



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par

Cécile APERT

Le 02 décembre 2019

Titre :

L'IL-2 et l'IL-15 façonnent le développement
thymique des lymphocytes T régulateurs

École doctorale et discipline ou spécialité

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche

UMR 1043 INSERM – Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP)

Directrice(s) ou Directeur(s) de Thèse

Pr. Joost VAN MEERWIJK

Jury

Pr. Maha AYYOUB

Président du jury

Pr. Stéphanie HUGUES

Rapporteur

Dr. Magali IRLA

Rapporteur

Dr. Bruno LUCAS

Rapporteur

Sommaire

SOMMAIRE	1
RESUME	4
ABSTRACT	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	6
LISTE DES ABREVIATIONS	7
REMERCIEMENTS	9
AVANT-PROPOS	17
INTRODUCTION	20
I. LES TREGS EN PERIPHERIE	20
1. LA TOLÉRANCE	21
2. LES TREGS	23
A. <i>Découverte des lymphocytes T régulateurs</i>	23
B. <i>Découverte de foxp3</i>	23
3. HÉTÉROGÉNÉITÉ DES TREGS EN PÉRIPHÉRIE	25
A. <i>Diversité des mécanismes effecteurs des Tregs</i>	26
Molécules régulatrices des cellules présentatrices d'antigènes	28
Induction d'une mort cellulaire par les Tregs	28
Les cytokines immunosuppressives	30
Rôle des Tregs dans des processus non immunologiques	31
Modulations de l'environnement métabolique par les Tregs	32
Importance relative du mécanisme de déprivation en IL-2 par les Tregs	32
B. <i>Diversité des mécanismes nécessaires au maintien du potentiel immunosuppresseur des Tregs</i>	33
Hétérogénéité des facteurs de transcription important pour la fonction des Tregs	34
Importance des différents TNFR pour le potentiel immunosuppresseur des Tregs	35
C. <i>Les Tregs tissulaires</i>	36
Les Tregs de la peau	38
Les Tregs du tissu adipeux vicéral (VAT-Treg)	38
Les Tregs du muscle	38
Une population de tTregs du côlon	39
Les Tregs dans les tumeurs	39
Origines et imprinting des Tregs tissulaires	40
D. <i>Réponses Tregs "type-spécifique" (Th1, Th2, Th17 et Tfr)</i>	42
Réponses Treg de type 1	44
Réponses Treg de type 2	45
Réponses Treg de type 3	45
Les Tfr	46
E. <i>Quelle est l'origine de l'hétérogénéité des Tregs en périphérie</i>	47

II. CHOIX DE LIGNAGE TREG	48
1. MODÈLE STOCHASTIQUE VS. INSTRUCTIF	48
2. DE LA MOELLE OSSEUSE AU THYMUS.....	50
3. DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE T GÉNÉRAL : DN1-4, DP, SP	50
A. <i>Choix de lignage : $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$</i>	51
B. <i>Possibilité d'un engagement dans le lignage Treg au stade DN2</i>	52
4. SÉLECTION POSITIVE.....	53
5. CHOIX DE LIGNAGE CD4/CD8	54
6. SÉLECTION NÉGATIVE	57
A. <i>Migration des thymocytes du cortex vers la médulla</i>	57
B. <i>Présentation antigénique et composition cellulaire de la médulla</i>	59
C. <i>Anergie, délétion ou différenciation en Treg ?</i>	61
7. SORTIE DU THYMUS	64
III. DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS.....	65
1. PRÉCURSEURS POTENTIELS DES TREGS	65
A. <i>Les précurseurs $CD25^+Foxp3^-$</i>	65
B. <i>Les pré-précurseurs $CD122^+CD25^-Foxp3^-$</i>	65
C. <i>Les précurseurs $CD25^-Foxp3^+$</i>	66
2. SIGNAUX NÉCESSAIRES AU DÉVELOPPEMENT TREG	66
A. <i>Signal 1 : TCR</i>	67
B. <i>Signal 2 : co-stimulation</i>	69
Nécessité d'un signal via CD28 pour le développement des Treg.....	69
Contribution de CD27 au développement Treg	71
Contribution de CD40 au développement Treg	71
Contribution de CTLA-4 au développement Treg.....	71
Un signal de costimulation à double tranchant	72
C. <i>Signal 3 : cytokines</i>	73
Interleukine-2 & Interleukine 15	74
Les autres γc -cytokines.....	75
Transforming Growth Factor beta.....	76
Autres signaux : Les TNFR.....	77
3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA DIFFÉRENCIATION DES TREGS.....	78
A. <i>Expression de Foxp3</i>	78
Structure du gène Foxp3 : les différents CNS.....	79
Contrôle de l'expression de Foxp3 par les signaux développementaux reçus par les Tregs.....	80
B. <i>Cofacteurs de Foxp3</i>	83
C. <i>Régulation négative de Foxp3</i>	84
D. <i>Mécanismes indépendants de Foxp3 pour le développement Treg</i>	85
4. EPIGÉNÉTIQUE & DÉVELOPPEMENT DES TREGS	86

A.	<i>Modifications épigénétiques induites par le signal TCR et de costimulation</i>	86
B.	<i>Modifications épigénétiques induites par les cytokines</i>	87
C.	<i>Satb1</i>	87
5.	IMPLICATION DU STROMA THYMIQUE DANS LE DÉVELOPPEMENT TREG	89
6.	CONCLUSION & OBJECTIFS : UNE HÉTÉROGÉNÉITÉ AU SEIN DES TTREGS ?	93
RÉSULTATS		99
RÉSULTATS ANNEXES		145
DISCUSSION		158
	DÉPENDANCE À L'IL-2 OU L'IL-15 DES TTREGS EN DÉVELOPPEMENT	159
	L'EXEMPLE DES TREGS CD25 ⁺ ET CD25 ⁻	160
	L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES TREGS THYMIQUES	161
	RELEVANCE PHYSIOPATHOLOGIQUE D'UNE HÉTÉROGÉNÉITÉ THYMIQUE DES TREGS	164
	QUELS PARALLÈLES POSSIBLES POUR LE DÉVELOPPEMENT DES TTREGS HUMAINS ?	165
ANNEXES		172
BIBLIOGRAPHIE		183

Résumé

Cécile APERT

L'IL-2 et l'IL-15 façonnent le développement des lymphocytes T régulateurs thymiques

Directeur de Thèse : Pr. Joost van Meerwijk

Les lymphocytes T régulateurs exprimant le facteur de transcription Foxp3 (Treg) jouent un rôle majeur dans le contrôle des différents types des réponses immunitaires. Leur rôle est crucial puisqu'une absence totale de Treg chez la souris ou chez l'humain entraîne des pathologies auto-immunes létales, respectivement Scurfy and IPEX. Les Tregs sont également impliqués dans d'autres processus tels que la réparation tissulaire, le contrôle des inflammations chroniques et la tolérance fœto-maternelle et présentent de ce fait une hétérogénéité fonctionnelle. Certaines de ces spécifications fonctionnelles sont acquises en périphérie mais des données de la littérature suggèrent qu'une hétérogénéité des Tregs apparaît dès leur développement dans le thymus. Durant celui-ci, les précurseurs des Tregs interagissent avec des cellules stromales thymiques. Celles-ci expriment des complexes CMH:peptide reconnus par les précurseurs des Tregs grâce à leur récepteur à l'antigène, le TCR, et délivrent d'autres signaux, par exemple cytokiniques, nécessaires au développement des Tregs. Mon projet de thèse a visé à étudier les effets respectifs de deux interleukines, l'IL-2 et de l'IL-15, sur le développement des différentes sous-populations de Tregs. Après avoir confirmé l'importance quantitative de ces cytokines pour le développement des Tregs, nous nous sommes intéressés à l'aspect qualitatif de celui-ci. J'ai effectué des analyses de cytométrie et transcriptomiques (CITEseq) sur les Tregs en développement les plus matures afin de dresser l'inventaire détaillé des différentes sous-populations des Tregs thymiques. Mes résultats montrent une diversité fonctionnelle des Tregs en développement bien plus importante que celle rapportée dans la littérature. De plus, mes données suggèrent un besoin différent en IL-2 et IL-15 pour le développement des sous-populations de Tregs identifiées. Nos analyses par séquençage à haut débit du répertoire des TCR exprimé par les Tregs qui se développent en absence d'IL-2 ou d'IL-15, ont montré des répertoires partiellement différents des Tregs. Différentes sous-populations de Treg, avec des répertoires TCR et des besoins en cytokines distincts, se développent donc dans le thymus. A terme, la compréhension des implications exactes de ces sous-populations dans les différentes fonctions exercées par les Tregs permettra de les cibler dans le cadre du traitement de pathologies dans lesquelles le système immunitaire joue un rôle central, telles que les pathologies auto-immunes, l'inflammation chronique, le rejet des allogreffes et le cancer.

Abstract

Cécile APERT

IL-2 and IL-15 shape regulatory T cell development in the thymus

Directeur de Thèse : Pr. Joost van Meerwijk

Regulatory T cells that express the transcription factor Foxp3 (Treg) play a major role in controlling different types of immune responses. Their role is crucial since a total absence of Treg in mice or humans leads to lethal autoimmune pathologies, respectively Scurfy and IPEX. Tregs are also involved in other processes such as tissue repair, chronic inflammation control and maternal fetal tolerance and thus present a functional heterogeneity. Some of these functional specifications are acquired in the periphery but some data from the literature suggest that this Treg heterogeneity appears as soon as they develop in the thymus. During their development, the Treg precursors interact with thymic stromal cells which express MHC:peptide complexes recognized by Treg precursors through their antigen receptor, TCR, and deliver other signals, for example cytokines, necessary for the development of Tregs. My thesis project aimed to study the effects of two interleukins, IL-2 and IL-15, on the development of different Treg subpopulations. After having confirmed the quantitative importance of these cytokines for the development of Tregs, we were interested in the qualitative aspect of this one. I performed cytometry and transcriptomic analyzes (CITEseq) on the most mature developing Tregs in order to draw up a detailed inventory of the different subpopulations of thymic Tregs. My results show a functional diversity of developing Tregs, much larger than the one reported in the literature. In addition, my data suggest a different need for IL-2 and IL-15 for the development of the identified Treg subpopulations. Our high throughput sequencing analyzes of the TCR repertoire expressed by Tregs that develop in the absence of IL-2 or IL-15, showed partially different Treg repertoires. Therefore, we showed that different Treg subpopulations, with different TCR repertoires and cytokine requirements, develop in the thymus. In the long term, understanding the exact implications of these subpopulations in the various functions exercised by the Tregs will help to target them in order to treat diseases in which the immune system plays a central role, such as autoimmune diseases, chronic inflammation, allograft rejection, and cancer.

