

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

---

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

									2	9
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

# Les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> : relation avec les lymphocytes T<sub>H</sub>17 et implication dans les cancers humains

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Médecine et Santé

Spécialité : Immunologie

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Caroline RAFFIN**

*Le 9 Décembre 2013, devant le jury ci-dessous*

Président : Pr Eric TARTOUR, PU-PH, Paris  
Rapporteurs : Pr Eric TARTOUR, PU-PH, Paris  
Dr Lionel APETOH, CR, Dijon

*Directrices de thèse*

Pr Danila VALMORI, PU-PH, Nantes  
Dr Maha AYYOUB, DR, Nantes  
(UMR INSERM U1102)

*"There's real poetry in the real world  
Science is the poetry of reality"*

Richard Dawkins

# Remerciements

Je remercie tout d'abord Pr Eric TARTOUR et Dr Lionel APETOH d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Pr Karin TARTE et Pr Naomi TAYLOR, pour l'intérêt porté à ma thèse et à mon parcours actuel et à venir ainsi que pour leurs encouragements.

Je tiens à remercier sincèrement mes directrices de thèses, Pr Danila VALMORI et Dr Maha AYYOUB, pour avoir cru en moi et m'avoir encouragé à réaliser ma thèse. Merci pour le temps passé à me former ainsi que pour votre confiance, votre considération et votre patience.

Je salue tous mes collègues de travail, les actuels et les anciens : Isabelle, Nassima, Ahmed, Caroline (à ton tour de devenir ma thésarde préférée), Karine, Clara, Clotilde, Emilie et Kanako. Merci pour votre aide, votre soutien et votre bonne humeur. Une spéciale dédicace à Pascale, ma presque jumelle : travailler avec toi a été un vrai bonheur. En plus d'être professionnellement excellente, tu l'es humainement, tu as toujours les mots justes et nos discussions vont me manquer.

Merci à la Ligue Nationale contre le Cancer d'avoir financé mes 3 années de thèse.

Je tiens à saluer tous les nombreux membres de ma famille, je vous remercie pour votre soutien au cours de ces dernières années ainsi que pour l'amour et la gentillesse que vous portez à mon égard depuis que j'ai poussé mes premiers cris. Je salue tout particulièrement mes grands-mères que j'aimerais voir plus souvent.

Je remercie mes parents de m'avoir éduqué en me laissant libre de faire mes propres choix depuis mon plus jeune âge, sans me mettre la moindre pression. J'ai toujours eu le sentiment que quoique je fasse vous seriez toujours fiers de moi, par conséquent cette thèse je l'ai faite pour moi. J'espère cependant que l'arbuste dont vous étiez les tuteurs est en train de devenir un arbre qui vous satisfait (malgré son attraction pour les contrées lointaines). Maman, merci de m'avoir transmis ton optimisme à toute épreuve et puis merci pour tes bons petits plats et toutes ces 'petites' délicates attentions. Papa, merci de m'avoir donné un peu de tes talents de bricoleur qui m'ont été bien utiles au cours de ma thèse (réparations du FACS Aria, piège à souris,...). Christophe, avoir un grand frère hyperactif et curieux de tout, m'a permis de découvrir plein de choses et je pense que je te dois mon intérêt pour la Biologie ainsi que mes (bons) goûts musicaux. Ma petite Nanou, je m'en veux un peu de partir si loin de toi à un moment charnière de ta vie mais je te promets d'assurer mon rôle de grande sœur comme une pro malgré la distance. Merci à vous 5 pour votre soutien.

Je tiens à remercier ma 2<sup>nd</sup>e famille, celle du '5 bis', pour être si fidèle en amitié malgré nos vies bien remplies. Merci infiniment à Gaëlle, Pascal et Keny, Laura et Nico, Loïc et Nancy pour tous les bons moments passés et futurs, pour votre écoute (surtout Keny), votre joie de vivre et votre générosité. Gagou, qu'aurait été ma vie sans toi ? (voisines forever <3). Nico et Laura, merci de m'avoir bichonné et soutenu comme vous l'avez fait ces derniers mois, vous avez été adorables. J'ai vraiment une chance incroyable d'avoir des amis comme vous tous.

Merci également à tous mes autres amis proches et de longue date : Ingrid (on en aura vécu des choses depuis ce fameux : « Salut! Tu veux bien être mon amie? »), Lolita et Thierry, Nicolas A. ainsi qu'Aurélie, Julien et Ethan.

I also would like to thank all the foreign people that I had the chance to meet during congresses or at the lab, who became good friends and maybe one day collaborators (who knows?), especially Susy and Sebastián. A special thanks to Ilgiz: you supported me a lot during those last crazy busy months and gave me the chance to take some real breaks. So, thank you very much.

J'en profite également pour saluer tous mes collègues de faculté, on aura finalement tous survécu à ce long et périlleux périple qu'est la thèse! Je salue aussi toute la tribu des chambretaudais et tous mes amis nantais.

Enfin, je remercie également toutes les personnes que j'aurais pu oublier et je vous demande par avance de bien vouloir m'en excuser.

Et n'oubliez pas : « *If you're going to San Francisco* », je vous accueillerai avec grand plaisir!

# Sommaire

<b>Remerciements</b>	<b>2</b>
<b>Sommaire</b>	<b>4</b>
<b>Abréviations</b>	<b>7</b>
<b>Introduction</b>	<b>10</b>
<b>1- Le système immunitaire : généralités</b>	<b>11</b>
A- La réponse immunitaire innée	11
B- La réponse immunitaire adaptative	15
<b>2- Les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup></b>	<b>19</b>
A- Le paradigme T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2	20
a. Découverte des sous-populations de T <sub>H</sub> 1 et T <sub>H</sub> 2	20
b. Voies de différenciation des T <sub>H</sub> 1 et T <sub>H</sub> 2	20
c. Fonctions des T <sub>H</sub> 1 et T <sub>H</sub> 2	21
d. Dichotomie T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2	22
B- Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> régulateurs	23
a. Découverte des LT régulateurs	23
b. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des Treg	24
c. Origines des Treg présents dans la périphérie	29
C- Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17	35
a. Découverte des T <sub>H</sub> 17	35
b. Voies de différenciation des T <sub>H</sub> 17	36
c. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des T <sub>H</sub> 17	38
D- Les autres sous-populations de LT CD4 <sup>+</sup>	40
a. Les autres populations de LT CD4 <sup>+</sup> auxiliaires	40
b. Les autres populations de LT CD4 <sup>+</sup> suppressives	41
<b>3- Flexibilité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup></b>	<b>42</b>
A- Plasticité des LT CD4 <sup>+</sup> auxiliaires	43
B- Plasticité, stabilité et hétérogénéité des Treg	44
a. Spécialisation et/ou conversion des Treg	44
b. Stabilité des Treg	48
<b>4- La réponse immunitaire dans le cancer épithélial de l'ovaire</b>	<b>51</b>
A- Cancérologie	51
a. Les cellules cancéreuses	51
b. Le cancer épithélial de l'ovaire	52
B- La réponse immunitaire anti-tumorale	53
a. Immunosurveillance du cancer	53
b. La théorie des trois E	55
c. Les lymphocytes T régulateurs dans le cancer	58
d. La réponse immunitaire anti-tumorale dans le CEO	64
<b>5- Objectif de la thèse</b>	<b>66</b>

**PARTIE 1 : Etude des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants humains exprimant l'IL-1RI ex vivo** \_\_\_\_\_ **69**

1- Etude de l'expression de l'IL-1RI par les LT CD4 <sup>+</sup> circulants humains <i>ex vivo</i>	70
2- Etude de la production d'IL-17 et de l'expression de ROR $\gamma$ t dans la sous-population des MTreg IL-1RI <sup>+</sup>	72
3- Analyse du stade de différenciation des MTreg IL-1RI <sup>+</sup> produisant de l'IL-17	73
4- Etude cinétique de l'induction de l'expression de l'IL-1RI dans les NTreg après stimulation en condition polarisante pro-T <sub>H</sub> 17	76
5- Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules IL-1RI <sup>+</sup> obtenues à partir des NTreg après stimulation en condition polarisante pro-T <sub>H</sub> 17	78
6- Etude de la sensibilité des CM Treg IL-1RI <sup>+</sup> à l'IL-1 $\beta$	80
7- Bilan de la Partie 1	83

**PARTIE 2 : Etude comparative des sous-populations de Treg FOXP3<sup>+</sup> mémoires Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> humains ex vivo** \_\_\_\_\_ **84**

1- Etude de la production cytokinique dans les sous-populations de Treg FOXP3 <sup>+</sup> mémoires Helios <sup>+</sup> et Helios <sup>-</sup>	85
2- Etude comparative du profil d'expression phénotypique des Treg FOXP3 <sup>+</sup> mémoires Helios <sup>-</sup> et Helios <sup>+</sup>	87
3- Mise au point d'une stratégie de tri par cytométrie de flux, basée sur l'expression différentielle de l'IL-1RI et de CCR7, permettant la séparation des sous-populations de Treg mémoires Helios <sup>-</sup> et Helios <sup>+</sup> <i>ex vivo</i>	91
4- Etude de l'expression d'autres facteurs de transcription membres de la famille d'Ikaros dans les Treg FOXP3 <sup>+</sup> mémoires Helios <sup>-</sup> et Helios <sup>+</sup>	93
5- Etude de l'état de méthylation de la région TSDR chez les Treg mémoires Helios <sup>-</sup> et Helios <sup>+</sup>	95
6- Analyse des capacités prolifératives et de la stabilité phénotypique des Treg mémoires Helios <sup>-</sup> et Helios <sup>+</sup>	96
7- Etude des capacités suppressives des Treg mémoires Helios <sup>+</sup> et Helios <sup>-</sup> et de leur sensibilité à l'IL-1 $\beta$	98
8- Etude de l'expression du facteur de transcription Helios dans le compartiment des LT CD4 <sup>+</sup> naïfs	100
9- Bilan de la Partie 2	101

**PARTIE 3 : Caractérisation des lymphocytes T régulateurs présents au site tumoral dans le cancer épithélial de l'ovaire** \_\_\_\_\_ **103**

1- Etude du stade de différenciation et du profil d'expression des récepteurs de chimiokine des Treg présents au niveau du site tumoral	105
2- Etude de l'expression de T-bet, de la production d'IFN- $\gamma$ et des capacités suppressives des Treg CXCR3 <sup>+</sup> présents au niveau des tumeurs ovariennes	109
3- Recherche de l'origine des Treg CXCR3 <sup>+</sup> présents au niveau du site tumoral dans le CEO	115
4- Etude de l'aptitude des Treg CXCR3 <sup>+</sup> à migrer au niveau du site tumoral en suivant un gradient de concentration de CXCL10	119
5- Bilan de la Partie 3	122

**Discussion & Perspectives** \_\_\_\_\_ **123**

**Discussion de la Partie 1 : L'expression de l'IL-1RI chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains ex vivo identifie un intermédiaire précoce dans la voie de différenciation des T<sub>H</sub>17 à partir des lymphocytes T régulateurs FOXP3<sup>+</sup> naïfs** \_\_\_\_\_ **124**

**Discussion de la Partie 2** \_\_\_\_\_ **130**

1- Les Treg mémoires FOXP3 <sup>+</sup> Helios <sup>-</sup> contiennent des iTreg qui expriment Aiolos et répondent à l'IL-1 $\beta$ en diminuant leurs fonctions suppressives	130
2- Les Treg naïfs Helios <sup>-</sup> sont présents dans le sang périphérique de donneurs sains adultes mais absents dans le sang de cordon ombilical.	136
<b>Discussion de la Partie 3 : Les Treg CXCR3<sup>+</sup> s'accumulent sélectivement au niveau du site tumoral dans le CEO pour y limiter la réponse immunitaire anti-tumorale de type I</b>	<b>139</b>
<b>Conclusion générale</b>	<b>147</b>
<b>Matériels &amp; Méthodes</b>	<b>149</b>
<b>Références</b>	<b>157</b>
<b>Annexes</b>	<b>173</b>

# Abréviations

AA T : Antigène Associé à la Tumeur

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BCL-2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B Cell Receptor (récepteur des LB)

BFA : Bréfeldine A

CCL : Chemokine (C-C motif) ligand

CCR : C-C chemokine receptor

CD : Cluster de Différenciation

CEO : Cancer Epithélial de l'Ovaire

CFSE : Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

CLA : Cutaneous Lymphocyte Antigen

CM : Central Memory (mémoire centrale)

CMH-I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I

CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRTH2 : Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on T<sub>H</sub>2 cells

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

CXCR : C-X-C chemokine receptor

DC : Dendritic Cell (cellule dendritique)

EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (encéphalite auto-immune expérimentale)

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EM : Effector Memory (mémoire effectrice)

FOXP3 : Forkhead box P3

GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein

GMR : Globule Rouge de Mouton

HLA-DR : Human Leukocyte Antigen-DR

ICOS : Inducible T-cell COStimulator

IDO : Indoleamine 2 3-Dioxygenase

IFN- $\gamma$  : Interféron-gamma

IL : Interleukine

IL-1RI : Interleukin 1 receptor, type I (récepteur de l'IL-1 de type 1)

ILC : Innate lymphoid cells (cellules lymphoïdes innées)

IPEX : Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome

IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4

iTr35 : IL-35-dependent induced Tregs

iTreg : Treg induit

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

Mconv : LT CD4<sup>+</sup> conventionnel mémoire

MFI : Mean Fluorescence Intensity (intensité moyenne de fluorescence)

MTreg : Treg mémoire

Nconv : LT CD4<sup>+</sup> conventionnel naïf

NK : Natural Killer

NKT : Natural Killer T

Nrp1 : Neuropiline-1

NTreg : Treg naïf

nTreg : Treg naturel

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern (motif moléculaire associé aux pathogènes)

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell (cellule mononucléées du sang périphérique)

PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD1 : Programmed cell Death protein 1

PHA : Phytohémagglutinine

PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

PRR : Pattern Recognition Receptor (récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires)

RAG : Recombination Activating Gene

ROR $\gamma$ t : Retinoic acid-related Orphan Receptor gamma thymus

SEM : Standard Error of Mean

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

SVF : Sérum de Veau Foetal

TAL : Tumor Associated Lymphocyte (lymphocyte associé à la tumeur)

TAM : Tumor-Associated Macrophage

T-bet : T-cell-specific T-box transcription factor

TCR : T Cell Receptor (récepteur des LT)

TGF- $\beta$  : Tumor Growth Factor-beta

T<sub>H</sub> : T helper (lymphocyte T auxiliaire)

TIL : Tumor Infiltrating Lymphocyte (lymphocyte infiltrant la tumeur)

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose tumorale)

Tr1 : Type 1 regulatory T cells (LT régulateur de type 1)

Treg : LT CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> régulateur

TSDR : Treg-Specific Demethylated Region

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

# Introduction

## 1- Le système immunitaire : généralités

Au cours de l'évolution des espèces, le système immunitaire, un réseau complexe constitué de nombreux types cellulaires, tissulaires et moléculaires, s'est progressivement développé et perfectionné afin de permettre aux organismes de reconnaître et d'éliminer les agents pathogènes tout en préservant l'intégrité de leurs constituants du soi. Chez l'homme, ainsi que chez les autres mammifères, le système immunitaire se coordonne en deux types de réponses qui coopèrent étroitement. La première à se mettre en place, suite à une infection, est dite innée et est nécessaire au déclenchement de la seconde, appelée réponse immunitaire adaptative.

### A- La réponse immunitaire innée

La rupture de l'une des barrières naturelles de protection, que sont la peau et les muqueuses, permet aux agents pathogènes de pénétrer dans l'organisme. Ces agents infectieux, de types viral, bactérien, fongique ou parasitaire, vont alors chercher à se propager et à proliférer à l'intérieur de l'hôte pouvant avoir des conséquences délétères à la survie de ce dernier. Bien que très variés, les agents pathogènes possèdent tous des motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP) qui ne sont pas exprimés chez les plantes ni les vertébrés. A l'inverse, ceux-ci ont développé des récepteurs spécialisés dans la reconnaissance des PAMP, nommés PRR (Pattern Recognition Receptor). Parmi les PRR, les récepteurs TLR (Toll-Like Receptors) jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. Bien que la majorité des types cellulaires expriment des TLR, les cellules de l'immunité en expriment un plus grand nombre et une plus grande diversité. Ces récepteurs sont classés en deux groupes, les TLR présents au niveau de la membrane plasmique qui reconnaissent majoritairement des PAMP issus des parois bactériennes et les TLR situés en intracellulaire au niveau de la membrane endosomale, qui ont pour ligands des acides nucléiques d'origines bactériennes ou virales. La liaison PAMP-TLR est perçue comme un signal de danger et déclenche une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à l'activation de la cellule immunitaire. Cette activation engendre chez cette dernière d'importantes modifications pouvant être morphologiques, fonctionnelles et/ou migratoires. Une réaction inflammatoire, induite notamment par la sécrétion des

molécules spécialisées dans la communication intercellulaire, appelées cytokines, se met alors en place localement et conduit au recrutement efficace des cellules immunitaires au site de l'infection où se forme ainsi un œdème. Il existe différents types de cytokines dont les interférons et les interleukines qui peuvent avoir un effet pro-inflammatoire ou immunosuppresseur via l'induction de voies de signalisation intracellulaires suite à leur liaison avec leur récepteur spécifique. On trouve également des chimiokines qui sont des cytokines dites chimioattractantes et qui, en se liant à leurs récepteurs exprimés à la surface des cellules de l'immunité, permettent la migration de ces dernières en suivant un gradient de concentration.

Plusieurs types moléculaires et cellulaires interviennent dans la réponse immunitaire innée, mettant en place différents mécanismes de défense, qui, par complémentarité d'action, permettent de faire face aux différents types d'infections aussi bien extracellulaires, qu'intracellulaires. Il y a notamment intervention d'un ensemble de molécules appelé système du complément dont l'activation, induite suite à l'infection, participe activement à la formation de l'inflammation, aide à la migration et à l'activation des cellules de l'immunité et joue un rôle important dans la neutralisation et l'élimination des agents pathogènes. Il y a également activation des cellules de l'immunité innée qui, bien que présentant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles distinctes, dérivent toutes de cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse.

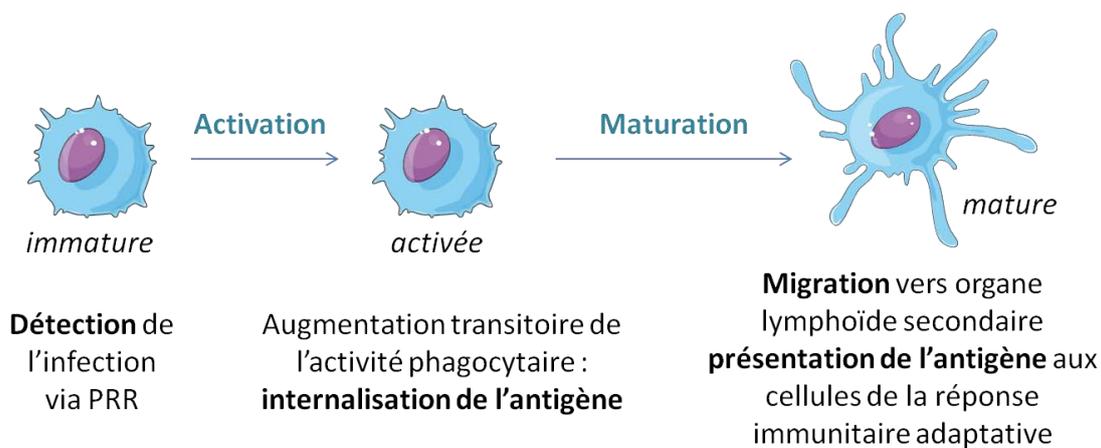
On retrouve parmi les acteurs de l'immunité innée, des cellules phagocytaires aptes à internaliser des débris, ou même parfois l'entière, du micro-organisme pathogène et à les éliminer. Il en existe principalement deux types : les monocytes/macrophages et les granulocytes neutrophiles. Ces derniers sont en grand nombre dans les tissus ce qui permet à la réponse immunitaire de réagir très rapidement après l'infection et limite ainsi la dissémination de l'agent pathogène. Alors que les polynucléaires neutrophiles ne possèdent qu'une durée de vie très courte (2 à 3 jours), les monocytes/macrophages, qui sont circulants ou tissulaires, peuvent vivre plusieurs mois et migrent efficacement vers le site de l'inflammation pour y exercer leur fonction phagocytaire. Il est à noter que les neutrophiles ne sont pas les seuls membres de la famille des granulocytes, les basophiles et les éosinophiles en font également partie et participent eux aussi à la réponse immunitaire.

L'immunité innée fait intervenir des cellules dites cytotoxiques qui détectent et tuent les cellules infectées via la production et la sécrétion de molécules lytiques. Bien que d'autres types cellulaires, tels que les lymphocytes  $T\gamma\delta$ , présentent également des fonctions cytotoxiques, la population la mieux définie est celle des cellules tueuses naturelles ou NK (Natural Killer). Les cellules NK sont d'origine lymphoïde. Elles expriment à leur surface à la fois des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs qui ont pour ligands des molécules exprimées à la surface des cellules normales de l'individu. Lorsqu'elles sont infectées par un agent pathogène intracellulaire, les cellules cessent de présenter à leur surface les ligands des récepteurs inhibiteurs des cellules NK. L'équilibre entre les signaux inhibiteurs et les signaux activateurs est ainsi rompu entraînant l'activation de la cellule NK qui va alors lyser la cellule infectée. Les cellules NK activées sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires, tel que l'IFN- $\gamma$ , qui stimulent l'activité phagocytaire des macrophages tandis que ces derniers produisent de l'IL-12 qui permet une réponse optimale des cellules NK, mettant en avant une étroite coopération entre les différents partenaires de l'immunité.

Il est à noter que des études ont récemment mis en évidence que les cellules NK n'étaient pas les seules cellules de l'immunité innée dérivant d'un précurseur lymphoïde mais qu'elles faisaient en réalité partie d'une vaste famille de cellules appelées cellules lymphoïdes innées (Innate lymphoid cells ; ILC). Ces cellules n'expriment aucun des marqueurs caractéristiques des lymphocytes ou des cellules myéloïdes et étaient par conséquent exclues lors des analyses expliquant leur découverte tardive. Les ILC ont été classées en trois groupes en fonction de leur production cytokinique et de l'expression de facteurs de transcription. Les ILC1 comprenant les cellules NK ainsi que des ILC produisant de l'IFN- $\gamma$ , les ILC2 qui expriment GATA-3 et produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 et les ILC3 qui expriment ROR $\gamma$ t et produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 (Spits et al., 2013). Les premières études ont montré que les ILC participaient à la protection contre les agents pathogènes extracellulaires, tels que les bactéries et les parasites, mais qu'elles semblaient également pouvoir être pathogéniques dans certains cas et conduire au développement d'inflammations chroniques (Walker et al., 2013).

Enfin, à l'interface entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative se situe la famille des cellules dendritiques. Elles sont

divisées en deux principaux types que sont les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes et qui, bien qu'étant issues d'un progéniteur hématopoïétique commun, diffèrent morphologiquement et fonctionnellement. De plus, en fonction de leur localisation anatomique, il existe différentes sous-populations de cellules dendritiques telles que les cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme. Les cellules dendritiques jouent le rôle de sentinelles de l'immunité guettant l'arrivée d'agents pathogènes. Suite à leur activation, induite par la liaison d'un PAMP à l'un de leurs PRR, les cellules dendritiques deviennent transitoirement aptes à internaliser efficacement des antigènes, c'est à dire des molécules étrangères pouvant être reconnues de façon spécifique par les cellules de la réponse immunitaire adaptative (Figure 1). S'en suit alors une étape de maturation des cellules dendritiques durant laquelle ces dernières subissent une réorganisation de leur cytosquelette et acquièrent l'expression du récepteur de chimiokine CCR7. Ces modifications leur permettent de migrer par chimiotactisme, via les vaisseaux lymphatiques, vers l'organe lymphoïde secondaire le plus proche, à la rencontre des cellules de l'immunité adaptative : les lymphocytes.



**Figure 1. Activation et maturation des cellules dendritiques.** La cellule dendritique immature exprime un grand nombre de PRR ce qui lui permet de détecter efficacement la présence d'un agent pathogène. La liaison d'un de ses PRR avec un PAMP conduit à l'activation de la cellule dendritique qui va alors transitoirement augmenter son activité phagocytaire conduisant à la capture d'un antigène. S'en suit alors une étape de maturation durant laquelle la cellule dendritique subit une réorganisation de son cytosquelette, une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et des complexes CMH/peptide antigénique suite au processus d'apprêtement antigénique tout en migrant jusqu'à l'organe lymphoïde secondaire le plus proche pour y présenter l'antigène aux cellules de l'immunité adaptative.

## B- La réponse immunitaire adaptative

A la différence des cellules de l'immunité innée, les lymphocytes reconnaissent de façon spécifique l'agent pathogène responsable de l'inflammation et peuvent ainsi mettre en place une stratégie de défense optimale à l'élimination de ce dernier. Les lymphocytes dérivent de cellules souches lymphoïdes et sont générés dans la moelle osseuse. Il en existe deux grands types, les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). Pour se différencier en lymphocytes, les progéniteurs lymphoïdes subissent une étape dite de maturation qui se produit dans l'un des deux organes lymphoïdes primaires, au niveau de la moelle osseuse pour les LB et dans le thymus pour les LT qui sont alors appelés thymocytes. Lors de ce processus de maturation, il se produit des réarrangements aléatoires des gènes codant pour les chaînes du récepteur spécifique d'antigène pouvant aboutir à l'expression d'un récepteur appelé BCR chez les LB et TCR dans les LT. Ce réarrangement aléatoire permet d'obtenir un répertoire de récepteurs d'une très grande diversité. Chaque lymphocyte exprime un récepteur unique, c'est à dire spécifique d'un seul antigène. La majorité des LT expriment des TCR constitués d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  et sont dits conventionnels. Il est cependant à noter que le réarrangement génique peut également générer des LT non conventionnels que sont les lymphocytes NKT et les lymphocytes  $T\gamma\delta$  qui possèdent un répertoire de TCR restreint et qui sont à mi-chemin entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les lymphocytes NKT expriment des TCR  $\alpha\beta$  semi-invariants ainsi que des molécules caractéristiques des cellules NK. Ils reconnaissent des lipides et des glycolipides présentés par la molécule CD1d et produisent des cytokines et des chimiokines après activation. Les lymphocytes  $T\gamma\delta$  reconnaissent des phosphoantigènes, ils produisent des cytokines pro-inflammatoires et présentent des propriétés cytotoxiques.

Le développement des LB et LT conventionnels s'accompagne également d'étapes de sélections positive et négative. La sélection positive permet la mort par apoptose des lymphocytes ayant des récepteurs spécifiques d'antigènes non fonctionnels, tels que des LT exprimant des TCR ne pouvant pas être reconnus par les CMH de l'individu. Puis la sélection négative contribue à éliminer la majorité des lymphocytes auto-réactifs exprimant des récepteurs reconnaissant des antigènes du soi. En plus de l'acquisition de l'expression de leur TCR, une induction de l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 a lieu au cours du développement des

thymocytes qui sont alors dits double-positifs. Lors de la sélection positive, l'expression de l'une de ces deux molécules est perdue ce qui conduit à l'obtention de deux sous-populations de LT simple-positifs matures : les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup>.

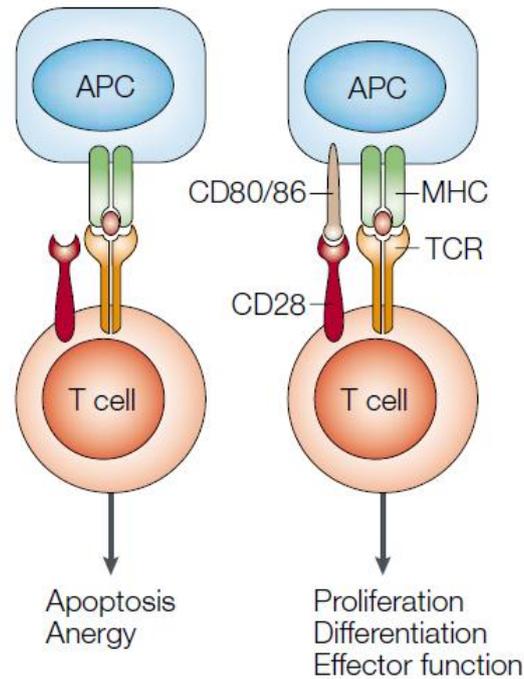
Les lymphocytes matures migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, dont font partie les plaques de Payer situées au niveau de l'intestin. Les LT se localisent dans la zone T aussi appelée le paracortex dans les ganglions lymphatiques alors que les LB se situent dans la zone B (ou le cortex) composée de follicules lymphoïdes primaires et secondaires. A ce stade les lymphocytes n'ont pas encore rencontré l'antigène pour lequel ils sont spécifiques et sont dits naïfs.

Suite à leur migration au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les cellules dendritiques, ayant terminé leur maturation, vont alors présenter aux lymphocytes les antigènes qu'elles avaient précédemment internalisés après avoir subi le processus d'apprêtement antigénique. Les modes de reconnaissance de l'antigène par son récepteur varient en fonction des populations de lymphocytes. Les BCR se lient de façon directe à leurs antigènes spécifiques. Lors d'une réponse immunitaire, il y a formation d'une structure appelée centre germinatif, au niveau des follicules secondaires, au sein de laquelle a lieu l'activation des LB spécifiques de l'antigène qui vont alors proliférer et subir des étapes de maturation d'affinité et de commutation de classe puis se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps, une population cellulaire effectrice essentielle à la réponse immunitaire à médiation humorale.

A l'inverse du LB, le LT ne reconnaît pas directement l'antigène dont il est spécifique, celui-ci doit lui être présenté sous la forme d'un peptide antigénique associé à un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par une cellule appartenant au groupe des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles dont font partie les cellules dendritiques, les macrophages et certains LB. Alors que les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissent des complexes CMH de classe I (CMH-I)/peptide antigénique, les TCR des LT CD4<sup>+</sup> sont spécifiques de complexes CMH-II/peptide. Les molécules de CMH-I sont exprimées de façon ubiquitaire à la surface des

cellules normales, cependant seules les CPA professionnelles sont capables de former des CMH-I présentant des peptides d'origine exogène, ce phénomène étant appelé la présentation croisée. L'aptitude à présenter des complexes CMH-II/peptide est, quant à elle, restreinte aux CPA professionnelles.

De plus, afin d'activer de façon optimale le LT naïf ayant un TCR spécifique de son complexe CMH/peptide, la CPA se doit de lui transmettre également un signal dit de co-stimulation positif faisant intervenir un ensemble complexe de protéines. La CPA se doit d'être mature pour pouvoir transmettre ce signal. En l'absence de co-stimulation, le LT peut mourir par apoptose ou bien encore entrer dans un état dit d'anergie caractérisé par une incapacité à s'activer et à proliférer après une stimulation et qui est notamment dû à une répression de l'expression du TCR et de l'IL-2, une cytokine essentielle à la prolifération des LT (Figure 2). Ce mécanisme permet d'empêcher l'activation des LT potentiellement autoréactifs et prévient ainsi du développement de désordres auto-immuns. Parmi les molécules de co-stimulation, on trouve celles de la famille B7, dont font partie CD80 et CD86, qui sont présentes à la surface des CPA et qui ont pour ligands des récepteurs de la famille CD28 exprimés à la surface des LT (Figure 2). Les récepteurs CD28 et CTLA-4 appartiennent à la famille CD28 et ont pour ligands communs CD80 et CD86. Les signaux transmis au LT suite à la fixation de leur ligand ont des effets antagonistes. En effet, la liaison de CD28 avec CD80 et CD86 transmet un signal d'activation au LT favorisant sa survie et sa prolifération. A l'inverse, la liaison de CTLA-4 avec ces mêmes ligands envoie un signal d'inhibition au LT diminuant sa réactivité. CD28 est exprimé constitutivement à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> tandis que l'expression de CTLA-4 n'est induite qu'après l'activation du LT. Ainsi, l'équilibre entre ces deux récepteurs contribue à réguler finement l'activation des LT afin de permettre la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative, dans le cas d'une infection par un agent pathogène, tout en limitant le développement de réponses immunitaires excessives ou dirigées contre des antigènes du soi. ICOS et PD-1 sont également des récepteurs appartenant à la famille CD28 qui ont pour ligands d'autres membres de la famille B7 et participent eux aussi à la régulation de l'activation des LT.



Alegre et al., *Nat Rev Immunol*, Decembre 2001, Volume 1, Issue 3, Page 220-8.

**Figure 2. Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T.** Le TCR des LT CD4<sup>+</sup> reconnaît un complexe CMH-II/peptide antigénique tandis que celui des LT CD8<sup>+</sup> est spécifique d'un complexe CMH-I/peptide. La liaison TCR-CMH/peptide envoie un signal d'activation au LT. L'envoi d'un signal de co-stimulation au LT par la cellule présentatrice de l'antigène (APC) est essentiel à l'activation optimale du LT. L'absence d'un signal de co-stimulation entraîne l'apoptose ou l'anergie du LT.

Tout comme les LB, suite à leur activation, les LT prolifèrent et se différencient en cellules effectrices. Les LT CD8<sup>+</sup> deviennent des LT cytotoxiques qui via leur TCR reconnaissent les cellules infectées et les lysent. Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs sont aptes à se différencier en plusieurs sous-populations possédant des propriétés différentes. En effet, en fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement lors de la reconnaissance du complexe CMH-II/peptide par leur TCR, des voies de signalisation particulières sont induites qui, via l'activation de protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), conduisent à l'activation de facteurs de transcription spécifiques qui, en régulant l'expression de gènes, jouent un rôle central dans l'orientation de la différenciation des cellules naïves activées en l'une des différentes sous-populations effectrices de LT CD4<sup>+</sup>.

En plus de sa capacité à reconnaître spécifiquement l'agent pathogène, la réponse immunitaire adaptative se distingue de la réponse immunitaire innée par le fait qu'elle possède une mémoire immunitaire. En effet, lors d'une primo-infection par

un agent pathogène, une partie des lymphocytes activés se différencie en cellules dites mémoires, ayant une durée de vie longue, qui lors d'une seconde infection par un même agent permettent une mise en place rapide et plus efficace de la réponse immunitaire adaptative. C'est sur ce phénomène que se base le principe de la vaccination qui vise à mimer l'infection par un agent pathogène afin d'induire une réponse immunitaire primaire et ainsi rendre la réponse immunitaire adaptative plus efficace en cas d'infection par ce même agent pathogène.

La collaboration étroite entre les deux types de réponses immunitaires est l'une des grandes forces du système immunitaire. De par sa rapidité d'action la réponse immunitaire innée permet de limiter la propagation de l'agent pathogène. Cette première réponse, en plus de combattre l'agent infectieux, active la réponse immunitaire adaptative, qui bien qu'étant plus lente à se mettre en place, lors d'une primo-infection, est spécifique et permet donc la mise en place d'une réponse plus efficace.

En plus de protéger l'organisme contre les agents pathogènes, une autre fonction importante du système immunitaire est de détecter et d'éliminer les constituants du 'soi modifié'. C'est à dire, les cellules du soi présentant un phénotype anormal qui peuvent correspondre à des cellules infectées mais également à des cellules précancéreuses et dont la destruction par le système immunitaire devrait permettre d'empêcher le développement tumoral. Le système immunitaire peut également parfois présenter certains dysfonctionnements pouvant entraîner le développement de réponses immunitaires dirigées contre des antigènes du soi et conduire à l'apparition de désordres auto-immuns tels que le diabète de type 1 ou la polyarthrite rhumatoïde.

## **2- Les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont des cellules de l'immunité adaptative décrites comme ayant une fonction auxiliaire c'est-à-dire qu'ils n'agissent pas directement contre l'agent pathogène, mais indirectement, au travers des autres types cellulaires de l'immunité, en orientant et régulant leurs actions. Notamment via la sécrétion de cytokines et de chimiokines, les LT CD4<sup>+</sup> sont essentiels à la production d'anticorps

par les LB, aident à la maturation des LT CD8<sup>+</sup>, stimulent l'activité phagocytaire des macrophages et aident également au recrutement des cellules de l'immunité au niveau du site inflammatoire. Le terme de cellules auxiliaires ne les définit donc pas comme des acteurs secondaires de la réponse immunitaire, mais bien comme des cellules jouant le rôle de chef d'orchestre de cette dernière qui en dirigeant les autres types cellulaires de l'immunité permet la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique contre l'agent infectieux.

#### A- Le paradigme T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2

##### a. *Découverte des sous-populations de T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2*

Après avoir été décrite dans un premier temps comme homogène, la population des LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires a commencé à se complexifier suite à l'identification de deux sous-groupes distincts de LT CD4<sup>+</sup>. Une première étude a mis en évidence qu'en passant des LT CD4<sup>+</sup>, issues de la rate d'une souris, dans une colonne de laine de nylon, les cellules adhérentes, alors nommées LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires de type 1 (T<sub>H</sub>1 : 1<sup>st</sup> type of helper T cells) et les cellules non-adhérentes, appelées LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires de type 2 (T<sub>H</sub>2), induisaient la production d'anticorps par les LB via des mécanismes différents (Tada et al., 1978). Puis, suite au développement de la technique du clonage moléculaire, de nombreuses cytokines ont été découvertes et ont permis une meilleure caractérisation des LT CD4<sup>+</sup>. C'est ainsi qu'en 1986, Mosmann et Coffman, en réalisant une étude sur des clones de LT murins spécifiques de plusieurs antigènes *in vitro*, ont identifié deux sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> présentant des profils de production cytokinique différents et ayant des fonctions distinctes (Mosmann et al., 1986). Une fraction des clones T produisait de l'IFN-γ ainsi que de l'IL-2 et du TNF-α et présentaient des caractéristiques communes avec la sous-population des T<sub>H</sub>1 précédemment identifiée par Tada et al., tandis que la seconde partie des clones T produisait de l'IL-4 et partageait des points communs avec les T<sub>H</sub>2. Mosmann et Coffman ont, par conséquent, utilisé les termes T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 pour désigner ces deux sous-populations.

##### b. *Voies de différenciation des T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2*

De nombreux travaux ont par la suite permis d'identifier les cytokines nécessaires à la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en l'une des deux sous-

populations. Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs, qui sont à un stade indifférencié, se sont montrés aptes à devenir des T<sub>H</sub>2 après une stimulation de leur TCR en présence d'IL-2 et d'IL-4 *in vitro* (Le Gros et al., 1990). Il a ensuite été décrit que le facteur de transcription GATA-3 jouait un rôle central dans cette voie de différenciation et que son expression était induite par STAT6 (Zheng and Flavell, 1997). L'obtention de T<sub>H</sub>1 à partir de LT CD4<sup>+</sup> naïfs, suite à leur stimulation *in vitro*, a été montrée comme nécessitant la collaboration d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  qui en activant respectivement STAT4 et STAT1 permettent d'induire l'expression du facteur de transcription T-bet qui a été décrit comme essentiel à la différenciation en T<sub>H</sub>1 (Hsieh et al., 1993; Szabo et al., 2000).

### c. Fonctions des T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2

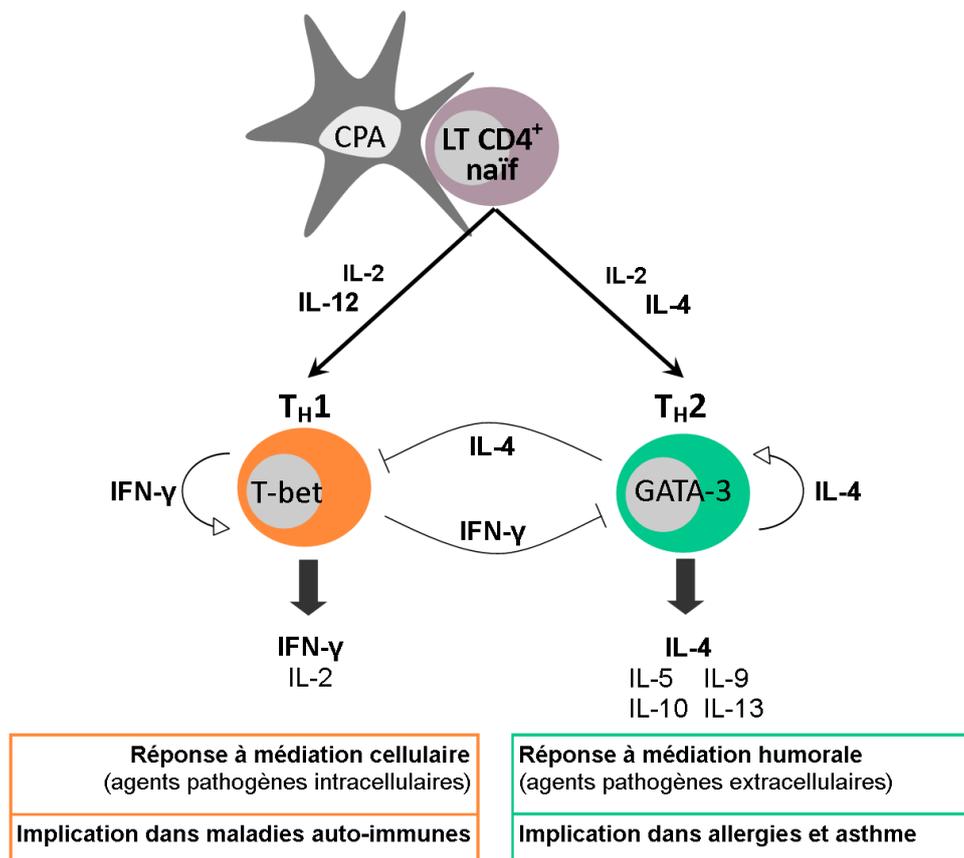
La caractérisation des T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 a été poursuivie et a permis de définir fonctionnellement ces deux sous-populations. Il a été montré que les T<sub>H</sub>1 exprimaient préférentiellement à leur surface les récepteurs de chimiokines CXCR3 et CCR5 (Sallusto et al., 1998). CXCR3 a pour ligands les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 qui sont exprimées par différents types cellulaires localisés au site de l'inflammation permettant ainsi la migration et le recrutement des T<sub>H</sub>1 au niveau des tissus infectés. Les T<sub>H</sub>1 ont été décrits comme spécialisés dans la défense contre les agents pathogènes intracellulaires, tels que les virus, en induisant une réponse à médiation cellulaire notamment via l'augmentation de l'activité des monocytes/macrophages et en aidant à la maturation des LT CD8<sup>+</sup>. Il est à souligner que l'activation anormale des T<sub>H</sub>1 a été associée à de nombreux désordres auto-immuns tels que la maladie de Crohn et l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), le modèle murin de la sclérose en plaques.

Les T<sub>H</sub>2 ont, quant à eux, été caractérisés par une expression préférentielle de CCR3, CCR4 (Sallusto et al., 1998), CCR8 (D'Ambrosio et al., 1998) et CRTH2 (Nagata et al., 1999). Il a également été montré qu'en plus de l'IL-4, les T<sub>H</sub>2 sécrétaient d'autres cytokines telles que l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13, leur permettant à la fois d'aider à la différenciation et la prolifération des LB ainsi que d'orienter la commutation de classe. A l'inverse des T<sub>H</sub>1, les T<sub>H</sub>2 ont été définis comme soutenant la réponse immunitaire à médiation humorale optimisée dans l'élimination des agents

pathogènes extracellulaires. De plus, les  $T_H2$  ont été mis en cause dans les réactions allergiques ainsi que dans l'asthme.

*d. Dichotomie  $T_H1/T_H2$*

Des études ont par la suite décrit un effet antagoniste mutuel de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$ . En effet, il a été mis en évidence qu'alors que la sécrétion d'IL-4 par les  $T_H2$  favorisait le développement des réponses  $T_H2$  et bloquait celui des réponses  $T_H1$ , la sécrétion d'IFN- $\gamma$  permettait aux  $T_H1$  de se développer et inhibait la mise en place d'une réponse de type  $T_H2$  (Figure 3). C'est ainsi que la notion de dichotomie  $T_H1/T_H2$  a émergé définissant les LT  $CD4^+$  comme une sous-population divisée en deux sous-groupes antagonistes,  $T_H1$  et  $T_H2$ , respectivement optimisés dans la défense contre les agents pathogènes intracellulaires ou extracellulaires.



**Figure 3. La dichotomie  $T_H1/T_H2$ .** En fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement lors de la stimulation, par la CPA, du LT  $CD4^+$  naïf, celui-ci se différencie soit en  $T_H1$  aidant à la réponse à médiation cellulaire, soit en  $T_H2$  impliqué dans la réponse à médiation humorale. Les deux sous-populations de LT  $CD4^+$  auxiliaires sécrètent chacune des cytokines qui bloquent le développement de l'autre et favorisent leur propre maintien.

Il est cependant à noter que, lors de leur étude, Mosmann et Coffman ont souligné le fait que, bien que leur procédure expérimentale n'ait permis l'identification que de deux sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>, il n'était pas exclu que d'autres sous-populations puissent exister *in vivo* (Mosmann et al., 1986).

## B- Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> régulateurs

### a. *Découverte des LT régulateurs*

Il a été constaté qu'en opposition avec le nombre relativement faible d'individus souffrant de maladies auto-immunes, des LT spécifiques d'antigènes du soi étaient détectables chez les individus sains. Il a ainsi été suggéré que la tolérance centrale, qui permet l'élimination des lymphocytes auto-réactifs au niveau des organes lymphoïdes primaires, n'était pas l'unique processus permettant le maintien de la tolérance aux constituants du soi mais qu'un ou des mécanismes de tolérance périphérique étaient également impliqués.

A la fin des années 60, Nishizuka et Sakakura ont montré que des souris ayant subi une thymectomie 3 jours après la naissance, développaient des maladies auto-immunes, notamment au niveau des ovaires chez les femelles, mais que la greffe d'un thymus intact au 7<sup>ème</sup> jour post-natal prévenait l'apparition de désordres auto-immuns chez ces mêmes souris (Nishizuka and Sakakura, 1969). Bien que leur conclusion ait été que le thymus semblait jouer un rôle dans le contrôle de la reproduction, ces travaux ont été les premiers à montrer que des cellules issues du thymus étaient aptes à empêcher le développement de maladies auto-immunes.

Un an plus tard, dans le but de mieux comprendre le phénomène de tolérance périphérique, Gershon et Kondo ont dans un premier temps irradié des souris adultes précédemment thymectomisées puis réalisé un transfert de cellules de moelle osseuse associé ou non avec un transfert de thymocytes chez ces souris. Ils ont ensuite réalisé des injections répétées de globules rouges de mouton (GRM) chez ces souris. Ils ont ainsi mis en évidence que l'induction de la tolérance aux GRM, était un phénomène dépendant de cellules dérivées du thymus puisque seules les souris ayant reçu des thymocytes, en parallèle de la greffe de cellules de moelle osseuse, ont été rendues tolérantes (Gershon and Kondo, 1970). Ils ont également montré que cette tolérance pouvait être transférée à des hôtes naïfs via l'infusion de

cellules thymiques issues de souris ayant préalablement été sensibilisées aux GRM (Gershon and Kondo, 1971). Ces études ont ainsi montré l'existence de cellules dérivées du thymus, dites suppressives, qui en limitant la réponse immunitaire permettraient la tolérance immunitaire périphérique.

Les lymphocytes T suppressifs ont fait l'objet de controverses et ont été dénigrés par la communauté scientifique durant plusieurs décennies. Jusqu'à ce qu'en 1995, l'équipe de Shimon Sakaguchi démontre qu'après avoir séparé les LT CD4<sup>+</sup> en deux sous-populations, l'une exprimant la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25) et l'autre étant CD25<sup>-</sup>, le transfert des LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> chez une souris dépourvue de thymus (*nude*), engendrait le développement de maladies auto-immunes alors que leur co-transfert avec des LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> empêchait l'apparition de désordres auto-immuns (Sakaguchi et al., 1995). Cette étude a ainsi mis en évidence l'important rôle des LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans la tolérance périphérique. Cette population nommée LT régulateurs (Treg) a ensuite été identifiée chez l'homme où, comme chez la souris, elle représente environ 5 à 10% des LT CD4<sup>+</sup> présents dans la périphérie (Baecher-Allan et al., 2001).

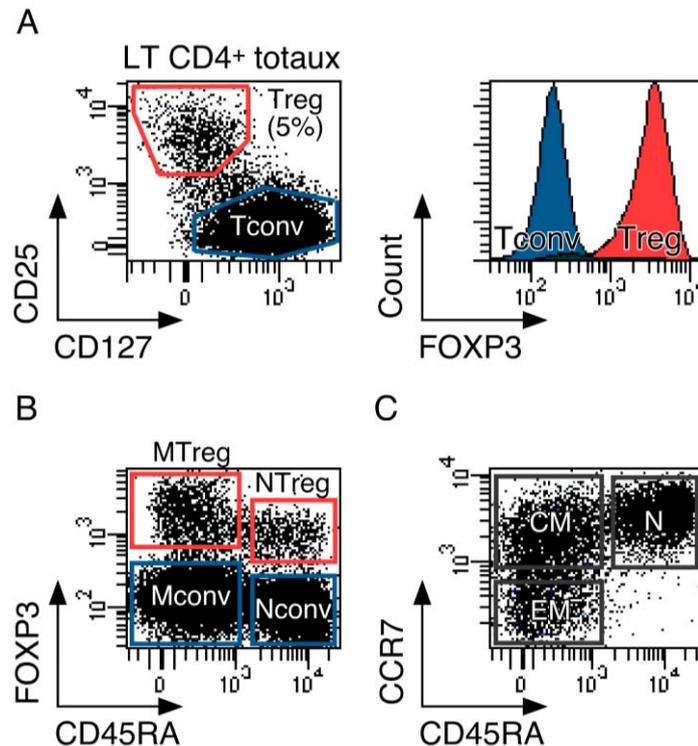
#### b. *Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des Treg*

Suite à leur identification, les Treg ont été très amplement étudiés. Des travaux se sont notamment intéressés à l'expression, dans les LT CD4<sup>+</sup>, du facteur de transcription FOXP3 (Forkhead box P3) dont la mutation du gène, localisé sur le chromosome X, avait auparavant été décrite comme étant responsable du profil mutant des souris 'Scurfy' (Brunkow et al., 2001) et du syndrome IPEX chez l'homme (Wildin et al., 2001), caractérisé par le développement de différents types de maladies auto-immunes touchant de multiples organes dès le plus jeune âge. Il a alors été mis en évidence que parmi les LT CD4<sup>+</sup>, FOXP3 était exprimé spécifiquement par les cellules CD25<sup>+</sup> et que l'induction d'une expression ectopique du facteur de transcription dans des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> les convertissait en des cellules présentant des propriétés suppressives et des caractéristiques phénotypiques similaires à celles des Treg (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Walker et al., 2003). FOXP3 a ainsi été identifié comme étant un facteur de transcription spécifique des Treg jouant un rôle clé dans leur développement et leur fonction aussi bien chez la souris que chez l'homme. Il est à noter que chez l'homme,

il a été par la suite démontré que les LT récemment activés exprimaient également FOXP3 mais de façon transitoire et sans acquérir de capacité suppressive (Allan et al., 2007; Tran et al., 2007).

En plus de CD25, l'étude de l'expression d'autres molécules a permis de dresser un profil phénotypique des Treg CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>. Il a notamment été mis en évidence que chez l'homme l'expression de FOXP3 était inversement corrélée avec celle de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7, CD127 (Liu et al., 2006b). En considérant l'expression de CD25 par rapport à celle de CD127, les LT CD4<sup>+</sup> ont pu être séparés en deux sous-populations, l'une CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> correspondant aux Treg FOXP3<sup>+</sup> et la seconde CD25<sup>-</sup> regroupant les LT CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> auxiliaires conventionnels (Figure 4A). A l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre ces deux molécules de surface, il est donc possible de séparer physiquement ces deux populations par la technique de cytométrie de flux.

Les Treg ont été décrits comme exprimant constitutivement la molécule de co-stimulation CTLA-4, un homologue de la molécule de co-stimulation CD28 mais qui, à l'inverse, transmet un signal inhibiteur lorsqu'il interagit avec le complexe moléculaire formé par CD80 et CD86 (Takahashi et al., 2000). Les Treg ont également été caractérisés comme sur-exprimant, par rapport aux LT CD4<sup>+</sup> conventionnels, les molécules ICOS (Burmeister et al., 2008) et PD-1 (Raimondi et al., 2006). De plus, la protéine transmembranaire GITR (Shimizu et al., 2002), le récepteur de l'IL-1 de type I (IL-1RI) (Mercer et al., 2010; Tran et al., 2009), le marqueur d'activation HLA-DR (Baecher-Allan et al., 2001; Baecher-Allan et al., 2006) et le récepteur de mort cellulaire CD95 (Fritzsching et al., 2005) ont été décrits comme étant exprimés de façon prédominante à la surface des Treg par rapport aux LT CD4<sup>+</sup> conventionnels. Il a aussi été mis en évidence que de fortes proportions de Treg expriment à leur surface des récepteurs de chimiokines tels que CLA, CCR4, CCR6 et CCR8 (Hirahara et al., 2006; Iellem et al., 2001).

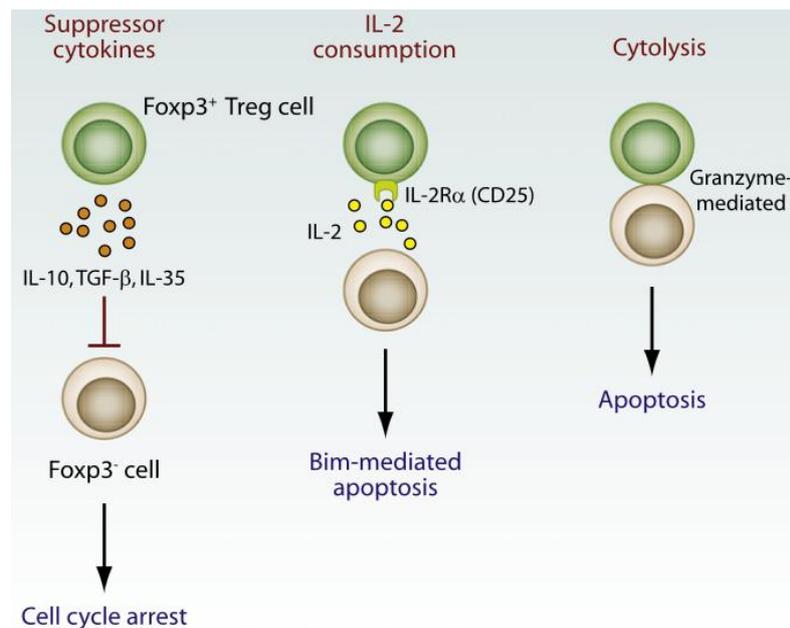


**Figure 4. Identification des LT CD4<sup>+</sup> régulateurs et conventionnels présents dans la périphérie par cytométrie de flux.** A, Le marquage des LT CD4<sup>+</sup>, issus du sang périphérique de donneur sain, avec des anticorps couplés à des fluorochromes dirigés contre CD25 et CD127 permet de séparer, par cytométrie de flux, les LT CD4<sup>+</sup> régulateurs FOXP3<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> ; Treg) des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels FOXP3<sup>-</sup> (CD25<sup>-</sup> ; Tconv). B, Le marquage des LT CD4<sup>+</sup> avec des anticorps dirigés contre FOXP3 et CD45RA permet d'identifier quatre sous-populations : les Treg naïfs CD45RA<sup>+</sup> (NTreg), les Treg mémoires CD45RA<sup>-</sup> (MTreg), les Tconv naïfs CD45RA<sup>+</sup> (Nconv) et les Tconv mémoires CD45RA<sup>-</sup> (Mconv). C, L'expression de CD45RA contre celle de CCR7 sépare les LT CD4<sup>+</sup> en fonction de leur stade de différenciation en 3 compartiments : naïf (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> ; N), mémoire centrale (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> ; CM) et mémoire effectrice (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> ; EM).

Chez l'homme, les Treg présents dans la périphérie se retrouvent dans le compartiment des cellules mémoires CD45RA<sup>-</sup> et sont appelés Treg mémoires (MTreg) mais aussi dans celui des cellules naïves CD45RA<sup>+</sup>. Ces Treg CD45RA<sup>+</sup>, nommés Treg naïfs (NTreg), possèdent également des propriétés suppressives (Valmori et al., 2005) (Figure 4B). Les Treg, aussi bien les MTreg que les NTreg, sont anergiques car ils ne produisent pas d'IL-2 et sont incapables de proliférer suite à la stimulation de leur TCR en l'absence d'un apport exogène d'IL-2 *in vitro*. De plus, tout comme les populations de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels, l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 permet de séparer la population des Treg mémoires en deux fractions, l'une nommée mémoire centrale (Central Memory ; CM) qui exprime CCR7 et qui serait à un stade de différenciation moins avancé que la

seconde n'exprimant pas CCR7, appelée mémoire effectrice (Effector Memory ; EM) (Figure 4C) (Sallusto et al., 1999; Tosello et al., 2008).

Les Treg après l'activation spécifique de leur TCR vont inhiber la prolifération et la fonction des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de façon directe (Figure 5) ou de manière indirecte en ciblant d'autres types cellulaires tels que les cellules dendritiques, les macrophages et les LB (Figure 6).



Shevach E, *Immunity*. Mai 2009, Volume 30, Issue 5, Page 636-45.

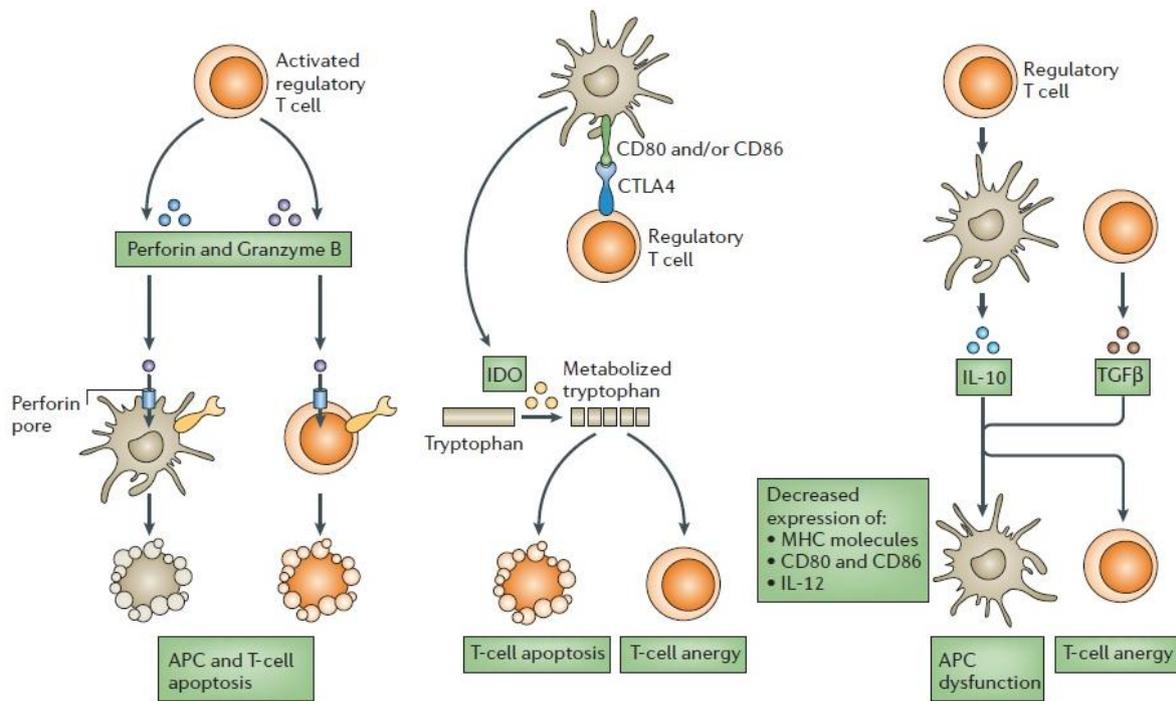
**Figure 5. Mécanismes suppressifs des Treg inhibant de façon directe la fonction des LT.** De multiples mécanismes contribuent à l'action suppressive des Treg. Les Treg peuvent notamment agir de façon directe sur les LT en sécrétant des cytokines immuno-régulatrices (IL-10, TGF- $\beta$ ) aptes à induire l'arrêt du cycle cellulaire. Par la forte expression de la molécule CD25, les Treg appauvrissent le micro-environnement en IL-2, une cytokine essentielle à la survie des LT. Les Treg produisent également des granzymes et des perforines pouvant induire l'apoptose des LT.

De multiples mécanismes impliquant, ou non, un contact cellulaire ont été décrits comme pouvant intervenir dans l'activité suppressive des Treg. Par l'expression constitutive du récepteur à haute affinité de l'IL-2, un hétérotrimère constitué de la molécule CD25, les Treg sont en compétition avec les LT pour la consommation de l'IL-2 présente dans le milieu, les privant ainsi d'une cytokine essentielle à leur prolifération et à leur survie (de la Rosa et al., 2004; Pandiyan et al., 2007). Les Treg sécrètent également des cytokines immunosuppressives, tels que l'IL-10 (Dieckmann et al., 2001) et le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ )

(Nakamura et al., 2004). Il est à noter que l'IL-35 a aussi été décrite comme étant une cytokine sécrétée par les Treg chez la souris et impliquée dans leur activité suppressive (Collison et al., 2007). Cependant chez l'homme, son expression par les Treg a fait l'objet de controverse et l'IL-35 ne semblerait finalement pas impliquée dans la fonction suppressive des Treg humains (Bardel et al., 2008; Chaturvedi et al., 2011; Chaturvedi et al., 2013).

Les Treg possèdent aussi des propriétés cytolytiques par la production de granzymes et de perforines aptes à induire l'apoptose des LT et des CPA (Grossman et al., 2004). Une implication des molécules de surface CD39 et CD73 dans l'activité suppressive des Treg a également été mise en évidence. En effet, ces ecto-enzymes en coopérant convertissent l'ATP extracellulaire en adénosine qui possède des propriétés anti-inflammatoires et entraîne notamment une diminution de l'activité des LT (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). L'expression forte de CTLA-4 par les Treg intervient également dans la fonction suppressive des Treg. En interagissant avec le complexe CD80/CD86 exprimé à la surface des cellules dendritiques, CTLA-4 entraîne la diminution de l'expression de ces deux molécules de co-stimulation et induit également la production d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme qui catabolise le tryptophane, un acide aminé essentiel, conduisant à la déplétion de ce dernier dans le milieu et à la production de kynurénine, un catabolite toxique pour les cellules (Fallarino et al., 2003; Grohmann et al., 2002).

La grande diversité des mécanismes de suppression et le fait qu'ils puissent agir simultanément rend leur étude très complexe aussi bien *in vivo* qu'en conditions *in vitro*. Par conséquent, la manière dont tous ces mécanismes s'organisent et coopèrent pour permettre aux Treg d'exercer leur activité suppressive en fonction du contexte (physiologique ou pathologique), de la localisation et des cibles cellulaires, n'est pas encore clairement définie.



Zou W, *Nat Rev Immunol.* Avril 2006, Volume 6, Issue 4, Page 295-307.

**Figure 6. Mécanismes suppressifs des Treg inhibant de façon indirecte la fonction des LT.** Les Treg peuvent également inhiber la fonction des LT de manière indirecte en agissant sur les CPA. La production de granzymes et perforines, la sécrétion de cytokines immunosuppressives ou encore la forte expression de la molécule de co-stimulation CTLA-4, par les Treg, peuvent modifier fonctionnellement les CPA et ainsi induire l'apoptose ou l'anergie des LT.

### c. Origines des Treg présents dans la périphérie

Les Treg présents dans la périphérie ont deux origines possibles. Ils peuvent être générés directement dans le thymus et sont appelés Treg naturels (nTreg) ou bien être générés en dehors du thymus, à partir de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels, et sont dits Treg induits (iTreg).

#### • Les Treg naturels

Lors du développement thymique, les précurseurs des LT CD4<sup>+</sup> subissent une première étape de sélection positive à laquelle seuls les thymocytes double-positifs (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) qui expriment un TCR pouvant reconnaître l'un des CMH de l'individu, survivent. Les thymocytes simple-positifs passent ensuite une seconde étape, appelée sélection négative, qui entraîne l'élimination des thymocytes exprimant des TCR interagissant avec une trop forte avidité avec des complexes CMH/peptide du soi présentés par les CPA médullaires thymiques. Il a été suggéré que les nTreg

exprimaient des TCR spécifiques d'antigènes du soi, par conséquent de nombreuses études ont cherché à comprendre par quel processus ces derniers parvenaient à échapper à la sélection négative (Jordan et al., 2001; Seddon and Mason, 1999; Taguchi et al., 1994). Bien que de nombreux points ne soient pas encore élucidés, plusieurs modèles ont été proposés dont celui de Lio et Hsieh qui décrit un développement thymique des Treg en deux étapes (Lio and Hsieh, 2008). Dans un premier temps une interaction spécifique d'une avidité suffisamment forte entre le TCR et un complexe CMH-II/peptide du soi induirait l'expression de CD25 à la surface du thymocyte. L'IL-2 interviendrait alors en activant plusieurs voies de signalisation conduisant à l'expression de FOXP3 par le précurseur CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Il est à noter que le TGF- $\beta$  a été décrit comme n'étant pas nécessaire au développement thymique des nTreg (Fahlen et al., 2005). De plus, de par leur phénotype naïf, les nTreg ont été caractérisés comme étant des Treg d'origine thymique.

- Les Treg induits

Au début du siècle dernier, des travaux réalisés sur des cochons d'Inde ont montré que la tolérance immunitaire à un antigène pouvait être induite par voie orale. Des études chez la souris ont par la suite montré que le transfert adoptif de cellules spléniques issues d'une souris ayant précédemment été mise en présence d'un antigène par voie orale, rendaient la souris receveuse tolérante à ce même antigène (Richman et al., 1978). Il a ainsi été mis en évidence, qu'en plus de la tolérance centrale, qui se produit dans le thymus, la tolérance immunitaire pouvait être induite dans la périphérie. Ces travaux ont également montré que le passage par la voie des muqueuses intestinales était important dans l'induction de la tolérance et que les LT suppressifs étaient impliqués dans ce phénomène.

Il a ensuite été découvert que la stimulation de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> conventionnels naïfs en présence d'IL-2 et de TGF- $\beta$ , *in vitro*, induisait leur conversion en LT CD25<sup>+</sup> régulateurs exprimant FOXP3 et présentant des propriétés suppressives (Chen et al., 2003). Des études réalisées sur des modèles murins ont par la suite mis en évidence que ce phénomène de conversion pouvait également se produire *in vivo*. Il a notamment été décrit qu'en diffusant de façon continue et prolongée un antigène à faible dose, à l'aide d'une pompe osmotique, chez des souris dépourvues de nTreg,

une conversion de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> conventionnels en Treg était observée et conférait une tolérance à l'antigène (Apostolou and von Boehmer, 2004). Il a également été montré que des iTreg étaient générés, au niveau de la muqueuse intestinale, lors de la tolérance induite par voie orale (Mucida et al., 2005). Ces travaux, ainsi que d'autres, ont mis en évidence que les iTreg pouvaient être générés en conditions non-inflammatoires suite à l'activation des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels par des CPA dans un microenvironnement tolérogène riche en IL-2 et TGF- $\beta$ . Une conversion importante des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels en iTreg se produit au niveau des tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale et serait, au moins partiellement, induite par les bactéries de la flore commensale. Ces iTreg permettraient d'induire une tolérance aux antigènes produits par les microorganismes de la flore commensale ainsi qu'aux antigènes alimentaires et joueraient un rôle protecteur contre le développement de désordres auto-immuns tels que la maladie de Crohn (Atarashi et al., 2011; Lathrop et al., 2011; Round and Mazmanian, 2010).

Il a également été observé que les iTreg pouvaient être générés en condition inflammatoire où ils auraient pour rôle de limiter les dommages aux tissus proches du site de l'inflammation. Cependant, il a été mis en évidence que l'induction ou l'accumulation d'une proportion trop importante de Treg au niveau du site de l'infection pouvait empêcher l'élimination totale de l'agent pathogène et ainsi conduire à la mise en place d'une infection chronique (Belkaid et al., 2002; Scott-Browne et al., 2007). De plus, les iTreg ont également été décrits comme étant générés dans le contexte de certaines maladies auto-immunes, telle que dans l'EAE, où ils contrôlèrent l'activité des LT effecteurs afin de limiter l'inflammation (Weiss et al., 2012).

Il est à noter que les iTreg générés dans un contexte non-inflammatoire pourraient avoir des propriétés fonctionnelles et migratoires différentes de ceux générés lors d'une inflammation. De même, les caractéristiques des iTreg pourraient varier en fonction du lieu de leur conversion et du type des cellules présentatrices d'antigène impliquées dans leur activation (Bilate and Lafaille, 2012).

- Différences entre les nTreg et les iTreg

Bien qu'ayant des origines distinctes, les nTreg et les iTreg sont phénotypiquement très similaires et au début de ma thèse, aucun marqueur de surface permettant de séparer ces deux sous-populations n'avait encore été identifié chez l'homme. Cependant, de nombreuses études visant à mieux comprendre les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de ses deux sous-populations ont été réalisées.

En comparant le répertoire antigénique reconnu par les thymocytes  $CD4^+CD25^+$ , considérés comme nTreg, avec celui de LT  $CD4^+$  conventionnels présents dans la périphérie, des travaux ont montré que bien qu'une fraction de leurs TCR respectifs présentait une spécificité antigénique commune, les deux répertoires antigéniques étaient globalement différents (Hsieh et al., 2006). Les iTreg étant générés à partir de LT  $CD4^+$  conventionnels, ces travaux ont suggéré que les deux sous-populations de Treg seraient spécifiques de répertoires antigéniques distincts. Les nTreg reconnaîtraient principalement des antigènes du soi, tandis que, les iTreg seraient spécifiques d'antigènes du soi ainsi que du non soi.

En comparant l'état de méthylation du locus du gène *FOXP3* entre des Treg  $CD4^+CD25^+$  et des LT  $CD4^+CD25^-$  issus des organes lymphoïdes de souris, Floess et al., ont identifié une région conservée localisée dans la région non codante du gène, nommée TSDR (Treg-specific demethylated region) et dont l'état déméthylé, s'est montré associé avec une expression stable de *FOXP3* et serait ainsi représentatif d'un phénotype Treg à long terme (Floess et al., 2007). L'analyse épigénétique du locus du gène *FOXP3* a également montré que les Treg induits *in vitro*, obtenus à partir de LT  $CD4^+CD25^-$  stimulés en présence d'IL-2 et de TGF- $\beta$ , n'étaient que partiellement déméthylés au niveau du TSDR, suggérant un phénotype Treg moins stable. En accord avec ces données, une perte de l'expression de *FOXP3* et des capacités suppressives a été observée chez ces Treg induits *in vitro* après leur restimulation en l'absence de TGF- $\beta$ . En revanche après une stimulation en présence d'IL-2 seule, les Treg isolés *ex vivo* ont maintenu l'expression de *FOXP3* (Floess et al., 2007). Ces données ont conduit à émettre l'hypothèse que les nTreg pourraient se distinguer des Treg induits dans la périphérie en fonction de l'état de méthylation de leur TSDR. Cette même équipe a, par conséquent, cherché à

déterminer si l'instabilité de l'expression de FOXP3 observée chez les Treg induits *in vitro* était une caractéristique qui pouvait également être associée aux iTreg générés *in vivo*. Ils ont ainsi réalisé l'analyse épigénétique et l'étude de la stabilité de l'expression de FOXP3 des iTreg générés *in vivo*, suite à une vaccination tolérogène à l'aide d'un antigène couplé à un anticorps ciblant DEC-205, un récepteur d'endocytose notamment exprimé à la surface des cellules dendritiques (Polansky et al., 2008). Leurs résultats ont montré que les iTreg obtenus exprimaient FOXP3 de façon stable et leur TSDR était à un état déméthylé, tout comme le TSDR des nTreg. Lors de cette même étude, la génération *in vitro* de Treg induits en présence de TGF- $\beta$  a montré que bien qu'induisant l'expression de FOXP3, le TGF- $\beta$  n'influe pas sur l'état de méthylation du TSDR, ne permettant pas une expression stable du facteur de transcription, même après une exposition prolongée (Polansky et al., 2008). Il est à noter que, l'analyse épigénétique des thymocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a montré qu'ils n'étaient que partiellement déméthylés au niveau de leur TSDR pouvant suggérer que l'acquisition d'un état totalement déméthylé du TSDR nécessite un certain délai (Floess et al., 2007). Etant donné que l'étude de la méthylation du TSDR des Treg induits *in vivo* a été réalisée 3 semaines après la vaccination tolérogène, il est possible que l'état de méthylation des iTreg récemment générés puisse différer de celui des iTreg et nTreg présents dans la périphérie depuis plus longtemps. Enfin, bien qu'exprimant de façon transitoire FOXP3, l'analyse épigénétique des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels récemment activés a montré qu'ils présentaient un TSDR à un état méthylé (Baron et al., 2007). L'ensemble de ces résultats a défini l'état déméthylé du TSDR comme étant représentatif d'une expression stable de FOXP3 permettant de distinguer les Treg FOXP3<sup>+</sup> des LT CD4<sup>+</sup> récemment activés et potentiellement des iTreg récemment induits mais ne semblant pas être un marqueur qui distingue les nTreg des iTreg.

Certaines molécules, ayant précédemment été définies comme exprimées spécifiquement par les Treg (Bruder et al., 2004; Hill et al., 2007; Sugimoto et al., 2006), ont été décrites comme étant des marqueurs potentiels qui permettraient de distinguer les nTreg des iTreg. Des études chez la souris ont notamment montré que le récepteur de surface Neuropilin-1 (Nrp1) était exprimé par les nTreg mais n'était pas présent à la surface des iTreg (Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012). Cependant, une étude ayant comparé l'expression de Nrp1 à la surface des Treg

murins avec celle des Treg humains a mis en évidence que celle-ci variait d'une espèce à l'autre (Milpied et al., 2009). En effet, à la différence des Treg murins, les Treg humains n'exprimaient que faiblement Nrp1 à leur surface et à des niveaux équivalents à ceux des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels. Par conséquent, Nrp1 ne semble pas pouvoir être utilisé en tant que marqueur des nTreg chez l'homme.

Helios est l'un des cinq facteurs de transcription de la famille d'Ikaros également composée d'Eos et d'Aiolos. Il a précédemment été identifié comme étant spécifiquement exprimé par les Treg, parmi les LT CD4<sup>+</sup> circulants dans la périphérie, avec une expression indépendante de FOXP3 (Sugimoto et al., 2006). Il a ensuite été décrit qu'Helios inhibait l'expression de l'IL-2 dans les Treg, en induisant des modifications épigénétiques au niveau du promoteur de l'IL-2 et en favorisant la liaison de FOXP3 au niveau de ce même promoteur (Baine et al., 2013). Il a cependant été montré, à partir d'un modèle murin muté n'exprimant pas Helios, que ce facteur de transcription n'était pas indispensable au développement, ni à la fonction des Treg (Cai et al., 2009). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que plusieurs membres de la famille d'Ikaros reconnaissent des séquences d'ADN similaires et auraient une fonction redondante. Eos a notamment été décrit comme étant exprimé dans les Treg et participe également à la mise sous silence de gènes, dont celui de l'IL-2, en interagissant directement avec FOXP3 (Pan et al., 2009). Bien que le rôle d'Helios apparaisse comme n'étant pas indispensable au développement ni à la fonction des Treg, un grand intérêt lui a été porté depuis une étude de Thornton et al.. Cette étude a en effet décrit que les thymocytes FOXP3<sup>+</sup> étaient Helios<sup>+</sup> alors que les Treg induits *in vitro* et *in vivo* n'exprimaient pas le facteur de transcription et a ainsi désigné Helios comme étant un marqueur des nTreg (Thornton et al., 2010). Cependant, plusieurs études ont par la suite contesté ces résultats en parvenant à obtenir, après stimulation antigénique *in vitro* et *in vivo*, des Treg FOXP3<sup>+</sup> induits exprimant Helios à partir de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs issus de souris transgéniques (Gottschalk et al., 2012; Verhagen and Wraith, 2010). Etant donné que Helios a une localisation intracellulaire, l'absence de marqueurs de surface permettant d'isoler les Treg Helios<sup>+</sup> des Treg Helios<sup>-</sup>, tout en maintenant leur viabilité, avait, jusqu'à avant ma thèse, limité l'étude comparative de ces deux sous-populations régulatrices.

En conclusion, un marqueur permettant de distinguer spécifiquement les nTreg des iTreg n'a pour l'instant pas encore été clairement identifié et serait pourtant d'un intérêt majeur puisque de nombreuses questions restent encore sans réponse. Les nTreg et iTreg agissent-ils en synergie ? Ont-ils des rôles complémentaires ou redondants ? Utilisent-ils des mécanismes suppressifs distincts ? Quelle est leur implication respective dans certaines pathologies telles que les cancers ou les infections chroniques ? Quels sont les Treg les plus adéquats à être utilisés en tant qu'outil thérapeutique pour lutter contre le rejet de greffe ou encore soigner les maladies auto-immunes ? Il est important de souligner que de nombreux travaux visant à mieux caractériser les Treg ont été réalisés ces dernières années et ont mis en évidence que bien loin d'être d'une population homogène, les Treg étaient en réalité composés de multiples sous-populations rendant leur étude encore plus complexe.

### C- Les lymphocytes T<sub>H</sub>17

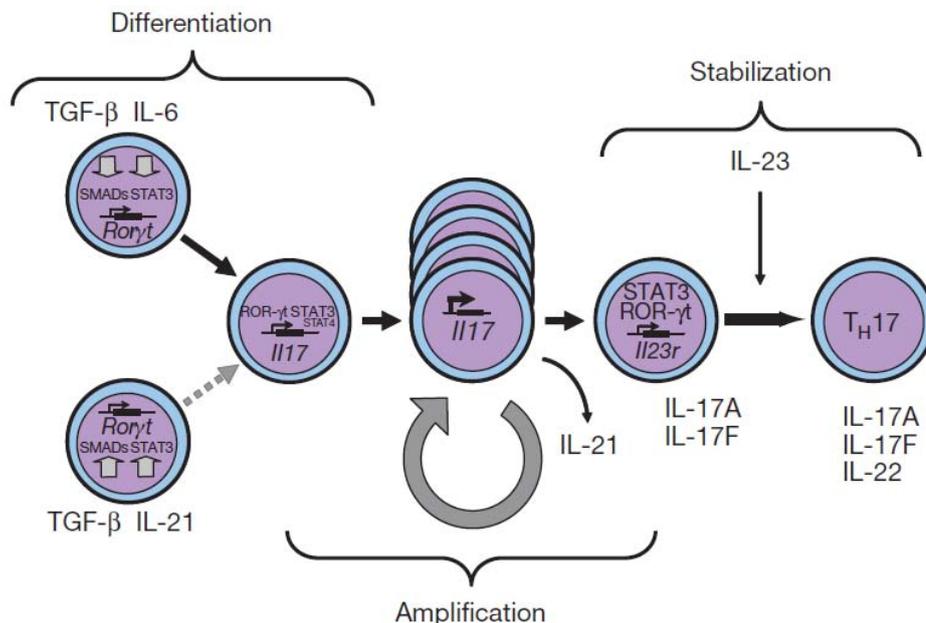
#### a. *Découverte des T<sub>H</sub>17*

Au début des années 2000, des études, réalisées sur des souris transgéniques incapables à produire des T<sub>H</sub>1 fonctionnels, ont mis en évidence que certaines maladies auto-immunes, telles que l'arthrite induite au collagène, l'EAE ou la maladie de Crohn, avaient à tort été associées à un dysfonctionnement dans la réponse T<sub>H</sub>1 puisqu'elles se développaient même en l'absence de cette population (Gran et al., 2002; Zhang et al., 2003a). L'IL-12 est essentielle à la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en T<sub>H</sub>1, cette cytokine est un dimère composé de deux chaînes, p35 et p40. En 2000, une nouvelle molécule, appelée p19, a été identifiée. Tout comme p35, la chaîne p19 s'est révélée pouvoir composer un hétéro-dimère avec la sous-unité p40 pour former une cytokine alors nommée IL-23 (Oppmann et al., 2000). Une autre étude, visant à comparer la susceptibilité à développer une EAE entre des souris transgéniques n'exprimant pas soit l'IL-23 (p19<sup>-/-</sup>) soit l'IL-12 (p35<sup>-/-</sup>) ou aucune des deux chaînes (p40<sup>-/-</sup>), a ensuite mis en évidence que seules les souris déficientes en IL-23 étaient résistantes à l'EAE montrant ainsi que l'IL-23 et non l'IL-12 était impliquée dans le développement de la maladie (Cua et al., 2003). La même équipe a par la suite démontré que l'IL-23 contribuait à l'apparition de l'EAE en

promouvant une population de cellules T CD4<sup>+</sup> produisant de l'IL-17A (Langrish et al., 2005). Cette population a alors été caractérisée comme étant une population de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires distincte de celles des T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub> et a été appelée T<sub>H17</sub> (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005).

#### b. Voies de différenciation des T<sub>H17</sub>

Il a rapidement été constaté que l'IL-23 seule ne suffisait pas à générer efficacement des T<sub>H17</sub> à partir de LT CD4<sup>+</sup> naïfs (Bettelli et al., 2006). Des études chez la souris ont alors mis en évidence que le TGF-β et l'IL-6 étaient les cytokines essentielles à l'induction de la différenciation en T<sub>H17</sub> (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). La production autocrine d'IL-21 permettrait ensuite l'expansion des T<sub>H17</sub> et l'IL-23 contribuerait à la stabilisation du profil T<sub>H17</sub> (Figure 7) (McGeachy et al., 2009; Nurieva et al., 2007). Il est à souligner qu'il a par la suite été démontré que l'IL-1 jouait également un rôle important dans la génération des T<sub>H17</sub> murins puisque les souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur de l'IL-1, IL-1RI, étaient incapables d'induire des réponses T<sub>H17</sub> et étaient ainsi résistantes à l'EAE (Chung et al., 2009).



Bettelli et al., *Nature*, Juin 2008, Volume 453, Issue 7198, Page 1051-7.

**Figure 7. Modèle de différenciation en T<sub>H17</sub> en trois étapes chez la souris.** Plusieurs cytokines sont nécessaires pour générer efficacement des T<sub>H17</sub> phénotypiquement stables à partir de LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Le TGF-β et l'IL-6 permettent dans un premier temps d'initier la différenciation, puis l'IL-21, qui est produite de façon autocrine par les T<sub>H17</sub>, participe à l'amplification de ces derniers. Enfin, l'IL-23 contribue à stabiliser le phénotype des T<sub>H17</sub>.

En revanche, chez l'homme, l'association du TGF- $\beta$  et de l'IL-6 n'est pas parvenue à induire une différenciation efficace en T<sub>H</sub>17 à partir des LT CD4<sup>+</sup> naïfs stimulés. Dans un premier temps il a été soutenu qu'à l'inverse de chez la souris, chez l'homme, le TGF- $\beta$  ainsi que l'IL-2 inhibaient la génération des T<sub>H</sub>17 et que l'IL-1 $\beta$  en association avec l'IL-6 permettait cette différenciation (Acosta-Rodriguez et al., 2007a). Cependant, ces résultats ont par la suite été contredits par d'autres études montrant l'implication du TGF- $\beta$  et de l'IL-2 dans la différenciation en T<sub>H</sub>17 en association avec l'IL-21 ou combiné avec l'IL-1 $\beta$ , l'IL-23 et/ou l'IL-6 (Manel et al., 2008; Volpe et al., 2008; Yang et al., 2008).

