increased expression of inflammatory cytokines, such as IL-17 (2, 3). Consequently, TNFR2-deficient Treg cells would be deficient in suppressing Tconv cells in the CNS, leading to massive Tconv cell activation, as observed at the level of activation markers, cytokines and chemokines, signaling molecules, transcription factors, and glucose metabolism. These highly activated Tconv cells produced an increased level of pathogenic cytokines such as GM-CSF, precipitating EAE. In conclusion, our data demonstrate that TNFR2 expression by Treg cells is essential to limit EAE severity by promoting their transient expansion and by increasing their suppressive function in the CNS, thereby limiting pathogenic Tconv cell activation. Thus, we reveal here a nonredundant function of TNF in the control of EAE in the inflamed CNS. Recent findings emphasized the critical role of IL-33 in the accumulation of Treg cells residing in the intestine or adipose tissues (38–40). Thus, depending on the tissue and type of inflammation, Treg cells may rely on different environmental cues (IL-33 and TNF) for their homeostasis and function.

Besides this nonredundant function of TNFR2 in Treg cells, our data also bring a mechanistic explanation to the deleterious effect of TNF blockade in patients with MS. A series of pre-clinical studies in mice conducted in the nineties concluded that blocking TNF was beneficial in EAE (reviewed in ref. 41). These findings led to initiate two clinical trials in MS patients that had to be rapidly stopped because of disease aggravation (31, 32). Here, we revisited this question using reagents that selectively block TNF, whereas older studies used drugs blocking both TNF and lymphotoxin- α , which is an issue since the latter cytokine is pathogenic in EAE (42). We found that blocking TNF at

Table 1. mAbs and fluorescent reagents used in this study

mAb or reagent	Clone	Vendor	Reference	Dilution
BV510 anti-mouse CD4	RM4-5	BD Biosciences	563106	1/500
BUV496 anti-mouse CD4	GK1.5	BD Biosciences	564667	1/400
Alexa Fluor 700 anti-mouse CD8a	53-6.7	BD Biosciences	557959	1/400
BUV805 anti-mouse CD8a	53-6.7	BD Biosciences	564920	1/400
PerCP-C5.5 anti-mouse CD11a	2D7	BD Biosciences	562809	1/100
Biotin anti-mouse CD25	7D4	BD Biosciences	553070	1/300
PE-Cy7 anti-mouse CD44	IM7	Invitrogen/eBioscience	25-0441-82	1/400
BUV395 anti-mouse CD45	30-F11	BD Biosciences	564279	1/400
PE-CF594 anti-mouse CD45	30-F11	BD Biosciences	562420	1/1000
PE anti-mouse CD45.1	A20	BD Biosciences	561872	1/100
Biotin anti-mouse CD45.1	A20	Miltenyi	130101902	1/10
PE anti-mouse CD49d	R1-2	BD Biosciences	553157	1/100
AF700 anti-mouse CD62L	MEL-14	BD Biosciences	560517	1/100
APC anti-mouse CD90.1	OX-7	BD Biosciences	561409	1/400
PE-Cy7 anti-mouse ICOS	7E.17G9	Invitrogen/eBioscience	25-9942-82	1/400
PE anti-mouse CTLA-4 (CD152)	UC104F10-11	BD Biosciences	553720	1/200
Alexa Fluor 647 anti-mouse Blimp-1	5E7	BD Biosciences	563643	1/100
PE-Cy7 anti-mouse Eomes	Dan11mag	Invitrogen/eBioscience	25-4875-80	1/100
BV421 anti-mouse TNFR2 (CD120b)	TR75-89	BD Biosciences	564088	1/200
FITC anti-mouse GITR	DTA-1	BD Biosciences	558139	1/200
PE anti-mouse Vβ11	RR3-15	BD Biosciences	553198	1/200
BV421 anti-mouse CCR6	140706	BD Biosciences	564736	1/20
APC anti-mouse CXCR3	CXCR3-173	BD Biosciences	562266	1/100
APC anti-human/mouse Foxp3	FJK-16s	Invitrogen/eBioscience	17-5773-82	1/200
FITC anti-human/mouse Foxp3	FJK-16s	Invitrogen/eBioscience	11-5773-82	1/200
PE-e610 anti-huma/mouse Foxp3	FJK-16s	Invitrogen/eBioscience	61-5773-82	1/100
eF450 anti mouse/human Ki67	SOLA15	Invitrogen/eBioscience	48-5698-82	1/400
AF647 anti-mouse IFNg	XMG1.2	BD Biosciences	557735	1/100
APC-Cy7 anti-mouse IL-17A	TC11-18H10	BD Biosciences	560821	1/100
PE anti-mouse GM-CSF	MP1-22E9	BD Biosciences	554406	1/100
BV421 streptavidin		BD Biosciences	563259	1/400
PE-Cy7 streptavidin		Invitrogen/eBioscience	25-4317-82	1/200
e450 cell trace		Life Technologies		1/2,000
e506 fixable viability dye		Invitrogen/eBioscience	65-0866-14	1/1,000