Table des illustrations

FIGURE 1 MÉCANISMES IMMUNOSUPPESSEURS DES TREGS.....	27
FIGURE 2 MAINTIEN DU POTENTIEL IMMUNOSUPPESSEUR DES TREGS.....	34
FIGURE 3 DIFFERENCES TRANSCRIPTOMIQUES DES TREGS TISSULAIRES.....	37
FIGURE 4 DIFFERENTS SOUS-TYPES DE TREGS.....	44
FIGURE 5 ÉTAPES DE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES T.....	49
FIGURE 6 CHOIX DE LIGNAGE DES LYMPHOCYTES ENTRE T $\alpha\beta$ ET T $\gamma\delta$	52
FIGURE 7 CHOIX DE LIGNAGE DES LYMPHOCYTES ENTRE LYMPHOCYTES T CD4 ET CD8.....	56
FIGURE 8 CHOIX DE LIGNAGE ENTRE DELETION ET DIFFERENCIATION EN LYMPHOCYTES T REGULATEURS BASE SUR LA FORCE DU SIGNAL TCR.....	63
FIGURE 9 SIGNAUX NÉCESSAIRES AU DÉVELOPPEMENT DES TREGS.....	67
FIGURE 10 CYTOKINES PARTAGEANT LA CHAÎNE G DANS LEUR RECEPTEUR ET SIGNALISANT PAR STAT5.....	74
FIGURE 11 CONSTRUCTION DU GÈNE FOXP3 ET SIGNAUX NÉCESSAIRES À SA RÉGULATION.....	81
FIGURE 12 RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT DES TREGS.....	88
FIGURE 13 POPULATIONS CELLULAIRES IMPLIQUÉES DANS LE DÉVELOPPEMENT DES TREGS.....	90
TABLE 1 TOLÉRANCE INDUITE PAR LES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE INNÉ.....	22
TABLE 2 AUTRES MÉCANISMES DE TOLÉRANCE DES LYMPHOCYTES T ET B.....	25
TABLE 3 COMPARAISON DES DEUX RÉGULATEURS DE TRANSCRIPTION, AIRE ET FEZF2.....	60

Liste des abréviations

AMP	Adénosine MonoPhosphate
Areg	Amphiréguline
ATP	Adénosine TriPhosphate
Breg	Lymphocyte B régulateur
CCR	Chemokine Receptor
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNS	Conserved Non-coding Sequence
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
cTEC	Cellules Epithéliales Thymiques corticales
cTr	Treg central
DC	Cellule Dendritique
DN	Cellule Double Négative
DP	Cellule Double Positive
DTX	Toxine Diphtérique
EAE	Experimental Autoimmune Encéphalomyelitis
ETP	Early Thymic Progenitor
eTr	Treg effecteur
Foxp3	Forkhead box P3
GFP	Green Fluorescent Protein
IL-X	Interleukine X
IDO	Indolamine 2,3 Dioxygénase
IFN γ	Inteféron gamma
KO	Knock out
MAIT	Mucosal-Associated Invariant T cells
MO	Moelle Osseuse
mTEC	Cellules Epithéliales Thymiques médullaires
NKT	Natural Killer T cells
NOD	Non Obese Diabetic
Nrp1	Neuropilin 1
pDC	Cellule Dendritique Plasmacytoïde

pTa	Pre-TCR alpha
Rag	Recombination activating gene
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
S1P1	Sphingosine-1-Phosphate Receptor1
SP	Cellule Simple Positive
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tconv	Lymphocyte T conventionnel
TGFβ	Transforming Growth Factor bêta
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
Treg-SE	Super Enhancer Treg
TSA	Tissue Specific Antigen
TSDR	Treg-specific demethylated region
TSP	Thymic Seeding Progenitor
tTreg	Treg thymique
VAT	Viceral Adipose Tissue
TCR	T Cell Récepteur
Treg	Lymphocyte T régulateur

Remerciements

Pour commencer, je voudrais remercier toutes les personnes du centre qui ont, chacune à sa façon, contribué à m'aider durant ces 5 années de Master et de Thèse à progresser pour devenir celle que je suis aujourd'hui. Je suis arrivée dans le centre avec l'envie naïve de devenir « chercheur » et un enthousiasme certain pour la science. Aujourd'hui, grâce à vous tous, j'ai pu transformer cette vision naïve de la recherche en quelque chose d'un peu plus réaliste (même si je rêve toujours !) avec ses bons comme ses moins bons côtés et avec une motivation nouvelle de persévérer dans cette voie.

J'aimerais tout particulièrement, et en premier lieu, remercier mon chef de laboratoire, directeur de thèse, Professeur John...Joost (pardon !) van Meerwijk de m'avoir guidée jusqu'ici. Vous m'avez énormément appris, autant scientifiquement qu'humainement. Je garderai précieusement en mémoire nos discussions scientifiques et philosophiques, parfois un mélange des deux (et même celles sur lesquelles nous n'étions pas d'accord). Grâce à vous, j'ai, je l'espère, emmagasiné le bagage nécessaire pour affronter la suite. Merci encore !

Durant une bonne partie de ma thèse, j'ai eu le plaisir de côtoyer Paola, durant les réunions, dans les couloirs, mais aussi à la paillasse, car Paola était partout ! Merci pour vos nombreux conseils, votre soutien moral durant les moments difficiles, votre vision claire de la science (et des gens !) et surtout merci pour vos petites attentions que je retrouvais sur le bureau certains matins (Kakis, kiwis du jardin et j'en passe). Vous serez pour la suite de ma carrière un exemple à suivre, une image vivante qui me restera en mémoire.

Ah...Olivier, pauvre de toi ! Tu auras écopé de la version « non finie » d'une Cécile à peine sortie de Licence 3 et n'ayant jamais touché une pipette de sa vie ! Et pourtant, voilà que je vais soutenir ma thèse, cinq ans plus tard...et tu y es pour beaucoup. Enumérer toutes ces choses prendrait trop de temps donc je vais simplement te remercier d'avoir été là, merci d'avoir partagé avec moi ta science et ton humour (à peu près à parts égales ?!). J'ai énormément appris de toi et j'espère continuer sur cette lancée pour appliquer ce qui m'a été enseigné ici. Je te souhaite également plein de courage pour la suite !

Un grand merci également à tous les membres qui sont encore présents dans les murs de notre laboratoire à ce jour.

A Jérémy et Ariel qui ont partagé mon bureau durant tout ce temps !

Jérémy, tu es mon petit frère de la science, plein de ressources, notamment pour ce qui est de faire des farces ou de me donner des surnoms...(Angela, Dori, Dora...) que je n'expliquerai pas ici, je suis sûre que tu t'en chargeras dans un autre cadre. Malgré quelques chamailles comme c'est le cas entre frère et sœur, tu m'as été d'un grand soutien durant ces années, tant humainement que pour faire avancer mes réflexions scientifiques. Je suis sûre que tu as un brillant avenir devant toi en tant que chercheur et en tant que personne. J'espère qu'on gardera contact et qu'on se recroisera au fil de nos carrières respectives !

Ariel, thanks for all our nice discussions and for sharing a bit of mexican culture with me (for example how to properly prepare a cucumber xD), i really hope i will visit this country once, and if I do, I'll for sure let you know first!

A Sarah qui m'aura accompagnée de très près durant ces derniers mois ! Bien que nous ayons des caractères différents, je suis très heureuse qu'on ait eu l'opportunité d'apprendre à mieux se connaître, je pense que tu es une personne formidable et que tu as un bel avenir devant toi. Merci de ton efficacité et de ta rigueur qui auront apporté un grand plus à mes dernières expériences, mais surtout à ton soutien grâce auquel nous avons pu accomplir de très belles choses !

A Véro, « la maman du labo » comme le disent certains. Pour moi, je ne te vois pas tellement ainsi mais c'est peut-être parce que nous faisons partie de ceux qui aiment la réglisse ;). Merci pour les bons moments partagés, dans et en dehors du labo, et d'avoir contribué à m'inculquer des notions d'épigénétiques qui me seront très utiles pour la suite de ma carrière !

A Claire, l'artiste du labo ! J'ai toujours cru qu'un esprit scientifique était souvent couplé à une incapacité à chanter...mais il semblerait que ce ne soit pas ton cas, car j'adore ta musique ! Merci pour ta gentillesse et ton humanité, ainsi que ton soutien dans les moments un peu durs.

A Julie N (N pas seulement pour Nogueroles...mais également parce que tu es la N-ième Julie à passer par cette équipe !!!)...la petite dernière arrivée en thèse ! Bien que tu sois déjà « dans les parages » depuis un moment (toi aussi tu as chopé le virus et tu vas rester loooooongtemps dans le labo et tu finiras par être la plus vieille et tu penseras à moi :p), j'ai eu la chance d'apprendre à te connaître un peu mieux durant cette dernière année...mais je pense qu'on a pour le coup bien rattrapé le temps perdu !xD Merci pour ta bonne humeur, ton grain de folie et ton sens de l'humour...très bien assorti au

mien (au grand malheur de Jérémy !). Bon courage pour la suite, tu es sur la bonne voie et je suis certaine qu'on sera amenées à se recroiser.

Manu, « notre » bioinfo ! Merci pour ta bonne humeur de brocoli pas trop cuit (parce que trop cuit c'est pas bon !) ainsi que pour ton aide sur les divers single cell, ta pédagogie et ta patience pour m'inculquer certaines notions de bioinfo... je finirai par me mettre à R, c'est certain !

A Karl, petit dernier arrivé (pas si petit que ça), grand tennisman, mais qui malheureusement n'a pas encore compris que Nadal va finir par perdre, même sur terre battue (car pour le reste c'est déjà fait) :D. Merci pour nos discussions, que ce soit de tennis, de présentations, de flowjo ou bien de choses moins sérieuses (car oui le tennis c'est sérieux) ...surtout tard le soir quand les bureaux sont déserts et qu'il fait bon d'avoir un peu de compagnie en dehors du gardien.

Je voudrais également en suivant remercier les membres passés, mais qui m'ont accompagnée durant une bonne partie de ma thèse pour certain(e)s.

A Julie D. (D. comme...Darrigues, et rien d'autre :D). Merci de m'avoir aidée à « grandir » au sein de cette équipe, pour ton aide au quotidien, nos discussions et nos soirées/weekend fortessa ! J'ai énormément apprécié le temps passé ensemble et je suis très contente que tu aies trouvé un nouveau laboratoire dans lequel tu te sentiras bien je l'espère ! Peut être se recroisera-t-on un de ces jours ?

A Agathe Malbec (Ah oui...pour toi il fallait que j'écrive le nom en entier, premièrement pour te montrer que je ne l'avais pas encore oublié et secondo parce qu'il te va si bien ce nom de domaine :D). Tout comme Julie (mais à ta manière) tu m'as été d'une énorme aide durant le temps passé ensemble dans cette équipe...depuis le mime du flagelle pour réviser la viro jusqu'aux discussions autour de tes cafés et les sessions d'escalade/ping-pong vraiment sympa ! Je te souhaite de trouver ta voie pour la suite, et que tu te pliras dans ce que tu fais, car c'est au fond ce qui compte le plus.

A Joanna, notre bioinformaticienne, souvent discrète mais avec son caractère ! Merci pour ta gentillesse et ton soucis du bien être des autres, j'ai rarement rencontré des gens qui se préoccupe aussi sincèrement des autres. Bon courage pour la suite à toi et à Guillaume.

A Karine, notre ancienne post-doc dont le passage dans l'équipe fut bref mais intense. Merci pour ta bonne humeur, ton soutien et merci de m'avoir initiée aux GNs, j'en referai c'est certain !

A Bénédicte, alias BB, des initiales que je retrouve encore sur certaines boites au labo ! Merci de m'avoir toujours parlé franchement et transmis (je l'espère) un peu de tes capacités impressionnantes à présenter et à faire des ppt !

A Mehdi, mon superviseur durant le M2 sans lequel j'aurais sans doutes chaviré ! Merci d'avoir pris le temps de faire des manip avec moi alors que ta thèse touchait à sa fin et que tu avais d'autres chats à fouetter.