La controverse autour de l'implication ou non du TGF- $\beta$  dans la voie de différenciation des T<sub>H</sub>17 a en partie été due au fait que cette cytokine est exprimée par un grand nombre de types cellulaires et tissulaires et est notamment présente dans le plasma. Par conséquent, certaines des études visant à déterminer *in vitro* les conditions cytokiniques requises pour générer des T<sub>H</sub>17 à partir des LT CD4<sup>+</sup> naïfs, ont été réalisées avec des milieux de cultures contenant déjà du TGF- $\beta$  de par la présence de sérum humain ou de sérum de veau fœtal.

De plus, il a été décrit chez la souris que deux voies de différenciation distinctes, l'une dépendante de la présence de TGF- $\beta$  exogène et l'autre ne nécessitant pas de TGF- $\beta$ , permettaient de générer des cellules produisant de l'IL-17 à partir de LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Deux types de T<sub>H</sub>17, présentant des caractéristiques transcriptionnelles et fonctionnelles distinctes, ont été obtenus après stimulation *in vitro* en fonction des conditions cytokiniques testées. En effet, alors que les T<sub>H</sub>17 obtenus en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  sécrétaient de l'IL-17 et de l'IL-10, les T<sub>H</sub>17 générés en l'absence de TGF- $\beta$  et en présence d'IL-6, d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23, exprimaient T-bet, co-produisaient de l'IL-17 et de l'IFN- $\gamma$  et se sont révélés être pathogéniques après leur transfert adoptif dans un modèle murin de EAE (Ghoreschi et al., 2010). Ces deux sous-populations de T<sub>H</sub>17 sembleraient être impliquées de manière différente dans la protection contre les agents infectieux ainsi que dans le développement de maladies auto-immunes. Les T<sub>H</sub>17 générés en présence de TGF- $\beta$  paraîtraient avoir un rôle protecteur et ont été décrits comme étant peu efficaces à induire des désordres auto-immuns alors que les T<sub>H</sub>17 obtenus en l'absence de TGF- $\beta$  et en présence d'IL-23 présenteraient plutôt un profil pathogénique (McGeachy et al., 2007). Des travaux réalisés chez l'homme ont également décrit

que deux sous-populations de  $T_H17$  pouvaient être générées à partir de LT  $CD4^+$  naïfs stimulés *in vitro* : l'une co-produisant de l'IL-17 et de l'IFN- $\gamma$  et étant spécifique pour le champignon *Candida albicans* et une seconde co-produisant de l'IL-17 et de l'IL-10 et ayant une spécificité pour la bactérie *Staphylococcus aureus* (Zielinski et al., 2012). De plus, des études récentes ont mis en évidence que la présence d'une forte concentration de sel, lors de la polarisation en  $T_H17$ , génère des  $T_H17$  pathogéniques capables d'induire des désordres auto-immuns (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013).

Il est à souligner que, malgré les nombreuses études réalisées dans le but de comprendre la polarisation des  $T_H17$ , la combinaison cytokinique permettant d'induire une différenciation optimale des LT  $CD4^+$  naïfs en  $T_H17$  chez l'homme n'a pas encore été déterminée. Cependant, le TGF- $\beta$ , qui est essentiel à la génération des iTreg, ressort comme étant impliqué, en association avec d'autres cytokines, dans la voie de différenciation des  $T_H17$ . Il existe donc un médiateur commun entre les voies de différenciation des  $T_H17$  et des iTreg ce qui suggère une relation réciproque entre les Treg et les  $T_H17$ . Cette observation a conduit, mon laboratoire d'accueil et moi-même, à comparer l'aptitude des LT  $CD4^+$  naïfs conventionnels et celle des NTreg à se différencier en  $T_H17$  après stimulation *in vitro*. En testant de multiples combinaisons associant les cytokines précédemment décrites comme étant impliquées dans la polarisation en  $T_H17$ , nous avons mis en évidence que les NTreg présentaient une prédisposition à se différencier en  $T_H17$  par rapport aux LT  $CD4^+$  naïfs conventionnels (Valmori et al., 2010). La combinaison cytokinique la plus efficace pour générer des  $T_H17$  à partir des NTreg s'est montrée être l'association de l'IL-1 $\beta$ , du TGF- $\beta$  et de l'IL-23 en présence d'IL-2. Enfin une induction rapide de l'expression du récepteur de l'IL-1 de type I (IL-1RI) a été observée après stimulation à la surface des NTreg mais pas à la surface des LT  $CD4^+$  conventionnels naïfs, pouvant en partie expliquer la prédisposition des NTreg à générer des  $T_H17$  (Valmori et al., 2010).

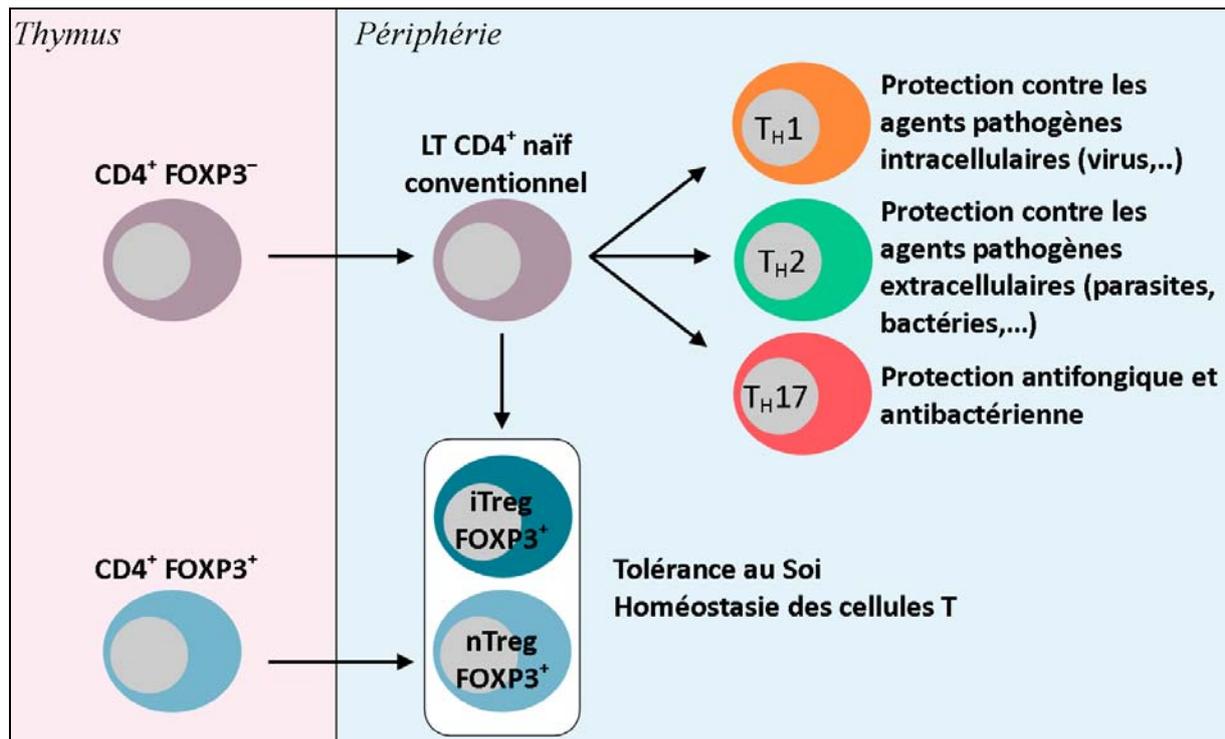
### c. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des $T_H17$

RA-related Orphan Receptor- $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) a été décrit comme étant le facteur de transcription essentiel à la différenciation des  $T_H17$  et est induit via STAT3 (Ivanov et al., 2006). Il a également été décrit que le facteur de transcription IRF4 était impliqué

dans le contrôle de la différenciation en T<sub>H</sub>17 (Brustle et al., 2007). Les T<sub>H</sub>17 présentent à leur surface le récepteur de chimiokine CCR6 (Acosta-Rodriguez et al., 2007b; Annunziato et al., 2007) et ont également été caractérisés comme exprimant la molécule CD161, un marqueur des cellules NK (Cosmi et al., 2008). En plus de l'IL-17A (abrégée IL-17), les T<sub>H</sub>17 sécrètent d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17F, l'IL-21, l'IL-22, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  ainsi que de l'IL-2.

Les T<sub>H</sub>17 sont impliqués dans la protection contre les bactéries extracellulaires et les champignons en permettant notamment le recrutement de neutrophiles et en induisant la production de molécules pro-inflammatoires par les cellules résidentes (Acosta-Rodriguez et al., 2007b; Bettelli et al., 2006; Ouyang et al., 2008). En condition physiologique, les T<sub>H</sub>17 se localisent principalement au niveau de l'intestin où, en collaboration avec les iTreg, ils participeraient à la protection contre les agents pathogènes tout en contribuant au maintien de la tolérance au soi et aux constituants de la flore commensale (le presque soi). En cas d'infection, il a été montré que les T<sub>H</sub>17 pouvaient être induits de façon efficace au niveau de l'appareil digestif, des voies respiratoires et de la peau. Enfin, les T<sub>H</sub>17 ont également été décrits comme pouvant être pathogéniques, leur implication dans le développement de certaines maladies auto-immunes telles que l'EAE et la maladie de Crohn, a notamment été montré (Bettelli et al., 2006; Ouyang et al., 2008).

Les T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 et Treg sont définis comme étant les quatre principales sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>. Par conséquent, leurs voies de différenciation ainsi que leur propriétés phénotypiques et fonctionnelles ont été très largement étudiées (Figure 8). Il est à noter que d'autres sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>, présentant des fonctions auxiliaires ou régulatrices, ont également été découvertes.



**Figure 8. Les principales sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>.** En fonction des conditions cytokiniques présentes lors de la stimulation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs conventionnels, ces derniers se différencient en T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 ou en iTreg. La population des Treg présents dans la périphérie est composée de iTreg et de nTreg.

#### D- Les autres sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>

##### a. *Les autres populations de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires*

Parmi les autres sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs, se trouvent les T<sub>H</sub>9 qui ont pour caractéristique de produire de l'IL-9, une cytokine précédemment associée aux T<sub>H</sub>2 (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Les T<sub>H</sub>9 sécrètent également de l'IL-10 mais ne semblent cependant pas présenter de propriété suppressive et contribueraient à la mise en place de l'inflammation au niveau tissulaire. L'IL-4 et le TGF-β seraient impliqués dans la différenciation en T<sub>H</sub>9. De plus, le facteur de transcription PU-1 a été décrit comme étant nécessaire au développement des T<sub>H</sub>9 (Chang et al., 2010).

Bien que l'IL-22 ait été dans un premier temps décrite comme étant produite spécifiquement par les T<sub>H</sub>17, une sous-population de LT CD4<sup>+</sup> produisant de l'IL-22 mais ne sécrétant pas d'IL-17 ni d'IFN-γ a été identifiée chez la souris et chez

l'homme. Ces cellules, nommées T<sub>H</sub>22, n'expriment que faiblement ROR $\gamma$ t et seraient générées à partir des LT CD4<sup>+</sup> naïfs suite à une stimulation en présence d'IL-6 et de TNF via une voie de différenciation dépendante de l'expression du facteur de transcription Aryl hydrocarbon Receptor (AHR) (Duhon et al., 2009; Trifari et al., 2009). Les T<sub>H</sub>22 expriment à leur surface CCR4, CCR6 et CCR10 et seraient par conséquent impliqués dans la défense immunitaire au niveau de la peau, des voies respiratoires et de l'intestin. Ils pourraient également jouer un rôle dans certains désordres auto-immuns.

Une sous-population de LT CD4<sup>+</sup> impliquée dans la formation des centres germinatifs au niveau de la zone B dans les organes lymphoïdes secondaires a été identifiée. Ces cellules auxiliaires appelées LT CD4<sup>+</sup> folliculaires jouent un rôle essentiel dans l'activation, la différenciation, l'expansion et la survie des LB notamment via l'expression de CD40L et d'ICOS mais aussi via la sécrétion d'IL-21. Les LT CD4<sup>+</sup> folliculaires expriment fortement le récepteur de chimiokine CXCR5, dont le ligand CXCL13 est exprimé au niveau des follicules de la zone B, et ont perdu l'expression de CCR7 ce qui leur permet de migrer vers les centres germinatifs. Le facteur de transcription BCL-6 a été décrit comme étant un facteur essentiel à la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> folliculaires (Breitfeld et al., 2000; Ma et al., 2012). Cette population semble essentielle à la réponse immunitaire à médiation humorale et a également été décrite comme pouvant en partie contribuer à la mise en place du microenvironnement tumoral dans le lymphome folliculaire (Ame-Thomas et al., 2012).

#### *b. Les autres populations de LT CD4<sup>+</sup> suppressives*

En plus des Treg FOXP3<sup>+</sup>, d'autres sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> présentant des propriétés suppressives ont été identifiées et coopèreraient avec les Treg FOXP3<sup>+</sup> pour prévenir l'apparition de désordres auto-immuns. Les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) qui produisent de l'IL-10 ont notamment été décrits (Groux et al., 1997). Ces cellules partagent des caractéristiques communes avec les Treg FOXP3<sup>+</sup>. En effet, elles sont anergiques et exercent leur activités suppressives à travers des mécanismes également utilisés par les Treg, tels que la sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$ , l'expression de CTLA-4 ou encore la production de granzymes et de perforines. Cependant, à la différence des Treg, les Tr1 n'expriment pas le facteur de

transcription FOXP3 (Vieira et al., 2004). Il a en effet été montré que les Tr1 étaient présents dans le sang périphérique de patients atteints du syndrome IPEX mais qu'ils n'étaient cependant pas suffisants pour maintenir la tolérance au soi (Passerini et al., 2011). Il a été décrit que l'IL-27, une cytokine sécrétée par les cellules dendritiques rendues tolérogènes en présence de Treg FOXP3<sup>+</sup>, était nécessaire à la différenciation des Tr1 qui permet l'induction de l'expression des facteurs de transcription C-MAF et AHR (Apetoh et al., 2010; Awasthi et al., 2007).

Les T<sub>H</sub>3 constituent une autre sous-population de LT CD4<sup>+</sup> qui possède des propriétés régulatrices. Ces cellules sont présentes au niveau des muqueuses et participent à la tolérance orale en sécrétant du TGF-β (Chen et al., 1994; Miller et al., 1992). Il a été montré que ces cellules pouvaient également produire de l'IL-10 et de l'IL-4. Il a été décrit que les cytokines nécessaires à leur développement étaient le TGF-β et l'IL-4 (Seder et al., 1998).

Enfin, une sous-population de LT CD4<sup>+</sup> sécrétant la cytokine immunorégulatrice IL-35, mais ne produisant pas d'IL-10 ni de TGF-β, a été identifiée et nommée iTr35 (IL-35-dependent induced Treg) (Collison et al., 2010). Il a été décrit que ces cellules se développaient suite à une activation en présence d'IL-35. De plus, tout comme les Tr1, les iTr35 sont anergiques et ne requièrent pas l'expression de FOXP3 pour leur différenciation ou leur fonction.

En conclusion, la population des LT CD4<sup>+</sup>, dans un premier temps décrite comme étant composée uniquement de deux sous-types antagonistes, T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2, est apparue bien plus vaste et complexe suite à l'identification d'autres sous-populations auxiliaires ou régulatrices, telles que les T<sub>H</sub>17 et les Treg. C'est par une collaboration étroite que ces différents sous-types cellulaires mettent en place une protection efficace contre les agents pathogènes, tout en veillant au maintien de la tolérance au soi.

### **3- Flexibilité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Récemment, la complexité du compartiment des LT CD4<sup>+</sup> est apparue comme étant encore plus importante que ce qui avait été précédemment décrit puisqu'à

l'hétérogénéité des LT CD4<sup>+</sup> est venue s'ajouter la notion de plasticité. Alors que l'engagement des LT CD4<sup>+</sup> naïfs dans l'une des différentes voies de différenciation était jusqu'à récemment considéré comme un choix définitif, plusieurs études ont mis en évidence qu'au contraire, certaines sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels et régulatrices pouvaient se convertir en un autre sous-type de LT CD4<sup>+</sup> dans certaines conditions. De plus, des sous-populations hybrides co-exprimant des facteurs de transcription et des marqueurs caractéristiques de deux sous-types de LT CD4<sup>+</sup> distincts ont également été identifiées, *in vitro* et *in vivo*, aussi bien chez l'homme que chez la souris.

#### A- Plasticité des LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires

Bien que les T<sub>H</sub>1 et les T<sub>H</sub>2 aient des voies de différenciation mutuellement exclusives, des études ont suggéré que ces cellules étaient capables de s'interconvertir. Il a notamment été montré que des LT CD4<sup>+</sup> naïfs murins ayant été polarisés en T<sub>H</sub>1 *in vitro* suite à une stimulation en présence d'IL-12 et d'un anticorps neutralisant anti-IL-4, pouvaient se convertir en T<sub>H</sub>2 après une seconde stimulation en présence d'IL-4. De même des LT CD4<sup>+</sup> naïfs différenciés *in vitro* en T<sub>H</sub>2 suite à une première stimulation ont pu être convertis en T<sub>H</sub>1 après une re-stimulation en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>1 (Murphy et al., 1996). Il a cependant été décrit que les T<sub>H</sub>1 et les T<sub>H</sub>2 perdaient de leur plasticité, après des stimulations *in vitro* répétées suggérant une diminution de la flexibilité au cours de la maturation. Il a également été montré que les T<sub>H</sub>2 murins pouvaient être reprogrammés en T<sub>H</sub>9 suite à une stimulation *in vitro* en présence d'IL-4 et de TGF-β (Veldhoen et al., 2008).

Les premières études qui ont visé à caractériser la population des T<sub>H</sub>17 ont montré la présence de cellules co-produisant, en plus de l'IL-17, de l'IFN-γ, une cytokine spécifiquement produite par les T<sub>H</sub>1, ce qui a suggéré un lien possible entre ces deux sous-populations (Acosta-Rodriguez et al., 2007a; Ivanov et al., 2006). Plusieurs travaux ont par conséquent été réalisés dans le but de percer l'origine des cellules IL-17<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. Une étude a ainsi montré que la re-stimulation en présence d'IL-12 de T<sub>H</sub>17 murins, ayant préalablement été polarisés *in vitro*, induisait l'expression de T-bet et la production d'IFN-γ chez ces cellules et était accompagnée de la perte de l'expression de RORγt et de la production d'IL-17 (Lee et al., 2009).

Ce phénomène de conversion des T<sub>H</sub>17 en cellules présentant des caractéristiques communes aux T<sub>H</sub>1, a également été décrit *in vivo* après le transfert de T<sub>H</sub>17, précédemment polarisés *in vitro*, dans des modèles murins d'inflammation intestinale chronique et de diabète de type 1 (Bending et al., 2009; Lee et al., 2009). Il a en parallèle été mis en évidence que les T<sub>H</sub>17 humains étaient aussi capables de se convertir en T<sub>H</sub>1 en présence d'IL12 *in vitro* (Annunziato et al., 2007).

La capacité des T<sub>H</sub>17 à se convertir en T<sub>H</sub>2 *in vitro*, suite à une stimulation en présence d'IL-4, a également été décrite (Cosmi et al., 2010; Lexberg et al., 2008). De plus des T<sub>H</sub>17 humains co-produisant de l'IL-17 et de l'IL-4 ont été identifiés dans le sang périphérique de donneurs sains ainsi que de patients asthmatiques, où des proportions plus élevées ont été observées, ce qui suggère une implication probable de ces cellules dans le développement de l'asthme (Cosmi et al., 2010).

A l'inverse des T<sub>H</sub>17, aucune étude n'est pour l'instant parvenue à convertir des T<sub>H</sub>1, ni des T<sub>H</sub>2, en T<sub>H</sub>17 suite à une re-stimulation *in vitro* en présence de cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>17, aussi bien chez l'homme que chez la souris (Cosmi et al., 2010; Lexberg et al., 2008). Ces résultats semblent suggérer que les sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> hybrides qui présentent des caractéristiques appartenant à la fois aux T<sub>H</sub>17 et aux T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2, dériveraient essentiellement des T<sub>H</sub>17. Cependant, l'incapacité des T<sub>H</sub>1 et des T<sub>H</sub>2 humains à se convertir en T<sub>H</sub>17 pourraient également être due au fait que la condition cytokinique permettant une polarisation optimale des T<sub>H</sub>17 chez l'homme n'a pas encore été déterminée.

## B- Plasticité, stabilité et hétérogénéité des Treg

### a. *Spécialisation et/ou conversion des Treg*

Les Treg sont généralement décrits comme étant divisés en deux sous-populations principales, les nTreg et les iTreg, définies en fonction de leur origine thymique ou périphérique. Cependant, des études ont mis en évidence qu'une hétérogénéité bien plus grande semblait exister au sein du compartiment des Treg. En effet des sous-populations co-exprimant en plus de FOXP3 un facteur de transcription associé à une des sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires ont été identifiées. Ces cellules hybrides pourraient correspondre à des populations ayant des propriétés fonctionnelles particulières ou bien à des intermédiaires dans des

voies de conversion ou de différenciation. De plus, certaines études ont mis en évidence que, sous certaines conditions, les Treg FOXP3<sup>+</sup> pouvaient perdre l'expression de FOXP3 et être convertis en LT CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> présentant des fonctions effectrices, après stimulation.

Des phénomènes de conversion de Treg FOXP3<sup>+</sup> en cellules FOXP3<sup>-</sup> présentant des caractéristiques des T<sub>H</sub>1 ont été décrits dans différents modèles murins. Le transfert de Treg FOXP3<sup>+</sup> dans des souris déficientes en lymphocytes (lymphopéniques) a montré que dans ce contexte, 50% des Treg perdaient l'expression de FOXP3. Cette perte d'expression s'est montrée être associée avec une induction de la production d'IL-2 et une perte des capacités suppressives (Duarte et al., 2009). De plus le transfert de ces Treg ayant perdu l'expression de FOXP3, dans un second hôte alymphoïde, a causé l'apparition d'infiltrations notamment au niveau du foie et des poumons occasionnant des dommages tissulaires. Les Treg ayant perdu l'expression de FOXP3 se sont montrés produire des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  mais également de l'IFN- $\gamma$  et plus faiblement de l'IL-4 ce qui expliquerait en partie leur pathogénicité (Duarte et al., 2009). D'autres travaux ont montré que dans le cas d'une infection par *Toxoplasma gondii*, qui déclenche une forte réponse inflammatoire de type I (impliquant des T<sub>H</sub>1) au niveau des muqueuses, les Treg FOXP3<sup>+</sup> présentaient un phénotype de T<sub>H</sub>1 suite à l'induction de l'expression de T-bet et d'IFN- $\gamma$  *in vivo* (Oldenhove et al., 2009). L'utilisation de souris transgéniques permettant de détecter par cytométrie de flux les LT CD4<sup>+</sup> exprimant FOXP3 ainsi que ceux ayant perdu l'expression de FOXP3, nommés cellules exFOXP3, a montré qu'une fraction des Treg était instable et perdait l'expression de FOXP3 *in vivo* (Zhou et al., 2009). Une perte d'expression de nombreux marqueurs phénotypiques des Treg a été observée dans la population des cellules exFOXP3 tels que CD25 et GITR et une forte expression de CD127 a été montrée. De plus, ils ont constaté qu'une fraction de ces cellules exFOXP3 produisait de l'IFN- $\gamma$  ainsi que de l'IL-17 et que ces cellules étaient pathogéniques après un transfert adoptif dans un modèle murin de diabète de type 1. Enfin, l'analyse de leur répertoire de TCR a suggéré que les cellules ayant perdu l'expression de FOXP3 semblaient dériver à la fois de nTreg et de iTreg (Zhou et al., 2009). Une autre étude a mis en évidence que l'IL-12 était impliquée dans la conversion des Treg en cellules productrices d'IFN- $\gamma$  (Feng et al., 2011).

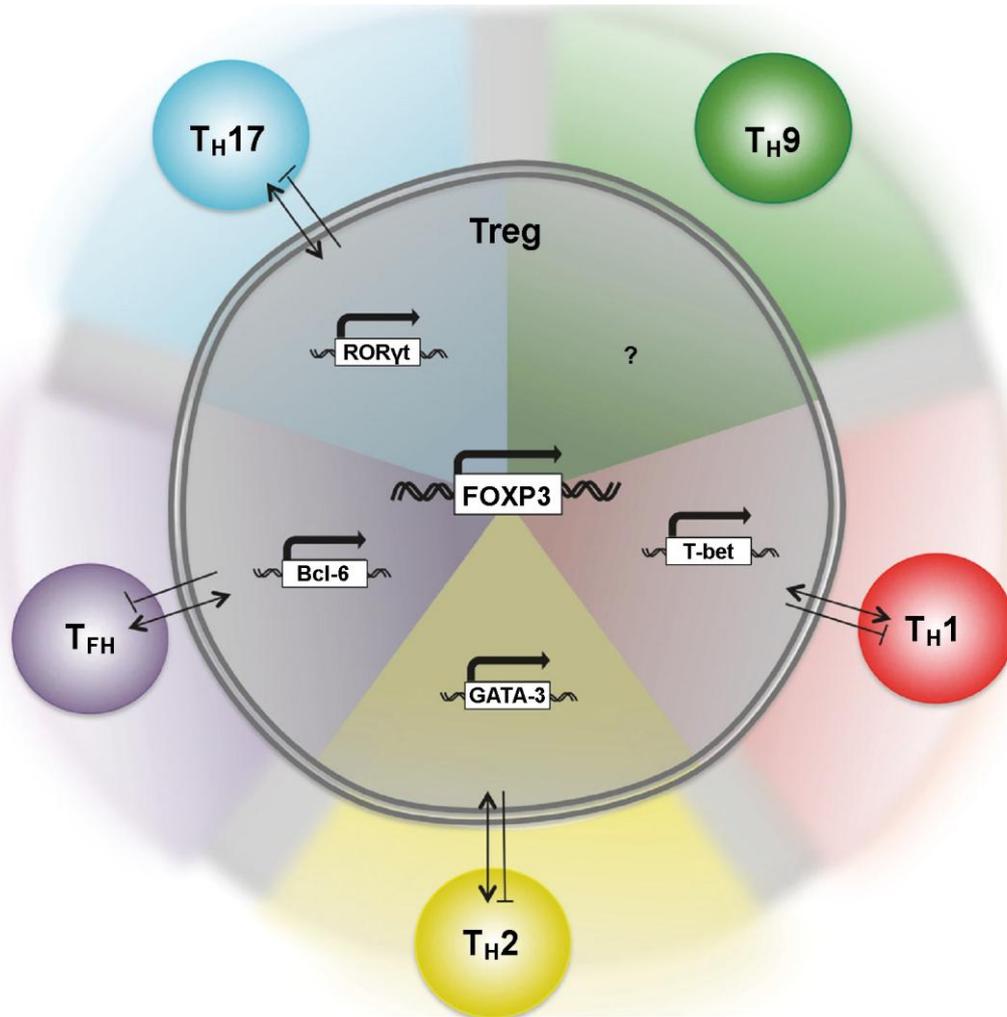
Une étude de Koch et al., a identifié une sous-population de Treg FOXP3<sup>+</sup> co-qui exprimait T-bet ainsi que le récepteur de chimiokine associé aux T<sub>H</sub>1, CXCR3, mais qui ne produisait pas d'IFN- $\gamma$ . Cette sous-population présenterait des propriétés migratoires et homéostatiques optimisées dans la régulation de réponse immunitaire de type I *in vivo* (Koch et al., 2009). Chez l'homme, des travaux réalisés *ex vivo* et *in vitro* ont également identifié des sous-populations de Treg FOXP3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> qui exprimaient CXCR3. Il a notamment été décrit que la mise en co-culture, *in vitro*, de LT CD4<sup>+</sup> naïfs avec un faible nombre de LB allogéniques activés induisait la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Treg CD25<sup>+</sup> co-exprimant FOXP3 et T-bet, exprimant CXCR3 et produisant de l'IFN- $\gamma$ , tout en ayant des capacités suppressives (Zheng et al., 2011). Cette sous-population a également été identifiée *ex vivo* dans le sang périphérique de donneurs sains ainsi que dans le cadre de maladies auto-immunes (Dominguez-Villar et al., 2011; Hoerning et al., 2011; McClymont et al., 2011). Une fréquence plus élevée de Treg FOXP3<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> a d'ailleurs été observée chez les patients atteints de sclérose en plaques ou de diabète de type 1 (Dominguez-Villar et al., 2011; McClymont et al., 2011).

Bien qu'ayant des fonctions antagonistes, une relation forte entre les Treg et les T<sub>H</sub>17 a été décrite. En effet, il a été montré qu'aussi bien chez la souris que chez l'homme, un facteur commun, le TGF- $\beta$ , était impliqué dans la différenciation de ces deux sous-populations, en association avec d'autres cytokines concernant la polarisation en T<sub>H</sub>17. Il a ainsi été suggéré qu'un équilibre existait entre la différenciation des Treg et des T<sub>H</sub>17 dans la périphérie. Une sous-population de Treg CCR6<sup>+</sup> co-exprimant FOXP3 et ROR $\gamma$ t, produisant de l'IL-17 tout en présentant des propriétés suppressives a été identifiée chez la souris *in vivo* et *ex vivo* (Lochner et al., 2008). Des travaux réalisés par mon laboratoire d'accueil ainsi que d'autres études ont ensuite mis en évidence que cette sous-population de Treg FOXP3<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> était présente *ex vivo* chez l'homme dans le sang périphérique et au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Ayyoub et al., 2009; Voo et al., 2009). De plus, mon laboratoire d'accueil a également montré que, chez l'homme, les Treg mémoires pouvaient se convertir en T<sub>H</sub>17 suite à une stimulation en présence d'IL-1 $\beta$  et d'IL-2 *in vitro* (Deknuydt et al., 2009). Nous avons par la suite mis en évidence que les NTreg humains pouvaient se différencier en T<sub>H</sub>17 suite à une stimulation en présence d'IL-2, d'IL-1 $\beta$ , d'IL-23 et de TGF- $\beta$  *in vitro* (Valmori et al., 2010). De plus,

lors de l'étude de Zhou et *al.*, utilisant des modèles murins transgéniques permettant de détecter, parmi les LT CD4<sup>+</sup>, les cellules exFOXP3, il a été décrit qu'un pourcentage important de cellules exFOXP3 produisait de l'IL-17 au niveau des plaques de Payer (Zhou et al., 2009).

Des travaux effectués à partir de souris transgéniques ont montré que l'atténuation de l'expression de FOXP3 chez les Treg induisait leur conversion en T<sub>H</sub>2 et conduisait au développement d'immunopathologies (Wan and Flavell, 2007). Le phénomène inverse a également été décrit. En effet, des T<sub>H</sub>2 murins ont été convertis en Treg suite à une re-stimulation en présence de TGF-β, d'acide rétinoïque et de rapamycine *in vitro* (Kim et al., 2010). Une aptitude des Treg à se convertir en LT CD4<sup>+</sup> folliculaires au niveau des plaques de Payer a également été observée chez la souris (Tsuji et al., 2009). De plus, une sous-population de Treg CXCR5<sup>+</sup> exprimant le facteur de transcription BCL-6 a été identifiée, chez la souris et chez l'homme, et serait impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire au niveau des centres germinatifs (Chung et al., 2011).

La présence d'une grande hétérogénéité au sein du compartiment des Treg ressort de l'ensemble de ces études (Figure 9). Il semblerait que certaines sous-populations de Treg soient optimisées dans la régulation d'un type particulier de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaire, notamment via l'expression de récepteurs de chimiokine qui leur permettent une migration spécifique. Cependant, l'origine de ces cellules, les conditions et les mécanismes conduisant à leur spécialisation ainsi que leurs modes de fonctionnement ne sont pas encore définis. De même, leurs implications relatives dans la protection contre les infections, dans les désordres auto-immuns ou encore dans les cancers restent à être déterminées. De plus, les phénomènes de conversion décrits *in vitro* ainsi que chez des modèles murins suggèrent une possible instabilité dans la population des Treg.



Coomes et al., *Open Biol.* Janvier 2013, Volume 3, Issue 1.

**Figure 9. Hétérogénéité et plasticité des Treg.** Des phénomènes de conversion des Treg en TH1, TH2, TH17 et LT CD4<sup>+</sup> folliculaires (TFH) ont été décrits. De même de nombreuses sous-populations de Treg co-exprimant en plus de FOXP3 un facteur de transcription caractéristique d'une des sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires ont été identifiées, aussi bien chez la souris que chez l'homme. Ces sous-populations hybrides pourraient correspondre à des intermédiaires dans des voies de différenciation/conversion ou bien à des cellules spécialisées dans la régulation d'un type particulier de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaire.

### *b. Stabilité des Treg*

Etant donné l'importance des Treg dans la régulation de la tolérance aux constituants de soi, la question de la plasticité et/ou de la stabilité des Treg fait actuellement l'objet d'un grand débat au sein de la communauté scientifique (Sakaguchi et al., 2013). Plusieurs études citées dans le paragraphe précédent suggèrent qu'au moins une fraction des Treg serait instable et présenterait une

aptitude à perdre l'expression de FOXP3 et acquérir des caractéristiques de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs *in vivo* (Duarte et al., 2009; Oldenhove et al., 2009; Zhou et al., 2009).

Une étude chez la souris a décrit que seule une petite fraction (environ 10%) des Treg FOXP3<sup>+</sup> perdait l'expression de FOXP3 après un transfert adoptif chez des hôtes lymphopéniques ou normaux et acquérait la capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires (Komatsu et al., 2009). Ces cellules se sont révélées exprimer faiblement la molécule CD25 tandis que les Treg CD25<sup>high</sup> présentaient une expression stable de FOXP3. Ces résultats les ont amenés à définir la population des Treg comme étant hétérogène et composée de deux sous-populations possédant des flexibilités différentes. L'une étant majoritaire et constituée de cellules CD25<sup>high</sup> qui exprimeraient FOXP3 de façon stable et seraient engagées de façon définitive dans la voie des Treg et par conséquent résistantes à la reprogrammation en cellules effectrices. L'autre sous-population, minoritaire, serait composée de cellules CD25<sup>low</sup> ou CD25<sup>-</sup> non engagées totalement dans la lignée des Treg qui conserveraient une plasticité leur conférant la capacité de perdre l'expression de FOXP3 et de se convertir en LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires dans certaines conditions de stimulation (Komatsu et al., 2009).

Une autre équipe a utilisé des souris transgéniques où seuls les vrais Treg, mais pas les cellules T exprimant FOXP3 transitoirement, étaient fluorescents, afin d'étudier la stabilité des Treg *in vivo* (Rubtsov et al., 2010). Leurs résultats ont montré que les Treg maintenaient fortement l'expression de FOXP3 aussi bien en conditions physiologiques qu'inflammatoires. L'étude de Miyao et al., réalisée chez les modèles transgéniques murins permettant de détecter les cellules ayant perdu l'expression de FOXP3, a par la suite suggéré que les cellules exFOXP3 correspondaient à des LT CD4<sup>+</sup> ne possédant pas de propriétés suppressives et qui exprimaient transitoirement FOXP3 suite à leur activation (Miyao et al., 2012). A l'inverse les Treg aussi bien d'origine thymique que périphérique se sont révélés être stables en conditions physiologiques et inflammatoires. En effet, bien qu'une perte de l'expression de FOXP3 ait été observée dans une faible fraction des Treg suite à leur transfert dans un hôte lymphopénique, elle s'est avérée être transitoire. Ces cellules se sont montrées maintenir un TSDR partiellement déméthylé et ont réacquis l'expression de FOXP3 et leur capacité suppressive après réactivation (Miyao et al., 2012).

En conclusion, il y a actuellement une divergence d'opinion concernant la stabilité des Treg au sein de la communauté scientifique. Certains affirment que les Treg représentent une population stable mais hétérogène, notamment composée de sous-populations spécialisées dans la régulation d'un type particulier de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaire. Les cellules ayant perdu l'expression de FOXP3 correspondraient à des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels qui exprimeraient transitoirement FOXP3 dans la périphérie après activation ou encore à des précurseurs non engagés totalement dans la voie de différenciation des Treg et n'exprimant pas encore FOXP3 de façon stable. A l'inverse d'autres travaux suggèrent que les Treg seraient potentiellement aptes à perdre l'expression de FOXP3 et à se reprogrammer en LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires dans certaines conditions extrêmes ou spécifiques.

De nombreuses questions sont soulevées par la potentielle instabilité des Treg. Il serait essentiel de déterminer si cette instabilité concerne l'ensemble des Treg ou seulement une sous-population spécifique. Il serait notamment important de savoir si les iTreg et les nTreg possèdent des propensions à se reprogrammer identiques ou différentes. Les conditions physiologiques et pathologiques et les sites permettant la conversion des Treg en LT CD4<sup>+</sup> effecteurs *in vivo* seraient également à définir. De même l'implication de cette instabilité dans certaines maladies telles que les maladies auto-immunes devrait être étudiée. Enfin, une meilleure compréhension des mécanismes permettant la reprogrammation des Treg pourrait fortement aider au développement de stratégies de thérapie cellulaire. En effet, l'utilisation des Treg en tant qu'outil thérapeutique est actuellement étudiée afin de soigner certains désordres auto-immuns, tels que le diabète de type 1. L'une des stratégies envisagées vise à faire proliférer *in vitro* des Treg issus du patient puis à les lui réinjecter (Putnam et al., 2009). La sous-population des Treg la plus adaptée ainsi que les conditions expérimentales requises pour permettre une expansion optimale de Treg présentant un profil stable, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, restent encore à être déterminées. De plus, renforcer la stabilité des Treg *in vivo* pourrait également s'avérer bénéfique dans le cadre de désordres auto-immuns ou chez des patients transplantés. A l'inverse pouvoir induire une reprogrammation des Treg en LT CD4<sup>+</sup> effecteurs pourrait servir d'outil thérapeutique dans certaines pathologies où l'effet immunosuppresseur des Treg a été décrit comme étant impliqué dans l'inefficacité de

la réponse immunitaire, tels que dans des cas d'infections virales chroniques ou encore dans certains cancers.

#### **4- La réponse immunitaire dans le cancer épithélial de l'ovaire**

##### **A- Cancérologie**

###### *a. Les cellules cancéreuses*

Au cours des cycles de division cellulaire, des anomalies dans la réplication de l'ADN peuvent apparaître mais sont corrigées par des mécanismes intrinsèques spécialisés dans la détection et la réparation des défauts de l'ADN. Cependant, il arrive dans de rares cas qu'une mutation entraîne la modification d'un gène impliqué dans la réparation de l'ADN et engendre ainsi l'accumulation d'anomalies génétiques. De même, lorsqu'une altération de l'ADN se produit au niveau d'un gène codant pour une molécule impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, une perte de contrôle de la prolifération cellulaire peut être observée et conduire à l'immortalisation de la cellule. Cette cellule anormale, dite précancéreuse, va alors proliférer de façon anarchique et générer des clones qui vont au fur et à mesure des cycles de division acquérir de nouvelles anomalies génétiques et ainsi de nouvelles caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques leur conférant un avantage sélectif de plus en plus fort et conduire à l'apparition d'un cancer.

Il a été défini que les cellules cancéreuses différaient des cellules normales sur la base de six caractéristiques principales qu'elles acquièrent au cours de la progression tumorale. Les cellules cancéreuses produisent elles-mêmes le facteur de croissance auquel elles sont réactives et stimulent ainsi de façon autocrine leur prolifération. Elles sont insensibles aux signaux antiprolifératifs, tel que celui induit par le TGF- $\beta$ . Les cellules cancéreuses sont résistantes à l'apoptose et présentent une capacité à proliférer sans limite. Elles sont capables d'induire l'angiogenèse notamment en produisant du VEGF, un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Elles acquièrent également un pouvoir invasif. Elles deviennent aptes à envahir les tissus adjacents causant leur destruction et/ou leur dysfonctionnement mais également à quitter le site de la tumeur primaire par voie sanguine ou

lymphatique et à se propager dans l'organisme ce qui conduit à la formation de métastases.

Différents facteurs à risques ont été décrits comme favorisant le développement de cancer. Il existe notamment des facteurs génétiques, certains individus présentent des mutations génétiques, transmises de façon héréditaire, qui les prédisposent à développer certains types de cancer. Par exemple, des mutations sur les gènes BRCA1 ou BRCA2, qui codent pour des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, ont été montrées comme augmentant fortement les risques de développer un cancer du sein mais également des ovaires chez la femme et de la prostate chez l'homme. De nombreux autres facteurs ont aussi été mis en évidence tels que l'exposition aux rayonnements ionisants, le tabagisme, la consommation importante d'alcool, l'obésité, les perturbateurs endocriniens, le vieillissement ou encore certaines infections virales chroniques.

#### *b. Le cancer épithélial de l'ovaire*

Le cancer épithélial de l'ovaire (CEO) est un adénocarcinome avec un taux d'incidence qui le place au 8<sup>ème</sup> rang des cancers féminins en France en 2012, selon le rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Le cancer de l'ovaire touche principalement les femmes âgées avec un pic d'incidence entre 75 et 79 ans. Le CEO se manifeste par des symptômes banals tels que des troubles digestifs, une fatigue ou bien un amaigrissement. Par conséquent, de par l'absence de dépistage, 65% des CEO sont diagnostiqués à un stade avancé, c'est-à-dire après l'apparition de métastases au niveau du péritoine (stade III) ou à distance (stade IV). En raison de ce diagnostic tardif, le CEO représente la cause la plus fréquente de décès par cancer gynécologique et la 5<sup>ème</sup> cause de décès par cancer chez la femme en 2012 selon l'InVS. En France, la survie relative à 5 ans après le diagnostic d'un cancer de l'ovaire est de 35% mais varie très fortement en fonction du stade de la maladie. En effet les patientes diagnostiquées à un stade I ont une survie relative à 5 ans de 85% contre 14% seulement chez les patientes présentant un cancer de l'ovaire de stade IV.

Les traitements actuels consistent en une intervention chirurgicale visant à l'exérèse totale de la tumeur le plus souvent en association avec une chimiothérapie (combinaison de Carboplatine et de Paclitaxel) qui cible et élimine les cellules en

cours de division cellulaire. La chimiothérapie peut être mise en place avant l'intervention chirurgicale dans le but de diminuer la taille de la tumeur ou bien après l'opération afin d'éliminer les éventuelles cellules tumorales résiduelles ainsi que les métastases et ainsi limiter les risques de rechute. Cependant, le traitement actuel s'avère insuffisamment efficace puisqu'une rechute de la maladie est observée chez la majorité des patientes entre les 16 à 18 mois après la fin du traitement. Il est par conséquent nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ayant une meilleure efficacité.

## B- La réponse immunitaire anti-tumorale

### a. *Immunosurveillance du cancer*

Le concept de l'immunosurveillance du cancer, qui émet l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire jouerait un rôle protecteur contre le développement tumoral, a été suggéré par Paul Ehrlich au début du XX<sup>ème</sup> siècle puis repris par Burnett et Thomas dans les années 50. Il a cependant fallu attendre les années 90 et les avancées technologiques dans la génération de modèles transgéniques murins et dans la production d'anticorps pour pouvoir apporter des preuves expérimentales à ce concept.

Des travaux réalisés sur des souris déficientes pour les gènes RAG (Recombination Activation Gene) ont notamment apporté des résultats soutenant fortement l'implication de la réponse immunitaire dans le contrôle du développement tumoral. Les gènes RAG codent pour des enzymes essentielles au réarrangement des gènes des chaînes des immunoglobulines et du TCR, par conséquent les souris RAG déficientes ne présentent pas de LT conventionnels et non-conventionnels ni de LB matures en périphérie. Or, il a été mis en évidence que ces souris présentaient un risque accru à développer des tumeurs spontanées ou induites, mettant en évidence l'implication des lymphocytes, et donc de la réponse immunitaire adaptative, dans le processus d'immunosurveillance du cancer (Shankaran et al., 2001). Il a également été montré que la réponse immunitaire innée intervenait dans la prévention des tumeurs. Des travaux ont notamment montré l'implication des cellules NK dans le contrôle de la dissémination des cellules tumorales et ainsi dans la protection contre la formation métastatique. En effet, il a été décrit que l'inactivation des cellules NK, chez des souris porteuses d'un mélanome, n'influe

pas sur la croissance de la tumeur primaire mais entraînait une accélération significative du développement de métastases pulmonaires (Gorelik et al., 1982).

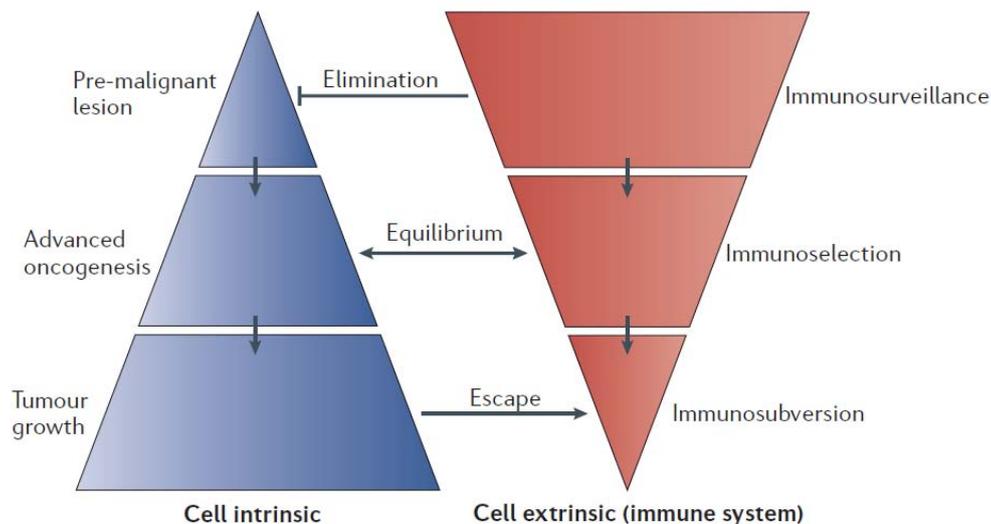
Des preuves de l'immunosurveillance du cancer chez l'homme ont également été observées. Il a été constaté que chez les individus immunodéprimés, suite à une infection virale chronique ou suite à la prise de traitements immunosuppresseurs, l'incidence des cancers était fortement augmentée. De plus, plusieurs études ont mis en évidence que la présence d'un infiltrat de lymphocytes T au niveau du site tumoral était corrélée positivement avec la survie globale chez les patients atteints de différents types de cancers tels que le mélanome, le cancer du colon, du sein et de l'ovaire (Clark et al., 1989; Galon et al., 2006; Rilke et al., 1991; Zhang et al., 2003b).

Enfin, un autre argument en faveur du concept selon lequel le système immunitaire jouerait un rôle dans la protection des cancers a été l'identification des antigènes associés aux tumeurs (AAT). Les AAT sont des molécules exprimées spécifiquement ou surexprimées par les cellules tumorales pouvant être reconnues par les lymphocytes et ainsi déclencher une réponse immunitaire. Les AAT peuvent être classés en 5 sous-groupes : les antigènes de différenciation spécifique de tissu (MART-1), les antigènes résultant d'altérations géniques (mutation du gène p53), les antigènes dérivés de virus oncogéniques (HPV16), les antigènes surexprimés (HER2/neu) et les antigènes spécifiques de tumeur du groupe 'cancer-testis' qui ne sont pas exprimés par les cellules somatiques normales (MAGE, NY-ESO-1).

De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été envisagées dans le but d'induire ou d'augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale des patients afin d'éliminer les cellules tumorales tout en préservant les cellules normales. Les stratégies d'immunothérapies anti-tumorales se sont orientées vers deux voies principales. L'immunothérapie passive par l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant des AAT ou par le transfert adoptif de LT spécifiques d'antigènes de tumeur. L'immunothérapie active encore appelée vaccinothérapie qui vise à stimuler la réponse immunitaire de l'individu *in vivo*. Il est à souligner que des études ont aussi mis en évidence que la tumeur mettait en place des mécanismes d'immunosuppression afin d'empêcher l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale et que cette dernière pouvait participer à l'échappement tumoral.

### b. La théorie des trois E

Des études ont mis en évidence que l'immunosurveillance du cancer ne représentait en réalité qu'un seul aspect de la relation complexe qui s'opère entre le système immunitaire et le cancer. En effet, il a été observé que les tumeurs qui se développaient chez des modèles murins immunodéficients étaient plus immunogéniques que les tumeurs générées chez des souris immunocompétentes. Ces résultats ont suggérés que le système immunitaire, en éliminant les cellules tumorales pouvant être reconnues, favoriserait également la sélection de variants tumoraux résistants aux attaques du système immunitaire et contribuerait ainsi à l'échappement tumoral (Shankaran et al., 2001). L'équipe de Schreiber a ainsi formulé la théorie de l'immunoediting des cancers, aussi appelée la théorie des trois E, qui décrit le processus du développement tumoral en trois phases successives : l'Élimination, l'Équilibre et l'Échappement (Dunn et al., 2002) (Figure 10).



Zitvogel et al., *Nat Rev Immunol.* Octobre 2006, Volume 6, Issue 10, Page 715-27.

**Figure 10. La théorie des trois E.** La théorie des trois E divise la progression tumorale en trois étapes successives. La première est l'élimination, au cours de laquelle le système immunitaire détecte et élimine les cellules anormales protégeant ainsi du développement tumoral. Il arrive que l'immunosurveillance ne soit pas totalement efficace ce qui conduit à la phase d'équilibre. La réponse immunitaire, en éliminant les cellules tumorales immunogéniques, favorise la progression de variants tumoraux de plus en plus résistants. Cette immunosélection peut conduire à la phase d'échappement où la prolifération des cellules tumorales n'est plus sous le contrôle du système immunitaire et engendre l'apparition d'une tumeur.

La première phase, celle de l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire, correspond au concept de l'immunosurveillance du cancer. Il peut arriver que ce processus ne soit pas totalement efficace et ne parvienne pas à détruire l'entièreté des cellules anormales, ce qui entraîne le passage à une étape dite d'équilibre pouvant durer plusieurs années. Durant cette seconde phase, le système immunitaire maintient sous contrôle la progression des cellules tumorales et induit également en contre partie le phénomène d'immunosélection. En effet, l'élimination des cellules tumorales pouvant être reconnues par le système immunitaire engendre également une pression de sélection favorable à la survie de variants tumoraux moins immunogènes. Par conséquent, au cours de cette phase d'équilibre, la réponse immunitaire conduit progressivement à l'émergence de cellules tumorales résistantes et aboutit à une perte de contrôle de la prolifération des cellules tumorales par le système immunitaire et le passage à la phase d'échappement tumoral. Des preuves de l'étape d'équilibre ont été apportées par des cas cliniques observés chez des patients transplantés. Par exemple, chez deux patients ayant été transplantés à partir d'un même donneur, des cellules métastatiques issues d'un mélanome ont été détectées bien qu'aucune tumeur primaire de mélanome n'ait pu être trouvée. En s'intéressant aux antécédents médicaux du donneur d'organe, il s'est avéré que ce dernier avait eu un mélanome mais était en rémission depuis 15 ans (MacKie et al., 2003). Il y a donc eu transmission des cellules tumorales aux receveurs. Alors que chez le donneur, le développement des métastases était sous le contrôle de la réponse immunitaire, chez les receveurs qui recevaient un traitement immunosuppresseur pour empêcher le rejet de greffe, l'équilibre entre la réponse immunitaire et la prolifération des cellules cancéreuses semble avoir été rompu conduisant ainsi à l'émergence de métastases.

Le passage à la phase d'échappement se produit lorsque le système immunitaire ne parvient plus à contrôler la prolifération des cellules cancéreuses et conduit à la formation d'une tumeur cliniquement détectable. Les variants tumoraux générés résistent à la réponse immunitaire anti-tumorale en mettant en place de nombreux mécanismes d'échappement. Certains sont inhérents aux cellules tumorales, tels que la perte d'immunogénicité par l'arrêt de l'expression d'antigènes de tumeurs ou encore suite à des altérations dans l'apprêtement ou dans la présentation des peptides antigéniques. Les cellules tumorales peuvent également

acquérir une résistance à la lyse induite par les effecteurs cytotoxiques ainsi qu'à l'apoptose. En plus de cette immunorésistance intrinsèque, les cellules tumorales façonnent un microenvironnement tumoral favorable à leur survie ainsi qu'à l'angiogenèse et apte à inhiber localement l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les cellules tumorales produisent notamment des molécules immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou encore l'IDO. Un enrichissement en cellules myéloïdes suppressives a également été observé dans de nombreux cancers et participerait à l'inhibition de l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, à l'induction de l'anergie des LT et au développement de iTreg (Huang et al., 2006). Les cellules tumorales favorisent également, via la sécrétion de chimiokines, l'accumulation de macrophages associés à la tumeur (Tumor-associated macrophages ; TAM) qui aident à la prolifération tumorale par la production de facteur de croissance, favorisent l'angiogenèse en produisant du VEGF et ont un effet suppressif sur les cellules de l'immunité via la sécrétion d'IL-10. L'infiltration importante de TAM au niveau de la tumeur a d'ailleurs été associée avec un mauvais pronostic dans un grand nombre de cancers, tels que le cancer du sein ou de la prostate (Bingle et al., 2002). Une inhibition de la maturation des cellules dendritiques a également été observée au niveau du site tumoral. Par l'absence de signaux de co-stimulation, ces cellules dendritiques immatures empêchent l'activation optimale des LT et entraînent leur anergie ou apoptose tout en favorisant la génération de nTreg. Enfin, une fréquence augmentée de Treg a également été observée au niveau du site tumoral dans certains types de cancers et semble jouer un rôle important dans l'immunosuppression présente au niveau de la tumeur.

Deux points importants ressortent de ces différentes études et sont à prendre en considération pour la conception des stratégies d'immunothérapies anti-tumorales. Premièrement, il apparaît clairement que plus la progression tumorale est à un stade tardif et plus les variants tumoraux sont résistants à la réponse immunitaire. Par conséquent une prise en charge à un stade précoce de la maladie permettrait une plus grande efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale induite par le traitement d'immunothérapie, d'où la nécessité de développer des techniques de dépistage des cancers. Deuxièmement, la présence de nombreux mécanismes immunosuppresseurs au niveau du site tumoral semble être un frein à l'efficacité des immunothérapies anti-tumorales. Il est par conséquent nécessaire de développer, en

parallèle des stratégies visant à stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale, des outils permettant d'atténuer l'immunosuppression présente dans le microenvironnement tumoral.

### *c. Les lymphocytes T régulateurs dans le cancer*

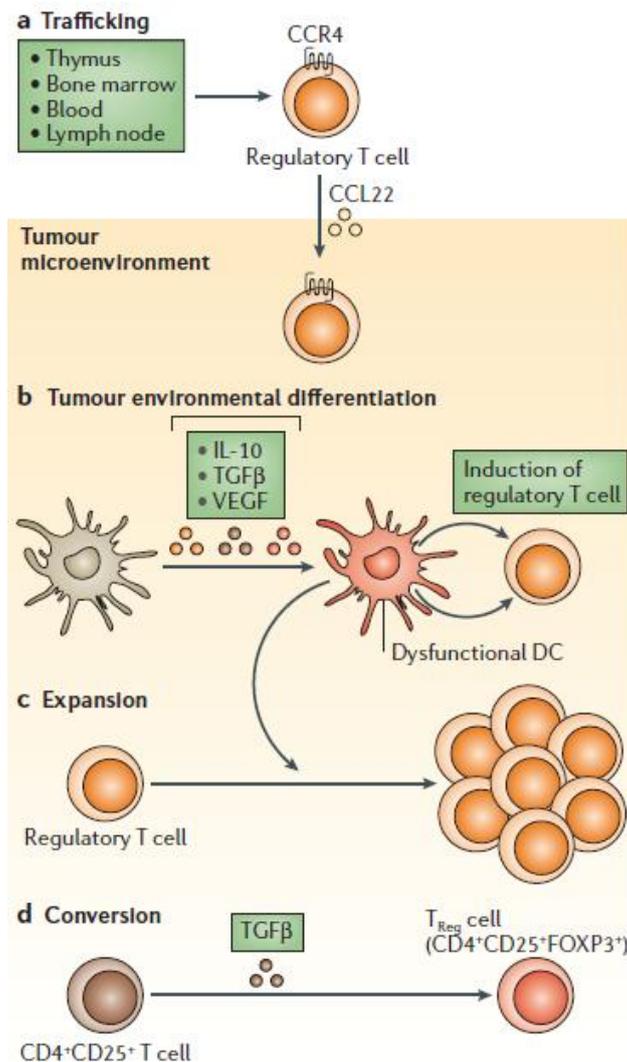
Des travaux chez la souris ont été les premiers à mettre en évidence une implication des Treg dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale et dans la progression de la maladie. Alors que les lignées tumorales transférées chez des souris syngéniques proliféraient efficacement, une étude a mis en évidence que l'administration d'anticorps anti-CD25 avant l'inoculation de la tumeur conduisait à une régression de la taille de la tumeur (Onizuka et al., 1999). Les anticorps anti-CD25 ayant pour effet de diminuer le nombre de Treg, ces résultats ont suggéré que les Treg favorisaient la croissance tumorale. De plus, lors de cette étude ils ont également observé que lorsque l'administration d'anticorps anti-CD25 était associée avec une déplétion des LT CD8<sup>+</sup> ou des LT CD4<sup>+</sup>, la tumeur n'était pas rejetée.

Chez l'homme il a été mis en évidence qu'une fréquence élevée de Treg au niveau du site tumoral corrélait avec un mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers tels que le cancer du sein, des ovaires, du pancréas, du rein et du foie (Bates et al., 2006; Curiel et al., 2004; Hiraoka et al., 2006; Kobayashi et al., 2007; Liotta et al., 2011). Une augmentation de la prévalence des Treg au cours de la progression tumorale a été observée lors de ces études. Il ressort de ces observations que des stratégies thérapeutiques visant à empêcher l'effet immunosuppresseur des Treg au niveau du site tumoral pourraient aider à améliorer l'efficacité des traitements anti-tumoraux. Cependant, il est à souligner que dans certains cancers comme par exemple le lymphome de Hodgkin, les cancers du colon, de la tête et du cou, une fréquence élevée de Treg infiltrant la tumeur a également été observée et a été associée avec un meilleur pronostic (Badoual et al., 2006; Salama et al., 2009; Tzankov et al., 2008). Ces tumeurs sont souvent associées avec une inflammation chronique qui a un effet bénéfique sur la progression tumorale. Par conséquent, l'effet suppressif des Treg sur la réponse immunitaire pourrait, dans ces cas particuliers, limiter le développement tumoral.

Plusieurs mécanismes ont été mis en cause dans l'enrichissement des Treg au niveau du site tumoral observé dans certains cancers (Figure 11). Il a notamment été décrit qu'une migration des Treg, alors d'origine thymique ou périphérique, pouvait avoir lieu grâce à la sécrétion de chimiokines par les cellules tumorales ou par les cellules présentes dans le microenvironnement tumoral tels que les TAM. Ainsi les Treg exprimant les récepteurs de chimiokines spécifiques migreraient en suivant un gradient de concentration et s'accumuleraient au niveau de la tumeur. Dans le cancer du sein, de l'ovaire et le gliome, l'axe CCR4/CCL22 a été suggéré comme étant à l'origine du recrutement préférentiel des Treg au site tumoral (Curiel et al., 2004; Gobert et al., 2009; Jordan et al., 2008). Il est à souligner que dans le CEO l'axe CCR10/CCL28 a également été décrit comme favorisant le recrutement des Treg au niveau de la tumeur (Facciabene et al., 2011). Chez la souris dans le cancer du pancréas c'est l'axe CCR5/CCL5 qui a été mis en cause (Tan et al., 2009).

En plus de la migration des Treg, le microenvironnement tumoral pourrait également être propice à la différenciation et à la conversion des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels en iTreg ainsi qu'à l'expansion des Treg. En effet, de nombreuses cytokines immunosuppressives, tels que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , sont présentes dans ce microenvironnement. Ces cytokines, en inhibant la maturation des cellules dendritiques, favorisent l'émergence de cellules dendritiques immatures et tolérogènes. Or, il a été décrit que les cellules dendritiques immatures pouvaient potentiellement induire la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en iTreg produisant de l'IL-10 *in vitro* (Jonuleit et al., 2000). De plus, les cellules dendritiques immatures associées à la tumeur pourraient également favoriser l'expansion des Treg pré-existants via la sécrétion de TGF- $\beta$  (Ghiringhelli et al., 2005). Enfin, étant donné qu'il a été décrit que l'activation des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels en présence de TGF- $\beta$  conduisait à leur conversion en iTreg, la présence de cette cytokine immunosuppressive dans le microenvironnement tumoral suggère que ce phénomène de conversion pourrait également contribuer à l'augmentation de la fréquence des Treg infiltrant la tumeur (Chen et al., 2003). Il a d'ailleurs été montré que la stimulation *in vitro* de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels murins en présence de lignées de cellules tumorales induisait leur conversion en Treg et que la présence d'un anticorps neutralisant anti-TGF- $\beta$  empêchait ce phénomène de conversion (Liu et al., 2007). Il est important de souligner que la contribution relative des nTreg et des iTreg

dans l'enrichissement des LT régulateurs au niveau de la tumeur n'est pas encore connue. L'absence d'un marqueur permettant de distinguer ces deux sous-populations à jusqu'à présent limité leur étude comparative. Cependant, une étude chez des modèles murins a montré qu'aussi bien les nTreg que les iTreg participaient à l'immunosuppression de la réponse immunitaire anti-tumorale (Zhou and Levitsky, 2007).



Zou W, *Nat Rev Immunol.* Avril 2006, Volume 6, Issue 4, Page 295-307.

**Figure 11. Les différentes sources potentielles de Treg au niveau du site tumoral.** Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans l'enrichissement des Treg au niveau du site tumoral. Il pourrait être dû à une migration préférentielle de Treg exprimant un récepteur de chimiokine dont le ligand est sécrété au site tumoral (a), par la génération de cellules dendritiques (DC) dysfonctionnelles pouvant potentiellement favoriser l'induction de iTreg (b), par l'induction de l'expansion des Treg intra-tumoraux par les DC (c) et également par la conversion de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en Treg induits, après une stimulation en présence de TGF-β (d).

Les mécanismes de suppression, mis en place par les Treg au niveau du site tumoral, ne sont pas clairement définis et varient très probablement en fonction du type de cancer, du microenvironnement tumoral et de la sous-population de Treg. Cependant, la sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$ , l'appauvrissement du milieu en IL-2, la production de granzyme B et de perforine ainsi que l'induction de la production d'IDO par les APC via l'interaction CTLA-4/B7 pourraient être impliqués dans l'induction de la tolérance par les Treg au niveau de la tumeur.

La spécificité antigénique des Treg présents au niveau du site tumorale n'a pas encore été étudiée de façon approfondie à cause des difficultés rencontrées dans le développement des tétramères de complexes CMH-II/peptide (Ayyoub et al., 2010). Cependant, des Treg spécifiques de AAT ont été détectés dans le sang périphérique et parmi les lymphocytes infiltrant la tumeur (Tumor Infiltrating Lymphocytes ; TIL) chez des patients atteints de mélanome et de cancer du colon (Bonertz et al., 2009; Vence et al., 2007; Wang et al., 2004). Il a également été mis en évidence que certaines stratégies d'immunothérapie active visant à stimuler une réponse immunitaire dirigée contre des AAT, induisaient l'amplification de Treg spécifiques d'antigènes de tumeur pouvant conduire à l'échec du traitement (Francois et al., 2009; Zhou et al., 2006). Une meilleure connaissance des antigènes de tumeurs reconnus par les Treg et les LT effecteurs est nécessaire afin de choisir les stratégies d'immunothérapie les mieux adaptées, c'est-à-dire qui permettraient une stimulation efficace des LT effecteurs tout en limitant celle des Treg. De plus, connaître la spécificité antigénique des Treg infiltrant la tumeur contribuerait également fortement à une meilleure compréhension des mécanismes responsables de leur enrichissement et pourrait aider à déterminer la contribution relative des nTreg et iTreg dans ce phénomène. Il est à noter qu'une étude qui a comparé le répertoire des TCR des Treg avec celui des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels présents au site tumoral chez des modèles de cancers murins, a montré que ces répertoires étaient différents (Hindley et al., 2011). Ces résultats ont suggéré que le phénomène de conversion intra-tumoral des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels en iTreg ne semblait pas être le mécanisme principalement responsable de la fréquence élevée des Treg dans l'infiltrat tumoral. Cependant, une autre étude réalisée chez l'homme a, à l'inverse, suggéré qu'au moins une partie des Treg présents au site tumoral était générée suite à la conversion des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels (Fourcade et al., 2010).

Dans leur ensemble, les études portant sur les Treg infiltrant la tumeur suggèrent fortement que dans de nombreux types de cancers, combiner une immunothérapie anti-tumorale avec des traitements visant à empêcher l'effet immunosuppresseur des Treg infiltrant la tumeur pourrait fortement contribuer au succès de la thérapie. Par conséquent, de nombreuses stratégies visant à inhiber, localement ou en systémique l'action des Treg ont été envisagées. Certaines chimiothérapies ont été montrées comme pouvant stimuler la réponse immunitaire. Par exemple, le Cyclophosphamide, un agent alkylant utilisé à faible dose comme chimiothérapie anticancéreuse permet une augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale en induisant une forte diminution du nombre de Treg (Ghiringhelli et al., 2007). Ainsi, ces données suggèrent que combiner un traitement d'immunothérapie avec une chimiothérapie adaptée pourrait favoriser l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Dans le but d'éliminer les Treg ou d'inhiber leur fonction, de nombreux anticorps, ciblant des molécules de surface préférentiellement exprimées par les Treg, ont été développés. L'utilisation d'anticorps anti-CD25 (Daclizumab) a notamment été testée en association avec un vaccin anti-tumoral chez des patientes ayant un cancer du sein métastatique et a montré une diminution durable du nombre de Treg ainsi que l'induction d'une réponse immunitaire cytotoxique dirigée contre des AAT (Rech and Vonderheide, 2009). Une protéine recombinante fusionnant l'IL-2 avec le domaine actif de la toxine diphtérique, appelée ONTAK, a été mise au point dans le but d'éliminer spécifiquement les cellules exprimant fortement CD25. La fixation de l'IL-2 à son récepteur entraîne l'internalisation de la protéine par la cellule, la toxine induit alors l'inhibition de la synthèse protéique ce qui conduit à l'apoptose de la cible cellulaire. Il a été montré que l'administration de la protéine ONTAK chez des patients atteints d'un carcinome rénal métastatique, recevant en parallèle une vaccination anti-tumorale, permettait d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale plus forte que celle générée par le vaccin seul (Dannull et al., 2005). D'autres essais cliniques, combinant ou non une stratégie de vaccination anti-tumorale, ont également mis en évidence une réduction de la fréquence des Treg, après l'administration de la protéine ONTAK, dans le sang périphérique de patients atteints de cancers (Barnett et al., 2005; Mahnke et al., 2007; Morse et al., 2008). Cependant, il est à noter que des travaux ayant testé l'action de cette protéine de

fusion chez des patients atteints de mélanomes à des stades avancés, n'ont pas observé de déplétion des Treg présents dans la périphérie suite à l'administration de l'ONTAK (Attia et al., 2005; Baur et al., 2013).

L'anticorps antagoniste anti-CTLA-4 (Ipilimumab) apparaît également comme étant un outil thérapeutique prometteur. Une étude clinique chez des patients ayant un mélanome de stade IV a montré que l'administration de l'anticorps antagoniste en association avec une immunothérapie active entraînait une régression tumorale bien que pouvant également engendrer l'apparition de maladies autoimmunes (Phan et al., 2003). De plus, une augmentation importante de la survie a été observée chez les patients traités ce qui a suggéré un bénéfice clinique à long terme. Alors qu'il avait été supposé que l'anticorps anti-CTLA-4 permettrait une diminution de l'immunosuppression en induisant l'élimination des Treg, il a été montré *in vitro* qu'en réalité l'anticorps anti-CTLA-4 augmentait le nombre de Treg ainsi que celui des LT effecteurs et ne réduisait pas la capacité suppressive des Treg (Kavanagh et al., 2008). L'efficacité du traitement serait due à l'effet de l'anticorps sur les LT effecteurs qui en bloquant la co-stimulation inhibitrice induite par CTLA-4 favoriseraient leur activation. D'autres molécules exprimées par les Treg ont également été décrites comme étant des cibles thérapeutiques potentielles telles que GITR et OX40, deux membres de la famille des récepteurs de TNF (Ko et al., 2005; Piconese et al., 2008).

Une autre approche pour diminuer l'efficacité immunosuppressive des Treg serait de cibler certains TLR. En effet, il a été mis en évidence que l'activation de certains TLR exprimés par les Treg pouvait influencer sur l'aptitude des Treg à proliférer ainsi que sur leurs capacités suppressives. La voie de signalisation induite suite à l'activation du TLR5 améliore l'efficacité suppressive des Treg humains alors qu'à l'inverse, la signalisation à travers le TLR2 entraîne une diminution transitoire de leurs capacités suppressives *in vitro* ainsi qu'une expansion des LT CD4<sup>+</sup> (Crellin et al., 2005; Liu et al., 2006a). Il a été décrit que chez des modèles murins de cancers, l'administration du ligand des TLR1/2 entraînait une régression tumorale et une diminution de l'activité suppressive des Treg ainsi qu'une augmentation de l'activité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> (Zhang et al., 2011). Il a également été décrit que l'activation de TLR8 inhibait la fonction suppressive des Treg et améliorait l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale *in vivo* (Peng et al., 2005).

Des études ont montré que certaines molécules anti-angiogéniques utilisées dans le traitement de tumeurs solides pouvaient aussi diminuer l'activité immunosuppressive. Il a notamment été décrit que le sunitinib, un inhibiteur de différents récepteurs à activité tyrosine kinase, dont VEGFR, induisait une diminution du nombre de Treg chez des patients atteints de cancer rénal métastatique (Adotevi et al., 2010; Finke et al., 2008). Il a aussi été mis en évidence que le bevacizumab, un autre inhibiteur de VEGFR, inhibait la prolifération des Treg et entraînait ainsi une diminution des proportions de Treg circulants chez des patients ayant un cancer colorectal métastatique (Terme et al., 2013). Par conséquent, l'utilisation de certaines molécules anti-angiogéniques pourrait s'avérer efficace pour contrer l'immunosuppression mise en place par la tumeur dans le CEO.

Des stratégies ayant pour but d'empêcher la migration des Treg au niveau du site tumoral sont également étudiées. Ces dernières ciblent soit des chimiokines ayant été décrites comme impliquées dans le recrutement des Treg au niveau de la tumeur (telle que CCL22), soit leurs récepteurs (anticorps antagoniste anti-CCR4), afin d'inhiber l'interaction chimiokine/récepteur (Pere et al., 2011; Sugiyama et al., 2013). Enfin d'autres stratégies visant à bloquer la conversion des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels en iTreg (en inhibant le TGF- $\beta$ ) ou encore à contrer l'expansion intra-tumorale des Treg (en agissant indirectement via les cellules dendritiques) sont également à l'étude.

#### *d. La réponse immunitaire anti-tumorale dans le CEO*

Bien que le cancer de l'ovaire ait été dans un premier temps décrit comme non immunogène, il a été démontré par la suite qu'une réponse immunitaire anti-tumorale pouvait se développer spontanément chez certaines patientes atteintes de CEO. L'étude de Zhang et al., a été la première à mettre en évidence que la présence d'un infiltrat de lymphocytes T au niveau de la tumeur corrélait avec une augmentation de la survie sans récurrence et de la survie globale chez des patientes ayant un CEO de stade avancé (Zhang et al., 2003b). Lors de cette même étude, la présence d'un infiltrat de lymphocytes T a également été associée avec une augmentation de l'expression d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  au site tumoral. D'autres travaux ont ensuite montré que l'expression élevée d'IFN- $\gamma$  au niveau de la tumeur était associée avec un meilleur pronostic dans le CEO (Marth et al., 2004). De même, une survie

plus longue a été observée chez les patientes ayant des fréquences plus élevées de LT CD8<sup>+</sup> parmi les lymphocytes T infiltrant la tumeur par rapport à celles ayant des fréquences plus faibles (Sato et al., 2005). Ces résultats ont montré que la présence d'une réponse immunitaire anti-tumorale spontanée de type I était associée avec un meilleur pronostic, suggérant que la mise au point d'une stratégie d'immunothérapie visant à induire ou stimuler cette réponse immunitaire pourrait améliorer l'efficacité des traitements.

Cependant, des mécanismes immunosuppresseifs ont également été décrits dans le CEO. Une accumulation de Treg au niveau de la tumeur ainsi que dans l'ascite a été observée chez les patientes atteintes d'un CEO et a été décrite comme ayant un rôle important dans l'immunosuppression de la réponse immunitaire. En effet Curiel et al., ont mis en évidence que le nombre élevé de Treg au niveau du site tumoral corrélait avec une survie plus faible et serait donc un facteur de mauvais pronostic (Curiel et al., 2004). De plus, ils ont observé une augmentation du nombre de Treg dans les TIL au cours de la progression tumorale et ont suggéré que cette accumulation des Treg se ferait suite à leur migration via un gradient de la chimiokine CCL22 qui attirerait les Treg CCR4<sup>+</sup> (Curiel et al., 2004). En accord avec ces résultats, une étude de Wolf et al., a décrit que la forte expression de FOXP3 était associée avec un mauvais pronostic dans le CEO (Wolf et al., 2005). En revanche, des travaux réalisés par la suite ne sont pas parvenus à mettre en évidence un lien direct entre le nombre de Treg et la survie des patientes (Preston et al., 2013; Sato et al., 2005). Cependant ils ont observé que les patientes qui présentaient un fort ratio CD8/Treg avaient une meilleure survie que celles avec un ratio plus faible (Preston et al., 2013; Sato et al., 2005). Ces résultats ont suggéré que la présence de Treg au niveau de la tumeur inhibait l'effet bénéfique des LT CD8<sup>+</sup> dans le CEO.

Les Treg présents dans les TIL apparaissent comme étant capables d'inhiber significativement la réponse immunitaire anti-tumorale et favoriseraient ainsi la progression tumorale. La mise au point d'une stratégie thérapeutique capable d'empêcher l'effet des Treg présents dans les TIL pourrait fortement améliorer l'efficacité des traitements visant à stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale, chez les patientes atteintes d'un CEO. Par conséquent, une meilleure caractérisation des Treg aussi bien chez des patientes avec un CEO que chez des donneurs sains est nécessaire. En effet, définir la stabilité ou la plasticité, le phénotype, l'origine et le

mode d'action des Treg présents dans les TIL permettrait de déterminer s'il est préférable d'éliminer ces Treg ou bien d'empêcher leur migration au niveau de la tumeur ou encore d'induire leur conversion en LT effecteurs. Cela pourrait également aider à identifier des cibles moléculaires potentielles qui seraient exprimées par les Treg de façon spécifique.

## **5- Objectif de la thèse**

Deux points importants ressortent des récents travaux portant sur les Treg. Premièrement, le compartiment des Treg s'avère être un ensemble hétérogène complexe composé de sous-populations d'origines variées présentant des propriétés phénotypiques et fonctionnelles spécifiques et dont, apparemment, au moins une partie présenterait une potentielle instabilité dans certaines conditions. De très nombreuses questions sont actuellement sans réponse et nécessitent d'être adressées afin de déterminer comment ces différentes sous-populations de Treg s'organisent pour permettre une régulation optimale de la réponse immunitaire en conditions physiologiques et inflammatoires. Il est notamment essentiel de poursuivre les études visant à comprendre la stabilité ou l'instabilité des Treg. De même, de par l'absence de marqueurs permettant de distinguer les nTreg des iTreg, l'implication relative de ces deux sous-populations en conditions physiologiques et pathologiques reste à être découverte. Etant donné le vif intérêt porté sur les Treg en tant que potentiels outils thérapeutiques dans le but de soigner certains désordres auto-immuns ou encore de lutter contre le rejet de greffe, apporter des réponses à ces questions est d'un enjeu majeur.

Deuxièmement, il a clairement été démontré que les Treg contribuaient activement à l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale dans de nombreux types de cancers, tel que dans le CEO. Une meilleure caractérisation des Treg présents au niveau du site tumorale pourrait par conséquent aider au développement de stratégies visant à inhiber leur effet délétère. Il serait nécessaire de comprendre par quels mécanismes se produit l'accumulation des Treg présents dans les TIL. Il serait également important de déterminer si ces Treg présentent des propriétés phénotypiques et fonctionnelles spécifiques, ainsi que de définir leur origine, thymique et/ou périphérique, et leur spécificité antigénique.

Dans le but de mieux comprendre la biologie des Treg, l'objectif de ma thèse a été d'étudier l'origine, l'hétérogénéité, la fonction et la plasticité des Treg humains à la fois en conditions physiologiques, chez des donneurs sains, ainsi que dans un contexte pathologique, chez des patientes atteintes d'un CEO.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'étude de la relation entre les Treg et les T<sub>H</sub>17. Lors de nos précédents travaux, mon laboratoire d'accueil et moi-même, avons montré une prédisposition des NTreg à se différencier en T<sub>H</sub>17 *in vitro*, par rapport aux LT CD4<sup>+</sup> naïfs conventionnels, après stimulation en présence de cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>17 dont l'IL-1 $\beta$  (Valmori et al., 2010). Nous avons également observé une induction préférentielle de l'expression de l'IL-1RI à la surface des NTreg après stimulation ce qui pourrait expliquer la prédisposition des NTreg à se différencier en T<sub>H</sub>17 (Valmori et al., 2010). Nos résultats ont ainsi suggéré un rôle important de l'IL-1RI dans la voie de différenciation des T<sub>H</sub>17. Dans la continuité de ces travaux nous avons entrepris l'étude des populations de LT CD4<sup>+</sup> circulants humains exprimant l'IL-1RI *ex vivo* à partir de donneurs sains.

Nous avons poursuivi en nous intéressant à l'origine des Treg présents dans la périphérie, à travers l'étude de l'expression du facteur de transcription Helios, un membre de la famille Ikaros, dont l'utilisation comme marqueur spécifique des Treg d'origine thymique a fait l'objet de controverses. Dans le but de mieux comprendre le lien entre l'expression d'Helios et l'origine des Treg, nous avons réalisé une analyse phénotypique et fonctionnelle approfondie des Treg mémoires FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> issus du sang périphérique de donneurs sains *ex vivo*. Nous avons également en parallèle étudié l'expression d'Helios au sein du compartiment des LT CD4<sup>+</sup> naïfs issus du sang périphérique de donneurs sains et du sang de cordon ombilical.

Enfin, dans le but de déterminer les caractéristiques et l'origine des Treg enrichis au niveau du site tumoral dans le CEO et également afin de comprendre le ou les mécanisme(s) impliqué(s) dans leur accumulation, j'ai réalisé, en collaboration avec le chercheur post-doctorant Dr Nassima Redjimi, une étude phénotypique et fonctionnelle des Treg issus du sang périphérique, de l'ascite et de l'infiltrat lymphocytaire tumoral de patientes atteintes d'un CEO.

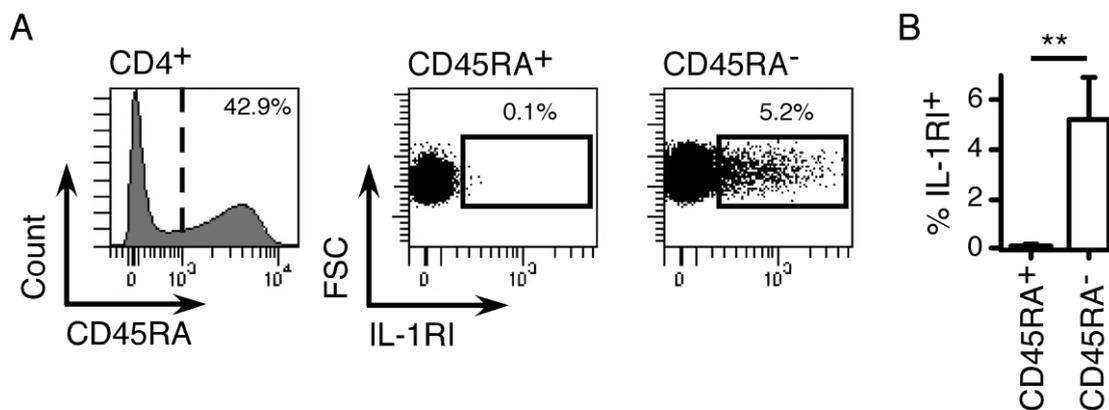
# Résultats

## **PARTIE 1 : Etude des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants humains exprimant l'IL-1RI *ex vivo***

Durant la première partie de ma thèse, je me suis intéressée à la relation entre les Treg et les T<sub>H</sub>17 chez l'homme. Précédemment, lors de l'étude de la différenciation des T<sub>H</sub>17 à partir des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs et des NTreg, nous avons mis en évidence une prédisposition des NTreg à se différencier en T<sub>H</sub>17 suite à leur stimulation *in vitro* en présence de cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>17, dont notamment l'IL-1 $\beta$  (Valmori et al., 2010). Nos résultats avaient montré, qu'après stimulation, une induction de l'expression de l'IL-1RI était observée chez les NTreg mais pas chez les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs, suggérant un rôle important de l'IL-1RI dans la voie de différenciation des T<sub>H</sub>17. Dans la continuité de ces travaux, nous avons par conséquent cherché à mieux comprendre l'implication de l'IL-1RI dans la voie de différenciation des T<sub>H</sub>17 en réalisant l'étude des populations de LT CD4<sup>+</sup> circulants humains exprimant l'IL-1RI *ex vivo*.

## 1- Etude de l'expression de l'IL-1RI par les LT CD4<sup>+</sup> circulants humains *ex vivo*

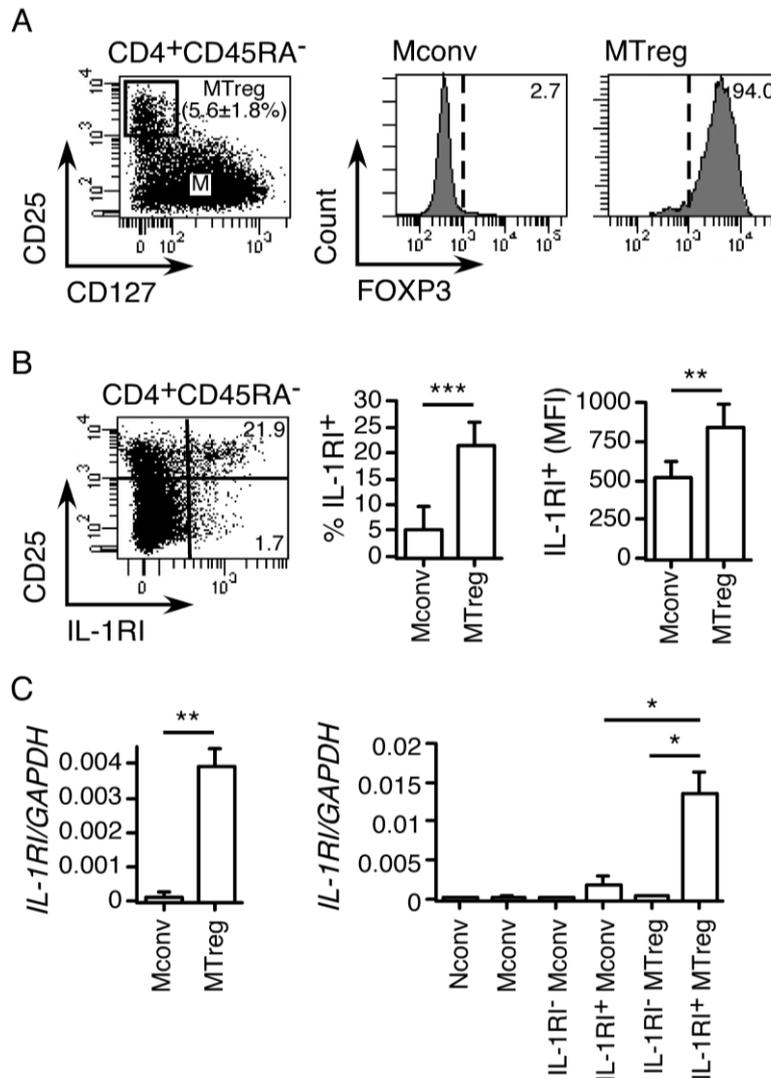
Nous avons commencé par rechercher la présence de cellules qui exprimaient le récepteur IL-1RI parmi les LT CD4<sup>+</sup> humains circulants totaux *ex vivo* en distinguant les cellules naïves, caractérisées par l'expression de CD45RA, des cellules mémoires (CD45RA<sup>-</sup>). Dans ce but, nous avons marqué *ex vivo* des LT CD4<sup>+</sup> totaux issus du sang périphérique de donneurs sains avec des anticorps spécifiques dirigés contre l'IL-1RI et CD45RA puis nous les avons analysés par la technique de cytométrie de flux. Nos résultats ont révélé l'absence d'expression de l'IL-1RI dans le compartiment naïf, en revanche, environ 5% des cellules mémoires étaient IL-1RI<sup>+</sup> (Figure 12A-B).