disease's peak induced EAE exacerbation, as in MS patients who were also treated during advanced disease progression. Interestingly, when TNF was blocked at earlier times, EAE was not exacerbated, and even slightly delayed. Thus, at disease initiation, TNF might be pathogenic by activating antigen-presenting cells via TNFR1, whereas it would regulate the disease afterward, by activating Treg cells via TNFR2 in the inflamed CNS. In this line, blocking TNFR1 at disease induction attenuated EAE (43), whereas we showed that blocking TNFR2 at day 10 induced disease exacerbation, similarly to late TNFR2 ablation in Treg cells. Furthermore, we demonstrated that stimulation of TNFR2 signaling reduced EAE severity.

In conclusion, our data reveal that the TNF/TNFR2 axis is critical to reach an optimal Treg cell function specifically in the CNS during EAE, thereby preventing excessive inflammation and controlling disease severity. Moreover, our results bring insights in the mechanism of autoimmune disease control by Treg cells and provide an explanation for the failure of anti-TNF therapy in MS patients, paving the way to the development of more specific treatments aiming at the selective blockade of TNFR1 and/or selective stimulation of TNFR2.

Methods

Mice. C57BL/6J (WT) mice were purchased from Janvier Labs (France). *Tnfrsf1b^{tm1Mvml}* (*Tnfrsf1b^{-/-}*), *Foxp3^{tm9(EGFP/cre)ERT2}Ayr/J* (*Foxp3^{Cre-ERT2}*), and C57BL/6 Tg (*Tcra2D2, Tcrb2D2*)1Kuch/J (2D2) T cell receptor transgenic mice, specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein, were purchased from The

Jackson Laboratory. *Cd3^{etm1Mal}* (*Cd3^{-/-}*), CD45.1, and CD90.1 mice were provided by the Cryopreservation Distribution Typing and Animal Archiving Department (Orléans, France). B6.129(Cg)-*Foxp3^{tm4(YFP/cre)Ayr/J}* (*Foxp3^{Cre}*) mice were a gift from Prof. Alexander Rudensky, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY. C57BL/6-*Tnfrsf1b^{<tm1c(EUCOMM)Wtsi>/lcs}* (*Tnfrsf1b^{fl}*) mice were obtained from the EMMA Consortium. All mice were on a C57BL/6J background or have been backcrossed at least 10 times to C57BL/6J mice. Mice were housed under specific pathogen-free conditions and were studied at 7 to 14 wk of age or 2 mo after bone marrow transplant.

TNF- and TNFR2-Targeting Biological. Anti-TNF (XT3-11) and anti-TNFR2 (TR75-54.7) mAbs were purchased from BioXCell and were injected at a dose of 500 µg by intraperitoneal route every other day for 8 or 14 d. Etanercept (TNFR2-Fc) was provided by Wyeth and was administered at a dose of 1 mg by intraperitoneal route every other day for 8 d. Purification and functional characterization of the TNFR2-specific agonist STAR2 have been described elsewhere (10).