A Geneviève, merci pour tes paroles aimables et de m'avoir appris à gérer les PCR de mes élevages avant de partir ! Profites bien de ta retraite et continues à voyager.

A « mes » étudiantes que j'ai pu superviser ou encadrer durant leurs stages :

Nikki, you are my number one student ! I enjoyed a lot the time spent together (you too it seems, as you extended it for a year :p). Teaching to a great mind like yours was a joy and your optimism was refreshing, specially during the rough months we had. I wish you all best for your futur and I'm sure you'll have a brilliant carreer in research.

Julie et Miriam, le duo de chock qui a amené de la bonne humeur dans notre labo pour quelques mois ! Merci à vous deux les filles, l'une comme l'autre vous êtes des personnes formidables et même si la vie au labo n'a pas toujours été très simple vous vous en êtes bien sorties. Je vous souhaite le meilleur pour la suite !

Au autres membres du centre, qui ne faisaient peut-être pas partie de l'équipe mais certainement de mon quotidien au CPTP :

A Caroline, tu es un rayon de soleil pour la personne qui franchit la porte principale du CPTP. Je n'ai jamais autant apprécié d'avoir quelqu'un à l'accueil que depuis ton arrivée, tu as toujours eu un mot gentil qui redonne le sourire même durant les jours de grisailles, sans mentionner ton efficacité lorsqu'on est perdu dans quelques démarches à effectuer dans le centre. Merci pour tout ça !

A Dominique Rozet et Nathalie Frances, les deux superwomans du secrétariat ! Vous avez été toutes les deux géniales depuis mon arrivée en tant que petite stagiaire de L3 pour m'aiguiller dans les démarches à suivre jusqu'à l'étudiante en thèse épuisée que vous avez soutenue dans toutes les démarches administratives !

A Ugo, Nuria et Dimitri, le trio de l'IRSD qui m'aura fait passé de superbes soirées et après-midi, jusqu'au brunch pré-thèse pour se redonner un peu le moral ! Merci à vous trois !

Au anciens du M2 : Cécile Dedieu...sacré personnage ! Je t'adore sincèrement et je te remercie de m'avoir soutenu durant ces années de thèse malgré que tu aies choisi une voie différente, tu es un exemple pour moi de personne qui sait ce qu'elle veut et où elle va, ce qui n'est très certainement pas donné à tout le monde ! Merci à Paul, Marion, Pauline, Mehdi, Manon N., Julien d'avoir été là pour se soutenir en tant que M2 pensant être « au bout de notre vie », la vie n'est finalement pas finie et continue plutôt bien.

A Eve, qui m'a toujours donné l'impression d'être un prolongement de notre équipe. Merci pour les moments passés ensemble, pour ta bonne humeur et ta joie de vivre contagieuse ! Bon courage pour la suite je suis sûre qu'elle sera intéressante si tu arrêtes le rodéo à cheval du moins ;).

Aux membres du plateau de cytométrie sur lequel j'aurai passé...une très grande partie de ma thèse !

Fatima, la maman du plateau, la personne auprès de laquelle on trouve toujours une oreille attentive et des conseils avisés quand la thèse n'avance pas comme on veut ou qu'une manip a raté ! Merci d'avoir été là pour moi dans les moments difficiles et de m'avoir appris la cytométrie.

A Anne-laure, Valérie, Paul et Lidia (dernière arrivée mais pas des moindres) merci à vous quatre pour tout votre soutien et votre aide sur le plateau ainsi que pour votre gentillesse. Merci Anne-Laure pour m'avoir aiguillé dans mes marquages compliqués ainsi que lors de mes navigations dans les recoins cachés de flowjo !

Merci aux membres de la Zootechnie, Rachel, Romain, Joïlita et Elisabeth. Vous faites un travail formidable grâce auquel nous pouvons effectuer sereinement nos expérimentations.

Finalement, j'aimerais remercier tous mes proches, ma famille, mes amis et Valentin.

Merci à mes parents de m'avoir soutenu depuis mes premiers pas et sans lesquels je ne serai pas arrivée là où j'en suis aujourd'hui, merci d'avoir cru en moi et d'avoir rendu possible l'accomplissement d'un rêve d'enfant malgré un chemin semé d'embûches. Un merci spécial à mon père d'avoir eu le courage de lire et de corriger ma thèse en entier ! Merci à ma mère de m'avoir soutenu durant tout ce temps et particulièrement lorsque la santé ne suivait pas ! Merci à mon frère

Cédric de me soutenir et de savoir me faire rire même dans mes moments les plus sombres, merci pour tes conseils avisés en toute situation...parfois j'ai l'impression d'être la petite et non la grande sœur.

Merci à mes amis pour les bons moments que j'ai passé ces années à Toulouse ! Je ne les citerai pas tous par peur d'en oublier (et parce que ça serait trop long) mais je suis sûre que vous vous reconnaitrez.

Last but not least...le meilleur pour la fin ? Merci à Valentin qui a eu le courage de me supporter au quotidien pendant toute ma thèse (et croyez moi, ça n'a pas été du gâteau tous les jours...plutôt des sushis). Tu m'as vue ravie, en colère, triste, déçue, bref dans tous mes états d'âme... et tu as su rester en toute circonstance fidèle à toi-même, m'apportant la joie, le réconfort et l'espoir dont j'ai eu besoin pour avancer et ne pas lâcher prise. Merci d'être là, tout simplement (avec Louxor et Papouche aussi bien sur !!!).

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Un organisme complexe est constitué d'un ensemble de cellules vivantes différenciées, assurant des fonctions spécialisées et opérant de manière concertée. Tout être vivant tend à se conserver en tant qu'individu et à se perpétuer en tant qu'espèce. Ainsi, au fil de l'évolution, s'est mis en place le système immunitaire, propre à chaque individu et espèce, qui participe à la conservation de l'individu et de l'intégrité de ses tissus. Il a pour but d'éliminer rapidement les éléments dangereux, extérieurs ou intérieurs à l'organisme, pouvant mener à sa dégradation. En effet, pour minimiser les dommages causés aux tissus lors d'une infection, il faut une élimination rapide du pathogène, mais il est tout aussi important que la réponse immunitaire apportée soit contrôlée.

Si tel n'est pas le cas, les cellules du système immunitaire peuvent engendrer des lésions tissulaires pouvant excéder le dommage causé par le pathogène en lui-même. C'est pourquoi la réponse immunitaire est un mécanisme finement régulé, composé non seulement de cellules dont la fonction principale est l'élimination du danger, mais également de cellules régulatrices dont le rôle est d'assurer une réponse adéquate et proportionnée au danger.

Ce danger est, dans un premier temps, détecté par les cellules immunitaires innées qui sont la première défense du système immunitaire contre un pathogène. Si l'infection persiste, c'est-à-dire si la réponse immunitaire innée n'est pas suffisante, une seconde réponse est mise en place, médiée par les cellules immunitaires adaptatives. Des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ont alors pour rôle d'aller activer les lymphocytes T afin de mettre en place une réponse spécifique et adaptée, dirigée contre le pathogène en question. Les lymphocytes T ainsi activés pourront migrer vers le site infectieux, éliminer la menace et mettre en place une mémoire immunitaire en cas de réinfection. L'étendue de la réponse immunitaire apportée par les lymphocytes T est régulée par une population de cellules régulatrices en charge de surveiller les réponses de ces lymphocytes T : ce sont les lymphocytes T régulateurs (Tregs). Une bonne gestion des réponses inflammatoires dirigées contre un pathogène permet au système immunitaire d'éviter le développement d'inflammation chroniques. Outre ce rôle, les Tregs, qui ont également pour fonction de contrôler les réponses dirigées contre soi afin d'empêcher l'apparition de pathologies auto-immunes, participent à la réparation tissulaire et préviennent, entre autres, le rejet de greffon ou du fœtus par la mère. Les Tregs sont une population

hétérogène présentant un nombre important de fonctions différentes dont le but final est de maintenir l'homéostasie immunitaire.

Durant ma thèse, j'ai étudié le développement de ces Tregs dans le thymus afin d'identifier des différences de développement qui pourraient refléter une hétérogénéité de cette population et expliquer en partie les différences fonctionnelles qu'on observe pour ces cellules. Ma thèse m'a permis d'identifier des marqueurs distinguant plusieurs sous-populations de Tregs dont les fonctions semblent différentes et dont le développement dépend de différents signaux cytokiniques. A terme, ces recherches pourraient permettre une utilisation ou modulation plus précise des Tregs pour certains traitements. En effet, ces Tregs sont utilisés dans le cadre de traitements cellulaires dans les pathologies auto-immunes ou bien sont ciblés par certains traitements expérimentaux anti-cancéreux pour lequel ces cellules auraient majoritairement un rôle néfaste. Ainsi, en distinguant le rôle des différentes sous-populations de Tregs, il serait possible de cibler spécifiquement l'une d'entre elles dans l'optique d'accentuer leur effet (pathologies auto-immunes, Tregs anti-cancéreux, greffe) ou bien de l'inhiber (Tregs pro-tumoraux).

INTRODUCTION

Introduction

I. Les Tregs en périphérie

Les cellules T sont classées en différentes sous-populations, notamment en fonction de leur récepteur aux antigènes, le T-Cell Receptor (TCR), composé de deux chaînes différentes. Nous nous intéresserons aux lymphocytes T ayant un TCR composé d'une chaîne alpha et d'une chaîne bêta, appelé $TCR\alpha\beta$. Grâce à leur TCR, ces cellules sont capables de reconnaître et de participer à l'élimination d'un danger donné. En effet, le répertoire TCR est très diversifié : pour la souris, on estime à 10^{15} - 10^{20} clonotypes (un clonotype est une population de cellules T qui portent un TCR identique) la diversité potentielle du répertoire TCR (Nikolich-Zugich et al., 2004). Ce récepteur est formé lors du développement des lymphocytes T dans le thymus. Chaque chaîne est composée d'une partie constante ainsi que d'une partie variable qui est celle pouvant interagir avec le complexe CMH-peptide. Cette partie variable est formée d'un segment V et J pour la chaîne alpha et d'un segment V, D et J pour la chaîne bêta. Avant réarrangement du gène, celui-ci comprend plusieurs segments pour chaque région V, D ou J. Ensuite, un segment de chaque région est recombinaison de manière aléatoire avec les autres pour former la partie variable des chaînes du TCR. Ces recombinaisons (et donc la diversité du répertoire T, tout comme celle du répertoire B) sont rendues possibles grâce aux enzymes RAG (recombination-activating gene) exprimées spécifiquement lors de cette étape de développement des lymphocytes T. Cette recombinaison des différentes régions V, (D) et J permet un premier niveau de diversité, on parle de diversité combinatoire. A cela s'ajoute une diversité jonctionnelle créée par la juxtaposition et la ligature des différentes régions qui vont constituer le CDR3. Plusieurs enzymes participent à ce mécanisme, notamment des nucléases permettant l'excision au hasard d'un certain nombre de nucléotides de chaque extrémité (V et J) ainsi que la TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) qui en rajoute de nouveaux (nucléotides N) (Motea and Berdis, 2010). A ces derniers peuvent également s'ajouter des nucléotides P (palindromiques) aux extrémités des gènes. Ces diverses modifications permettent une énorme diversité du répertoire TCR qui, en retour, permet aux lymphocytes T de reconnaître une très grande variété de pathogènes. Mais la génération aléatoire de ce dernier induit également des TCRs capables de reconnaître du soi ou du non-soi inoffensif (Jia et al., 2018). Or, une cellule T à elle seule n'est pas capable de savoir si ce qu'elle reconnaît est dangereux et

si par conséquent il faut engendrer une réponse immunitaire. Afin de maintenir l'intégrité de l'organisme, il est donc nécessaire d'éliminer ces cellules auto-réactives ou bien de contrôler leur activation. On parle dans ce cas d'établir une tolérance vis-à-vis du soi. Concernant les réponses contre non-soi inoffensif, celles-ci sont d'avantages contrôlées en périphérie qu'éliminées dans le thymus.