**Figure 12. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains circulants exprimant l'IL-1RI *ex vivo* sont présents dans le compartiment mémoire.** A, Des LT CD4<sup>+</sup> purifiés ont été marqués avec des anticorps anti-CD45RA et anti-IL-1RI puis l'expression de l'IL-1RI a été mesurée dans les populations CD45RA<sup>+</sup> et CD45RA<sup>-</sup> par cytométrie de flux. B, Résumé des résultats obtenus pour tous les donneurs (moyenne  $\pm$  SD, n = 6). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le Student's t test bilatéral. \*\*, P < 0,01.

Puis, afin de caractériser plus finement cette population mémoire exprimant l'IL-1RI, nous avons co-marqué des LT CD4<sup>+</sup>, comme décrit précédemment, en association avec des anticorps dirigés contre CD25 et CD127. Cela nous a permis de distinguer phénotypiquement les LT CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> conventionnels mémoires (Mconv ; CD25<sup>-</sup>) des Treg mémoires FOXP3<sup>+</sup> (MTreg ; CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) (Figure 13A). Nous avons observé qu'en moyenne seulement 5% des cellules exprimaient l'IL-1RI parmi les Mconv contre plus de 20% parmi les MTreg mettant en évidence un enrichissement important des cellules IL-1RI<sup>+</sup> parmi les MTreg (Figure 13B). De plus, la moyenne d'intensité de fluorescence du marquage de l'IL-1RI était plus élevée

dans les MTreg IL-1RI<sup>+</sup> par rapport aux Mconv IL-1RI<sup>+</sup> ce qui a suggéré un niveau d'expression plus fort à la surface des MTreg (Figure 13B).

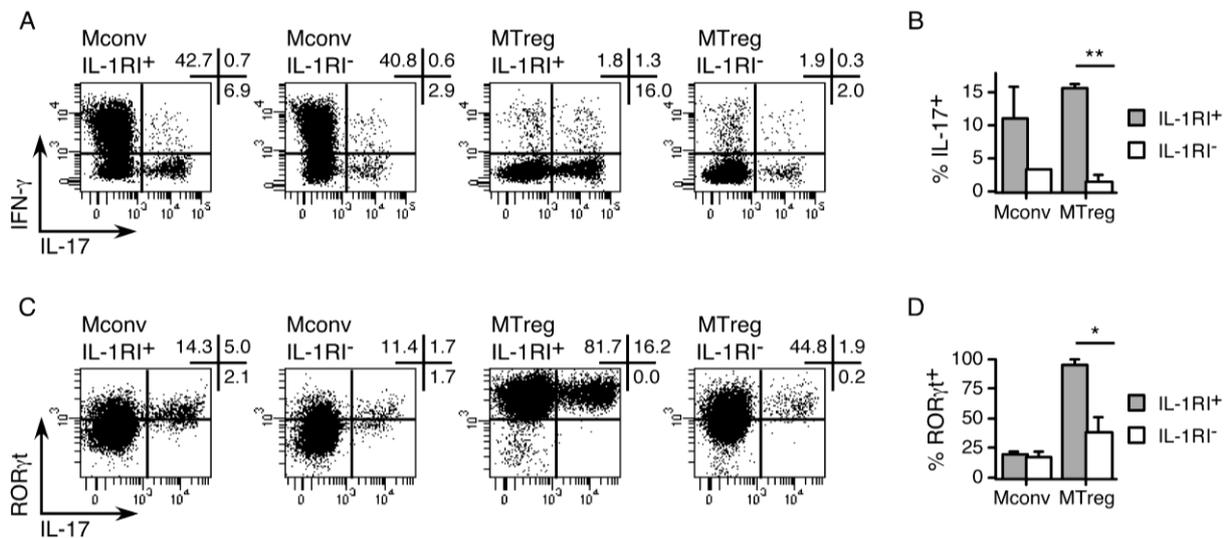


**Figure 13. L'expression de l'IL-1RI est enrichie dans les MTreg CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> FOXP3<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> circulants humains.** **A**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CD25, CD127 et FOXP3. L'expression de FOXP3 dans les populations mémoires conventionnelles CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (Mconv) et régulatrices CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (MTreg) est présentée. **B**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CD25, CD127 et IL-1RI. Les nombres dans le cytogramme correspondent aux pourcentages de cellules IL-1RI<sup>+</sup> dans les populations CD25<sup>+</sup> et CD25<sup>-</sup>. Le résumé des résultats de tous les donneurs est représenté (n = 6). MFI = Moyenne d'intensité de fluorescence. **C**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été séparés en différentes populations par cytométrie de flux puis l'expression du gène de l'IL-1RI a été mesurée par PCR quantitative. \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001.

Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons ensuite séparé par cytométrie de flux les sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires conventionnels et régulateurs en fonction de l'expression ou non de l'IL-1RI, puis nous avons mesuré l'expression de l'IL-1RI par la technique de PCR en temps réel. En accord avec les résultats obtenus lors du marquage de surface, une expression de l'IL-1RI considérablement plus forte a été observée dans les MTreg par rapport à celle obtenue dans les Mconv (Figure 13C). De plus, l'expression de l'IL-1RI s'est révélée limitée à la fraction IL-1RI<sup>+</sup> des MTreg après séparation par cytométrie de flux, ce qui a validé notre stratégie de tri. Dans l'ensemble, ces résultats ont mis en évidence que l'expression de l'IL-1RI était restreinte au compartiment des cellules mémoires et que les cellules IL-1RI<sup>+</sup> étaient fortement enrichies au sein des MTreg (Figure 13C).

## **2- Etude de la production d'IL-17 et de l'expression de ROR $\gamma$ t dans la sous-population des MTreg IL-1RI<sup>+</sup>**

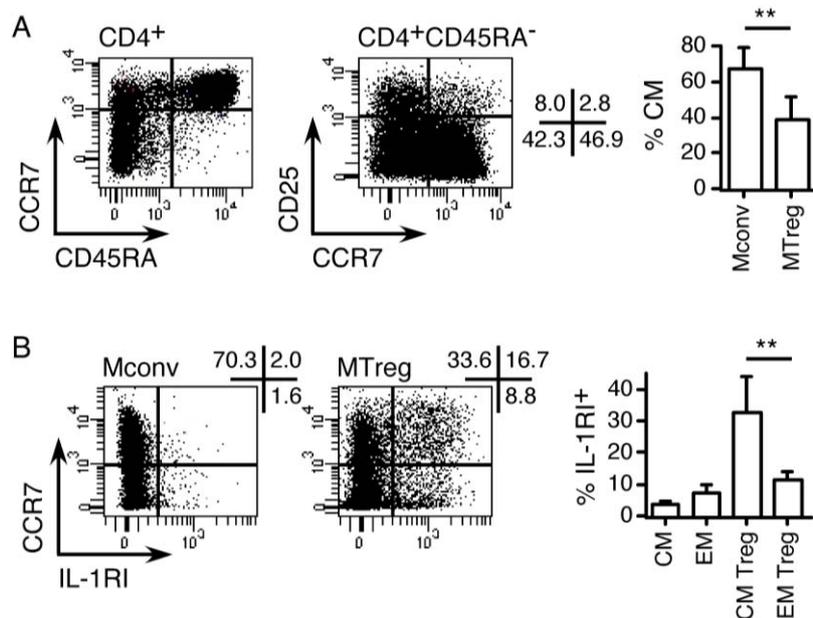
Nous avons ensuite recherché si l'expression *ex vivo* de l'IL-1RI à la surface des Mconv et des MTreg était associée à la production d'IL-17 ainsi qu'à l'expression du facteur de transcription spécifique des T<sub>H</sub>17, ROR $\gamma$ t. Dans ce but, nous avons séparé les populations IL-1RI<sup>+</sup> et IL-1RI<sup>-</sup> présentes dans les Mconv ou dans les MTreg par la technique de tri par cytométrie de flux. Les cellules triées ont ensuite été stimulées avec du PMA et de l'ionomycine puis une analyse de la production cytokinique et de l'expression de ROR $\gamma$ t a été réalisée par marquage intracellulaire et intranucléaire. Les résultats obtenus ont révélé un fort enrichissement des cellules produisant de l'IL-17 dans la fraction IL-1RI<sup>+</sup> parmi les Mconv et de façon encore plus importante parmi les MTreg (Figure 14A-B). L'étude de l'expression de ROR $\gamma$ t a mis en évidence que les cellules IL-17<sup>+</sup> étaient très majoritairement ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, avec un fort pourcentage de cellules exprimant ROR $\gamma$ t dans les MTreg que dans les Mconv (Figure 14C-D). De plus, parmi les MTreg IL-1RI<sup>+</sup> la quasi-totalité des cellules exprimaient ROR $\gamma$ t. Ces données ont suggéré un lien entre l'expression de l'IL-1RI, à la surface des MTreg et des Mconv, et leur aptitude à produire de l'IL-17 ainsi qu'à exprimer ROR $\gamma$ t.



**Figure 14.** L'expression *ex vivo* de l'IL-1RI, par les Treg, corrèle avec la production d'IL-17 et l'expression de RORγt. Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps anti-CD45RA, -CD25, -CD127 et anti-IL-1RI, puis les populations indiquées ont été séparées par cytométrie de flux. Les populations triées ont été stimulées avec du PMA/ionomycine durant 6 heures (les 5 dernières heures en présence de BFA) puis la production d'IFN-γ et d'IL-17, ainsi que l'expression de RORγt ont été analysées par cytométrie de flux. La production d'IL-17 est présentée par rapport à la production d'IFN-γ (A et B) et à l'expression de RORγt (C et D) (n = 4). \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01.

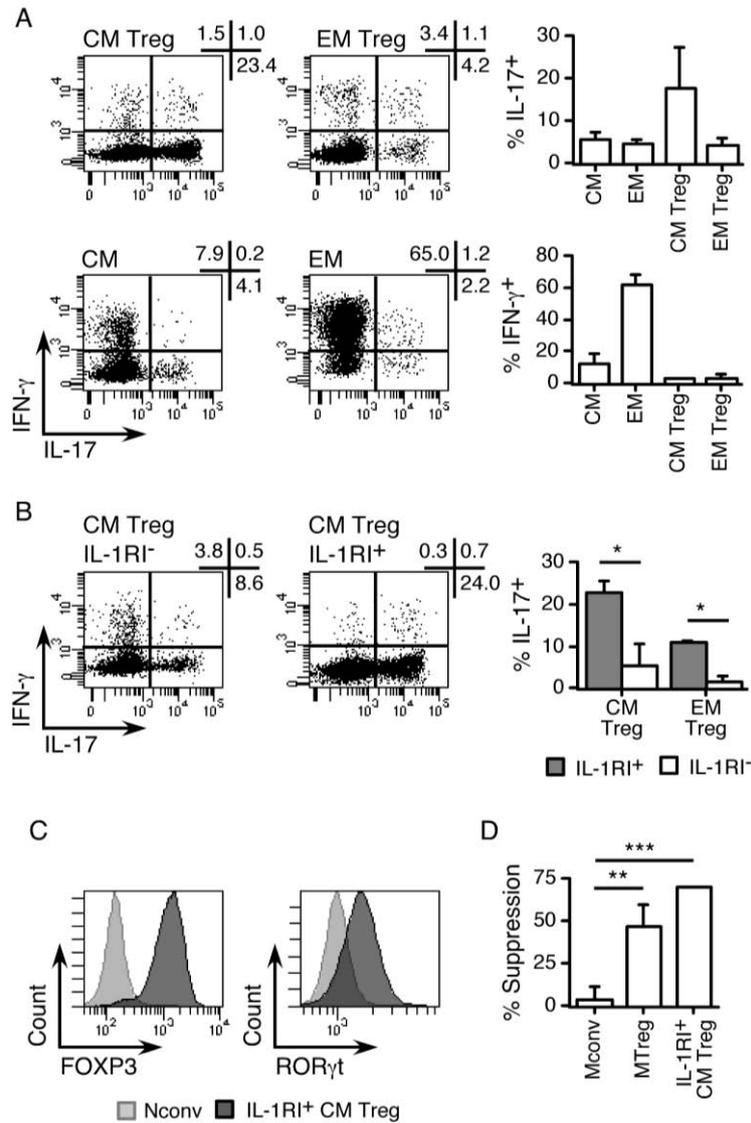
### 3- Analyse du stade de différenciation des MTreg IL-1RI<sup>+</sup> produisant de l'IL-17

Afin d'approfondir la caractérisation des MTreg IL-1RI<sup>+</sup>, nous avons étudié leur stade de différenciation. L'expression du récepteur de chimiokine CCR7 permet de séparer la population des Mconv en deux fractions, l'une, nommée mémoire centrale (CM), exprime CCR7 et est définie comme étant à un stade de différenciation moins avancé que la seconde sous-population qui est CCR7<sup>-</sup> et correspond aux mémoires effecteurs (EM) (Sallusto et al., 1999). Il a été décrit que les MTreg pouvaient également être divisés en cellules CM et EM en fonction de l'expression ou non de CCR7 (Tosello et al., 2008). Nous avons ainsi étudié l'expression de l'IL-1RI en fonction de celle de CCR7 chez les Mconv et les MTreg. Nos résultats ont révélé que, bien que les MTreg totaux contenaient une proportion plus faible de cellules CM par rapport aux Mconv, un fort enrichissement des MTreg IL-1RI<sup>+</sup> a été observé dans le compartiment des MTreg CCR7<sup>+</sup> (CM Treg) (Figure 15A-B).



**Figure 15. Les LT CD4<sup>+</sup> exprimant l'IL-1RI, *ex vivo*, sont fortement enrichis parmi les Treg CCR7<sup>+</sup>.** **A**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps anti-CD45RA, -CD25, -CD127 et anti-CCR7. Les pourcentages de cellules mémoires centrales CCR7<sup>+</sup> (CM), parmi les populations Mconv et MTreg, sont indiqués. **B**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps anti-CD45RA, -CD25, -CD127, -CCR7 et anti-IL-1RI. Les proportions de cellules IL-1RI<sup>+</sup> dans les populations CM et mémoires effectrices CCR7<sup>-</sup> (EM) parmi les Mconv et les MTreg sont représentées (n = 6). \*\*, P < 0,01.

Nous avons poursuivi la caractérisation des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> par l'étude de la production cytokinique. Les populations CM et EM, conventionnelles et régulatrices, ont été séparées *ex vivo* par cytométrie de flux, puis marquées avec des anticorps dirigés contre l'IL-17 et l'IFN- $\gamma$ . Tout comme l'expression de l'IL-1RI, la production d'IL-17 s'est révélée être enrichie dans la fraction mémoire centrale des MTreg (Figure 16A). En revanche, seule une faible production d'IFN- $\gamma$  a été observée dans les MTreg à la fois CM et EM. Afin d'étudier l'expression de l'IL-1RI par rapport à la production d'IL-17 dans les CM Treg, les populations CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et IL-1RI<sup>-</sup> ont été séparées par cytométrie de flux puis marquées avec un anticorps dirigé contre l'IL-17. Nos résultats ont montré que les CM Treg produisant de l'IL-17 étaient enrichis dans la fraction IL-1RI<sup>+</sup> (Figure 16B). Nous avons également étudié, par marquage intranucléaire, l'expression *ex vivo* de FOXP3 et ROR $\gamma$ t dans les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> isolés et avons observé que la majorité co-exprimait FOXP3 et ROR $\gamma$ t (Figure 16C).



**Figure 16. Les cellules IL-1RI<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 sont fortement enrichies parmi les CM Treg.** **A**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps anti-CD45RA, -CD25, -CD127 et anti-CCR7 puis les cellules CM ou EM, conventionnelles (CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) ou régulatrices (CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) ont été triées par cytométrie de flux. Les populations séparées ont été stimulées avec du PMA/ionomycine et la production d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  a été analysée (n = 3). **B**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CD25, CD127, CCR7 et IL-1RI puis les CM Treg et EM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et IL-1RI<sup>-</sup> ont été séparées et analysées pour la production d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  (n = 4). **C**, Des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et des LT CD4<sup>+</sup> naïfs conventionnels (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>; Nconv) ont été marqués avec un anticorps dirigé contre FOXP3 ou ROR $\gamma$ t et analysés par cytométrie de flux (n = 4). **D**, L'activité suppressive des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> triés et des contrôles (Mconv et MTreg) a été évaluée. Des cellules répondeuses marquées avec du CFSE ont été stimulées avec de la PHA en présence de monocytes irradiés, seules ou avec l'une des populations testées. La pousse des répondeuses a été mesurée par l'analyse de la dilution du CFSE par cytométrie de flux après 3 à 4 jours de culture. Les pourcentages de suppression obtenus sont présentés (n = 4). \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001.

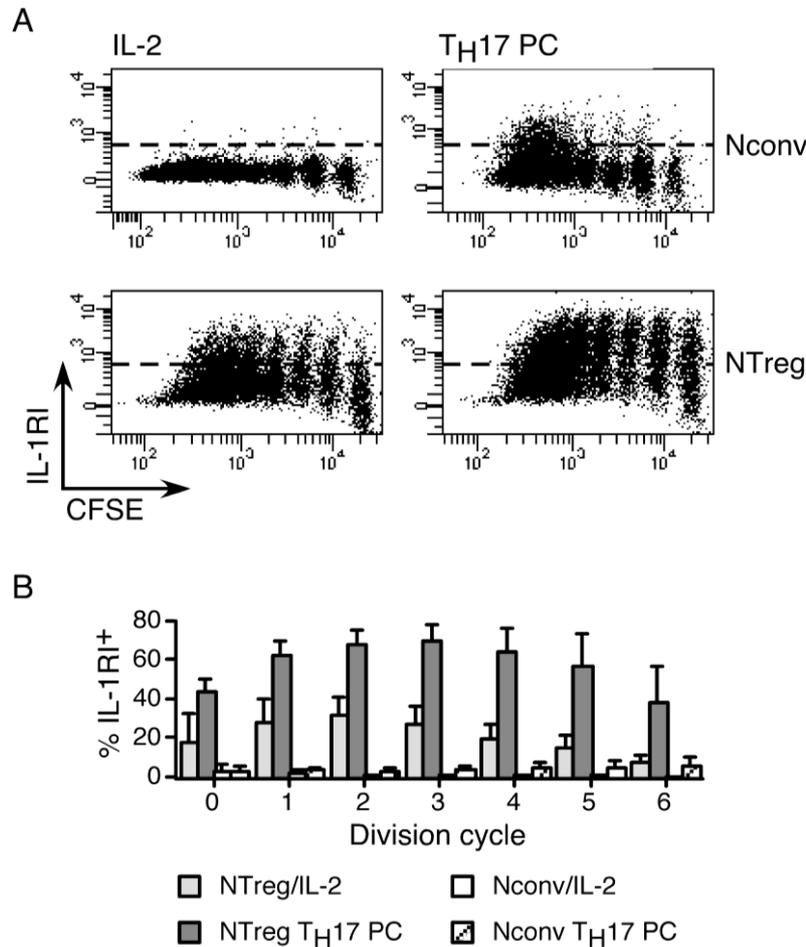
Nous avons également évalué la capacité des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> isolés *ex vivo* à supprimer la prolifération cellulaire de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels marqués avec du CFSE et mis en co-culture en présence de PHA et de cellules présentatrices d'antigène. La mesure de la dilution du CFSE par cytométrie de flux après 3 à 4 jours de culture a montré que bien que produisant de l'IL-17 et exprimant ROR $\gamma$ t, les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> étaient fortement suppressifs *ex vivo* (Figure 16D).

Dans leur ensemble, ces résultats ont mis en évidence que les MTreg IL-1RI<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 présents dans les LT CD4<sup>+</sup> circulants humains étaient fortement enrichis dans le compartiment des cellules CM, co-exprimaient les facteurs de transcription FOXP3 et ROR $\gamma$ t et étaient suppressifs *ex vivo*.

#### **4- Etude cinétique de l'induction de l'expression de l'IL-1RI dans les NTreg après stimulation en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17**

Lors de nos précédents travaux, portant sur l'étude de la différenciation *in vitro* des T<sub>H</sub>17 à partir des NTreg et des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs, nous avons observé une induction de l'expression de l'IL-1RI à la surface des NTreg après stimulation en condition pro-T<sub>H</sub>17 pouvant, au moins en partie, expliquer la prédisposition des NTreg à se différencier en T<sub>H</sub>17 par rapport aux LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs et soulignant l'importance de l'IL-1 $\beta$  dans la polarisation en T<sub>H</sub>17 (Valmori et al., 2010). Le fait que la population MTreg IL-1RI<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 se soit montrée enrichie dans la fraction des cellules mémoires centrales nous a ainsi conduit à supposer qu'elle pourrait correspondre à un intermédiaire précoce dans la voie de différenciation allant des NTreg aux T<sub>H</sub>17.

Par conséquent, nous avons cherché à déterminer si l'induction de l'IL-1RI correspondait à un événement précoce ou tardif lors de la polarisation des NTreg en T<sub>H</sub>17, en réalisant une analyse cinétique de l'expression de l'IL-1RI sur des NTreg stimulés en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17. Nous avons tout d'abord séparé à partir de LT CD4<sup>+</sup> circulants, par la technique de tri par cytométrie de flux, des NTreg. Ces cellules ont ensuite été marquées avec du CFSE et stimulées en présence d'IL-2 seule ou en combinaison avec des cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>17 (IL-1 $\beta$ , IL-23 et TGF- $\beta$ ).



**Figure 17. Une induction précoce de l'expression de l'IL-1RI dans les cultures de NTreg polarisées en condition pro-TH17.** Des LT CD4<sup>+</sup> naïfs conventionnels (Nconv ; CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) et des NTreg (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>), triés *ex vivo*, ont été marqués avec du CFSE puis stimulés avec des microbilles anti-CD2/CD3/CD28 en présence d'IL-2 seule ou associée avec les cytokines polarisantes pro-TH17 (TH17 PC : IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  et IL-23). Après 6 jours de culture, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-IL-1RI, puis analysées par cytométrie de flux. **A** et **B**, Des exemples de cytogrammes pour un donneur (A) et un histogramme récapitulant le pourcentage de cellules IL-1RI<sup>+</sup> obtenu dans chaque cycle de division, déterminé par la dilution de CFSE, pour tous les donneurs (n = 5) (B) sont présentés.

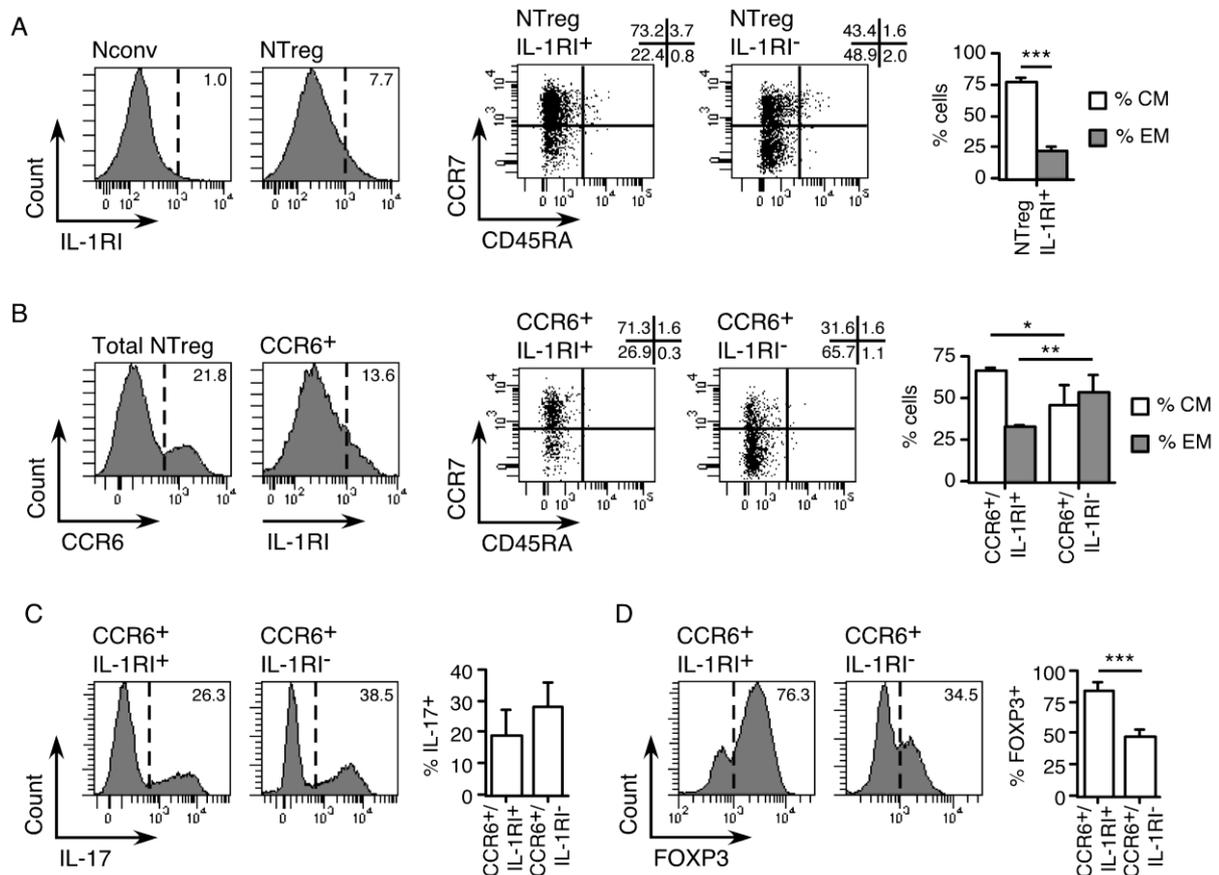
Après 6 jours, l'analyse de l'expression de l'IL-1RI dans les cultures a mis en évidence que l'expression du récepteur était induite rapidement dans une fraction des NTreg stimulées, avant même le premier cycle de division cellulaire (Figure 17A-B). Cette induction précoce de l'expression de l'IL-1RI a été observée à la fois dans les cultures stimulées en absence et en présence des cytokines polarisantes pro-TH17, avec cependant une plus forte induction en condition polarisante. Ces résultats ont révélé que l'induction de l'expression de l'IL-1RI était un événement précoce lors de la différenciation des NTreg en TH17. De plus, le pourcentage de cellules IL-1RI<sup>+</sup>

a continué à augmenter dans les cultures de NTreg au cours de la division cellulaire et s'est maintenu durant plusieurs cycles de division pour finalement diminuer progressivement. Il est à noter que cette expérience a également été réalisée à partir de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs, cependant, aucune induction significative de l'expression de l'IL-1RI n'a été observée dans ces cultures après stimulation en l'absence de cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>17 et seule une faible induction a été détectée en leur présence (Figure 17).

## **5- Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules IL-1RI<sup>+</sup> obtenues à partir des NTreg après stimulation en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17**

Nous avons ensuite cherché à mieux comprendre la relation entre l'expression de l'IL-1RI et le stade de différenciation dans les cultures de NTreg stimulées en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17. Dans cette optique, nous avons étudié l'expression de l'IL-1RI par rapport à celles de CD45RA, CCR7 et de CCR6, un récepteur de chimiokine exprimé par les cellules T<sub>H</sub>17, dans les populations de NTreg ayant été stimulées *in vitro* en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17 puis mises en culture durant 12 jours. En accord avec l'induction précoce de l'expression de l'IL-1RI à la surface de NTreg après stimulation, nous avons observé un enrichissement des cellules IL-1RI<sup>+</sup> dans la fraction mémoire centrale (CCR7<sup>+</sup>) des cellules en culture (Figure 18A). De plus, dans la fraction CCR6<sup>+</sup>, la majorité des cellules exprimant l'IL-1RI étaient CCR7<sup>+</sup> alors que la plupart des cellules IL-1RI<sup>-</sup> étaient CCR7<sup>-</sup> (Figure 18B). Nous avons également analysé l'expression de FOXP3 et la production d'IL-17 des cellules CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup> et CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup> obtenues à partir des NTreg stimulés après 12 jours de culture. Dans ce but, ces cellules ont été séparées par cytométrie de flux en fonction de l'expression de CCR6 et de l'IL-1RI, puis stimulées avec du PMA/ionomycine et marquées avec des anticorps anti-FOXP3 et anti-IL-17. Les données obtenues ont révélé qu'à la fois les cellules CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup> et CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup>, générées à partir des NTreg stimulés, produisaient de l'IL-17 avec une proportion plus importante de cellules IL-17<sup>+</sup> dans la fraction CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup> (Figure 18C). De plus, alors qu'un maintien de l'expression de FOXP3 a été observé dans la majorité des cellules CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup>, des pourcentages plus faibles de cellules exprimant FOXP3 ont été obtenus dans la population CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup> (Figure 18D). Dans leur

ensemble, ces résultats ont montré que les MTreg IL-1RI<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>, obtenus à partir des NTreg après une stimulation en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17, appartenaient au compartiment CM, exprimaient FOXP3 et produisaient de l'IL-17 présentant ainsi des caractéristiques similaires à celles des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> identifiés *ex vivo*.



**Figure 18. L'expression de l'IL-1RI identifie des cellules CM FOXP3<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 dans les cultures de NTreg stimulés en condition pro-T<sub>H</sub>17.** Des Nconv et des NTreg ont été stimulés *in vitro* en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17. **A**, Après 12 jours, les cultures de Nconv et NTreg ont été co-marquées avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7 et IL-1RI, puis analysées par cytométrie de flux. Les histogrammes et les cytogrammes pour un donneur ainsi que les données pour tous les donneurs sont présentés (n = 4). **B**, Les NTreg en culture depuis 12 jours ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CCR6 et IL-1RI puis analysés par cytométrie de flux. Les histogrammes et les cytogrammes pour un donneur ainsi que les résultats de tous les donneurs sont montrés (n = 4). **C** et **D**, Des NTreg en culture depuis 12 jours ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CCR6 et IL-1RI puis les populations CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup> et CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup> ont été triées par cytométrie de flux. Les populations isolées ont été stimulées avec du PMA/ionomycine (avec ajout de BFA après la 1<sup>ère</sup> heure d'incubation) et marquées avec des anticorps anti-IL-17 (C) ou anti-FOXP3 (D). Les histogrammes pour un donneur et le résumé des résultats obtenus pour tous les donneurs sont représentés (n = 4). \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001.

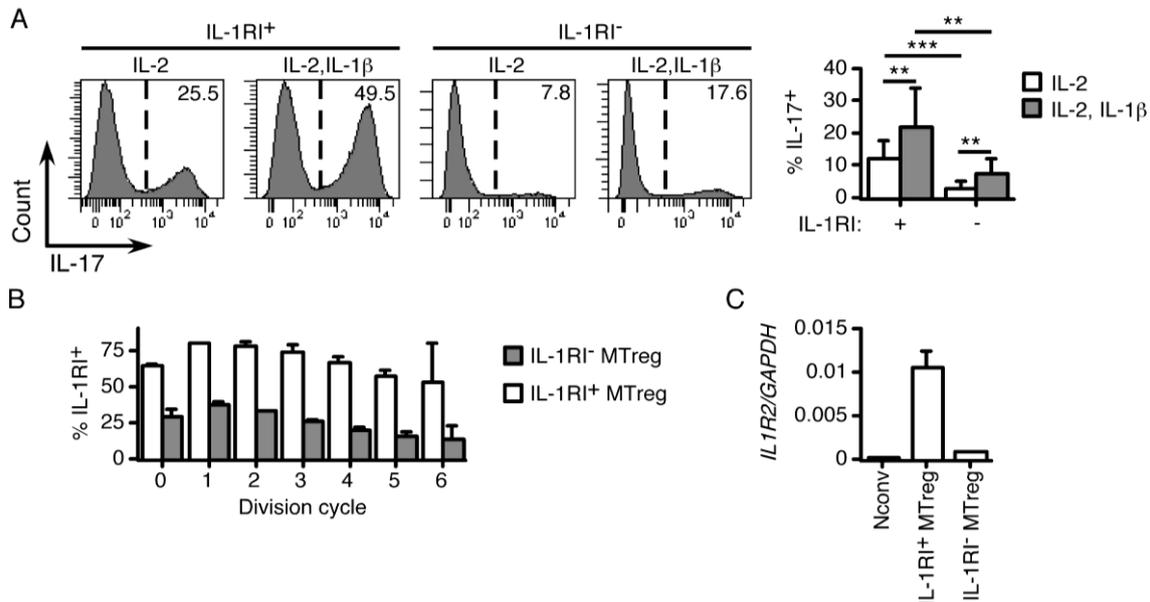
## 6- Etude de la sensibilité des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> à l'IL-1 $\beta$

L'hypothèse selon laquelle la population CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> pourrait correspondre à un intermédiaire précoce dans la voie de différenciation allant des NTreg aux T<sub>H</sub>17, nous a conduit à étudier l'effet de l'IL-1 $\beta$  sur cette population. Nous avons dans un premier temps analysé la relation entre l'expression de l'IL-1RI et la sensibilité des MTreg à l'IL-1 $\beta$ . Les populations MTreg IL-1RI<sup>+</sup> et MTreg IL-1RI<sup>-</sup> ont été séparées par cytométrie de flux puis stimulées *in vitro* en présence d'IL-2 seule ou combinée avec de l'IL-1 $\beta$ . Après 12 jours, la production d'IL-17 dans les cultures a été évaluée. Nous avons observé des pourcentages significativement plus élevés de cellules produisant de l'IL-17 dans les cultures de MTreg IL-1RI<sup>+</sup> par rapport aux cultures de MTreg IL-1RI<sup>-</sup> (Figure 19A). De plus, de plus fortes proportions de cellules IL-17<sup>+</sup> ont été obtenues dans les populations cellulaires ayant été stimulées en présence d'IL-1 $\beta$  par rapport à celles ayant été stimulées en présence d'IL-2 seule, aussi bien dans les cultures de MTreg IL-1RI<sup>+</sup> que dans celles de MTreg IL-1RI<sup>-</sup>. Ainsi, bien que n'exprimant pas l'IL-1RI *ex vivo*, les MTreg IL-1RI<sup>-</sup> étaient également capables de répondre à l'IL-1 $\beta$  en générant des cellules IL-17<sup>+</sup>.

Afin de comprendre l'aptitude des MTreg IL-1RI<sup>-</sup> à répondre à l'IL-1 $\beta$ , nous avons marqué avec du CFSE les populations de MTreg, séparées *ex vivo* sur la base de l'expression de l'IL-1RI, puis nous les avons stimulées en présence d'IL-2. Après 6 jours de culture, les cellules ont été marquées avec un anticorps dirigé contre l'IL-1RI et le pourcentage de cellules exprimant l'IL-1RI a été analysé pour chaque cycle de division cellulaire. Nos résultats ont mis en évidence une induction rapide de l'expression de l'IL-1RI dans les cultures de MTreg IL-1RI<sup>-</sup> qui a persisté après plusieurs cycles de division (Figure 19B).

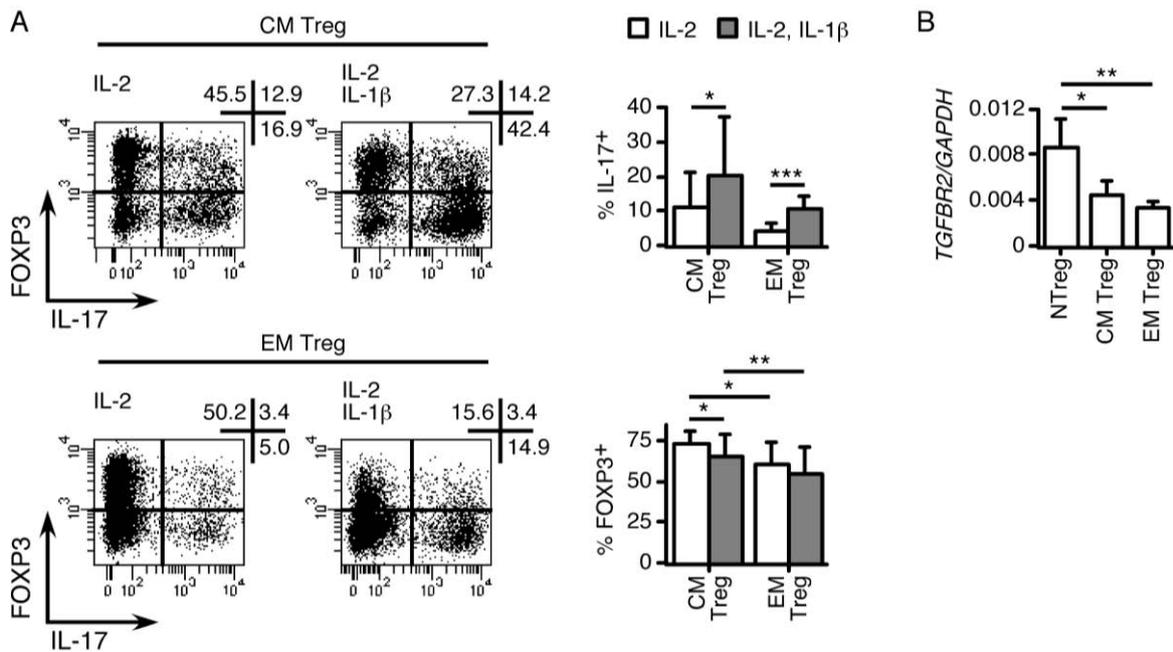
De plus, nous avons constaté que, bien que les MTreg IL-1RI<sup>+</sup> exprimaient tous l'IL-1RI, les pourcentages de cellules IL-17<sup>+</sup> obtenues après 12 jours de culture en présence d'IL-1 $\beta$  n'étaient en moyenne que de 23%. Ces données nous ont suggéré que des mécanismes limitant l'effet de l'IL-1 $\beta$  pourraient être impliqués. Nous avons ainsi étudié l'expression, par PCR quantitative, du récepteur de l'IL-1 de type II (IL-1RII), un récepteur leurre connu pour inhiber l'activité de l'IL-1 $\beta$ . Nos résultats ont montré que, *ex vivo*, l'IL-1RII était fortement exprimé dans les MTreg IL-

1RI<sup>+</sup> et qu'il pourrait par conséquent contrôler la sensibilité des MTreg IL-1RI<sup>+</sup> à l'IL-1 $\beta$  (Figure 19C).



**Figure 19.** Les MTreg IL-1RI<sup>+</sup> génèrent des cellules produisant de l'IL-17 après stimulation en présence d'IL-1 $\beta$ . Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127 et anti-IL-1RI puis les MTreg (CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>), IL-1RI<sup>+</sup> et IL-1RI<sup>-</sup>, ont été séparés. **A**, Les populations triées ont été stimulées *in vitro* en présence d'IL-2 seule ou associée avec de l'IL-1 $\beta$ . Après 12 jours de culture, les cellules ont été stimulées avec du PMA/ionomycine (avec ajout de BFA après la 1<sup>ère</sup> heure d'incubation) et marquées avec un anticorps anti-IL-17. Les histogrammes obtenus pour un donneur et le récapitulatif de tous les donneurs sont présentés (n = 8). **B**, Les populations triées ont été marquées avec du CFSE et stimulées avec des microbilles anti-CD2/CD3/CD28 en présence d'IL-2. Après 6 jours, les cultures ont été marquées avec un anticorps anti-IL-1RI et analysées par cytométrie de flux. Les pourcentages de cellules IL-1RI<sup>+</sup> dans chacun des cycles de division, déterminés par la dilution du CFSE, sont montrés (n = 2). **C**, L'expression d'ARNm de l'IL-1RII (*IL1R2*) dans les populations triées ainsi que dans les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs (Nconv) a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (n = 2). \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001.

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'état de différenciation (CM ou EM) des MTreg sur leur aptitude à générer des cellules produisant de l'IL-17. Des CM Treg et EM Treg ont été isolés *ex vivo* puis stimulés *in vitro* en présence d'IL-2 seule ou combinée avec de l'IL-1 $\beta$ . Des proportions plus élevées de cellules IL-17<sup>+</sup> suite à la stimulation en présence d'IL-1 $\beta$  ont été obtenues aussi bien dans les CM que dans les EM Treg (Figure 20A). De plus, des pourcentages plus élevés de cellules produisant de l'IL-17 ont été observés parmi les CM Treg par rapport aux EM Treg dans les deux conditions cytokiniques testées (Figure 20A).



**Figure 20.** Les CM Treg stimulés en présence d'IL-1β génèrent des cellules effectrices produisant de l'IL-17 tout en maintenant une population de cellules FOXP3<sup>+</sup>. Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec des anticorps anti-CD45RA, -CCR7, -CD25 et anti-CD127 puis les CM Treg et les EM Treg ont été séparés. **A**, Les populations triées ont été stimulées *in vitro* en présence d'IL-2 seule ou associée avec de l'IL-1β. Après 12 jours de culture, les cellules ont été stimulées avec du PMA/ionomycine (avec ajout de BFA après la 1<sup>ère</sup> heure d'incubation) puis un marquage intracellulaire avec des anticorps anti-IL-17 et anti-FOXP3 a été réalisé. Les cytogrammes obtenus pour un donneur et le récapitulatifs de tous les donneurs sont présentés (n = 7). **B**, L'expression de l'ARNm de TGF-βRII (*TGFBR2*) dans les populations triées, ainsi que dans les NTreg, a été déterminé par PCR quantitative en temps réel (n = 4). \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001.

L'expression de FOXP3 a également été analysée dans les cultures stimulées. Nous avons constaté un maintien plus fort de l'expression de FOXP3 parmi les CM Treg, aussi bien en l'absence qu'en présence d'IL-1β. Etant donné qu'il a été décrit que l'expression de FOXP3 était maintenue par le TGF-β, une cytokine immunorégulatrice exprimée constitutivement sous sa forme latente par les Treg, nous avons étudié l'expression, *ex vivo*, du récepteur du TGF-β de type II (TGF-βRII) par PCR quantitative dans les populations de NTreg, CM Treg et EM Treg. Nos résultats ont montré une expression plus faible du TGF-βRII dans les CM Treg par rapport aux NTreg qui était, cependant, plus forte que dans les EM Treg, suggérant qu'une diminution progressive de l'expression du TGF-βRII pourrait avoir lieu au cours de la différenciation des Treg (Figure 20B). Par conséquent, cette différence

d'expression du TGF- $\beta$ RII pourrait en partie expliquer l'aptitude des CM Treg à maintenir plus fortement l'expression de FOXP3 par rapport aux EM Treg.

Dans leur ensemble, ces données ont suggéré que bien qu'il y ait génération de cellules effectrices produisant de l'IL-17 à partir des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> en réponse à l'IL-1 $\beta$ , une fraction importante de ces cellules maintenait l'expression de FOXP3 et permettrait ainsi de conserver une réserve de cellules Treg/T<sub>H</sub>17 mémoires.

## 7- Bilan de la Partie 1

L'analyse, *ex vivo*, de l'expression de l'IL-1RI par les LT CD4<sup>+</sup> circulants humains a montré que les cellules IL-1RI<sup>+</sup> étaient restreintes au compartiment mémoire et étaient fortement enrichies dans les Treg mémoires. Nos résultats ont mis en évidence que la population des MTreg IL-1RI<sup>+</sup> co-exprimait les facteurs de transcription FOXP3 et ROR $\gamma$ t, était enrichie en cellules produisant de l'IL-17 mais possédait des propriétés suppressives *ex vivo* et présentait, par conséquent, des caractéristiques appartenant à la fois aux Treg et aux T<sub>H</sub>17.

L'analyse du stade de différenciation des MTreg IL-1RI<sup>+</sup> a montré qu'ils étaient enrichis dans la fraction des cellules mémoires centrales CCR7<sup>+</sup>, suggérant un stade de différenciation précoce. En accord avec cette observation, l'étude cinétique de l'expression de l'IL-1RI a révélé que l'induction de l'expression de l'IL-1RI correspondait à un évènement précoce dans la polarisation des NTreg en T<sub>H</sub>17. De plus, nous avons mis en évidence que des cellules, présentant des caractéristiques similaires aux CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> identifiés *ex vivo*, pouvaient être obtenues à partir des NTreg après leur stimulation en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17. Dans leur ensemble, ces données soutiennent le concept selon lequel la population CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> pourrait correspondre à un intermédiaire précoce dans la voie de différenciation allant des NTreg aux T<sub>H</sub>17.

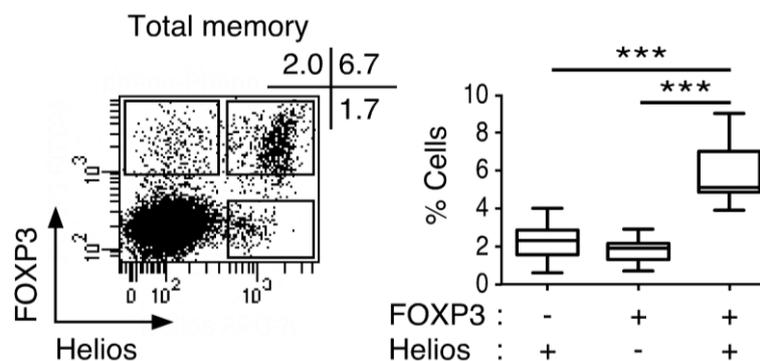
Enfin, l'étude de la sensibilité à l'IL-1 $\beta$  a montré que bien que des cellules effectrices produisant de l'IL-17 soient générées à partir des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> en réponse à l'IL-1 $\beta$ , une fraction significative des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> maintenait l'expression de FOXP3 et pourraient ainsi constituer une réserve de cellules Treg/T<sub>H</sub>17 mémoires.

## **PARTIE 2 : Etude comparative des sous-populations de Treg FOXP3<sup>+</sup> mémoires Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> humains *ex vivo***

Nous avons poursuivi la caractérisation des Treg présents dans la périphérie en nous intéressant à leur origine. Alors qu'aucun marqueur ne permettant de distinguer les Treg d'origine thymique, nTreg, des Treg générés dans la périphérie, iTreg, n'avait été identifié, une étude de Thornton et al., a récemment décrit le facteur de transcription Helios comme étant exprimé par les nTreg mais pas par les iTreg (Thornton et al., 2010). Cependant, la désignation d'Helios comme marqueur des nTreg a par la suite été contestée par plusieurs études qui sont parvenues à obtenir, après stimulation antigénique *in vitro* et *in vivo*, des Treg FOXP3<sup>+</sup> induits exprimant Helios à partir de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels issus de souris transgéniques (Gottschalk et al., 2012; Verhagen and Wraith, 2010). Helios étant une protéine intranucléaire, l'absence de marqueurs de surface permettant d'isoler, de façon viable, les Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> a, jusqu'à présent, empêché l'étude comparative approfondie de ces deux sous-populations. Par conséquent, dans le but de mieux comprendre l'origine et la fonction des Treg Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup>, nous avons entrepris l'étude phénotypique et fonctionnelle des Treg FOXP3<sup>+</sup> mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> issus du sang périphérique de donneurs sains *ex vivo*.

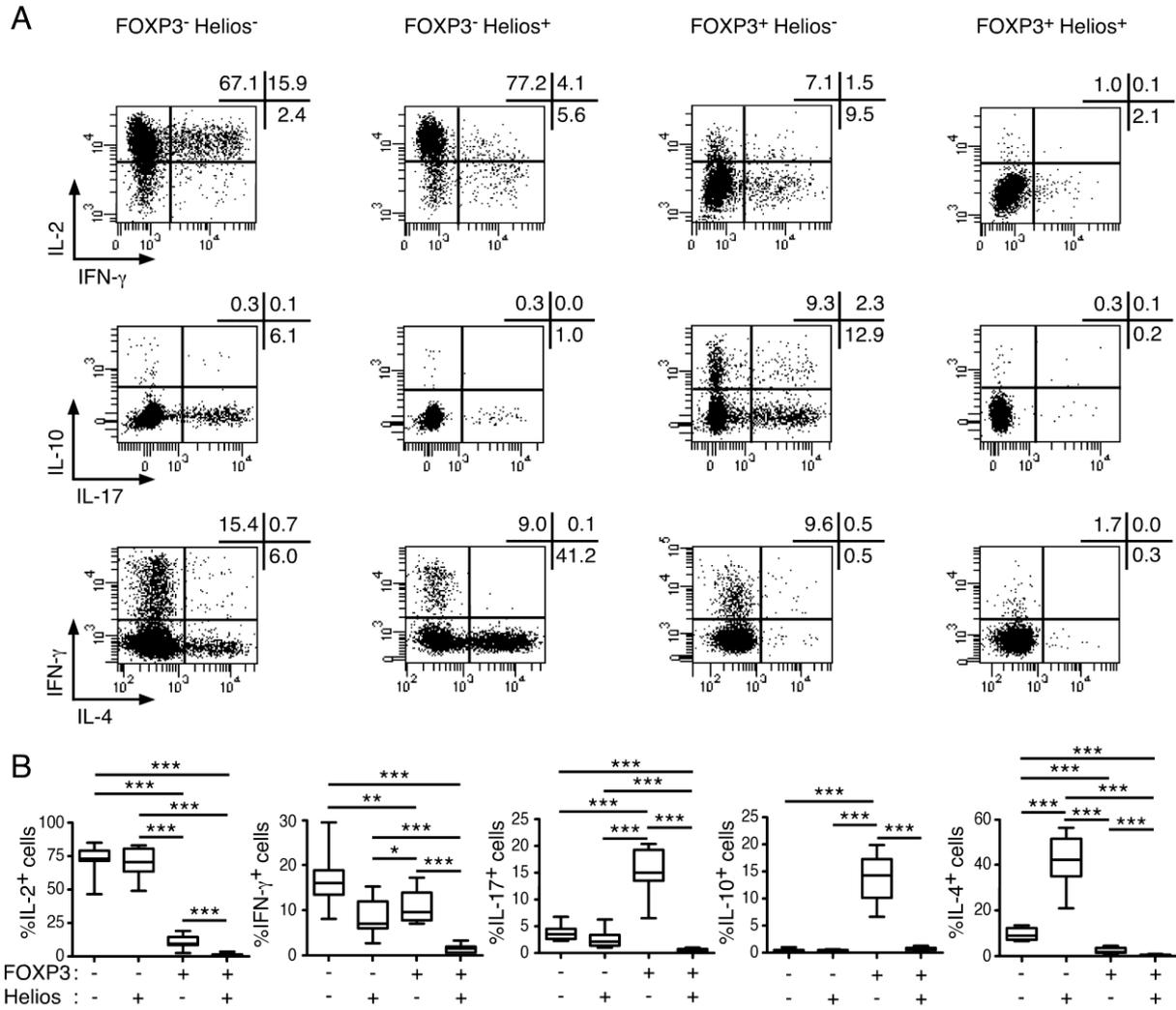
## 1- Etude de la production cytokinique dans les sous-populations de Treg FOXP3<sup>+</sup> mémoires Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup>

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression des facteurs de transcription FOXP3 et Helios parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires circulants, en réalisant un marquage intranucléaire à l'aide d'anticorps spécifiques. Deux sous-populations de Treg FOXP3<sup>+</sup> co-exprimant ou non Helios ont ainsi pu être définies, les Treg Helios<sup>-</sup> représentant environ 30% des Treg totaux (Figure 21). De plus, et comme décrit précédemment (Thornton et al., 2010), une sous-population de LT CD4<sup>+</sup> exprimant Helios a également été observée dans le compartiment des cellules mémoires conventionnelles FOXP3<sup>-</sup>.



**Figure 21. L'expression de FOXP3 et d'Helios définit des sous-populations distinctes de LT CD4<sup>+</sup> mémoires.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, FOXP3 et Helios puis analysés par cytométrie de flux. Un exemple de cytogramme montrant l'expression de FOXP3 contre celle d'Helios parmi les LT CD4<sup>+</sup> mémoires (CD45RA<sup>-</sup>) est présenté pour un donneur. Les proportions des sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires définies sur la base de l'expression de FOXP3 et d'Helios sont résumées pour tous les donneurs (n = 13). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney. \*\*\*, P < 0,001.

Des études précédentes ont montré qu'à la différence des Treg Helios<sup>+</sup>, les Treg Helios<sup>-</sup> produisaient des cytokines, *ex vivo*, en particulier de l'IL-17 ainsi que de l'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 (Kim et al., 2012; Thornton et al., 2010). Afin de comparer l'aptitude des Treg mémoires Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> à produire des cytokines *ex vivo*, nous avons co-marqué des LT CD4<sup>+</sup>, précédemment stimulés avec du PMA/ionomycine, avec des anticorps spécifiques d'Helios, de FOXP3 et des cytokines testées.



**Figure 22.** Les Treg FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> ne produisent pas de cytokines *ex vivo* alors que les Treg FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> produisent fortement de l'IL-10 et de l'IL-17. Des LT CD4<sup>+</sup> ont été stimulés *ex vivo* avec du PMA/ionomycine durant 6 heures (les 5 dernières heures en présence de BFA) puis marqués avec des anticorps dirigés contre CD45RA, FOXP3, Helios, IFN- $\gamma$ , IL-17 et IL-2 ou IL-10 ou IL-4 puis analysés par cytométrie de flux. **A**, Des cytogrammes montrant, pour un donneur représentatif, les pourcentages de cellules produisant les cytokines indiquées dans chacune des populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires définies sur la base de l'expression de FOXP3 et d'Helios, comme dans la Figure 1, sont présentés. **B**, Les proportions de cellules produisant l'une des cytokines testées dans chacune des quatre sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires sont récapitulées (IL-2, n = 12 ; IFN- $\gamma$ , n = 14 ; IL-17, n = 14 ; IL-10, n = 12, IL-4, n = 10). \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001.

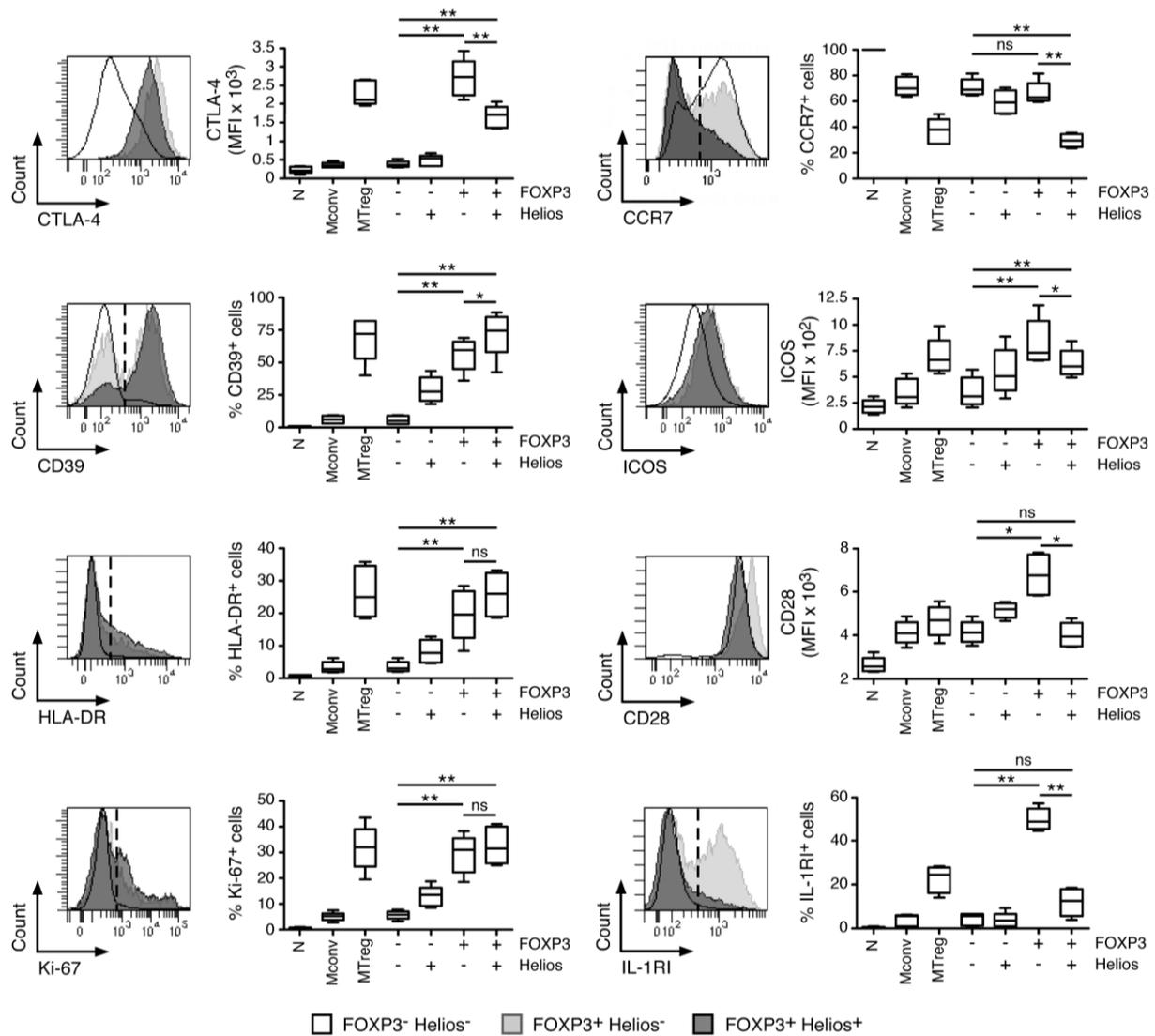
Nos résultats ont montré qu'à l'inverse des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels, les Treg Helios<sup>-</sup> comportaient de faibles proportions de cellules IL-2<sup>+</sup> et IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> et ne sécrétaient pas d'IL-4, mais contenaient des pourcentages élevés de cellules produisant de l'IL-17 et de l'IL-10 (Figure 22A-B). Il est également à noter que les plus fortes proportions de cellules produisant de l'IL-4 ont été observées dans la

population FOXP3<sup>-</sup> Helios<sup>+</sup>. Ces résultats sont en accord avec des travaux récents ayant désigné cette sous-population comme étant enrichie en T<sub>H</sub>2 (Serre et al., 2011). En revanche, comme décrit précédemment, aucune production cytokinique significative n'a été observée par la population des Treg mémoires Helios<sup>+</sup>.

## **2- Etude comparative du profil d'expression phénotypique des Treg FOXP3<sup>+</sup> mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>**

Dans le but de poursuivre la caractérisation *ex vivo* des Treg FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> mémoires et d'ainsi identifier des marqueurs de surfaces permettant de distinguer ces deux sous-populations, nous avons conduit une étude approfondie de leur profil d'expression phénotypique. Nous avons ainsi réalisé des marquages combinant des anticorps anti-Helios et anti-FOXP3 avec des anticorps dirigés contre des marqueurs précédemment décrit comme étant associés au phénotype et/ou à la fonction des Treg. Nos résultats ont montré que les Treg FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> mémoires possédaient de nombreuses caractéristiques phénotypiques communes mais présentaient également des profils d'expression différents pour certaines molécules (Figures 23 et 24).

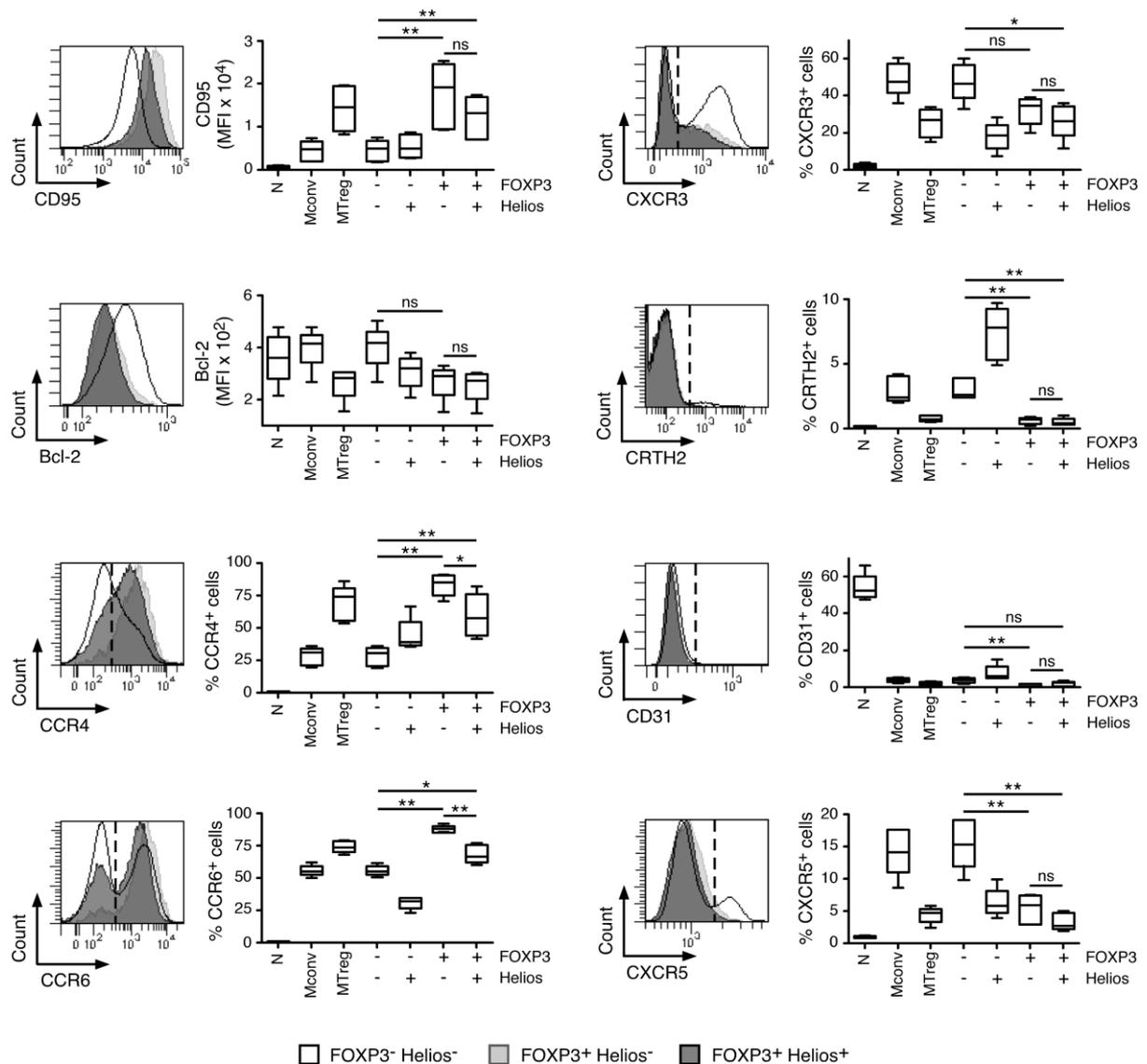
Les deux sous-populations exprimaient de hauts niveaux de CTLA-4 et de forts pourcentages de cellules CD39<sup>+</sup>, deux molécules associées aux fonctions suppressives des Treg (Shevach, 2009). Cependant, alors qu'une expression plus élevée de CTLA-4 a été observée dans les Treg Helios<sup>-</sup>, les proportions de cellules exprimant CD39 étaient plus fortes dans les Treg Helios<sup>+</sup> (Figure 23). Des pourcentages élevés de cellules exprimant HLA-DR et Ki-67 étaient présents dans les deux sous-populations, indiquant que ces cellules étaient activées et proliféraient *in vivo* (Figure 23). De plus, les deux sous-populations exprimaient fortement CD95 et faiblement Bcl-2, un profil d'expression associé à un phénotype pro-apoptotique (Figure 24). En accord avec des travaux antérieurs, les Treg étaient enrichis en cellules CCR4<sup>+</sup> et CCR6<sup>+</sup> (Tosello et al., 2008), cependant leurs proportions étaient plus élevées dans les Treg Helios<sup>-</sup> que dans les Treg Helios<sup>+</sup>. En revanche, les sous-populations de Treg contenaient toutes les deux de faibles proportions de cellules exprimant CXCR3 ainsi que CRTH2, CD31 et CXCR5 (Figure 24).



**Figure 23. Les Treg mémoires FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> présentent des profils d'expression phénotypique distincts *ex vivo*.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127, FOXP3 et Helios en association avec chacun des anticorps indiqués puis analysés par cytométrie de flux. Pour chaque marqueur, des exemples d'histogrammes représentant les populations de cellules mémoires (CD45RA<sup>-</sup>) FOXP3<sup>-</sup> Helios<sup>-</sup> (en blanc), FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> (en gris clair) et FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> (en gris foncé) sont montrés. Les données obtenues (moyennes d'intensité de fluorescence ou pourcentages de cellules) sont résumées pour les populations naïves (N, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), conventionnelles mémoires (Mconv, CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>), Treg mémoires (MTreg, CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) ainsi que pour les sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires définies sur la base de l'expression de FOXP3 et d'Helios. Chaque marqueur a été étudié à partir des LT CD4<sup>+</sup> issus de 4 à 6 donneurs indépendamment. ns = non significatif, P > 0,05 ; \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01.

En nous basant sur l'expression de CCR7, nous avons ensuite comparé l'état de différenciation des Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> mémoires. Nos résultats ont montré que les Treg Helios<sup>-</sup> contenaient des proportions élevées de cellules CM (CCR7<sup>+</sup>) alors que les Treg Helios<sup>+</sup> étaient fortement enrichis en cellules EM (CCR7<sup>-</sup>) (Figure 23). Une expression différentielle de CCR7 a ainsi été observée entre les deux sous-populations. De plus, en accord avec leur stade de différenciation moins avancé, les Treg Helios<sup>-</sup> exprimaient de plus hauts niveaux des molécules de co-stimulation ICOS et CD28 (Figure 23).

Les forts pourcentages de cellules IL-17<sup>+</sup>, observés dans la population des Treg Helios<sup>-</sup> (Figure 22), nous ont incité à comparer l'expression de l'IL-1RI entre les deux sous-populations de Treg. En effet, lors de l'étude réalisée dans la Partie 1, nous avons montré que l'expression de l'IL-1RI identifiait, parmi les Treg mémoires, un intermédiaire précoce dans la voie de différenciation allant des NTreg aux T<sub>H</sub>17 et qui, comme les Treg Helios<sup>-</sup>, était CCR7<sup>+</sup> et produisait de l'IL-17 (Raffin et al., 2011). Les résultats obtenus ont mis en évidence un fort enrichissement en cellules IL-1RI<sup>+</sup> parmi les Treg Helios<sup>-</sup> alors qu'à l'inverse seul un faible pourcentage de cellules exprimant l'IL-1RI a été détecté dans les Treg Helios<sup>+</sup> (Figure 23). En conclusion, parmi tous les marqueurs de surfaces testés, l'IL-1RI et CCR7 se sont révélés être ceux permettant le mieux de distinguer les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> des Treg mémoires Helios<sup>+</sup>.



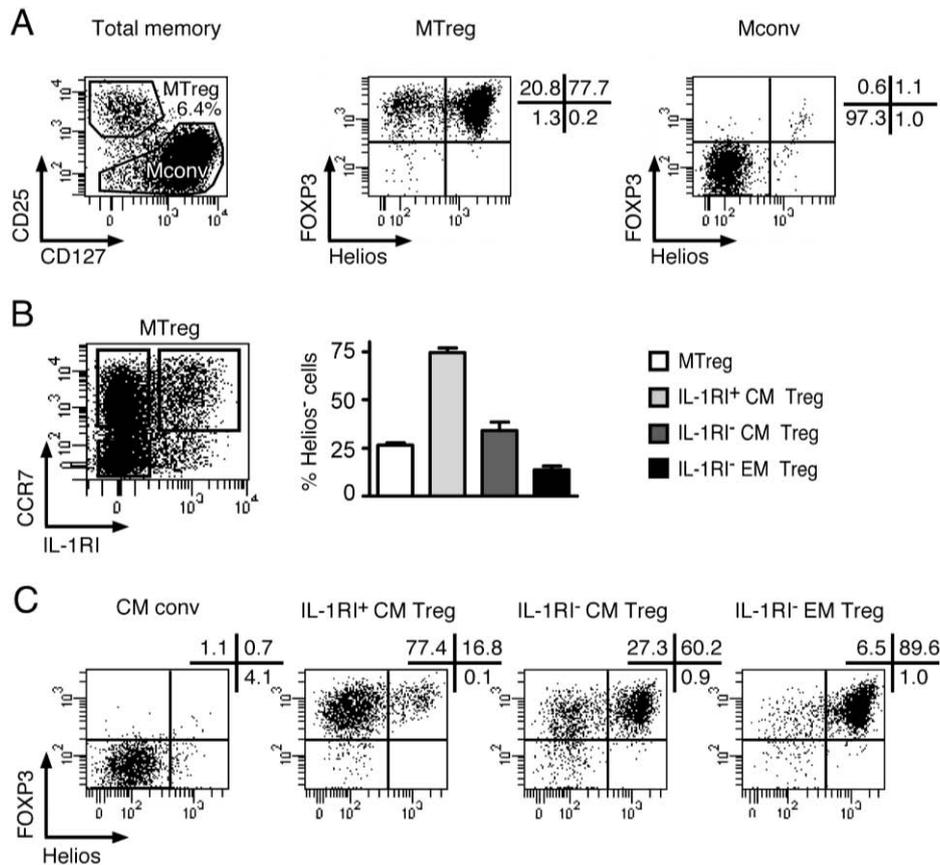
**Figure 24. Caractérisation phénotypique des Treg FOXP3<sup>+</sup> mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127, FOXP3 et Helios en association avec chacun des anticorps indiqués puis analysés par cytométrie de flux. Pour chaque marqueur, des exemples d'histogrammes représentant les populations de cellules mémoires (CD45RA<sup>-</sup>) FOXP3<sup>-</sup> Helios<sup>-</sup> (en blanc), FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> (en gris clair) et FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> (en gris foncé) sont montrés. Les données obtenues (MFI ou pourcentages de cellules) sont résumées pour les populations naïves (N, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), conventionnelles mémoires (Mconv, CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>), Treg mémoires (MTreg, CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) ainsi que pour les sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires définies sur la base de l'expression de FOXP3 et d'Helios. Chaque marqueur a été étudié à partir des LT CD4<sup>+</sup> issus de 5 à 6 donneurs indépendamment. ns = non significatif, P > 0,05 ; \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01.

### **3- Mise au point d'une stratégie de tri par cytométrie de flux, basée sur l'expression différentielle de l'IL-1RI et de CCR7, permettant la séparation des sous-populations de Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> ex vivo**

Les résultats obtenus dans le paragraphe précédent ont montré que l'IL-1RI et CCR7 pourraient représenter des marqueurs de surface permettant de séparer *ex vivo* les sous-populations de Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>. De plus, il a été décrit que l'utilisation d'anticorps dirigés contre les molécules de surface CD25 et CD127 permettait d'isoler la grande majorité des Treg FOXP3<sup>+</sup> humains définis comme étant CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (Liu et al., 2006b). Nous avons par conséquent cherché à vérifier s'il était possible d'isoler les Treg FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> sur la base de l'expression ces différentes molécules de surface. Nous avons ainsi marqué des LT CD4<sup>+</sup> totaux avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127 ainsi que FOXP3 et Helios. Nos résultats ont confirmé que les MTreg CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> étaient FOXP3<sup>+</sup> alors que les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels (CD45RA<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) étaient FOXP3<sup>-</sup> et ont révélé que, parmi les MTreg, les proportions de cellules Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> étaient équivalentes à celles observées dans la fraction des LT CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> (Figure 25A). Afin de tester notre stratégie de tri, nous avons ensuite marqué des LT CD4<sup>+</sup> avec des anticorps reconnaissant spécifiquement CD45RA, CD25, CD127, CCR7, IL-1RI, Helios et FOXP3, puis nous avons évalué les pourcentages de cellules Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> parmi les populations CM Treg (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup>) IL-1RI<sup>+</sup> et EM Treg (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup>) IL-1RI<sup>-</sup>. Les résultats obtenus ont révélé que les Treg Helios<sup>-</sup> étaient fortement enrichis dans la fraction CM IL-1RI<sup>+</sup> alors que les Treg Helios<sup>+</sup> étaient, à l'inverse, majoritaires dans la fraction EM IL-1RI<sup>-</sup> (Figure 25B). Ces résultats ont mis en évidence que l'utilisation combinée d'anticorps anti-CCR7 et anti-IL-1RI permettait de séparer avec un fort enrichissement les Treg Helios<sup>-</sup> des Treg Helios<sup>+</sup>.

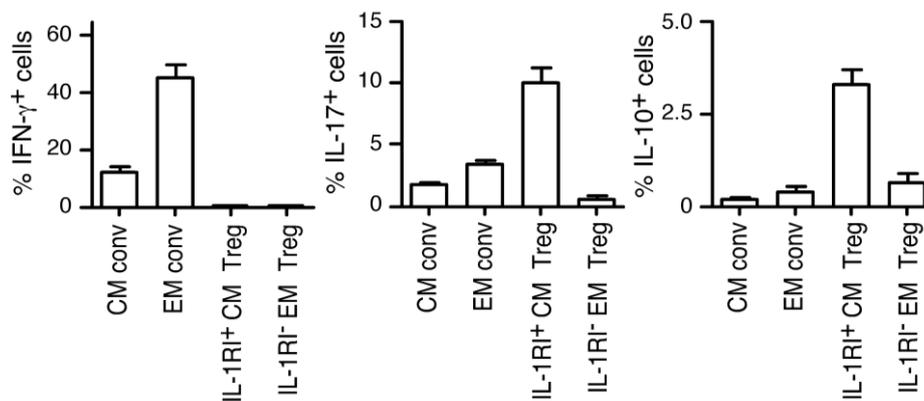
Nous avons, par conséquent, isolé, via la technique de tri cellulaire par cytométrie de flux, les fractions CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup>. Afin de vérifier l'efficacité de notre stratégie de tri, nous avons ensuite marqué les populations séparées avec des anticorps dirigés contre FOXP3 et Helios. L'analyse des populations triées a confirmé qu'un fort enrichissement en cellules FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> était obtenu dans la fraction Treg CM IL-1RI<sup>+</sup> alors qu'à l'inverse, la fraction EM IL-1RI<sup>-</sup> était fortement enrichie en cellules FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> (Figure 25C). Lors du tri par

cytométrie de flux, nous avons également isolé la sous-population des CM Treg IL-1RI<sup>-</sup>. L'étude de l'expression de FOXP3 et d'Helios a montré que cette sous-population était hétérogène, contenant à la fois des proportions importantes de cellules FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> et de cellules FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> (Figure 25B-C).



**Figure 25. L'expression de l'IL-1RI et de CCR7, parmi les Treg, permet la séparation des sous-populations Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> *ex vivo*.** **A**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127, FOXP3 et Helios puis analysés par cytométrie de flux. L'expression de CD127 contre celle de CD25 dans les LT CD4<sup>+</sup> mémoires (CD45RA<sup>-</sup>) définit les populations MTreg (CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>) et conventionnels mémoires (Mconv, CD25<sup>-</sup>) (cytogramme de gauche). L'expression d'Helios contre celle de FOXP3 est présentée pour les MTreg (cytogramme du milieu) et les Mconv (cytogramme de droite). **B**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* comme en A. Un cytogramme montrant l'expression de CCR7 et de l'IL-1RI dans les MTreg est présenté pour un donneur représentatif. Les pourcentages de cellules Helios<sup>+</sup> parmi les MTreg totaux, les CM Treg (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) IL-1RI<sup>+</sup>, CM Treg IL-1RI<sup>-</sup> et les EM Treg (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) IL-1RI<sup>-</sup> sont résumés (n = 5, moyenne ± SEM). **C**, Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et IL-1RI puis, les populations CM conv (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, CM Treg IL-1RI<sup>-</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ont été triées par cytométrie de flux. Des aliquots des populations isolées ont été marqués avec des anticorps anti-FOXP3 et anti-Helios puis analysés par cytométrie de flux. L'expression de FOXP3 et celle d'Helios dans les populations triées est montrée pour un donneur représentatif de trois.

Afin de comparer le profil de production cytokinique des populations CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et des EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> triées avec celui des MTreg FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> (Figure 22), présents parmi les CD4<sup>+</sup> totaux *ex vivo*, nous avons réalisé un marquage intracellulaire. Nous avons observé qu'en accord avec leur phénotype, les cellules triées CCR7<sup>+</sup> IL-1RI<sup>+</sup> sécrétaient de l'IL-10 et de l'IL-17 alors qu'à l'inverse, les cellules CCR7<sup>-</sup> IL-1RI<sup>-</sup> ne sécrétaient pas de cytokines (Figure 26). En conclusion, nos résultats ont montré qu'en utilisant une combinaison d'anticorps ciblant cinq marqueurs de surface (CD45RA, CD25, CD127, CCR7 et IL-1RI), les sous-populations de Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> pouvaient être séparées *ex vivo*, tout en conservant leur viabilité, avec un niveau de pureté suffisant pour poursuivre leur caractérisation après tri.

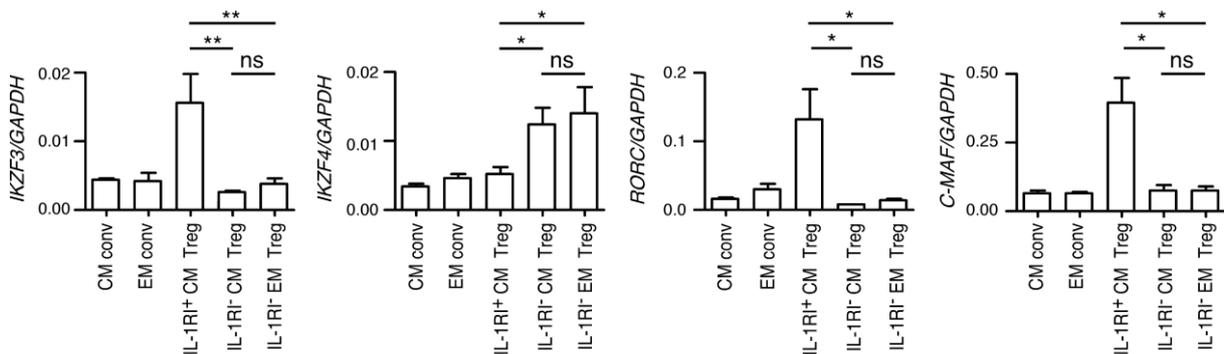


**Figure 26. Les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> produisent de l'IL-17 et de l'IL-10 alors que les EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ne produisent pas de cytokines.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et IL-1RI puis les populations CM conv, CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ont été triées par cytométrie de flux. Ces cellules ont ensuite été stimulées avec du PMA/ionomycine pendant 6 heures (les 5 dernières heures en présence de BFA), marquées avec des anticorps anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-17 et anti-IL-10 puis analysées par cytométrie de flux. Les pourcentages de cellules produisant la cytokine indiquée dans chacune des populations triées sont montrés (n = 3, moyenne  $\pm$  SEM).

#### 4- Etude de l'expression d'autres facteurs de transcription membres de la famille d'Ikaros dans les Treg FOXP3<sup>+</sup> mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>

Helios est actuellement le seul facteur de transcription membre de la famille d'Ikaros pour lequel un anticorps spécifique valide est disponible chez l'homme. Par conséquent, l'étude des autres membres de cette famille, dans les sous-populations de Treg humains, n'a pas encore été réalisée. Or, d'autres membres de cette famille de facteurs de transcription, Eos et Aiolo, ont également été associés à la fonction

ou à la différenciation des Treg. En effet, il a été montré que l'interaction directe d'Eos avec FOXP3 induisait la mise sous silence de gènes (Pan et al., 2009). Aiolos a, qu'en à lui, été montré comme étant impliqué dans la différenciation des T<sub>H</sub>17 et des Treg induits (Gandhi et al., 2010; Quintana et al., 2012). Nous avons par conséquent tiré avantage de notre stratégie de tri *ex vivo*, décrite dans le paragraphe précédent, pour étudier l'expression de ces autres membres de la famille d'Ikaros, par PCR en temps réel, dans les sous-populations de Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>. Nos résultats ont mis en évidence une expression différentielle entre les deux sous-populations de Treg. En effet, alors que les Treg Helios<sup>+</sup> exprimaient Eos mais n'exprimaient pas Aiolos, les Treg Helios<sup>-</sup> exprimaient Aiolos mais pas Eos (Figure 27).

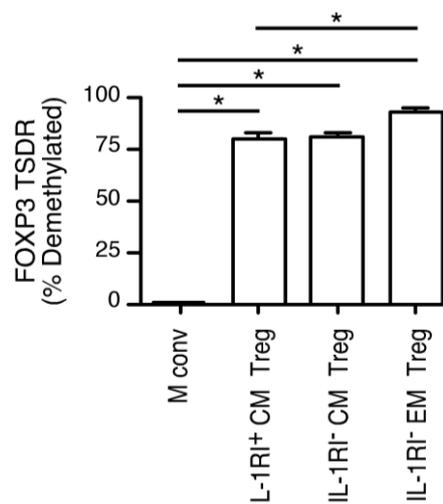


**Figure 27. Les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et les EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ont des profils d'expression génique différents.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127 et anti-IL-1RI puis les populations CM conv, EM conv, CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, CM Treg IL-1RI<sup>-</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ont été triées par cytométrie de flux. Une mesure de l'expression génique d'Aiolos (*IKZF3*), d'Eos (*IKZF4*), de RORγt (*RORC*) et de C-MAF (*C-MAF*) a été réalisée dans les populations triées (n = 4). \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01.

Nous avons également analysé, par PCR en temps réel, l'expression des facteurs de transcription RORγt et C-MAF, qui contrôlent respectivement l'expression d'IL-17 et d'IL-10, dans les deux populations de MTreg triés. Nous avons observé qu'en accord avec leur capacité à produire de l'IL-17 et de l'IL-10, les Treg Helios<sup>-</sup> exprimaient RORγt et C-MAF (Figure 27). En revanche les Treg Helios<sup>+</sup> n'exprimaient ni RORγt, ni C-MAF. Ces résultats ont révélé que les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Treg Helios<sup>+</sup> présentaient des profils d'expression génique différents ce qui a suggéré que ces deux sous-populations pourraient suivre des voies de différenciation distinctes.