Bone Marrow Transplantation. Bone marrow cells were isolated from tibia and femur of donor mice. Recipient mice were lethally irradiated (10.5 Gy) and transplanted intravenously with 10×10^6 bone marrow cells. EAE was induced at least 8 wk after transplantation.

EAE Induction. For active EAE, mice were injected subcutaneously in the flanks with 100 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Polypeptide) emulsified in 100 µL of complete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich) supplemented with 50 µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (BD Biosciences). Animals were additionally injected intravenously with 200 ng of *Bordetella pertussis* toxin (Enzo) at the time of immunization and 2 d later. For the passive EAE model, we first induced active EAE in donor mice as described above to generate pathogenic

cells. Ten days postimmunization, cells from spleen and dLN were cultured in complete RPMI (Gibco) medium with 10% fetal calf serum at 5×10^6 cells/mL with 20 $\mu\text{g/mL}$ MOG_{35–55} peptide, 10 $\mu\text{g/mL}$ anti-IFN γ (XMG1.2, BioXCell), and 5 ng/mL IL-23 (R&D Systems). After 3 d, dead cells were removed with a Ficoll gradient, and 2×10^6 cells were injected intravenously to recipient mice to induce passive EAE. The clinical evaluation was performed on a daily basis by a six-point scale ranging from 0, no clinical sign; 1, limp tail; 2, limp tail, impaired righting reflex, and paresis of one limb; 3, hindlimb paralysis; 4, hindlimb and forelimb paralysis; to 5, moribund/death. A score of 5 was permanently attributed to dead animals.

Preparation of Cell Suspensions. For isolation of CNS-infiltrating leukocytes, mice were anesthetized with a xylazine/ketamine solution and perfused with cold PBS. Spinal cords were removed by intrathecal hydrostatic pressure. Brain and spinal cords were cut into small pieces and digested in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 1 mg/mL collagenase type IV (Sigma), 100 $\mu\text{g/mL}$ DNase I (Sigma), and 1 $\mu\text{g/mL}$ TLCK for 30 min at 37 °C followed by mechanical desegregation. Single-cell suspensions were washed once and resuspended in Percoll 40%. For fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, cells were laid on a Percoll 80% solution, centrifuged for 20 min at 2,000 rpm at room, and mononuclear cells were collected from the interface of the 40:80% Percoll gradient and were washed two times in a PBS–3% fetal calf serum buffer. For FACS cell sorting, cells were centrifuged for 10 min at 400 $\times g$ and mononuclear cells were collected from the pellet of the monolayer Percoll gradient. Cells from thymus, spleen, and LN were obtained after mechanical dilacerations.

Antibodies and Flow Cytometry Analysis. The mAbs and fluorescent reagents used in this study are listed Table 1. Intracellular staining was performed using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set kit and protocol from eBioscience. Identification of MOG-specific T cells was performed using the I-A(b) mouse MOG 38–49 GWYRSPFSRVVH APC-labeled tetramer, obtained from the NIH Tetramer Facility, according to their protocol. Intracellular cytokine staining (SI Appendix, Figs. S5, S10, and S12) was assessed after 4 h of PMA (25 ng/mL)–ionomycin (1 mg/mL) stimulation in RPMI 1640 containing 10% FCS and Golgi plug (BD Biosciences).

Cells were acquired on a BD LSRII cytometer and analyzed using the FlowJo software.

Treg and Tconv Cell Purification. For suppression assay, colitis and transcriptomic analyses, cell suspensions from the spleen, LN, or the CNS were stained with e780 viability dye, BV510 anti-CD4 (RM4-5), and PE-CF594 anti-CD45 (30F11) mAbs. Purified Tconv cells (CD4⁺YFP[−] or CD4⁺GFP[−]) and Treg cells (CD4⁺YFP⁺ or CD4⁺GFP⁺) were obtained using a BD FACSAria II. For transcriptomic analyses, cells were sorted twice with the cytometer leading to over 99.8% purity.