1. La tolérance

La tolérance se définit par l'absence ou le contrôle des réponses immunitaires vis-à-vis des antigènes du soi ou d'antigènes du non-soi qui ne présenteraient pas de menace pour l'organisme (ex. : flore commensale). Medawar a été le premier à définir le concept de tolérance immune en 1953 (Billingham et al., 1953) dans le cadre de la transplantation. Il a démontré que l'acquisition d'une tolérance était possible lorsque les allogreffes entre différentes lignées murines étaient accompagnées d'une injection de cellules allogéniques en période néonatale. Cette première démonstration d'une tolérance induite par des cellules a ensuite entraîné de nombreuses recherches quant aux mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de celle-ci.

Jacques Miller a été le premier à démontrer l'importance du thymus tout au long de la vie de la souris pour la mise en place d'une tolérance et une éducation des cellules immunitaires en utilisant lui aussi des modèles de transplantation de peau de donneurs allogéniques associés à une thymectomie à différents âges (Miller, 1961, 1962). Des souris étaient thymectomisées puis greffées à la fois avec un thymus allogénique et un morceau de peau du donneur allogénique. La présence du thymus greffé permettait d'éduquer les cellules du système immunitaire à ne pas rejeter le greffon. Ses expériences ont permis de conclure que le thymus devait être le site où la tolérance au soi était imposée.

Les recherches ont ensuite mené à la compréhension des mécanismes de tolérance qui se déroulent dans le thymus que nous aborderons par la suite.

Burnet et Medawar se sont partagé le prix Nobel en 1960 pour proposer que la tolérance soit induite par les antigènes tissulaires, s'ils sont présents lors du développement du système immunitaire au cours de la période néonatale. Des expériences très élégantes de Le Douarin et de ses collègues dans les années 1980 ont démontré que ce n'était pas le cas. En utilisant le même modèle expérimental de greffe embryonnaire, ils montrent que s'ils transplantent un « thymus vide », c'est-à-dire avant même qu'il ne soit colonisé par des précurseurs, ceci permettrait une tolérance à long terme de toute greffe d'organe ou de tissu provenant du même donneur que le thymus en question. Ainsi, l'établissement de

Introduction

la tolérance aux tissus périphériques nécessite plutôt un épithélium thymique qui sélectionne les lymphocytes T CD4 médiateurs de la "tolérance dominante" (Ohki et al., 1987).

D'autres mécanismes indépendants du thymus ou même des cellules T sont également connus à ce jour et sont résumés de manière non exhaustive ci-contre (Tableau 1).

Table 1 **Tolérance induite par les cellules du système immunitaire inné**

Type cellulaire	Molécules régulatrices	Localisation	Fonction	Références
pDC	IDO, PD-L1, IL-10, IFN type1	Tissus	Important dans diverses pathologies (GVHD, arthrite auto-immune, tolérance orale)	<i>Audiger et al., Jimmunol 2017</i>
cDC	CTLA-4, PD-1, ICOS	Tissus, OL2	Induction d'anergie des lymphocytes T	<i>Hasegawa & Matsumoto Front. immunol 2018</i>
	Fas, TRAIL, IDO	Tissus, OL2	Délétion clonale par induction d'apoptose	
	PD-1, AR, IDO, TGF- β	Tissus, OL2	Induction de pTregs, maintien des Tregs	
ILC3	MHC-II	Barrière intestinale	Contrôle de l'activation des LT spécifiques des bactéries commensales	<i>Hopeworth et al., Nature 2013</i>
NK	TGF- β	Sang, tissus	Inhibition de la prolifération et activation des LT	<i>Chong et al., Eur J immunol 2010</i>
M2 Macrophage	IL-10	Tissus	Suppression des réponses pro-inflammatoires	<i>Murray, annual review 2016</i>

Les recherches jusqu'à aujourd'hui ont permis ensuite de comprendre que le premier mécanisme visant à induire une tolérance a lieu lors du développement des lymphocytes T dans le thymus après le réarrangement du TCR et sélection positive des T capables de reconnaître un complexe CMH-peptide (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). On parle couramment d'un mécanisme de tolérance centrale. Celui-ci a pour but principal l'élimination des lymphocytes T reconnaissant les antigènes du soi présentés par les cellules stromales thymiques que nous aborderons plus en détail par la suite. Or certaines cellules T autospécifiques s'échappent du thymus vers la périphérie et présentent un potentiel danger auto-immun. Il n'est pas établi, à ce jour, si cet échappement est un « défaut » de la tolérance centrale, c'est-à-dire un mal nécessaire pour permettre une diversité suffisante pour reconnaître n'importe quel pathogène, ou bien si cet échappement de Tconv autospécifiques pourrait avoir son utilité. En effet, il serait envisageable que certaines de ces cellules donnent naissance à des cellules régulatrices périphériques (pTreg). Selon Matzinger, cette imperfection de la tolérance centrale serait nécessaire pour garder une diversité suffisante du répertoire TCR (Matzinger, 1994).

Introduction

Pour empêcher les lymphocytes T autospécifiques ayant échappé à la sélection négative de nuire à l'organisme en induisant des réponses dirigées contre le soi et, à terme, une auto-immunité, le principal mécanisme mis en place sont les lymphocytes T régulateurs thymiques (tTregs).

2. Les Tregs

A. Découverte des lymphocytes T régulateurs

Le premier indice de l'existence des tTregs date de plusieurs expériences de thymectomie menées entre 1969 et 1981 dans lesquelles il apparaît que seule une thymectomie menée à J3 conduit au développement de pathologies auto-immunes chez la souris (Nishizuka and Cancer, 1981; Nishizuka and Sakakura, 1969). Un évènement important empêchant le développement de maladies auto-immunes se produit donc à ce moment dans le thymus : quelques années plus tard, des scientifiques découvrent des cellules caractérisées par l'expression du corécepteur CD4 et de CD25, la chaîne alpha du récepteur de haute affinité à l'interleukine-2 (IL-2). Ces cellules quittent le thymus à partir de J3 et possèdent des capacités régulatrices puisque leur injection dans des souris thymectomisées permet de largement diminuer le développement des pathologies qui se mettent en place normalement après la thymectomie (Asano, 1996). Dans le même temps, une expérience très élégante de l'équipe de Le Douarin a permis d'établir que ces cellules régulatrices sont en fait capables de contrôler les lymphocytes T, et de ce fait, d'exercer une « tolérance récessive » (Modigliani et al., 1995). Dans cette expérience, ils transfèrent des cellules T provenant de donneurs tolérants à des souris syngéniques athymiques. Ces cellules étaient tout à fait capables de rejeter des greffes initialement tolérées si l'on enlevait au préalable les cellules régulatrices. Plus tard, de nouvelles expériences ont conforté ces résultats en montrant que les Tregs sont capables d'inhiber l'activation et la différenciation des cellules T effectrices auto-réactives (DiPaolo et al., 2005), entre autres grâce à l'expression de CD25, qui leur permettrait de priver les Tconv de leur IL-2 nécessaire à leur prolifération (S Sakaguchi, N Sakaguchi, M Asano, 1995).

B. Découverte de foxp3

CD25 est également exprimé de manière transitoire par les cellules T activées et de ce fait ne présente pas un marqueur spécifique des Tregs.

Introduction

Les résultats cités ci-dessus ont ensuite incité à explorer les mécanismes génétiques sous-jacents à la différenciation et à la fonction des Tregs. Ces études ont mené à la découverte du facteur de transcription Foxp3 codé par le chromosome X. Une mutation de ce dernier induit une perte de fonction chez l'Homme, conduisant à un grave trouble auto-immunitaire et une inflammation multi-organes appelé IPEX, tout comme ce qui a été observé chez une souche de souris mutante scurfy (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001a; Wildin et al., 2001). La nature auto-immunitaire des pathologies observées suite à une mutation de Foxp3 ont porté à croire que celle-ci pouvait altérer la différenciation ou le fonctionnement des cellules Tregs CD25⁺. Ceci a été confirmé par des expériences montrant des quantités élevées d'ARNm et de protéines Foxp3 dans les Treg CD25⁺, ainsi que des souris mutantes pour Foxp3 chez la souris, faisant de Foxp3 le master régulateur des Tregs (Fontenot et al., 2003, 2005a; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2017). Bien que CD25 reste encore largement utilisé pour des expériences visant à trier des Tregs du fait que Foxp3 est intracellulaire, plusieurs modèles permettent aujourd'hui de trier les cellules foxp3⁺ (GFP ou protéine de surface tel que Thy1.1 exprimé sous contrôle du promoteur du gène *foxp3*) afin d'éviter des biais, notamment du fait qu'une partie seulement des Treg Foxp3⁺ exprime CD25 chez la souris. Après la découverte de Foxp3 comme facteur de transcription clef du lignage T régulateur permettant de définir précisément la population, de nombreuses recherches se sont portées sur les mécanismes suppresseurs de ces Tregs Foxp3⁺.

Nous traiterons ici seulement des CD4⁺Foxp3⁺, mais il faut néanmoins noter qu'au fil des dernières décennies plusieurs populations de cellules T régulatrices ont vu le jour (Tableau 2).

Table 2 **Autres mécanismes de tolérance des lymphocytes T et B**

Type cellulaire	Molécules régulatrices	Localisation	Fonction	Références
Breg	IL-10, IL-35, TGF- β	Rate, NL	Suppression des réponses pro-inflammatoires Différenciation de Treg, Tr1 Maintien des iNKT	<i>Rosser & Mauri, Immunity 2015</i>
Th3	TGF- β	Rate, NL	Tolérance Orale Induction de pTregs	<i>Faria et al., Immunol.Rev.2005</i>
Tr1	IL-10, TGF- β	NL, Tissus	Inhibition de la sécrétion de cytokines de type Th1	<i>Roncarolo et al., Immunol.rev.2006</i>
CD8⁺ Treg	induction d'ILT3 et ILT4	Rate	Inhibition de la prolifération des LT Rendent les DCs tolérogènes	<i>Chang et al., Nat immunol 2002</i>
iNKT Foxp3⁺	GITR	NL, foie	Inhibition de cellules par contact direct	<i>Monteiro et al., J immunol 2010</i>
LT$\gamma\delta$	Très nombreux	Sang, Tissus	Inhibition de prolifération ou apoptose des LT Inhibition des DCs Recrutement de cellules suppressives innées	<i>Peters et al., Cell Mol Life Sci 2018</i>
pTreg	Très nombreux	NL, Tissus	Régulation des réponses T Maintien de l'homéostasie de l'intestin	<i>Bluestone et al., Nat.rev.immunol 2003</i>

3. Hétérogénéité des Tregs en périphérie

Lorsqu'on évoque une hétérogénéité des Tregs dans un tissu donné en se limitant à ceux exprimant CD4 et Foxp3, une première distinction peut se faire entre ceux différenciés à partir de T conventionnels en périphérie, auquel cas on parle de pTregs, et ceux s'étant développés dans le thymus, les tTregs (Bluestone and Abbas, 2003). Il a, en effet, été montré que les pTregs et les tTregs, outre leur origine développementale différente, jouent des rôles complémentaires et non redondants pour empêcher le développement d'une l'auto-immunité systémique et la lymphoprolifération pathologique chez la souris scurfy, initialement dépourvue en Tregs Foxp3⁺ (Haribhai et al., 2011).