## 5- Etude de l'état de méthylation de la région TSDR chez les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>

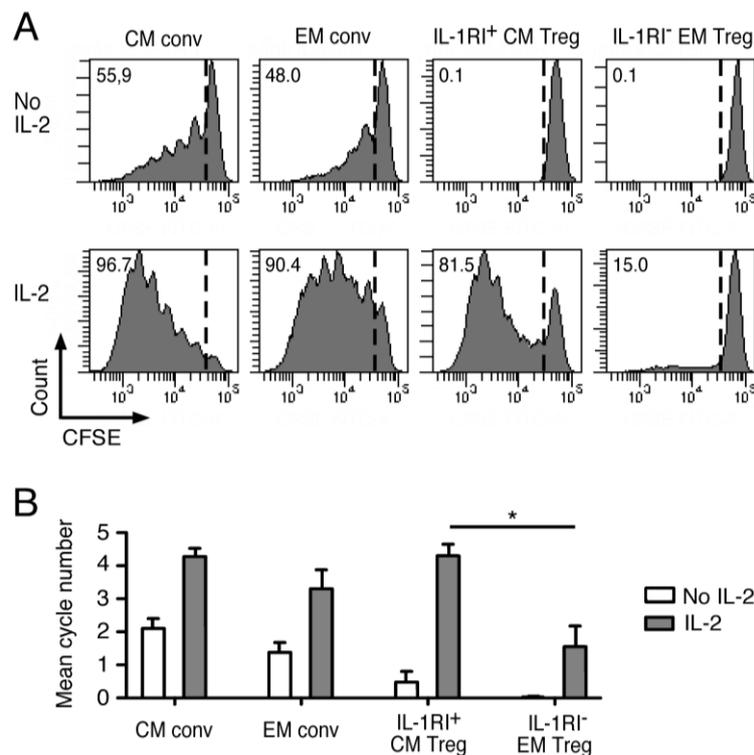
Nous avons poursuivi l'étude comparative des MTreg Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> en étudiant la stabilité de l'expression de FOXP3. Dans ce but, après séparation *ex vivo* par cytométrie de flux, des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, CM Treg IL-1RI<sup>-</sup> et des EM Treg IL-1RI<sup>-</sup>, nous avons mesuré, par PCR en temps réel, l'état de méthylation de la région TSDR. Il a, en effet, été suggéré que l'état de méthylation de cette région, située au niveau du promoteur du gène FOXP3, permettait de distinguer les Treg exprimant FOXP3 de façon stable et présentant un TSDR à un état déméthylé, des LT CD4<sup>+</sup> récemment activés exprimant transitoirement FOXP3 et ayant un TSDR fortement méthylé (Baron et al., 2007). Nous avons constaté que, par rapport aux LT CD4<sup>+</sup> conventionnels mémoires, les trois sous-populations de Treg testées contenaient des proportions importantes de cellules présentant un état déméthylé au niveau du TSDR (Figure 28). Il est à noter que le pourcentage de cellules ayant une région TSDR déméthylée était légèrement plus important dans les EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> par rapport aux deux autres sous-populations régulatrices testées. Ces données ont confirmé que les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> correspondaient tous les deux à des populations de vrais Treg exprimant FOXP3 de façon stable.



**Figure 28. Les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> sont fortement déméthylés au niveau de la région TSDR du gène FOXP3.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et IL-1RI puis les populations Mconv, CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, CM Treg IL-1RI<sup>-</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ont été triées par cytométrie de flux. L'état de méthylation du TSDR des populations séparées a ensuite été mesuré par PCR en temps réel. Le pourcentage de cellules présentant une région TSDR déméthylée obtenu pour chacune des populations testées est résumé (n = 4). \*, P < 0,05.

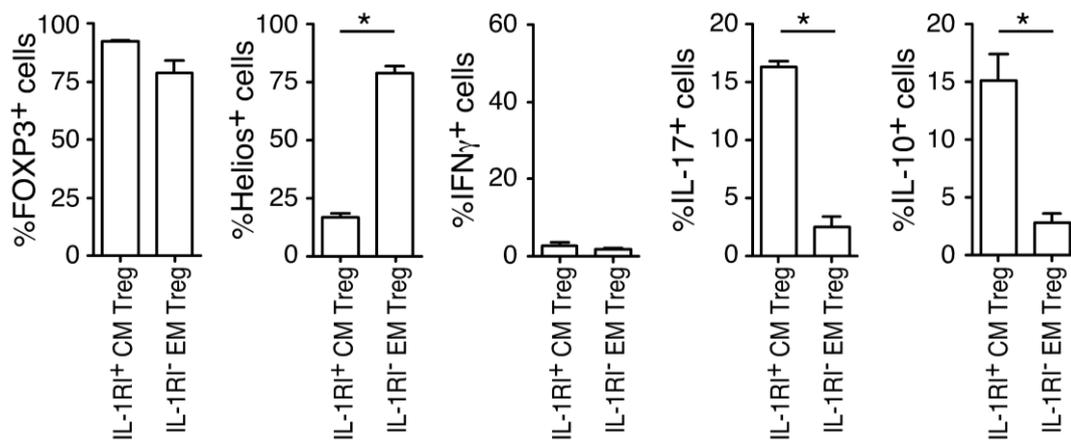
## 6- Analyse des capacités prolifératives et de la stabilité phénotypique des Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>

Nous avons ensuite cherché à comparer les capacités prolifératives des deux sous-populations de Treg mémoires isolées *ex vivo*. Dans ce but, nous avons marqués les cellules triées avec du CFSE puis nous les avons stimulé avec de la PHA en présence de cellules présentatrices d'antigène et en l'absence ou en présence d'IL-2. Nous avons observé que les Treg, aussi bien Helios<sup>-</sup> que Helios<sup>+</sup>, ne parvenaient pas à proliférer en l'absence d'IL-2 et étaient donc anergiques (Figure 29A-B). En revanche, en présence d'IL-2, les Treg Helios<sup>-</sup> se sont montrés proliférer significativement plus efficacement que les Treg Helios<sup>+</sup> (Figure 29A-B).



**Figure 29. Les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> sont anergiques mais les Treg Helios<sup>-</sup> prolifèrent efficacement en présence d'IL-2.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et IL-1RI puis les populations CM conv, EM conv, CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ont été triées par cytométrie de flux. Les populations triées ont été marquées avec du CFSE, stimulées avec de la PHA et des monocytes irradiés en l'absence ou en présence d'IL-2. La prolifération cellulaire a été mesurée après 6 jours de culture par l'analyse de la dilution de CFSE par cytométrie de flux. **A**, Histogrammes montrant la dilution de CFSE obtenue en l'absence ou en présence d'IL-2 dans les populations indiquées (les nombres dans les histogrammes correspondent aux pourcentages de cellules divisées). **B**, Les nombres moyens de cycles de division pour chacune des populations et conditions testées sont résumés (moyenne  $\pm$  SEM ; n = 4). \*, P < 0,05.

Il a été suggéré que les Treg FOXP3<sup>+</sup> humains produisant des cytokines ne seraient pas de réels Treg mais correspondraient à des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels récemment activés exprimant FOXP3 de façon transitoire et perdant son expression après expansion (Miyao et al., 2012). Etant donné que nos résultats ont montré que les Treg Helios<sup>-</sup> produisaient des cytokines *ex vivo*, nous avons voulu déterminer si leur aptitude à proliférer plus efficacement que les Treg Helios<sup>+</sup> était due à la présence de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels récemment activés parmi cette population. Dans ce but, nous avons étudié la stabilité phénotypique des Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> triés *ex vivo* en ré-analysant l'expression de FOXP3 et d'Helios ainsi que la production cytokinique dans ces mêmes populations après 10 jours d'expansion *in vitro* en condition neutre. Les données obtenues ont montré un fort maintien de l'expression de FOXP3 dans les deux sous-populations et un maintien de l'expression d'Helios dans les Treg Helios<sup>+</sup> (Figure 30). De plus, le profil de production cytokinique observé après 10 jours de culture s'est montré être équivalent à celui obtenu *ex vivo* (Figures 26 et 30). Ces résultats ont montré que les Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> étaient stables après expansion en condition neutre. Par conséquent, l'aptitude des Treg Helios<sup>-</sup> à proliférer plus efficacement que les Treg Helios<sup>+</sup>, après stimulation en présence d'IL-2, *in vitro*, ne semble pas être due à la présence de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels récemment activés au sein de la fraction des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> triés.

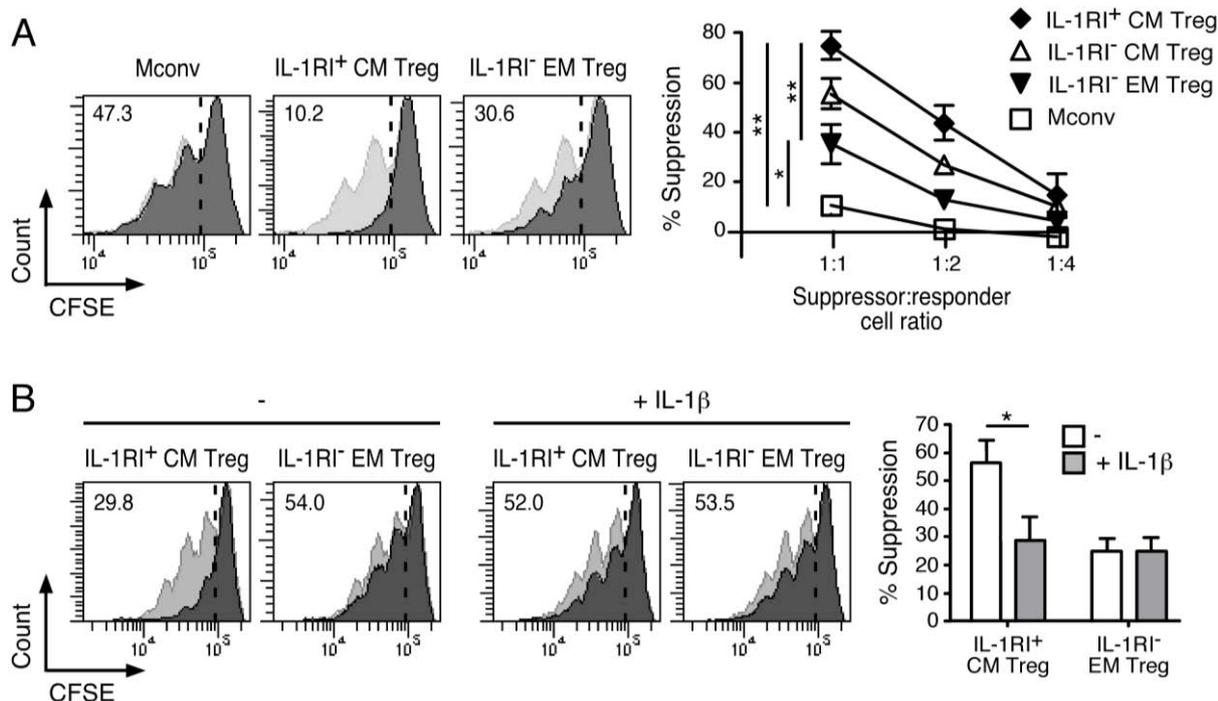


**Figure 30. Les populations CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> sont phénotypiquement stables après stimulation en condition neutre.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et IL-1RI puis les populations CM conv, EM conv, CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ont été triées par cytométrie de flux. Les populations isolées ont ensuite été stimulées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-2. Après 10 jours, l'expression de FOXP3 et d'Helios ainsi que la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-17 et d'IL-10 ont été analysées par cytométrie de flux dans les différentes cultures (n = 2, moyenne  $\pm$  SEM). \*, P < 0,05.

## 7- Etude des capacités suppressives des Treg mémoires Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> et de leur sensibilité à l'IL-1 $\beta$

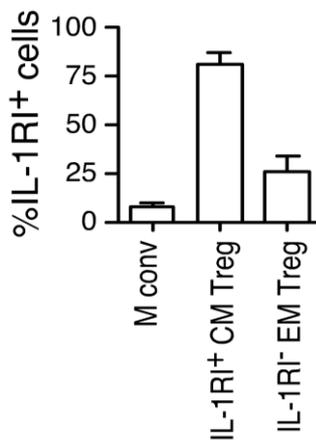
Une étude précédente a affirmé que les Treg FOXP3<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-17, tels que les Treg Helios<sup>-</sup>, ne possédaient pas de propriétés suppressives (Miyara et al., 2009). Nous avons par conséquent décidé d'effectuer une étude comparative des capacités suppressives des Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> triés en les stimulant *ex vivo* en co-culture avec des cellules CD4<sup>+</sup> conventionnelles répondeuses marquées avec du CFSE, en présence de PHA et de CPA, à différents ratios cellulaires. Après 4 jours de culture, la prolifération des cellules répondeuses a été mesurée. Nos résultats ont mis en évidence qu'à la fois les Treg Helios<sup>+</sup> mais également les Treg Helios<sup>-</sup> possédaient des propriétés suppressives *ex vivo* (Figure 31A). De plus, les Treg Helios<sup>-</sup>, qui produisent des cytokines *ex vivo*, se sont révélés supprimer plus efficacement la prolifération cellulaire des cellules répondeuses que les Treg Helios<sup>+</sup>. Les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, qui représentaient une population hétérogène contenant des Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>, se sont montrés posséder une capacité suppressive intermédiaire, entre celle des Treg Helios<sup>-</sup> et des Treg Helios<sup>+</sup> (Figure 31A).

Le récepteur IL-1RI appartient à la superfamille des IL-1R/TLR récepteurs. Or, l'activation de certains membres de cette même famille a précédemment été décrite comme pouvant moduler les capacités suppressives des Treg (Peng et al., 2005). Nous avons donc cherché à déterminer si l'activation de l'IL-1RI, exprimé à la surface des Treg Helios<sup>-</sup>, pouvait influencer sur leurs capacités suppressives. Dans ce but, nous avons comparé l'efficacité suppressive des Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> en l'absence ou en présence d'IL-1 $\beta$ , le ligand de l'IL-1RI. Nos résultats ont montré une diminution significative des capacités suppressives des Treg Helios<sup>-</sup> en présence d'IL-1 $\beta$  alors que celles des Treg Helios<sup>+</sup> n'ont pas été affectées (Figure 31B).



**Figure 31. Les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> sont fortement suppressives et diminuent leur activité suppressive en présence d'IL-1β.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et IL-1RI puis les populations Mconv, CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, CM Treg IL-1RI<sup>-</sup> et EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> ont été triées par cytométrie de flux. **A**, Les populations triées ont été mises en co-culture avec des cellules répondeuses marquées avec du CFSE à différents ratios cellulaires (suppressives : répondeuses) en présence de monocytes et de PHA. Après 4 jours de culture, la dilution du CFSE a été analysée par cytométrie de flux. Les histogrammes montrent la dilution du CFSE dans les cellules répondeuses obtenue en absence (en gris clair) ou en présence (en gris foncé) des populations cellulaires indiquées à un ratio 1:1 (les nombres indiqués dans les histogrammes correspondent aux pourcentages de cellules divisées observés en présence de la population suppressive indiquée). En l'absence de population suppressive testée, le pourcentage de prolifération des cellules répondeuses était de 49,0% ± 3,0% (n = 12). Les pourcentages de suppression de la prolifération des cellules répondeuses, obtenus après calculs (*cf.* la section matériels et méthodes), sont présentés pour toutes les populations testées et à tous les ratios effectués (n = 6). **B**, Les capacités suppressives des populations triées ont été évaluées comme en A à un ratio 1:1 en l'absence ou en présence d'IL-1β. Les histogrammes montrant la dilution du CFSE dans les cellules répondeuses obtenue en absence (en gris clair) ou en présence (en gris foncé) des populations cellulaires testées sont présentés pour un donneur (en l'absence de population suppressive testée, le pourcentage de prolifération des cellules répondeuses était de 63,5% ± 5,6% (n = 11) sans IL-1β et de 64,3% ± 3,8% (n = 11) avec IL-1β). Les pourcentages de suppressions obtenus en absence ou en présence d'IL-1β sont résumés (n = 3). \*,P < 0,05, \*\*,P < 0,01.

En accord avec leur incapacité à répondre à l'IL-1 $\beta$ , seule une faible induction de l'expression de l'IL-1RI a été observée chez les EM Treg IL-1RI $^{-}$  après une stimulation *in vitro* en présence d'IL-2 seule, alors que l'expression du récepteur était fortement maintenue chez les CM Treg IL-1RI $^{+}$  stimulés (Figure 32). L'IL-1 $\beta$  étant une cytokine pro-inflammatoire, ces données ont suggéré que les Treg Helios $^{-}$  étaient capables de moduler leur efficacité suppressive en fonction du contexte cytokinique en présence, physiologique ou inflammatoire.

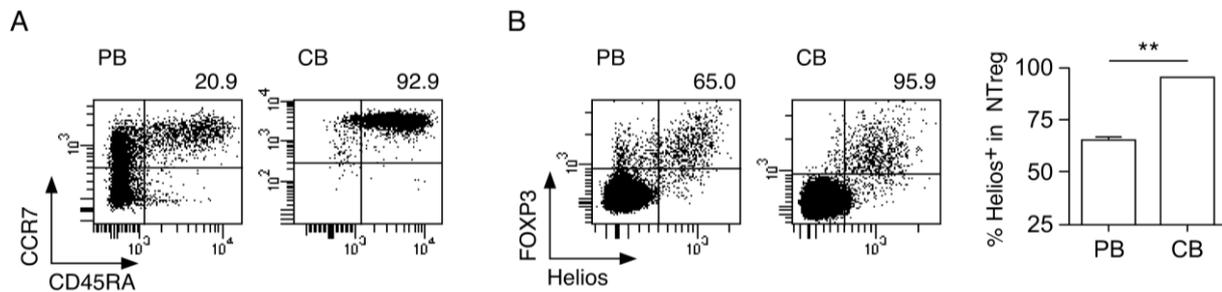


**Figure 32. Les CM Treg IL-1RI $^{+}$  et EM Treg IL-1RI $^{-}$  maintiennent une expression différentielle de l'IL-1RI après stimulation *in vitro* en condition neutre.** Des LT CD4 $^{+}$  ont été marqués *ex vivo* avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et IL-1RI puis les populations Mconv, CM Treg IL-1RI $^{+}$  et EM Treg IL-1RI $^{-}$  ont été triées par cytométrie de flux. Les populations isolées ont ensuite été stimulées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-2. Après 6 jours de culture, l'expression de l'IL-1RI a été analysée par cytométrie de flux dans les différentes populations (n = 2, moyenne  $\pm$  SEM).

## 8- Etude de l'expression du facteur de transcription Helios dans le compartiment des LT CD4 $^{+}$ naïfs

Chez l'homme, les Treg sont également présents dans le compartiment naïf des LT CD4 $^{+}$ . Nous avons, par conséquent, réalisé l'analyse de l'expression d'Helios dans la population des LT régulateur naïfs (NTreg) issus du sang périphérique de donneurs sains adultes et également isolés à partir du sang de cordon ombilical, où la vaste majorité des cellules sont naïves (CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{+}$ ) (Figure 33A). L'étude *ex vivo* de l'expression de FOXP3 par rapport à celle d'Helios dans le compartiment naïf des LT CD4 $^{+}$ , issus du sang périphérique de donneurs sains adultes, a révélé que parmi les NTreg FOXP3 $^{+}$ , bien que la majorité des cellules étaient Helios $^{+}$ , environ 30% des NTreg étaient Helios $^{-}$  (Figure 33B). En revanche les NTreg issus du sang de cordon ombilical étaient tous Helios $^{+}$  (Figure 33B). Ces résultats ont mis en évidence que, tout comme les Treg mémoires, les Treg naïfs présents dans le sang périphérique de donneurs sains adultes pouvaient être séparés en deux sous-populations distinctes en fonction de l'expression d'Helios. De plus, l'absence de NTreg Helios $^{-}$  dans le sang de cordon a suggéré que cette sous-population était

généralisée après la naissance. Cependant, son origine, thymique ou périphérique, reste à être déterminée.



**Figure 33. Une population de NTreg FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> est présente dans le sang périphérique de donneurs sains adultes mais est absente dans le sang de cordon ombilical.** Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir du sang périphérique de donneurs sains adultes (Peripheral Blood ; PB) ou du sang de cordon ombilical (Cord Blood ; CB) ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127, FOXP3 et Helios puis analysés par cytométrie de flux. **A**, Des exemples de cytogrammes montrant l'expression de CCR7 par rapport à celle de CD45RA dans les LT CD4<sup>+</sup> totaux issus de PB et de CB sont présentés. Les nombres correspondent aux proportions de LT CD4<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>). **B**, Des exemples de cytogrammes montrant l'expression de FOXP3 par rapport à celle d'Helios parmi les LT CD4<sup>+</sup> naïfs issus de PB et de CB sont présentés. Les nombres indiqués correspondent aux proportions de cellules Helios<sup>+</sup> parmi les NTreg FOXP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>. Les proportions de cellules Helios<sup>+</sup> parmi les NTreg FOXP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> sont récapitulées pour tous les échantillons testés (n = 6, moyenne ± SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney. \*\*, P < 0,01.

## 9- Bilan de la Partie 2

Lors de cette étude, nous avons réalisé une analyse comparative approfondie, à la fois phénotypique et fonctionnelle, des sous-populations de Treg mémoires humains Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup>. L'étude du profil d'expression cytokinique a montré que les Treg mémoires Helios<sup>+</sup> ne produisaient aucune des cytokines testées. En revanche, les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> étaient enrichis en cellules produisant de l'IL-17 ainsi qu'en cellules IL-10<sup>+</sup>. De plus, l'étude comparative des profils d'expression phénotypique des Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> nous a permis d'identifier deux marqueurs de surface, CCR7 et IL-1RI, qui sont exprimés de façon différentielle entre les deux sous-populations. En effet, alors que les Treg Helios<sup>-</sup> se sont révélés être majoritaires parmi les Treg mémoires CCR7<sup>+</sup> IL-1RI<sup>+</sup>, les Treg Helios<sup>+</sup> étaient pour la plupart CCR7<sup>-</sup> IL-1RI<sup>-</sup>. Ces résultats nous ont permis de mettre au point une stratégie

de tri, basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre CCR7 et IL-1RI, permettant la séparation *ex vivo* des Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> tout en conservant leur viabilité.

A partir des populations isolées, *ex vivo*, nous avons analysé l'expression de deux autres membres de la famille des facteurs de transcription d'Ikaros, Eos et Aiolos, et montré que les Treg Helios<sup>+</sup> co-exprimaient Eos alors que les Treg Helios<sup>-</sup> co-exprimaient Aiolos. De plus, en accord avec la production d'IL-17 et d'IL-10, les Treg Helios<sup>-</sup> exprimaient également les facteurs de transcription ROR $\gamma$ t et C-MAF. L'analyse de l'état de méthylation de la région TSDR, située au niveau du promoteur du gène FOXP3, a montré que les deux sous-populations de Treg présentaient une région TSDR fortement déméthylée indiquant une expression stable de FOXP3. Les Treg, aussi bien Helios<sup>-</sup> que Helios<sup>+</sup>, se sont montrés être anergiques et présenter un profil d'expression de FOXP3 et d'Helios stable après stimulation en condition neutre. Enfin, l'étude comparative des capacités suppressives des Treg Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> a mis en évidence que les Treg Helios<sup>-</sup> possédaient une plus grande efficacité suppressive que les Treg Helios<sup>+</sup> *ex vivo*. Une diminution des capacités suppressives des Treg Helios<sup>-</sup> a été observée en réponse à l'IL-1 $\beta$  suggérant que ces derniers pouvaient moduler leur activité suppressive en fonction de l'environnement cytokinique en présence.

En parallèle, l'analyse de l'expression d'Helios dans le compartiment naïf a montré qu'une sous-population de NTreg Helios<sup>-</sup> était présente dans le sang périphérique d'adultes sains mais qu'en revanche cette population était absente du le sang de cordon ombilical.

Dans leur ensemble, ces données ont montré que bien que présentant des caractéristiques et des marqueurs communs, les MTreg FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> représentent deux sous-populations phénotypiquement et fonctionnellement distinctes.

### **PARTIE 3 : Caractérisation des lymphocytes T régulateurs présents au site tumoral dans le cancer épithélial de l'ovaire**

En parallèle des travaux réalisés chez les donneurs sains, une partie de ma thèse a été consacrée à l'étude des Treg présents au niveau du site tumoral dans le cancer épithélial de l'ovaire (CEO). Il a été décrit que la présence de lymphocytes T et l'expression d'IFN- $\gamma$  au niveau du site tumoral étaient associées à un meilleur pronostic chez les patientes atteintes d'un CEO (Marth et al., 2004; Zhang et al., 2003b). Ces études ont mis en évidence qu'une réponse immunitaire anti-tumorale spontanée de type I pouvait se mettre en place et limiter le développement de la maladie mais ne parvenait cependant pas à éliminer la tumeur. La présence de divers mécanismes immunosuppresseurs au site tumoral a été décrite et montrée comme contribuant à diminuer l'efficacité de la réponse immunitaire. Notamment, dans le CEO, une accumulation de Treg a été observée au niveau de la tumeur et a été décrite comme étant directement corrélée avec un mauvais pronostic (Curiel et al., 2004; Wolf et al., 2005). Cependant, d'autres études réalisées par la suite n'ont pas observé de lien direct entre la fréquence des Treg et la survie des patientes (Preston et al., 2013; Sato et al., 2005). Ces travaux ont en revanche mis en évidence que les patientes qui présentaient un fort ratio CD8/Treg avaient une meilleure survie que celles avec un ratio plus faible suggérant ainsi que la présence de Treg au niveau de la tumeur inhibait l'effet bénéfique des LT CD8<sup>+</sup> dans le CEO (Preston et al., 2013; Sato et al., 2005).

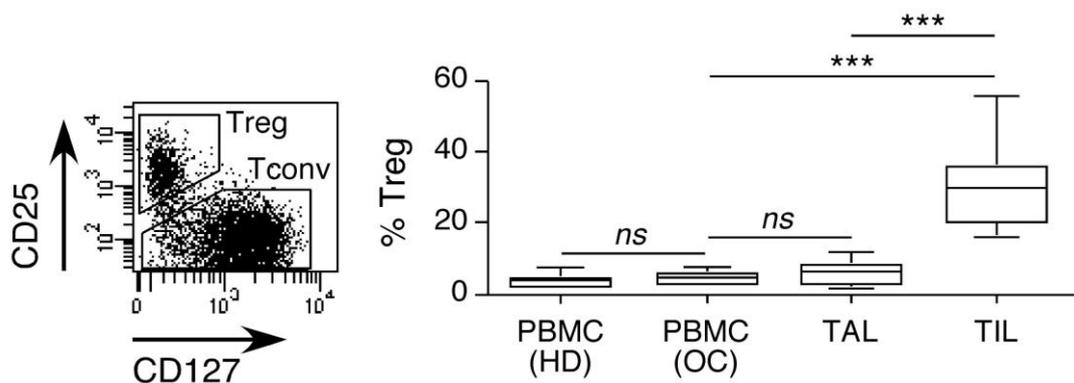
Certaines de nos études réalisées chez les donneurs sains ainsi que d'autres travaux, ont mis en évidence que la population des Treg était composée de plusieurs sous-types capables d'exprimer, en plus de FOXP3, un facteur de transcription associé à une des sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires et présentant à leur surface le ou les récepteurs de chimiokine associés à cette dernière (Ayyoub et al., 2009; Raffin et al., 2011; Zheng et al., 2009). Dans le cancer de l'ovaire, il a été suggéré que les Treg CCR4<sup>+</sup> étaient enrichis au niveau du site tumoral, suite à leur migration induite par CCL22 (Curiel et al., 2004). Une autre étude a cependant décrit un recrutement des Treg CCR10<sup>+</sup> au niveau de la tumeur dans le cancer de l'ovaire qui migreraient en suivant un gradient de concentration de CCL28 (Facciabene et al., 2011). En parallèle, d'autres travaux ont identifié chez la souris puis chez l'homme

une sous-population de Treg co-exprimant le facteur de transcription spécifique des  $T_H1$ , T-bet et présentant à leur surface CXCR3. Ces Treg posséderaient des propriétés migratoires et homéostatiques optimisées pour la suppression des réponses  $T_H1$  et n'avaient pas encore été étudiés dans le cadre du cancer (Hoerning et al., 2011; Koch et al., 2009).

Ces travaux ont mis en exergue une importante hétérogénéité au sein du compartiment des Treg qui doit dorénavant être prise en considération lors des études visant à définir les Treg. Etant donné qu'une meilleure caractérisation des Treg présents au site tumoral dans le CEO pourrait aider au choix de la stratégie thérapeutique anti-tumorale la mieux adaptée. J'ai entrepris, en collaboration avec le chercheur post-doctorant Dr Nassima Redjimi, l'étude des Treg FOXP3<sup>+</sup> présents au niveau du site tumoral dans le CEO.

## 1- Etude du stade de différenciation et du profil d'expression des récepteurs de chimiokine des Treg présents au niveau du site tumoral

Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer si, comme décrit précédemment, une accumulation de Treg au niveau du site tumoral était observée (Curiel et al., 2004). Nous avons ainsi isolé par tri immunomagnétique les LT CD4<sup>+</sup> issus des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains ou de patientes atteintes d'un CEO. De plus, les LT CD4<sup>+</sup> présents dans les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) obtenus à partir d'échantillons de tissus tumoraux solides et dans les lymphocytes T associés à la tumeur (TAL) récupérés à partir de prélèvements d'ascites ont également été isolés. Les LT CD4<sup>+</sup> ont ensuite été marqués avec des anticorps couplés à des fluorochromes dirigés contre CD4, CD25 et CD127 puis une analyse par cytométrie de flux a été effectuée.

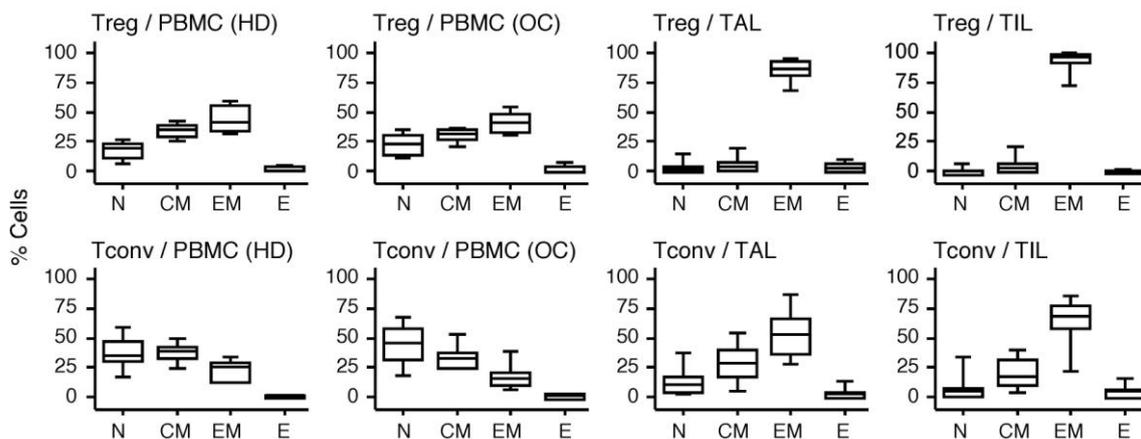


**Figure 34. Accumulation des Treg CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> au site tumoral dans le CEO.** Des LT CD4<sup>+</sup> issus des PBMC de donneurs sains ou de patientes atteintes d'un CEO ainsi que ceux issus des TIL et des TAL ont été marqués avec des anticorps anti-CD4, anti-CD25 et anti-CD127 puis analysés par cytométrie de flux. Les cellules CD4<sup>+</sup> ont été séparées en fonction de l'expression en surface de CD25 et CD127 en deux sous populations : les Treg (CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) et les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels (Tconv ; CD25<sup>-</sup>). Un exemple de cytogramme montrant l'expression de CD25 contre celle de CD127 dans les LT CD4<sup>+</sup> issus d'un TAL est présenté. L'histogramme récapitule les pourcentages de Treg obtenus dans les LT CD4<sup>+</sup> issus du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains (HD) (n = 15), de patientes atteintes d'un cancer ovarien (OC) (n = 15), de TAL (n = 17) et de TIL (n = 12). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le Student's t test bilatéral. ns = non significatif. \*\*\*, P < 0,001.

Nous avons constaté que les proportions de Treg (CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) présentes dans les LT CD4<sup>+</sup> issus du sang périphérique de patientes étaient équivalentes à celles observées dans les LT CD4<sup>+</sup> issus des PBMC de donneurs sains (Figure 34). En revanche, le pourcentage de Treg s'est montré être significativement plus élevé

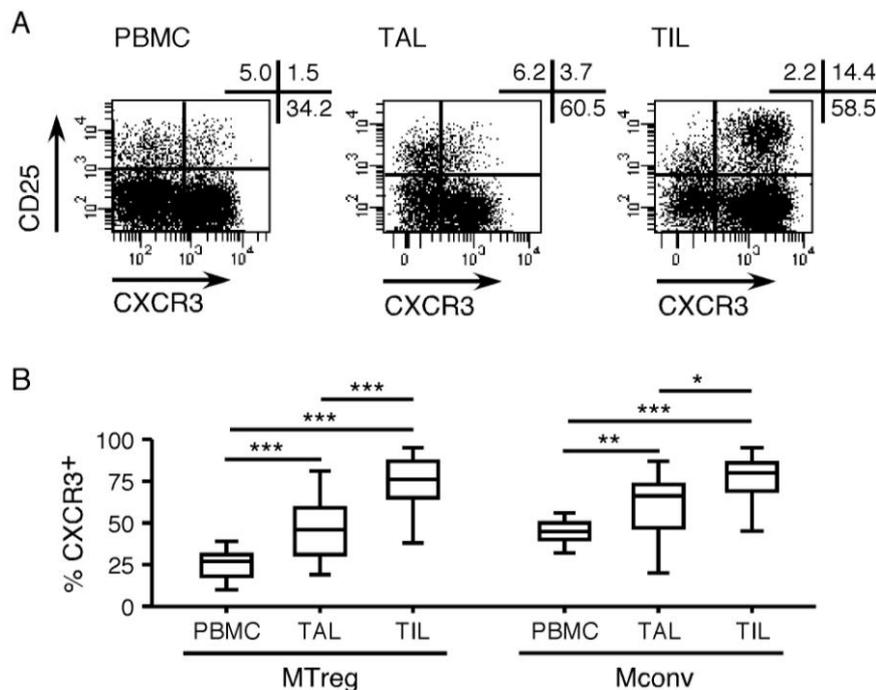
dans les échantillons tumoraux, en particulier dans les TIL, par rapport à celui observé dans le sang périphérique de patientes confirmant un enrichissement des Treg au niveau du site tumoral dans le CEO.

Afin de comparer l'état de différenciation des Treg et des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels (Tconv, CD25<sup>-</sup>) présents dans les PBMC, les TIL et les TAL, nous avons co-marqué les LT CD4<sup>+</sup> avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD127 et CD25 puis une analyse au cytomètre de flux à été réalisée. En fonction de l'expression de CD45RA et CCR7, les populations de Treg et de Tconv ont pu être divisées en quatre sous-groupes correspondant à quatre stades de différenciation distincts : les cellules naïves (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), les cellules mémoires centrales (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), les cellules mémoires effectrices (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) et les cellules effectrices (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Nos données ont montré que dans les TIL et TAL des patientes, les Treg et les Tconv présentaient un phénotype plus avancé dans la différenciation que celui observé dans les LT CD4<sup>+</sup> issus des PBMC de patientes ou de donneurs sains (Figure 35). En effet, un fort enrichissement en cellules effectrices mémoires et une absence de cellules naïves ont été observés parmi les Tconv et Treg au niveau du site tumoral.



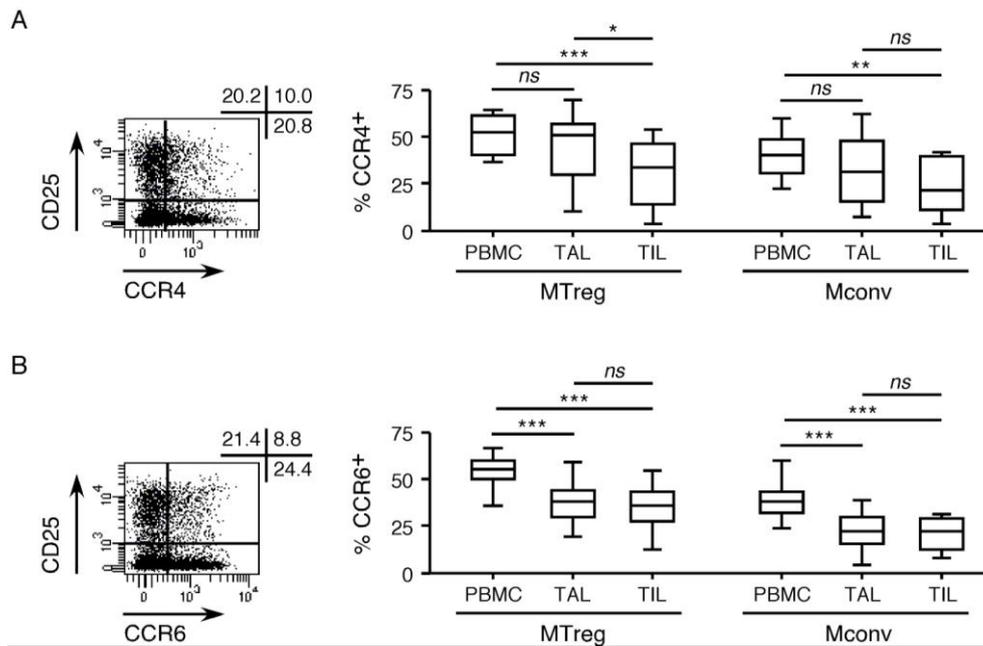
**Figure 35. Etude du stade de différenciation des Treg et Tconv issus des PBMC, des TIL ou des TAL de patientes ayant un CEO.** Des LT CD4<sup>+</sup> ont été isolés à partir des PBMC de donneurs sains ainsi qu'à partir des PBMC, TAL ou TIL de patientes atteintes d'un CEO. Un marquage avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD25 et CD127 a ensuite été réalisé et analysé par cytométrie de flux. Les proportions de cellules naïves (N, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), mémoires centrales (CM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), effectrices mémoires (EM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) et effectrices (E, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) dans les Treg et Tconv issus de PBMC de donneurs sains (HD, n = 15), de PBMC de patientes (OC, n = 15), de TAL (n = 17) et de TIL (n = 12) sont présentées.

L'expression de CXCR3, un récepteur de chimiokine préférentiellement exprimé à la surface des T<sub>H</sub>1, ainsi que celles de CCR4 et de CCR6 ont ensuite été étudiées à la surface des Treg mémoires (MTreg) et des Tconv mémoires (Mconv) présents dans les LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir des PBMC, TAL et TIL issus de patientes atteintes d'un CEO. Les résultats ont montré qu'en moyenne 25% des MTreg issus du sang périphérique de patientes exprimaient CXCR3, ce pourcentage étant équivalent à celui observé dans le sang périphérique de donneurs sains (Figure 36A-B). Le pourcentage moyen de MTreg CXCR3<sup>+</sup> présent dans les TAL s'est montré être significativement supérieur à celui observé dans la périphérie bien qu'inférieur à celui présent dans les TIL où la majorité des MTreg était CXCR3<sup>+</sup> (Figure 36A-B). Les Mconv se sont également révélés être fortement enrichis en cellules CXCR3<sup>+</sup> dans les TAL et TIL par rapport aux Mconv issus du sang périphériques (Figure 36).



**Figure 36. Les MTreg présents au niveau des tumeurs ovariennes sont fortement enrichis en cellules CXCR3<sup>+</sup>.** Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir des PBMC, des TAL ou des TIL de patientes atteintes d'un CEO ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et CXCR3 puis analysés par cytométrie de flux. **A**, Cytogrammes montrant l'expression de CXCR3 par rapport à celle de CD25 dans le compartiment mémoire (CD45RA<sup>-</sup> et CD45RA<sup>+</sup>CCR7) des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de prélèvements de PBMC, de TAL ou de TIL de patientes atteintes d'un CEO. **B**, Les proportions de cellules CXCR3<sup>+</sup> dans les MTreg et les Mconv issus de PBMC (n = 14), TAL (n = 16) et TIL (n = 12) issus de patientes atteintes d'un CEO sont présentées dans les diagrammes en boîte. \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001.

A l'inverse de CXCR3 et de façon surprenante par rapport à ce qui avait été précédemment suggéré dans la littérature, les proportions de cellules exprimant CCR4 ainsi que celles des cellules exprimant CCR6, parmi les MTreg et les Mconv présents au site tumoral dans le CEO, étaient plus faibles que celles observées dans le sang périphérique des patientes (Figure 37A-B) (Curiel et al., 2004).

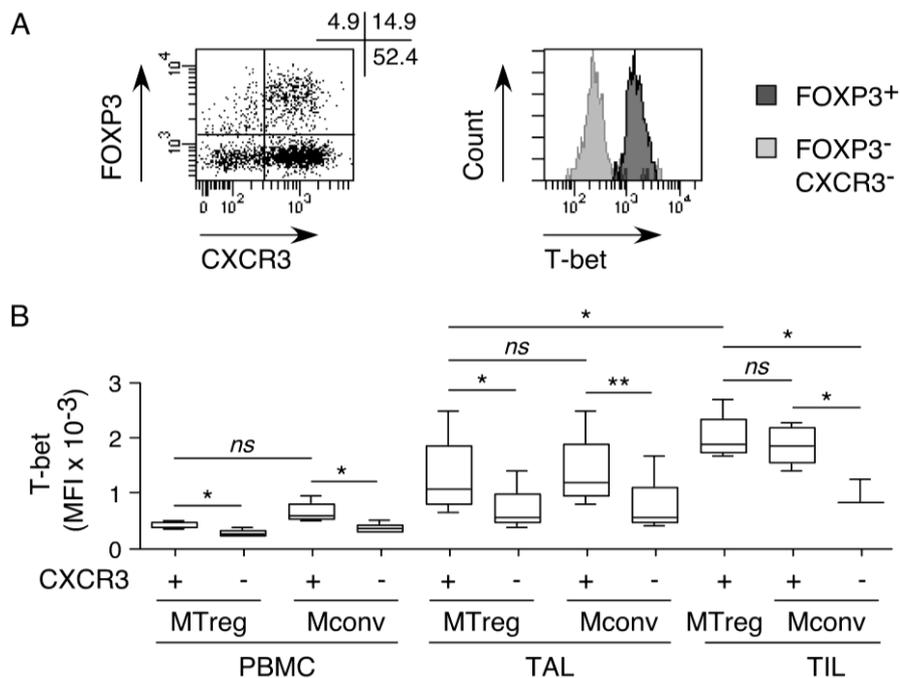


**Figure 37. Les MTreg présents au niveau des tumeurs ovariennes contiennent des proportions plus faibles de cellules CCR4<sup>+</sup> et CCR6<sup>+</sup> que les MTreg présents dans le sang périphérique.** Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir des PBMC, de TAL ou de TIL de patientes atteintes d'un CEO ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127, CCR4 et CCR6 puis analysés par cytométrie de flux. **A** et **B**, Les cytogrammes montrent l'expression de CCR4 (A) et CCR6 (B) par rapport à celle de CD25 dans le compartiment mémoire (CD45RA<sup>-</sup> et CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) de LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir d'un prélèvement de TIL de patiente atteinte d'un CEO. Les proportions de cellules CCR4<sup>+</sup> (A) et CCR6<sup>+</sup> (B) dans les MTreg et les Mconv issus de PBMC (n = 15), TAL (n = 16) et TIL (n = 12) issus de patientes atteintes d'un CEO sont présentées dans les diagrammes en boîte. ns = non significatif, P > 0,05 ; \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001.

Dans leur ensemble, ces résultats ont confirmé la présence d'une accumulation de Treg au niveau du site tumoral dans le CEO. De plus, les Treg présents dans les TIL se sont montrés être majoritairement à un stade de différenciation effecteur mémoire. Enfin, un fort enrichissement en cellules CXCR3<sup>+</sup> a été observé au site tumoral, aussi bien dans les MTreg que dans les LT CD4<sup>+</sup> mémoires conventionnels.

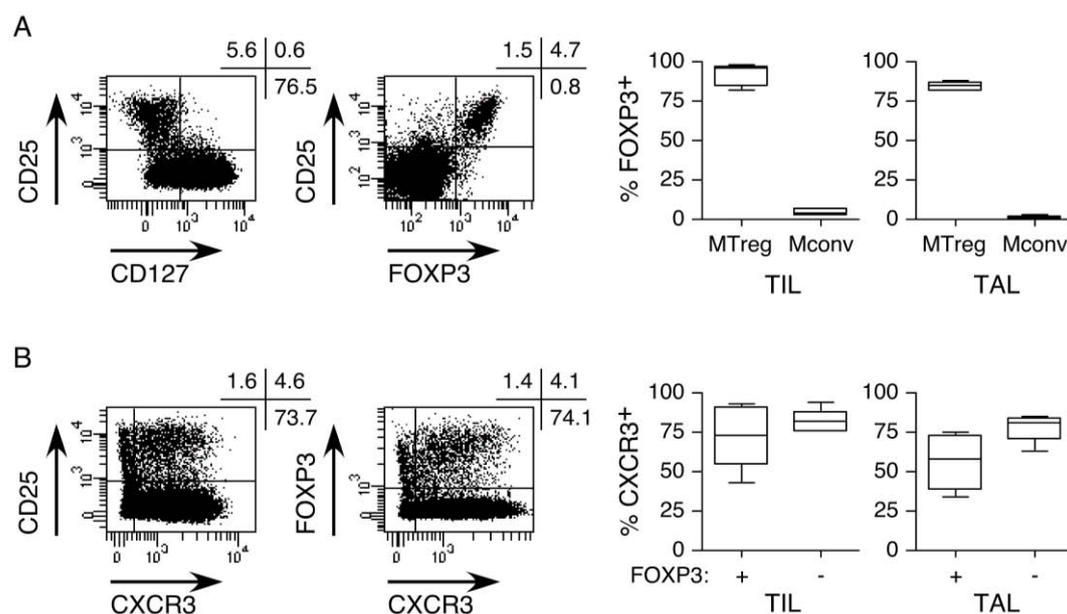
## 2- Etude de l'expression de T-bet, de la production d'IFN- $\gamma$ et des capacités suppressives des Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau des tumeurs ovariennes

Nous avons ensuite entrepris de caractériser à la fois phénotypiquement et fonctionnellement la sous-population de Treg CXCR3<sup>+</sup> présente majoritairement au site tumoral. CXCR3 étant un récepteur de chimiokine associé à l'expression du facteur de transcription T-bet dans les T<sub>H</sub>1, nous avons étudié si les Treg CXCR3<sup>+</sup> exprimaient également T-bet. Dans ce but, nous avons co-marqué des LT CD4<sup>+</sup>, isolés à partir de PBMC, de TAL et de TIL de patientes, avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127, CXCR3, FOXP3 et T-bet. Nos résultats ont montré que les MTreg CXCR3<sup>+</sup> présents dans les TIL et les TAL exprimaient T-bet *ex vivo*, et cela à des taux d'expression équivalents à ceux observés dans les Mconv CXCR3<sup>+</sup> (Figure 38). De plus, les niveaux d'expression de T-bet obtenus dans les MTreg et Mconv issus des TIL étaient supérieurs à ceux observés dans les TAL.



**Figure 38.** Les MTreg FOXP3<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau des tumeurs ovariennes expriment T-bet *ex vivo*. Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de PBMC, de TAL et de TIL de patientes atteintes d'un CEO ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD45RA, CCR7, CD25, CD127, CXCR3, FOXP3 et T-bet puis analysés par cytométrie de flux. **A**, A gauche, exemple d'un cytogramme montrant l'expression de CXCR3 contre celle de FOXP3 dans les LT CD4<sup>+</sup> mémoires issus d'un TIL, à droite exemple d'histogramme montrant l'expression de T-bet dans les populations CD4<sup>+</sup> mémoires indiquées. **B**, Diagrammes en boîte récapitulant les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) des marquages réalisés avec T-bet obtenus dans les populations MTreg et Mconv CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> dans les PBMC (n = 4), TAL (n = 4) et TIL (n = 4) analysées. ns, P > 0,05 ; \*, P < 0,05 ; \*\*, P < 0,01.

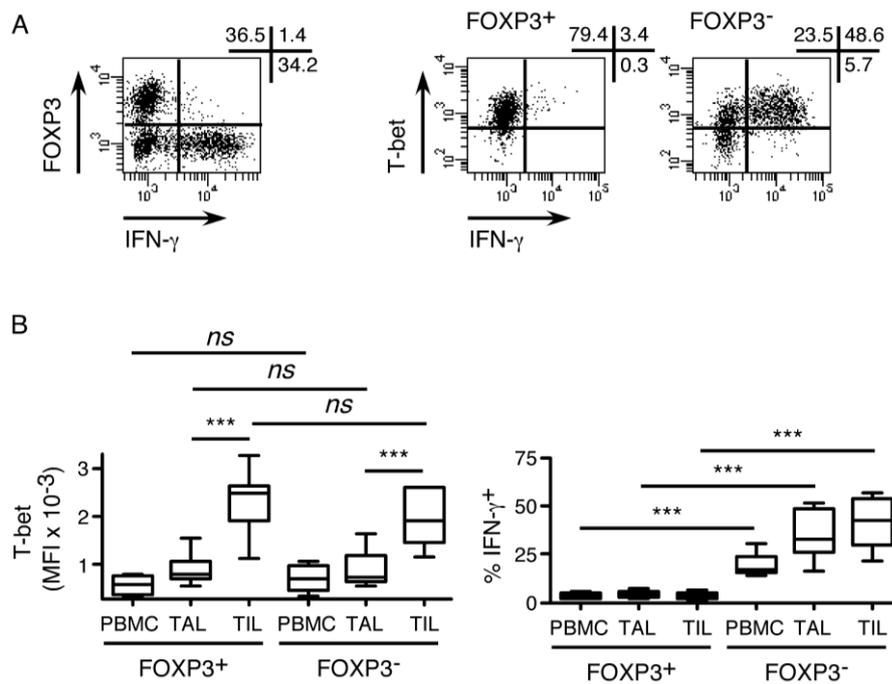
En parallèle, lors de ce même marquage, nous avons confirmé que les cellules CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> issues de TIL et de TAL étaient très majoritairement FOXP3<sup>+</sup> alors que les cellules CD25<sup>-</sup> étaient FOXP3<sup>-</sup> (Figure 39A). Par conséquent, les proportions de cellules CXCR3<sup>+</sup> observées dans les cellules FOXP3<sup>+</sup> se sont montrées être équivalentes à celles obtenues dans les MTreg CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (Figure 39B). Ces données ont confirmé que l'utilisation d'anticorps dirigés contre CD25 et CD127 ou l'utilisation d'un anticorps anti-FOXP3 permettaient de visualiser des proportions équivalentes de Treg contenant des pourcentages similaires de cellules CXCR3<sup>+</sup> au niveau du site tumoral.



**Figure 39. Les MTreg CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau des tumeurs ovariennes expriment FOXP3.** Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de TAL (n = 4) et de TIL (n = 5) de patientes atteintes d'un CEO ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127, CXCR3 et FOXP3 puis analysés par cytométrie de flux. **A**, Les cytogrammes montrent l'expression de CD127 et de FOXP3 par rapport à celle de CD25 parmi les LT CD4<sup>+</sup> mémoires totaux (CD45RA<sup>-</sup> et CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) issus d'un TAL. Les proportions de cellules FOXP3<sup>+</sup> dans les MTreg et les Mconv issus de TIL et de TAL sont résumées dans les diagrammes en boîte. **B**, Les cytogrammes montrent l'expression de CXCR3 par rapport à celle de CD25 et de FOXP3 parmi les LT CD4<sup>+</sup> mémoires totaux issus d'un TAL. Les proportions de cellules CXCR3<sup>+</sup> dans les cellules FOXP3<sup>+</sup> et FOXP3<sup>-</sup> issues de TIL et de TAL sont récapitulées dans les diagrammes en boîte.

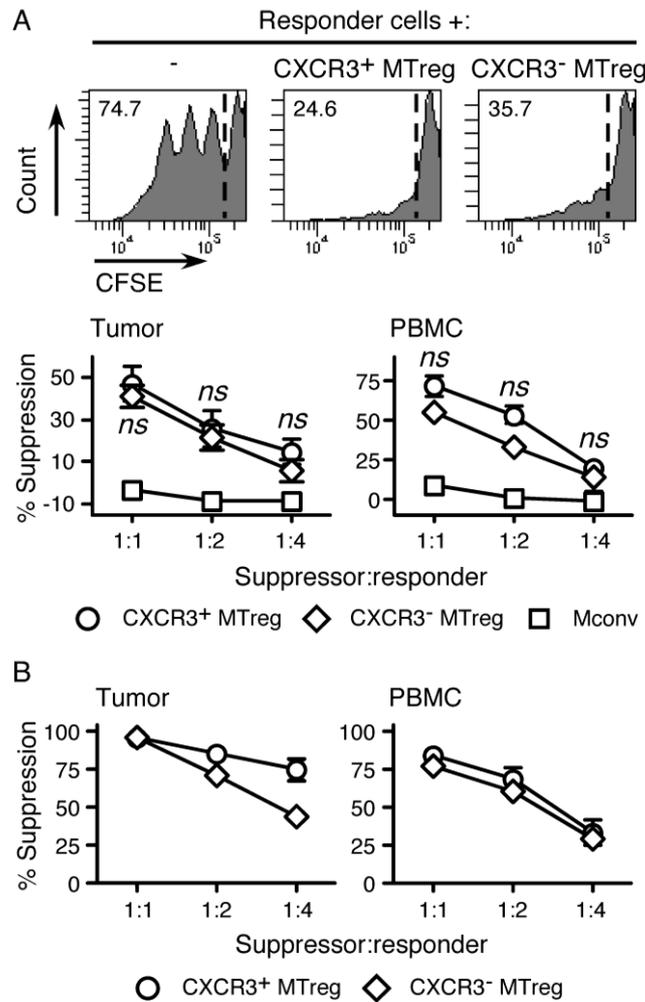
Alors que T-bet est impliqué dans la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , FOXP3 a été décrit comme étant apte à supprimer la production d'IFN- $\gamma$ . Etant donné que ces deux facteurs de transcription présentent des fonctions antagonistes, nous avons cherché

à déterminer les conséquences que leur co-expression avait sur la production d'IFN- $\gamma$  dans les Treg présents au site tumoral. Dans ce but, des LT CD4<sup>+</sup>, isolés à partir des PBMC, des TIL et des TAL de patientes atteintes de CEO, ont été stimulés en présence de PMA et de ionomycine, puis la production d'IFN- $\gamma$  a été analysée en parallèle avec l'expression de FOXP3 et de T-bet. Nous avons observé que les cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  étaient exclusivement présentes dans le compartiment FOXP3<sup>-</sup> des LT CD4<sup>+</sup> au site tumoral, bien que de forts pourcentages de cellules T-bet<sup>+</sup> aient été détectés à la fois dans les cellules FOXP3<sup>-</sup> et FOXP3<sup>+</sup> (Figure 40A-B). Ainsi, bien qu'exprimant T-bet, les Treg présents dans les TIL ne produisaient pas d'IFN- $\gamma$ .



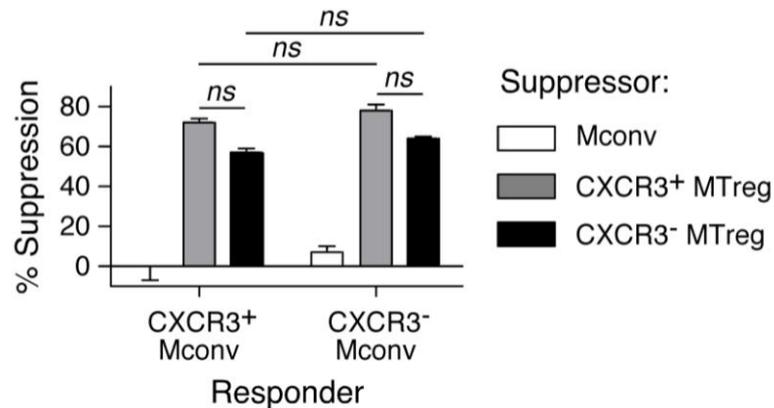
**Figure 40. Les MTreg FOXP3<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau des tumeurs ovariennes ne produisent pas d'IFN- $\gamma$  *ex vivo*.** Des LT CD4<sup>+</sup>, isolés à partir de PBMC, TAL et TIL de patientes atteintes d'un CEO, ont été stimulés 6h avec du PMA ionomycine (avec l'ajout de BFA après 1 heure d'incubation), marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD127, FOXP3, T-bet et IFN- $\gamma$  puis analysés par cytométrie de flux. **A**, A gauche figure un exemple de cytogramme montrant l'expression de FOXP3 contre la production d'IFN- $\gamma$  dans les LT CD4<sup>+</sup> issus d'un TIL. Les cytogrammes du milieu et de droite montrent l'expression de T-bet contre la production d'IFN- $\gamma$  dans les compartiments FOXP3<sup>+</sup> et FOXP3<sup>-</sup> des LT CD4<sup>+</sup> issus d'un TIL représentatif. **B**, Les moyennes d'intensité de fluorescence du marquage de T-bet et les pourcentages moyens de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  dans les cellules FOXP3<sup>+</sup> et FOXP3<sup>-</sup> issues de PBMC (n = 6), de TAL (n = 15) et de TIL (n = 10) de patientes sont présentés dans les digrammes en boîte. ns, P > 0,05 ; \*\*\*, P < 0,001.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si la co-expression de T-bet et de FOXP3 dans les Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site tumoral avait un impact sur leurs capacités suppressives. Dans le but de réaliser un test de suppression, nous avons séparé *ex vivo*, par cytométrie de flux, les MTreg CXCR3<sup>+</sup> et les MTreg CXCR3<sup>-</sup> présents dans les PBMC, les TAL et les TIL de patientes atteintes d'un CEO. Ces populations ont ensuite été mises en co-culture, à différents ratios, avec des Mconv, utilisés en tant que cellules répondeuses, marqués avec du CFSE en présence de monocytes irradiés et de PHA. Après 5 jours de culture, la dilution du CFSE dans chacune des conditions testées a été mesurée par cytométrie de flux, permettant d'obtenir les pourcentages de suppression de la prolifération des cellules répondeuses. Nos résultats ont montré que les MTreg CXCR3<sup>+</sup> étaient tout autant suppressifs que les MTreg CXCR3<sup>-</sup>, aussi bien dans les PBMC qu'au niveau du site tumoral (Figure 41A). Afin d'évaluer l'aptitude des MTreg CXCR3<sup>+</sup> à supprimer la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules répondeuses, nous avons dosé la quantité d'IFN- $\gamma$  présente dans le surnageant des cultures à jour 5 par ELISA. Les résultats ont révélé que les MTreg CXCR3<sup>+</sup> ainsi que les MTreg CXCR3<sup>-</sup> supprimaient efficacement la sécrétion d'IFN- $\gamma$  dans les cultures testées (Figure 41B).



**Figure 41. Les MTreg FOXP3<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau des tumeurs ovariennes sont fortement suppressifs *ex vivo*.** Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de PBMC (n = 3), TAL (n = 3) et TIL (n = 1) de patientes atteintes d'un CEO ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et CXCR3 puis triés par cytométrie de flux en MTreg et Mconv CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup>. Les populations triées ont ensuite été mises en co-culture avec des cellules répondeuses marquées avec du CFSE à différents ratios en présence de monocytes irradiés et de PHA. **A**, Après 5 jours de culture, la dilution du CFSE a été analysée par cytométrie de flux. Les histogrammes montrent la dilution du CFSE en présence ou non des populations cellulaires indiquées à un ratio 1:1 (les nombres indiqués dans les histogrammes correspondent aux pourcentages de cellules divisées). Les pourcentages de suppression de la prolifération des cellules répondeuses, obtenus après calculs (*cf.* la section matériels et méthodes), sont présentés pour toutes les populations testées et à tous les ratios effectués. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le Student's t test bilatéral et ont visé à comparer les pourcentages de suppression obtenus en présence de MTreg CXCR3<sup>+</sup> avec ceux obtenus en présence de MTreg CXCR3<sup>-</sup> dans les 3 ratios testés. ns, P > 0,05. **B**, La quantité d'IFN- $\gamma$  a été dosée par ELISA dans les surnageants des cultures à jour 5. Les pourcentages de suppression de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules répondeuses obtenus après co-culture en présence des populations MTreg CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> à différents ratios sont présentés.

Enfin, afin de déterminer si la capacité suppressive des MTreg CXCR3<sup>+</sup> variait en fonction de la présence ou de l'absence d'une expression de CXCR3 à la surface des cellules répondeuses, nous avons répété ce test de suppression en remplaçant les cellules répondeuses (Mconv totaux) par des Mconv CXCR3<sup>+</sup> ou CXCR3<sup>-</sup> marqués avec du CFSE. Les données obtenues ont mis en évidence que les MTreg CXCR3<sup>+</sup>, ainsi que les MTreg CXCR3<sup>-</sup>, étaient tout aussi aptes à supprimer la prolifération de cellules CXCR3<sup>+</sup> que de cellules CXCR3<sup>-</sup> (Figure 42).



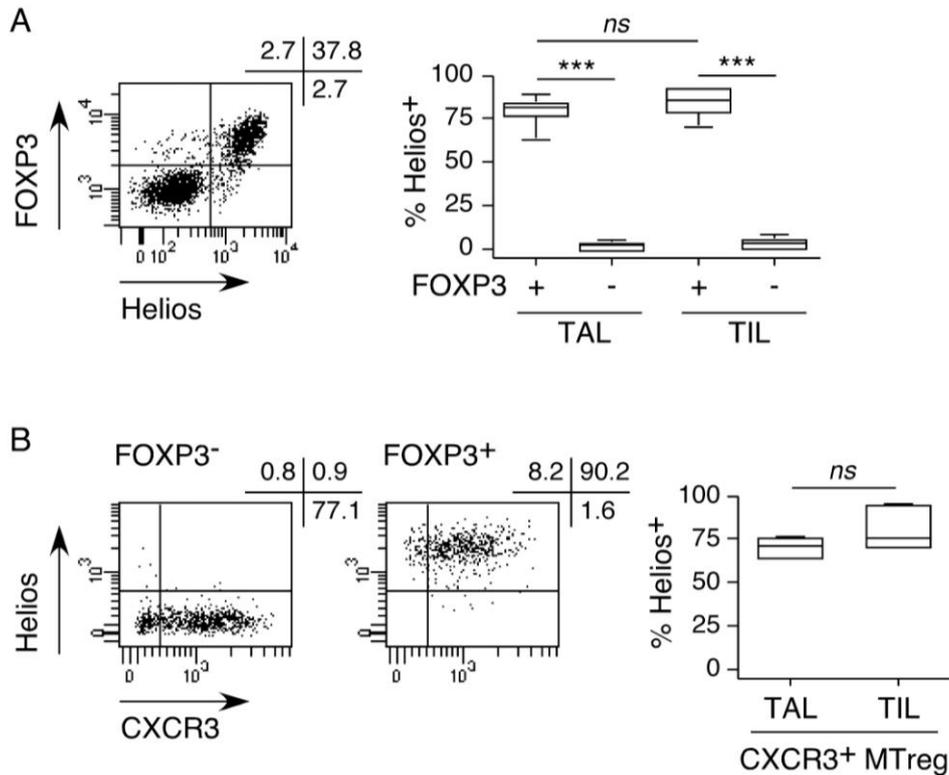
**Figure 42. Les MTreg CXCR3<sup>+</sup> suppriment la prolifération des Mconv CXCR3<sup>+</sup> et des Mconv CXCR3<sup>-</sup>.** Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de PBMC issus de donneurs sains (n = 3) ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et CXCR3 puis triés par cytométrie de flux en MTreg CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> et en Mconv CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> et Mconv totaux. Les populations isolées de MTreg CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> ainsi que les Mconv totaux ont été mis en co-cultures à un ratio 1:1 (répondeur:suppresseur) avec des Mconv CXCR3<sup>+</sup> ou CXCR3<sup>-</sup>, ayant été préalablement marqués avec du CFSE, en présence de monocytes irradiés et de PHA. La dilution du CFSE a été mesurée au 5<sup>ème</sup> jour par cytométrie de flux. Le pourcentage de suppression est présenté pour toutes les populations testées (mean ± SEM).

Dans leur ensemble, ces résultats ont montré que les MTreg FOXP3<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> présents dans les TIL co-exprimaient T-bet mais ne produisaient pas d'IFN- $\gamma$  et étaient tout aussi aptes que les MTreg CXCR3<sup>-</sup> à supprimer la prolifération et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs.

### 3- Recherche de l'origine des Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau du site tumoral dans le CEO

Nous avons poursuivi la caractérisation des MTreg CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau du site tumoral dans le CEO en nous intéressant à l'origine, thymique ou périphérique, de cette sous-population. Bien qu'aucun marqueur de surface permettant de distinguer phénotypiquement les nTreg des iTreg n'ait pour le moment été clairement identifié, le facteur de transcription Helios a été décrit comme étant exprimé par les nTreg mais pas par les iTreg (Thornton et al., 2010). Nous avons ainsi réalisé l'étude de l'expression d'Helios par rapport à celles de CXCR3 et de FOXP3 dans les LT CD4<sup>+</sup> issus de TIL et de TAL. L'analyse a révélé que la grande majorité des MTreg FOXP3<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> présents dans les TIL et TAL des patientes étaient Helios<sup>+</sup> alors que les cellules FOXP3<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> étaient Helios<sup>-</sup> (Figure 43A-B). L'expression d'Helios par la majorité des MTreg CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau du site tumoral a suggéré que ces derniers étaient principalement d'origine thymique.

Cependant, la valeur d'Helios en tant que marqueur des nTreg est actuellement controversée au sein de la communauté scientifique. En effet, certaines études sont parvenues à obtenir, après stimulation antigénique *in vitro* et *in vivo*, des Treg FOXP3<sup>+</sup> induits exprimant Helios à partir de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels issus de souris transgéniques (Gottschalk et al., 2012; Verhagen and Wraith, 2010). Nous avons, par conséquent, entrepris de poursuivre l'étude de l'origine des MTreg CXCR3<sup>+</sup> en analysant l'aptitude des populations naïves CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> conventionnelles FOXP3<sup>-</sup> (Nconv, CD25<sup>-</sup>) et régulatrices FOXP3<sup>+</sup> (NTreg, CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), décrites comme étant d'origine thymique, à se différencier en cellules présentant des caractéristiques similaires aux MTreg CXCR3<sup>+</sup> présents au site tumoral (Figure 44A). Nous avons ainsi isolé, *ex vivo* par cytométrie de flux, les Nconv et les NTreg issus du sang périphérique de donneurs sains. Les populations naïves ont ensuite été stimulées à l'aide de billes couplées à des anticorps dirigés contre CD2, CD3 et CD28 dans un contexte cytokinique neutre (IL-2 seule) ou polarisant pro-T<sub>H</sub>1 (IL-2 avec IL-12 et/ou IFN- $\gamma$ ).



**Figure 43. Les MTreg FOXP3<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau des tumeurs ovariennes expriment le facteur de transcription Helios *ex vivo*.** **A**, Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de TAL et TIL de patientes atteintes d'un CEO ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, FOXP3 et Helios puis analysés par cytométrie de flux. Un exemple de cytogramme montrant l'expression de FOXP3 contre celle d'Helios dans les LT CD4<sup>+</sup> issus d'un TIL est présenté. Le diagramme en boîte récapitule les pourcentages de cellules Helios<sup>+</sup> obtenus dans les compartiments FOXP3<sup>+</sup> et FOXP3<sup>-</sup> des LT CD4<sup>+</sup> issus de TAL (n = 15) et de TIL (n = 10). **B**, Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de TAL et TIL de patientes atteintes d'un CEO ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CXCR3, CD127, FOXP3 et Helios puis analysés par cytométrie de flux. Les cytogrammes montrent l'expression de Helios contre celle de CXCR3 dans les LT CD4<sup>+</sup> mémoires FOXP3<sup>+</sup> et FOXP3<sup>-</sup> issus d'un TIL représentatif. Le diagramme en boîte récapitule les pourcentages de cellules Helios<sup>+</sup> obtenus dans les MTreg FOXP3<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> des LT CD4<sup>+</sup> issus de TAL (n = 4) et de TIL (n = 5). ns, P > 0,05 ; \*\*\*, P < 0,001.

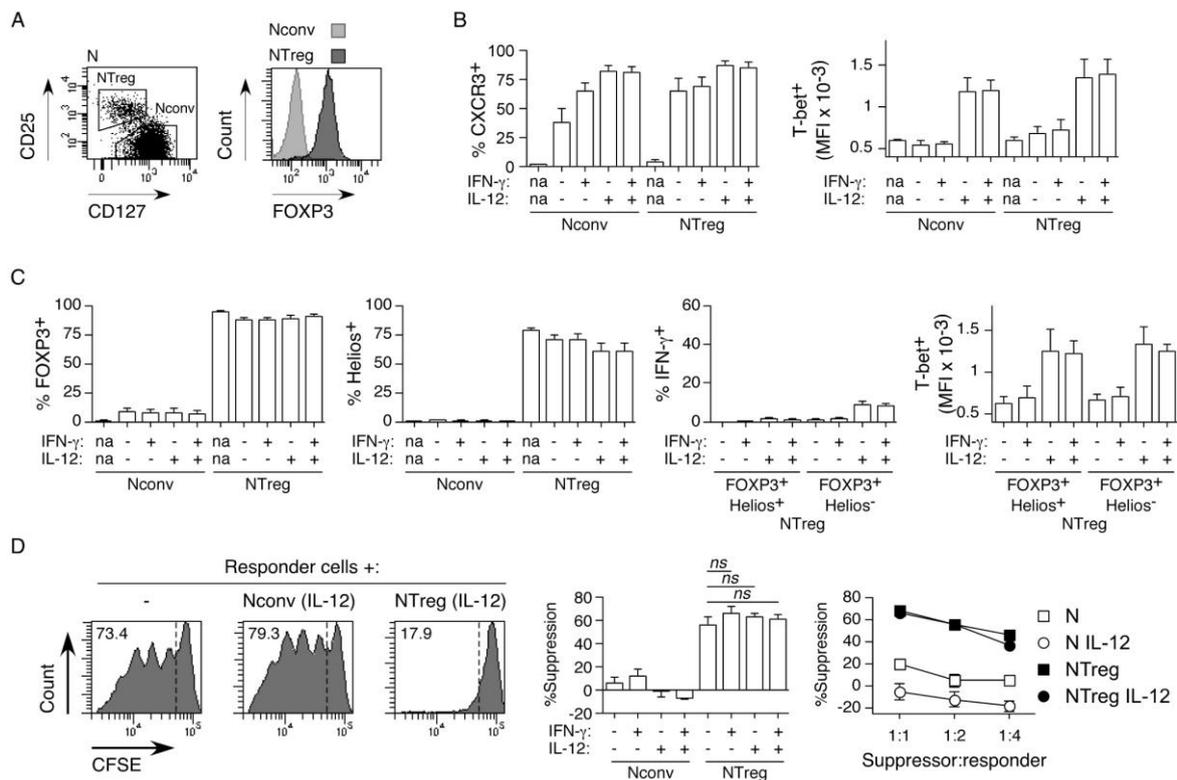
Après 12 jours, l'expression de CXCR3 ainsi que celle de T-bet ont été analysées par cytométrie de flux dans les différentes cultures. Alors qu'*ex vivo* aucune des deux sous-populations naïves n'exprimait CXCR3 ni T-bet, la présence d'IL-2 dans les cultures a suffi à induire l'expression de CXCR3 dans environ 40% des Nconv et 65% des NTreg (Figure 44B). L'ajout d'IFN- $\gamma$  dans le milieu de culture a permis d'obtenir un pourcentage de cellules CXCR3<sup>+</sup> dans les Nconv équivalent à celui obtenu dans les NTreg où l'IFN- $\gamma$  n'a pas semblé influencer sur le pourcentage de

cellules CXCR3<sup>+</sup>. Les pourcentages les plus élevés de cellules CXCR3<sup>+</sup> ont été observés en présence d'IL-12, seule ou associée à l'IFN- $\gamma$ , avec plus de 80% de cellules exprimant CXCR3 dans les Nconv et les NTreg. De plus, une forte induction de l'expression de T-bet a été observée dans les Nconv et de NTreg dans les cultures stimulées en présence d'IL-12 (Figure 44B).

Nous avons également étudié l'expression de FOXP3 et d'Helios dans les cultures obtenues après 12 jours. Une absence de cellules exprimant Helios ainsi qu'un pourcentage très faible de cellules FOXP3<sup>+</sup> ont été observés dans les cultures de Nconv (Figure 44C). En revanche, l'expression de FOXP3 ainsi que celle d'Helios étaient fortement maintenues dans les cultures de NTreg dans les différentes conditions cytokiniques testées. Nous avons également stimulé avec du PMA et de la ionomycine une fraction des NTreg en culture après 12 jours puis une analyse de l'expression de T-bet ainsi que de la production d'IFN- $\gamma$  a été réalisée par cytométrie de flux, en distinguant les sous-populations FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> et FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>. Nous avons observé que, malgré une forte induction de T-bet, aucune production d'IFN- $\gamma$  n'était détectée parmi les cellules FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> obtenues à partir des cultures de NTreg ayant été stimulés en présence d'IL-12 (Figure 44C).

Enfin, nous avons étudié les capacités suppressives des Nconv et NTreg après 12 jours de stimulation dans les différentes conditions cytokiniques testées. Les cellules ont ainsi été mises en co-culture avec des cellules répondeuses marquées avec du CFSE en présence de monocytes irradiés et de PHA, puis une mesure de la dilution du CFSE a été réalisée après 5 jours. Les données obtenues ont mis en évidence que dans toutes les conditions cytokiniques testées, les NTreg stimulés présentaient de fortes capacités suppressives (Figure 44D).

Dans leur ensemble, ces résultats ont montré qu'après stimulation *in vitro* en présence de cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>1, des NTreg issus du sang périphérique de donneurs sains pouvaient générer une population de Treg CXCR3<sup>+</sup> exprimant FOXP3, Helios et T-bet, possédant des propriétés suppressives et ne produisant pas d'IFN- $\gamma$ . Par conséquent, cette population générée à partir des NTreg présentait des caractéristiques similaires à celles des Treg CXCR3<sup>+</sup> observés au site tumoral dans le CEO.



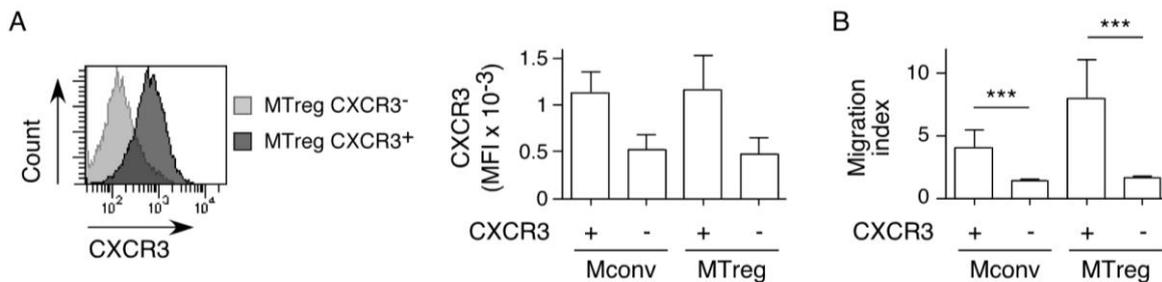
**Figure 44. Les MTreg CXCR3<sup>+</sup> peuvent être générés à partir de NTreg *in vitro* après stimulation en présence de cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>1.** **A**, Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de PBMC de donneurs sains ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD127 et CD25 puis les LT CD4<sup>+</sup> naïfs (N, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) ont été triés par cytométrie de flux en Nconv et NTreg en fonction de l'expression de CD25 et CD127 comme présenté sur le cytogramme. Une fraction des LT CD4<sup>+</sup> a en plus été marquée avec un anticorps anti-FOXP3, l'histogramme représente l'expression de FOXP3 dans les Nconv et NTreg. **B**, Les cellules triées ont été stimulées *in vitro* avec des microbilles anti-CD2/CD3/CD28 en présence d'IL-2 et les cytokines indiquées. Après 12 jours, une fraction des cultures a été marquée avec un anticorps anti-CXCR3 ou stimulée 4 heures avec du PMA/ionomycine puis marquée avec un anticorps anti-T-bet. L'expression de CXCR3 et de T-bet ont aussi été mesurée sur des NTreg et Nconv *ex vivo*. Les proportions de cellules CXCR3<sup>+</sup> et les MFI du marquage de T-bet obtenues *ex vivo* (↓) et dans les cultures sont présentées (n = 4). na = non applicable. **C**, Des fractions des cultures obtenues (en B) ont été stimulées 4 heures avec du PMA/ionomycine puis marquées avec des anticorps dirigés contre FOXP3, Helios, T-bet et IFN- $\gamma$  et analysées. Les proportions de cellules FOXP3<sup>+</sup> et Helios<sup>+</sup> obtenues dans les Nconv et NTreg *ex vivo* et après culture sont présentées (n = 4). Les pourcentages de cellules IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> et les MFI du marquage de T-bet obtenus dans les fractions FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> des NTreg *ex vivo* et après culture sont montrés (n = 4). **D**, Les capacités suppressives des populations obtenues comme en B ont été testées. Les histogrammes montrent la dilution du CFSE en l'absence (gauche) ou en présence à un ratio 1:1 de Nconv (milieu) ou de NTreg (droite) après culture avec de l'IL-12 (les nombres indiquent les pourcentages de cellules divisées). Les pourcentages de suppression sont présentés pour toutes les conditions et à tous les ratios testés (n = 3 ; moyenne  $\pm$  SEM).

Le fait que les Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site tumoral se soient montrés exprimer majoritairement le facteur de transcription Helios et qu'une population présentant des caractéristiques similaires ait pu être générée à partir de lymphocytes T régulateurs naïfs, décrits comme ayant une origine thymique, suggère que les Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site de la tumeur dans le CEO seraient principalement dérivés des nTreg.

#### **4- Etude de l'aptitude des Treg CXCR3<sup>+</sup> à migrer au niveau du site tumoral en suivant un gradient de concentration de CXCL10**

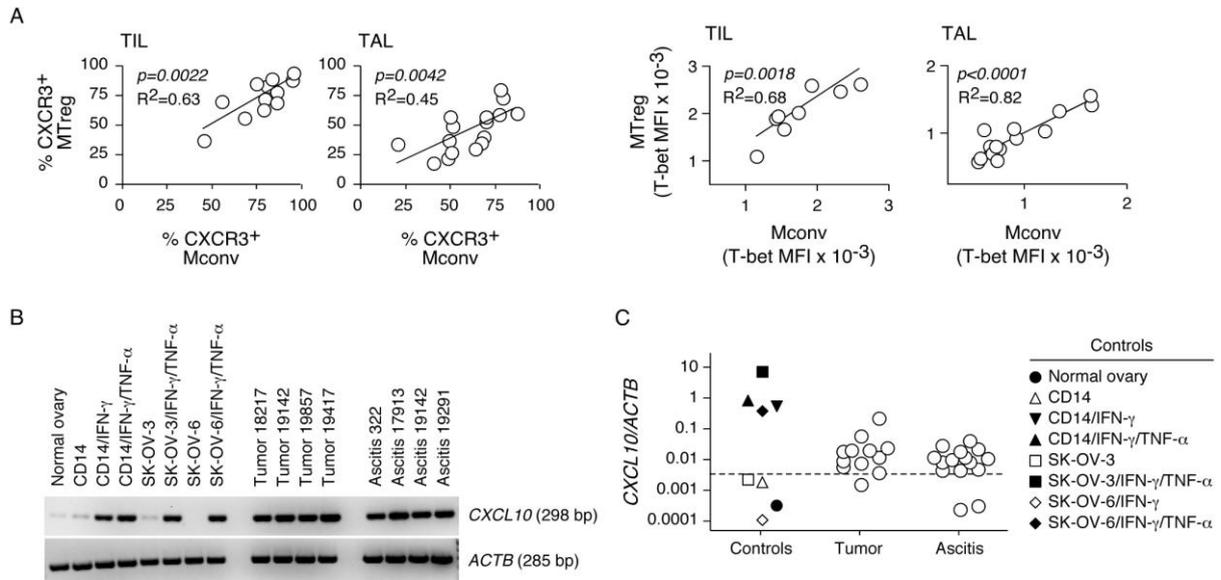
Nous avons ensuite cherché à comprendre par quel mécanisme avait lieu l'accumulation des MTreg CXCR3<sup>+</sup> au site tumoral. Ces derniers ayant vraisemblablement une origine thymique, leur accumulation au niveau du site tumoral ne semble pas pouvoir être due à une conversion intra-tumorale de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels en Treg induits. Etant donné que CXCR3 est un récepteur de chimiokine, qui a pour ligand CXCL10, nous avons émis l'hypothèse que les MTreg CXCR3<sup>+</sup> pourraient migrer vers la tumeur en suivant un gradient de concentration de CXCL10. Nous avons par conséquent réalisé un test de migration visant à étudier l'aptitude de MTreg CXCR3<sup>+</sup> et Mconv CXCR3<sup>+</sup>, issus de donneurs sains, à migrer en suivant un gradient de concentration CXCL10. Les résultats obtenus ont montré que les deux sous-populations CXCR3<sup>+</sup> migraient efficacement par chimiotactisme via CXCL10 (Figure 45A-B).

De plus, en réalisant l'étude comparative des pourcentages de cellules CXCR3<sup>+</sup> dans les MTreg présents dans les TIL et les TAL, par rapport à ceux des cellules CXCR3<sup>+</sup> présentes dans les Mconv CXCR3<sup>+</sup>, nous avons constaté que les proportions de ces deux populations CXCR3<sup>+</sup> étaient directement corrélées (Figure 46A). De façon similaire, le niveau d'expression de T-bet dans les MTreg s'est montré être corrélé à celui des Mconv dans les TIL et les TAL. Ces résultats nous ont suggéré que les cellules CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> présentes dans les Mconv et les MTreg s'accumuleraient au niveau des TIL et des TAL par le biais d'un mécanisme commun.



**Figure 45. Les MTreg CXCR3<sup>+</sup> migrent efficacement via un gradient de concentration de CXCL10.** Des LT CD4<sup>+</sup> isolés à partir de PBMC issus de donneurs sains (n = 3) ont été marqués avec des anticorps dirigés contre CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et CXCR3 puis triés par cytométrie de flux en MTreg CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> et en Mconv CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup>. Les populations isolées ont été stimulées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-2. **A**, Une fraction de chacune des cultures, à jour 10, a été marquée avec un anticorps anti-CXCR3 et analysée par cytométrie de flux. Des histogrammes montrant l'expression de CXCR3 dans les MTreg CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> pour un donneur et les résultats obtenus pour toutes les populations et tous les donneurs sont présentés (moyenne ± SEM). **B**, L'aptitude à migrer en suivant un gradient de concentration de CXCL10 des cultures à jour 10 a été évaluée. Les index de migration obtenus pour toutes les populations testées sont récapitulés (moyenne ± SEM). \*\*\*, P < 0,001.