Cell Culture. Culture medium was composed of RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum. For suppression assay, purified Tconv cells (2.5×10^4 cells/well), labeled with CellTrace Violet (Proliferation Kit; Life Technologies), and purified Treg cells were stimulated by splenocytes from *Cd3^{−/−}* mice (7.5×10^4 cells/well) and soluble anti-CD3 mAb (0.05 $\mu\text{g/mL}$ 2C11; BioXCell) in 96-well plate at different Treg/Tconv cell ratios. At day 3, CellTrace dilution was assessed by flow cytometry. To assess TNFR2 expression, whole splenocytes (3×10^6 cells/well) were stimulated by soluble anti-CD3 (5 $\mu\text{g/mL}$ 2C11; BioXCell) in 96-well plate. For ELISA studies (Fig. 3 and SI Appendix, Fig. S9), cells from 3.5×10^6 LN cells in 2 mL in 24-well plates or 1×10^5 CNS cells in 200 μL in 96-round bottom well plates were stimulated with 10 or 100 $\mu\text{g/mL}$ MOG or with 5 $\mu\text{g/mL}$ anti-CD3 mAb (2C11) for 24 h (CNS cells) or 72 h (LN cells) before performing ELISA on the supernatant using kits from Invitrogen.

Adoptive Transfer of 2D2 T Cells. LN and spleen cells from 2D2 CD90.1 or 2D2 CD45.1 mice were stained incubated with anti-CD19 (6D5), anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (N418), anti-CD8 (53-6.7), and anti-CD25 (7D4) biotin-labeled mAbs, and then were coated with anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec). After magnetic sorting, cells of the CD4⁺ enriched negative fraction were

labeled with CellTrace Violet Proliferation Kit and were intravenously injected in naive mice (10^6 cells/mouse). The following day, mice were immunized with MOG_{35–55} peptide as for EAE induction. Donor cells, identified by their CD4⁺CD90.1⁺V β 11⁺ (T cell receptor transgene) or CD45.1⁺CD3⁺ phenotypes, were analyzed by flow cytometry in dLNs and spleen 3 or 7 d later.

RNA-Sequencing and Bioinformatics Analyses. RNA was extracted from highly purified Treg and Tconv cells using the NucleoSpin RNA XS kit from Macherey-Nagel, quantified using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies), and purity/integrity was assessed using disposable RNA chips (Agilent High Sensitivity RNA ScreenTape) and an Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies). mRNA library preparation was performed following manufacturer's recommendations (SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit; TAKARA). Final-17 samples pooled library prep was sequenced on NextSeq 500 Illumina with HighOutput cartridge (2×400 million of 75 base reads), corresponding to 2 times 23×10^6 reads per sample after demultiplexing. Poor quality sequences have been trimmed or removed with Trimmomatic software to retain only good quality paired reads. Star v2.5.3a (44) has been used to align reads on reference genome mm10 using standard options. Quantification of gene and isoform abundances has been done with rsem 1.2.28 (45) prior to normalization on library size with DESeq2 bioconductor package. Finally, differential analysis has been conducted with edgeR bioconductor package. Multiple hypothesis adjusted *P* values were calculated with the Benjamini–Hochberg procedure to control false-discovery rate (FDR). For Treg cells, data were obtained from a biological triplicate. For Tconv cells, data were obtained from two independent experiments with biological quadruplicate, after exclusion of two outliers. GSEA has been done with fgSEA bioconductor R package (v1.12.0) on preranked list. Genes in our dataset (GSE165821) were ranked according to the signed fold-change multiplied by the $-\log_{10}$ *P* value of the differential analysis. Gene sets were extracted from GSE165821 (Fig. 2 G, Right), GSE146135 (Fig. 2 G, Left), and GSE11057 (Fig. 3D).