Dans le cas présent, nous nous intéressons à l'hétérogénéité des tTregs présents en périphérie. Or, l'expression de diverses molécules effectrices par les Tregs en périphérie est souvent abordée sans faire la distinction entre pTregs et tTregs. Néanmoins, si l'on considère la souris sauvage, c'est-à-dire une souris sans mutation et n'ayant subi aucun traitement, la plupart des Tregs périphériques sont des Tregs d'origine thymique, à l'exception des Tregs intestinaux dont une partie est composée de pTregs. En effet, des études ont comparé une souris saine avec une souris mutée dans la région non codante 1 (CNS1) du gène Foxp3 responsable de la différenciation des pTregs via une signalisation smad3 induite par le TFG- β . Par conséquent, ces souris mutées sont dépourvues en pTregs, mais présentent néanmoins le même taux de Tregs qu'une souris sauvage dans la rate, les nœuds lymphatiques et

Introduction

divers tissus, à l'exception près de l'intestin (perte de 50% des Tregs) (Zheng et al., 2010). En d'autres termes, on peut considérer que les études sur les Tregs périphériques de souris saines comprennent en large majorité des Tregs thymiques. Néanmoins, on ne peut pas exclure qu'en l'absence de pTregs, les tTregs aient proliféré davantage pour combler la « niche ».

Un Treg doit exécuter ses fonctions immuno-suppressives pour maintenir l'intégrité tissulaire, en évitant les réponses dirigées contre le soi et en modulant les réponses immunitaires pour prévenir les inflammations chroniques. Ces fonctions doivent donc s'exécuter de plus d'une façon, dans plus d'un endroit et à plus d'un moment donnés. Il serait donc cohérent de penser qu'il est difficile pour une population homogène de cellules d'effectuer tout cela et suggère que celle-ci puisse être composée de sous-populations aux rôles distincts. Différents indices de la littérature existent vis-à-vis d'une telle hétérogénéité en périphérie et l'origine de cette hétérogénéité est également discutée. Celle-ci peut s'exprimer à travers un panel de mécanismes effecteurs différents, une localisation différente ou encore une différence en fonction du contexte inflammatoire donné.

A. Diversité des mécanismes effecteurs des Tregs

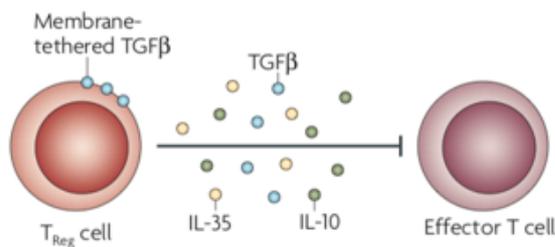
Aujourd'hui, un nombre important de mécanismes immunosuppresseurs a été décrit comprenant une longue liste de molécules immuno-suppressives (Josefowicz et al., 2012; Vignali et al., 2008; Zhao et al., 2017).

Afin d'exercer proprement leurs fonctions, les Tregs doivent cibler un large éventail de cellules immunitaires, innées et adaptatives, et limiter leurs différents mécanismes d'action. C'est pourquoi les Tregs présentent un large panel de molécules immunosuppresseives. Ces molécules possèdent des modes d'action très distincts et modulent différents paramètres afin de diminuer l'inflammation, ou encore de participer à la réparation des tissus suite à celle-ci (voir Figure 1). L'action conduite par les Tregs via ces molécules suppressives doit être localisée et spécifique au type cellulaire ciblé et nécessite une proximité entre la cellule cible et le Treg puisque les mécanismes d'action passent par des molécules de contact ou des cytokines. En effet, de récentes études ont montré que les Tregs ne sont pas uniquement présents dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les nœuds lymphatiques, mais également dans les tissus non lymphoïdes tels que la peau ou le tissu adipeux et ce en conditions basales (Sather et al., 2007). Lorsqu'on empêche les Tregs de migrer vers ces tissus, par exemple en utilisant des Tregs CCR4 KO, ceux-ci ne sont plus capables de prévenir le

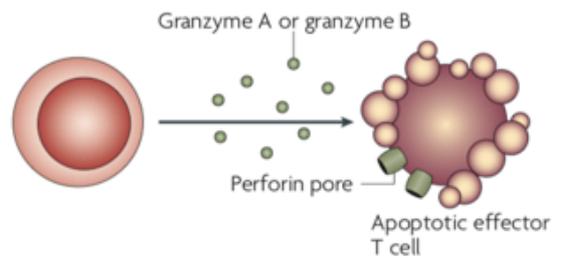
Introduction

développement de pathologies auto-immunes dans les tissus. Leur présence sur le site est donc nécessaire pour exercer leurs fonctions. Sakaguchi et ses collègues avaient énoncé que les Tregs pouvaient être classifiés en différentes sous-populations basées sur leur variété de mécanismes immuno-suppresseurs (Sakaguchi et al., 2008).

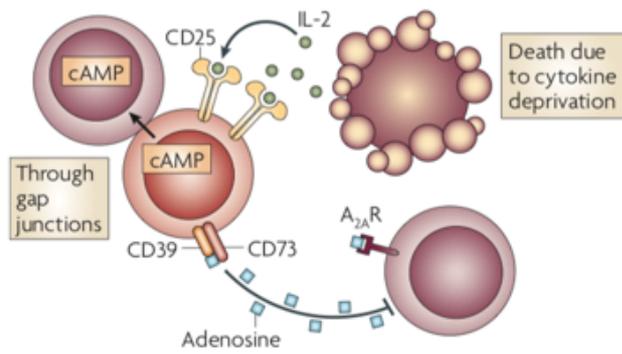
a/ Cytokines régulatrices



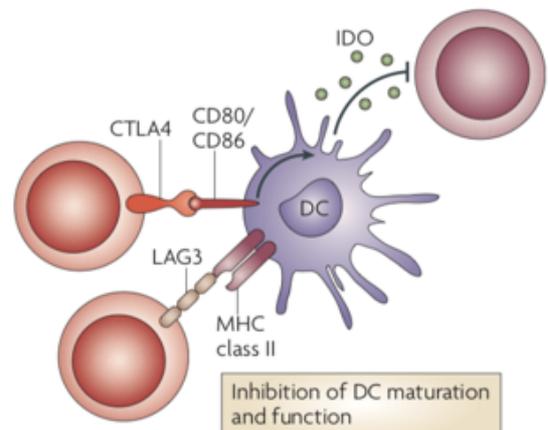
b/ Cytolyse



c/ Modulation métabolique



d/ Modulation des DCs



e/ Réparation tissulaire

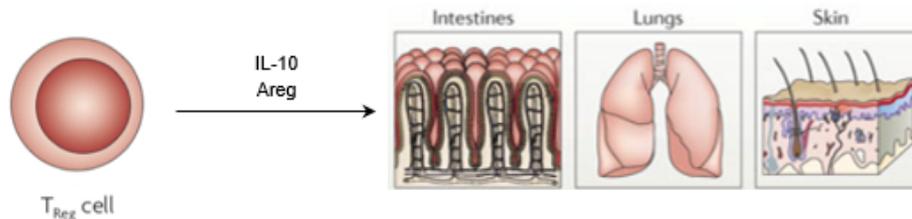


Figure 1 **Mécanismes immunosuppresseurs des Tregs** (adapté de Vignali et al., *Nat immunol.* 2008) Schéma des différents mécanismes régulateurs des Tregs résumés en quatre modes d'action majeurs. **a/** Cytokines inhibitrices incluant l'interleukine-10 (IL-10), l'IL-35 et le TGF-β. **b/** Mécanismes d'induction de mort cellulaire par les Tregs via une cytolysse médiée par les granzymes-A et B ainsi que la perforine. **c/** Modulations de l'environnement métabolique. Déprivation en cytokines via CD25 (récepteur de haute affinité à l'IL-2), inhibition via l'AMP cyclique et immunosuppression médiée par une déprivation en adénosine via CD39 et/ou CD73. **d/** Modulation de la maturation et/ou des fonctions des DC via l'inhibition du CMH-II par LAG3, l'inhibition du signal de co-stimulation CD80/86 et l'induction d'IDO, une molécule immunosuppressive produite par les DC modulant le métabolisme du tryptophane. **e/** Réparation des tissus via sécrétion d'IL-10 et/ou d'Amphiréguline (Areg).

Introduction

Molécules régulatrices des cellules présentatrices d'antigènes

Les Tregs interagissent avec différentes cellules pour contrôler les réponses immunitaires (Josefowicz et al., 2012). L'un de leurs rôles clef est d'interagir avec les cellules dendritiques, les APCs professionnelles qui jouent un rôle central dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Des études d'imagerie intra-vitale, étudiant la dynamique des cellules Treg dans les modèles de maladies auto-immunes, ont montré que les Tregs sont capables d'établir un contact stable avec des DCs présentant un antigène donné avant que ceux-ci ne rentrent en contact avec des cellules T (Th) auxiliaires naïves spécifiques pour l'antigène présenté et inhibent ainsi l'activation des cellules T helper (Tadokoro et al., 2006; Tang and Krummel, 2006). L'interaction des Tregs avec les DCs semble donc être un mécanisme crucial d'immunosuppression.