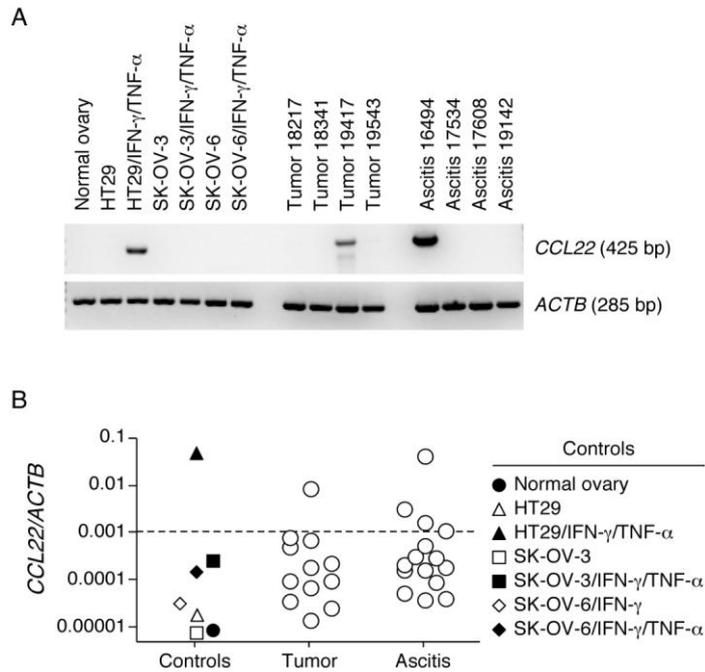
Nous avons en parallèle étudié l'expression de CXCL10 par PCR conventionnelle et par PCR en temps réel dans des échantillons d'ascites et de tumeurs solides ovariennes ainsi que dans des échantillons de tissus ovariens sains. L'expression de CXCL10 a également été mesurée dans des cellules CD14<sup>+</sup> et des lignées de tumeurs ovariennes (SK-OV-3 et SK-OV-6) préalablement stimulées en présence ou en l'absence d'IFN- $\gamma$ , qui a été décrit comme étant impliqué dans l'induction de l'expression de CXCL10, avec ou sans TNF- $\alpha$ , durant 24 heures. Les résultats obtenus ont révélé qu'aucune expression de CXCL10 n'était détectable dans le tissu ovarien sain alors qu'une forte expression de CXCL10 a été observée dans la majorité des tumeurs solides (11/12) et des ascites (13/15) analysées (Figure 46B-C). Une expression de CXCL10 a été détectée dans les cellules CD14<sup>+</sup> et les lignées cellulaires de tumeurs ovariennes après traitement avec de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ . Par conséquent, les cellules présentatrices d'antigène et les cellules tumorales étaient tout aussi aptes à exprimer CXCL10 en présence d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ .



**Figure 46. La proportion de MTreg CXCR3<sup>+</sup> corrèle avec celle des Mconv CXCR3<sup>+</sup> au niveau des tumeurs ovariennes et concorde avec l'expression de CXCL10.** **A**, Les diagrammes de dispersion et les lignes de régression représentent la corrélation entre la proportion de cellules CXCR3<sup>+</sup> dans les MTreg et celle présente dans les Mconv ainsi que la corrélation entre la MFI du marquage T-bet dans les MTreg et les Mconv issus de TIL et de TAL. **B et C**, L'expression génique de CXCL10 a été mesurée par PCR conventionnel (B) et PCR quantitative (C) dans des tissus ovariens sains (normal ovary), dans des prélèvements de tumeurs ovariennes et dans des échantillons de cellules associées à l'ascite ainsi que dans des cellules CD14<sup>+</sup> issues des PBMC de donneur sain et des lignées cellulaires de tumeurs ovariennes (SK-OV-3 et SK-OV-6) traitées ou non avec de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ .

Nous avons également réalisé l'étude de l'expression de CCL22, le ligand de CCR4, dans les échantillons de TIL et de TAL. En accord avec le faible pourcentage de Treg CCR4<sup>+</sup> observé dans les tumeurs (Figure 37), nos données ont révélé que seule une minorité des échantillons de tumeurs solides (1/12) et d'ascites exprimaient CCL22 (3/15) (Figure 47A-B).

Dans leur ensemble, nos résultats ont montré que les MTreg CXCR3<sup>+</sup> étaient aptes à migrer en suivant un gradient de concentration de CXCL10, que les proportions de cellules CXCR3<sup>+</sup> parmi les MTreg étaient corrélées à celles présentes dans les Mconv CXCR3<sup>+</sup> au niveau du site tumoral et que la majorité des tumeurs solides ovariennes et des ascites exprimaient CXCL10.



**Figure 47. Etude de l'expression de CCL22 dans les tumeurs ovariennes.** A et B, L'expression génique de CCL22 a été mesurée par PCR conventionnel (A) et PCR quantitative (B) dans des tissus ovariens sains (normal ovary), dans des prélèvements de tumeurs ovariennes et dans des échantillons de cellules associées à l'ascite de patiente ayant un CEO ainsi que dans des lignées cellulaires de cancer du colon (HT29) et de tumeurs ovariennes (SK-OV-3 et SK-OV-6) traitées ou non avec de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ .

### 5- Bilan de la Partie 3

En accord avec l'étude de Curiel et al., nous avons observé une accumulation des Treg au niveau du site tumoral chez les patientes atteintes d'un CEO (Curiel et al., 2004). Néanmoins, à l'inverse de l'étude de Curiel, notre analyse de l'expression des récepteurs de chimiokine a mis en évidence que les Treg CCR4<sup>+</sup> étaient rares au niveau du site tumoral et qu'en revanche les Treg CXCR3<sup>+</sup> représentaient la sous-population de Treg majoritaire. Ces Treg CXCR3<sup>+</sup> co-exprimaient T-bet mais ne produisaient pas d'IFN- $\gamma$  et supprimaient la prolifération et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des LT effecteurs. De plus, la majorité des Treg CXCR3<sup>+</sup> présents dans les TIL exprimaient Helios et des NTreg se sont montrés aptes à se différencier en cellules présentant des caractéristiques similaires à celles des Treg CXCR3<sup>+</sup> observés au site tumoral, suggérant une origine thymique de ces derniers. Enfin la proportion des Treg CXCR3<sup>+</sup> s'est révélée corrélée directement avec celle des LT effecteurs CXCR3<sup>+</sup> au niveau du site tumoral dans le CEO. De plus, une expression de CXCL10 a été observée dans la majorité des tumeurs. Ces résultats ont suggéré que la migration sélective des Treg CXCR3<sup>+</sup> en suivant un gradient de concentration de CXCL10 pourrait être l'un des mécanismes qui contribuent à l'accumulation de ces cellules au niveau du site tumoral dans le CEO.

# Discussion & Perspectives

## **Discussion de la Partie 1 : L'expression de l'IL-1RI chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains *ex vivo* identifie un intermédiaire précoce dans la voie de différenciation des T<sub>H</sub>17 à partir des lymphocytes T régulateurs FOXP3<sup>+</sup> naïfs**

Au cours de ma première année de thèse, nous nous sommes intéressés à la relation entre les Treg et les T<sub>H</sub>17 humains. Précédemment, lors de l'étude de la différenciation des T<sub>H</sub>17 à partir des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs et des NTreg chez l'homme, nous avons mis en évidence une prédisposition des NTreg à se différencier en T<sub>H</sub>17, après une stimulation *in vitro* en présence de cytokines polarisantes, dont l'IL-1β (Valmori et al., 2010). Un rôle important de l'IL-1RI dans la voie de différenciation des T<sub>H</sub>17 avait été suggéré par nos résultats. En effet, une induction de l'expression de l'IL-1RI avait été observée chez les NTreg mais pas chez les LT CD4<sup>+</sup> naïfs conventionnels après stimulation, pouvant en partie expliquer la prédisposition des NTreg à devenir T<sub>H</sub>17. De plus, d'autres études ont également mis en évidence que l'IL-1RI était nécessaire à la différenciation des T<sub>H</sub>17. En effet, il a été décrit que les LT CD4<sup>+</sup> naïfs issus de souris déficientes en IL-1RI ne parvenaient pas à se différencier en T<sub>H</sub>17, *in vitro*, après stimulation en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17 (Chung et al., 2009). De plus chez l'homme, un lien entre l'expression de l'IL-1RI par les LT CD4<sup>+</sup> et leur aptitude à produire de l'IL-17 a été mis en évidence (Lee et al., 2010). En parallèle de ces études, d'autres travaux ont montré une expression de l'IL-1RI chez les Treg à la fois *ex vivo* et après culture (Mercer et al., 2010; Tran et al., 2009). Ainsi, dans le but de mieux comprendre l'importance de l'IL-1RI dans la voie de différenciation des T<sub>H</sub>17, nous avons entrepris l'étude des populations de LT CD4<sup>+</sup> circulants humains exprimant l'IL-1RI *ex vivo*.

Nos résultats ont montré que l'expression de l'IL-1RI au sein des LT CD4<sup>+</sup> circulants humains *ex vivo* était restreinte au compartiment des cellules mémoires CD45RA<sup>-</sup>. En effet, à la différence des travaux présentés par Lee et al., nous n'avons détecté aucune expression de l'IL-1RI dans les populations naïves (Lee et al., 2010). Nous avons ensuite cherché à caractériser plus finement la sous-population de LT CD4<sup>+</sup> mémoires exprimant l'IL-1RI, en distinguant les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels et régulateurs. Bien que les deux sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires exprimaient l'IL-1RI, nos données ont montré un fort enrichissement des cellules IL-1RI<sup>+</sup> au sein du compartiment des Treg mémoires.

Dans le but de d'approfondir la caractérisation des cellules exprimant l'IL-1RI parmi les LT CD4<sup>+</sup> circulants *ex vivo*, nous avons réalisé une analyse phénotypique et fonctionnelle des MTreg IL-1RI<sup>+</sup>. Nos résultats ont mis en évidence que la population des MTreg IL-1RI<sup>+</sup> était FOXP3<sup>+</sup> et co-exprimait également le facteur de transcription associé aux T<sub>H</sub>17, ROR $\gamma$ t. En lien avec l'expression de ROR $\gamma$ t, nous avons observé que les MTreg IL-1RI<sup>+</sup> étaient enrichis en cellules produisant de l'IL-17. Cependant, bien que présentant des caractéristiques appartenant aux T<sub>H</sub>17, les cellules MTreg IL-1RI<sup>+</sup> se sont montrées aptes à inhiber efficacement la prolifération de cellules CD4<sup>+</sup> répondeuses et étaient par conséquent suppressives. Dans leur ensemble, nos résultats ont mis en évidence que les cellules exprimant l'IL-1RI, *ex vivo*, au sein des LT CD4<sup>+</sup> circulants humains, étaient fortement enrichies dans les MTreg et que ces cellules MTreg IL-1RI<sup>+</sup> possédaient à la fois des propriétés appartenant aux Treg et aux T<sub>H</sub>17. Il est à noter que cette sous-population hybride s'est montrée partager des caractéristiques communes avec les Treg FOXP3<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> précédemment identifiés (Ayyoub et al., 2009; Voo et al., 2009).

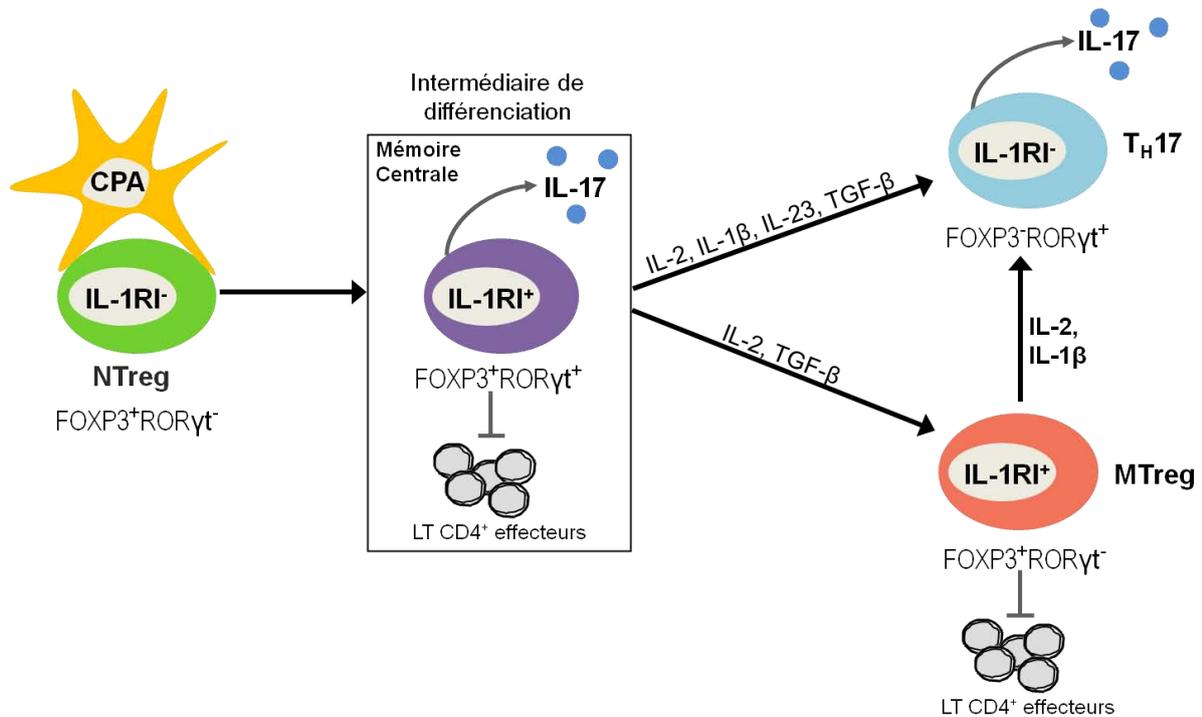
L'IL-1 a été décrit comme étant impliqué dans la différenciation des T<sub>H</sub>17 à partir des LT CD4<sup>+</sup> naïfs ainsi que dans la conversion des LT CD4<sup>+</sup> mémoires conventionnels en T<sub>H</sub>17 (Deknuydt et al., 2009; Manel et al., 2008). De plus, les résultats obtenus lors de notre précédente étude, ont montré que la différenciation des NTreg en T<sub>H</sub>17 après leur stimulation en présence de cytokines pro-T<sub>H</sub>17, dont l'IL-1 $\beta$ , était associée avec une induction de l'expression de l'IL-1RI (Valmori et al., 2010). Ces données nous ont conduit à émettre l'hypothèse que les MTreg IL-1RI<sup>+</sup>, identifiés *ex vivo*, pourraient correspondre à un intermédiaire précoce dans la voie différenciation allant des NTreg aux T<sub>H</sub>17. Par conséquent, nous avons dans un premier temps réalisé l'analyse, *ex vivo*, du stade de différenciation des MTreg IL-1RI<sup>+</sup> en étudiant l'expression de CCR7. Ce récepteur de chimiokine distingue les cellules mémoires centrales (CM ; CCR7<sup>+</sup>) des cellules mémoires effectrices (EM ; CCR7<sup>-</sup>), les cellules CM étant à un stade de différenciation moins avancé que les cellules EM (Tosello et al., 2008). Nos résultats ont mis en évidence que les MTreg IL-1RI<sup>+</sup> étaient enrichis dans la fraction des cellules exprimant CCR7, suggérant un stade de différenciation précoce. Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'induction de l'expression de l'IL-1RI à la surface des NTreg, après stimulation, correspondait à un événement précoce ou tardif. L'étude cinétique de l'expression de

l'IL-1RI nous a ainsi montré que l'induction de l'expression l'IL-1RI correspondait à un évènement précoce dans la polarisation des NTreg en T<sub>H</sub>17 coïncidant ainsi avec le stade de différenciation précoce des MTreg IL-1RI<sup>+</sup>. Enfin, nous avons mis en évidence qu'une sous-population cellulaire présentant des caractéristiques similaires aux CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> identifiées *ex vivo*, pouvait être obtenue à partir de NTreg après leur stimulation en présence de cytokines polarisante pro-T<sub>H</sub>17, dont l'IL-1β. En effet des cellules IL-1RI<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> appartenant au compartiment CM, exprimant FOXP3 et produisant de l'IL-17 ont été obtenues à partir de NTreg stimulés. Dans leur ensemble, nos résultats soutiennent le concept selon lequel les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, identifiés *ex vivo*, représenteraient un intermédiaire précoce dans la voie différenciation allant des NTreg aux T<sub>H</sub>17.

Nous avons poursuivi la caractérisation des cellules exprimant l'IL-1RI *ex vivo*, en nous intéressant à la sensibilité des MTreg à l'IL-1β en fonction de l'expression de l'IL-1RI et de leur stade de différenciation. Dans un premier temps l'étude de l'effet de la présence d'IL-1β lors de la stimulation, sur les MTreg IL-1RI<sup>+</sup> a montré que ces derniers répondaient à l'IL-1β en générant des cellules produisant de l'IL-17 et que leur réactivité à l'IL-1β apparaissait comme étant finement contrôlée puisqu'une expression augmentée du récepteur leurre de l'IL-1β, l'IL-1RII, a également été détectée, *ex vivo*, dans les MTreg IL-1RI<sup>+</sup>. Ensuite l'étude de la sensibilité des MTreg à l'IL-1β en fonction de leur stade de différenciation a montré que des proportions plus élevées de cellules effectrices FOXP3<sup>-</sup> IL-17<sup>+</sup> étaient obtenues suite à la stimulation en présence d'IL-1β, aussi bien dans les CM que dans les EM Treg, avec cependant des pourcentages plus élevés dans les cultures de CM Treg. De plus, un maintien plus fort de l'expression de FOXP3 a été observé parmi les CM Treg et pourrait s'expliquer par une plus forte expression du récepteur du TGF-β de type II qui permettrait ainsi au TGF-β de maintenir l'expression de FOXP3. Dans leur ensemble, ces données ont suggéré que bien qu'il y ait génération de cellules effectrices FOXP3<sup>-</sup> produisant de l'IL-17 à partir des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> en réponse à l'IL-1β, une fraction importante de ces cellules maintenait l'expression de FOXP3 et permettrait ainsi de conserver une réserve de cellules Treg/T<sub>H</sub>17 mémoires.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus lors de cette étude soutiennent le concept selon lequel les cellules MTreg/T<sub>H</sub>17 CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup> représenteraient un intermédiaire précoce dans la voie de différenciation partant des NTreg et étant

initialement commune aux Treg et aux T<sub>H</sub>17. En fonction de l'environnement cytokinique présent lors de la stimulation, cet intermédiaire de différenciation commun s'engagerait soit vers la voie des Treg, dans un contexte immunosuppresseif, soit vers celle des T<sub>H</sub>17, en condition pro-inflammatoire, à travers des signaux induits par la liaison IL-1/IL-1RI (Figure 48).



**Figure 48. Schéma hypothétique des voies de différenciation des T<sub>H</sub>17 et MTreg à partir des NTreg.** Après activation par une cellule présentatrice d'antigène (CPA), le NTreg passe par un stade de différenciation intermédiaire caractérisé par le maintien de l'expression du facteur de transcription des Treg, FOXP3, et par l'induction de l'expression de RORγt, le facteur de transcription des T<sub>H</sub>17. Cette co-expression engendre un intermédiaire de différenciation apte à produire la cytokine pro-inflammatoire IL-17, tout en ayant une capacité à supprimer la pousse de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs. En fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement, cet intermédiaire se dirige vers la voie des T<sub>H</sub>17 (en présence d'IL-2, d'IL-1β, d'IL-23 et de TGF-β) ou vers celle des MTreg (en présence d'IL-2 et de TGF-β).

Les résultats de cette étude ont donné lieu à un manuscrit intitulé 'Ex vivo IL-1RI expression in human CD4<sup>+</sup> T cells identifies an early intermediate in the differentiation of T<sub>H</sub>17 from FOXP3<sup>+</sup> naive Treg' publié dans *Journal of Immunology* (Raffin et al., 2011) (Annexe 1).

Il serait intéressant de poursuivre ces travaux par une étude visant à identifier les facteurs ainsi que la voie de signalisation impliqués dans l'induction de l'expression de l'IL-1RI à la surface des NTreg suite à leur stimulation. L'IL-1RI est un récepteur appartenant à la superfamille des IL-1R/TLRs et partage des caractéristiques mécanistiques et fonctionnelles communes avec d'autres membres de cette même famille. Cela pourrait suggérer que les facteurs influant sur l'expression de l'IL-1RI pourraient être identiques à ceux impliqués dans la régulation de l'expression de certains autres TLRs. L'une des différences majeures entre les NTreg et les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs est le fait que ces derniers n'expriment pas FOXP3. Or, il a été décrit que l'expression, dans les Treg humains, de TLR10 était contrôlée par FOXP3 en association avec NF-AT, un facteur de transcription dont l'activation est induite par la stimulation du TCR (Bell et al., 2007). Le fait que, lors de notre précédente étude, seulement les NTreg soient parvenus à induire efficacement l'expression de l'IL-1RI après la stimulation de leur TCR en présence d'IL-2 seule, pourrait donc suggérer que FOXP3 joue un rôle dans l'induction de l'expression de l'IL-1RI (Valmori et al., 2010). Il serait, par conséquent, intéressant de déterminer si l'induction de l'expression de l'IL-1RI dans les NTreg, après leur stimulation, découle du même mécanisme que celui de TLR10. Dans cette optique la présence de séquences consensus spécifiques de FOXP3 proches du promoteur du gène de l'IL-1RI pourra être recherchée. Un vecteur contenant ou non le gène codant pour FOXP3 pourra également être transfecté dans des cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> FOXP3<sup>-</sup> naïves, par électroporation, afin d'étudier l'influence de l'expression de FOXP3 sur l'expression de l'IL-1RI. De plus, le fait que l'induction de l'expression de l'IL-1RI dans les NTreg soit dépendante de la stimulation de leur TCR pourrait s'expliquer par une implication de NF-AT, ce facteur de transcription pourra par conséquent également être étudié.

Le TGF- $\beta$  a été montré comme étant impliqué dans l'induction et le maintien de l'expression de FOXP3 ainsi que dans la génération des Treg induits murins et humains (Chen et al., 2003; Shevach et al., 2008). Par conséquent, si FOXP3 s'avère être impliqué dans la régulation de l'expression de l'IL-1RI dans les NTreg stimulés, le TGF- $\beta$  pourrait correspondre à la cytokine induisant l'expression de l'IL-1RI. Le fait qu'une induction de l'expression de l'IL-1RI ait été observée chez les NTreg après leur stimulation en présence d'IL-2 seule semble aller à l'encontre de

cette hypothèse mais pourrait s'expliquer par le fait que les NTreg expriment constitutivement la forme latente du TGF- $\beta$ 1 et ne seraient donc pas dépendants d'une source exogène (Valmori et al., 2005; Valmori et al., 2010). Dans le but d'étudier l'influence du TGF- $\beta$  sur l'induction de l'expression de l'IL-1RI, des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs pourront être stimulés en présence ou en l'absence de TGF- $\beta$  puis l'étude de la présence de l'IL-1RI à la surface de ces cellules pourra être réalisée par cytométrie de flux. Dans la même optique, des NTreg pourront être stimulés en présence d'un anticorps bloquant anti-LAP (Latency-Associated Peptide) ou anti-TGF- $\beta$ RII afin d'évaluer si la neutralisation du TGF- $\beta$  produit de façon endogène influe sur l'expression de l'IL-1RI.

Enfin, il a été décrit que suite à la liaison de son ligand, l'IL-1RI s'associe à sa protéine accessoire, l'IL-1RAcP, et déclenche une cascade de signalisation qui fait intervenir de nombreux intermédiaires dont la protéine adaptatrice MyD88, des protéines IRAKs ainsi que TRAF6 et qui aboutit à l'activation des voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et des MAPKinases. De plus, de nombreux mécanismes d'inhibition interviennent dans la régulation de la voie de signalisation induite par l'interaction IL-1/IL-1RI. Il serait par conséquent intéressant de poursuivre cette étude en recherchant les mécanismes moléculaires, activés suite à la liaison IL-1 $\beta$ /IL-1RI, qui conduisent à la différenciation des NTreg en T<sub>H</sub>17. De plus, il a été montré que l'IL-1 était impliqué dans l'induction de l'expression de ROR $\gamma$ t et de IRF4 à un stade précoce de la différenciation en T<sub>H</sub>17 (Chung et al., 2009). Par conséquent, l'étude de l'expression de IRF4 dans les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, *ex vivo* et après stimulation en présence ou non d'IL-1 $\beta$ , pourra également être réalisée.

## Discussion de la Partie 2

### **1- Les Treg mémoires FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> contiennent des iTreg qui expriment Aiolos et répondent à l'IL-1 $\beta$ en diminuant leurs fonctions suppressives**

Bien qu'ayant des origines distinctes, les Treg d'origine thymique et ceux d'origine périphérique, nTreg et les iTreg, présentent des profils phénotypiques très similaires. Par conséquent, aucun marqueur permettant de les distinguer n'avait été identifié jusqu'à une étude réalisée par Thornton et al., dans laquelle ils ont décrit qu'Helios, un facteur de transcription appartenant à la famille d'Ikaros, était exprimé par les nTreg mais pas par les Treg induits dans la périphérie, aussi bien *in vivo* que *in vitro* (Thornton et al., 2010). Cependant, cette étude a par la suite été contestée par d'autres travaux, réalisés à partir de modèles transgéniques murins, qui ont observé qu'en fonction de la méthode d'activation une induction de l'expression d'Helios pouvait ou non être détectée chez les Treg induits *in vitro* et *in vivo* (Gottschalk et al., 2012; Verhagen and Wraith, 2010). Pouvoir distinguer et séparer les nTreg des iTreg serait essentiel pour pouvoir analyser la contribution relative de ces deux sous-populations dans les contextes physiologiques et pathologiques et pourrait ainsi aider à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par conséquent, dans le but de mieux comprendre l'origine et la fonction des Treg Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup>, nous avons réalisé une caractérisation phénotypique et fonctionnelle approfondie des Treg mémoires humains Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> issus du sang périphérique de donneurs sains.

Nous avons tout d'abord comparé, entre les Treg mémoires Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup>, la production cytokinique ainsi que l'expression de certaines molécules associées au phénotype ou à la fonction des Treg et également l'expression de marqueurs de différenciation et d'activation. Nos premiers résultats ont montré que les Treg Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> présentaient des profils de production cytokinique très distincts. En effet, en accord avec des études précédentes, les Treg Helios<sup>+</sup> ne produisaient aucune des cytokines testées (Kim et al., 2012; Thornton et al., 2010). A l'inverse les Treg Helios<sup>-</sup> se sont montrés, comme précédemment décrit, enrichis en cellules produisant de l'IL-17 mais également en cellules produisant de l'IL-10. De plus, l'étude comparative de l'expression de CCR7 à la surface des Treg mémoires en fonction de l'expression d'Helios a mis en évidence que les Treg Helios<sup>-</sup> étaient

fortement enrichis dans la fraction mémoire centrale CCR7<sup>+</sup> alors qu'à l'inverse, les Treg Helios<sup>+</sup> étaient principalement compris dans la fraction mémoire effectrice CCR7<sup>-</sup>. Etant donné que, lors notre étude de l'expression de l'IL-1RI *ex vivo* parmi les LT CD4<sup>+</sup> circulants humains (Partie 1), nous avons montré que les cellules IL-1RI<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 étaient enrichies parmi les CM Treg, nous avons analysé l'expression de l'IL-1RI. Nos données ont alors mis en évidence que les Treg mémoires Helios<sup>+</sup> étaient majoritairement IL-1RI<sup>-</sup> alors que la plupart des Treg mémoires Helios<sup>-</sup> exprimait l'IL-1RI à leur surface. En nous basant sur l'expression différentielle de CCR7 et de l'IL-1RI à la surface des Treg (CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup>) mémoires (CD45RA<sup>-</sup>) Helios<sup>+</sup> (CCR7<sup>-</sup> IL-1RI<sup>-</sup>) et Helios<sup>-</sup> (CCR7<sup>+</sup> IL-1RI<sup>+</sup>), nous avons élaboré une stratégie de tri qui nous a permis d'isoler ces deux sous-populations à partir des LT CD4<sup>+</sup> totaux *ex vivo* par cytométrie de flux, tout en conservant leur viabilité. Nous avons ainsi poursuivi leur caractérisation en étudiant leur profil d'expression génique, l'état de méthylation de leur TSDR, leur propriétés prolifératives, leur stabilité, leur capacités suppressives ainsi que leur sensibilité à l'IL-1 $\beta$ .

Les résultats obtenus lors de notre étude soutiennent fortement l'hypothèse selon laquelle les Treg Helios<sup>-</sup> seraient, au moins en partie, d'origine périphérique. En effet, nous avons montré que ces derniers contenaient des proportions importantes de cellules produisant de l'IL-17 ainsi que de cellules produisant de l'IL-10. En accord avec ces données, les Treg Helios<sup>-</sup> se sont montrés exprimer ROR $\gamma$ t et C-MAF qui ont été décrits comme étant respectivement impliqués dans l'induction de l'expression de l'IL-17 et de l'IL-10 (Ivanov et al., 2006; Xu et al., 2009). Les Treg Helios<sup>-</sup> présentent ainsi des caractéristiques communes avec une sous-population de Treg FOXP3<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> produisant de l'IL-10 et de l'IL-17 précédemment identifiée et décrite comme étant générée au niveau des muqueuses intestinales au travers d'une voie de différenciation induite par les bactéries de la flore commensale (Lochner et al., 2008; Round and Mazmanian, 2010). De plus, le fait que les Treg Helios<sup>-</sup> soient majoritairement dans le compartiment des cellules centrales mémoires CCR7<sup>+</sup>, et donc à un stade de différenciation précoce, est compatible avec le concept selon lequel au moins une partie de cette sous-population pourrait se convertir en cellules FOXP3<sup>-</sup> à un stade de différenciation plus tardif, en particulier dans un contexte inflammatoire. Nous avons également mis en évidence que les Treg mémoires FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> exprimaient le facteur de transcription Aiolos, un autre membre de la

famille d'Ikaros, qui a précédemment été décrit comme étant impliqué dans la différenciation des T<sub>H</sub>17 chez la souris ainsi que dans la génération des Treg induits chez l'homme (Gandhi et al., 2010; Quintana et al., 2012). Ces résultats renforcent le concept selon lequel les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> seraient, au moins en partie, d'origine périphérique. Cependant, l'expression d'Aiolos n'a pas été étudiée dans les nTreg. Le fait qu'Aiolos ait été décrit comme étant à la fois impliqué dans la différenciation des iTreg et des T<sub>H</sub>17 est en accord avec les résultats obtenus dans la Partie 1, où nous avons décrit les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, qui correspondent aux Treg Helios<sup>-</sup>, comme représentant un intermédiaire précoce dans la voie de différenciation initialement commune aux Treg et aux T<sub>H</sub>17 (Raffin et al., 2011). Enfin, nos résultats ont également montré que les Treg Helios<sup>-</sup> étaient fortement suppressifs mais qu'une diminution de leur capacité suppressive était observée en présence d'IL-1 $\beta$ . L'IL-1RI est un récepteur appartenant à la superfamille des IL-1R/TLRs et il a été décrit qu'au niveau des muqueuses intestinales, les bactéries de la flore commensale modulent la réponse immunitaire en activant des voies de signalisation au travers des TLRs exprimés à la surface des cellules de l'immunité dont les iTreg (Round and Mazmanian, 2010). Par conséquent, l'aptitude des Treg Helios<sup>-</sup> à moduler rapidement leur efficacité suppressive en fonction du contexte, physiologique ou inflammatoire, à travers la voie de signalisation induite par l'activation de l'IL-1RI, suggère également qu'ils ont une origine périphérique.

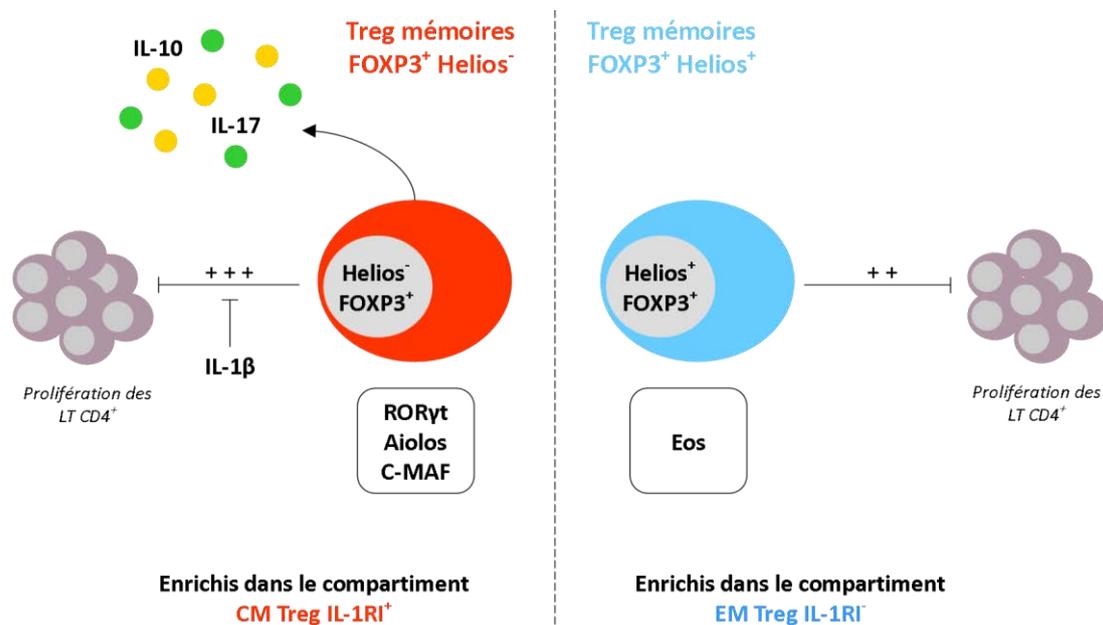
A l'inverse des Treg mémoires Helios<sup>-</sup>, nos résultats ont montré que les Treg Helios<sup>+</sup> n'exprimaient pas C-MAF ni ROR $\gamma$ t et non plus Aiolos, mais exprimaient Eos, un facteur de transcription appartenant également à la famille d'Ikaros qui a été décrit comme interagissant directement avec FOXP3, dans les Treg, et permet ainsi d'induire la mise sous silence de gènes (Pan et al., 2009). Les Treg mémoires Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> présentent donc des profils d'expression génique distincts, suggérant qu'ils sont issus de voies de différenciation différentes. Bien que l'analyse comparative de l'expression d'Eos entre les iTreg et les nTreg n'ait pas encore été réalisée, une étude récente, chez la souris, a montré que les Treg présents dans le thymus exprimaient Eos (Sharma et al., 2013). De plus, lors de cette étude, une fraction des Treg FOXP3<sup>+</sup> Eos<sup>+</sup> présents dans le thymus a été décrite comme étant constitutivement labile, c'est-à-dire apte à perdre l'expression d'Eos sous certaines conditions inflammatoires, notamment en présence d'IL-6, et à se reprogrammer en

cellules présentant des fonctions effectrices. Il serait par conséquent intéressant d'étudier la stabilité de l'expression d'Eos parmi les Treg Helios<sup>+</sup> après stimulation en condition neutre ou pro-inflammatoire. Les Treg Helios<sup>+</sup> ont été décrits comme étant potentiellement d'origine thymique et exprimeraient donc des TCR spécifiques d'antigènes du soi (Hsieh et al., 2006; Thornton et al., 2010). Par conséquent, le fait que les Treg Helios<sup>+</sup> soient pour la plupart présents dans le compartiment des cellules effectrices mémoires CCR7<sup>-</sup> pourrait être compatible avec une stimulation continue *in vivo* en réponse à des antigènes du soi exprimés de façon ubiquitaire. De plus, l'expression persistante d'Helios dans des Treg naturels à un stade de différenciation avancé est en accord avec des études ayant montré une importante stabilité phénotypique des nTreg aussi bien en condition physiologique que dans un contexte pro-inflammatoire (Rubtsov et al., 2010). Nos résultats ont également montré que les Treg mémoires Helios<sup>+</sup> n'exprimaient pas de cytokine et que leur capacité suppressive n'était pas diminuée en présence d'IL-1 $\beta$ , suggérant un profil Treg particulièrement stable.

La question de la stabilité des Treg fait actuellement l'objet d'un grand débat dans la communauté scientifique. En effet, certaines études avancent qu'au moins une fraction des Treg serait instable et apte à être reprogrammée en cellules effectrices (Duarte et al., 2009; Oldenhove et al., 2009; Zhou et al., 2009). Alors que d'autres travaux affirment, qu'au contraire, les Treg représentent une population hautement stable et que seules les cellules exprimant FOXP3 de façon transitoire, suite à une activation, ou les précurseurs non-engagés totalement dans la voie de différenciation des Treg présenteraient une instabilité (Komatsu et al., 2009; Miyao et al., 2012; Rubtsov et al., 2010). Cependant, bien que les Treg Helios<sup>-</sup> exprimaient des cytokines, dont la cytokine pro-inflammatoire IL-17, nos résultats ont clairement mis en évidence qu'ils ne correspondaient pas à des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels récemment activés mais bien à de vrais Treg. En effet, nous avons mis en évidence que les deux sous-populations de Treg présentaient une région TSDR fortement déméthylée et que l'expression de FOXP3 était maintenue après culture en condition neutre, mettant en évidence une expression stable de FOXP3. De plus, il a été décrit que les cellules exprimant FOXP3 de façon transitoire suite à leur activation ne possédaient pas de propriétés suppressives alors que, lors de notre étude, les Treg Helios<sup>-</sup> se sont montrés être plus suppressifs que les Treg Helios<sup>+</sup> (Miyara et al.,

2009). Etant donné que, lors de l'étude de l'expression de l'IL-1RI parmi les LT CD4<sup>+</sup> *ex vivo* (Partie 1), nous avons montré que les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, qui correspondent aux Treg Helios<sup>-</sup>, pouvaient générer des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs FOXP3<sup>-</sup> produisant de l'IL-17 suite à une stimulation en présence d'IL-1β, nos données soutiennent le concept selon lequel une partie des Treg, d'origine périphérique, présente une aptitude à se convertir en LT CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> effecteurs dans certaines conditions pro-inflammatoires.

En conclusion, lors de cette étude, nous avons mis en évidence que les Treg Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> humains présentaient des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles distinctes (Figure 49). Une stratégie de tri basée sur l'expression différentielle de CCR7 et de l'IL-1RI, entre les deux sous-populations, a ainsi pu être élaborée et a permis leur séparation tout en conservant leur viabilité. De plus, nos résultats soutiennent fortement le concept selon lequel les Treg Helios<sup>-</sup>, seraient, au moins en partie, composés de Treg d'origine périphérique aptes à moduler leur activité suppressive en fonction du contexte, physiologique ou inflammatoire.



**Figure 49. Les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes ainsi que des profils d'expression génique distincts.** Les Treg Helios<sup>-</sup> sont fortement enrichis parmi les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> alors que les Treg Helios<sup>+</sup> sont majoritaires parmi les EM Treg IL-1RI<sup>-</sup>. Les Helios<sup>+</sup> Treg ne produisent pas de cytokine alors que les Treg Helios<sup>-</sup> sont composés de cellules IL-17<sup>+</sup> et de cellules IL-10<sup>+</sup>. Les Treg Helios<sup>+</sup> co-expriment Eos, alors que les Treg Helios<sup>-</sup> n'expriment pas Eos mais expriment Aiolos, RORγt et C-MAF. Les Treg Helios<sup>-</sup> sont plus suppressifs que les Treg Helios<sup>+</sup> et diminuent leur capacité suppressive en réponse à l'IL-1β.

Un manuscrit regroupant ces résultats intitulé 'Human memory Helios<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg encompass induced Treg that express Aiolos and respond to IL-1 $\beta$  by downregulating their suppressor functions' a récemment été publié dans *The Journal of Immunology* (Raffin et al., 2013) (Annexe 2).

La stratégie de tri, mise au point lors de cette étude, séparant les populations de Treg Helios<sup>+</sup> et de Treg Helios<sup>-</sup>, va permettre d'approfondir leur caractérisation. Dans ce but une analyse comparative de leur profil d'expression génique sera prochainement réalisée via l'utilisation de puces à ADN et pourra potentiellement conduire à l'identification d'autres marqueurs permettant de distinguer les Treg Helios<sup>+</sup> des Helios<sup>-</sup>. De même, une étude comparative de la spécificité antigénique ou du répertoire de TCR des deux sous-populations de Treg mémoires triées pourrait permettre d'en apprendre plus sur leur origine et leur fonction respectives.

De plus, les deux sous-populations de Treg se sont montrées avoir une sensibilité différente à l'IL-1 $\beta$ . Cela pourrait signifier qu'alors que les Treg Helios<sup>-</sup> modulent leur capacité suppressive en fonction du contexte, les Treg Helios<sup>+</sup> maintiennent une activité suppressive stable. Il serait par conséquent intéressant d'analyser l'expression des récepteurs de cytokine ainsi que d'autres membres de la superfamille des IL-1R/TLRs dans les deux sous-populations de Treg. L'expression de TLR2, TLR5 ainsi que celle de TLR8 pourront notamment être étudiées puisqu'il a été mis en évidence que leur activation modulait la capacité suppressive des Treg et que TLR2 a été décrit comme étant nécessaire à la génération des Treg induits et à l'expression d'IL-10 au niveau des muqueuses intestinales (Crellin et al., 2005; Liu et al., 2006a; Peng et al., 2005). Il serait également nécessaire de déterminer si la diminution de l'efficacité suppressive observée en présence d'IL-1 $\beta$  chez les Treg Helios<sup>-</sup> correspond à un phénomène définitif ou réversible après le retour à un contexte non-inflammatoire. Dans ce but, les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> triés *ex vivo* pourront être mis en culture dans un milieu contenant ou pas de l'IL-1 $\beta$  puis leurs capacités suppressives seront évaluées en présence ou en l'absence d'IL-1 $\beta$ . Il serait également intéressant d'identifier les mécanismes de suppression qui sont inhibés en présence d'IL-1 $\beta$  et qui conduisent à la diminution de l'activité suppressive des Treg Helios<sup>-</sup>.

Enfin, des anticorps dirigés contre Eos et Aiolos, à la fois murins et humains, ont récemment été mis au point et utilisés chez la souris mais pas encore chez l'homme (Sharma et al., 2013). Pouvoir comparer l'expression d'Helios et de FOXP3 par rapport à celle d'Eos et d'Aiolos dans les LT CD4<sup>+</sup> par cytométrie de flux serait d'un grand intérêt. Par conséquent nous travaillons actuellement sur la mise au point de ces anticorps chez l'homme.

## **2- Les Treg naïfs Helios<sup>-</sup> sont présents dans le sang périphérique de donneurs sains adultes mais absents dans le sang de cordon ombilical.**

Lors de l'étude, *ex vivo*, de l'expression de l'IL-1RI parmi les LT CD4<sup>+</sup> circulants (Partie 1), nous avons mis en évidence qu'après une stimulation *in vitro* en présence de cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>17, une fraction des NTreg pouvait se différencier en cellules CCR7<sup>+</sup>, exprimant FOXP3 et produisant de l'IL-17 (Figure 18). Ces résultats ont montré qu'à partir des NTreg, qui, de par leur stade naïf, sont définis comme étant d'origine thymique, il était possible de générer des cellules présentant des caractéristiques similaires aux CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> identifiés *ex vivo*, suggérant que ces derniers seraient des nTreg. Cependant, lors de l'étude de l'expression d'Helios au sein du compartiment des Treg mémoires *ex vivo* (Partie 2), nous avons mis en évidence que les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> constituaient la population majoritaire au sein du compartiment des CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> et que les MTreg Helios<sup>-</sup> étaient, au moins en partie, composés de iTreg. Les résultats obtenus lors de ces deux études, qui apparaissent contradictoires au premier abord, pourraient s'expliquer de deux façons. La première étant que les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> pourraient être une population hétérogène composée à la fois de cellules d'origine thymique et périphérique. Une autre explication pourrait être que les NTreg présents dans la périphérie ne seraient pas tous d'origine thymique, qu'une partie d'entre eux serait d'origine périphérique et serait apte à se différencier en CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>.

Une récente étude de Himmel et al., a montré que dans le sang périphérique de donneurs sains, la population des NTreg pouvait être divisée en deux sous-populations en fonction de l'expression ou non du facteur de transcription Helios (Himmel et al., 2013). Ils en ont conclu que l'absence d'expression d'Helios parmi les Treg ne pouvait pas être utilisée comme un marqueur des iTreg étant donné qu'une fraction des NTreg, pourtant d'origine thymique, était Helios<sup>-</sup>. Nous avons également

étudier l'expression d'Helios en fonction de celle de FOXP3 dans le compartiment naïf des LT CD4<sup>+</sup> issus du sang périphérique de donneurs sains adultes ou bien issu du sang de cordon ombilical. Tout comme Himmel et al., nous avons observé la présence de cellules Helios<sup>-</sup> (environ 30%) dans les NTreg issus du sang périphérique d'adultes, cependant, cette sous-population s'est révélée être absente dans le sang de cordon ombilical (Ayyoub et al., 2013) (Annexe 3). Ces données ont ainsi montré que les cellules Helios<sup>-</sup> présentes dans le compartiment des NTreg semblaient être générées après la naissance. Il n'est cependant pour l'instant pas encore défini si ces NTreg Helios<sup>-</sup> dérivent de NTreg d'origine thymique ayant perdu l'expression d'Helios ou bien d'une autre sous-population de LT CD4<sup>+</sup>. On peut cependant émettre l'hypothèse que les cellules présentant des caractéristiques communes aux CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, obtenues après stimulation des NTreg en condition polarisante pro-T<sub>H</sub>17, pourraient être issues de la fraction des NTreg Helios<sup>-</sup>.

Définir l'origine des NTreg Helios<sup>-</sup> ainsi que leur relation avec les Treg mémoires Helios<sup>-</sup> seraient d'un grand intérêt. Cependant, à la différence des Treg mémoires, les NTreg sont tous CCR7<sup>+</sup> et n'expriment pas l'IL-1RI *ex vivo*, il n'est donc pas possible de séparer les NTreg Helios<sup>+</sup> des NTreg Helios<sup>-</sup> en ciblant les mêmes marqueurs de surface que ceux utilisés dans le compartiment mémoire des Treg. Etant donné que nous avons observé une induction rapide de l'expression de l'IL-1RI parmi les NTreg après stimulation (Figure 17), nous avons récemment cherché à voir si les cellules IL-1RI<sup>+</sup> obtenues après stimulation correspondaient aux NTreg Helios<sup>-</sup>. Cependant, nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'enrichissement des cellules Helios<sup>-</sup> parmi les NTreg exprimant l'IL-1RI après stimulation (résultats non fournis). Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles qui permettraient d'isoler les deux sous-populations de NTreg observées dans le sang périphérique des donneurs sains. Les puces à ADN qui seront réalisées sur les populations des Treg mémoires Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup>, pourront éventuellement nous aider à identifier de nouvelles cibles moléculaires dont l'expression pourra être analysée en fonction de celle d'Helios parmi les NTreg. De plus, le profil d'expression génique des NTreg issus du sang périphérique d'adultes pourrait également être comparé avec celui des NTreg issus du sang de cordon ombilical. En effet, étant donné que dans le sang périphérique 30% des NTreg sont Helios<sup>-</sup>, une variation de l'expression d'un gène entre les NTreg issus du sang de cordon ombilical et ceux

issus de la périphérie pourrait correspondre à un gène exprimé de façon différentielle entre les NTreg Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup>.

De plus, la caractérisation des cellules CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> exprimant FOXP3 et produisant de l'IL-17, obtenues à partir des NTreg après stimulation en condition polarisante pro T<sub>H</sub>17, pourra être poursuivie. En effet, il serait nécessaire de répéter cette expérience de polarisation en analysant par marquage intranucléaire, après 12 jours de culture, l'expression d'Helios dans les cellules CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> obtenues. De même, les expressions d'Eos, Aiolos, ROR $\gamma$ t et C-MAF devront être étudiées dans les cellules CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> générées et ayant préalablement été séparées par cytométrie de flux. Ces données nous permettront de vérifier si, tout comme les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> présents *ex vivo* dans la périphérie, les CM Treg IL-1RI<sup>+</sup> obtenus à partir des NTreg *in vitro* expriment Helios, Aiolos, ROR $\gamma$ t et C-MAF mais n'expriment pas Eos.

### **Discussion de la Partie 3 : Les Treg CXCR3<sup>+</sup> s'accumulent sélectivement au niveau du site tumoral dans le CEO pour y limiter la réponse immunitaire anti-tumorale de type I**

De études récentes ont mis en évidence que la population des Treg correspondait à un ensemble hétérogène complexe composé de plusieurs sous-groupes pouvant co-exprimer, en plus de FOXP3, au moins un des facteurs de transcription caractéristiques d'une des populations de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels. Lors de la première partie de ma thèse ainsi que lors de travaux précédents, nous avons notamment identifié une sous-population de Treg co-exprimant ROR $\gamma$ t et produisant de l'IL-17 (Ayyoub et al., 2009; Raffin et al., 2011). De même, une sous-population de Treg FOXP3<sup>+</sup> co-exprimant le facteur de transcription spécifique des T<sub>H</sub>1, T-bet, ainsi que le récepteur de chimiokine CXCR3 a été identifiée *in vivo* chez la souris et a été décrite comme étant spécialisée dans la régulation des réponses immunitaires de type I (Koch et al., 2009). Des sous-populations de Treg CXCR3<sup>+</sup> ont par la suite été décrites chez l'homme, chez des donneurs sains ou chez des patients atteints de maladies auto-immunes (Dominguez-Villar et al., 2011; Koch et al., 2009; McClymont et al., 2011). Ces sous-populations de Treg semblent présenter des propriétés migratoires, fonctionnelles et homéostatiques leur conférant une capacité optimisée à réguler la population de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels dont elles co-expriment le facteur de transcription.

Dans le but de mieux comprendre comment les différentes sous-populations de Treg coopèrent dans la régulation de la réponse immunitaire, l'étude phénotypique et fonctionnelle, la recherche de l'origine ainsi que l'analyse de la stabilité de ces différentes sous-populations de Treg doivent être poursuivies à la fois chez les donneurs sains mais également chez des patients atteints de maladies auto-immunes ou encore dans certains types de cancers où des mécanismes immunosuppresseurs impliquant les Treg ont été décrits. Notamment dans le cancer épithélial de l'ovaire où, bien qu'il ait été décrit qu'une réponse immunitaire anti-tumorale de type I pouvait se développer spontanément chez certaines patientes et était associée avec un meilleur pronostic (Marth et al., 2004; Zhang et al., 2003b), il a également été mis en évidence qu'une accumulation de Treg pouvait être observée au niveau du site tumoral et a été définie comme étant un facteur de mauvais pronostic (Curiel et al., 2004; Sato et al., 2005; Wolf et al., 2005). Nous avons par

conséquent entrepris de réaliser une caractérisation phénotypique et fonctionnelle des Treg humains présents au niveau de la tumeur dans le CEO.

En accord avec l'étude de Curiel et *al.*, nous avons constaté une accumulation de Treg au niveau du site tumoral (Curiel et al., 2004). De plus, l'analyse de l'expression de CXCR3 ainsi que celle de T-bet nous a révélé que les Treg présents dans les TIL étaient majoritairement CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup>. Nous avons également mis en évidence un enrichissement en cellules exprimant CXCR3 et T-bet au sein des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels dans les TIL. FOXP3 et T-bet sont deux facteurs de transcription qui régulent de façon antagoniste l'expression d'IFN- $\gamma$ . En effet, T-bet favorise l'induction de l'expression d'IFN- $\gamma$  alors que FOXP3 l'inhibe (Bettelli et al., 2005). Nous avons ainsi étudié les conséquences de cette co-expression sur les propriétés fonctionnelles des Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site tumoral. Nos résultats ont montré que bien qu'exprimant T-bet, les Treg CXCR3<sup>+</sup> ne produisaient pas d'IFN- $\gamma$  alors qu'une production d'IFN- $\gamma$  a été observée dans la population FOXP3<sup>-</sup>, dans les TIL et les TAL. De plus, l'étude comparative des capacités suppressives des Treg CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> présents au site tumoral a révélé que les deux sous-populations étaient tout aussi aptes à supprimer la prolifération de cellules répondeuses ainsi qu'à inhiber la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Ces résultats ont montré que bien qu'exprimant T-bet, les Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site tumoral étaient fortement suppressifs *ex vivo*.

L'accumulation de Treg au site de la tumeur est un des mécanismes immunosuppresseurs mis en place dans le CEO et contribue en partie à l'inefficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale. Par conséquent, des stratégies visant à cibler spécifiquement les Treg présents au site tumoral dans le but de les éliminer ou de les convertir en cellules effectrices sont envisagées en tant qu'outil thérapeutique. Il nous a donc paru important d'identifier le ou les mécanismes responsables de l'accumulation de Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau du site tumoral dans le CEO. Cette accumulation pourrait s'expliquer par la migration sélective de Treg CXCR3<sup>+</sup> vers le site tumoral ou par leur expansion préférentielle au niveau de la tumeur ou encore par la conversion de T<sub>H</sub>1 infiltrant la tumeur en Treg CXCR3<sup>+</sup> via un phénomène de tolérogénisation favorisé par le microenvironnement tumoral connu pour être fortement immunosuppresseur dans le CEO (Yigit et al., 2010).

Afin d'obtenir un premier élément de réponse nous avons entrepris de rechercher l'origine, thymique ou périphérique, des Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au niveau du site tumoral. L'étude de l'expression d'Helios par marquage intranucléaire a montré que les Treg CXCR3<sup>+</sup> présents dans les TIL et TAL des patientes étaient majoritairement Helios<sup>+</sup> suggérant leur origine naturelle (Thornton et al., 2010). Cependant, l'utilisation d'Helios en tant que marqueur des Treg d'origine thymique étant actuellement controversée, nous avons cherché à déterminer l'origine des Treg CXCR3<sup>+</sup> par une seconde approche (Gottschalk et al., 2012; Verhagen and Wraith, 2010). Nous avons ainsi étudié l'aptitude des NTreg à se différencier en cellules présentant des caractéristiques communes aux Treg CXCR3<sup>+</sup> observés au site tumoral. Après stimulation *in vitro* en présence de cytokines polarisantes pro-T<sub>H</sub>1, nous avons généré efficacement à partir de NTreg issus du sang périphérique de donneurs sains, une population de Treg qui exprimait CXCR3 ainsi que T-bet tout en ayant maintenu l'expression de FOXP3 et d'Helios. Cette population de Treg CXCR3<sup>+</sup> issue des NTreg possédait également des propriétés suppressives et ne produisait pas d'IFN- $\gamma$ . Bien que notre analyse de l'expression d'Helios dans les NTreg (Partie 2) ait mis en évidence que l'origine des NTreg Helios<sup>-</sup> restait à être déterminée, celle des NTreg Helios<sup>+</sup> apparaît comme étant thymique. Par conséquent, le fait que les NTreg Helios<sup>+</sup> aient été capables de se différencier en Treg CXCR3<sup>+</sup> possédant des caractéristiques similaires à celles des Treg CXCR3<sup>+</sup> décrits au niveau du site tumoral dans le CEO, a renforcé l'hypothèse selon laquelle cette dernière population serait majoritairement d'origine thymique. De plus, il est à noter que nous n'avons pas observé d'induction de l'expression de FOXP3 ni d'Helios dans les cultures de LT CD4<sup>+</sup> conventionnels naïfs ayant été stimulés *in vitro* lors de notre étude.

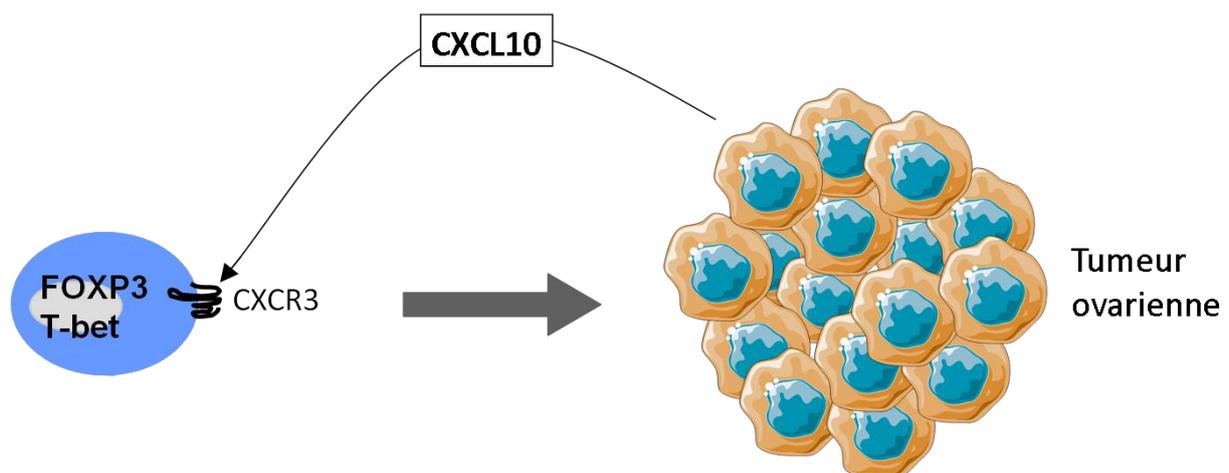
Ces résultats, désignant les Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site tumoral comme étant principalement des nTreg, nous ont suggéré que l'accumulation des Treg CXCR3<sup>+</sup> pourrait être due à une migration de ces cellules au site tumoral et non pas à une conversion des T<sub>H</sub>1 infiltrant la tumeur en Treg qui seraient alors d'origine périphérique. Par conséquent, nous avons recherché le mécanisme impliqué dans la migration et l'accumulation des Treg CXCR3<sup>+</sup> au niveau du site tumoral dans le CEO. CXCR3 est un récepteur de chimiokine qui a pour ligand CXCL10 ce qui permet aux T<sub>H</sub>1 de migrer vers les sites d'inflammation de type I. Nous avons donc émis

l'hypothèse que les Treg CXCR3<sup>+</sup> pourraient migrer vers les tumeurs associées avec une réponse inflammatoire de type I, tel que le CEO, en suivant un gradient de concentration de CXCL10. En réalisant un test de migration, nous avons constaté que le récepteur CXCR3 exprimé à la surface des Treg CXCR3<sup>+</sup> était fonctionnel et que les MTreg CXCR3<sup>+</sup> étaient tout aussi aptes que les Mconv CXCR3<sup>+</sup> à migrer en suivant un gradient de concentration de CXCL10. De plus, la proportion de cellules CXCR3<sup>+</sup> dans les MTreg et celle contenue dans les Mconv se sont révélées être directement corrélées aussi bien dans les TIL que dans les TAL, ce qui nous a suggéré que ces deux sous-populations CXCR3<sup>+</sup> pourraient migrer au site tumoral via un mécanisme commun. Enfin l'étude de l'expression de CXCL10 par PCR conventionnelle et PCR en temps réel a montré que CXCL10 était exprimé dans la majorité des tumeurs ovariennes, aussi bien dans les ascites que dans les masses solides. Il est à noter que les cellules présentatrices d'antigène ainsi que les cellules issues de lignées tumorales ovariennes se sont montrées aptes à exprimer CXCL10 après culture en présence d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . Ces données ont soutenu le concept selon lequel les Treg CXCR3<sup>+</sup> migreraient et s'accumuleraient spécifiquement au niveau du site tumoral dans le CEO en suivant un gradient de concentration de CXCL10. En accord avec nos résultats, une étude précédente avait montré que l'expression de FOXP3 corrélait positivement avec l'expression d'IFN- $\gamma$  dans les tumeurs ovariennes (Wolf et al., 2005). De plus, ils ont observé que parmi les patientes présentant une forte expression d'IFN- $\gamma$ , celles ayant également une forte expression de FOXP3 avaient un plus mauvais pronostic que celles qui exprimaient de faible taux de FOXP3 (Wolf et al., 2005).

L'étude de Curiel et al., ayant mis en évidence l'accumulation de Treg au niveau du site tumoral dans le CEO, a affirmé que cette dernière était induite par la migration de Treg CCR4<sup>+</sup> via un gradient de concentration de CCL22, le ligand de CCR4 (Curiel et al., 2004). Il est à souligner qu'à la différence de cette étude, nous avons observé que les proportions de Treg CCR4<sup>+</sup> présentes dans les TAL et particulièrement dans les TIL étaient significativement plus faibles que les pourcentages obtenus dans la périphérie. De plus, les pourcentages de cellules CCR4<sup>+</sup> étaient bien inférieurs à ceux des cellules CXCR3<sup>+</sup> au niveau du site tumoral aussi bien parmi les Treg que les LT CD4<sup>+</sup> conventionnels. En accord avec ces résultats, l'étude de l'expression de CCL22 dans les échantillons de tumeurs

ovariennes solides et d'ascites a montré que seule une minorité des tumeurs testées exprimait CCL22. Ces données ont suggéré que la migration via un gradient de concentration de CCL22 ne représenterait pas le mécanisme principal impliqué dans l'accumulation des Treg au site tumoral dans le CEO. Il est également à noter qu'à la différence des travaux de Facciabene et al., dans lesquels une migration préférentielle des Treg CCR10<sup>+</sup> avait été suggérée, nous n'avons pas observé d'enrichissement des cellules exprimant CCR10 au sein des Treg au niveau du site tumoral (résultats non fournis) (Facciabene et al., 2011).

En conclusion, nos résultats ont montré que les Treg CXCR3<sup>+</sup> étaient présents et constituaient même la sous-population de Treg majoritaire dans les TIL. Les Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site tumoral, co-exprimaient T-bet mais ne produisaient pas d'IFN- $\gamma$  et supprimaient la prolifération et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des LT effecteurs. De plus, ces Treg se sont révélés être majoritairement Helios<sup>+</sup> et sembleraient donc avoir une origine thymique. Enfin la proportion des Treg CXCR3<sup>+</sup> s'est montrée corrélée directement avec celle des LT effecteurs CXCR3<sup>+</sup> au niveau du site tumoral dans le CEO, où une expression de CXCL10 a été observée dans la majorité des tumeurs. Ces données soutiennent le concept selon lequel des Treg CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup>, d'origine thymique, migreraient et s'accumuleraient spécifiquement au niveau du site tumoral dans le CEO afin de contrôler les réponses immunitaires de types I, limitant ainsi l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale (Figure 50).



**Figure 50.** L'expression de CXCL10 au niveau du site tumoral participe à l'accumulation des Treg CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> dans le CEO. Les résultats obtenus lors de cette étude soutiennent le concept selon lequel l'expression de CXCL10 au niveau du site tumorale induirait la migration et l'accumulation sélective des Treg CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> par chimiotactisme dans le CEO.

Un manuscrit regroupant l'ensemble de ces résultats intitulé 'CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg selectively accumulates in human ovarian carcinomas to control type I immunity', a été publié dans le journal *Cancer Research* (Redjimi et al., 2012) (Annexe 4).

De nombreuses études sont actuellement réalisées dans le but de mettre au point des stratégies permettant d'éliminer ou de diminuer l'environnement immunosuppresseur présent au niveau du site tumoral afin de permettre à la réponse immunitaire d'agir efficacement. Parmi les stratégies envisagées certaines visent à éliminer les Treg ou encore à empêcher leur migration au niveau de la tumeur. Etant donné que nos résultats ont montré qu'au site tumoral, CXCR3 était exprimé par la majorité des Treg mais également par la plupart des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs, une stratégie thérapeutique visant à bloquer la migration des Treg, par exemple en bloquant CXCL10, empêcherait également la migration des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs et serait par conséquent inappropriée. La caractérisation des Treg CXCR3<sup>+</sup> au site tumoral dans le CEO doit donc être poursuivie dans le but d'élaborer une stratégie thérapeutique empêchant l'effet immunosuppresseur des Treg tout en permettant la migration des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs. Dans cette optique, une analyse du profil d'expression génique des Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site de la tumeur, via la technique de puce à ADN, pourra être réalisée afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Il serait également intéressant d'étudier l'expression des facteurs de transcription Eos et Aiolos afin de voir si tout comme les MTreg Helios<sup>+</sup> identifiés, *ex vivo*, dans le sang périphérique de donneur sains, les Treg Helios<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> présents dans les TIL sont Eos<sup>+</sup> et Aiolos<sup>-</sup> (Raffin et al., 2013).

Lors de notre étude nous avons observé que les Treg CXCR3<sup>+</sup> représentaient la sous-population majoritaire de Treg au niveau du site tumoral cependant, bien qu'étant en de plus faibles proportions, nous avons également détecté d'autres sous-populations de Treg, notamment des Treg CCR4<sup>+</sup>. De plus, d'autres travaux ont précédemment suggéré un recrutement spécifique des Treg CCR4<sup>+</sup> ou CCR10<sup>+</sup> au niveau du site tumoral dans le CEO (Curiel et al., 2004; Facciabene et al., 2011). Ces divergences entre les différentes études pourraient s'expliquer par l'hétérogénéité des patientes testées. En effet, les proportions des différentes sous-populations de Treg pourraient varier en fonction du stade de la maladie. De plus il est à souligner que le cancer de l'ovaire représente en réalité un ensemble de maladies ayant une

localisation anatomique commune mais présentant des caractéristiques histologiques et moléculaires distinctes en fonction de l'origine tissulaire des cellules cancéreuses (Vaughan et al., 2011). Par conséquent, la fréquence des différentes sous-populations de Treg au niveau du site tumoral pourraient également varier en fonction du sous-type de la maladie. Il serait ainsi intéressant d'étudier la corrélation entre les proportions des différentes sous-populations de Treg (déterminées en fonction de l'expression des récepteurs de chimiokine) et la survie des patientes, en prenant également en considération le stade de la maladie et le sous-type histologique ou/et moléculaire des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire.

Nos résultats soutiennent que les Treg CXCR3<sup>+</sup> présents au site tumoral dans le CEO sont très probablement d'origine naturelle et auraient par conséquent des TCR reconnaissant un répertoire antigénique différent de celui des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels dont font partie les T<sub>H</sub>1 (Hsieh et al., 2006). Il serait important de comparer le répertoire TCR ainsi que la spécificité antigénique des Treg et des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels présents au site tumoral. D'une part ces analyses apporteront des éléments nouveaux permettant de confirmer, ou non, l'origine naturelle de ces Treg. De plus, connaître la spécificité antigénique des LT CD4<sup>+</sup> régulateurs et conventionnels présents au niveau du site tumoral serait d'un grand intérêt pour aider au développement des stratégies d'immunothérapies anticancéreuses actives. En effet, la vaccinothérapie anti-tumorale, qui consiste à injecter au patient un vaccin composé d'un antigène associé aux tumeurs (AAT) et d'un adjuvant, a pour but d'induire une réponse immunitaire efficace spécifiquement dirigée contre les cellules exprimant l'AAT, à savoir les cellules cancéreuses, afin de les éliminer. Par conséquent, pour que la réponse immunitaire spécifique de l'AAT, induite par la vaccination, soit optimale, elle devra efficacement activer les LT CD4<sup>+</sup> présentant des fonctions effectrices mais ne devra pas induire l'expansion des Treg. Ainsi, si les Treg et les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs présents au niveau du site tumoral s'avèrent avoir une spécificité antigénique distincte, cela signifie qu'il sera très probablement possible de cibler un AAT uniquement reconnu par les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs et non par les Treg.

Plusieurs AAT ont été pressentis comme étant de bonnes cibles thérapeutiques parmi lesquels NY-ESO-1, un antigène du groupe 'cancer-testis'. Une étude réalisée dans mon laboratoire d'accueil qui visait à mieux caractériser la réponse immunitaire spontanée dirigée contre NY-ESO-1 observée chez certaines

patientes atteintes d'un CEO, a montré que les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de NY-ESO-1 étaient majoritairement des T<sub>H</sub>1 et qu'ils étaient absents du compartiment des Treg (Redjimi et al., 2011). Ces résultats montrent que certains AAT peuvent être reconnus de façon différentielle entre les Treg et les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs. De plus, NY-ESO-1 apparait comme étant un bon candidat pour le développement d'un vaccin anti-cancer et a déjà été testé dans des études cliniques de phase I. Il a notamment été mis en évidence que l'injection d'une protéine recombinante NY-ESO-1, en association avec un adjuvant, induisait des anticorps et des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques de NY-ESO-1 chez des patients ayant des tumeurs connues pour exprimer l'antigène (Valmori et al., 2007). Ces études suggèrent qu'il sera possible par les stratégies d'immunothérapie active d'induire une réponse immunitaire efficace sans activer les Treg. Cependant, afin de permettre à cette réponse immunitaire anti-tumorale d'être efficace, il sera en parallèle nécessaire d'utiliser des stratégies aptes à stopper l'effet immunosuppresseur présent au niveau de la tumeur notamment en ciblant les Treg.

## **Conclusion générale**

Etant donné le rôle essentiel que jouent les Treg dans le maintien de la tolérance au soi, leur utilisation en tant qu'outil thérapeutique dans le but de soigner certains désordres auto-immuns ou de prévenir du rejet de greffe allogénique est actuellement en cours de développement. En parallèle, de nombreuses stratégies, visant à stopper l'immunosuppression observée au niveau du site tumoral dans certains cancers, ciblent les Treg dans le but de les éliminer ou d'inhiber leur fonction suppressive et d'ainsi permettre à la réponse immunitaire anti-tumorale, spontanée ou induite, d'être efficace. Etant donné le grand potentiel thérapeutique des Treg, ces derniers ont été très étudiés et se sont révélés représenter une population de LT CD4<sup>+</sup> très complexe qui nécessite d'être mieux caractérisée. Dans ce contexte, les travaux réalisés au cours de ma thèse ont visé à mieux comprendre l'origine, l'hétérogénéité, la fonction et la plasticité, des Treg humains en conditions physiologiques, chez des donneurs sains, ainsi que dans un contexte pathologique, chez des patientes atteintes d'un CEO.

Nous avons dans un premier temps approfondi l'étude de la relation entre les Treg et les T<sub>H</sub>17 et montré que, *ex vivo*, l'expression de l'IL-1RI identifiait, parmi les Treg, un intermédiaire précoce dans une voie de différenciation partant des NTreg et étant initialement commune aux Treg et aux T<sub>H</sub>17. Puis, dans le but de mieux comprendre le lien entre l'expression d'Helios et l'origine des Treg, nous avons réalisé une étude comparative des Treg mémoires FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> et Helios<sup>+</sup> issus du sang périphérique de donneurs sains *ex vivo*. Nous avons montré que l'expression de l'IL1RI, en combinaison avec celle de CCR7, caractérisait une sous-population de Treg n'exprimant pas Helios et avons ainsi pu de mettre au point une stratégie de tri permettant de séparer les Treg Helios<sup>-</sup> des Treg Helios<sup>+</sup> et d'approfondir leur caractérisation. Nos résultats ont mis en évidence que les Treg Helios<sup>+</sup> et Helios<sup>-</sup> présentaient des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles distinctes et soutiennent fortement le concept selon lequel les Treg Helios<sup>-</sup> seraient, au moins en partie, composés de Treg d'origine périphérique aptes à moduler leur activité suppressive en fonction du contexte, physiologique ou inflammatoire.

Enfin, dans le but de caractériser les Treg enrichis au niveau du site tumoral dans le CEO et de comprendre les mécanismes impliqués dans leur accumulation,

nous avons réalisé une étude phénotypique et fonctionnelle des Treg présents au niveau de la tumeur chez des patientes atteintes d'un CEO. Nos résultats ont mis en évidence que ces Treg étaient majoritairement CXCR3<sup>+</sup>, co-exprimaient T-bet mais ne produisaient pas d'IFN- $\gamma$  et étaient suppressifs. De plus, les Treg présents au niveau de la tumeur étaient majoritairement Helios<sup>+</sup>, suggérant une origine thymique. Enfin la proportion des Treg CXCR3<sup>+</sup> s'est montrée corrélée directement avec celle des LT effecteurs CXCR3<sup>+</sup> au niveau du site tumoral, où une expression de CXCL10 a été observée dans la majorité des tumeurs. Dans leur ensemble, ces données soutiennent le concept selon lequel les Treg CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup>, d'origine thymique, migreraient et s'accumuleraient spécifiquement au niveau du site tumoral dans le CEO afin d'y contrôler les réponses immunitaires de types I, limitant ainsi l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale.

# Matériels & Méthodes

## **Origines des prélèvements de sang périphérique issus de donneurs sains, de sang de cordon ombilical et des échantillons issus des patientes atteintes d'un CEO, purification des PBMC et séparation des cellules CD4<sup>+</sup>**

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) des donneurs sains ont été isolées par la technique de centrifugation en gradient de densité (LSM 1077 lymphocyte separation medium, PAA laboratories GmbH) à partir de résidus d'anneaux de cytophèrese fournis par l'Etablissement Français du Sang (EFS) des Pays de la Loire. Les prélèvements de sang de cordon ombilical ont été fournis par l'EFS et les cellules mononucléées ont également été isolées par la technique de centrifugation en gradient de densité. Les prélèvements de tumeurs solides, d'ascites et de sangs périphériques de patientes atteintes d'un CEO ont été fournis par Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, NY) après consentement des patientes. Les échantillons de tumeurs solides ont été broyés par dissection mécanique et les suspensions cellulaires obtenues ont été congelées. Les cellules présentes dans les ascites de CEO ont été isolées par centrifugation et congelées. Les cellules CD4<sup>+</sup> issus des donneurs sains et des patientes ont ensuite été purifiées par sélection positive en utilisant la technique du tri cellulaire immunomagnétique (MACS® Cell Separation Technology, Miltenyi Biotec).

### **Analyse phénotypique *ex vivo* ou après culture *in vitro***

Des marquages de surface ont été réalisés sur des LT CD4<sup>+</sup> *ex vivo* ou sur les populations indiquées, après tri *ex vivo* ou après 12 jours de culture *in vitro*, en fonction des expériences, en utilisant différentes combinaisons d'anticorps (de chez BD Biosciences si non indiqué) couplé à des fluorochromes dirigés contre CD4 et/ou CD8, CD45RA, CCR7 (Miltenyi Biotec ou BD Biosciences), CD25 (Beckman Coulter), CD127 (eBioscience ou BD Biosciences) en association ou non avec des anticorps ciblant l'IL-1RI (R&D Systems), CXCR3, CXCR5, CCR4, CCR6, CRTH2 (Miltenyi Biotec), CD28, CD31, CD39, CD95, ICOS (eBioscience), HLA-DR, CTLA-4 (Immunotech), Bcl-2 et Ki-67. Dans certaines expériences les cellules ont été fixées puis marquées en intranucléaire avec différents mélanges d'anticorps dirigés contre FOXP3 (eBioscience), T-bet (eBioscience) et Helios (BioLegend) en utilisant le kit Foxp3 Staining Buffer Set en suivant les recommandations du fabricant (eBioscience). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie de flux (FACS Aria I ou II et LSR II; BD Biosciences).

## **Séparation des populations de LT CD4<sup>+</sup> *ex vivo* ou après culture *in vitro* par la technique de tri par cytométrie de flux**

Les cellules CD4<sup>+</sup> purifiées *ex vivo* ont été triées via la technique de tri cellulaire par cytométrie de flux à l'aide d'un FACS Aria I ou II (BD Biosciences). Les cellules ont été marquées en surface avec différents mélanges d'anticorps dirigés contre CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD25, CD127 et IL-1RI ou CXCR3 puis les populations souhaitées ont été séparées par cytométrie de flux avec une pureté supérieure à 97%. Dans le but de réaliser une étude de leurs capacités suppressives après stimulation en condition neutre ou en présence des cytokines indiquées, des NTreg en culture depuis 12 jours ont été marqués avec les anticorps anti-CCR6 et anti-IL-1RI puis séparés par cytométrie de flux en trois sous-populations : CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup> et CCR6<sup>-</sup>IL-1RI<sup>+</sup>.

## **Stimulation *in vitro* des populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolées**

Les populations de LT CD4<sup>+</sup> triées par cytométrie de flux ont été stimulées avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD2/CD3/CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit human, Miltenyi Biotec) dans des plaques de culture de 96 puits à fond rond, chaque puits contenant  $3 \times 10^4$  cellules et  $3 \times 10^4$  billes dans du milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) complet contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), pour les expériences réalisées dans les Parties 1 et 3 des résultats. La stimulation effectuée dans la Partie 2 des résultats a été réalisée en mettant  $5 \times 10^4$  des cellules dans des plaques de 96 puits à fond plat recouvertes d'anticorps anti-CD3 (1µg/ml ; eBioscience) et anti-CD28 (1µg/ml ; eBioscience), après 4 jours de culture les cellules ont été transférées dans des plaques de 96 puits à fond rond. Les cellules ont été stimulées dans différentes conditions cytokiniques, en fonction des expériences, en présence ou en absence d'IL-1β (10 ng/ml, R&D systems), d'IL-2 (100 UI/ml, Chiron), d'IL-6 (50 ng/ml, R&D systems), d'IL-21 (50 ng/ml, R&D systems), d'IL-23 (100 ng/ml, R&D systems), de TGF-β (10 ng/ml, PeproTech), d'IL-12 (10 ng/ml ; R&D systems) et d'IFN-γ (20 ng/ml ; R&D systems). Les cellules ont été mises en culture à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> et laissées au repos durant 4 jours. Le milieu a ensuite été renouvelé tous les deux jours avec de l'IMDM complet-10% SVF avec ou sans IL-2 selon les conditions.

## **Etude de la production cytokinique et de l'expression des facteurs de transcription *ex vivo* ou après culture *in vitro***

Afin d'analyser la production cytokinique des CD4<sup>+</sup> totaux ou des populations triées *ex vivo* ou après 10 à 12 jours de culture *in vitro*, les cellules ont été stimulées de façon indépendante de la spécificité antigénique de leur TCR avec du PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acétate, 100 ng/ml, Sigma Aldrich) et de l'ionomycine (1 µg/ml, Sigma Aldrich) pendant 4 heures pour les populations issues de culture *in vitro* et 6 heures pour les populations analysées *ex vivo*, à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Après la première heure d'incubation, une solution de Brefeldine A (BFA ; 10 µg/ml, Sigma Aldrich) a été ajoutée afin d'inhiber la sécrétion de cytokines. Dans certaines expériences les cellules ont subi un marquage de surface, entre l'étape de stimulation et celle de fixation, avec un anticorps anti-CD45RA seul ou couplé avec un anticorps anti-CCR7 (BD Biosciences) ou encore avec uniquement un anticorps dirigé contre CXCR3. Les cellules stimulées, ayant été marquées ou non en surface, ont ensuite été fixées puis marquées avec différentes combinaisons d'anticorps (BD Biosciences si non indiqué) dirigés contre l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-17A (eBioscience), l'IFN-γ, FOXP3 (eBioscience), RORγt (eBioscience), T-bet et/ou Helios (BioLegend) en utilisant le kit Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie de flux.

## **Marquage des cellules avec du CFSE et étude cinétique de l'induction de l'expression de l'IL-1RI**

Afin de réaliser l'étude cinétique de l'induction de l'expression de l'IL-1RI chez les Nconv et les NTreg, les deux populations ont dans un premier temps été séparées *ex vivo* par cytométrie de flux puis placées à 37°C. Le lendemain les cellules triées ont été marquées avec du CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester). Dans ce but, elles ont été incubées à 37°C avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X contenant 0,1% d'albumine de sérum bovin et du CFSE (5 µM, Invitrogen) pendant 14 minutes. Elles ont ensuite été lavées à deux reprises avec du PBS 1X-5% SVF froid puis avec du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) contenant 10% SVF. Les cellules marquées ont été déposées dans des plaques de 96 puits à fond rond à une concentration de  $3 \times 10^4$  cellules par puits. Elles ont ensuite été stimulées avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CD2/CD3/CD28 en présence d'IL-2 seule ou combinée à l'IL-1β, l'IL-23 et le TGF-β. Après 6 jours d'incubation à

37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été marquées avec un anticorps dirigé contre l'IL-1RI puis analysées par cytométrie de flux. L'étude de l'expression de l'IL-1RI par rapport à la dilution de CFSE a permis de déterminer le pourcentage de cellules exprimant l'IL-1RI dans chaque cycle de division cellulaire.

### **Etude de la fonction suppressive**

Afin d'évaluer l'aptitude des cellules à inhiber la croissance de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs, les populations de LT CD4<sup>+</sup> testées ont d'abord été isolées par cytométrie de flux. Les cellules ont ensuite été mises en co-culture, soit *ex vivo* soit après stimulation *in vitro*, avec 3 x 10<sup>4</sup> Mconv (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) marquées avec du CFSE (5µM ; Invitrogen ou 3,25µM ; eBioscience), jouant le rôle de cellules répondeuses, dans des plaques de 96 puits à fond rond à un seul ratio (1:1) ou à différents ratios, en présence de 3 x 10<sup>4</sup> monocytes irradiés et de PHA (HA16, 0,5 µg/ml ; Oxoid). Les monocytes ont été préalablement obtenus par sélection positive des cellules CD14<sup>+</sup> à partir des PBMC d'un donneur sain par tri cellulaire immunomagnétique (Miltenyi Biotec). Une fraction des cellules T CD4<sup>+</sup> répondeuses marquées CFSE a été mise en culture en l'absence de cellules à tester et a servi de témoin de prolifération. Après 4 à 6 jours de culture, la croissance des cellules répondeuses a été mesurée par l'analyse de la dilution du CFSE par cytométrie de flux. La croissance (100 - pourcentage de cellules non divisées) dans les puits sans cellule testée (groupe témoin) a été comparée avec celles des puits contenant les cellules à tester (groupes testés). Le pourcentage de suppression a été déterminé selon le calcul suivant: 100 - ((croissance du groupe testé/croissance du groupe témoin) x 100). Dans certains cas les cellules répondeuses utilisées ont été des Mconv CXCR3<sup>+</sup> ou CXCR3<sup>-</sup> marqués avec du CFSE. Dans d'autres expériences visant à étudier l'effet de l'IL-1β sur la capacité suppressive des cellules testées, de l'IL-1β (10 ng/ml, R&D systems) a été ajouté au milieu lors du test de suppression aussi bien dans le groupe testé que dans le groupe témoin. Dans certaines expériences, afin d'évaluer l'aptitude des populations suppressives testées à inhiber la production d'IFN-γ par les cellules répondeuses, une fraction des surnageants des cultures a été récupérée à jour 5 puis la concentration d'IFN-γ a été dosée par test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; Invitrogen). Le pourcentage de suppression de la production

d'IFN- $\gamma$  a été calculée ainsi :  $100 - [\text{IFN-}\gamma \text{ (ng/ml) dans les cultures testées} / \text{IFN-}\gamma \text{ (ng/ml) dans les cultures contrôles} \times 100]$ .

### **Analyse de l'expression de génique par PCR quantitative**

L'ARN a été extrait à partir des populations de LT CD4<sup>+</sup> triées *ex vivo* en utilisant le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). La synthèse d'ADNc a été réalisée en utilisant le système Promega Reverse Transcription System A3500 (Promega). La PCR quantitative a été réalisée avec un kit TaqMan à l'aide d'un ABI 7000 system (Applied Biosystems) en utilisant des sondes Taqman spécifiques de *IL1R1* (Hs00168392\_m1) (Applied Biosystems ; assays-on-Demand Gene Expression probe), *IL-1R2* (Hs01030384\_m1), *TGFBR2* (Hs00947889\_s1), *IKZF3* (Aiolos ; Hs00232635\_m1), *IKZF4* (Eos ; Hs00223842\_m1), *RORC* (ROR $\gamma$ t ; Hs01076112\_m1) et *C-MAF* (Hs04185012\_s1). Nous avons utilisé la sonde Taqman (FAM-5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3'-TAMRA) et les amorces (5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3' and 5'-CCAGGCGCCCAATACG-3) du gène de ménage *GAPDH* (Hs02758991\_g1) pour normaliser les réactions. L'expression relative d'ARNm a été calculée ainsi :  $2^{(\text{Ct}_{\text{GAPDH}} - \text{Ct}_{\text{IL-1RI}})}$ .