Statistics. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 8.3.1. For EAE scores and two-group comparisons, statistical significance was determined using the two-tailed unpaired nonparametric Mann–Whitney *U* test, excluding D0 to D5 as all scores were 0. For survival curves, log-rank (Mantel–Cox) test was used. For ELISAs, two-way unpaired ANOVA test with Sidak correction for multiple comparisons was used. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001.

Study Approval. All experimental protocols were approved by Comité d'Éthique en Expérimentation Animal Charles Darwin No. 5 under number 02811.03 and are in compliance with European Union guidelines.

Data Availability. The RNA-seq data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> (accession no. GSE165821). All other study data are included in the article and/or SI Appendix.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Grants (ANR-15-CE15-0015-03, ANR-17-CE15-0030-01), Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM), Fondation Bettencourt Schueller (to B.L.S.), Association de la Recherche sur la Sclérose en Plaques (to B.L.S. and Y.G.-B.), the ATIP-Avenir Young Investigator Program (to Y.G.-B.), Institut Français de Recherche et d'Enseignement Supérieur à l'International (to M.K.), and Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants (324392634-TRR 221, WA 1025/31-1) (to H.W.). We are grateful to Prof. Alexander Rudensky for providing us with the Foxp3Cre mice, to Prof. Jeffrey Bluestone and Matthew Krummel for critical reading of the manuscript, to Dr. Lennart Mars for providing us with the 2D2 mice, and to Doriane Foret, Flora Issert, Olivier Bregerie, and Maria Mihoc for their expert care of the mouse colony. We thank the NIH Tetramer Facility for providing us with the MOG tetramer. We are grateful for the great expertise of Yannick Marie, Delphine Bouteiller, Beata Gyorgy, and Justine Guegan from the bioinformatic platform of Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (Paris).

1. E. Cretney *et al.*, The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 304–311 (2011).
2. G. Garg *et al.*, Blimp1 prevents methylation of Foxp3 and loss of regulatory T cell identity at sites of inflammation. *Cell Rep.* **26**, 1854–1868.e5 (2019).
3. C. Ogawa *et al.*, Blimp-1 functions as a molecular switch to prevent inflammatory activity in Foxp3⁺ROR γ ⁺ regulatory T cells. *Cell Rep.* **25**, 19–28.e5 (2018).

4. S. Z. Josefowicz, L. F. Lu, A. Y. Rudensky, Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
5. J. B. Wing, A. Tanaka, S. Sakaguchi, Human FOXP3⁺ regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. *Immunity* **50**, 302–316 (2019).
6. M. J. McGeachy, L. A. Stephens, S. M. Anderson, Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells within the central nervous system. *J. Immunol.* **175**, 3025–3032 (2005).