Les Tregs peuvent inhiber la maturation des DCs et ainsi prévenir l'activation de la réponse adaptative, et ce *via* différentes molécules régulatrices. CTLA-4, un homologue structurel de CD28, est capable d'interagir avec CD80/CD86 exprimé par les DCs. Des souris déficientes pour CTLA-4 développent une pathologie auto-immune sévère, tout comme des souris irradiées ayant reçu de la moelle osseuse (MO) CTLA-4KO seule. CTLA-4 est exprimé à la fois par les Tregs et supposé être une molécule régulatrice ainsi que par les Tconv eux-mêmes, empêchant leur prolifération de manière intrinsèque (arrêt du cycle cellulaire, inhibition de la sécrétion d'IL-2, diminution des signaux de co-stimulation positif *via* CD28). De ce fait, il est impossible dans un modèle murin comportant un KO total de cette molécule de définir si le rôle important de CTLA-4 dans le compartiment hématopoïétique est intrinsèque aux Tconv ou relié aux capacités immuno-suppressives des Tregs. Or, lorsqu'une souris reçoit à la fois une MO CTLA-4 KO et une MO de souris sauvage, la chimère mixte ne présente pas de symptômes auto-immunes (Friedline et al., 2009). Ceci suggère que la régulation en trans par les Tregs compétents pour CTLA-4 est suffisante pour prévenir le développement de la pathologie. En revanche, une autre publication tend à affirmer que des souris adultes, dans lesquelles on induit l'ablation de l'expression de CTLA-4 spécifiquement dans les Tregs par injection de tamoxifen, se portent bien et montrent même des résistances au développement d'une maladie auto-immune du système nerveux central (EAE) (Paterson et al., 2015). La différence fondamentale entre ces deux expériences réside dans le fait que dans la première condition les Tregs n'expriment pas CTLA-4 dès leur développement, alors que dans la seconde l'ablation de CTLA-4 est induite de manière ponctuelle. On peut, de ce fait, supposer que CTLA-4 n'aurait pas uniquement une fonction de

Introduction

molécule immunosuppressive, mais joue également un rôle dans le développement d'au moins une partie des Tregs. De plus, il est possible que CTLA-4 agisse, tout comme pour les Tconv, en inhibiteur de la prolifération des Tregs en périphérie. A ce sujet, Wing *et al.* montrent qu'une délétion spécifique de CTLA-4 dans les Tregs (Cre exprimée sous contrôle du promoteur Foxp3) induit une prolifération de Tregs bien supérieure à la normale, néanmoins eux aussi observent que ces Tregs sont moins suppresseurs, puisque les souris mutées développent des symptômes auto-immunes (Wing *et al.*, 2008). Il semblerait donc que l'âge auquel la délétion spécifique de CTLA-4 dans les Tregs a lieu importe. Il est probable qu'une délétion dès le plus jeune âge affecte les capacités immunomodulatrices des Tregs, alors qu'une délétion tardive n'ait pour effet qu'une hyperprolifération des Tregs sans altérer leurs fonctions, induisant de ce fait plutôt une résistance au développement d'auto-immunités. De plus, il semblerait que la souris B6 CTLA4 déficiente présente un répertoire Treg altéré, ce qui favoriserait l'hypothèse selon laquelle CTLA-4 joue également un rôle dans le développement ou le maintien de certains clonotypes qui pourraient se développer précocement et être importants pour prévenir l'apparition de pathologies auto-immunes (Verhagen *et al.*, 2013). CTLA-4 est de ce fait être non seulement une molécule régulatrice, mais pourrait également définir une sous-population de Tregs avec un répertoire TCR donné et donc contribuer à une hétérogénéité des populations.

D'autres molécules telles que Lag-3 (CD223, homologue de CD4), sont impliquées dans l'inhibition de la maturation des DCs en interagissant directement avec le CMHII (Huang *et al.*, 2004). Cette molécule contribuerait également à l'hétérogénéité des Tregs en périphérie puisque sa co-expression avec CD49b serait spécifique d'une population de Tregs intestinaux producteurs d'IL-10 (Gagliani *et al.*, 2013).

Les Tregs sont également capables d'inhiber l'interaction entre DC et lymphocytes T *via* des molécules telles que la neuropilin1 (Nrp1) (Mizui and Kikutani, 2008; Sarris *et al.*, 2008). Nrp1 permet de renforcer la synapse immunologique entre le Treg et la DC, conférant ainsi un avantage compétitif au Treg par rapport au Tnaïf. Bien que Nrp1 ait été décrit comme un marqueur distinctif des tTregs (Weiss *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2012), il semblerait davantage décrire des cellules activées, qu'il s'agisse de Tregs ou de Tconv. Nrp1. De plus, Weiss et ses collègues montrent qu'en conditions inflammatoires les Tregs des muqueuses expriment Nrp1, alors que ceux présents dans le système nerveux central d'une souris atteinte d'EAE ne l'expriment pas. Qu'il s'agisse donc d'un marqueur

Introduction

d'activation des Tregs ou non, il semblerait refléter une certaine hétérogénéité tissu-dépendante, en conditions inflammatoires.

Un autre mécanisme d'induction de tolérance par les Tregs est de rendre les DCs tolérogènes. TIGIT, un membre de la famille des immunoglobulines, permet aux Tregs d'induire une production d'IL-10 et de TGF- β par les DCs, les rendant ainsi tolérogènes. Plus intéressant encore, TIGIT a été décrit comme étant un marqueur d'une sous-population de Tregs capable de contrôler les réponses immunitaires Th1 et Th17, mais non Th2, via la sécrétion de Fgl2 (Joller et al., 2014). Les analyses RNAseq effectuées par ces chercheurs montrent des différences d'expression génique de récepteur aux cytokines et chimiokines, ainsi que de facteurs de transcription entre Tregs TIGIT+ et TIGIT-. Cela impliquerait que TIGIT n'est exprimé que par certaines sous-populations de Tregs ayant des capacités régulatrices différentes, spécifiquement dirigées vers les Th1 et Th17.

Induction d'une mort cellulaire par les Tregs

D'autres mécanismes impliquant une mort cellulaire induite par les Tregs sont connus à ce jour tels que la production de granzyme B (Cao et al., 2007; Gondek et al., 2005), ou bien par l'engagement de TRAIL qui reconnaît le ligand de mort DR5 et induit l'apoptose cytotolytique des cellules cibles (Ren et al., 2007). Les Tregs exprimant la granzymeB sont retrouvés dans les tissus tumoraux et participent à l'élimination des réponses anti-tumorales. D'un autre côté, ces Tregs granzymeB+ sont capables de spécifiquement cibler les lymphocytes B et plus particulièrement ceux présentant des antigènes du soi (Zhao et al., 2006). Cette sous-population de Tregs participerait ainsi sans doute à la prévention d'une production d'auto-anticorps par les lymphocytes B.

Les cytokines immunosuppressives

La production de cytokines immunosuppressives tels que l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35 est un autre mécanisme utilisé par les Tregs pour créer un environnement immunosuppressif. La production de TGF- β est notamment importante pour convertir des Tconv en pTreg et il semblerait que l'IL-35 ait une fonction similaire de conversion de Tconv en IL-35 pTreg. Outre cette fonction, il a récemment été montré que le TGF- β a d'autres fonctions : il limiterait d'une part la suppression des réponses Th1 par les Tregs mais favoriserait en revanche leur contrôle des réponses Th17 de manière tissu-spécifique dans le côlon (Konkel et al., 2017). Des Tregs dépourvus du récepteur au TGF- β seraient plus aptes à contrôler la prolifération cellulaire *in vitro* ou tout aussi apte que des Tregs sauvages à contrôler le

Introduction

développement d'une EAE, mais en revanche ne pourraient pas contrôler le développement d'une colite. Le TGF- β est donc important pour permettre la suppression de sous-populations spécifiques de T helper et de contrôler de manière tissu-spécifique les réponses immunitaires. Le récepteur au TGF- β quant à lui semble distinguer des populations de Tregs aux fonctions différentes.

Un rôle non redondant de l'IL-10 produite par les Tregs a été décrit pour le maintien de l'homéostasie tissulaire dans les muqueuses, alors que ce mécanisme n'est pas indispensable dans des réponses immunitaires d'autres tissus (Rubtsov et al., 2008). Certains mécanismes des Tregs sont donc primordiaux pour maintenir l'homéostasie d'un type de tissu donné, ici le côlon.

Rôle des Tregs dans des processus non immunologiques

Le rôle des Tregs n'est pas seulement de contrôler ou d'empêcher la mise en place de réponses immunitaires, mais ils participent également activement à des processus non immunologiques tels que la réparation tissulaire (Arpaia et al., 2015). Selon le tissu concerné, les Tregs doivent agir sur des types cellulaires variés pour induire la réparation des tissus et utilisent de ce fait des mécanismes différents (Li et al., 2018b). En effet, après une lésion musculaire, une population de Treg phénotypiquement et fonctionnellement distincte est capable de promouvoir la réparation du muscle en induisant une prolifération et une différenciation des cellules satellites (cellules souches du muscle) *via* la sécrétion d'amphiréguline (Areg) (Burzyn et al., 2013). Bien que non limités au tissu musculaire, les Tregs Areg⁺ expriment un set caractéristique de gènes exprimés et un répertoire TCR bien distinct des Tregs spléniques (Zhao et al., 2017).

De même, certains Tregs ont été décrit comme important pour la myélinisation ainsi que la re-myélinisation des neurones et ce même en dehors de tout contexte inflammatoire (Dombrowski et al., 2017). Ce processus est à nouveau apparenté à une fonction de réparation tissulaire indépendante des fonctions immuno-modulatrices des Tregs dans le CNS : les Tregs stimulent directement la différenciation des progéniteurs d'oligodendrocytes *via* leur production de CCN3.

Ainsi, bien que les Tregs partagent une même fonction de réparation tissulaire, il s'agit de populations utilisant des molécules effectrices différentes, adaptées au tissu dans lequel elles se trouvent pour exercer cette fonction.

Introduction

Modulations de l'environnement métabolique par les Tregs

Mais les Tregs ne se limitent pas au ciblage de populations cellulaires, ils modifient également l'environnement en altérant par exemple la composition du milieu extra-cellulaire afin de moduler la réponse immunitaire. Les Tregs sont capables d'agir sur le métabolisme cellulaire en appauvrissant le milieu extra-cellulaire en ATP via les ectonucleotidases CD39 et CD73 (Cekic and Linden, 2016). Leur rôle est de convertir successivement l'ATP, source d'énergie pour les cellules, en AMP puis en adénosine qui, elle-même, inhibe l'activité des cellules T tout en promouvant l'activité régulatrice des Tregs.

Les Tregs sont également capables de stimuler les DCs afin que celles-ci produise de l'indolamine 2, 3 dioxygénase (IDO) et diminuent le métabolisme du tryptophane nécessaire aux Tconv pour leur survie. Par exemple, dans des pathologies auto-immunes telles que l'EAE, un cross-talk entre DC et Treg est nécessaire pour contrôler la sévérité de la pathologie. Dans ce contexte, il a été montré que les Tregs induisent une production d'IDO par les pDCs (plasmacytoid Dendritic Cells) qui à son tour est nécessaire pour conférer une capacité immunosuppressive aux Tregs (Lippens et al., 2016).

Importance relative du mécanisme de déprivation en IL-2 par les Tregs

L'un des premiers mécanismes immunosuppresseurs ayant été décrit pour les Tregs est leur capacité à appauvrir le milieu extracellulaire en IL-2 et, de ce fait, d'empêcher la prolifération des Tconv. Ce mécanisme viendrait en grande partie du fait que les Tregs à l'époque étaient caractérisés par leur expression élevée de CD25 et entreraient ainsi en compétition pour l'IL-2 avec les Tconv qui expriment lors de leur activation des niveaux plus faibles en CD25 (Pandiyani et al., 2007). Les Tregs induiraient ainsi l'apoptose des Tconv. Néanmoins, au vu des marquages de Tregs Foxp3⁺ des publications actuelles, seule une partie des Tregs exprimeraient CD25, ce ne serait donc pas un mécanisme immunosuppresseur commun à tous les Tregs comme décrit initialement. De plus, il est à noter que dans une souris dépourvue de IL-2, une forte inflammation se met en place vers la troisième semaine de vie, avec une lymphoprolifération non contrôlée. Certes, l'IL-2 est nécessaire pour maintenir les Tregs en périphérie, ceux-ci sont d'ailleurs absents dans la périphérie d'une souris IL2KO, néanmoins les Tconv sont activés et prolifèrent énormément. L'IL-2 ne semble donc pas nécessaire, du moins pour les Tconv auto-spécifiques, pour leur activation et prolifération. Il est possible que ces cellules utilisent une autre source cytokinique pour leur prolifération telle que l'IL-7 ou l'IL-15 (Ma et al., 2006; Pandiyani et al., 2007). L'appauvrissement en IL-2 n'est, de ce fait, sans doute pas le mécanisme

majoritaire d'immunosuppression des Tregs, mais plutôt une molécule importante pour maintenir la capacité des Tregs à être immunosuppresseurs.