### **Etude de l'expression des ARNm des chimiokines par PCR en temps réel et PCR conventionnelle**

Des lignées cellulaires de cancer ovarien humain (SK-OV-3 et SK-OV-6, fournies par Dr. Lloyd J. Old), des lignées cellulaires de cancer du colon humain (HT-29, American Type Culture Collection) ainsi que des monocytes (CD14<sup>+</sup>) enrichis par sélection positive à partir de PBMC issus de donneurs sains ont été traités durant 24h en présence ou en l'absence d'IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) seul ou combiné avec du TNF- $\alpha$  (50 ng/ml ; R&D Systems). L'ARN a été extrait, des échantillons de tumeurs ovariennes, des cellules isolées d'ascites de CEO, des lignées cellulaires de tumeurs ovariennes et des monocytes, en utilisant le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel). La synthèse d'ADNc a été réalisée en utilisant le système Promega Reverse Transcription System kit (Promega). La PCR quantitative a été réalisée avec un kit TaqMan à l'aide d'un ABI 7000 system (Applied Biosystems) en utilisant une sonde Taqman spécifique de *CXCL10* (Hs00171042\_m1), *CCL22* (Hs01574247\_m1) et *ACTB* (Hs99999903\_m1 ; Applied Biosystems). L'expression relative d'ARNm a été

calculée ainsi :  $2^{(Ct \text{ ACTB} - Ct \text{ gène testé})}$ . La PCR conventionnelle a été réalisée en utilisant le kit GoTaq Flexi DNA Polymerase Kit (Promega). L'efficacité de la synthèse d'ADNc a été contrôlée par l'amplification de l'ARNm de *ACTB* ( $\beta$ -actin) et l'expression d'ARNm de *CXCL10* (sens : 5'-AGTGGCATTCAAGGAGTACC-3' ; anti-sens : 5'-ATCCTTGGAAGCACTGCATC-3') ainsi que l'expression d'ARNm de *CCL22* (sens : 5'-GAGACATACAGGACAGAGCATGGCT-3' ; anti-sens : 5'-ATGGAGATCAGGGAATGCAGAGAG-3') ont été étudiées.

### **Test de migration**

Afin d'évaluer l'aptitude des LT CD4<sup>+</sup> à migrer en suivant un gradient de concentration de CXCL10, les populations CXCR3<sup>+</sup> et CXCR3<sup>-</sup> des MTreg et Mconv, triées par cytométrie de flux à partir des LT CD4<sup>+</sup> issus du sang périphérique de donneurs sains, ont été stimulées dans des plaques de 96 puits à fond plat ayant été préalablement recouverts d'anticorps monoclonaux purifiés dirigés contre CD3 et CD28 (BD Biosciences) en présence d'IL-2. Après quatre jours, les cellules ont été transférées dans des plaques de 96 puits à fond rond classiques et le milieu de culture a été changé tout les 2 jours. Une fraction des cellules issues des cultures à jour 10, a été marquée avec un anticorps dirigé contre CXCR3 et analysée par cytométrie de flux. Les cellules obtenues après 10 jours de culture ont été placées dans les chambres supérieures de plaques 96 puits transwell (corning Costar ; filtre de polycarbonate avec des pores de 5 $\mu$ m) et du milieu de culture contenant ou non du CXCL10 (100 ng/ml ; R&D Systems) a été ajouté dans les chambres inférieures. Après 2 heures d'incubation à 37°C, les cellules ont été récupérées dans les chambres inférieures et une numération par cytométrie de flux a été réalisée. L'index de migration pour chaque population a été déterminé en calculant le ratio du nombre de cellules ayant migré en présence de CXCL10 sur le nombre de cellules ayant migré en l'absence de CXCL10.

### **Test de prolifération**

Dans le but d'évaluer les capacités prolifératives de populations de LT CD4<sup>+</sup> isolées *ex vivo*, les cellules ont été marquées avec du CFSE (3,25 $\mu$ M ; eBioscience), puis ont été stimulées avec de la PHA (HA16, 0,5  $\mu$ g/ml) en présence de monocytes irradiés en présence ou en l'absence d'IL-2 (100 U/ml ; Chiron). Après 6 jours de

culture, la dilution du CFSE a été mesurée par cytométrie de flux pour chacune des cultures permettant d'obtenir le pourcentage de cellules dans chaque cycle de division. Le nombre de cycles de division moyen a été calculé comme étant la somme de  $nf_n$  allant de  $n=0$  à  $n_{max}$ , avec  $n$  correspondant au nombre de cycle de division et  $f_n$  à la fraction de cellules ayant subi  $n$  divisions.

### **Mesure de l'état de méthylation de la région TSDR du gène FOXP3 par PCR quantitative**

La mesure de l'état de méthylation de la région TSDR du gène FOXP3 a été réalisée par PCR quantitative par Epiontis GmbH (Berlin, Allemagne). L'ADN génomique des populations LT CD4<sup>+</sup> que nous avons précédemment triées *ex vivo* et congelé a été extrait avec le DNeasy kit (Qiagen). Puis une PCR en temps réel utilisant des amorces spécifiques de la région TSDR méthylée ou déméthylée a été réalisée et les proportions d'ADN déméthylés au niveau du TSDR ont été calculées ainsi :  $FOXP3$  TSDR-DNA déméthylé / [( $FOXP3$  TSDR-DNA déméthylé) + ( $FOXP3$  TSDR-DNA méthylé)].

### **Analyse statistique**

Le Student's t test bilatéral ou le test non-paramétrique bilatéral de Mann-Whitney ont été utilisés pour comparer les moyennes de deux groupes non-appariés. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme étant significative (\*,  $P < 0,05$  ; \*\*,  $P < 0,01$  ; \*\*\*,  $P < 0,001$  ; ns = non significatif).

# Références

- Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007a. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 8:942-949.
- Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007b. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 8:639-646.
- Adotevi, O., H. Pere, P. Ravel, N. Haicheur, C. Badoual, N. Merillon, J. Medioni, S. Peyrard, S. Roncelin, V. Verkarre, A. Mejean, W.H. Fridman, S. Oudard, and E. Tartour. 2010. A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother.* 33:991-998.
- Allan, S.E., S.Q. Crome, N.K. Crellin, L. Passerini, T.S. Steiner, R. Bacchetta, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* 19:345-354.
- Ame-Thomas, P., J. Le Priol, H. Yssel, G. Caron, C. Pangault, R. Jean, N. Martin, T. Marafioti, P. Gaulard, T. Lamy, T. Fest, G. Semana, and K. Tarte. 2012. Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia.* 26:1053-1063.
- Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 204:1849-1861.
- Apetoh, L., F.J. Quintana, C. Pot, N. Joller, S. Xiao, D. Kumar, E.J. Burns, D.H. Sherr, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol.* 11:854-861.
- Apostolou, I., and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med.* 199:1401-1408.
- Atarashi, K., T. Tanoue, T. Shima, A. Imaoka, T. Kuwahara, Y. Momose, G. Cheng, S. Yamasaki, T. Saito, Y. Ohba, T. Taniguchi, K. Takeda, S. Hori, Ivanov, II, Y. Umesaki, K. Itoh, and K. Honda. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science.* 331:337-341.
- Attia, P., A.V. Maker, L.R. Haworth, L. Rogers-Freezer, and S.A. Rosenberg. 2005. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother.* 28:582-592.
- Awasthi, A., Y. Carrier, J.P. Peron, E. Bettelli, M. Kamanaka, R.A. Flavell, V.K. Kuchroo, M. Oukka, and H.L. Weiner. 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol.* 8:1380-1389.
- Ayyoub, M., F. Deknuydt, I. Raimbaud, C. Dousset, L. Leveque, G. Bioley, and D. Valmori. 2009. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:8635-8640.
- Ayyoub, M., D. Dojcinovic, P. Pignon, I. Raimbaud, J. Schmidt, I. Luescher, and D. Valmori. 2010. Monitoring of NY-ESO-1 specific CD4+ T cells using molecularly defined MHC class II/His-tag-peptide tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:7437-7442.
- Ayyoub, M., C. Raffin, and D. Valmori. 2013. Comment on "helios+ and helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans". *J Immunol.* 190:4439-4440.
- Badoual, C., S. Hans, J. Rodriguez, S. Peyrard, C. Klein, H. Agueznay Nel, V. Mosseri, O. Laccourreye, P. Bruneval, W.H. Fridman, D.F. Brasnu, and E. Tartour. 2006. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 12:465-472.
- Baecher-Allan, C., J.A. Brown, G.J. Freeman, and D.A. Hafler. 2001. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 167:1245-1253.
- Baecher-Allan, C., E. Wolf, and D.A. Hafler. 2006. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol.* 176:4622-4631.
- Baine, I., S. Basu, R. Ames, R.S. Sellers, and F. Macian. 2013. Helios induces epigenetic silencing of IL2 gene expression in regulatory T cells. *J Immunol.* 190:1008-1016.

- Bardel, E., F. Larousserie, P. Charlot-Rabiega, A. Coulomb-L'Hermine, and O. Devergne. 2008. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol.* 181:6898-6905.
- Barnett, B., I. Kryczek, P. Cheng, W. Zou, and T.J. Curiel. 2005. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol.* 54:369-377.
- Baron, U., S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grutzkau, J. Dong, A. Thiel, T.J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Turbachova, A. Hamann, S. Olek, and J. Huehn. 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol.* 37:2378-2389.
- Bates, G.J., S.B. Fox, C. Han, R.D. Leek, J.F. Garcia, A.L. Harris, and A.H. Banham. 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 24:5373-5380.
- Baur, A.S., M.B. Lutz, S. Schierer, L. Beltrame, G. Theiner, E. Zinser, C. Ostalecki, G. Heidkamp, I. Haendle, M. Erdmann, M. Wiesinger, W. Leisgang, S. Gross, A.J. Pommer, E. Kampgen, D. Dudziak, A. Steinkasserer, D. Cavalieri, B. Schuler-Thurner, and G. Schuler. 2013. Denileukin diftitox (ONTAK) induces a tolerogenic phenotype in dendritic cells and stimulates survival of resting Treg. *Blood.* 122:2185-2194.
- Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 420:502-507.
- Bell, M.P., P.A. Svingen, M.K. Rahman, Y. Xiong, and W.A. Faubion, Jr. 2007. FOXP3 regulates TLR10 expression in human T regulatory cells. *J Immunol.* 179:1893-1900.
- Bending, D., H. De la Pena, M. Veldhoen, J.M. Phillips, C. Uyttenhove, B. Stockinger, and A. Cooke. 2009. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest.* 119:565-572.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 441:235-238.
- Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:5138-5143.
- Bilate, A.M., and J.J. Lafaille. 2012. Induced CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol.* 30:733-758.
- Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 196:254-265.
- Bonertz, A., J. Weitz, D.H. Pietsch, N.N. Rahbari, C. Schlude, Y. Ge, S. Juenger, I. Vlodavsky, K. Khazaie, D. Jaeger, C. Reissfelder, D. Antolovic, M. Aigner, M. Koch, and P. Beckhove. 2009. Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. *J Clin Invest.* 119:3311-3321.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 110:1225-1232.
- Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Forster. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 192:1545-1552.
- Bruder, D., M. Probst-Kepper, A.M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer, and W. Hansen. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 34:623-630.
- Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paepers, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 27:68-73.

- Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T.W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol.* 8:958-966.
- Burmeister, Y., T. Lischke, A.C. Dahler, H.W. Mages, K.P. Lam, A.J. Coyle, R.A. Kroccek, and A. Hutloff. 2008. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol.* 180:774-782.
- Cai, Q., A. Dierich, M. Oulad-Abdelghani, S. Chan, and P. Kastner. 2009. Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function. *J Immunol.* 183:2303-2311.
- Chang, H.C., S. Sehra, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G.L. Stritesky, R. Jabeen, C. McKinley, A.N. Ahyi, L. Han, E.T. Nguyen, M.J. Robertson, N.B. Perumal, R.S. Tepper, S.L. Nutt, and M.H. Kaplan. 2010. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol.* 11:527-534.
- Chaturvedi, V., L.W. Collison, C.S. Guy, C.J. Workman, and D.A. Vignali. 2011. Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol.* 186:6661-6666.
- Chaturvedi, V., L.W. Collison, C.S. Guy, C.J. Workman, and D.A. Vignali. 2013. Retraction. Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol.* 191:2018.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 198:1875-1886.
- Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265:1237-1240.
- Chung, Y., S.H. Chang, G.J. Martinez, X.O. Yang, R. Nurieva, H.S. Kang, L. Ma, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* 30:576-587.
- Chung, Y., S. Tanaka, F. Chu, R.I. Nurieva, G.J. Martinez, S. Rawal, Y.H. Wang, H. Lim, J.M. Reynolds, X.H. Zhou, H.M. Fan, Z.M. Liu, S.S. Neelapu, and C. Dong. 2011. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med.* 17:983-988.
- Clark, W.H., Jr., D.E. Elder, D.t. Guerry, L.E. Braitman, B.J. Trock, D. Schultz, M. Synnestvedt, and A.C. Halpern. 1989. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 81:1893-1904.
- Collison, L.W., V. Chaturvedi, A.L. Henderson, P.R. Giacomini, C. Guy, J. Bankoti, D. Finkelstein, K. Forbes, C.J. Workman, S.A. Brown, J.E. Rehg, M.L. Jones, H.T. Ni, D. Artis, M.J. Turk, and D.A. Vignali. 2010. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol.* 11:1093-1101.
- Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 450:566-569.
- Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2008. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med.* 205:1903-1916.
- Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone, E. Cardilicchia, F. Frosali, V. Querci, R. Angeli, A. Matucci, M. Fambrini, F. Liotta, P. Parronchi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2010. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol.* 125:222-230 e221-224.
- Crellin, N.K., R.V. Garcia, O. Hadisfar, S.E. Allan, T.S. Steiner, and M.K. Levings. 2005. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 175:8051-8059.
- Cua, D.J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein, and J.D.

- Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 421:744-748.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 10:942-949.
- D'Ambrosio, D., A. Iellem, R. Bonecchi, D. Mazzeo, S. Sozzani, A. Mantovani, and F. Sinigaglia. 1998. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol*. 161:5111-5115.
- Dannull, J., Z. Su, D. Rizzieri, B.K. Yang, D. Coleman, D. Yancey, A. Zhang, P. Dahm, N. Chao, E. Gilboa, and J. Vieweg. 2005. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 115:3623-3633.
- Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R.A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T.B. Strom, W. Elyaman, I.C. Ho, S. Khoury, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*. 9:1347-1355.
- de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 34:2480-2488.
- Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enyoloji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 204:1257-1265.
- Deknuydt, F., G. Boleley, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2009. IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol*. 131:298-307.
- Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 193:1303-1310.
- Dominguez-Villar, M., C.M. Baecher-Allan, and D.A. Hafler. 2011. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med*. 17:673-675.
- Duarte, J.H., S. Zelenay, M.L. Bergman, A.C. Martins, and J. Demengeot. 2009. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur J Immunol*. 39:948-955.
- Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*. 10:857-863.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 3:991-998.
- Facciabene, A., X. Peng, I.S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L.P. Wang, P.A. Gimotty, C.B. Gilks, P. Lal, L. Zhang, and G. Coukos. 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*. 475:226-230.
- Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S.D. Hurst, R.L. Coffman, R.A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 201:737-746.
- Fallarino, F., U. Grohmann, K.W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, M.L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 4:1206-1212.
- Feng, T., A.T. Cao, C.T. Weaver, C.O. Elson, and Y. Cong. 2011. Interleukin-12 converts Foxp3+ regulatory T cells to interferon-gamma-producing Foxp3+ T cells that inhibit colitis. *Gastroenterology*. 140:2031-2043.

- Finke, J.H., B. Rini, J. Ireland, P. Rayman, A. Richmond, A. Golshayan, L. Wood, P. Elson, J. Garcia, R. Dreicer, and R. Bukowski. 2008. Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 14:6674-6682.
- Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 5:e38.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4:330-336.
- Fourcade, J., Z. Sun, P. Kudela, B. Janjic, J.M. Kirkwood, T. El-Hafnawy, and H.M. Zarour. 2010. Human tumor antigen-specific helper and regulatory T cells share common epitope specificity but exhibit distinct T cell repertoire. *J Immunol.* 184:6709-6718.
- Francois, V., S. Ottaviani, N. Renkvist, J. Stockis, G. Schuler, K. Thielemans, D. Colau, M. Marchand, T. Boon, S. Lucas, and P. van der Bruggen. 2009. The CD4(+) T-cell response of melanoma patients to a MAGE-A3 peptide vaccine involves potential regulatory T cells. *Cancer Res.* 69:4335-4345.
- Fritzsching, B., N. Oberle, N. Eberhardt, S. Quick, J. Haas, B. Wildemann, P.H. Krammer, and E. Suri-Payer. 2005. In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol.* 175:32-36.
- Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and F. Pages. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 313:1960-1964.
- Gandhi, R., D. Kumar, E.J. Burns, M. Nadeau, B. Dake, A. Laroni, D. Kozoriz, H.L. Weiner, and F.J. Quintana. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol.* 11:846-853.
- Gershon, R.K., and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 18:723-737.
- Gershon, R.K., and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology.* 21:903-914.
- Ghiringhelli, F., C. Menard, P.E. Puig, S. Ladoire, S. Roux, F. Martin, E. Solary, A. Le Cesne, L. Zitvogel, and B. Chauffert. 2007. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 56:641-648.
- Ghiringhelli, F., P.E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, and L. Zitvogel. 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 202:919-929.
- Ghoreschi, K., A. Laurence, X.P. Yang, C.M. Tato, M.J. McGeachy, J.E. Konkel, H.L. Ramos, L. Wei, T.S. Davidson, N. Bouladoux, J.R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W.T. Watford, H.W. Sun, G. Eberl, E.M. Shevach, Y. Belkaid, D.J. Cua, W. Chen, and J.J. O'Shea. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature.* 467:967-971.
- Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A.C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J.Y. Blay, and C. Menetrier-Caux. 2009. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 69:2000-2009.
- Gorelik, E., R.H. Wiltrot, K. Okumura, S. Habu, and R.B. Herberman. 1982. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer.* 30:107-112.
- Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison. 2012. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 188:976-980.
- Gran, B., G.X. Zhang, S. Yu, J. Li, X.H. Chen, E.S. Ventura, M. Kamoun, and A. Rostami. 2002. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for

- redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol.* 169:7104-7110.
- Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M.L. Belladonna, R. Bianchi, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol.* 3:1097-1101.
- Grossman, W.J., J.W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J.P. Atkinson, and T.J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 21:589-601.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 389:737-742.
- Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6:1123-1132.
- Hill, J.A., M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity.* 27:786-800.
- Himmel, M.E., K.G. MacDonald, R.V. Garcia, T.S. Steiner, and M.K. Levings. 2013. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol.* 190:2001-2008.
- Hindley, J.P., C. Ferreira, E. Jones, S.N. Lauder, K. Ladell, K.K. Wynn, G.J. Betts, Y. Singh, D.A. Price, A.J. Godkin, J. Dyson, and A. Gallimore. 2011. Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. *Cancer Res.* 71:736-746.
- Hirahara, K., L. Liu, R.A. Clark, K. Yamanaka, R.C. Fuhlbrigge, and T.S. Kupper. 2006. The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol.* 177:4488-4494.
- Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 12:5423-5434.
- Hoerning, A., K. Koss, D. Datta, L. Boneschansker, C.N. Jones, I.Y. Wong, D. Irimia, K. Calzadilla, F. Benitez, P.F. Hoyer, W.E. Harmon, and D.M. Briscoe. 2011. Subsets of human CD4(+) regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3. *Eur J Immunol.* 41:2291-2302.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299:1057-1061.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 260:547-549.
- Hsieh, C.S., Y. Zheng, Y. Liang, J.D. Fontenot, and A.Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol.* 7:401-410.
- Huang, B., P.Y. Pan, Q. Li, A.I. Sato, D.E. Levy, J. Bromberg, C.M. Divino, and S.H. Chen. 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 66:1123-1131.
- Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia, and D. D'Ambrosio. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med.* 194:847-853.
- Ivanov, II, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 126:1121-1133.

- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A.H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 192:1213-1222.
- Jordan, J.T., W. Sun, S.F. Hussain, G. DeAngulo, S.S. Prabhu, and A.B. Heimberger. 2008. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 57:123-131.
- Jordan, M.S., A. Boesteanu, A.J. Reed, A.L. Petrone, A.E. Hohenbeck, M.A. Lerman, A. Najj, and A.J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2:301-306.
- Kavanagh, B., S. O'Brien, D. Lee, Y. Hou, V. Weinberg, B. Rini, J.P. Allison, E.J. Small, and L. Fong. 2008. CTLA4 blockade expands FoxP3+ regulatory and activated effector CD4+ T cells in a dose-dependent fashion. *Blood*. 112:1175-1183.
- Kim, B.S., I.K. Kim, Y.J. Park, Y.S. Kim, Y.J. Kim, W.S. Chang, Y.S. Lee, M.N. Kweon, Y. Chung, and C.Y. Kang. 2010. Conversion of Th2 memory cells into Foxp3+ regulatory T cells suppressing Th2-mediated allergic asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:8742-8747.
- Kim, Y.C., R. Bhairavabhotla, J. Yoon, A. Golding, A.M. Thornton, D.Q. Tran, and E.M. Shevach. 2012. Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood*. 119:2810-2818.
- Kleinewietfeld, M., A. Manzel, J. Titze, H. Kvakana, N. Yosef, R.A. Linker, D.N. Muller, and D.A. Hafler. 2013. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 496:518-522.
- Ko, K., S. Yamazaki, K. Nakamura, T. Nishioka, K. Hirota, T. Yamaguchi, J. Shimizu, T. Nomura, T. Chiba, and S. Sakaguchi. 2005. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med*. 202:885-891.
- Kobayashi, N., N. Hiraoka, W. Yamagami, H. Ojima, Y. Kanai, T. Kosuge, A. Nakajima, and S. Hirohashi. 2007. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 13:902-911.
- Koch, M.A., G. Tucker-Heard, N.R. Perdue, J.R. Killebrew, K.B. Urdahl, and D.J. Campbell. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*. 10:595-602.
- Komatsu, N., M.E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann, and S. Hori. 2009. 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*. 106:1903-1908.
- Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 201:233-240.
- Lathrop, S.K., S.M. Bloom, S.M. Rao, K. Nutsch, C.W. Lio, N. Santacruz, D.A. Peterson, T.S. Stappenbeck, and C.S. Hsieh. 2011. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*. 478:250-254.
- Le Gros, G., S.Z. Ben Sasson, R. Seder, F.D. Finkelman, and W.E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med*. 172:921-929.
- Lee, W.W., S.W. Kang, J. Choi, S.H. Lee, K. Shah, E.E. Eynon, R.A. Flavell, and I. Kang. 2010. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood*. 115:530-540.
- Lee, Y.K., H. Turner, C.L. Maynard, J.R. Oliver, D. Chen, C.O. Elson, and C.T. Weaver. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 30:92-107.
- Lexberg, M.H., A. Taubner, A. Forster, I. Albrecht, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch, and H.D. Chang. 2008. Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur J Immunol*. 38:2654-2664.
- Lio, C.W., and C.S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*. 28:100-111.

- Liotta, F., M. Gacci, F. Frosali, V. Querci, G. Vittori, A. Lapini, V. Santarasci, S. Serni, L. Cosmi, L. Maggi, R. Angeli, B. Mazzinghi, P. Romagnani, E. Maggi, M. Carini, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2011. Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 107:1500-1506.
- Liu, H., M. Komai-Koma, D. Xu, and F.Y. Liew. 2006a. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7048-7053.
- Liu, V.C., L.Y. Wong, T. Jang, A.H. Shah, I. Park, X. Yang, Q. Zhang, S. Lonning, B.A. Teicher, and C. Lee. 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol.* 178:2883-2892.
- Liu, W., A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, and J.A. Bluestone. 2006b. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 203:1701-1711.
- Lochner, M., L. Peduto, M. Cherrier, S. Sawa, F. Langa, R. Varona, D. Riethmacher, M. Si-Tahar, J.P. Di Santo, and G. Eberl. 2008. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med.* 205:1381-1393.
- Ma, C.S., E.K. Deenick, M. Batten, and S.G. Tangye. 2012. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 209:1241-1253.
- Mackie, R.M., R. Reid, and B. Junor. 2003. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med.* 348:567-568.
- Mahnke, K., K. Schonfeld, S. Fondel, S. Ring, S. Karakhanova, K. Wiedemeyer, T. Bedke, T.S. Johnson, V. Storn, S. Schallenberg, and A.H. Enk. 2007. Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer.* 120:2723-2733.
- Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman. 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol.* 9:641-649.
- Mangan, P.R., L.E. Harrington, D.B. O'Quinn, W.S. Helms, D.C. Bullard, C.O. Elson, R.D. Hatton, S.M. Wahl, T.R. Schoeb, and C.T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 441:231-234.
- Marth, C., H. Fiegl, A.G. Zeimet, E. Muller-Holzner, M. Deibl, W. Doppler, and G. Daxenbichler. 2004. Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 191:1598-1605.
- McClymont, S.A., A.L. Putnam, M.R. Lee, J.H. Esensten, W. Liu, M.A. Hulme, U. Hoffmuller, U. Baron, S. Olek, J.A. Bluestone, and T.M. Brusko. 2011. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Immunol.* 186:3918-3926.
- McGeachy, M.J., K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D.J. Cua. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 8:1390-1397.
- McGeachy, M.J., Y. Chen, C.M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W.M. Blumenschein, T.K. McClanahan, J.J. O'Shea, and D.J. Cua. 2009. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 10:314-324.
- Mercer, F., L. Kozhaya, and D. Unutmaz. 2010. Expression and function of TNF and IL-1 receptors on human regulatory T cells. *PLoS One.* 5:e8639.
- Miller, A., O. Lider, A.B. Roberts, M.B. Sporn, and H.L. Weiner. 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:421-425.

- Milpied, P., A. Renand, J. Bruneau, D.A. Mendes-da-Cruz, S. Jacquelin, V. Asnafi, M.T. Rubio, E. MacIntyre, Y. Lepelletier, and O. Hermine. 2009. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol.* 39:1466-1471.
- Miyao, T., S. Floess, R. Setoguchi, H. Luche, H.J. Fehling, H. Waldmann, J. Huehn, and S. Hori. 2012. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity.* 36:262-275.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov, and S. Sakaguchi. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 30:899-911.
- Morse, M.A., A.C. Hobeika, T. Osada, D. Serra, D. Niedzwiecki, H.K. Lyerly, and T.M. Clay. 2008. Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood.* 112:610-618.
- Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136:2348-2357.
- Mucida, D., N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J.J. Lafaille, and M.A. Curotto de Lafaille. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest.* 115:1923-1933.
- Murphy, E., K. Shibuya, N. Hosken, P. Openshaw, V. Maino, K. Davis, K. Murphy, and A. O'Garra. 1996. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med.* 183:901-913.
- Nagata, K., K. Tanaka, K. Ogawa, K. Kemmotsu, T. Imai, O. Yoshie, H. Abe, K. Tada, M. Nakamura, K. Sugamura, and S. Takano. 1999. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol.* 162:1278-1286.
- Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 172:834-842.
- Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science.* 166:753-755.
- Nurieva, R., X.O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A.D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S.S. Watowich, A.M. Jetten, and C. Dong. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 448:480-483.
- Oldenhove, G., N. Bouladoux, E.A. Wohlfert, J.A. Hall, D. Chou, L. Dos Santos, S. O'Brien, R. Blank, E. Lamb, S. Natarajan, R. Kastenmayer, C. Hunter, M.E. Grigg, and Y. Belkaid. 2009. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity.* 31:772-786.
- Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita, and E. Nakayama. 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 59:3128-3133.
- Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J.C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J.S. Abrams, K.W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 13:715-725.
- Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 28:454-467.
- Pan, F., H. Yu, E.V. Dang, J. Barbi, X. Pan, J.F. Grosso, D. Jinasena, S.M. Sharma, E.M. McCadden, D. Getnet, C.G. Drake, J.O. Liu, M.C. Ostrowski, and D.M. Pardoll. 2009. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science.* 325:1142-1146.
- Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M.J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 8:1353-1362.

- Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 6:1133-1141.
- Passerini, L., S. Di Nunzio, S. Gregori, E. Gambineri, M. Cecconi, M.G. Seidel, G. Cazzola, L. Perroni, A. Tommasini, S. Vignola, L. Guidi, M.G. Roncarolo, and R. Bacchetta. 2011. Functional type 1 regulatory T cells develop regardless of FOXP3 mutations in patients with IPEX syndrome. *Eur J Immunol.* 41:1120-1131.
- Peng, G., Z. Guo, Y. Kiniwa, K.S. Voo, W. Peng, T. Fu, D.Y. Wang, Y. Li, H.Y. Wang, and R.F. Wang. 2005. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science.* 309:1380-1384.
- Pere, H., Y. Montier, J. Bayry, F. Quintin-Colonna, N. Merillon, E. Dransart, C. Badoual, A. Gey, P. Ravel, E. Marcheteau, F. Batteux, F. Sandoval, O. Adotevi, C. Chiu, S. Garcia, C. Tanchot, Y.C. Lone, L.C. Ferreira, B.H. Nelson, D. Hanahan, W.H. Fridman, L. Johannes, and E. Tartour. 2011. A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens. *Blood.* 118:4853-4862.
- Phan, G.Q., J.C. Yang, R.M. Sherry, P. Hwu, S.L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, N.P. Restifo, L.R. Haworth, C.A. Seipp, L.J. Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, P.H. Duray, S.M. Steinberg, J.P. Allison, T.A. Davis, and S.A. Rosenberg. 2003. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:8372-8377.
- Piconese, S., B. Valzasina, and M.P. Colombo. 2008. OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J Exp Med.* 205:825-839.
- Polansky, J.K., K. Kretschmer, J. Freyer, S. Floess, A. Garbe, U. Baron, S. Olek, A. Hamann, H. von Boehmer, and J. Huehn. 2008. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol.* 38:1654-1663.
- Preston, C.C., M.J. Maurer, A.L. Oberg, D.W. Visscher, K.R. Kalli, L.C. Hartmann, E.L. Goode, and K.L. Knutson. 2013. The Ratios of CD8(+) T Cells to CD4(+)CD25(+) FOXP3(+) and FOXP3(-) T Cells Correlate with Poor Clinical Outcome in Human Serous Ovarian Cancer. *PLoS One.* 8:e80063.
- Putnam, A.L., T.M. Brusko, M.R. Lee, W. Liu, G.L. Szot, T. Ghosh, M.A. Atkinson, and J.A. Bluestone. 2009. Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 58:652-662.
- Quintana, F.J., H. Jin, E.J. Burns, M. Nadeau, A. Yeste, D. Kumar, M. Rangachari, C. Zhu, S. Xiao, J. Seavitt, K. Georgopoulos, and V.K. Kuchroo. 2012. Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing Il2 expression. *Nat Immunol.* 13:770-777.
- Raffin, C., P. Pignon, C. Celse, E. Debien, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2013. Human Memory Helios-FOXP3+ Regulatory T Cells (Tregs) Encompass Induced Tregs That Express Aiolos and Respond to IL-1beta by Downregulating Their Suppressor Functions. *J Immunol.*
- Raffin, C., I. Raimbaud, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2011. Ex vivo IL-1 receptor type I expression in human CD4+ T cells identifies an early intermediate in the differentiation of Th17 from FOXP3+ naive regulatory T cells. *J Immunol.* 187:5196-5202.
- Raimondi, G., W.J. Shufesky, D. Tokita, A.E. Morelli, and A.W. Thomson. 2006. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol.* 176:2808-2816.
- Rech, A.J., and R.H. Vonderheide. 2009. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1174:99-106.
- Redjimi, N., K. Duperrier-Amouriaux, I. Raimbaud, I. Luescher, D. Dojcinovic, J.M. Classe, D. Berton-Rigaud, J.S. Frenel, E. Bourbouloux, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2011. NY-ESO-1-specific circulating CD4+ T cells in ovarian cancer patients are prevalently T(H)1 type cells undetectable in the CD25+ FOXP3+ Treg compartment. *PLoS One.* 6:e22845.

- Redjimi, N., C. Raffin, I. Raimbaud, P. Pignon, J. Matsuzaki, K. Odunsi, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2012. CXCR3+ T Regulatory Cells Selectively Accumulate in Human Ovarian Carcinomas to Limit Type I Immunity. *Cancer Res.* 72:4351-4360.
- Richman, L.K., J.M. Chiller, W.R. Brown, D.G. Hanson, and N.M. Vaz. 1978. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J Immunol.* 121:2429-2434.
- Rilke, F., M.I. Colnaghi, N. Cascinelli, S. Andreola, M.T. Baldini, R. Bufalino, G. Della Porta, S. Menard, M.A. Pierotti, and A. Testori. 1991. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer.* 49:44-49.
- Round, J.L., and S.K. Mazmanian. 2010. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:12204-12209.
- Rubtsov, Y.P., R.E. Niec, S. Josefowicz, L. Li, J. Darce, D. Mathis, C. Benoist, and A.Y. Rudensky. 2010. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science.* 329:1667-1671.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155:1151-1164.
- Sakaguchi, S., D.A. Vignali, A.Y. Rudensky, R.E. Niec, and H. Waldmann. 2013. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 13:461-467.
- Salama, P., M. Phillips, F. Grieu, M. Morris, N. Zeps, D. Joseph, C. Platell, and B. Iacopetta. 2009. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 27:186-192.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 401:708-712.
- Sallusto, F., D. Lenig, C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 187:875-883.
- Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18538-18543.
- Scott-Browne, J.P., S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J.D. Fontenot, A.Y. Rudensky, M.J. Bevan, and K.B. Urdahl. 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med.* 204:2159-2169.
- Seddon, B., and D. Mason. 1999. Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J Exp Med.* 189:877-882.
- Seder, R.A., T. Marth, M.C. Sieve, W. Strober, J.J. Letterio, A.B. Roberts, and B. Kelsall. 1998. Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J Immunol.* 160:5719-5728.
- Serre, K., C. Benezech, G. Desanti, S. Bobat, K.M. Toellner, R. Bird, S. Chan, P. Kastner, A.F. Cunningham, I.C. MacLennan, and E. Mohr. 2011. Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PLoS One.* 6:e20731.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2001. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 410:1107-1111.
- Sharma, M.D., L. Huang, J.H. Choi, E.J. Lee, J.M. Wilson, H. Lemos, F. Pan, B.R. Blazar, D.M. Pardoll, A.L. Mellor, H. Shi, and D.H. Munn. 2013. An inherently bifunctional subset of Foxp3+ T helper cells is controlled by the transcription factor eos. *Immunity.* 38:998-1012.

- Shevach, E.M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 30:636-645.
- Shevach, E.M., T.S. Davidson, E.N. Huter, R.A. Dipaolo, and J. Andersson. 2008. Role of TGF-Beta in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function. *J Clin Immunol*. 28:640-646.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 3:135-142.
- Spits, H., D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J.P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R.M. Locksley, A.N. McKenzie, R.E. Mebius, F. Powrie, and E. Vivier. 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 13:145-149.
- Sugimoto, N., T. Oida, K. Hirota, K. Nakamura, T. Nomura, T. Uchiyama, and S. Sakaguchi. 2006. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol*. 18:1197-1209.
- Sugiyama, D., H. Nishikawa, Y. Maeda, M. Nishioka, A. Tanemura, I. Katayama, S. Ezo, Y. Kanakura, E. Sato, Y. Fukumori, J. Karbach, E. Jager, and S. Sakaguchi. 2013. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:17945-17950.
- Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, and L.H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 100:655-669.
- Tada, T., T. Takemori, K. Okumura, M. Nonaka, and T. Tokuhisa. 1978. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J Exp Med*. 147:446-458.
- Taguchi, O., K. Kontani, H. Ikeda, T. Kezuka, M. Takeuchi, and T. Takahashi. 1994. Tissue-specific suppressor T cells involved in self-tolerance are activated extrathymically by self-antigens. *Immunology*. 82:365-369.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 192:303-310.
- Tan, M.C., P.S. Goedegebuure, B.A. Belt, B. Flaherty, N. Sankpal, W.E. Gillanders, T.J. Eberlein, C.S. Hsieh, and D.C. Linehan. 2009. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol*. 182:1746-1755.
- Terme, M., S. Pernet, E. Marcheteau, F. Sandoval, N. Benhamouda, O. Colussi, O. Dubreuil, A.F. Carpentier, E. Tartour, and J. Taieb. 2013. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res*. 73:539-549.
- Thornton, A.M., P.E. Korty, D.Q. Tran, E.A. Wohlfert, P.E. Murray, Y. Belkaid, and E.M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 184:3433-3441.
- Tosello, V., K. Odunsi, N.E. Souleimanian, S. Lele, P. Shrikant, L.J. Old, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2008. Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4(+)CD25(+) Tregs. *Clin Immunol*. 126:291-302.
- Tran, D.Q., J. Andersson, D. Hardwick, L. Bebris, G.G. Illei, and E.M. Shevach. 2009. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood*. 113:5125-5133.
- Tran, D.Q., H. Ramsey, and E.M. Shevach. 2007. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*. 110:2983-2990.
- Trifari, S., C.D. Kaplan, E.H. Tran, N.K. Crellin, and H. Spits. 2009. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*. 10:864-871.

- Tsuji, M., N. Komatsu, S. Kawamoto, K. Suzuki, O. Kanagawa, T. Honjo, S. Hori, and S. Fagarasan. 2009. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*. 323:1488-1492.
- Tzankov, A., C. Meier, P. Hirschmann, P. Went, S.A. Pileri, and S. Dirnhofer. 2008. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 93:193-200.
- Valmori, D., A. Merlo, N.E. Souleimanian, C.S. Hesdorffer, and M. Ayyoub. 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest*. 115:1953-1962.
- Valmori, D., C. Raffin, I. Raimbaud, and M. Ayyoub. 2010. Human ROR $\gamma$ + TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:19402-19407.
- Valmori, D., N.E. Souleimanian, V. Tosello, N. Bhardwaj, S. Adams, D. O'Neill, A. Pavlick, J.B. Escalon, C.M. Cruz, A. Angiulli, F. Angiulli, G. Mears, S.M. Vogel, L. Pan, A.A. Jungbluth, E.W. Hoffmann, R. Venhaus, G. Ritter, L.J. Old, and M. Ayyoub. 2007. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:8947-8952.
- Vaughan, S., J.I. Coward, R.C. Bast, Jr., A. Berchuck, J.S. Berek, J.D. Brenton, G. Coukos, C.C. Crum, R. Drapkin, D. Etemadmoghadam, M. Friedlander, H. Gabra, S.B. Kaye, C.J. Lord, E. Lengyel, D.A. Levine, I.A. McNeish, U. Menon, G.B. Mills, K.P. Nephew, A.M. Oza, A.K. Sood, E.A. Stronach, H. Walczak, D.D. Bowtell, and F.R. Balkwill. 2011. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer*. 11:719-725.
- Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24:179-189.
- Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 9:1341-1346.
- Vence, L., A.K. Palucka, J.W. Fay, T. Ito, Y.J. Liu, J. Banchereau, and H. Ueno. 2007. Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:20884-20889.
- Verhagen, J., and D.C. Wraith. 2010. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells". *J Immunol*. 185:7129; author reply 7130.
- Vieira, P.L., J.R. Christensen, S. Minaee, E.J. O'Neill, F.J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D.C. Wraith, and A. O'Garra. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 172:5986-5993.
- Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S.I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot, and V. Soumelis. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*. 9:650-657.
- Voo, K.S., Y.H. Wang, F.R. Santori, C. Boggiano, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D.R. Littman, and Y.J. Liu. 2009. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:4793-4798.
- Walker, J.A., J.L. Barlow, and A.N. McKenzie. 2013. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol*. 13:75-87.
- Walker, M.R., D.J. Kaspirowicz, V.H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J.H. Buckner, and S.F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. 112:1437-1443.
- Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*. 445:766-770.

- Wang, H.Y., D.A. Lee, G. Peng, Z. Guo, Y. Li, Y. Kiniwa, E.M. Shevach, and R.F. Wang. 2004. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity*. 20:107-118.
- Weiss, J.M., A.M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M.A. Curotto de Lafaille, C.N. Parkhurst, H. Xiong, J. Dolpady, A.B. Frey, M.G. Ruocco, Y. Yang, S. Floess, J. Huehn, S. Oh, M.O. Li, R.E. Niec, A.Y. Rudensky, M.L. Dustin, D.R. Littman, and J.J. Lafaille. 2012. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med*. 209:1723-1742, S1721.
- Wildin, R.S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M.E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 27:18-20.
- Wolf, D., A.M. Wolf, H. Rumpold, H. Fiegl, A.G. Zeimet, E. Muller-Holzner, M. Deibl, G. Gastl, E. Gunsilius, and C. Marth. 2005. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 11:8326-8331.
- Wu, C., N. Yosef, T. Thalhamer, C. Zhu, S. Xiao, Y. Kishi, A. Regev, and V.K. Kuchroo. 2013. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*. 496:513-517.
- Xu, J., Y. Yang, G. Qiu, G. Lal, Z. Wu, D.E. Levy, J.C. Ochando, J.S. Bromberg, and Y. Ding. 2009. c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *J Immunol*. 182:6226-6236.
- Yadav, M., C. Louvet, D. Davini, J.M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B.A. Anthony, F.M. Sverdrup, R. Head, D.J. Kuster, P. Ruminski, D. Weiss, D. Von Schack, and J.A. Bluestone. 2012. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med*. 209:1713-1722, S1711-1719.
- Yang, L., D.E. Anderson, C. Baecher-Allan, W.D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo, and D.A. Hafler. 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*. 454:350-352.
- Yigit, R., L.F. Massuger, C.G. Figdor, and R. Torensma. 2010. Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecol Oncol*. 117:366-372.
- Zhang, G.X., B. Gran, S. Yu, J. Li, I. Siglienti, X. Chen, M. Kamoun, and A. Rostami. 2003a. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol*. 170:2153-2160.
- Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003b. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 348:203-213.
- Zhang, Y., F. Luo, Y. Cai, N. Liu, L. Wang, D. Xu, and Y. Chu. 2011. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J Immunol*. 186:1963-1969.
- Zheng, J., Y. Liu, G. Qin, K.T. Lam, J. Guan, Z. Xiang, D.B. Lewis, Y.L. Lau, and W. Tu. 2011. Generation of human Th1-like regulatory CD4+ T cells by an intrinsic IFN-gamma- and T-bet-dependent pathway. *Eur J Immunol*. 41:128-139.
- Zheng, W., and R.A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 89:587-596.
- Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J.M. Kim, T.T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein, and A.Y. Rudensky. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature*. 458:351-356.
- Zhou, G., C.G. Drake, and H.I. Levitsky. 2006. Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood*. 107:628-636.
- Zhou, G., and H.I. Levitsky. 2007. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol*. 178:2155-2162.

- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* 10:1000-1007.
- Zielinski, C.E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2012. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature.* 484:514-518.

# Annexes

## Liste des annexes

**Annexe 1:** *Ex vivo* IL-1RI expression in human CD4<sup>+</sup> T cells identifies an early intermediate in the differentiation of T<sub>H</sub>17 from FOXP3<sup>+</sup> naive Treg.

Raffin C, Raimbaud I, Valmori D, Ayyoub M.

*Journal of Immunology*, 2011, **185**:5196-5202.

**Annexe 2:** Human memory Helios<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) encompass induced Tregs that express Aiolos and respond to IL-1 $\beta$  by downregulating their suppressor functions.

Raffin C, Pignon P, Celse C, Debien E, Valmori D, Ayyoub M.

*The Journal of Immunology*, 2013, **191**:4619-27.

**Annexe 3:** Comment on “Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> cells coexist within the natural FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cell subset in Humans”.

Ayyoub M, Raffin C, Valmori D.

*The Journal of Immunology* (Letter to the Editor), 2013, **190**:4439-40.

**Annexe 4:** CXCR3<sup>+</sup> T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity.

Redjimi N\*, Raffin C\*, Raimbaud I, Matsuzaki J, Odunsi K, Valmori D, Ayyoub M.

\*contribution équivalente aux travaux

*Cancer Research*, 2012, **72**:4351-60.

# Ex Vivo IL-1 Receptor Type I Expression in Human CD4<sup>+</sup> T Cells Identifies an Early Intermediate in the Differentiation of Th17 from FOXP3<sup>+</sup> Naive Regulatory T Cells

Caroline Raffin,\* Isabelle Raimbaud,\* Danila Valmori,\*<sup>†,1</sup> and Maha Ayyoub\*<sup>1</sup>

IL-17–producing CD4<sup>+</sup> Th (Th17) cells are a unique subset of proinflammatory cells expressing the retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t and associated with different forms of inflammatory autoimmune pathologies. The development of Th17 cells, mediated by TGF- $\beta$  and IL-1, is closely related to that of FOXP3<sup>+</sup> suppressor/regulatory T cells (Treg). In this study, we report that ex vivo expression of IL-1RI in human circulating CD4<sup>+</sup> T cells identifies a subpopulation of FOXP3<sup>+</sup> Treg that coexpress retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t, secrete IL-17, and are highly enriched among CCR7<sup>+</sup> central memory cells. Consistent with the concept that IL-1RI expression in Treg identifies a subpopulation at an early stage of differentiation, we show that, in Th17 populations differentiated in vitro from natural naive FOXP3<sup>+</sup> Treg, IL-1RI<sup>+</sup> IL-17–secreting cells are central memory cells, whereas IL-1RI<sup>-</sup> cells secreting IL-17 are effector memory cells. Together with the absence of detectable IL-1RI and IL-17 expression in resting naive CD4<sup>+</sup> T cells, these data identify circulating CCR7<sup>+</sup> Treg expressing IL-1RI ex vivo as early intermediates along an IL-1–controlled differentiation pathway leading from naive FOXP3<sup>+</sup> Treg to Th17 effectors. We further show that, whereas IL-1RI<sup>+</sup> central memory Treg respond to stimulation in the presence of IL-1 by generating IL-17–secreting effectors, a significant fraction of them maintain FOXP3 expression, consistent with an important role of this population in maintaining the Treg/Th17 memory pool in vivo. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 5196–5202.

CD4<sup>+</sup> Th cells secreting the proinflammatory cytokine IL-17 (Th17), associated with different forms of inflammatory autoimmune pathologies (1, 2) and characterized by the specific expression of the transcription factor retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) (3, 4), have been defined as a separate subset, distinct from Th1 and Th2 with respect to both differentiation and function. The differentiation pathway of human Th17 cells has been hard to define, as stimulation of naive CD4<sup>+</sup> T cell precursors in the presence of TGF- $\beta$  and IL-6 efficiently generates murine but not human Th17 cells (5). The differentiation program of Th17 cells was initially reported as mutually exclusive with respect to that of regulatory/suppressive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg, which exert opposite immune functions and differentiate in the presence of TGF- $\beta$  alone (6). Recent data, however, have documented a close relationship between the two subsets. Namely, stimulation of memory regulatory T cells (MTreg) under inflammatory conditions converts them into Th17, IL-1 be-

ing the key molecule in promoting conversion (7, 8). In addition, MTreg contain a hybrid subpopulation of cells coexpressing FOXP3 and ROR $\gamma$ t that exert suppressive functions but concomitantly secrete IL-17 ex vivo (9, 10). Finally, in the presence of IL-1, IL-2, TGF- $\beta$ , and IL-23, human Th17 cells preferentially differentiate from natural naive regulatory T cells (NnTreg), a population of thymically derived human regulatory T cell (Treg) precursors (11), rather than from conventional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells (12). Together, these data suggest that the differentiation pathway of Treg and Th17 cells is partially common.

IL-1, the prototypic proinflammatory cytokine, exerts its effects through engagement of a receptor complex formed by IL-1RI and IL-1 receptor accessory protein, which is recruited to the complex after binding of IL-1 to IL-1RI (13). The essential role of IL-1RI in the differentiation of Th17 cells has been recently underlined by the inability of IL-1RI–deficient mice to generate Th17 responses, which makes them resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis (14). Whereas the expression of IL-1RI in human CD4<sup>+</sup> T cells has not been investigated until recently, a study from Lee et al. has documented selective expression of the receptor by a subpopulation of circulating CD4<sup>+</sup> T cells enriched in IL-17–secreting cells (15). Two other studies, however, have reported selective expression of IL-1RI by Treg, both after culture and ex vivo (16, 17).

To get insight into the role of IL-1RI in the differentiation of Th17 cells with respect to the existence of a partially common differentiation pathway with Treg, in this study we have assessed the expression of IL-1RI in human circulating conventional CD4<sup>+</sup> T cells and Treg subsets ex vivo. We report that IL-1RI expression in human CD4<sup>+</sup> T cells is highly enriched in MTreg. IL-1RI<sup>+</sup> Treg coexpress ROR $\gamma$ t, secrete IL-17 ex vivo, and are highly enriched among CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> central memory (CM) cells, a population at early stages of differentiation. We further show that in Th17 populations differentiated from ex vivo-isolated FOXP3<sup>+</sup> NnTreg, IL-17–secreting cells expressing IL-1RI are CM cells, whereas

\*INSERM, Unité 892, Centre de Lutte Contre le Cancer René Gauducheau, 44800 Saint Herblain, France; and <sup>†</sup>Faculty of Medicine, University of Nantes, 44093 Nantes, France

<sup>1</sup>D.V. and M.A. are senior coauthors.

Received for publication June 14, 2011. Accepted for publication September 14, 2011.

This work was supported by the Ludwig Institute for Cancer Research, the Cancer Research Institute, the Institut National du Cancer, and the Cancéropôle Île-de-France. C.R. was supported through a fellowship from the Ligue Contre le Cancer.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Maha Ayyoub and Prof. Danila Valmori, INSERM U892, Centre de Lutte Contre le Cancer René Gauducheau, 44800 Saint Herblain, France. E-mail addresses: Maha.Ayyoub@univ-nantes.fr and Danila.Valmori@univ-nantes.fr

Abbreviations used in this article: CM, central memory; EM, effector memory; M, conventional memory CD4<sup>+</sup> T cell; MTreg, memory regulatory T cell; N, conventional naive CD4<sup>+</sup> T cell; NnTreg, natural naive regulatory T cell; ROR $\gamma$ t, retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

IL-1RI<sup>-</sup> cells secreting IL-17 are effector memory (EM) cells. These findings identify circulating CM Treg expressing IL-1RI ex vivo as early intermediates along an IL-1-controlled differentiation pathway leading from NnTreg to Th17 effectors. IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg respond to stimulation in the presence of IL-1 by generating IL-17-secreting effectors while largely maintaining FOXP3 expression, consistent with an important role of this population in maintaining the Treg/Th17 memory pool in vivo.

## Materials and Methods

### Samples, cell purification, ex vivo phenotypic assessment, and cell sorting

Peripheral blood samples were obtained from the Etablissement Français du Sang Pays de la Loire (Nantes, France) upon informed consent and approval by the Institutional Review Board. PBMCs were isolated by density gradient sedimentation using LSM 1077 lymphocyte separation medium (PAA Laboratories GmbH). CD4<sup>+</sup> T cells were enriched by positive selection from PBMCs by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec). CD4<sup>+</sup> T cells were assessed phenotypically by staining with fluorochrome-labeled mAb specific for CD45RA (BD Biosciences), CD25 (Beckman Coulter), and CD127 (eBioscience) together with mAb specific for FOXP3 (eBioscience), CCR7 (Miltenyi Biotec), and IL-1RI (R&D Systems), as indicated, and analysis by flow cytometry (FACSaria or LSR II; BD Biosciences). For ex vivo flow cytometry cell sorting, enriched CD4<sup>+</sup> T cells were stained with fluorochrome-labeled mAb specific for CD8, CD4, CD45RA, CD25, CD127, CCR7, and IL-1RI. After gating on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> lymphocytes, cells were separated into the indicated populations to high purity (>97%) by flow cytometry cell sorting (FACSaria; BD Biosciences).

### Assessment of IL-1RI, IL-1RII, and TGF-βRII expression by quantitative PCR

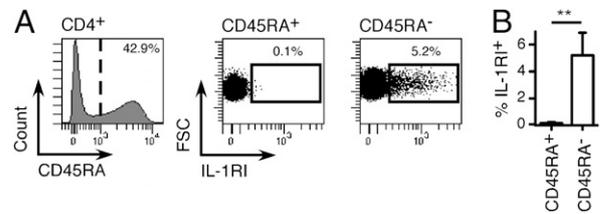
RNA was prepared from the indicated ex vivo-sorted CD4<sup>+</sup> T cell populations using RNeasy Mini Kit and RNase-Free DNase Set for on-column digestion of DNA (Qiagen). cDNA synthesis was performed using Promega Reverse Transcription System A3500 (Promega). Quantitative PCR was performed with a TaqMan assay on an ABI 7000 system (Applied Biosystems) using Assays-on-Demand Gene Expression probes for *IL1RI* (Hs00168392\_m1), *IL1RI2* (Hs01030384\_m1), and *TGFBR2* (Hs00947889\_s1) (Applied Biosystems). For control of input RNA, we used TaqMan probe (FAM-5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTG-3'-TAMRA) and primers (5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3' and 5'-CCAGGCGCCCAATACG-3) for *GAPDH*. Relative mRNA expression was calculated as  $2^{-(Ct_{GAPDH} - Ct_{test\ mRNA})}$ .

### In vitro stimulation of CD4<sup>+</sup> T cell populations and phenotypic assessment and flow cytometry cell sorting of stimulated cultures

Ex vivo-sorted conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells (N) and NnTreg ( $3 \times 10^4$ /well in 96-well U-bottom plates) were stimulated with anti-CD2/CD3/CD28-coated microbeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec) in the absence or presence of IL-1β (10 ng/ml; R&D Systems), IL-23 (100 ng/ml; R&D Systems), and TGF-β (10 ng/ml; PeproTech), as previously described (12). Ex vivo-sorted IL-1RI<sup>+</sup> and IL-1RI<sup>-</sup> MTreg and CM Treg and EM Treg were stimulated in the absence or presence of IL-1β. Cells were maintained in culture in complete IMDM (Invitrogen) containing IL-2 (100 IU/ml; Chiron). In some experiments, cells were labeled with CFSE (Invitrogen) prior to stimulation. On days 6 to 12, aliquots of cultures were either assessed for cytokine production and transcription factors expression, as detailed later, or stained with IL-1RI-, CCR6-, CD45RA-, and CCR7-specific mAb, as indicated, and analyzed by flow cytometry. Day 12 N and NnTreg cultures were also stained with IL-1RI- and CCR6-specific mAb and sorted into CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup> and CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup> populations by flow cytometry. Sorted populations were rested overnight prior to functional analysis.

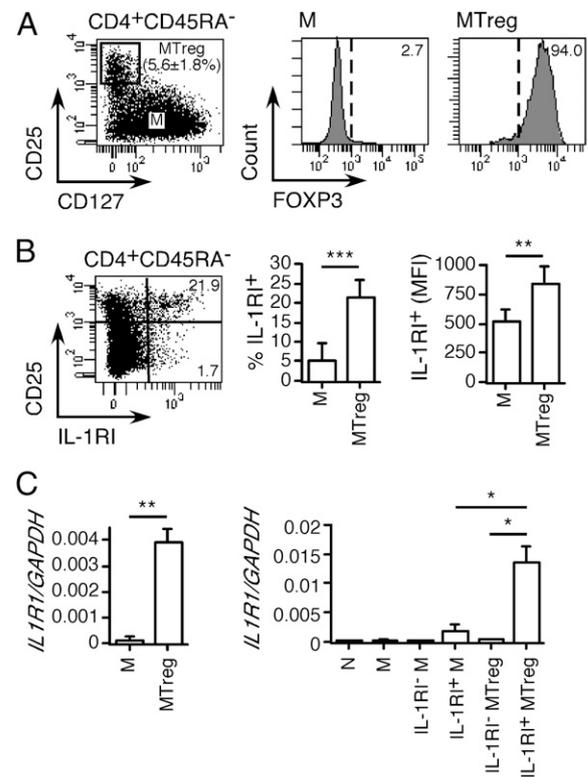
### Assessment of cytokine production and suppressive function

Cytokine production by sorted CD4<sup>+</sup> T cell populations was assessed by intracellular staining after stimulation with PMA (100 ng/ml; Sigma Aldrich) and ionomycin (1 μg/ml; Sigma Aldrich) during 4 and 6 h for in vitro-stimulated cultures and ex vivo-sorted populations, respectively, as previously described (9, 12). Brefeldin A (10 μg/ml; Sigma Aldrich) was added 1 h after the beginning of the incubation. Cells were then

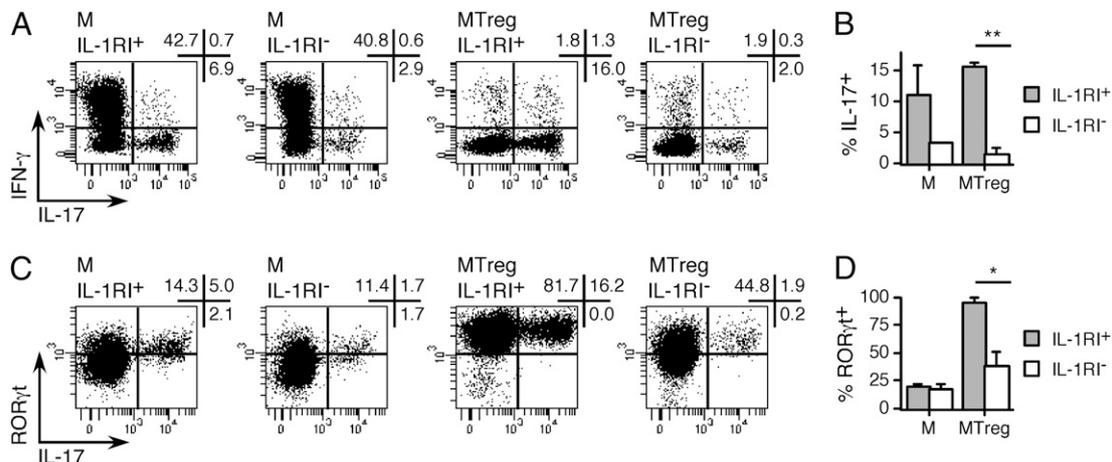


**FIGURE 1.** Ex vivo expression of IL-1RI is detected in memory but not in naive human circulating CD4<sup>+</sup> T cells. *A*, Enriched CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA and anti-IL-1RI mAb, and IL-1RI expression was assessed in gated CD45RA<sup>+</sup> and CD45RA<sup>-</sup> populations. *B*, Summary of the results (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ ). Statistical analyses were performed using two-tailed *t* test. \*\* $p < 0.01$ .

fixed, permeabilized, and stained with Abs specific for FOXP3, RORγ/γt, IL-17 (eBioscience), and IFN-γ (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry. The ability of in vitro-differentiated or ex vivo-sorted CD4<sup>+</sup> T cell populations to suppress the growth of responder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells was assessed by coculture of CFSE-labeled responder conventional CD4<sup>+</sup> T cells ( $3 \times 10^4$ ) with or without test populations ( $3 \times 10^4$ ), in 96-well U-bottom plates, in the presence of  $3 \times 10^4$  irradiated monocytes, enriched by positive selection from PBMCs by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec), and PHA (HA16, 0.5 μg/ml; Oxoid), as previously described (11). Growth of responder cells was assessed by flow cytometry analysis of CFSE dilution in day 4 to 6 cultures. The growth (100 – percentage undivided cells) of the wells with suppressor cells (experimental



**FIGURE 2.** Ex vivo expression of IL-1RI in human circulating CD4<sup>+</sup> T cells is highly enriched in memory CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg. *A*, CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, anti-CD25, anti-CD127, and anti-FOXP3 mAb. FOXP3 expression is shown on gated CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> conventional memory (M) and CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (MTreg) populations. *B*, CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, anti-CD25, anti-CD127, and anti-IL-1RI mAb. Numbers in the dot plot indicate the percentage of IL-1RI<sup>+</sup> cells in the CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> populations. Summary of the results for all donors ( $n = 6$ ) is shown. MFI, mean fluorescence intensity. *C*, CD4<sup>+</sup> T cells were sorted by flow cytometry into the indicated populations and assessed for IL-1RI mRNA (*IL1RI*) expression by quantitative PCR. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**FIGURE 3.** Ex vivo expression of IL-1RI in Treg correlates with IL-17 secretion and expression of ROR $\gamma$ t. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD25, anti-CD45RA, anti-CD127, and anti-IL-1RI mAb and sorted into the indicated populations. Sorted populations were stimulated with PMA/ionomycin during 6 h, and IFN- $\gamma$  and IL-17 production and ROR $\gamma$ t expression were assessed by staining with specific mAb. A–D, IL-17 production is shown in relation to IFN- $\gamma$  production (A, B) and to ROR $\gamma$ t expression (C, D). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01.

group) was compared with that of the wells without suppressors (control). The percentage of suppression was determined as follows:  $100 - [(\text{growth of experimental group}/\text{growth of control}) \times 100]$ .

## Results

### *Ex vivo expression of IL-1RI in human circulating CD4<sup>+</sup> T cells is detected in memory but not in naive populations and is highly enriched in memory CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg*

We initially assessed IL-1RI expression in total circulating CD4<sup>+</sup> T cells ex vivo using specific mAb. We detected significant surface expression of IL-1RI in a fraction of memory (CD45RA<sup>−</sup>) but not in naive (CD45RA<sup>+</sup>) cells (Fig. 1). To characterize further IL-1RI expression in the memory compartment, we stained CD4<sup>+</sup> T cells with IL-1RI-specific mAb together with a combination of mAb against markers that distinguish conventional CD4<sup>+</sup> T cells and Treg. Circulating MTreg are characterized by high ex vivo expression of CD25 and FOXP3 and low expression of CD127 (Fig. 2A). As illustrated in Fig. 2B, IL-1RI<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were highly enriched among MTreg compared with conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells. The mean fluorescence intensity of IL-1RI staining in IL-1RI<sup>+</sup> MTreg was higher than that of conventional IL-1RI<sup>+</sup> memory CD4<sup>+</sup> T cells, suggesting a higher expression level. To confirm the differential IL-1RI expression in the defined populations, we isolated them by cell sorting and assessed IL-1RI expression by quantitative PCR. We found higher levels of IL-1RI mRNA in sorted total MTreg than in conventional memory CD4<sup>+</sup> T cell populations (Fig. 2C). As expected, IL-1RI mRNA expression in MTreg was confined to the IL-1RI<sup>+</sup> fraction, and only low levels of IL-1RI mRNA expression were detected in the IL-1RI<sup>−</sup> fraction from conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells.

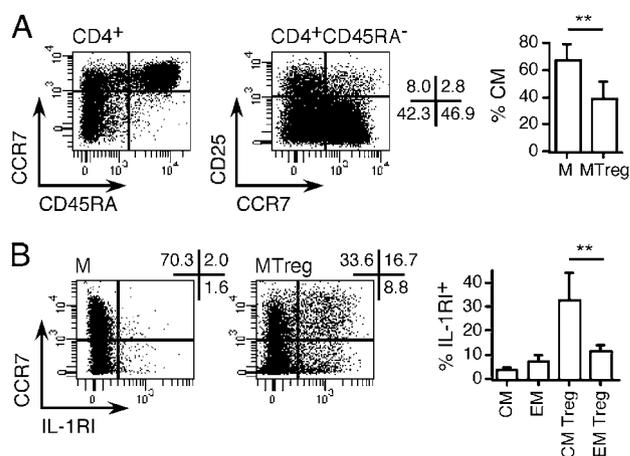
### *Ex vivo expression of IL-1RI in MTreg correlates with IL-17 secretion and expression of ROR $\gamma$ t*

To assess the correlation between IL-1RI expression and ex vivo IL-17 secretion in conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells and MTreg, we isolated the corresponding IL-1RI<sup>+</sup> and IL-1RI<sup>−</sup> populations by cell sorting, stimulated them with PMA/ionomycin, and assessed cytokine production by intracellular staining. We also assessed intranuclear expression of ROR $\gamma$ t with respect to IL-17 secretion. Both among conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells and, to a higher extent, among MTreg, IL-1RI<sup>+</sup> populations were enriched in IL-17-secreting cells (Fig. 3A, 3B). In all populations, IL-17-

secreting cells were mostly ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, but the proportion of ROR $\gamma$ t-expressing cells and the expression levels were higher in MTreg than in conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 3C, 3D). All IL-1RI<sup>+</sup> MTreg, irrespective of their ability to secrete IL-17 ex vivo, expressed high levels of ROR $\gamma$ t. It is noteworthy that no significant IL-17 secretion was detected in isolated conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells or FOXP3<sup>+</sup> NnTreg populations ex vivo (data not shown).

### *IL-1RI<sup>+</sup> IL-17-secreting cells are highly enriched among CM Treg*

To characterize further IL-1RI<sup>+</sup> Treg, we assessed their differentiation stage. Memory CD4<sup>+</sup> T cells have been distinguished into CM and EM populations based on the expression of the chemokine receptor CCR7 (18). We have previously shown that, similar to conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells, human MTreg can be distinguished into CM and EM populations, which are both anergic and suppressive ex vivo (19). MTreg contain lower proportions of CM cells as compared with conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells



**FIGURE 4.** CD4<sup>+</sup> T cells expressing IL-1RI ex vivo are highly enriched among CM Treg. A, CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD25, anti-CD45RA, anti-CD127, and anti-CCR7 mAb. The percentage of CM cells among M and MTreg populations is shown. B, CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD25, anti-CD45RA, anti-CD127, anti-CCR7, and anti-IL-1RI mAb. The percentage of IL-1RI<sup>+</sup> cells among CM and EM conventional and Treg populations is shown. \*\* $p$  < 0.01.

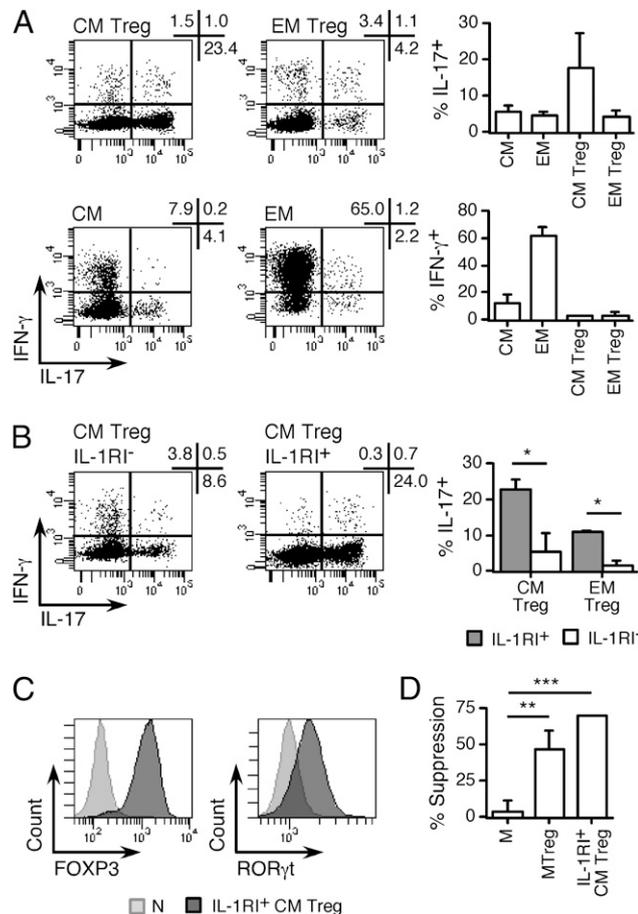
(Fig. 4A). Assessment of IL-1RI expression with respect to that of CCR7 in conventional and Treg populations, however, revealed that IL-1RI<sup>+</sup> MTreg were enriched in CM cells (Fig. 4B). Assessment of isolated populations with respect to IL-17 secretion further showed that CM Treg were enriched in IL-17-secreting cells (Fig. 5A) and that, within CM Treg, IL-17-secreting cells were enriched in the IL-1RI<sup>+</sup> fraction (Fig. 5B). It is noteworthy that IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg were RORγt<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> (Fig. 5C) and were highly suppressive ex vivo (Fig. 5D).

*IL-1RI expression identifies CM FOXP3<sup>+</sup> IL-17-secreting cells in Th17-polarized cultures from NnTreg*

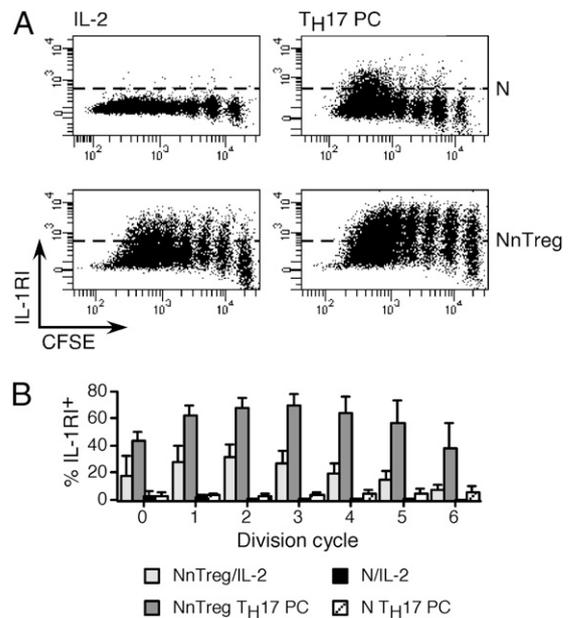
We have recently shown that, after stimulation in the presence of Th17-polarizing cytokines, human Th17 preferentially differentiate from NnTreg rather than from conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells (12). Priming of Th17 from NnTreg is accompanied by the induction of IL-1RI expression, consistent with the important role of IL-1 in the polarization. The finding that IL-1RI<sup>+</sup> MTreg secreting

IL-17 ex vivo are enriched in CM cells suggested that this population may represent an early intermediate in the differentiation pathway leading from NnTreg to Th17 cells. To obtain evidence in support of this hypothesis, we assessed the kinetics of IL-1RI expression induction after Th17 polarization of NnTreg. To this end, we labeled sorted NnTreg and conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells with CFSE, stimulated them in the presence of IL-2 alone or with Th17-polarizing cytokines, and, 6 d later, assessed IL-1RI expression in the corresponding cultures. As shown in Fig. 6, induction of IL-1RI expression was an early event of Th17 cell differentiation from NnTreg, as it was detected in a significant fraction of the cells early after stimulation, before cell division. This was true both in the absence and in the presence of Th17-polarizing factors but was significantly enhanced in the latter case. In addition, IL-1RI expression further increased after cell division, was sustained for several days, and slowly declined afterward. In contrast, no significant induction of IL-1RI expression was detected in conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells upon stimulation with IL-2 alone, and only low induction was detected in the presence of the polarizing factors.

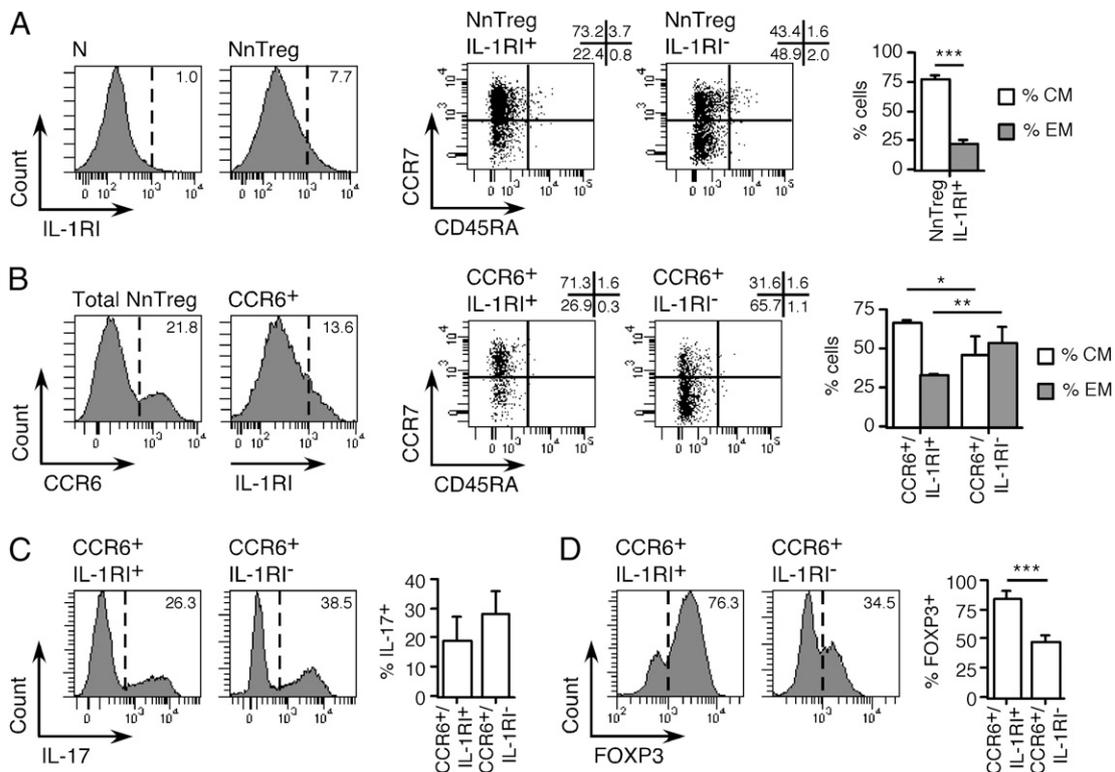
The chemokine receptor CCR6 has been described as a marker of Th17 effectors (20, 21). Accordingly, we have previously shown that in Th17 populations differentiated from NnTreg, IL-17-secreting cells are contained in the CCR6<sup>+</sup> fraction (12). To address further the correlation between IL-1RI expression in the polarized NnTreg cultures and their differentiation stage, we assessed the expression of IL-1RI with respect to that of CD45RA, CCR7, and CCR6 as well as FOXP3 and IL-17. Consistent with the induction of IL-1RI expression early in the differentiation of Th17 from NnTreg, most IL-1RI<sup>+</sup> cells in polarized NnTreg cultures were CM cells (Fig. 7A). In addition, within the CCR6<sup>+</sup>



**FIGURE 5.** IL-1RI<sup>+</sup> IL-17-secreting cells are highly enriched among CM Treg. *A*, CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD25, anti-CD45RA, anti-CD127, and anti-CCR7 mAb and sorted into CM and EM conventional (CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>, CCR7<sup>+</sup> or CCR7<sup>-</sup>) and Treg (CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>, CCR7<sup>+</sup> or CCR7<sup>-</sup>) populations. *B*, CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD25, anti-CD45RA, anti-CD127, anti-CCR7, and anti-IL-1RI mAb and sorted into CM Treg and EM Treg IL-1RI<sup>+</sup> and IL-1RI<sup>-</sup> populations. Sorted populations (*A*, *B*) were stimulated with PMA/ionomycin, and IFN-γ and IL-17 production was assessed by intracellular staining using specific mAb. *C*, A fraction of IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg and control naive (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) populations were stained with anti-FOXP3 or anti-RORγt mAb. *D*, The suppressive activity of sorted IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg and control M and MTreg populations was assessed as described (11, 12). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.



**FIGURE 6.** Early induction of IL-1RI expression in Th17-polarized NnTreg cultures. Ex vivo-sorted conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) and NnTreg (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) were labeled with CFSE and stimulated with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads in the presence of IL-2 alone or in combination with Th17-polarizing cytokines (TH17 PC: IL-1β, TGF-β, and IL-23). Cells were stained with mAb specific for IL-1RI 6 d after stimulation and analyzed by flow cytometry. *A* and *B*, Examples of dot plots for one donor (*A*) and a summary of data (*B*) corresponding to the percentage of IL-1RI<sup>+</sup> cells in each division cycle, as determined by CFSE dilution, for all donors (*n* = 5) are shown.



**FIGURE 7.** IL-1RI expression identifies CM FOXP3<sup>+</sup> IL-17-secreting cells in Th17-polarizing cultures from NnTreg. Ex vivo-sorted N and NnTreg populations were stimulated in vitro under Th17-polarizing conditions. **A**, Day 12 N and NnTreg cultures were costained with anti-CD45RA, anti-CCR7, and anti-IL-1RI mAb and analyzed by flow cytometry. Dot plots for one donor and data for all donors ( $n = 4$ ) are shown. **B**, Day 12 NnTreg cultures were stained with anti-CD45RA, anti-CCR7, anti-CCR6, and anti-IL-1RI mAb and analyzed by flow cytometry. Histograms and dot plots for one donor and data for all donors ( $n = 4$ ) are shown. **C** and **D**, Day 12 NnTreg cultures were stained with anti-CCR6 and anti-IL-1RI mAb and sorted into CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup> and CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup> populations. Sorted populations were stimulated with PMA/ionomycin and stained with anti-FOXP3 and anti-IL-17 mAb. Histograms for one donor and data for all donors ( $n = 4$ ) are shown. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

fraction, expression of IL-1RI identified a population that was prevalently CCR7<sup>+</sup> (Fig. 7B) and secreted IL-17 while maintaining FOXP3 expression (Fig. 7C, 7D), corresponding with the IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg population identified ex vivo. In contrast, CCR6<sup>+</sup>IL-1RI<sup>-</sup> cells, which also secreted IL-17 but had mostly lost FOXP3 expression, were prevalently CCR7<sup>-</sup> cells, representing therefore a later differentiation stage of Th17.

#### *IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg respond to stimulation in the presence of IL-1 by generating Th17 effectors while maintaining the Treg/Th17 memory pool*

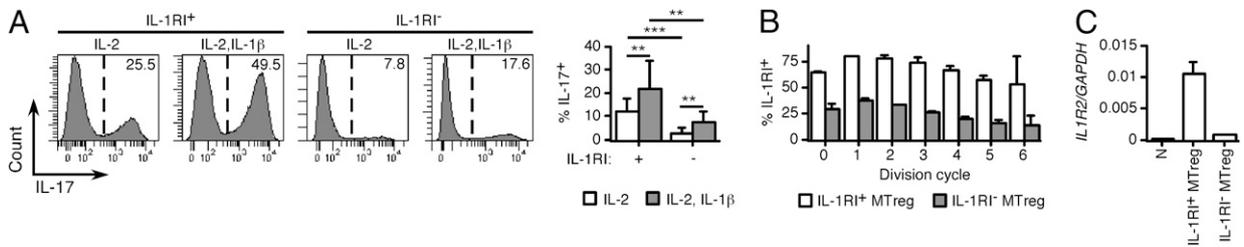
Based on our conclusions that IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg are early intermediates in a differentiation pathway leading from Treg precursors to Th17 cells, it was of interest to address the responsiveness of this population to IL-1. To this end, we initially assessed the correlation between ex vivo expression of IL-1RI in Treg and their responsiveness to IL-1. We isolated IL-1RI<sup>+</sup> and IL-1RI<sup>-</sup> MTreg populations by cell sorting, stimulated them in the presence of IL-2 alone or with IL-1 $\beta$ , and assessed the resulting cultures for IL-17 secretion. As expected, we observed significantly higher levels of IL-17-secreting cells in IL-1RI<sup>+</sup> compared with those in IL-1RI<sup>-</sup> MTreg populations (Fig. 8A). Compared with stimulation with IL-2 alone, stimulation in the presence of IL-1 $\beta$  resulted in an increased proportion of IL-17-secreting cells in IL-1RI<sup>+</sup> MTreg but also in IL-1RI<sup>-</sup> MTreg populations. Thus, responsiveness to IL-1 $\beta$  in MTreg was not restricted to the population expressing IL-1RI ex vivo. The responsiveness of IL-1RI<sup>-</sup> MTreg to IL-1 was explained by the fact that IL-1RI expression was rapidly induced in a large proportion of cells in this population after in vitro stimulation and persisted for several days (Fig. 8B). In contrast, it

is noteworthy that, along with IL-1RI, IL-1RI<sup>+</sup> Treg expressed increased levels of the decoy IL-1RII, which controls their responsiveness to IL-1 (Fig. 8C).

To assess the impact of the differentiation stage on the generation of IL-17-secreting cells from Treg, we then isolated CM and EM Treg populations ex vivo and assessed them after in vitro stimulation in the absence or in the presence of IL-1. As shown in Fig. 9A, stimulation, particularly in the presence of IL-1, resulted in an increased proportion of IL-17-secreting cells in CM Treg and, to a lower extent, in EM Treg. In contrast, compared with EM Treg, FOXP3 expression was more sustained in CM Treg, both in the absence and in the presence of IL-1. Because FOXP3 expression is maintained by TGF- $\beta$  (which is constitutively expressed in the latent form in Treg), we hypothesized that maintenance of FOXP3 in CM versus EM Treg may be due to a differential responsiveness to TGF- $\beta$ . In support of this, we found that expression of TGF- $\beta$ RII progressively decreased with Treg differentiation and was lower in MTreg compared with that in NnTreg but higher at the CM Treg stage than in EM Treg (Fig. 9B). Overall, these data indicate that, whereas IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg respond to IL-1 by generating IL-17-secreting effectors, a significant proportion of them maintain FOXP3 expression, consistent with an important role of this population in maintaining the Treg/Th17 memory pool.

## Discussion

In this study, we have assessed the ex vivo expression of IL-1RI in human circulating conventional CD4<sup>+</sup> T cells. In contrast with a previous report by Lee et al. (15), we failed to detect significant ex vivo expression of IL-1RI (both at the protein and mRNA levels) in circulating naive CD4<sup>+</sup> T cells, which do not contain significant



**FIGURE 8.** Generation of IL-17–secreting cells by stimulation of IL-1RI<sup>+</sup> MTreg in the presence of IL-1. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD25, anti-CD45RA, anti-CD127, anti-CCR7, and anti-IL-1RI mAb, and MTreg (CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) were sorted into IL-1RI<sup>+</sup> and IL-1RI<sup>-</sup> populations. *A*, Sorted populations were stimulated in vitro in the presence of IL-2 alone or with IL-1β, and IL-17 secretion was assessed in day 12 cultures in an intracellular cytokine staining assay after stimulation with PMA/ionomycin. Histograms for one donor and data for all donors (*n* = 8) are shown. *B*, Sorted populations were labeled with CFSE and stimulated with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads in the presence of IL-2. Day 6 cultures were stained with anti-IL-1RI mAb and analyzed by flow cytometry. The percentage of IL-1RI<sup>+</sup> cells in each division cycle, as determined by CFSE dilution, is shown. *C*, Expression of IL-1RII mRNA (*IL1R2*) in the sorted populations, as well as in conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells, was determined by quantitative PCR (*n* = 2). \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

proportions of IL-17–secreting cells (9, 20). In contrast, we detected ex vivo IL-1RI expression in a subset of circulating memory cells, enriched in IL-17–secreting cells. By assessing the differential expression of IL-1RI in memory conventional CD4<sup>+</sup> T cells and MTreg ex vivo, we found highly enriched proportions of IL-1RI–expressing cells in MTreg, consistent with a recent report by Mercer et al. (17). We further showed that IL-1RI<sup>+</sup> MTreg co-express high levels of RORγt and FOXP3 and are enriched in IL-17–secreting cells, overlapping with an IL-17–producing FOXP3<sup>+</sup> MTreg population that we and others have recently described (10, 12). Whereas this population simultaneously displays several functional features of both Th17 and Treg subsets, pro-inflammatory and suppressive, its origin and developmental relationship with Treg and Th17 effectors have remained undefined.

Importantly, whereas initial studies in the mouse have reported TGF-β and IL-6 to be crucial for differentiation of Th17 (6, 22), with IL-1 only playing an enhancing role, the essential role of IL-1 signaling through IL-1RI for the early differentiation of Th17 has recently been demonstrated by the inability of IL-1RI–deficient mice to generate Th17 responses, which makes them resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis (14). We have shown that IL-1 promotes conversion of human MTreg into Th17 (8) as well as, in association with other cytokines, differentiation of Th17 from NnTreg, which is concomitant with induction of IL-1RI expression in the cultures (12). The ex vivo identification of the IL-1RI<sup>+</sup> MTreg population prompted us to hypothesize that this population could represent a common intermediate in a differentiation pathway leading to both Treg and Th17 effectors.