7. A. P. Kohm, P. A. Carpentier, H. A. Anger, S. D. Miller, Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **169**, 4712–4716 (2002).
8. S. Hori, M. Haurly, A. Coutinho, J. Demengeot, Specificity requirements for selection and effector functions of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8213–8218 (2002).
9. X. Chen, M. Bäümel, D. N. Männel, O. M. Howard, J. J. Oppenheim, Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* **179**, 154–161 (2007).
10. M. Chopra *et al.*, Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *J. Exp. Med.* **213**, 1881–1900 (2016).
11. Y. Grinberg-Bleyer *et al.*, Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J. Clin. Invest.* **120**, 4558–4568 (2010).
12. M. Leclerc *et al.*, Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* **128**, 1651–1659 (2016).
13. B. Zaragoza *et al.*, Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. *Nat. Med.* **22**, 16–17 (2016).
14. S. Yang *et al.*, Differential roles of TNF α -TNFR1 and TNF α -TNFR2 in the differentiation and function of CD4⁺Foxp3⁺ induced Treg cells in vitro and in vivo periphery in autoimmune diseases. *Cell Death Dis.* **10**, 27 (2019).
15. K. N. Atrekhany *et al.*, Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, 13051–13056 (2018).
16. L. Probert *et al.*, TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. *Brain* **123**, 2005–2019 (2000).
17. G. C. Suvannavejh *et al.*, Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG_{35–55}-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* **205**, 24–33 (2000).
18. N. Tsakiri, D. Papadopoulos, M. C. Denis, D. D. Mitsikostas, G. Kollias, TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3⁺ Treg-cell function and disease suppression in EAE. *Eur. J. Immunol.* **42**, 403–412 (2012).
19. B. Becher, A. Waisman, L. F. Lu, Conditional gene-targeting in mice: Problems and solutions. *Immunity* **48**, 835–836 (2018).
20. M. Kurachi, S. F. Ngjow, J. Kurachi, Z. Chen, E. J. Wherry, Hidden caveat of inducible cre recombinase. *Immunity* **51**, 591–592 (2019).
21. P. D. Bittner-Eddy, L. A. Fischer, M. Costalonga, Cre-loxP reporter mouse reveals stochastic activity of the *Foxp3* promoter. *Front. Immunol.* **10**, 2228 (2019).
22. D. Franckaert *et al.*, Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3⁺ and Foxp3⁻ T cells. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 417–423 (2015).
23. K. Wing *et al.*, CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–275 (2008).
24. C. Neumann *et al.*, Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers. *J. Exp. Med.* **211**, 1807–1819 (2014).
25. S. Dias *et al.*, Effector regulatory T cell differentiation and immune homeostasis depend on the transcription factor Myb. *Immunity* **46**, 78–91 (2017).
26. D. Zemmour, A. Pratama, S. M. Loughhead, D. Mathis, C. Benoist, *Flicr*, a long non-coding RNA, modulates Foxp3 expression and autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E3472–E3480 (2017).
27. L. Codarri *et al.*, ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* **12**, 560–567 (2011).
28. S. L. Bailey, B. Schreiner, E. J. McMahon, S. D. Miller, CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides “preferentially” polarize CD4⁺ T_H-17 cells in relapsing EAE. *Nat. Immunol.* **8**, 172–180 (2007).
29. F. Sallusto *et al.*, T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol. Rev.* **248**, 216–227 (2012).
30. R. Sporici, T. B. Issekutz, CXCR3 blockade inhibits T-cell migration into the CNS during EAE and prevents development of adoptively transferred, but not actively induced, disease. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2751–2761 (2010).
31. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, TNF neutralization in MS: Results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* **53**, 457–465 (1999).
32. B. W. van Oosten *et al.*, Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* **47**, 1531–1534 (1996).
33. T. Korn *et al.*, Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* **13**, 423–431 (2007).
34. R. A. O’Connor, K. H. Malpass, S. M. Anderton, The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* **179**, 958–966 (2007).
35. M. Feuerer, Y. Shen, D. R. Littman, C. Benoist, D. Mathis, How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity* **31**, 654–664 (2009).
36. L. A. Stephens, K. H. Malpass, S. M. Anderton, Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3⁺ Treg. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1108–1117 (2009).
37. Q. Tang *et al.*, In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* **199**, 1455–1465 (2004).
38. C. Schiering *et al.*, The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* **513**, 564–568 (2014).
39. D. Kolodin *et al.*, Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cell Metab.* **21**, 543–557 (2015).
40. A. Vasanthakumar *et al.*, The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **16**, 276–285 (2015).
41. C. A. Dendrou, J. I. Bell, L. Fugger, A clinical conundrum: The detrimental effect of TNF antagonists in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics* **14**, 1397–1404 (2013).
42. W. E. Suen, C. M. Bergman, P. Hjelmsström, N. H. Ruddle, A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **186**, 1233–1240 (1997).
43. S. K. Williams *et al.*, Antibody-mediated inhibition of TNFR1 attenuates disease in a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One* **9**, e90117 (2014).
44. A. Dobin *et al.*, STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
45. B. Li, C. N. Dewey, RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323 (2011).