B. Diversité des mécanismes nécessaires au maintien du potentiel immunosuppresseur des Tregs

En périphérie, les Tregs doivent maintenir leur potentiel fonctionnel et une stabilité de lignage au cours du temps et ce en conditions non inflammatoires. Les Tregs nécessiteraient une stimulation *via* le TCR, de faible affinité, pour maintenir cette activité (Delpoux et al., 2014; Levine et al., 2014). Le signal TCR permettant le maintien du lignage passerait par différents facteurs de transcription (NFkB, NFAT, Foxo) qui modulent, entre autres, l'expression de Foxp3. Néanmoins, un autre papier montre que les Tregs ont un transcriptome inchangé en conditions basales, qu'ils reçoivent (souris sauvage) ou non (souris TCRa déficiente) un signal *via* le TCR et que seule leur activité immunosuppressive dépend du TCR (Vahl et al., 2014). D'après Rundensky *et al.*, ce sont les cytokines, l'IL-2 et possiblement l'IL-15, qui seraient nécessaires à la survie des Tregs en périphérie en signalisant *via* STAT5 (Li and Rudensky, 2016). Néanmoins, dans la littérature on recense un nombre important de molécules exprimées par les Tregs en périphérie, tels que par exemple les TNFR (ex. : GITR) qui semblent nécessaires aux Tregs pour leurs capacités fonctionnelles, sans pour autant qu'un mécanisme immunosuppresseur soit connu pour ces molécules (Figure 2). En leur absence, les Tregs perdent, en partie ou complètement, leur potentiel fonctionnel.

Il est possible que ces molécules, plutôt que d'agir directement sur des cellules cibles en vue d'inhiber une réponse immunitaire, agissent sur les Tregs pour permettre le maintien de la stabilité du lignage et des capacités immunosuppressives. En effet, différents facteurs de transcription, mais aussi de molécules impliquées dans le métabolisme ou encore des molécules de surfaces dont certaines ont d'ores et déjà été utilisées pour définir des sous-populations de Tregs, ont été décrits comme importants pour la fonctionnalité des Tregs, sans pour autant toujours relater un mécanisme immunosuppresseur..

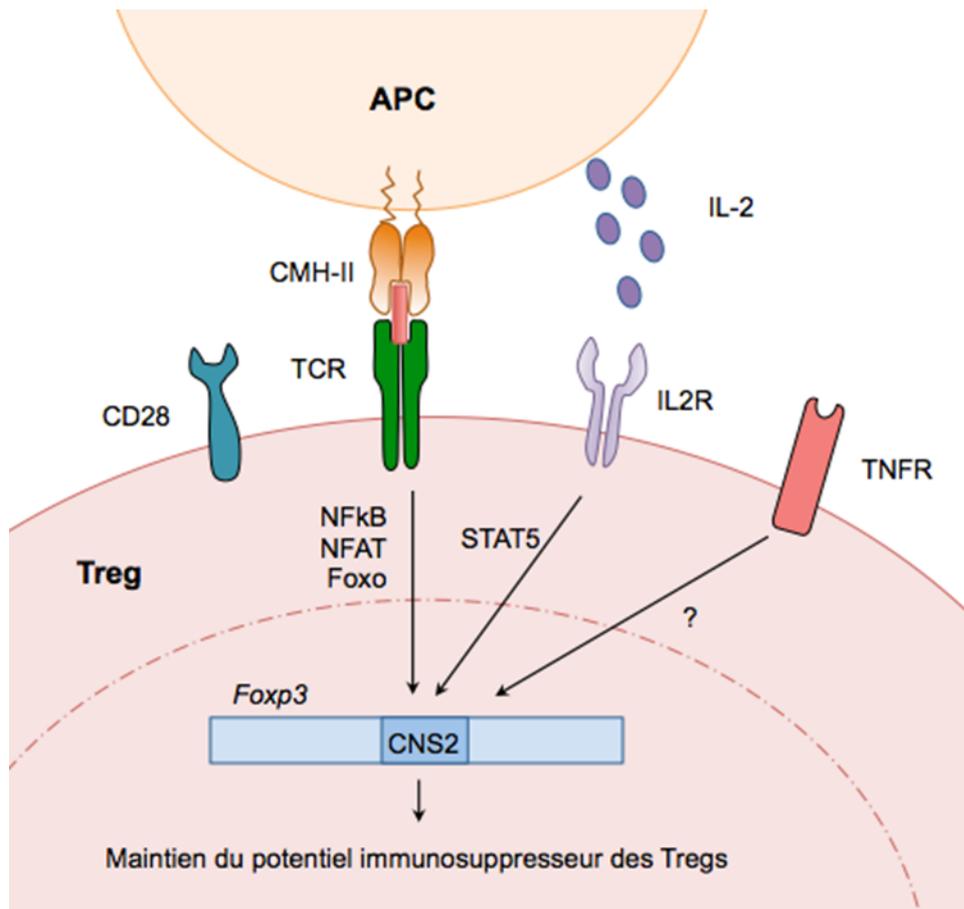


Figure 2 **Maintien du potentiel immunosuppresseur des Tregs** (inspiré de Sharabi et al., *Nat Rev Drug Discov.* 2018) Schéma résumant les différents signaux nécessaires au maintien des capacités immunosuppressives des Tregs en périphérie et les voies de signalisation impliquées.

Hétérogénéité des facteurs de transcription important pour la fonction des Tregs

Récemment, deux facteurs de transcription, Tcf1 et Lef1 ont été décrits comme nécessaires pour maintenir les fonctions suppressives des Tregs et éviter une perte de tolérance au soi (Xing et al., 2019). Dans ce papier, les auteurs décrivent une sous-population de Tregs, caractérisée par une surexpression de gènes tels qu'Ikzf4 (codant pour Eos) et Izumo1, régulée positivement par ces deux facteurs de transcription. L'absence de l'une de ces deux molécules induit une immuno-pathologie chez la souris avec l'âge, démontrant un rôle important dans le maintien de l'homéostasie pour cette sous-population régulatrice.

KAP1, un autre facteur de transcription est nécessaire au maintien des fonctions immunosuppressives des Tregs en périphérie de manière foxp3 dépendante, mais agit également indépendamment de foxp3 sur la capacité proliférative des Tregs (Tanaka et al., 2018). En effet, le maintien des fonctions immunosuppressives des Tregs passe par différentes voies, dépendantes et indépendantes de foxp3. Une voie métabolique passant par le complexe mitochondrial III est, par exemple, essentielle au

Introduction

maintien des capacités immunosuppressives des Tregs en périphérie, et ce indépendamment de foxp3 (Weinberg et al., 2019).

La localisation nucléaire NFAT2, un facteur de transcription reflétant un signal en aval du TCR, participe à la discrimination entre deux sous-populations de Tregs aux capacités immunosuppressives différentes : les Treg Ly6C⁺ et les Treg Ly6C⁻ (Delpoux et al., 2014). L'expression de Ly6C chez les Tconv est inversement corrélée à leur réactivité au soi et à leur capacité à se différencier en Treg (Martin *et al.*, 2013). Ainsi, les Treg Ly6C⁻ seraient plus auto-réactifs et seraient d'avantage stimulés *via* leur TCR en périphérie. Il est possible que cette signalisation constante *via* le TCR soit plus importante pour les Treg Ly6C⁻ que pour les autres afin d'assurer leur maintien. Ceci indiquerait que tous les Tregs n'ont pas la même dépendance aux signaux en périphérie pour leur maintien. De plus, une proportion des Tregs thymiques exprime Ly6C bien qu'il n'ait pas été défini à ce jour s'il s'agit de cellules re-circulantes ou en développement (Delpoux et al., 2014). Il est de ce fait possible que la différenciation de ces deux populations se fasse dès leur développement thymique.

Ainsi, des facteurs de transcription autres que Foxp3 sont nécessaires pour le maintien des fonctions immunosuppressives de certaines sous-populations de Tregs caractérisées par leur expression. Il semble donc qu'une hétérogénéité existe au niveau de facteurs de transcription cruciaux pour le maintien de l'homéostasie du système immunitaire par les Tregs.

Importance des différents TNFR pour le potentiel immunosuppresseur des Tregs

Certaines molécules de la famille des TNFR ont été décrites comme marqueurs des Tregs sans vraiment refléter de mécanismes immunosuppresseurs. Leur expression et stimulation semblent importantes pour maintenir le potentiel immunosuppresseur des Tregs plutôt qu'en agissant elles-mêmes comme des molécules régulatrices.

OX-40 jouerait un rôle dans l'homéostasie et les fonctions suppressives des Tregs puisque les Tregs déficients pour cette molécule sont moins suppresseurs. L'utilisation d'un anticorps bloquant pour OX-40 semble limiter l'action immunosuppressive des Tregs mais aucun mécanisme ne décrit le fonctionnement exact de cette molécule exprimée par les Tregs (Takeda et al., 2004).

TNFR2 est l'un des deux récepteurs au TNF et est exprimé par les Tregs. Il a récemment été montré que les Tconv sont capables de stimuler les Tregs, notamment par production de TNF, et que ce seul phénomène semble important dans la modulation du rejet de greffe (Leclerc et al., 2016). Cela

Introduction

stimulerait la prolifération des Tregs et leurs capacités immunosuppressives. Par la suite, l'utilisation d'anticorps agonistes du TNFR2 exprimée par les Tregs a montré son efficacité dans des modèles murins de rejet de greffe (Cohen and Wood, 2017).

Un autre récepteur de la famille des TNFR, TNFRSF18, plus connu sous le nom de GITR, a été étudié dans le cadre de la modulation des Tregs dans diverses immunothérapies, dans le but d'inhiber l'action des Tregs (oncologie) *via* l'utilisation d'anti-GITR (Schaer et al., 2012). Plus récemment, deux populations de Tregs thymiques ont été décrites, l'une exprimant des niveaux élevés de GITR, l'autre des niveaux plus faibles, et possédant des fonctions différentes en périphérie (Wyss et al., 2016). Il semblerait donc que du moins certains de ces marqueurs ne soit pas exprimés de manière homogène par la population de Tregs et puissent participer à la diversité phénotypique et fonctionnelle de celle-ci, peut-être par leur sensibilité à des signaux de stimulation différents (TNF, OX-40L, GITRL, ...).

Bien qu'on ne connaisse pas forcément les voies de signalisation de ces molécules, leurs fonctions semblent pour la plupart converger : ces marqueurs permettraient de stimuler la prolifération et/ou de réguler l'activité immunosuppressive et/ou de participer au maintien de la stabilité des Tregs en périphérie. La nécessité d'une certaine redondance fonctionnelle de ces voies réside possiblement dans la disponibilité des molécules nécessaires à la stimulation de celles-ci. Ainsi, l'expression de ces molécules crée un second niveau de complexité dans l'hétérogénéité des populations de Tregs qu'il faut distinguer de celui créé par les molécules immunosuppressives à proprement parler, à savoir celles qui permettent une action directe des Tregs pour exercer leur fonctions.