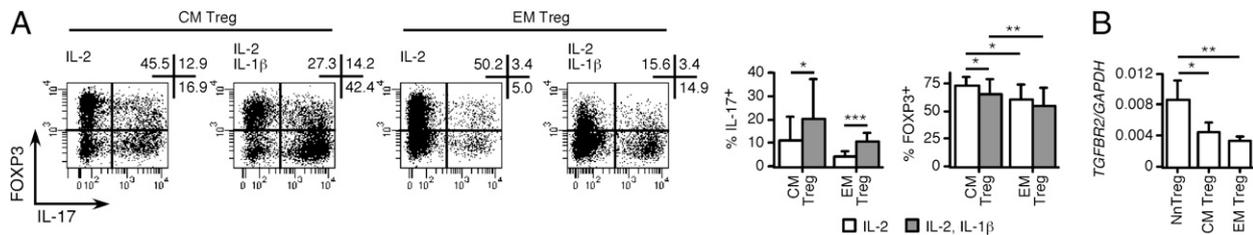
By assessing IL-1RI<sup>+</sup> MTreg with respect to their differentiation stage, we found that they are highly enriched among CCR7<sup>+</sup> CM cells, a population at an early stage of differentiation. Although

CM populations were initially considered nonpolarized, similar to naive T cells, subsequent studies have shown that they also contain pre-Th1 and pre-Th2 cells (23). Because circulating naive CD4<sup>+</sup> T cells do not contain significant proportions of IL-17–secreting cells, we propose that, similar to the previously described pre-Th1 and pre-Th2 (23), IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg represent pre-Th17 cells (i.e., direct precursors of Th17 effectors).

To corroborate our hypothesis, we characterized the differentiation stages of NnTreg stimulated under Th17-polarizing conditions in the presence of IL-1. We found that, in line with the concept that IL-1RI<sup>+</sup> MTreg are at an early stage of differentiation, induction of IL-1RI expression in Th17-polarized NnTreg cultures was an early event. Accordingly, part of IL-1RI<sup>+</sup> cells in the cultures were CM “bi-potential” Treg/Th17 populations that secreted IL-17 while maintaining FOXP3 expression. In contrast, IL-1RI<sup>-</sup> cells were mostly EM FOXP3<sup>-</sup> fully differentiated Th17 effectors.

By assessing the responsiveness of MTreg sorted ex vivo to stimulation in the presence of IL-1, we further showed that, whereas IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg respond by generating IL-17–secreting effectors, a significant proportion of them maintain FOXP3 expression, consistent with an important role of the population in maintaining the Treg/Th17 memory pool.

Together, the phenotypic and functional data obtained in this study support the concept that CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>IL-1RI<sup>+</sup> MTreg/Th17 are early intermediates in a differentiation pathway that, starting prevalently from NnTreg precursors, is initially common to Treg and Th17, and then diverges to generate either Treg effectors under sustained immune suppressive conditions or Th17 effectors under inflammatory conditions, through IL-1/IL-1RI–mediated signals.



**FIGURE 9.** CM Treg stimulated in the presence of IL-1 generate IL-17–secreting effectors while maintaining a population of FOXP3<sup>+</sup> cells. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD25, anti-CD45RA, anti-CD127, and anti-CCR7 mAb, and MTreg (CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) were sorted into CM (CCR7<sup>+</sup>) and EM (CCR7<sup>-</sup>) populations. *A*, Sorted populations were stimulated in vitro in the presence of IL-2 alone or with IL-1β, and IL-17 secretion and FOXP3 expression were assessed in day 12 cultures by staining with specific mAb after stimulation with PMA/ionomycin. Dot plots for one donor and data for all donors (*n* = 7) are shown. *B*, Expression of TGF-βRII mRNA (*TGFβR2*) in the sorted populations, as well as in sorted NnTreg, was determined by quantitative PCR (*n* = 4). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

Besides being a common differentiation intermediate of Treg and Th17 cells, the identified IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg population could also play an important role during immune responses in vivo. Notably indeed, a recent study by Kryczek et al. (24) has documented the presence of significant proportions of a population of FOXP3<sup>+</sup> IL-17-producing cells in the colonic mucosa from individuals with ulcerative colitis and colitis-associated colon carcinoma. Although the precise stage of differentiation of the populations and expression of IL-1RI were not assessed in that study, these findings underline the physio-pathological relevance of Treg/Th17 “bi-potential” populations and warrant their further assessment. Our findings also have important implications with regard to the proposed use of NnTreg for immunotherapy of autoimmune diseases or after transplantation (25, 26). Indeed, although, as reported by us and others, in vitro-expanded NnTreg maintain high levels of FOXP3 expression and suppressive functions, stimulation of NnTreg in the presence of IL-2 alone or, to a higher extent, Th17 polarizing factors results in the rapid induction of high levels of IL-1RI expression and the generation of Treg/Th17 “bi-potential” effectors. Thus, the success of immunotherapy approaches based on the use of in vitro-expanded NnTreg will involve the need to control strictly the exquisite responsiveness of these populations to inflammatory stimuli in vivo.

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Amadi-Obi, A., C. R. Yu, X. Liu, R. M. Mahdi, G. L. Clarke, R. B. Nussenblatt, I. Gery, Y. S. Lee, and C. E. Egwuagu. 2007. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat. Med.* 13: 711–718.
- Kolls, J. K., and A. Lindén. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467–476.
- Ivanov, I. I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelletier, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126: 1121–1133.
- Betelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453: 1051–1057.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 485–517.
- Betelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238.
- Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots, and I. Joosten. 2008. Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112: 2340–2352.
- Deknuydt, F., G. Bioley, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2009. IL-1 $\beta$  and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin. Immunol.* 131: 298–307.
- Ayyoub, M., F. Deknuydt, I. Raimbaud, C. Dousset, L. Leveque, G. Bioley, and D. Valmori. 2009. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor ROR $\gamma$ t. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8635–8640.
- Voo, K. S., Y. H. Wang, F. R. Santori, C. Boggiano, Y. H. Wang, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, et al. 2009. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 4793–4798.
- Valmori, D., A. Merlo, N. E. Souleimanian, C. S. Hesdorffer, and M. Ayyoub. 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J. Clin. Invest.* 115: 1953–1962.
- Valmori, D., C. Raffin, I. Raimbaud, and M. Ayyoub. 2010. Human ROR $\gamma$ t+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 19402–19407.
- O’Neill, L. A. 2008. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* 226: 10–18.
- Chung, Y., S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30: 576–587.
- Lee, W. W., S. W. Kang, J. Choi, S. H. Lee, K. Shah, E. E. Eynon, R. A. Flavell, and I. Kang. 2010. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor. *Blood* 115: 530–540.
- Tran, D. Q., J. Andersson, D. Hardwick, L. Bebris, G. G. Illei, and E. M. Shevach. 2009. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113: 5125–5133.
- Mercer, F., L. Kozhaya, and D. Unutmaz. 2010. Expression and function of TNF and IL-1 receptors on human regulatory T cells. *PLoS ONE* 5: e8639.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708–712.
- Tosello, V., K. Odunsi, N. E. Souleimanian, S. Lele, P. Shrikant, L. J. Old, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2008. Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4+CD25+ Tregs. *Clin. Immunol.* 126: 291–302.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8: 639–646.
- Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, et al. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204: 1849–1861.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O’Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441: 231–234.
- Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and J. Geginat. 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J. Exp. Med.* 200: 725–735.
- Kryczek, I., K. Wu, E. Zhao, S. Wei, L. Vatan, W. Szeliga, E. Huang, J. Greenson, A. Chang, J. Roliński, et al. 2011. IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J. Immunol.* 186: 4388–4395.
- Hoffmann, P., R. Eder, T. J. Boeld, K. Doser, B. Piseshka, R. Andreesen, and M. Edinger. 2006. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25<sup>high</sup> T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 108: 4260–4267.
- Safinia, N., P. Sagoo, R. Lechler, and G. Lombardi. 2010. Adoptive regulatory T cell therapy: challenges in clinical transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15: 427–434.

# Human Memory Helios<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells (Tregs) Encompass Induced Tregs That Express Aiolos and Respond to IL-1 $\beta$ by Downregulating Their Suppressor Functions

Caroline Raffin,\* Pascale Pignon,\* Clotilde Celse,\* Emilie Debien,\* Danila Valmori,\*<sup>†,1</sup> and Maha Ayyoub\*<sup>1</sup>

FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) are critical regulators of self-tolerance and immune homeostasis. In mice and humans, two subsets of FOXP3<sup>+</sup> Tregs have been defined based on their differential expression of Helios, a transcription factor of the Ikaros family. Whereas the origin, specificity, and differential function of the two subsets are as yet a source of controversy, their characterization thus far has been limited by the absence of surface markers to distinguish them. In this article, we show that human memory Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Tregs are phenotypically distinct and can be separated ex vivo based on their differential expression of IL-1RI, which is restricted to Helios<sup>-</sup> Tregs, in combination with CCR7. The two populations isolated using this strategy are distinct with respect to the expression of other Ikaros family members. Namely, whereas Eos, which has been reported to mediate FOXP3-dependent gene silencing, is expressed in Helios<sup>+</sup> Tregs, Aiolos, which is involved in the differentiation of T<sub>H</sub>17 and induced Tregs, is instead expressed in Helios<sup>-</sup> Tregs. In addition, whereas both subsets are suppressive ex vivo, Helios<sup>-</sup> Tregs display increased suppressive capacity in comparison to Helios<sup>+</sup> Tregs, but respond to IL-1 $\beta$  by downregulating their suppressive activity. Together, these data support the concept that human Helios<sup>-</sup> memory Tregs encompass induced Tregs that can readily respond to changes in the environment by modulating their suppressive capacity. *The Journal of Immunology*, 2013, 191: 000–000.

To optimally exert their function in maintaining self-tolerance and limiting excessive immune responses, FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) include at least two subsets (1–3). The first, called natural Tregs (nTregs) arises in the thymus during the normal generation of CD4<sup>+</sup> T cells and is believed to be enriched in self-specific cells, although different studies have suggested that this subset also plays important roles in modulating immune responses to pathogens and inflammatory immune responses (3). The second subset, called induced Tregs (iTregs), is generated in the periphery from conventional CD4<sup>+</sup> T cells, is particularly prevalent at certain sites, such as the gut (4), and may recognize Ags derived from the “extended self,” including not only autoantigens, but also Ags from commensal microorganisms or persistent pathogens.

The nTreg and iTreg subsets have been considered phenotypically indistinguishable until recently; the expression of the transcription factor Helios, of the Ikaros family, has been proposed to specifically identify nTreg in mice and humans (5). This conclu-

sion was based on evidence showing that thymic FOXP3<sup>+</sup> Tregs emerging in young mice were all Helios<sup>+</sup>, and that FOXP3<sup>+</sup> iTregs generated in vitro and in vivo were Helios<sup>-</sup>. The concept, however, has been challenged by studies showing that at least some level of Helios expression can be acquired by iTregs generated in vitro and in vivo, depending on stimulation conditions (6, 7).

In humans, ~30% of circulating memory FOXP3<sup>+</sup> Tregs are Helios<sup>-</sup>. Based on the finding that this population is enriched in cells able to produce some cytokines, particularly IL-17, some studies have suggested that they might be iTregs (5, 8). Our group initially identified human circulating Tregs secreting IL-17 ex vivo as a subpopulation of highly suppressive memory FOXP3<sup>+</sup> Tregs (9). More recently, we have shown that this subpopulation is enriched in cells at an early stage of memory T cell differentiation that may represent FOXP3<sup>+</sup> Treg intermediates along a differentiation pathway partially common to T<sub>H</sub>17 (10, 11). Others, however, have argued that IL-17-secreting human FOXP3<sup>+</sup> Tregs are activated conventional CD4<sup>+</sup> T cells that acquire FOXP3 expression transiently and do not exert suppressive functions (12).

Whereas the origin, specificity, and differential function of human Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Tregs remain open questions, a major limitation for their assessment has been thus far the absence of known surface markers that can be used to separate the two subsets. In this study, we have conducted an extended characterization of Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> human memory Tregs ex vivo. The results of these analyses confirmed that the two subsets share many common characteristics but revealed that they also exhibit differential features. We found that, in addition to containing high proportions of IL-17-secreting cells, Helios<sup>-</sup> Tregs are also highly enriched in IL-10-secreting cells, whereas Helios<sup>+</sup> Tregs fail to secrete any cytokine. We also found that the Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Treg subsets are phenotypically distinct and can be isolated ex vivo based on their differential expression of IL-1RI, which is restricted to Helios<sup>-</sup> memory Tregs, in combination with CCR7. The two subsets isolated using this strategy are dis-

\*INSERM, Unité 1102, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44800 Nantes-Saint Herblain, France; and <sup>†</sup>Faculty of Medicine, University of Nantes, 44035 Nantes, France

<sup>1</sup>D.V. and M.A. share senior authorship.

Received for publication May 23, 2013. Accepted for publication August 20, 2013.

This study was supported by the Ludwig Institute for Cancer Research, the Cancer Research Institute, the Fondation de France, and by a fellowship from the Ligue Contre le Cancer (to C.R.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Maha Ayyoub and Prof. Danila Valmori, INSERM U1102, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Boulevard Jacques Monod, 44800 Nantes-Saint Herblain, France. E-mail addresses: maha.ayyoub@univ-nantes.fr (M.A.) and danila.valmori@univ-nantes.fr (D.V.)

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CM, central memory; EM, effector memory; iTreg, induced regulatory T cell; nTreg, natural regulatory T cell; qPCR, quantitative PCR; Treg, regulatory T cell; TSDR, Treg-specific demethylated region.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

tinct with respect to the expression of other Ikaros family members, with Eos, which has been reported to mediate FOXP3-dependent gene silencing (13), being expressed in Helios<sup>+</sup> Tregs and Aiolos, which has been reported to be involved in the differentiation of FOXP3<sup>+</sup> iTregs and T<sub>H</sub>17 cells (14, 15), in Helios<sup>-</sup> Tregs. In addition, although both subsets contain high proportions of cells with demethylated FOXP3 gene Treg-specific demethylated region (TSDR) and are suppressive *ex vivo*, Helios<sup>-</sup> Tregs exhibit increased suppressive capacity with respect to Helios<sup>+</sup> Tregs. Finally, we found that Helios<sup>-</sup> Tregs readily respond to IL-1 $\beta$  by downregulating their suppressive capacity.

Together, the coherent picture emerging from these analyses supports the concept that the human circulating Helios<sup>-</sup> memory Treg subset encompasses iTregs similar to those found in the intestinal mucosae, which can readily respond to changes in the environment by modulating their suppressive capacity in response to inflammatory cytokines or pathogen-derived TLR ligands.

## Materials and Methods

### Samples, cell purification, and sorting

Peripheral blood samples were obtained from the Etablissement Français du Sang Pays de la Loire (Nantes, France) upon informed consent and approval by the Institutional Review Board. PBMCs were isolated by density gradient sedimentation using LSM 1077 lymphocyte separation medium (PAA Laboratories). CD4<sup>+</sup> T cells were enriched by positive selection from PBMCs by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec). For *ex vivo* flow cytometry cell sorting, enriched CD4<sup>+</sup> T cells were stained with fluorochrome-labeled Abs (from BD Biosciences unless indicated otherwise) specific for CD8, CD45RA, CCR7, CD25 (Beckman Coulter), CD127, and IL-1RI (R&D Systems). After gating on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> lymphocytes, cells were separated into the indicated populations to high purity (>97%) by flow cytometry cell sorting (FACSaria II; BD Biosciences).

### Phenotypic analysis and assessment of cytokine production

For *ex vivo* phenotypic analysis, CD4<sup>+</sup> T cells were stained with fluorochrome-labeled Abs specific for CD8, CD45RA, CD25, CD127, FOXP3 (eBioscience), and Helios (Biolegend) in combination or not with one of the following Abs: anti-CD28, -CD31, -CD39, -CD95, -CCR4, -CCR6, -CCR7, -CXCR3, -CXCR5, -IL-1RI (R&D Systems), -ICOS (eBioscience), -CRTH2 (Miltenyi Biotec), -HLA-DR, -CTLA-4 (Immunotech), -Bcl-2, and -Ki-67. All intracellular/intranuclear stainings were performed using the Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed by flow cytometry (FACSaria II; BD Biosciences). For the assessment of cytokine and transcription factor expression, total CD4<sup>+</sup> T cells or sorted subpopulations were stimulated with PMA (100 ng/ml; Sigma Aldrich) and ionomycin (1  $\mu$ g/ml; Sigma Aldrich) during 6 h, and brefeldin A (10  $\mu$ g/ml; Sigma Aldrich) was added 1 h after the beginning of the incubation. Cells were then stained with anti-CD45RA Abs, where specified, fixed, permeabilized, and stained with Abs specific for FOXP3, Helios, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10, and IL-17 (eBioscience), as indicated, and analyzed by flow cytometry. In some experiments, sorted CD4<sup>+</sup> T cell subsets were stimulated with plate-bound anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml; eBioscience) and -CD28 (1  $\mu$ g/ml; eBioscience) Abs, and maintained in culture for 6–10 d in the presence of IL-2 before assessment of the expression of IL-1RI, cytokines, and transcription factors.

### Assessment of transcription factors mRNA expression and FOXP3 gene TSDR methylation by quantitative PCR

Total RNA was extracted from *ex vivo*-sorted CD4<sup>+</sup> T cell populations using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and retrotranscribed using Promega Reverse Transcription System A3500 (Promega). Quantitative PCR (qPCR) was performed with a TaqMan assay on an ABI 7000 system (Applied Biosystems) using Assays-on-Demand Gene Expression probes (Applied Biosystems) for *IKZF3* (Aiolos; Hs00232635\_m1), *IKZF4* (Eos; Hs00223842\_m1), *RORC* (*ROR $\gamma$ t*; Hs01076112\_m1), and *C-MAF* (Hs04185012\_s1), as well as *GAPDH* (Hs02758991\_g1) for control of input RNA. Relative mRNA expression was calculated as  $2^{-(Ct_{GAPDH} - Ct_{test\ mRNA})}$ . For epigenetic analyses, genomic DNA was extracted from *ex vivo*-sorted CD4<sup>+</sup> T cell populations,

and TSDR methylation was assessed by qPCR by Epiontis (Berlin, Germany), as previously described (16).

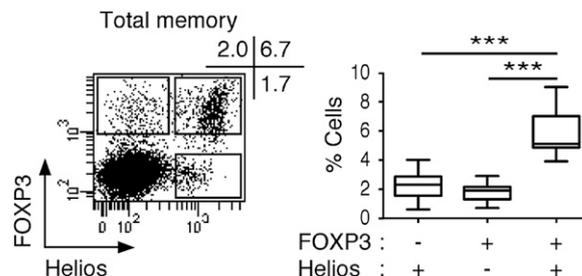
### Assessment of Treg proliferative capacity and suppressive function

*Ex vivo*-sorted CD4<sup>+</sup> T cell populations were labeled with CFSE (5  $\mu$ M; eBioscience), stimulated with PHA (HA16, 0.5  $\mu$ g/ml; Oxoid) in the presence of irradiated monocytes, enriched by positive selection of CD14<sup>+</sup> cells from PBMCs by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec), and maintained in culture in the absence or the presence of recombinant human IL-2 (100 U/ml; Chiron), to assess proliferative capacity. Cell growth at day 6 was determined by flow cytometry assessment of CFSE dilution. The mean division cycles number was calculated as the sum of  $nf_n$  for  $n = 0$  to  $n_{max}$ , where  $n$  is the division cycle number and  $f_n$  is the fraction of cells that have undergone  $n$  divisions. The ability of *ex vivo*-sorted CD4<sup>+</sup> T cell populations to suppress the growth of responder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells was assessed, as previously described (17), by coculture of CFSE-labeled responder conventional CD4<sup>+</sup> T cells ( $3 \times 10^4$ ) with or without test populations (suppressor cells) at the indicated suppressor/responder cell ratios, in 96-well U-bottom plates, in the presence of  $3 \times 10^4$  monocytes and PHA (0.5  $\mu$ g/ml). Growth of responder cells was assessed by flow cytometry analysis of CFSE dilution in day 4 cultures. The growth (% divided cells) of the wells with each test population (experimental group) was compared with that of the wells without test populations (control). The percentage of suppression was determined as follows:  $100 - ([\text{growth of experimental group/growth of control}] \times 100)$ . To assess the effect of IL-1 $\beta$  on the suppressive function of the test populations, where indicated, we added IL-1 $\beta$  (10 ng/ml; R&D Systems) in the experimental groups, as well as in the controls, and the percentage of suppression was assessed as described earlier.

## Results

### Reciprocal expression of Helios, IL-17, and IL-10 in human memory FOXP3<sup>+</sup> Treg subsets

Assessment of expression of FOXP3 and Helios in human circulating memory CD4<sup>+</sup> T cells by intracellular staining using specific Abs defines two subpopulations of FOXP3<sup>+</sup> Tregs coexpressing or not coexpressing Helios, the latter representing  $\sim 30\%$  of the total population (Fig. 1). In addition, and as reported previously (5), the staining identifies a subpopulation of conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells expressing Helios. Previous studies have reported that Helios<sup>-</sup>, but not Helios<sup>+</sup>, Tregs secrete cytokines *ex vivo*, in particular, IL-17, together with low amounts of IFN- $\gamma$  and IL-2 (5, 8). To further compare Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> memory Tregs with respect to their capacity to secrete cytokines *ex vivo*, we costained CD4<sup>+</sup> T cells stimulated with PMA/ionomycin with Helios-, FOXP3-, and cytokine-specific Abs. We found that, as compared with conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells, Helios<sup>-</sup> memory Tregs contained low proportions of IL-2<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells, and did not secrete IL-4, but



**FIGURE 1.** Expression of FOXP3 and Helios defines distinct subsets of memory CD4<sup>+</sup> T cells. *Ex vivo*-isolated CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -FOXP3, and -Helios Abs and analyzed by flow cytometry. A dot plot, gated on total memory (CD45RA<sup>-</sup>) cells, is shown for one donor, and the proportions of memory CD4<sup>+</sup> T cell subsets defined on the basis of FOXP3 and Helios expression are summarized for all donors ( $n = 13$ ). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney U test. \*\*\* $p < 0.001$ .

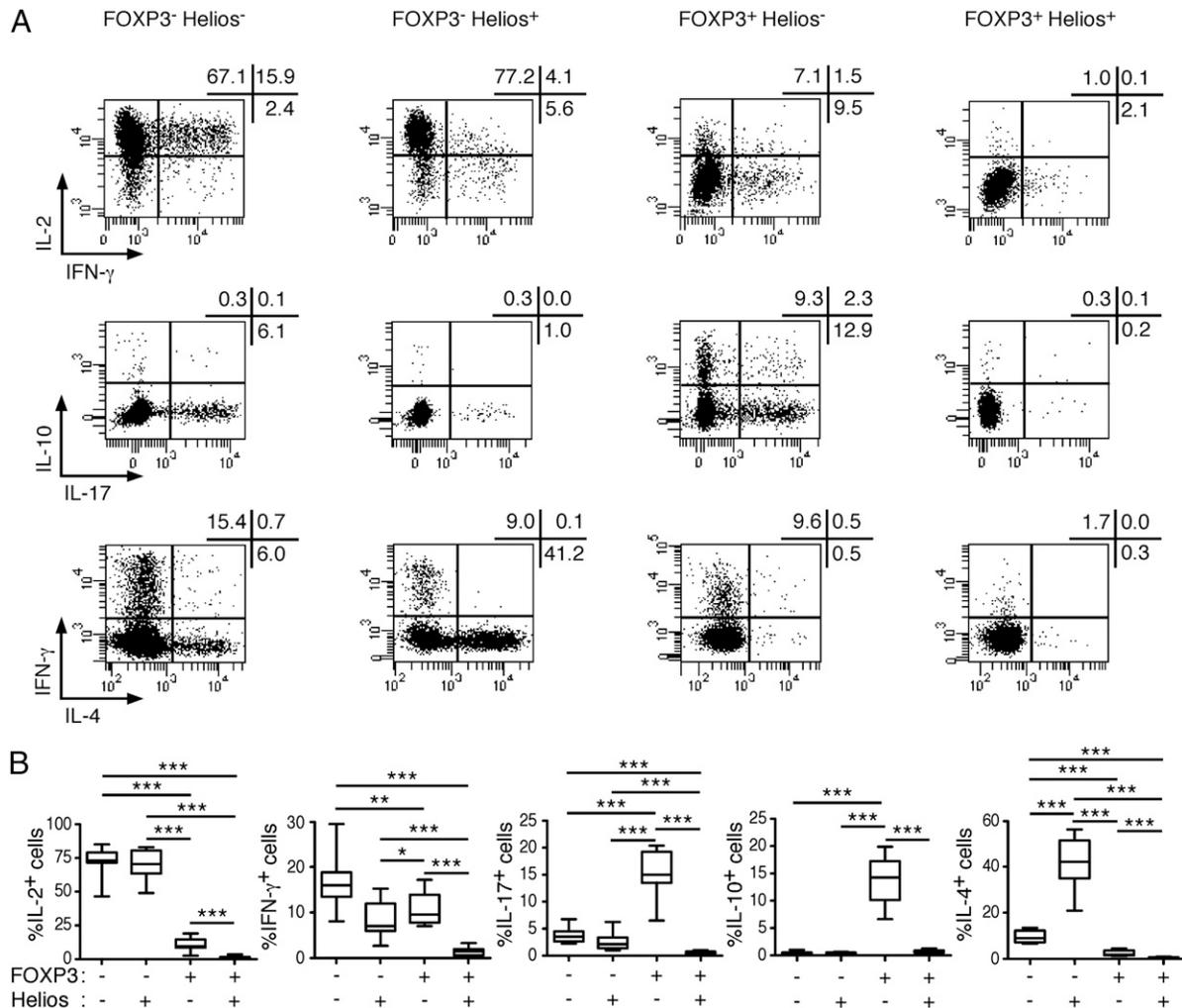
contained increased proportions of IL-17- and IL-10-secreting cells (Fig. 2A, 2B). The FOXP3<sup>-</sup> Helios<sup>+</sup> population contained increased proportions of IL-4<sup>+</sup> cells, in line with recent reports that have described this population as T<sub>H</sub>2 (18). However, memory Helios<sup>+</sup> Tregs failed to secrete any of the cytokines.

*Phenotypic characterization of memory Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs*

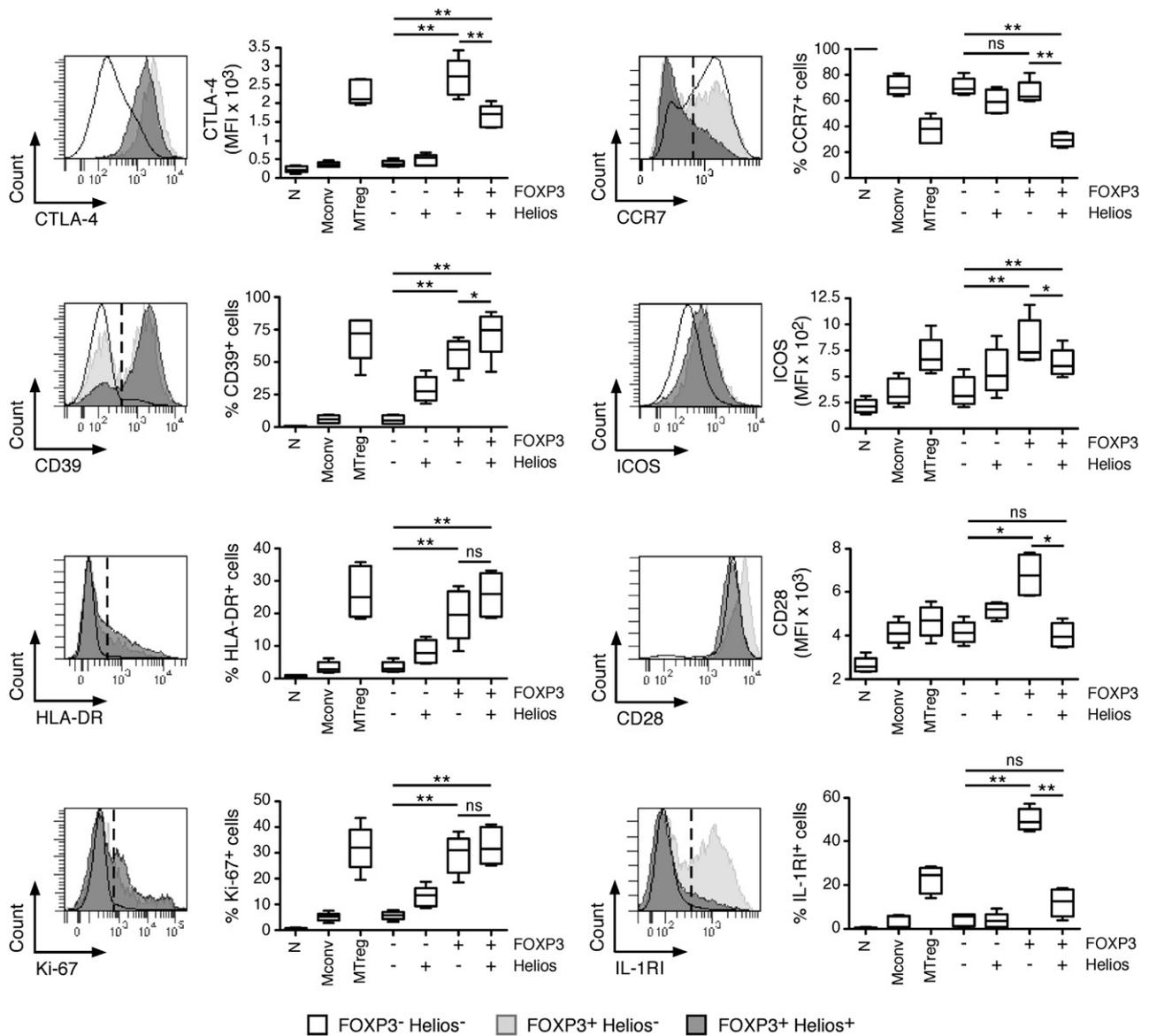
To get further insight into the memory Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg subsets and identify potential surface markers that could discriminate them, we performed an extensive phenotypic characterization using Helios- and FOXP3-specific Abs in combination with markers that have been associated with Treg phenotype and/or function. We found that the two subsets shared many phenotypic characteristics, but also exhibited distinct features. For instance, the two subsets expressed high levels of CTLA-4 and contained high proportions of cells expressing CD39, both associated with suppressive functions (19). However, whereas the expression of CTLA-4 was higher in Helios<sup>-</sup> Tregs, the proportion of CD39<sup>+</sup> cells was higher in Helios<sup>+</sup> Tregs (Fig. 3). Both subsets contained significant proportions of cells expressing HLA-DR and Ki-67, indicating that they were activated and cycling in vivo (Fig.

3). Similarly, both subsets expressed high levels of CD95 and low levels of BCL-2, indicating an apoptosis-prone phenotype (Supplemental Fig. 1). Consistent with previous data, Tregs were enriched in populations expressing the chemokine receptors CCR4 and CCR6 (20). Their proportions, however, were higher in Helios<sup>-</sup> than in Helios<sup>+</sup> Tregs. In contrast, both subsets contained low proportions of CXCR3<sup>+</sup> cells, as well as CRTH2<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup>, and CXCR5<sup>+</sup> cells (Supplemental Fig. 1).

We have previously reported that, similar to conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells, human memory Tregs contain subpopulations expressing CCR7, called central memory (CM), that are at an early stage of memory cell differentiation, as well as more differentiated CCR7<sup>-</sup> cells, called effector memory (EM) (20, 21). We found that the Helios<sup>-</sup> Treg subset contained high proportions of CM cells, whereas the Helios<sup>+</sup> Treg subset was highly enriched in EM cells (Fig. 3). Consistent with their earlier differentiation stage, Helios<sup>-</sup> Tregs expressed higher levels of the costimulatory molecules ICOS and CD28 (Fig. 3). We also found that ex vivo expression of IL-1RI, which we have recently reported identifies a Treg intermediate in the differentiation of T<sub>H</sub>17 cells (11), was highly enriched in Helios<sup>-</sup> Tregs and low in Helios<sup>+</sup> Tregs (Fig. 3). It is noteworthy that ex vivo expression of IL-1RI is highly



**FIGURE 2.** Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs fail to produce cytokines ex vivo, whereas Helios<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs contain high proportions of cells producing IL-10 and IL-17. CD4<sup>+</sup> T cells were assessed ex vivo in a 6-h intracellular cytokine staining assay after stimulation with PMA and ionomycin using anti-CD45RA, -FOXP3, -Helios, -IFN-γ, and -IL-17 together with -IL-2, -IL-10, or -IL-4 Abs and analyzed by flow cytometry. (A) Dot plots show cytokine expression gated on the indicated memory CD4<sup>+</sup> T cell subsets defined according to FOXP3 and Helios expression as in Fig. 1. (B) The proportions of cytokine<sup>+</sup> cells within the indicated memory CD4<sup>+</sup> T cell subsets are summarized (IL-2, n = 12; IFN-γ, n = 14; IL-17, n = 14; IL-10, n = 12; IL-4, n = 10). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney U test. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.



**FIGURE 3.** Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs exhibit distinct phenotypic profiles. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, -FOXP3, and -Helios Abs in combination with Abs specific for each of the indicated markers. For each marker, examples of histograms are shown gated on memory (CD45RA<sup>-</sup>) FOXP3<sup>-</sup> Helios<sup>-</sup>, FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup>, and FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> populations, and data (MFI or percentage of expressing cells) are summarized for naive (N, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), conventional memory (Mconv, CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>), memory Treg (MTreg, CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>), as well as for the indicated memory subsets defined, as in Fig. 1, according to FOXP3 and Helios expression. Each marker was assessed using CD4<sup>+</sup> T cells from four to six donors. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney *U* test. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01. ns, Nonsignificant.

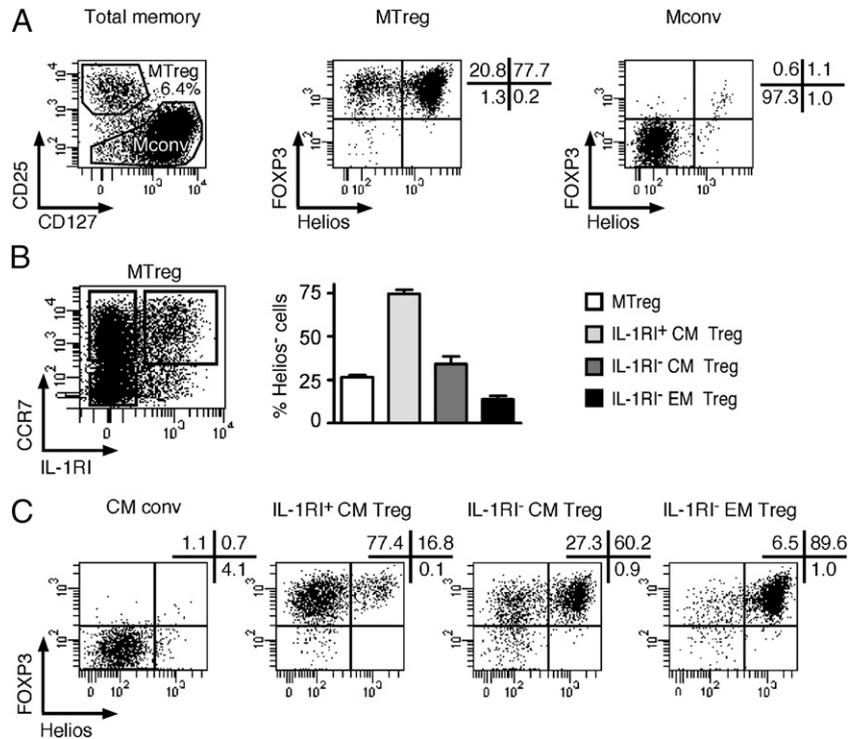
enriched in memory Tregs as compared with conventional CD4<sup>+</sup> T cells and is not detectable in naive CD4<sup>+</sup> T cells including CD45RA<sup>+</sup> naive Tregs (10, 11) (Fig. 3). In summary, among all assessed surface markers, IL-1RI and CCR7 were those that best differentiated Helios<sup>-</sup> from Helios<sup>+</sup> memory Tregs.

#### *Ex vivo isolation of Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Treg subsets based on their differential expression of IL-1RI and CCR7*

The earlier results indicated that IL-1RI and CCR7 could be suitable surface markers to separate ex vivo memory Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> subpopulations. Definition of human Tregs using surface markers is based on their CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> phenotype (22) that identifies the majority of FOXP3<sup>+</sup> cells, both Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> (Fig. 4A). We found that the combined use of CCR7- and IL-1RI-specific Abs allowed to optimally distinguish Helios<sup>-</sup> Tregs, which were highly enriched in the IL-1RI<sup>+</sup> CM (CCR7<sup>+</sup>) fraction, from Helios<sup>+</sup> Tregs, which were instead enriched in the

IL1RI<sup>-</sup> EM (CCR7<sup>-</sup>) fraction (Fig. 4B). We therefore isolated the IL-1RI<sup>+</sup> CM and IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg fractions by flow cytometry cell sorting and, to verify the efficiency of the approach, stained the sorted populations with FOXP3- and Helios-specific Abs. As expected, the isolated IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg population was highly enriched in FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> cells, whereas the IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg fraction was highly enriched in FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> cells (Fig. 4C). It is noteworthy that the IL-1RI<sup>-</sup> CM Treg population isolated and assessed similarly was found to be heterogeneous, containing roughly equivalent proportions of Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> cells. Consistent with their phenotype, the isolated IL-1RI<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> fraction secreted IL-17 and IL-10, whereas the IL-1RI<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> fraction did not secrete cytokines (Supplemental Fig. 2). Thus, through the combination of five surface markers (CD45RA, CD25, CD127, CCR7, and IL-1RI), memory Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Treg populations were isolated to a sufficient degree of purity to allow their further characterization.

**FIGURE 4.** Expression of IL-1RI and CCR7 in Tregs allows the ex vivo isolation of Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> subsets. **(A)** CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, -IL-1RI, -FOXP3, and -Helios Abs, and analyzed by flow cytometry. CD25 and CD127 expression in memory (CD45RA<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells defines MTregs (CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) and conventional memory (Mconv; CD25<sup>-</sup>) subsets (*left panel*). FOXP3 and Helios expression is shown gated on MTregs and Mconv (*middle and right panels*). **(B)** Dot plot shows IL-1RI and CCR7 expression gated on memory Tregs (CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) for one representative donor. Helios expression was assessed gated on the total MTreg, IL-1RI<sup>+</sup> CM (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) Treg, IL-1RI<sup>-</sup> CM Treg, and IL-1RI<sup>-</sup> EM (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) Treg populations. The proportions of Helios<sup>-</sup> cells in each population are summarized (*n* = 5, mean ± SEM). **(C)** CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, and -IL-1RI Abs and sorted by flow cytometry into CM conv (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), CM Treg IL-1RI<sup>+</sup>, CM Treg IL-1RI<sup>-</sup>, and EM Treg IL-1RI<sup>-</sup> populations. Aliquots of sorted populations were stained with anti-FOXP3 and -Helios Abs, and analyzed by flow cytometry. FOXP3 and Helios expression in sorted populations is shown for one donor representative of three.



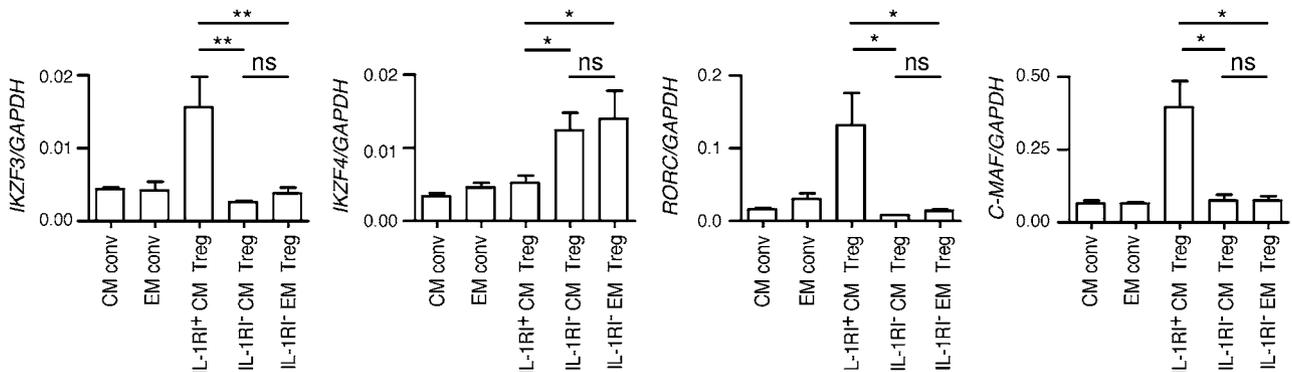
*Differential expression of Aiolos and Eos in Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs*

Because Abs specific for members of the Ikaros family other than Helios are not available, their expression in human Treg subsets has not yet been addressed. We therefore took advantage of the ex vivo isolation approach described earlier to assess the expression of Eos, which has been reported to mediate FOXP3-dependent gene silencing (13), and Aiolos, which has been reported to be involved in the differentiation of FOXP3<sup>+</sup> iTregs and T<sub>H</sub>17 cells (14, 15), in the isolated Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Treg subpopulations, by qPCR. Remarkably, we found that Helios<sup>+</sup> Tregs coexpressed Eos but did not express Aiolos (Fig. 5). In contrast, Helios<sup>-</sup> Tregs expressed Aiolos but not Eos. In addition, we found that, consistent with their capacity to secrete IL-17 and IL-10, Helios<sup>-</sup> Tregs, but not Helios<sup>+</sup> Tregs, expressed the transcription factors RORγt and C-MAF, which control the expression of IL-17 and IL-10, respectively (Fig. 5). Together, these results depict distinct transcriptional profiles

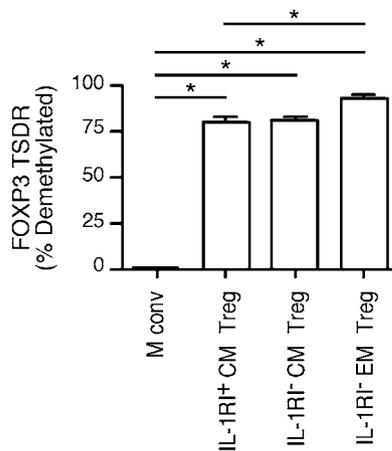
for the Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Treg subsets, suggesting that they follow distinct differentiation pathways. In particular, expression of Aiolos, together with that of RORγt and C-MAF, in Helios<sup>-</sup> Tregs, indicate that their differentiation pathway is similar to that common to T<sub>H</sub>17 and FOXP3<sup>+</sup> iTregs (14, 15).

*Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg populations contain high proportions of cells with demethylated FOXP3 gene TSDR*

The methylation status at the TSDR region of the FOXP3 gene promoter has emerged as a specific marker of Tregs, whereby demethylation at TSDR is associated to stable FOXP3 expression in bona fide Tregs, and methylation at TSDR concomitant to FOXP3 expression reflects an unstable expression of the gene in activated conventional CD4<sup>+</sup> T cells (23). To get insight into the stability of FOXP3 expression in Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Tregs, we assessed the TSDR methylation status of the isolated IL-1RI<sup>+</sup> CM, IL-1RI<sup>-</sup> CM, and IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg populations. We found that, as compared



**FIGURE 5.** Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs display distinct transcriptional profiles. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, and -IL-1RI Abs and sorted by flow cytometry into CM conv, EM conv, IL-1RI<sup>+</sup> CM Tregs, IL-1RI<sup>-</sup> CM Tregs, and IL-1RI<sup>-</sup> EM Tregs, as in Fig. 4C. Sorted populations were assessed for mRNA expression of Aiolos (*IKZF3*), Eos (*IKZF4*), RORγt (*RORC*), and C-MAF (*C-MAF*) (*n* = 4). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney *U* test. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01. ns, Nonsignificant.



**FIGURE 6.** Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs are mostly demethylated at the *FOXP3* gene TSDR. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, and -IL-1RI Abs and sorted by flow cytometry into conventional memory (Mconv), IL-1RI<sup>+</sup> CM Tregs, IL-1RI<sup>-</sup> CM Tregs, and IL-1RI<sup>-</sup> EM Tregs, as in Fig. 4C. Sorted populations were assessed for *FOXP3* TSDR methylation ( $n = 4$ ). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney *U* test. \* $p < 0.05$ .

with conventional CD4<sup>+</sup> T cell populations, which contain only minor proportions of cells with demethylated TSDR, the three Treg populations isolated ex vivo contained high proportions of cells with demethylated TSDR, confirming that they all are, for the most part, bona fide Tregs (Fig. 6). The Helios<sup>+</sup> IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg population, however, contained slightly higher proportions of cells with demethylated TSDR as compared with the other two subpopulations.

*Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg subsets are anergic and phenotypically stable*

To characterize functionally the subpopulations isolated ex vivo by flow cytometry cell sorting, we labeled them with CFSE and

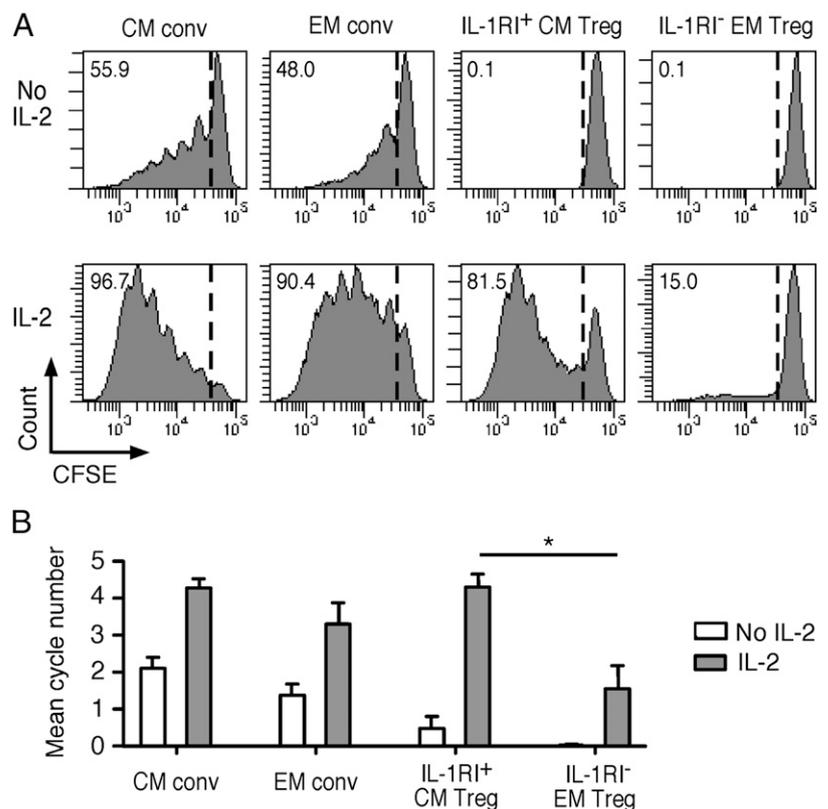
assessed their proliferative capacity after stimulation with PHA and APCs in the absence or presence of IL-2. We found that both Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Treg subsets were anergic and failed to proliferate in the absence of IL-2 (Fig. 7A, 7B). In the presence of IL-2, however, Helios<sup>-</sup> Tregs proliferated significantly as compared with Helios<sup>+</sup> Tregs.

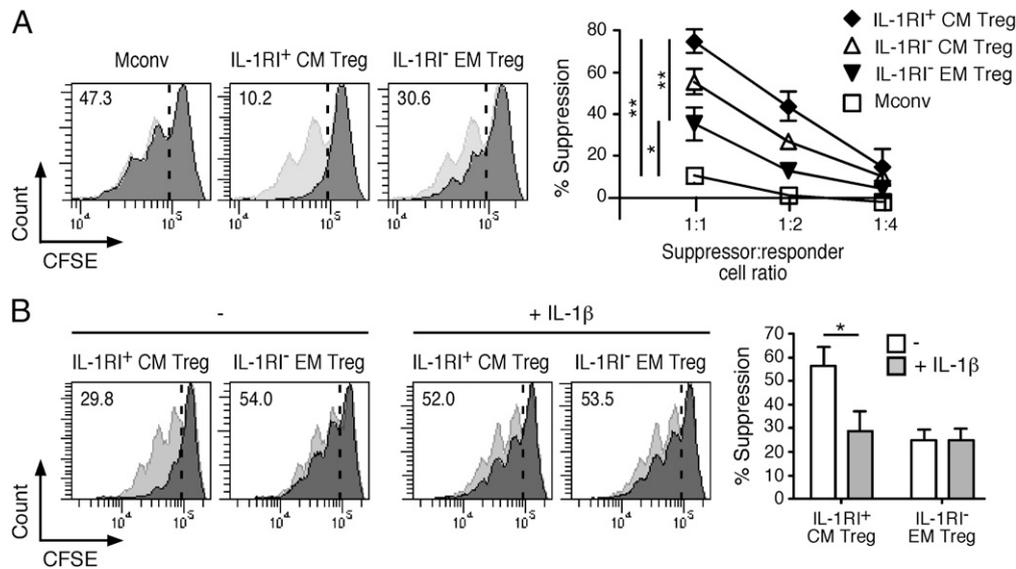
An ongoing issue regarding human FOXP3<sup>+</sup> Tregs producing cytokines is that they may correspond to activated conventional CD4<sup>+</sup> T cells that have acquired FOXP3 expression transiently and would downregulate it after expansion. To address the stability of ex vivo-sorted Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Tregs, we stimulated the isolated populations with anti-CD3/CD28 Abs and IL-2 and, 10 d after in vitro expansion, reassessed their phenotype. As shown in Supplemental Fig. 3, we found that both subsets maintained the phenotype that they exhibited ex vivo, indicating that they were both stable under neutral conditions.

*Helios<sup>-</sup> Tregs are highly suppressive ex vivo and readily downregulate their suppressive capacity in response to IL-1 $\beta$*

It has been argued that IL-17-secreting FOXP3<sup>+</sup> Tregs are activated conventional CD4<sup>+</sup> T cells that do not exert suppressive functions (12). To address this point, we compared the suppressive capacity of Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Tregs by stimulating the ex vivo-isolated subpopulations together with CFSE-labeled responder T cells and APCs at different suppressor-to-responder cell ratios and, 4 d later, assessed the growth of responder T cells. As illustrated in Fig. 8A, we found that both Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Tregs significantly inhibited the proliferation of responder T cells, confirming that both subpopulations are suppressive ex vivo. However, Helios<sup>-</sup> Tregs actually suppressed the proliferation of responder T cells to a higher extent and at lower suppressor-to-responder cell ratios as compared with Helios<sup>+</sup> Tregs. IL-1RI<sup>-</sup> CM Tregs, which contained a mixture of Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> cells, exhibited a suppressive capacity intermediate between those of the Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> populations.

**FIGURE 7.** Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg subsets are anergic. CM conv, EM conv, IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg, and IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg populations, sorted by flow cytometry as in Fig. 4C, were labeled with CFSE and stimulated with PHA in the presence of irradiated monocytes in the absence or presence of IL-2. Cell growth was assessed in day 6 cultures by flow cytometry analysis of CFSE dilution. Histograms in (A) show CFSE dilution in the absence or presence of IL-2 in the indicated populations (numbers in histograms correspond to the percentage of divided cells). The mean division cycle numbers for all populations and conditions tested are summarized in (B) (mean  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney *U* test. \* $p < 0.05$ .





**FIGURE 8.** Helios<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> Tregs are highly suppressive ex vivo and downregulate their suppressive activity in response to IL-1 $\beta$ . CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, and -IL-1RI Abs and sorted into conventional memory (Mconv), IL-1RI<sup>+</sup> CM Tregs, IL-1RI<sup>-</sup> CM Tregs, and IL-1RI<sup>-</sup> EM Tregs. **(A)** Sorted populations were cocultured with CFSE-labeled responder conventional CD4<sup>+</sup> T cells at the indicated suppressor-to-responder cell ratios in the presence of monocytes, and PHA and CFSE dilution was assessed in day 4 cultures by flow cytometry. Histograms show CFSE dilution in responder cells in the absence (light gray) and presence (dark gray) of the indicated test populations at 1:1 responder-to-suppressor cell ratio (numbers in histograms correspond to the percentage of divided cells in the presence of test populations). In the absence of test populations, 49.0  $\pm$  3.0% ( $n = 12$ ) of responder cells had undergone cell division. Data corresponding to the percentage of suppression, calculated as detailed in *Materials and Methods*, are summarized for all ratios (populations from six donors, each assessed in duplicate cultures). **(B)** Sorted Treg populations were assessed in a suppression assay as in (A) at a 1:1 responder-to-suppressor cell ratio in the absence (-) or presence of IL-1 $\beta$ . Histograms show CFSE dilution in responder cells in the absence (light gray) and presence (dark gray) of the indicated test populations for one donor (numbers in histograms correspond to the percentage of divided cells in the presence of test populations). In the absence of test populations, 63.5  $\pm$  5.6% ( $n = 11$ ) of responder cells had undergone cell division in the absence of IL-1 $\beta$  and 64.3  $\pm$  3.8% ( $n = 11$ ) in the presence IL-1 $\beta$ . Data corresponding to the percentage of suppression are summarized (populations from three donors, each assessed in duplicate cultures). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney  $U$  test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

It has been shown that stimulation through TLRs can impair the suppressive capacity of Tregs (24). Because IL-1RI belongs to the same receptor superfamily as TLRs (25), we hypothesized that Helios<sup>-</sup> Tregs, which express IL-1RI ex vivo, may modulate their suppressive function under inflammatory conditions in response to IL-1 $\beta$ . To address this point, we compared the capacity of the ex vivo-isolated Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Treg populations to suppress the proliferation of responder T cells in the absence or in the presence of exogenously added IL-1 $\beta$ . As illustrated in Fig. 8B, we found that the presence of IL-1 $\beta$  significantly decreased the suppressive activity of Helios<sup>-</sup> Tregs without affecting that of Helios<sup>+</sup> Tregs. In line with their inability to respond to IL-1 $\beta$ , IL-1RI<sup>-</sup> EM Tregs only moderately upregulated IL-1RI expression upon stimulation in vitro, whereas high proportions of IL-1RI<sup>+</sup> CM Tregs maintained expression of the receptor (Supplemental Fig. 4).

## Discussion

In this study, we have conducted an extensive comparative phenotypical and functional characterization of human memory Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Tregs, with the aim of getting insight into their origin, differentiation, and function. We found that, despite many shared markers and common characteristics, the two populations are phenotypically and functionally distinct. Our results confirm and extend previous data in the literature (5, 8) reporting that, in contrast with Helios<sup>+</sup> Tregs, which fail to secrete cytokines, Helios<sup>-</sup> Tregs contain subpopulations able to produce cytokines ex vivo, including a ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> subpopulation secreting IL-17, that we have previously identified (9), and a subpopulation secreting IL-10. Because these features characterize populations of iTregs found in the intestinal mucosae, where they restrain excessive effector

T cell responses that might damage host tissues (26, 27), these results support the concept that human circulating Helios<sup>-</sup> memory Tregs represent, at least in part, iTregs.

Helios<sup>+</sup> Tregs were, for the most part, of CCR7<sup>-</sup> EM type. The prevalence of EM cells among memory Helios<sup>+</sup> Tregs, which are presumably of thymic origin, is compatible with a continuous in vivo stimulation of this population in response to ubiquitously expressed self-Ags. Persistent expression of Helios in nTreg at late stages of differentiation is also consistent with data obtained in mouse models using tracking of nTreg cell fate in vivo, which have suggested a high stability of the lineage both under physiologic and inflammatory conditions (28). Opposite to Helios<sup>+</sup> Tregs, Helios<sup>-</sup> Tregs are prevalently CCR7<sup>+</sup> CM cells, which is compatible with the concept that this subset could at least partially convert into FOXP3<sup>-</sup> cells at later stages of differentiation, particularly under inflammatory conditions (11).

Based on our recent finding that ex vivo expression of IL-1RI in Tregs identifies an early memory Treg intermediate in the differentiation of T<sub>H</sub>17 (11), we found that, consistent with the restricted expression of ROR $\gamma$ t and IL-17 in Helios<sup>-</sup> Tregs, ex vivo expression of IL-1RI was also highly enriched in this subpopulation. Notably, the expression of ROR $\gamma$ t, which is induced by TGF- $\beta$ , in Helios<sup>-</sup> but not Helios<sup>+</sup> Tregs further supports the peripheral origin of the former, because several studies have reported a role for TGF- $\beta$  in the differentiation of peripherally induced but not of thymically derived Tregs (3, 29).

Using combined ex vivo staining with CCR7 and IL-1RI Abs, we were able to separate highly enriched Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> Treg subpopulations ex vivo and assess further their phenotype and function. Of particular interest are the data we obtained concerning

the differential expression of additional Ikaros family members in Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Tregs. The function of Helios itself in Tregs has been initially unclear, because ectopic expression of Helios was reported as insufficient to induce a Treg phenotype, and Helios-deficient mice have normal FOXP3 expression and Treg function (5, 30). A recent study, however, has reported that Helios induces epigenetic silencing of the IL-2 gene expression in Tregs and participates in their suppressive phenotype (31). Two other members of the Ikaros family, Eos and Aiolos, have also been reported to play direct roles in Treg differentiation and function. Namely, Eos has been identified as a critical mediator of Foxp3-dependent gene silencing in Tregs (13). The expression of Eos in nTregs versus iTregs, however, has not been assessed. Aiolos has been identified as involved in the differentiation of FOXP3<sup>+</sup> iTregs and T<sub>H</sub>17 cells (14, 15), but its expression in nTregs has not been addressed. In this context, our findings that, in contrast with Helios<sup>+</sup> Tregs that express Eos and do not secrete cytokines, Helios<sup>-</sup> Tregs express Aiolos, together with ROR $\gamma$ t and C-MAF, which respectively direct IL-17 and IL-10 production, support the concept that they encompass iTregs that differentiate along a pathway partially common to T<sub>H</sub>17 cells (11).

Another significant finding was that Helios<sup>-</sup> Tregs, which secrete IL-17, were highly suppressive *ex vivo*. These results are consistent with our previous description of clonal Treg populations that secrete IL-17, whereas simultaneously exerting suppressor functions (9). In contrast, another study found reduced suppressive capacity of IL-17-secreting Tregs, a discrepancy that could be possibly explained by a less stringent selection of the Treg population, which may have resulted in the inclusion of conventional T<sub>H</sub>17 cells (12). In contrast, we found that Helios<sup>+</sup> Tregs were less suppressive than Helios<sup>-</sup> Tregs. Nevertheless, the Helios<sup>+</sup> Treg population contained the highest proportions of cells with demethylated *FOXP3* gene TSDR clearly indicating that it is comprised primarily of bona fide Tregs.

Finally, the finding that Helios<sup>-</sup> Tregs respond to IL-1 $\beta$  by downregulating suppressor functions is in line with the fact that this population shares many common characteristics with iTregs found in intestinal mucosae (26, 27) where, because the changing conditions may require a rapid switch from tolerance to protection, Tregs need to maintain the capacity to readily respond to the environment by modulating their suppressive capacity in response to inflammatory cytokines or pathogen-derived TLR ligands.

Whereas our study has concentrated on memory Tregs, it is noteworthy that Helios<sup>-</sup> Tregs have been recently described by Himmel et al. (32) among naive Tregs. Whereas Himmel et al. (32) have suggested that this population is composed of nTregs, we found that naive Helios<sup>-</sup> Tregs are absent in human cord blood, and therefore likely arise after birth (33). However, because human naive Tregs, including the Helios<sup>-</sup> population, do not express IL-1RI *ex vivo* and cannot therefore be isolated and characterized using this marker, their origin and relationship with memory Helios<sup>-</sup> Tregs remain to be addressed.

In conclusion, the results of this study reveal previously unappreciated phenotypic and functional differences between human memory Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Tregs, and support the concept that the latter encompass highly suppressive iTregs. Moreover, the identification of a combination of surface markers that allow the isolation of the two subsets opens new perspectives for further studies addressing the origin, Ag specificity, and potential use or targeting of these subpopulations for immunotherapy.

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Piccirillo, C. A., and E. M. Shevach. 2004. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin. Immunol.* 16: 81–88.
- Lee, H. M., J. L. Bautista, and C. S. Hsieh. 2011. Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells. *Adv. Immunol.* 112: 25–71.
- Curotto de Lafaille, M. A., and J. J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30: 626–635.
- Lathrop, S. K., S. M. Bloom, S. M. Rao, K. Nutsch, C. W. Lio, N. Santacruz, D. A. Peterson, T. S. Stappenbeck, and C. S. Hsieh. 2011. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478: 250–254.
- Thornton, A. M., P. E. Korty, D. Q. Tran, E. A. Wohlfert, P. E. Murray, Y. Belkaid, and E. M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 184: 3433–3441.
- Akimova, T., U. H. Beier, L. Wang, M. H. Levine, and W. W. Hancock. 2011. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS ONE* 6: e24226.
- Gottschalk, R. A., E. Corse, and J. P. Allison. 2012. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 188: 976–980.
- Kim, Y. C., R. Bhairavabhotla, J. Yoon, A. Golding, A. M. Thornton, D. Q. Tran, and E. M. Shevach. 2012. Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during *in vitro* expansion. *Blood* 119: 2810–2818.
- Ayyoub, M., F. Deknuydt, I. Raimbaud, C. Doussset, L. Leveque, G. Biele, and D. Valmori. 2009. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 *ex vivo* and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor ROR $\gamma$ t. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8635–8640.
- Valmori, D., C. Raffin, I. Raimbaud, and M. Ayyoub. 2010. Human ROR $\gamma$ t+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 19402–19407.
- Raffin, C., I. Raimbaud, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2011. *Ex vivo* IL-1 receptor type I expression in human CD4+ T cells identifies an early intermediate in the differentiation of Th17 from FOXP3+ naive regulatory T cells. *J. Immunol.* 187: 5196–5202.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taffin, T. Heike, D. Valeyre, et al. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the Foxp3 transcription factor. *Immunity* 30: 899–911.
- Pan, F., H. Yu, E. V. Dang, J. Barbi, X. Pan, J. F. Grosso, D. Jinasena, S. M. Sharma, E. M. McCadden, D. Getnet, et al. 2009. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* 325: 1142–1146.
- Gandhi, R., D. Kumar, E. J. Burns, M. Nadeau, B. Dake, A. Laroni, D. Kozoriz, H. L. Weiner, and F. J. Quintana. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 11: 846–853.
- Quintana, F. J., H. Jin, E. J. Burns, M. Nadeau, A. Yeste, D. Kumar, M. Rangachari, C. Zhu, S. Xiao, J. Seavitt, et al. 2012. Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing IL2 expression. *Nat. Immunol.* 13: 770–777.
- Wieczorek, G., A. Asemissen, F. Model, I. Turbachova, S. Floess, V. Liebenberg, U. Baron, D. Stauch, K. Kotsch, J. Pratschke, et al. 2009. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res.* 69: 599–608.
- Valmori, D., A. Merlo, N. E. Souleimanian, C. S. Heschdorfer, and M. Ayyoub. 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J. Clin. Invest.* 115: 1953–1962.
- Serre, K., C. Bénézech, G. Desanti, S. Bobat, K. M. Toellner, R. Bird, S. Chan, P. Kastner, A. F. Cunningham, I. C. MacLennan, and E. Mohr. 2011. Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells *in vivo* independently of Foxp3 expression. *PLoS ONE* 6: e20731.
- Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636–645.
- Tosello, V., K. Odunsi, N. E. Souleimanian, S. Lele, P. Shrikant, L. J. Old, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2008. Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4+CD25+ Tregs. *Clin. Immunol.* 126: 291–302.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708–712.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, et al. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 203: 1701–1711.
- Baron, U., S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grützkau, J. Dong, A. Thiel, T. J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, et al. 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur. J. Immunol.* 37: 2378–2389.
- Peng, G., Z. Guo, Y. Kuniwa, K. S. Voo, W. Peng, T. Fu, D. Y. Wang, Y. Li, H. Y. Wang, and R. F. Wang. 2005. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 309: 1380–1384.
- O'Neill, L. A. 2008. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* 226: 10–18.
- Lochner, M., L. Peduto, M. Cherrier, S. Sawa, F. Langa, R. Varona, D. Riethmacher, M. Si-Tahar, J. P. Di Santo, and G. Eberl. 2008. *In vivo* equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ ROR $\gamma$ t+ T cells. *J. Exp. Med.* 205: 1381–1393.

27. Round, J. L., and S. K. Mazmanian. 2010. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 12204–12209.
28. Rubtsov, Y. P., R. E. Nieu, S. Josefowicz, L. Li, J. Darce, D. Mathis, C. Benoist, and A. Y. Rudensky. 2010. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329: 1667–1671.
29. Fahlén, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201: 737–746.
30. Getnet, D., J. F. Grosso, M. V. Goldberg, T. J. Harris, H. R. Yen, T. C. Bruno, N. M. Durham, E. L. Hipkiss, K. J. Pyle, S. Wada, et al. 2010. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol. Immunol.* 47: 1595–1600.
31. Baine, I., S. Basu, R. Ames, R. S. Sellers, and F. Macian. 2013. Helios induces epigenetic silencing of IL2 gene expression in regulatory T cells. *J. Immunol.* 190: 1008–1016.
32. Himmel, M. E., K. G. MacDonald, R. V. Garcia, T. S. Steiner, and M. K. Levings. 2013. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J. Immunol.* 190: 2001–2008.
33. Ayyoub, M., C. Raffin, and D. Valmori. 2013. Comment on “helios+ and helios-cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans”. *J. Immunol.* 190: 4439–4440.

**SUPPLEMENTAL FIGURE 1.** Phenotypic characterization of memory Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg. CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, -FOXP3, and -Helios Abs in combination with Abs specific for the indicated markers. For each marker, examples of histograms are shown gated on memory (CD45RA<sup>-</sup>) FOXP3<sup>-</sup> Helios<sup>-</sup>, FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> and FOXP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> populations and data (MFI or percentage of expressing cells) are summarized for naïve (N, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), conventional memory (Mconv, CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>), memory Treg (MTreg, CD45RA<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) as well as for the indicated memory CD4<sup>+</sup> T cell populations defined, as in Figure 1, according to FOXP3 and Helios expression. Each marker was assessed using CD4<sup>+</sup> T cells from 5 or 6 donors. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test. ns = non-significant; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

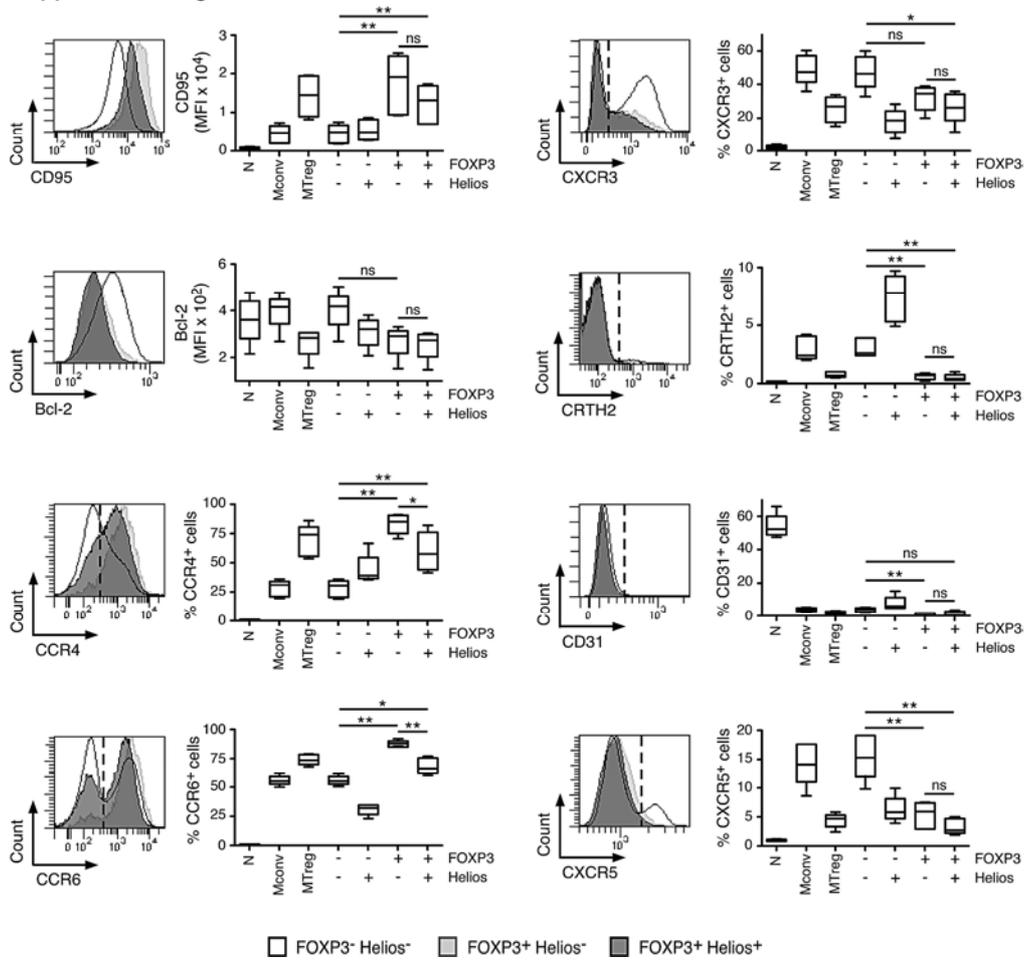
**SUPPLEMENTAL FIGURE 2.** *Ex vivo*-sorted IL-1RI<sup>+</sup> CM and IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg exhibit the same cytokine-production profile as Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg, respectively. CM conv, EM conv, IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg and IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg populations, sorted by flow cytometry as in Figure 4C, were assessed in a 6-h cytokine staining assay following stimulation with PMA and ionomycin using anti-IFN- $\gamma$ , -IL-17 and -IL-10 Abs and analyzed by flow cytometry. The proportions of cytokine<sup>+</sup> cells in the indicated sorted populations are summarized ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM).

**SUPPLEMENTAL FIGURE 3.** Helios<sup>-</sup> and Helios<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg are phenotypically stable. IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg and IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg populations, sorted by flow cytometry as in Figure 4C, were stimulated with plate-bound anti-CD3 and -CD28 Abs in the presence of IL-2. Day 10 cultures were assessed for FOXP3, Helios, IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-10 expression in a 4-h

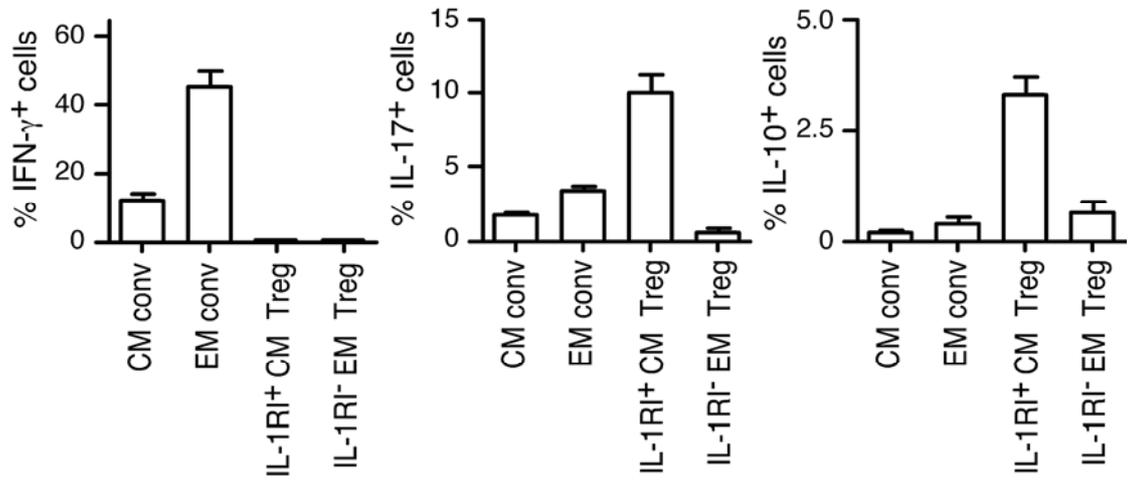
intracellular cytokine staining assay following stimulation with PMA and ionomycin ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test. \*,  $p < 0.05$ .

**SUPPLEMENTAL FIGURE 4.** IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg and IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg maintain differential IL-1RI expression upon *in vitro* stimulation. M conv, IL-1RI<sup>+</sup> CM Treg and IL-1RI<sup>-</sup> EM Treg populations, sorted by flow cytometry as in Figure 4C, were stimulated with plate-bound anti-CD3 and -CD28 Abs in the presence of IL-2. Day 6 cultures were assessed for IL-1RI expression by staining with specific Abs and analysis by flow cytometry ( $n = 2$ , mean  $\pm$  SEM).

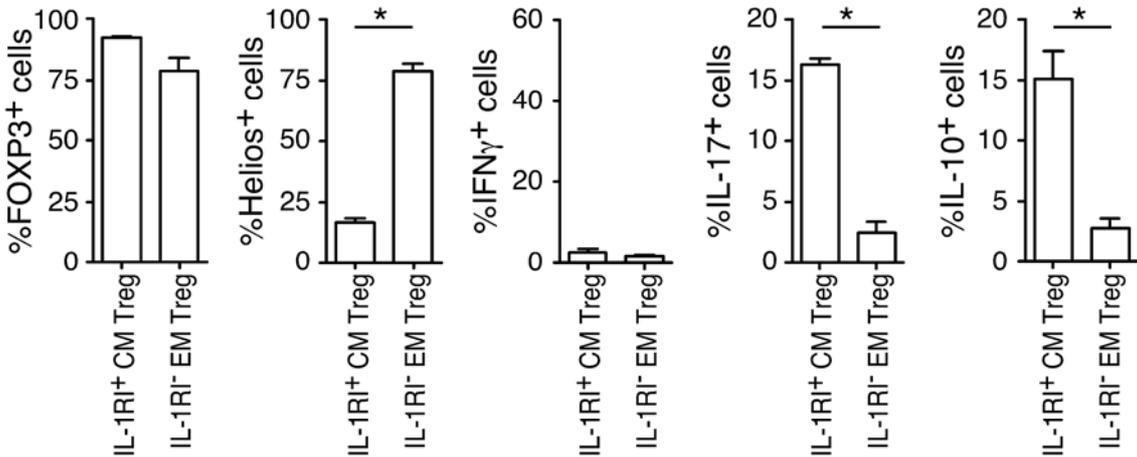
Supplemental Figure 1



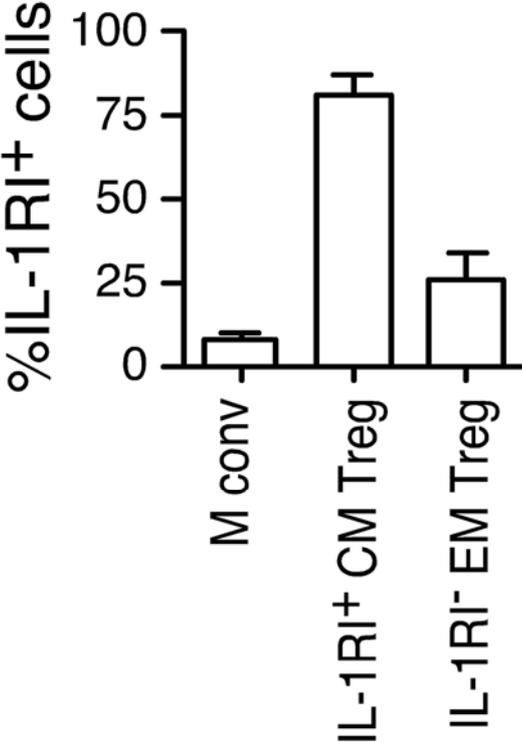
## Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3



# Supplemental Figure 4



## Comment on “A20 and CYLD Do Not Share Significant Overlapping Functions during B Cell Development and Activation”

Interleukin-6 is a cytokine that plays an important role in both innate and adaptive immunity. Its primary function in adaptive immunity is stimulation of the growth of B cells (1). In a recent article by Chu et al. (2), the authors measured IL-6 production in B cells derived from four dif-

ferent genotypes under five different conditions as a part of their research to examine the functional overlapping of two proteins, A20 and CYLD. In this letter, we propose a hypothesis on the mechanism of the production of IL-6 in B cells.

We grouped the 20 different measurements of IL-6 shown in the *bottom panel* of Fig. 4B of the article into five groups based on proximity of values (Fig. 1A). We found that the relationship between the quantum level ( $x$ ) and the IL-6 amount ( $y$ ) is described by a linear equation,  $y = ax + b$  (Fig. 1B). The slope  $a$  corresponds to the quantized amount of IL-6. This means that IL-6 production in B cells may be quantized with constant spacing between each level. This type of quantized behavior has been previously observed in the release of neurotransmitters from presynaptic cells (3).

To test our hypothesis, we would like to suggest that further experiments be conducted to verify if A20/CYLD-deficient and A20-deficient B cells produce IL-6 in a quantized pattern responding to combined stimuli (such as LPS and CpG).

Jonghoon Kang, Adarsh Gopinath, and Iris Rivera

Department of Biology, Valdosta State University, Valdosta, GA 31698

Address correspondence and reprint requests to Jonghoon Kang, Department of Biology, Valdosta State University, 1500 N. Patterson Street, Valdosta, GA 31698. E-mail address: jkang@valdosta.edu

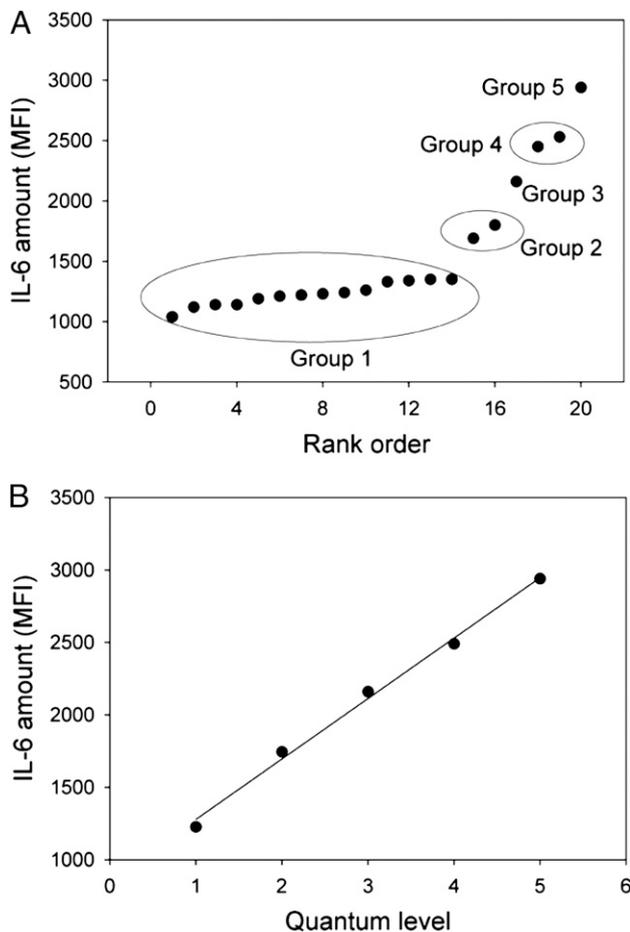
### References

1. Abbas, A. K., and A. H. Lichtman. 2009. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 3rd Ed. Saunders, Philadelphia, p. 36–39.
2. Chu, Y., V. Soberon, L. Glockner, R. Beyaert, R. Massoumi, G. van Loo, D. Krappmann, and M. Schmidt-Suppran. 2012. A20 and CYLD do not share significant overlapping functions during B cell development and activation. *J. Immunol.* 189: 4437–4443.
3. Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer, Sunderland, MA, p. 141–145.

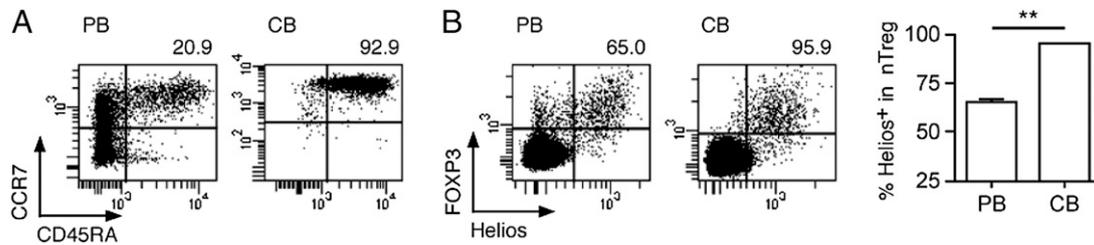
www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1390017

## Comment on “Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Cells Coexist within the Natural FOXP3<sup>+</sup> T Regulatory Cell Subset in Humans”

We read with interest the recent study by Himmel and colleagues (1) reporting that human circulating FOXP3<sup>+</sup> naive T regulatory cells (nTreg), a population that we defined in 2005 (2), includes Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> cells, the latter representing, on average, 30% of total nTreg (1). Whereas Himmel et al. found that T cell clones derived from the two populations were similarly suppressive in vitro (although Helios<sup>-</sup> Treg clones produced more CCL3 and IFN- $\gamma$  than Helios<sup>+</sup> clones) and carried demethylated *FOXP3* T regulatory cell-specific demethylated region, indicating stable expression of FOXP3, the origin of the circulating Helios<sup>-</sup> Treg population is yet unclear. In recent experiments performed in our laboratory, we similarly identified the Helios<sup>-</sup>



**FIGURE 1.** (A) The amount of IL-6 produced in B cells in ascending order. They are combined into five groups. When a group contains multiple elements, then the average value is taken as the representative value of the group. Each group is treated as a quantum level. (B) Quantized production of IL-6 as a function of quantum level. The relationship is fitted to a linear equation,  $y = ax + b$ , where  $a = 417 \pm 17$  and  $b = 860 \pm 58$ , respectively ( $R^2 = 0.9948$ ). The IL-6 amount is expressed by mean fluorescence intensity (MFI). Fitting was conducted using SigmaPlot (version 11, Systat Software, San Jose, CA).



**FIGURE 1.** Helios<sup>-</sup> FXP3<sup>+</sup> naive Treg are absent in cord blood. CD4<sup>+</sup> T cells, isolated from adult peripheral blood (PB) or cord blood (CB) by density gradient sedimentation (PAA Laboratories) followed by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec), were stained with anti-CD45RA (BD Biosciences), -CCR7 (BD Biosciences), -CD25 (Beckman Coulter), -CD127 (BD Biosciences), -FXP3 (eBioscience), and -Helios (BioLegend) mAb and analyzed by flow cytometry (FACS Aria II; BD Biosciences). **(A)** Dot plots show CD45RA and CCR7 expression in total PB and CB CD4<sup>+</sup> T cells. Numbers correspond to the proportion of naive (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells. **(B)** FXP3 and Helios expression gated on naive CD4<sup>+</sup> T cells and the proportion of Helios<sup>+</sup> cells in FXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> nTreg are shown for one sample of PB and one sample of CB. The proportion of Helios<sup>+</sup> cells in FXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> nTreg is summarized for all samples (mean ± SEM, *n* = 6). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney *U* test. \*\**p* < 0.01.

subpopulation, in the proportions reported by Himmel et al., in circulating nTreg from healthy donors (Fig. 1). To gain insight into the origin of this population, we assessed CD4<sup>+</sup> T cells in human cord blood, where nTreg are abundant (2). We found, however, that Helios<sup>-</sup> Treg were absent in cord blood, indicating that they develop in the periphery after birth (Fig. 1). Thus, whereas human thymically derived nTreg in cord blood are all Helios<sup>+</sup>, whether Helios<sup>-</sup> circulating naive Treg in healthy adults derive from Helios<sup>+</sup> Treg that have lost Helios expression, or from another, yet undefined, population, remains to be addressed. Nonetheless, the absence of Helios<sup>-</sup> Treg, that, as suggested by Himmel et al. may be prone to secrete cytokines/chemokines, among cord blood-derived Treg, suggests that the latter should be a preferred source for use in Treg-based adoptive transfer therapy approaches.

Maha Ayyoub,\* Caroline Raffin,\* and Danila Valmori\*<sup>†</sup>

\*INSERM U1102, Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44800 Nantes-Saint Herblain, France; and <sup>†</sup>Faculty of Medicine, University of Nantes, 44035 Nantes, France

Address correspondence and reprint requests to Dr. Maha Ayyoub and Prof. Danila Valmori, INSERM U1102, Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44800 Nantes-Saint Herblain, France. E-mail addresses: Maha.Ayyoub@univ-nantes.fr (M.A.) and Danila.Valmori@univ-nantes.fr (D.V.)

## References

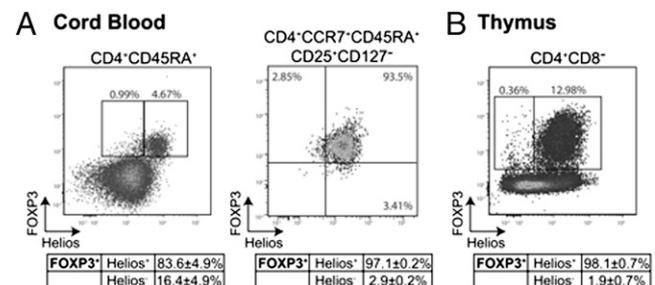
- Himmel, M. E., K. G. MacDonald, R. V. Garcia, T. S. Steiner, and M. K. Levings. 2013. Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> cells coexist within the natural FXP3<sup>+</sup> T regulatory cell subset in humans. *J. Immunol.* 190: 2001–2008.
- Valmori, D., A. Merlo, N. E. Souleimanian, C. S. Hesdorffer, and M. Ayyoub. 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J. Clin. Invest.* 115: 1953–1962.

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1390018

## Response to Comment on “Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Cells Coexist within the Natural FXP3<sup>+</sup> T Regulatory Cell Subset in Humans”

**A**yyoub et al. raise two long-standing questions in their comment addressing the publication by Himmel et al. (1): what is the best way to define T regulatory

cells (Tregs) from different origins in humans; and which population of Tregs is optimal for cell therapy applications? A consistent observation in adult peripheral blood is that, even when only considering CD4<sup>+</sup> T cells expressing canonical naive markers, ~30% of FXP3<sup>+</sup> cells do not express Helios (1–3). Because Helios<sup>-</sup> FXP3<sup>+</sup> Tregs have previously been characterized as cells originating in the periphery upon Ag encounter (4), these data raise the question: are Helios<sup>-</sup> FXP3<sup>+</sup> cells expressing CD45RA, CCR7, CD62L, and/or CD31 truly naive cells? This is a difficult question to definitively answer in humans, but if so, one would expect to find evidence for their existence in cord blood and thymus. Ayyoub et al. analyzed cord blood and concluded that Helios<sup>-</sup> FXP3<sup>+</sup> cells are “absent.” We note, however, that although these cells are indeed present at lower proportions than in adult blood, they are not completely absent. In our own investigation of cord blood, 16.4 ± 4.9% of FXP3<sup>+</sup> cells in the CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> gate were Helios<sup>-</sup> (Fig. 1A). When further gated as CCR7<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> cells, and consistent with Ayyoub et al., this proportion was reduced to 2.9 ± 0.2%. Thus some of the CD45RA<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup> FXP3<sup>+</sup> cells in cord blood do not express canonical Treg cell surface markers. We also examined the thymus and found that



**FIGURE 1.** Helios<sup>-</sup> FXP3<sup>+</sup> cells are present in cord blood and thymus. **(A)** Cord blood mononuclear cells obtained from elective Cesarean section deliveries at term were stained with CD4 (eBioscience, SK3), CD8 (BioLegend, RPA-T8), CCR7 (BD Biosciences, 3D12), CD45RA (eBioscience, HI100), CD127 (eBioscience, eBioRDR5), and CD25 (BioLegend, M-A251), then fixed, permeabilized, and stained for FXP3 (eBioscience, 236A/E7) and Helios (BioLegend, 22F6). **(B)** Thymocytes were isolated from thymi (0, 6, or 17 mo old) by mincing and filtration. Tables report the average ± SD proportion of Helios positive or negative cells within the FXP3<sup>+</sup> gate from independent experiments: (A, left panel) *n* = 6, (A, right panel) *n* = 3, (B) *n* = 3. Gates were set based on fluorescence minus one controls.

a very small, but detectable, proportion of Helios<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells was present (Fig. 1B). Overall, these data suggest it is premature to conclude that all Helios<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells develop in the periphery after birth, and we agree with Ayyoub et al. that further study is required to define the origin of Helios<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells and to identify the most accurate surface versus intracellular markers with which to track and study them.

Although cord blood is clearly enriched for Helios<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Tregs, it would be difficult to use this source of cells for applications in which delivery of autologous Tregs is desired, unless the patient has banked cord blood. In addition, despite expressing more IFN- $\gamma$  and CCL3 than Helios<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg clones, Helios<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg clones are suppressive (1). Indeed, in the context of transplantation, Treg-derived production of IFN- $\gamma$  is necessary for their protective effect (5, 6). Further research into the mechanisms of Treg action that are critical for their therapeutic effects in different diseases is required to determine the best way to isolate Tregs that express the immunomodulatory effector molecules required for each clinical application.

Katherine G. MacDonald,\* Jonathan M. Han,\*  
Megan E. Himmel,\* Qing Huang,\* Bernard Kan,<sup>†</sup>  
Andrew I. M. Campbell,\* Pascal M. Lavoie,<sup>†</sup> and  
Megan K. Levings\*

\*Department of Surgery, Child and Family Research Institute, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V5Z 4H4, Canada; and <sup>†</sup>Department of Pediatrics, Child and Family Research Institute, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V5Z 4H4, Canada

Address correspondence and reprint requests to Dr. Megan Levings, Department of Surgery, Child and Family Research Institute, University of British Columbia, A4-186, 950 West 28th Avenue, Vancouver, BC V5Z 4H4, Canada. E-mail address: megan.levings@ubc.ca

## References

- Himmel, M. E., K. G. Macdonald, R. V. Garcia, T. S. Steiner, and M. K. Levings. 2013. Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> cells coexist within the natural FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cell subset in humans. *J. Immunol.* 190: 2001–2008.
- Akimova, T., U. H. Beier, L. Wang, M. H. Levine, and W. W. Hancock. 2011. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS ONE* 6: e24226.
- Kim, Y. C., R. Bhairavabhotla, J. Yoon, A. Golding, A. M. Thornton, D. Q. Tran, and E. M. Shevach. 2012. Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3<sup>+</sup> human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood* 119: 2810–2818.
- Thornton, A. M., P. E. Kory, D. Q. Tran, E. A. Wohlfert, P. E. Murray, Y. Belkaid, and E. M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J. Immunol.* 184: 3433–3441.
- Koenecke, C., C. W. Lee, K. Thamm, L. Föhse, M. Schafferus, H. W. Mittrücker, S. Floess, J. Huehn, A. Ganser, R. Förster, and I. Prinz. 2012. IFN- $\gamma$  production by allogeneic Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells is essential for preventing experimental graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 189: 2890–2896.
- Sawitzki, B., C. I. Kingsley, V. Oliveira, M. Karim, M. Herber, and K. J. Wood. 2005. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J. Exp. Med.* 201: 1925–1935.

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1390019

## CXCR3<sup>+</sup> T Regulatory Cells Selectively Accumulate in Human Ovarian Carcinomas to Limit Type I Immunity

Nassima Redjimi<sup>1</sup>, Caroline Raffin<sup>1</sup>, Isabelle Raimbaud<sup>1</sup>, Pascale Pignon<sup>1</sup>, Junko Matsuzaki<sup>3,4</sup>, Kunle Odunsi<sup>3,4</sup>, Danila Valmori<sup>1,2</sup>, and Maha Ayyoub<sup>1</sup>

### Abstract

Antitumor type I T-cell responses involving IFN- $\gamma$  production are critical to control cancer, but the efficacy of this response is limited by a variety of immunosuppressive mechanisms that promote tumoral immune escape. One critical mechanism involves the accumulation of FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells (Treg), a class of suppressive T cells that prevent excessive tissue destruction caused by unchecked immune responses. Recent studies have revealed that FOXP3<sup>+</sup> Treg include distinct subsets specifically controlling over the corresponding effector subset. In particular, CXCR3<sup>+</sup> Treg have been described as a subset specialized in the control of type I T-cell responses *in vivo*. Here, we show that CXCR3<sup>+</sup> Treg are highly enriched in human ovarian carcinomas, particularly in solid tumor masses, where they represent the majority of Treg. Tumor-associated CXCR3<sup>+</sup> Treg coexpress T-bet but do not secrete IFN- $\gamma$  *ex vivo* and suppress proliferation and IFN- $\gamma$  secretion of T effectors. In addition, they coexpress Helios, suggesting that they originate from natural Treg. Finally, we show that the proportion of CXCR3<sup>+</sup> Treg at tumor sites is directly correlated with that of CXCR3<sup>+</sup> T effectors, consistent with expression of CXCR3 ligands. Together, our findings support the concept that natural CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> Treg selectively accumulate in ovarian tumors to control type I T-cell responses, resulting in the collateral limitation of efficient antitumor immunity. *Cancer Res*; 72(17); 4351–60. ©2012 AACR.

### Introduction

Antitumor type I immune responses to human ovarian cancers have the potential to control disease progression, as the presence of intratumoral T cells, as well as the expression of IFN- $\gamma$ , have been reported to correlate with improved clinical outcome (1, 2). The clinical efficacy of type I immune responses in ovarian cancer, however, is limited by immune regulation mechanisms at the tumor site, including tumor-associated FOXP3<sup>+</sup> Treg, that are abundant, particularly in late-stage tumors, their frequency correlating with reduced survival (3–5). It has been reported that ovarian cancer-associated Treg express CCR4 and accumulate at tumor sites attracted by the CCR4 ligand CCL22, secreted by tumor cells and environmen-

tal macrophages. On the basis of these findings, it has been proposed that blockade of CCL22 may inhibit Treg trafficking into ovarian tumors (3, 6).

Recent studies have revealed a significant phenotypical and functional heterogeneity in FOXP3<sup>+</sup> Treg, similar to that found in conventional CD4<sup>+</sup> T cells. CD4<sup>+</sup> T-cell populations, both conventional and Treg, have been identified as to coexpress more than one lineage-specific transcription factor, exhibit hybrid features, and could represent differentiation intermediates and/or exert specialized functions, underlining the complexity and finesse of the immune response (7, 8). An emerging concept is that subpopulations of FOXP3<sup>+</sup> Treg coexpressing other lineage-specific transcription factors specifically control over the corresponding conventional effector subset (9). In this context, a recent study has identified, in mice, a subset of FOXP3<sup>+</sup> Treg expressing the T-helper (T<sub>H</sub>)1-associated chemokine receptor CXCR3 and the transcription factor T-bet (10). The subset is highly expanded during type I inflammation and exhibits homeostatic and migratory properties optimized for the suppression of T<sub>H</sub>1 responses *in vivo*. Lately, the existence of CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg has been shown in humans, both in healthy individuals and in patients with autoimmune diseases (11–13). However, the presence of CXCR3<sup>+</sup> Treg in tumors has not been addressed so far.

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes-Saint Herblain; <sup>2</sup>L'UNAM Université, Faculty of Medicine, University of Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>Department of Gynecologic Oncology, <sup>4</sup>Center for Immunotherapy, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

N. Redjimi and C. Raffin equally contributed to the study.

D. Valmori and M. Ayyoub share senior authorship.

**Corresponding Authors:** Danila Valmori, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U1102, Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44800 Nantes-Saint Herblain, France. Phone: 330240679725; Fax: 330240679763; E-mail: Danila.Valmori@univ-nantes.fr; and Maha Ayyoub. E-mail: Maha.Ayyoub@univ-nantes.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0579

©2012 American Association for Cancer Research.

### Materials and Methods

#### Patients and healthy donors samples

Surgical tumor specimens and peripheral blood samples were obtained from the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, NY) from patients with ovarian cancer upon approval by the

Institutional Review Board and signed informed consent. Tumor specimens were processed by mechanical dissection and single-cell suspensions were cryopreserved. Cells from ovarian cancer ascites were isolated by centrifugation and cryopreserved. Peripheral blood samples from healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang Pays de la Loire (Nantes, France) upon signed informed consent and approval by the Institutional Review Board. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient sedimentation using LSM 1077 lymphocyte separation medium (PAA Laboratories GmbH).

#### Cell purification, *ex vivo* phenotypic assessment, and cell sorting

CD4<sup>+</sup> T cells were enriched by positive selection from PBMC, single-cell suspensions from ovarian solid tumors or ascites, by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec). CD4<sup>+</sup> T cells were assessed phenotypically by staining with fluorochrome-labeled monoclonal antibody (mAb; from BD Biosciences, unless indicated otherwise) specific for CD4, CD45RA, CCR7, CD25 (Beckman Coulter), and CD127 together with mAb specific for CXCR3, CCR4, CCR6, FOXP3 (eBioscience), T-bet (eBioscience), and Helios (BioLegend), as indicated, and analyzed by flow cytometry (FACSARIA, BD Biosciences). For *ex vivo* flow cytometry cell sorting, enriched CD4<sup>+</sup> T cells were stained with fluorochrome-labeled mAb specific for CD8, CD4, CD45RA, CD25, CD127, CCR7, and CXCR3. After gating on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> lymphocytes, cells were separated into the indicated populations to high purity (>97%) by flow cytometry cell sorting (FACSARIA, BD Biosciences).

#### *In vitro* differentiation of NTreg and conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells

*Ex vivo*-sorted conventional naive CD4<sup>+</sup> T cells and NTreg ( $3 \times 10^4$  per well in 96-well U-bottom plates) were stimulated *in vitro* with anti-CD2/CD3/CD28-coated microbeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec) in the absence or presence of recombinant human (rh)IL-12 (10 ng/mL; R&D Systems) and rhIFN- $\gamma$  (20 ng/mL; R&D Systems) alone or in combination. Cells were maintained in culture in IMDM medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS containing rhIL-2 (100 IU/mL; Chiron). Aliquots of day 12 cultures were either stained with anti-CXCR3 mAb and analyzed by flow cytometry or assessed for cytokine production and transcription factors expression, following stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin, as well as for suppressive function, as detailed below.

#### Assessment of cytokine production, transcription factors expression, and suppressive function

Cytokine production by CD4<sup>+</sup> T-cell populations was assessed by intracellular staining after stimulation with PMA (100 ng/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (1  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich) during 4 and 6 hours for *in vitro*-stimulated cultures and *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells, respectively, as previously described (7, 14). Brefeldin A (10  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich) was added 1 hour after the beginning of the incubation. Cells were then

fixed, permeabilized, and stained with mAb specific for FOXP3, T-bet, Helios, and IFN- $\gamma$  and then analyzed by flow cytometry. The ability of *ex vivo*-sorted Treg from PBMC and from ovarian cancer tumors as well as *in vitro*-stimulated CD4<sup>+</sup> T-cell populations to suppress the growth of responder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells was assessed by coculture of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled responder conventional CD4<sup>+</sup> T cells with or without test populations in the presence of irradiated monocytes and phytohemagglutinin, as previously described (15, 16). Growth of responder cells was assessed by flow cytometric analysis of CFSE dilution in day 5 cultures. The growth (% divided cells) of the wells with test population (experimental group) was compared with that of the wells without test population (control). The percentage of suppression was determined as follows:  $100 - [(growth\ of\ experimental\ group / growth\ of\ control) \times 100]$ . In some experiments, to assess the ability of Treg to suppress IFN- $\gamma$  production by responder cells, IFN- $\gamma$  was measured in day 5 culture supernatants by ELISA (Invitrogen). The percentage of IFN- $\gamma$  production suppression was determined as follows:  $100 - [IFN-\gamma\ (ng/mL)\ in\ experimental\ group\ cultures / IFN-\gamma\ (ng/mL)\ in\ control\ cultures \times 100]$ .

#### Assessment of chemokines mRNA expression by PCR and migration assay

Human ovarian cancer cell lines SK-OV-3 and SK-OV-6 (kindly provided by Dr. Lloyd J. Old) and the human colon carcinoma cell line HT-29 (American Type Culture Collection) as well as monocytes (CD14<sup>+</sup>), enriched by positive selection from healthy donor PBMC by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec) were treated for 24 hours in the absence or presence of rhIFN- $\gamma$  (20 ng/mL) and rhTNF- $\alpha$  (50 ng/mL; R&D Systems) alone or in combination, as indicated. RNA was extracted from ovarian tumor specimens, cells isolated from tumor ascites, tumor cell lines, and monocytes using the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription of RNA was conducted using Promega Reverse Transcription System Kit (Promega). Quantitative PCR (qPCR) was carried out using a TaqMan assay on an ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) using assays-on-Demand Gene Expression probes for *CXCL10* (Hs00171042\_m1), *CCL22* (Hs01574247\_m1), and *ACTB* (Hs99999903\_m1; Applied Biosystems). Relative mRNA expression was calculated as  $2^{-(C_{t\_ACTB} - C_{t\_testgene})}$ . Conventional PCR was conducted using GoTaq Flexi DNA Polymerase Kit (Promega). cDNA integrity was tested by amplification of *ACTB* ( $\beta$ -actin) mRNA (15) and *CXCL10* and *CCL22* mRNA expression was assessed using previously validated primers (17, 18).

To assess the ability of T cells to migrate toward CXCL10, CXCR3<sup>+</sup>, and CXCR3<sup>-</sup>, MTreg and Mconv populations sorted from CD4<sup>+</sup> T cells of healthy donors were stimulated with plate-bound anti-CD3 and -CD28 mAb (BD Biosciences) and maintained in culture in the presence IL-2. Aliquots of day 10 cultures were stained with anti-CXCR3 mAb and analyzed by flow cytometry. Cells from day 10 cultures ( $5 \times 10^4$  per well) were added to the top chambers of 96-Transwell plates (Corning Costar; 5- $\mu$ m-pore polycarbonate filter) and culture medium containing or not CXCL10 (100 ng/mL; R&D Systems) was

added to the lower chambers. After 2-hour incubation at 37°C, cells were recovered from bottom chambers and counted by flow cytometry. The migration index for each population was calculated as the ratio of the number of cells that migrated in the presence of CXCL10 to that of cells that migrated in the absence of CXCL10.

**Results**

**CXCR3<sup>+</sup> Treg are the prevalent tumor-infiltrating Treg subset in ovarian carcinomas**

We initially assessed the proportions of CD4<sup>+</sup> Treg in T lymphocytes infiltrating ovarian tumor solid masses [tumor-infiltrating lymphocytes (TIL)] or isolated from tumor ascites [tumor-associated lymphocytes (TAL)], using anti-CD25 mAb in combination with anti-CD127 mAb as described (19). TIL contained high proportions of CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg, whereas the proportion of Treg in TAL was significantly lower and, in average, similar to that found in circulating CD4<sup>+</sup> T cells of patients or healthy donors (Fig. 1). Tumor Treg in both TAL and TIL exhibited a more differentiated phenotype as compared with coexisting CD25<sup>-</sup> conventional CD4<sup>+</sup> T cells (Tconv), and were, for the largest part, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> effector memory cells (Supplementary Fig. S1). We then evaluated the relative proportions of Treg expressing CXCR3, CCR4 or CCR6 by costaining with specific mAb. Similar to healthy donors, circulating memory Treg (MTreg) from patients contained in average 25% CXCR3<sup>+</sup> cells (Fig. 2A and B). Strikingly, we found that the majority of MTreg in TIL were CXCR3<sup>+</sup>. The proportion of CXCR3<sup>+</sup> MTreg was lower in TAL than in TIL but was, in average, significantly higher than in circulating CD4<sup>+</sup> T cells. It is noteworthy that CXCR3<sup>+</sup> cells were also highly enriched in CD25<sup>-</sup> conventional memory CD4<sup>+</sup> T cells

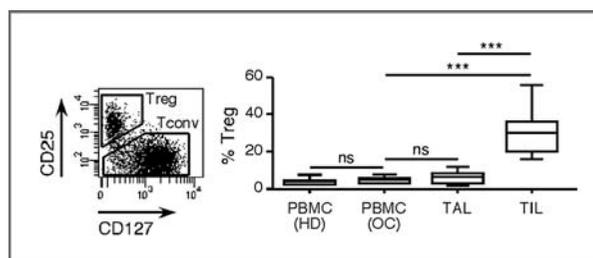


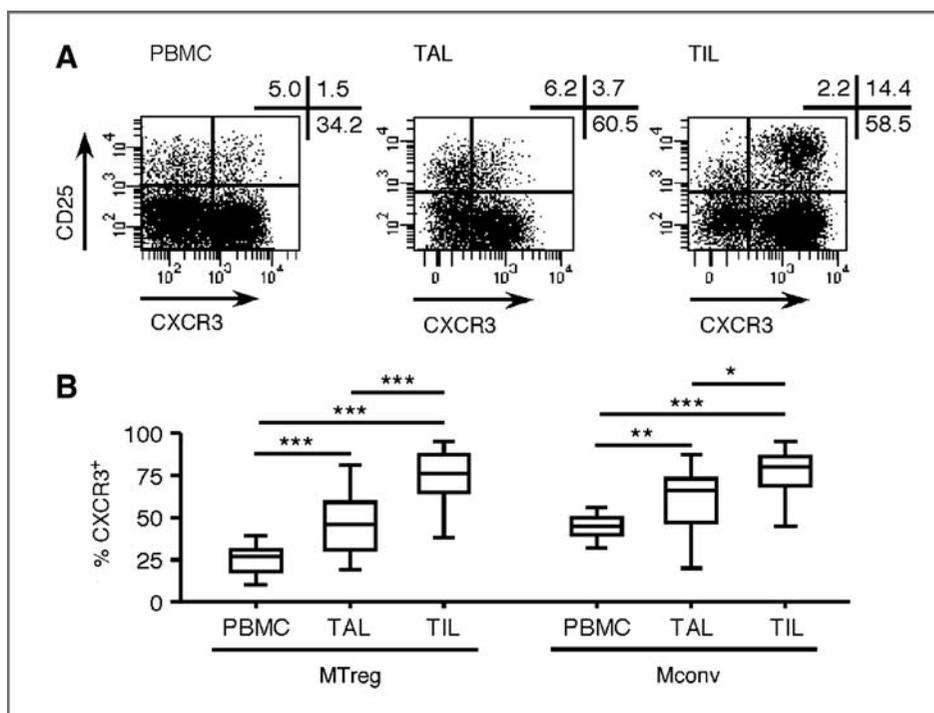
Figure 1. CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg accumulate in ovarian tumors. CD4<sup>+</sup> T cells isolated from healthy donors' (HD) and patients' with ovarian cancer (OC) PBMC as well as from OC TAL and TIL were stained with anti-CD4, anti-CD25, and anti-CD127 mAb, and analyzed by flow cytometry. CD25<sup>-</sup> conventional CD4<sup>+</sup> T cells (Tconv) and CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg were analyzed as shown in the representative dot plot corresponding to CD4<sup>+</sup> T cells from TAL. Data corresponding to the percentage of Treg in CD4<sup>+</sup> T cells from HD PBMC (n = 15), OC PBMC (n = 15), OC TAL (n = 17), and OC TIL (n = 12) are shown. Statistical analyses were conducted using a 2-tailed t test. \*\*\*, P < 0.001. ns, not significant.

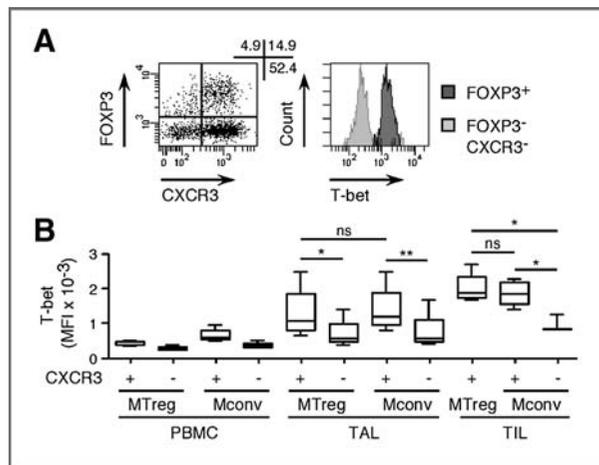
(Mconv) from TAL and TIL as compared with circulating CD4<sup>+</sup> T cells. In contrast, the proportion of MTreg expressing CCR4 in TIL was lower than in circulating CD4<sup>+</sup> T cells and TAL (Supplementary Fig. S2A). The proportion of MTreg expressing CCR6 in TAL and TIL was also lower than in circulating CD4<sup>+</sup> T cells (Supplementary Fig. S2B). Thus, CXCR3<sup>+</sup> Treg, and not CCR4<sup>+</sup> Treg or CCR6<sup>+</sup> Treg, were enriched in T lymphocytes infiltrating ovarian carcinomas.

**CXCR3<sup>+</sup> Treg in ovarian tumors express T-bet but do not secrete IFN-γ and are highly suppressive ex vivo**

Expression of CXCR3 in T<sub>H</sub>1 is associated to that of the transcription factor T-bet (10). To assess whether, and to what extent, FOXP3<sup>+</sup> Treg expressing CXCR3 also expressed T-bet,

Figure 2. MTreg in ovarian tumors are highly enriched in CXCR3<sup>+</sup> cells. CD4<sup>+</sup> T cells isolated from ovarian cancer patients' PBMC as well as from ovarian cancer TAL and TIL were stained with CD4-, CD45RA-, CCR7-, CD25-, CD127-, and CXCR3-specific mAb, and analyzed by flow cytometry. A, dot plots gated on memory (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+/+</sup>- and CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells show CXCR3 expression with respect to that of CD25 in representative PBMC, TAL, and TIL samples. B, the proportions of CXCR3<sup>+</sup> cells in memory CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg (MTreg) and memory conventional CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (Mconv) from ovarian cancer patients' PBMC (n = 14) and ovarian cancer TAL (n = 16) and TIL (n = 12) are summarized in box and whiskers plots. Statistical analyses were conducted using a 2-tailed t test. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.





**Figure 3.** Ovarian cancer CXCR3<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> MTreg express the T<sub>H</sub>1 lineage-specific transcription factor T-bet *ex vivo*. CD4<sup>+</sup> T cells isolated from TAL and TIL were stained with CD45RA-, CCR7-, CD25-, CD127-, FOXP3-, CXCR3-, and T-bet-specific mAb and analyzed by flow cytometry. A, left, dot plot for one representative TIL sample showing FOXP3 and CXCR3 expression gated on total memory CD4<sup>+</sup> T cells. Right, expression of T-bet in the indicated populations, defined according to the expression of CXCR3 and FOXP3. B, mean fluorescence intensity (MFI) of T-bet staining in CXCR3<sup>+</sup> and CXCR3<sup>-</sup> MTreg (FOXP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup>) and Mconv (FOXP3<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) populations is summarized for all PBMC ( $n = 4$ ), TAL ( $n = 4$ ) and TIL ( $n = 4$ ) assessed. Statistical analyses were conducted using a 2-tailed *t* test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . ns, not significant.

we conducted a combined analysis of CD25, CD127, FOXP3, T-bet, and CXCR3 expression in TIL and TAL samples, by combined surface and intranuclear staining with specific mAb. As expected, we found that the large majority of CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> cells in TIL and TAL were FOXP3<sup>+</sup> (Supplementary Fig. S3A) whereas very low proportions of FOXP3<sup>+</sup> cells were contained in the CD25<sup>-</sup> population. The proportions of CXCR3<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells in TAL and TIL (Supplementary Fig. S3B) were therefore similar to those of CXCR3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> cells (Fig. 2). CXCR3<sup>+</sup> MTreg in ovarian tumors expressed T-bet *ex vivo* (Fig. 3A). The expression levels of T-bet in tumor-associated CXCR3<sup>+</sup> MTreg were similar to those found in the coexisting CXCR3<sup>+</sup> Mconv populations and were higher in TIL than in TAL (Fig. 3B). FOXP3 and T-bet, however, control distinct transcriptional programs that can result in opposite effects. Namely, whereas T-bet directs IFN- $\gamma$  secretion, FOXP3 instead suppresses IFN- $\gamma$  production. To address the functional consequences of FOXP3 and T-bet coexpression in tumor Treg, we stimulated CD4<sup>+</sup> T cells isolated from tumors *ex vivo* with PMA and ionomycin and assessed the secretion of IFN- $\gamma$  with respect to the expression of FOXP3 and T-bet. As illustrated in Fig. 4A, Mconv in the tumors contained large proportions of IFN- $\gamma$ -secreting cells *ex vivo*. However, tumor-associated FOXP3<sup>+</sup> Treg, despite high expression of T-bet, failed, for the largest part, to secrete IFN- $\gamma$ . To further assess CXCR3<sup>+</sup> Treg functionally, we isolated them *ex vivo*, from PBMC and ovarian cancer tumors, by flow cytometric cell sorting, and stimulated them in the presence of CFSE-labeled responder CD4<sup>+</sup> T cells. As shown in Fig. 4B and C, CXCR3<sup>+</sup> Treg from PBMC and ovarian cancer tumors suppressed proliferation and IFN- $\gamma$

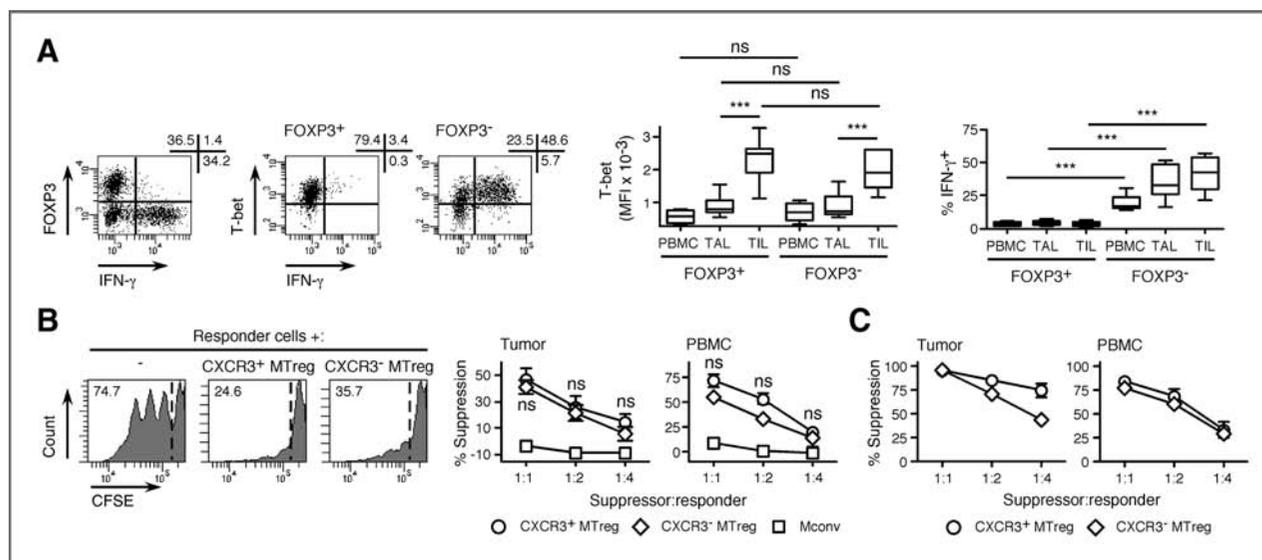
production of stimulated responder T cells as efficiently as CXCR3<sup>-</sup> Treg. In addition, it is noteworthy that CXCR3<sup>+</sup> Treg suppressed proliferation of both CXCR3<sup>+</sup> and CXCR3<sup>-</sup> responder T cells (Supplementary Fig. S4). Together, these results indicate that CXCR3<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells that accumulate at sites of ovarian carcinomas have full functional characteristics of Treg, as they do not secrete IFN- $\gamma$  and exert vigorous suppressive functions *ex vivo*.

### CXCR3<sup>+</sup> Treg coexpress the natural Treg marker Helios *ex vivo* and are efficiently generated from natural naive Treg stimulated under T<sub>H</sub>1 priming conditions

FOXP3<sup>+</sup> Treg include natural Treg, generated as such in the thymus, and adaptive Treg, generated in the periphery from conventional CD4<sup>+</sup> T cells after exposure to Ag (20). The 2 subsets have been long considered as phenotypically identical, but it has been recently inferred that expression of Helios, a transcription factor of the Ikaros family, can distinguish natural from adaptive Treg (21). To get insight into the origin of Treg in ovarian tumors, natural or adaptive, we assessed expression of Helios in tumor Treg by costaining CD4<sup>+</sup> T cells isolated *ex vivo* from tumors with FOXP3- and Helios-specific mAb. This revealed that the large majority of FOXP3<sup>+</sup> Treg in TAL and TIL was Helios<sup>+</sup> (Fig. 5A). Costaining with CXCR3-, FOXP3-, and Helios-specific mAb confirmed high expression of Helios in CXCR3<sup>+</sup> Treg in TAL and TIL (Fig. 5B) suggesting that the latter are, for the most part, natural Treg. To further address whether tumor-associated CXCR3<sup>+</sup> Treg may originate from natural Treg, we isolated NTreg, a population of human natural naive (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) FOXP3<sup>+</sup> Treg, that we have previously identified (15) from CD4<sup>+</sup> T cells of healthy donors, *ex vivo* by cell sorting (Fig. 6A), and stimulated them, along with naive conventional CD4<sup>+</sup> T cells (Nconv), under neutral [interleukin (IL)-2 only] or T<sub>H</sub>1 polarizing conditions, in the presence of IFN- $\gamma$  and IL-12, alone or in combination. As summarized in Fig. 6B, expression of CXCR3 was induced in a large fraction of NTreg and in a lower fraction of Nconv by stimulation in the presence of IL-2, was increased in Nconv by IFN- $\gamma$ , and was increased in both NTreg and Nconv by IL-12, alone or with IFN- $\gamma$ . Expression of T-bet was induced by IL-12 alone or with IFN- $\gamma$ , but not by IFN- $\gamma$  alone, in NTreg and Nconv. It is noteworthy that a large fraction of NTreg stimulated in the presence of IL-12 alone or with IFN- $\gamma$  remained FOXP3<sup>+</sup> and Helios<sup>+</sup> and acquired T-bet but remained IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> (Fig. 6C) and suppressive (Fig. 6D). Thus, stimulation of NTreg under T<sub>H</sub>1 conditions resulted in the efficient induction of CXCR3<sup>+</sup> Treg, similar to those found in ovarian tumors, namely coexpressing high levels of FOXP3, T-bet, and Helios, unable to secrete IFN- $\gamma$  and endowed with suppressive capacity.

### The proportion of CXCR3<sup>+</sup> Treg in ovarian carcinomas is directly related to that of CXCR3<sup>+</sup> T effectors and is consistent with the expression of CXCR3 ligands

Expression of CXCR3 in tumor MTreg suggested that this population is chemoattracted at tumor sites associated with type I inflammation by CXCR3 ligands, to control type I T effectors. By assessing isolated CXCR3<sup>-</sup> and CXCR3<sup>+</sup> Treg, we

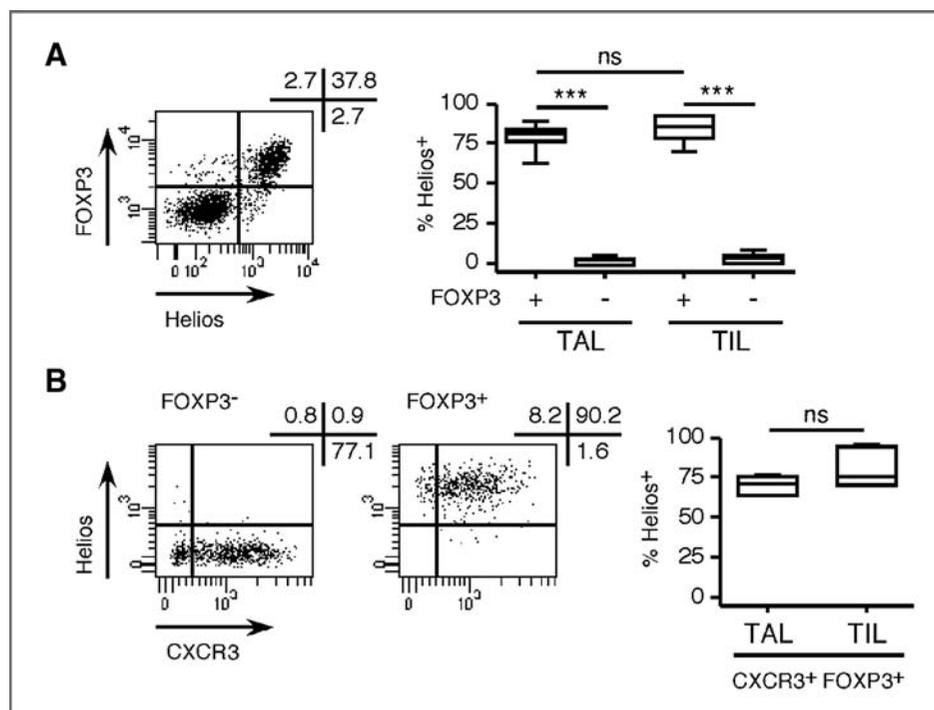


**Figure 4.** Ovarian cancer FOXP3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> MTreg do not produce IFN- $\gamma$  and are highly suppressive *ex vivo*. **A**, CD4<sup>+</sup> T cells from ovarian cancer TAL and TIL were stimulated for 6 hours with PMA and ionomycin, stained with CD4<sup>+</sup>, FOXP3<sup>-</sup>, CD127<sup>-</sup>, IFN- $\gamma$ , and T-bet-specific mAb, and analyzed by flow cytometry. IFN- $\gamma$  production is shown for a representative TIL with respect to FOXP3 expression gated on total CD4<sup>+</sup> cells in the left dot plot and with respect to T-bet expression gated on FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>-</sup> cells, as indicated, in the middle and right dot plots. The mean fluorescence intensity (MFI) of T-bet staining and the proportions of cells producing IFN- $\gamma$  in MTreg and Mconv from PBMC ( $n = 6$ ), TAL ( $n = 15$ ), and TIL ( $n = 10$ ) are summarized in the box and whiskers plots. Statistical analyses were conducted using a 2-tailed *t* test. \*\*\*,  $P < 0.001$ . **B**, CD4<sup>+</sup> T cells from PBMC ( $n = 3$ ), TAL ( $n = 3$ ), and TIL ( $n = 1$ ) were stained with CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, CD25<sup>-</sup>, CD127<sup>-</sup>, and CXCR3-specific mAb, CXCR3<sup>+</sup> and CXCR3<sup>-</sup> MTreg and total Mconv populations were sorted by flow cytometry and cocultured with CFSE-labeled conventional CD4<sup>+</sup> T cells, at the indicated suppressor-to-responder cell ratios, in the presence of irradiated monocytes and phytohemagglutinin. CFSE dilution was assessed in day 5 cultures by flow cytometry. Histograms show CFSE dilution in the absence or presence of the indicated test populations at 1:1 ratio (numbers in histograms correspond to the percentage of divided cells) and percentage suppression, calculated as detailed in Materials and Methods section, is shown for all test populations and ratios assessed. Statistical analyses were conducted using a 2-tailed *t* test to compare, at each suppressor-to-responder cell ratio, CXCR3<sup>+</sup> and CXCR3<sup>-</sup> MTreg. **C**, IFN- $\gamma$  was measured by ELISA in day 5 supernatants of cultures assessed as in **B**. Percentage suppression of responder cells' IFN- $\gamma$  production by the indicated MTreg populations was calculated as detailed in Materials and Methods section. ns, not significant.

confirmed that, similar to T<sub>H</sub>1 cells, the latter efficiently migrate toward the CXCR3 ligand CXCL10 (Supplementary Fig. S5). It was therefore of interest to assess the presence of CXCR3<sup>+</sup> MTreg in ovarian tumors in relation to that of CXCR3<sup>+</sup> T effectors and of CXCL10. We found that the proportion of CXCR3<sup>+</sup> MTreg in both TIL and TAL was directly related to that of coexisting CXCR3<sup>+</sup> Mconv (Fig. 7A), supporting the concept that these 2 populations are co-attracted at tumor sites by CXCR3 ligands. We obtained similar results by assessing the relationship between T-bet expression levels in MTreg and Mconv in TIL and TAL (Fig. 7A). We then assessed the expression of CXCL10, that is induced by IFN- $\gamma$ , by conventional and qPCR, using specific primers. We found no significant expression of CXCL10 in normal ovarian tissue (Fig. 7B and C) but detected high expression in CD14<sup>+</sup> monocytes and ovarian cancer cell lines after stimulation with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . In addition, we detected significant expression of CXCL10 in the majority of ovarian tumors both in solid tumor masses (11 of 12) and in ascites-associated cells (13 of 15). Thus, expression of CXCR3 ligands in ovarian tumors, induced by type I cytokines, was consistent with the recruitment of CXCR3<sup>+</sup> T effectors and Treg at tumor sites. It is noteworthy that we detected expression of the CCR4 ligand CCL22 only in a minority of samples (3 of 15 ascites and 1 of 12 tumors, Supplementary Fig. S6A and B).

## Discussion

FOXP3<sup>+</sup> Treg have emerged as potent immunosuppressive cells in cancer, raising considerable expectations about the possibility to therapeutically target them to boost antitumor immunity. Recently, however, it has become increasingly appreciated that Treg are a complex population, composed, similar to conventional CD4<sup>+</sup> T cells, of various subpopulations that differentiate and migrate in response to signals from the immune milieu to exert specialized functions (22). For example, Treg expressing CD103 and CCR4 migrate to and are retained in the skin, and deletion of these molecules in Treg results in the development of skin-specific autoimmunity (23, 24). Loss of CCR7 prevents Treg migration to the lymph nodes and impairs their protective function in experimental colitis (25), and expression of CCR6 by Treg is indispensable for their recruitment at sites of T<sub>H</sub>17-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE; ref. 26). Expression of IRF4, involved in controlling T<sub>H</sub>2 differentiation and IL-4 production, has been shown to be required for Treg-mediated control of T<sub>H</sub>2-type inflammation (8). Similarly, it has been shown that Treg expressing CXCR3 and T-bet accumulate at sites of T<sub>H</sub>1-type inflammation and that T-bet-deficient Treg cells fail to control IFN- $\gamma$ -producing T<sub>H</sub>1 cells when transferred into FOXP3-deficient scurfy mice (10). From these studies, a model is emerging in which Treg subsets expressing



**Figure 5.** Ovarian cancer CXCR3<sup>+</sup> Treg express the transcription factor Helios *ex vivo*. **A**, CD4<sup>+</sup> T cells from ovarian cancer TAL and TIL were stained with CD4-, FOXP3-, and Helios-specific mAb and analyzed by flow cytometry. Expression of FOXP3 and Helios in one TIL is shown in the dot plot gated on CD4<sup>+</sup> T cells and the proportions of Helios<sup>+</sup> cells in FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from all TAL ( $n = 15$ ) and TIL ( $n = 10$ ) assessed are summarized in the box and whiskers plot. **B**, CD4<sup>+</sup> T cells from TAL and TIL were stained with CD4-, CD45RA-, CCR7-, CXCR3-, CD127-, FOXP3-, and Helios-specific mAb and analyzed by flow cytometry. Examples of dot plots showing expression of Helios and CXCR3 gated on FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>-</sup> populations, as indicated, are shown for one TIL. The proportions of Helios<sup>+</sup> cells in CXCR3<sup>+</sup> MTreg from TAL ( $n = 4$ ) and TIL ( $n = 5$ ) are shown. Statistical analyses were conducted using a 2-tailed *t* test. \*\*\*,  $P < 0.001$ . ns, not significant.

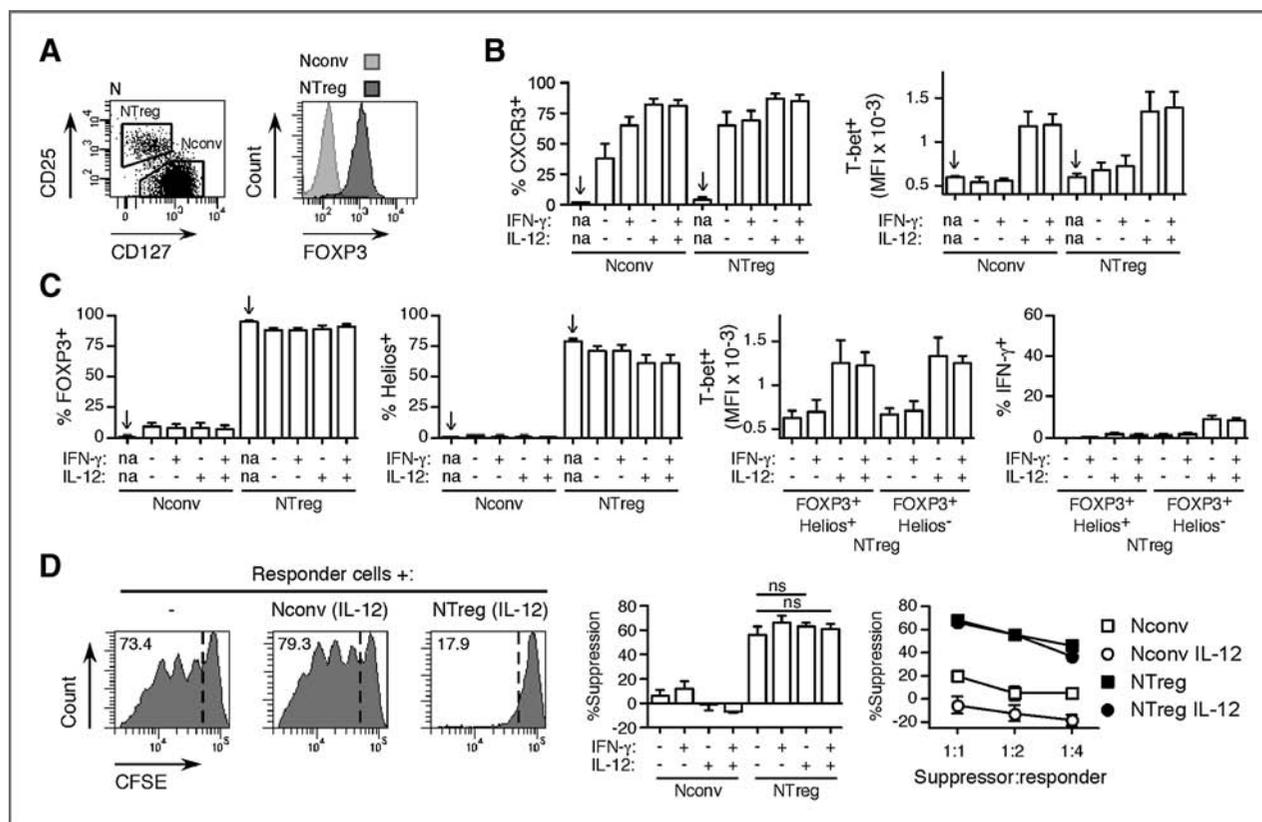
T<sub>H</sub> lineage-specific chemokine receptors and transcription factors specifically suppress the corresponding T<sub>H</sub> subset, likely through complex mechanisms involving differential modulation of migration, homeostasis, and function. An important implication of this concept in cancer is that the subset of Treg that suppress T<sub>H</sub>1-type immune responses, associated with efficient antitumor responses, should be specifically targeted to enhance antitumor immunity.

A previous study from Curiel and colleagues has documented the accumulation of Treg in human ovarian cancer along with their association with poor clinical outcome (3). In support of the relevance of Treg in ovarian tumors, we found highly increased proportions of Treg in TIL as compared with the periphery. The frequency of Treg in TAL, however, was lower and, in our sample group, not significantly different from the periphery. A major finding of our study is that CXCR3<sup>+</sup> Treg are the prevalent subset of tumor-infiltrating FOXP3<sup>+</sup> Treg in ovarian cancer. Namely, whereas CXCR3<sup>+</sup> Treg constitute, in average, 1 of 4 circulating memory Treg, they are significantly enriched in TAL and represent the large majority of Treg in TIL *ex vivo*, indicating that this particular Treg subset selectively accumulates in ovarian tumors. The study from Curiel and colleagues reported that tumor-associated Treg express CCR4 and accumulate in ovarian tumors attracted by the CCR4 ligand CCL22, produced by ovarian cancer cells and tumor-associated macrophages. We found, however, lower propor-

tions of CCR4<sup>+</sup> than CXCR3<sup>+</sup> Treg in ovarian tumors, particularly in TIL, and less frequent expression of CCL22 than of CXCL10.

Along with increased proportions of CXCR3<sup>+</sup> Treg in ovarian tumors, we found high proportions of CXCR3<sup>+</sup> Mconv, supporting the concept that ovarian tumors are predominantly associated with a T<sub>H</sub>1-type inflammatory milieu. A recent study using a murine model of lethal infection with *Toxoplasma gondii* has shown that the strong T<sub>H</sub>1 environment triggered by the infection impaired Treg through several mechanisms, including their conversion into T<sub>H</sub>1-like effectors, expressing T-bet and secreting IFN- $\gamma$  (27). We found, however, that tumor-associated CXCR3<sup>+</sup> Treg express high levels of T-bet but do not secrete IFN- $\gamma$  (or other inflammatory cytokines, not shown) *ex vivo* and strongly inhibit proliferation and IFN- $\gamma$  production of Tconv, showing that they fully maintain their suppressive capacity in the ovarian cancer environment. It is noteworthy that an important role in the subversion of Treg during *T. gondii* infection is played by decreased production of IL-2 that is crucial for Treg homeostasis. We found, however, that tumor-associated Mconv contain significant proportions of cells secreting IL-2 (not shown), which may explain the ability of Treg to survive and maintain their phenotype in the ovarian cancer environment.

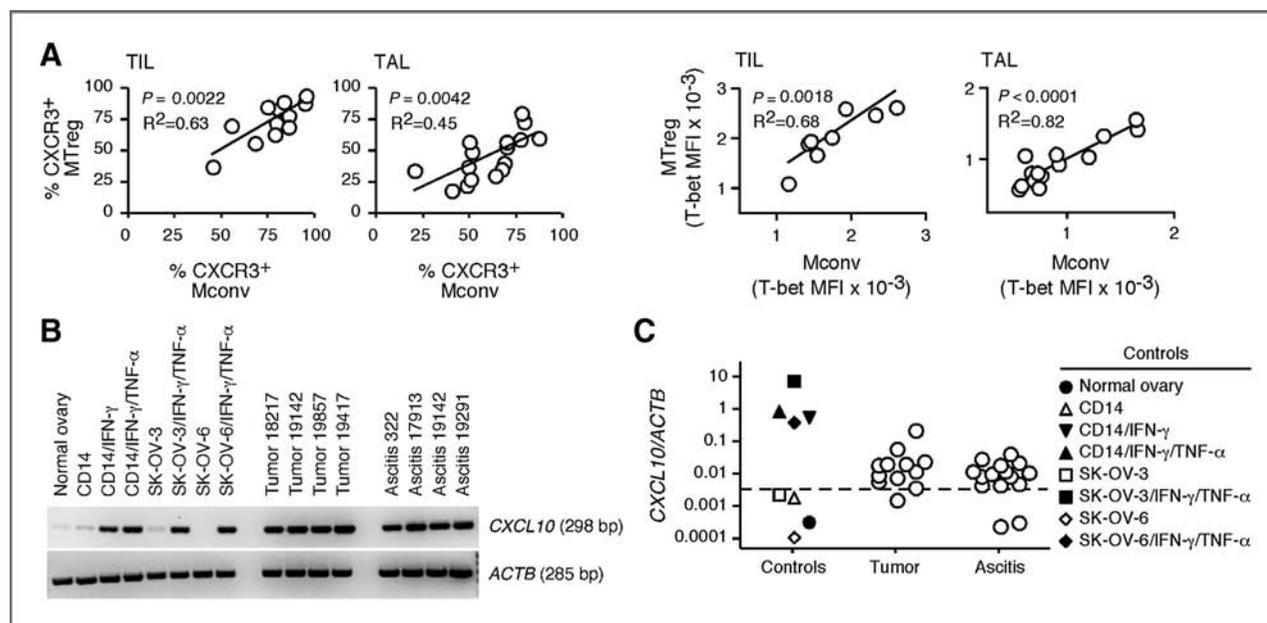
The finding that CXCR3<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> Treg are the main Treg subset in ovarian tumors prompted us to address their origin,



**Figure 6.** CXCR3<sup>+</sup> Treg can be generated from NTreg *in vitro* by stimulation under T<sub>H</sub>1 polarizing conditions. **A**, CD4<sup>+</sup> T cells from HD PBMC were stained with CD4-, CD45RA-, CCR7-, CD25-, and CD127-specific mAb, and naive (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells were sorted into NTreg and Nconv populations according to CD25 and CD127 expression as shown in the dot plot. An aliquot of CD4<sup>+</sup> T cells was additionally stained with anti-FOXP3 mAb. Expression of FOXP3 gated on NTreg and Nconv is shown in the overlaid histogram plots. **B**, sorted populations were stimulated *in vitro* with anti-CD2/3/28-coated beads in the absence or presence of IL-12 and IFN-γ, alone or in combination, and cultured in the presence of IL-2. Aliquots of day 12 cultures were either stained with anti-CXCR3 mAb or stimulated with PMA and ionomycin for 4 hours and stained with anti-T-bet mAb and analyzed by flow cytometry. CXCR3 and T-bet expression was also assessed *ex vivo* in the sorted populations. The proportions of cells expressing CXCR3 and the mean fluorescence intensity (MFI) of T-bet staining are shown for all populations, *ex vivo* (□) and in the indicated culture conditions (*n* = 4; mean ± SEM). n.a., nonapplicable. **C**, cultures obtained as in **B** were stimulated in the presence of PMA and ionomycin, stained with FOXP3-, Helios-, T-bet-, and IFN-γ-specific mAb, and analyzed by flow cytometry. The proportions of FOXP3<sup>+</sup> and Helios<sup>+</sup> cells are shown for all populations, *ex vivo* (□) and in the indicated culture conditions (*n* = 4; mean ± SEM). The proportions of IFN-γ-producing cells and the MFI of T-bet staining of Helios<sup>+</sup> or Helios<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> cells in NTreg cultures are summarized (*n* = 4; mean ± SEM). **D**, the suppressive capacity of cells in the cultures obtained as in **B** was assessed, as in Fig. 4B, by coculture with CFSE-labeled responder CD4<sup>+</sup> T cells. Percent suppression is summarized for all donors (*n* = 3; mean ± SEM) at 1:1 suppressor-to-responder cell ratio for all culture conditions (middle) and at the indicated suppressor-to-responder cell ratios for cells stimulated in the absence or presence of IL-12 (right). Statistical analyses were conducted using a 2-tailed *t* test. ns, not significant.

from natural Treg, generated in the thymus, or adaptive Treg, generated in the periphery from Tconv. Previous studies addressing the origin of tumor-associated Treg in mouse models have suggested that both Treg types can contribute to tumor-specific tolerance (28–30). Analysis of the T-cell receptor (TCR) repertoires of tumor-infiltrating Treg and Tconv in murine carcinogen-induced tumors, however, has revealed a minor overlapping between the 2 TCR repertoires, suggesting that Treg and Tconv arise from different populations with unique TCR repertoires (31). In addition, in support of the concept that most Treg in tumors are thymically derived, in a mouse model of glioblastoma multiforme, thymectomy before tumor implantation highly decreased the number of Treg infiltrating brain tumors (32). The relative contribution of the natural and adaptive subsets to Treg populations infiltrating human cancers has remained unexplored, mainly because

of the lack of specific markers that distinguish them. Recently, however, expression of Helios, a transcription factor of the Ikaros family, has been proposed to differentiate thymically derived from peripherally induced Treg (21). We found that tumor CXCR3<sup>+</sup> Treg express high levels of Helios, suggesting that they are natural Treg. In line with this conclusion, we found that stimulation of NTreg under T<sub>H</sub>1 conditions results in the efficient induction of CXCR3 and T-bet. In addition, similar to Treg in ovarian cancers, a large proportion of NTreg differentiated under T<sub>H</sub>1 polarizing conditions were FOXP3<sup>+</sup> and Helios<sup>+</sup>, did not secrete IFN-γ, and were highly suppressive. Together, these data are in line with the previous conclusions from the study of Koch and colleagues that CXCR3<sup>+</sup> Treg controlling type I inflammatory responses are derived from CXCR3<sup>-</sup> T-bet<sup>-</sup> FOXP3<sup>+</sup> natural Treg precursors and not peripherally induced from naive CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> T cells (10).



**Figure 7.** The proportion of CXCR3<sup>+</sup> Treg correlates with that of CXCR3<sup>+</sup> T effectors in ovarian cancer tumors and is consistent with CXCL10 expression. A, scatter plots and linear regression of the correlation between the proportion of CXCR3<sup>+</sup> cells in MTTreg and Mconv as well as the MFI of T-bet staining in MTTreg and Mconv from both TIL and TAL. B and C, CXCL10 mRNA expression was assessed by conventional PCR (B) and qPCR (C) in normal ovarian tissue, in ovarian cancer tumors and ascitis-associated cells, as well as in CD14<sup>+</sup> cells from healthy donors' PBMC and ovarian cancer tumor cell lines (SK-OV-3 and SK-OV-6), treated or not with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

Lately, however, it has been argued that expression of Helios may also be induced following activation by Ag, depending on specific conditions (33–35). Thus, although we did not observe significant induction of Helios or FOXP3 expression in Nconv in our *in vitro* differentiation system, additional studies comparing the TCR repertoire or/and the antigen specificity of Treg and Tconv in ovarian tumors will be of interest to further support the conclusion that tumor-associated Treg originate from natural Treg.

We found that both CXCR3<sup>+</sup> Treg and CXCR3<sup>+</sup> Tconv were enriched at ovarian tumor sites and, consistently, detected frequent expression of the CXCR3 ligand CXCL10 in ovarian tumors. Together, our data depict a scenario in which CXCR3<sup>+</sup> Treg migrate and accumulate in ovarian tumors in response to type I inflammation, to control it, which collaterally results in the limitation of type I antitumor immunity. It is noteworthy that, in line with our findings, a study from Wolf and colleagues, that independently of Curjel and colleagues (3) confirmed the correlation between FOXP3 expression and survival in ovarian cancer, also found FOXP3 expression, unexpectedly, to positively correlate with expression of T<sub>H</sub>1-associated factors, and in particular the IFN- $\gamma$ -regulated gene *IRF-1* (4). Whereas the same group had previously documented a positive correlation between high IFN- $\gamma$  expression and survival in ovarian cancer (2), the study showed that in patients with high IFN- $\gamma$  expression, a subgroup with concomitant high FOXP3 expression was characterized by a significantly inferior overall survival.

Together, the findings reported in the present study confirm the relevance of Treg in human ovarian cancers. However, they also make it indispensable to modify the current paradigm concerning this population, particularly with respect to

approaches aimed at interfering with Treg-mediated suppression of antitumor immunity (36). First, our data showing that CCR4<sup>+</sup> Treg are less frequent than CXCR3<sup>+</sup> Treg, particularly in solid tumor masses, make it unlikely that CCL22 blockade alone, as proposed (3, 6), would suffice to prevent the recruitment of Treg in ovarian tumor tissues. Targeting CXCR3 would simultaneously prevent the recruitment of T effectors in tumors and would, therefore, be equally inadequate. Second, the finding that the large majority of Treg in ovarian tumors are Helios<sup>+</sup>, and therefore, could mostly correspond to natural and not to induced Treg, has also several implications. Indeed, if tumor Treg are mostly natural Treg, approaches aimed at interfering with peripheral conversion of Tconv into Treg, such as those targeting for example the indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) pathway, would not give the expected results, although the same pathways may also affect natural Treg (36–38). On the other hand, because natural Treg are believed to be self-reactive and should be distinct from tumor-specific T effectors, in terms of TCR repertoire and antigen specificity, combined approaches aimed at depleting Treg concomitant with elicitation or reinforcement of tumor antigen-specific T-cell responses with highly immunogenic cancer vaccines (39–41) could be particularly promising in ovarian cancer. Finally, further assessment of tumor-associated CXCR3<sup>+</sup> Treg may reveal specific "Achilles' heels" of this population that will, hopefully, help the selection of new approaches for their therapeutic targeting to improve the clinical outcome of patients with ovarian cancers.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Authors' Contributions

**Conception and design:** D. Valmori, M. Ayyoub

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** K. Odunsi

**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** N. Redjimi, C. Raffin, K. Odunsi, D. Valmori, M. Ayyoub

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** D. Valmori, M. Ayyoub

**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** I. Raimbaud, P. Pignon, J. Matsuzaki

**Study supervision:** D. Valmori, M. Ayyoub

**Carried out the experiments:** N. Redjimi, C. Raffin

## References

- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203–13.
- Marth C, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Deibl M, Doppler W, et al. Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1598–605.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.
- Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:8326–31.
- Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18538–43.
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006;6:295–307.
- Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Boley G, et al. Human memory FOXP3<sup>+</sup> Treg secrete IL-17 *ex vivo* and constitutively express the TH17 lineage-specific transcription factor RORγt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8635–40.
- Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, deRoos P, Kim JM, Chu TT, et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature* 2009;458:351–6.
- Barnes MJ, Powrie F. Hybrid Treg cells: steel frames and plastic exteriors. *Nat Immunol* 2009;10:563–4.
- Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 2009;10:595–602.
- McClymont SA, Putnam AL, Lee MR, Esensten JH, Liu W, Hulme MA, et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Immunol* 2011;186:3918–26.
- Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-like, Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med* 2011;17:673–5.
- Hoerning A, Koss K, Datta D, Boneschansker L, Jones CN, Wong IY, et al. Subsets of human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3. *Eur J Immunol* 2011;41:2291–302.
- Valmori D, Raffin C, Raimbaud I, Ayyoub M. Human RORγt<sup>+</sup> TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3<sup>+</sup> Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:19402–7.
- Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Treg. *J Clin Invest* 2005;115:1953–62.
- Raffin C, Raimbaud I, Valmori D, Ayyoub M. *Ex vivo* IL-1 receptor type I expression in human CD4<sup>+</sup> T cells identifies an early intermediate in the differentiation of Th17 from FOXP3<sup>+</sup> naive regulatory T cells. *J Immunol* 2011;187:5196–202.
- Schweyer S, Soruri A, Baumhoer D, Peters J, Cattaruzza M, Radzun HJ, et al. Expression of CXC chemokine IP-10 in testicular germ cell tumours. *J Pathol* 2002;197:89–97.
- Berin MC, Dwinell MB, Eckmann L, Kagnoff MF. Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1217–26.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701–11.
- Curto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30:626–35.
- Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* 2010;184:3433–41.
- Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11:119–30.
- Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* 2007;204:1335–47.
- Dudda JC, Perdue N, Bachtanian E, Campbell DJ. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *J Exp Med* 2008;205:1559–65.
- Schneider MA, Meingassner JG, Lipp M, Moore HD, Rot A. CCR7 is required for the *in vivo* function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2007;204:735–45.
- Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008;181:8391–401.
- Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, et al. Decrease of Foxp3<sup>+</sup> Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 2009;31:772–86.
- Zhou G, Levitsky HI. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol* 2007;178:2155–62.
- Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-β. *J Immunol* 2007;178:2883–92.
- Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res* 2006;66:4488–95.
- Hindley JP, Ferreira C, Jones E, Lauder SN, Ladell K, Wynn KK, et al. Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. *Cancer Res* 2011;71:736–46.
- Wainwright DA, Sengupta S, Han Y, Lesniak MS. Thymus-derived rather than tumor-induced regulatory T cells predominate in brain tumors. *Neuro Oncol* 2011;13:1308–23.
- Verhagen J, Wraith DC. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells". *J Immunol* 2010;185:7129; author reply 7130.
- Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011;6:e24226.

## Grant Support

The study was supported by the Ovarian Cancer Working Group of the Cancer Research Institute (USA) and the Fondation de France (France). C. Raffin is supported through a fellowship from the Ligue Contre le Cancer (France).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received February 16, 2012; revised July 4, 2012; accepted July 6, 2012; published OnlineFirst July 12, 2012.

35. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2012;188:976–80.
36. Colombo MP, Piconese S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:880–7.
37. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005;11:312–9.
38. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 2001;7:1118–22.
39. Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol* 2011;33:369–83.
40. Berraondo P, Nouze C, Preville X, Ladant D, Leclerc C. Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. *Cancer Res* 2007;67:8847–55.
41. Valmori D, Souleimanian NE, Tosello V, Bhardwaj N, Adams S, O'Neill D, et al. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8947–52.

## Supplementary figures legends

**Supplementary figure S1.** Assessment of the differentiation stage of Treg and Tconv from PBMC and OC tumors. CD4<sup>+</sup> T cells isolated from HD and OC patients' PBMC as well as from OC TAL and TIL were stained with CD3, CD4, CD45RA, CCR7, CD25 and CD127 specific mAb and analyzed by flow cytometry. The proportion of naïve (N, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), central memory (CM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), effector memory (EM, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) and effector (E, CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) cells in Treg and Tconv, defined as in Figure 1, is shown for CD4<sup>+</sup> T cells from HD PBMC (n=15), OC patients' PBMC (n=15), TAL (n=17) and TIL (n=12).

**Supplementary figure S2.** OC MTreg contain lower proportions of CCR4<sup>+</sup> and CCR6<sup>+</sup> cells than peripheral MTreg. CD4<sup>+</sup> T cells isolated from OC patients' PBMC as well as from OC TAL and TIL were stained with CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127, CCR4 and CCR6 specific mAb and analyzed by flow cytometry. Dot plots gated on total memory (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+/-</sup> and CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells from a TIL sample show CCR4 (A) and CCR6 (B) expression with respect to that of CD25. The proportions of CCR4<sup>+</sup> (A) and CCR6<sup>+</sup> (B) cells in MTreg and Mconv from OC patients' PBMC (n=15) and OC TAL (n=16) and TIL (n=12) are summarized in box and whiskers plots. Statistical analyses were performed using a two-tailed *t*-test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

**Supplementary figure S3.** CXCR3<sup>+</sup> MTreg in ovarian tumors express FOXP3. CD4<sup>+</sup> T cells isolated from OC TAL (n=4) and TIL (n=5) were stained with CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127, CXCR3 and FOXP3 specific mAb and analyzed by flow cytometry. A, Dot plots gated on total memory (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+/-</sup> and

CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells from a TAL sample show CD127 and FOXP3 expression with respect to that of CD25. The proportions of FOXP3<sup>+</sup> cells in MTreg and Mconv from OC TIL and TAL are summarized in box and whiskers plots. B, Dot plots gated on total memory (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+/-</sup> and CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> T cells from a TAL sample show CXCR3 expression with respect to that of CD25 and of FOXP3. The proportions of CXCR3<sup>+</sup> cells in FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>-</sup> populations from OC TIL and TAL are summarized in box and whiskers plots.

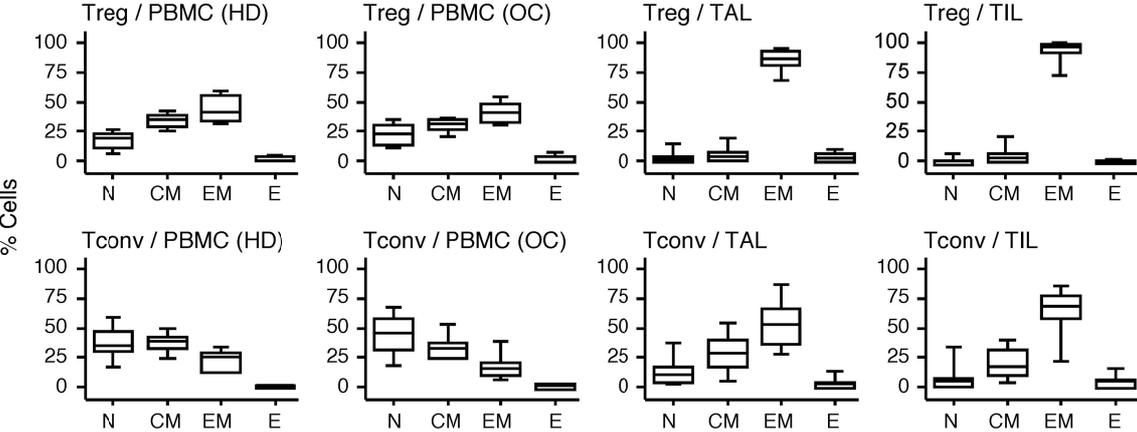
**Supplementary figure S4.** CXCR3<sup>+</sup> MTreg can suppress the proliferation of both CXCR3<sup>+</sup> and CXCR3<sup>-</sup> effector cells. CD4<sup>+</sup> T cells from HD PBMC (n=3) were stained with CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127 and CXCR3 specific mAb and sorted by flow cytometry into CXCR3<sup>+</sup> and CXCR3<sup>-</sup> MTreg and Mconv or total Mconv populations. Sorted CXCR3<sup>+</sup> and CXCR3<sup>-</sup> MTreg and total Mconv populations were co-cultured with CFSE-labeled CXCR3<sup>+</sup> or CXCR3<sup>-</sup> Mconv at 1:1 suppressor-to-responder cell ratio, in the presence of irradiated monocytes and PHA. CFSE-dilution was assessed in day 5 cultures by flow cytometry. Percent suppression, calculated as detailed in the Methods section, is shown for all test populations (mean ± SEM).

**Supplementary figure S5.** CXCR3<sup>+</sup> MTreg efficiently migrate toward CXCL10. CD4<sup>+</sup> T cells from HD PBMC (n=3) were stained with CD4, CD45RA, CCR7, CD25, CD127 and CXCR3 specific mAb and sorted by flow cytometry into CXCR3<sup>+</sup> and CXCR3<sup>-</sup> MTreg and Mconv populations. Sorted populations were stimulated with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 mAb in the presence of IL-2. A, Aliquots of day 10 cultures were stained with anti-CXCR3 mAb and analyzed by flow cytometry. Examples of CXCR3 staining are shown in the histogram plot and MFI of CXCR3 staining is

summarized for all populations (mean  $\pm$  SEM). B, Day 10 cultures were assessed for migration toward CXCL10. Migration index, calculated as detailed in the Methods section, is summarized for all populations (mean  $\pm$  SEM). Statistical analyses were performed using a two-tailed *t*-test. \*\*\*  $P < 0.001$ .

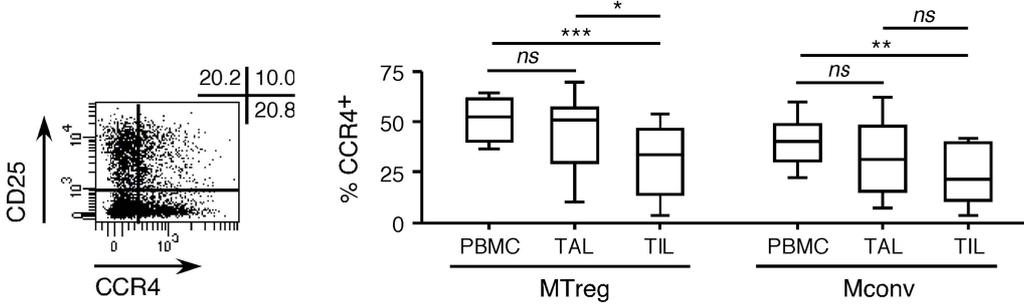
**Supplementary figure S6.** Expression of CCL22 in OC tumors. *CCL22* mRNA expression was assessed by conventional PCR (A) and qPCR (B) in normal ovarian tissue, in OC tumors and ascitis-associated cells, as well as in the colon carcinoma cell line HT29 and the OC cell lines SK-OV-3 and SK-OV-6, treated or not with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , as indicated.

Supplementary figure S1

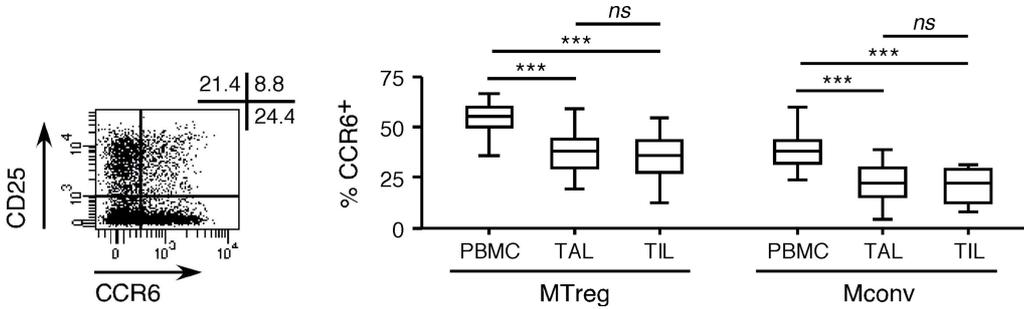


Supplementary figure S2

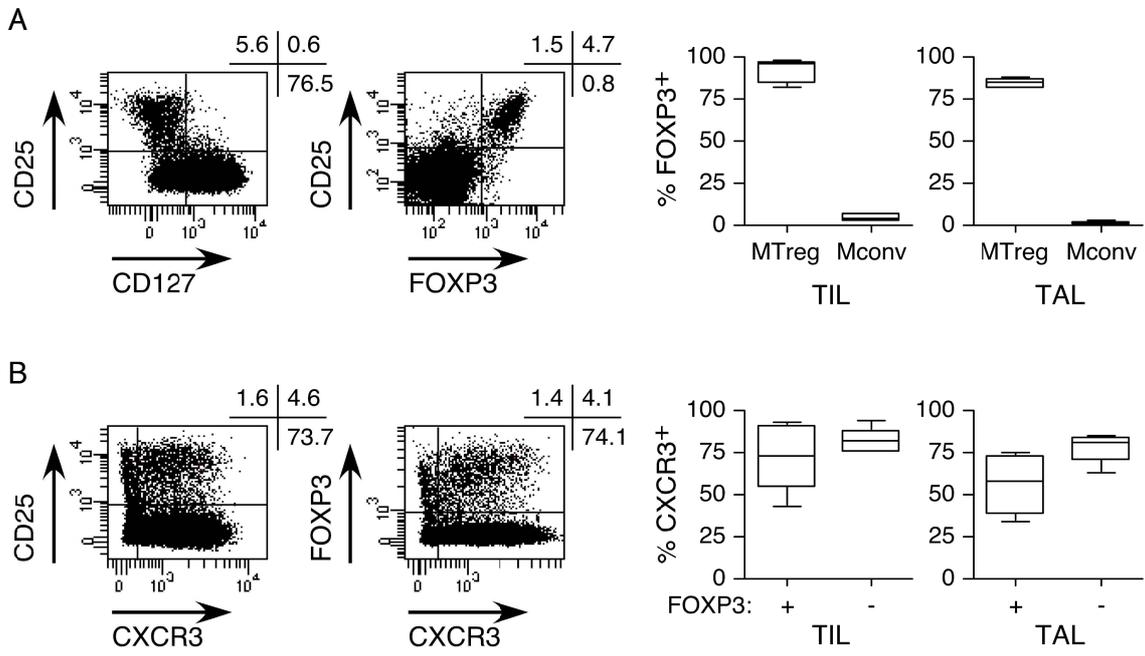
A



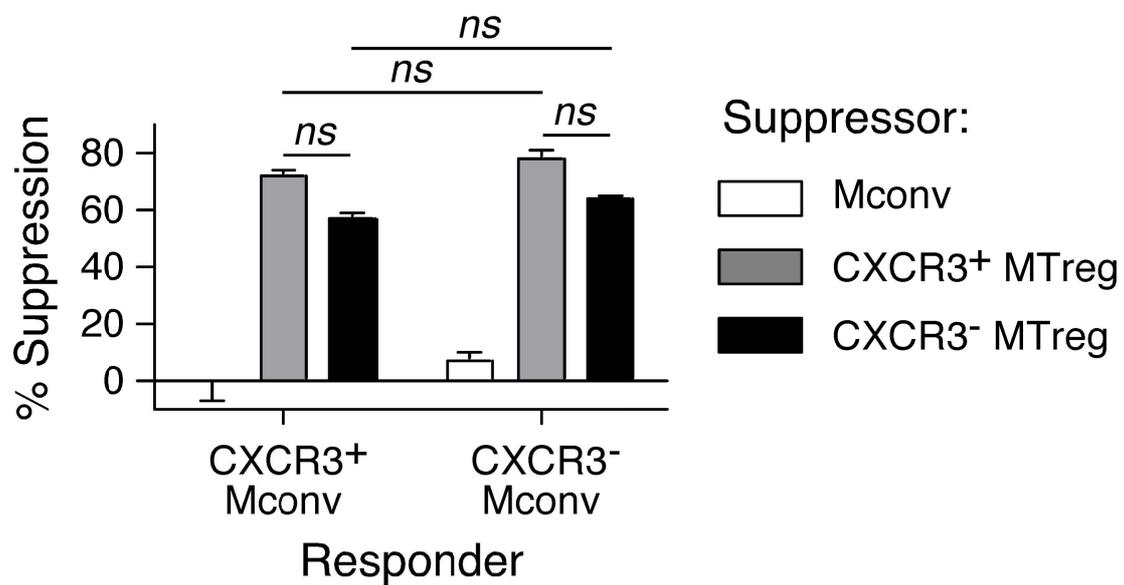
B



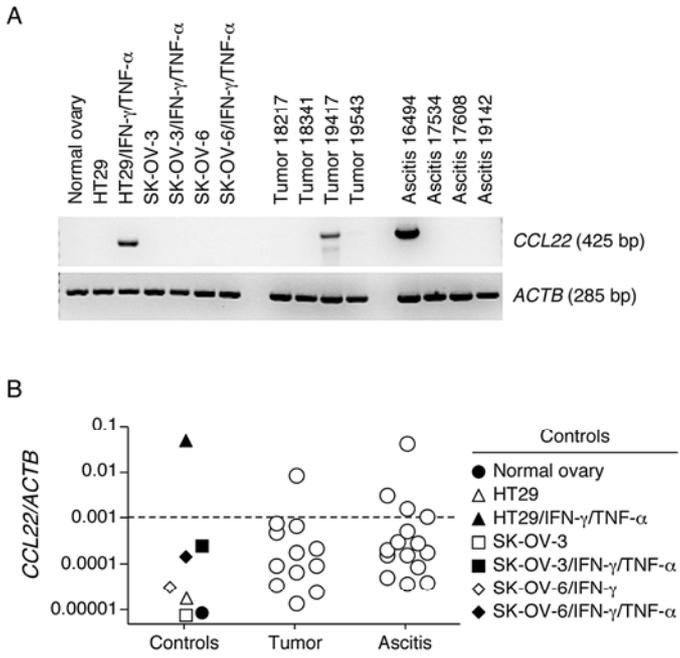
Supplementary figure S3



Supplementary figure 4

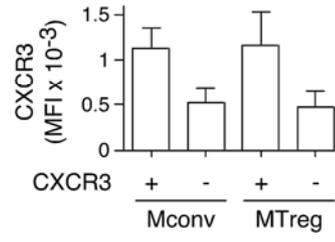
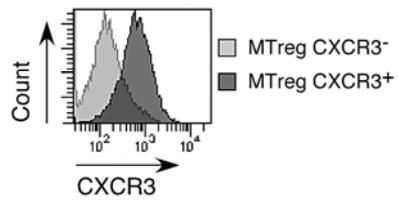


Supplementary figure 5

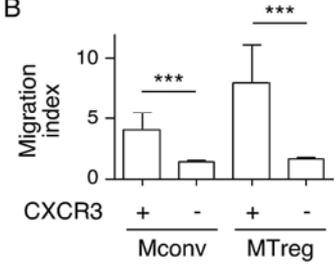


Supplementary Figure 6

A



B



## LES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> : RELATION AVEC LES LYMPHOCYTES T<sub>H</sub>17 ET IMPLICATION DANS LES CANCERS HUMAINS

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs (Treg) sont essentiels pour maintenir la tolérance au soi ainsi que pour limiter les réponses immunitaires exagérées. Les Treg ont initialement été définis comme une population homogène de cellules CD25<sup>+</sup> et FOXP3<sup>+</sup>. Il a ensuite été montré que la population était hétérogène, incluant notamment des populations générées dans le thymus, dites naturelles (nTreg), ainsi que d'autres dérivées dans la périphérie, dites induites (iTreg). Ces deux populations étaient, au début de ma thèse, décrites comme étant phénotypiquement indistinguables, ce qui limitait leur analyse. L'objectif de ma thèse a ainsi été d'étudier l'hétérogénéité des Treg humains. Nous avons dans un premier temps approfondi l'étude de la relation entre les Treg et une population de cellules T CD4<sup>+</sup> auxiliaires appelées T<sub>H</sub>17 et montré que l'expression du récepteur de l'IL-1 (IL-1RI), *ex vivo*, identifiait, parmi les Treg, un intermédiaire précoce dans une voie de différenciation allant des Treg naïfs aux T<sub>H</sub>17. Puis, nous avons montré que l'expression de l'IL1RI, en combinaison avec celle de CCR7, caractérisait une sous-population n'exprimant pas Helios, associé aux nTreg, mais qui exprimait Aiolos, associé aux iTreg et aux T<sub>H</sub>17. L'utilisation de ces marqueurs permet désormais de distinguer, parmi les lymphocytes T circulants humains, les iTreg des nTreg, et également de les isoler et ainsi d'approfondir leur étude. Enfin, en caractérisant les Treg infiltrant la tumeur dans le cancer épithélial de l'ovaire, nous avons montré que la population principale de Treg dans ces sites était de type Helios<sup>+</sup>, donc probablement nTreg, et exprimait CXCR3 et T-bet, qui sont associés aux T<sub>H</sub>1.

**Mots clés** : Immunorégulation, Treg, T<sub>H</sub>17, Différenciation, IL-1RI, Helios, Cancer, CXCR3.

## CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> REGULATORY T CELLS: RELATIONSHIP WITH T<sub>H</sub>17 CELLS AND ASSESSMENT IN HUMAN CANCERS

Regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (Treg) are essential to maintain self-tolerance and to limit exuberant immune responses. Treg were initially defined as a homogenous population composed of cells expressing CD25 and FOXP3. However, it was later shown that this population is, in fact, heterogeneous notably including subsets generated in the thymus, called natural Treg (nTreg), or derived in the periphery, called induced Treg (iTreg). These two populations were, at the beginning of my thesis, described as phenotypically undistinguishable. Therefore, the aim of my thesis was to study the heterogeneity of the human Treg compartment, namely by characterizing and comparing nTreg and iTreg. To this end, I first explored the relationship between Treg and a population of pro-inflammatory CD4<sup>+</sup> helper T cells called T<sub>H</sub>17. I demonstrated that the *ex vivo* expression of IL-1 receptor type I (IL-1RI) identifies, among Treg, an early intermediate along a differentiation pathway leading from naïve Treg to T<sub>H</sub>17. I then showed that the expression IL-1RI, in combination with that of CCR7, characterizes, *ex vivo*, a subset of Treg that do not express the transcription factor Helios, associated with nTreg, but express Aiolos, associated with iTreg and T<sub>H</sub>17. Thus, the use of these markers now allows to distinguish, among human circulating T cells, iTreg from nTreg, as well as to isolate and further assess them. Finally, by characterizing tumor-infiltrating Treg in epithelial ovarian cancer, I could show that the main Treg population at these tumor sites is Helios<sup>+</sup>, suggesting a natural origin, and expresses CXCR3 and T-bet, both associated with T<sub>H</sub>1 cells.

**Keywords**: Immune regulation, Treg, T<sub>H</sub>17, Differentiation, IL-1RI, Helios, Cancer, CXCR3.