C. Les Tregs tissulaires

Comme mentionné au préalable, certains des mécanismes décrits, comme par exemple la production d'IL-10, semblent nécessaires spécifiquement au maintien de l'intégrité d'un tissu donné. En effet, les Tregs ne sont pas uniquement situés dans les organes lymphoïdes secondaires mais résident également dans les tissus où ils permettent le maintien d'une homéostasie de ces derniers, et ce en conditions physiologiques (Sather et al., 2007). Différentes sous-populations de Tregs tissulaires ont été décrites et constituent de ce fait un autre niveau d'hétérogénéité des Tregs comme l'illustre l'analyse transcriptomique des différentes populations de Tregs tissulaires ci-contre (Panduro et al., 2016)(Figure 3).

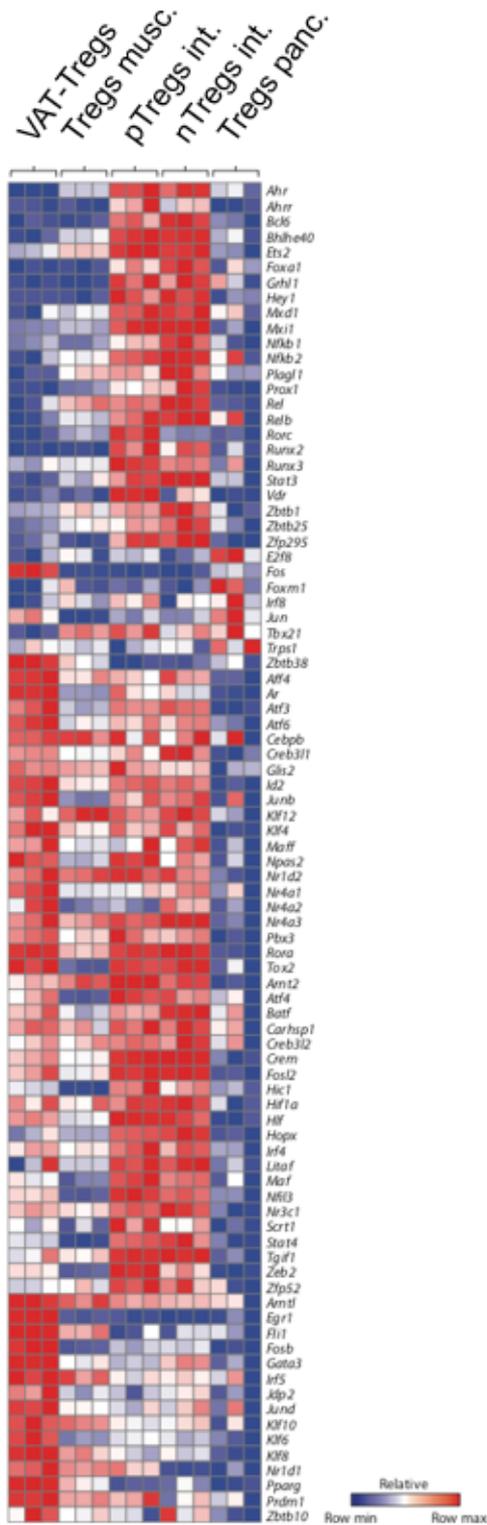


Figure 3 **Différences transcriptomiques des Tregs tissulaires** (issu Panduro et al., *Annual rev Immunol 2015*) Résultats d'une analyse transcriptomique comparant les Tregs du tissu adipeux (VAT-Tregs), les Tregs du muscle, les pTregs et les nTregs de l'intestin ainsi que les Tregs pancréatiques avec les Tregs des nœuds lymphatiques drainants.

Introduction

Les Tregs de la peau

En effet, pour la peau par exemple, l'intégrine CD103 tout comme le récepteur aux chimiokines CCR4 sont exprimés par les Tregs résidents de la peau et semblent nécessaires à leur adressage et maintien dans le tissu (Sather et al., 2007). Une seule mutation de l'une des molécules caractéristiques des Tregs de la peau entraîne une pathologie auto-immune spécifique à ce tissu (Dudda et al., 2008) ou encore une mauvaise élimination des pathogènes de la peau du fait de l'établissement d'une inflammation chronique de la peau en l'absence de Tregs (Freyschmidt et al., 2010). Autrement dit, il existe des sous-populations de Tregs spécifiques à un organe dont les mécanismes effecteurs permettent le maintien de l'homéostasie du tissu.

Les Tregs du tissu adipeux viscéral (VAT-Treg)

Ceci vaut également pour une autre population de Tregs tissulaires ayant gagné de l'intérêt au cours de ces dernières années : les VAT Tregs, autrement dit les Tregs spécifiques du tissu adipeux viscéral (Panduro *et al.*, 2016). En effet, ce tissu n'a pas pour seule fonction de stocker de l'énergie, mais est également colonisé par un nombre important de cellules immunitaires et nécessite de ce fait une régulation appropriée. Ces Tregs sont distincts des autres Tregs, notamment présents dans les nœuds lymphatiques, ainsi que des VAT Tconv, par leur répertoire ainsi que par leur transcriptome (Feuerer et al., 2009). L'un des masters régulateurs des VAT Tregs est PPAR- γ , exprimé également par les adipocytes. Une délétion spécifique de PPAR- γ dans les Tregs montre l'importance de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie de ce tissu (Cipolletta et al., 2012). En effet, en l'absence de ces Tregs exprimant PPAR- γ , les souris souffrent de désordre métaboliques sévères et d'une inflammation du tissu adipeux.

Les Tregs du muscle

Comme évoqué précédemment, les Tregs participent également à la réparation tissulaire et ce notamment pour les muscles. Il existe une population de Tregs propres au tissu musculaire caractérisés par un transcriptome et un répertoire TCR spécifique (Burzyn et al., 2013). Ces Tregs sont majoritairement Areg⁺ et résident dans le muscle en conditions homéostatiques et prolifèrent suite à une blessure musculaire. On peut questionner la réalité d'un répertoire TCR spécifique lorsque des Tregs spécifiques à un tissu donné sont comparés au « bulk » de Tregs présents dans la rate. Pour cela, Matis et Benoist ont expandu les Tregs Areg⁺ de la rate et les ont comparés à ceux présents dans le muscle. Dans ce cas-là, on observait un recoupement partiel entre les deux répertoires TCR. Sachant

Introduction

que les Tregs Areg⁺ sont également importants dans d'autres tissus pour la réparation tissulaire (ex. : le côlon), il est intéressant de noter qu'il existe néanmoins un lien entre l'expression d'une molécule effectrice donnée et celle de son répertoire TCR. Cela suggérerait qu'en amont de son adressage au tissu, la cellule est déjà prédestinée à exercer une fonction spécifique limitée à certains tissus.

Une population de tTregs du côlon

Dans le côlon, bien que la proportion de pTregs soit plus conséquente que dans d'autres tissus, une population de Tregs d'origine thymique a été décrite, exprimant Gata3 et Helios (Schiering et al., 2014).

Les Tregs dans les tumeurs

Une tumeur n'est pas un tissu présent en conditions homéostatiques, il se forme par la prolifération de cellules du soi altérées et ces cellules devenues cancéreuses finissent par s'organiser tel un organe pour maintenir la tumeur en vie, en permettant l'apport de nutriments grâce notamment à une néoangiogénèse et mettent également en place des mécanismes pour contrôler les réponses du système immunitaire. En effet, bien que celui-ci soit capable de reconnaître le soi altéré, l'élimination de la tumeur nécessite souvent une intervention extérieure (chimiothérapies, radiothérapies, chirurgies, immunothérapies). L'incapacité du système immunitaire à éliminer la tumeur proviendrait en partie des Tregs qui joueraient un rôle anti-tumoral important. En effet, une ablation chez la souris des Tregs (souris Foxp3 DTR) facilite l'élimination de la tumeur par le système immunitaire (Han et al., 2019). De même, chez l'humain, la présence de Tregs est souvent corrélée à un mauvais pronostic vital car ceux-ci participeraient à la mise en place d'un environnement immuno-déprimé (ex. : CTLA-4, LAG-3, TGF- β , production d'IDO par les DCs). Néanmoins certaines études ont également observé une corrélation favorable entre la présence de Tregs dans certaines tumeurs et la régression de celles-ci, bien que ces observations restent majoritairement inexplicables (Han et al., 2019). Il semblerait que les Tregs soient de bon pronostic dans des tumeurs non solides (ex. : lymphome hodgkinien) pour lesquelles l'état inflammatoire du patient est souvent la source de développement des tumeurs. Néanmoins, même dans certaines tumeurs solides, les Tregs joueraient un rôle favorable (ex. : cancers gastriques) (Haas et al., 2009). Il est possible, du fait de l'hétérogénéité des Tregs, que différentes populations jouent des rôles antagonistes dans le développement de tumeurs. Dans ce sens, une publication a décrit deux populations de cellules Foxp3⁺ dans des cancers colorectaux, dont l'une exprime des niveaux plus faibles de Foxp3 et possède des capacités pro-inflammatoires ressemblantes

Introduction

à celles des Tregs Th17-like et favorables à la réponse anti-tumorale (cf. partie D), alors que l'autre exprime des niveaux plus élevés de Foxp3 et tend à participer à l'inhibition de la réponse (Saito et al., 2016). L'hétérogénéité de la provenance des Tregs est également connue puisque certains Tregs infiltrent la tumeur une fois celle-ci mise en place grâce à un gradient chimiokinique (ex. : CXCR4), alors que d'autres sont déjà sur place (Tregs tissulaires ?) et d'autres encore sont induits par la tumeur à partir de lymphocytes T conventionnels grâce à un environnement anti-inflammatoire (ex. : Production de TGF- β et d'IDO par les cellules dendritiques). Il a par ailleurs été suggéré que certains Tregs tumoraux sont sélectionnés dès leur développement dans le thymus par des mécanismes de sélection spécifiques (AIRE) (Malchow et al., 2013).

Bien que le concept d'hétérogénéité des Tregs infiltrant les tumeurs soit évoqué à diverses reprises, il n'existe pas encore de marqueurs qui permettraient de différencier clairement des populations de Tregs jouant des rôles distincts dans la réponse anti-tumorale. Ceci est certainement dû partie à une difficulté à définir les Tregs dans les études chez l'Homme en raison d'une difficulté à identifier ces cellules. Identifier des sous-populations de Tregs dans les tumeurs aurait un rôle crucial pour améliorer les immunothérapies ciblant les Tregs qui sont étudiées à l'heure actuelle.

Origines et imprinting des Tregs tissulaires

Toutes ces populations de Tregs dont l'origine est majoritairement thymique (Panduro et al., 2016) se trouvent dans les tissus en conditions homéostatiques (à l'exception des Tregs tumoraux) et expriment des molécules spécifiques au tissu donné. Il est possible que les Treg expriment les marqueurs tissulaires avant leur adressage au tissu, ce qui impliquerait un pré-conditionnement de ces Tregs, ou bien l'empreinte tissulaire pourrait être acquise par les Tregs une fois présents dans le microenvironnement tissulaire. Pour les VAT-Treg exprimant PPAR- γ , il a été montré que les précurseurs des VAT Tregs, alors qu'ils ne sont encore présents que dans la rate, expriment déjà de faibles niveaux de PPAR- γ , ce qui impliquerait un conditionnement préalable à l'arrivée dans le tissu. De plus, les Tregs tissulaires expriment des molécules effectrices différentes et possèdent des fonctionnalités régulatrices ainsi qu'un répertoire TCR qui leur sont propres. Il est probable que celui-ci, du moins en partie, conditionne leur adressage au tissu. Les Tregs engagent leur TCR avec une forte affinité au moins à deux reprises en conditions non inflammatoires : premièrement lors de leur développement dans le thymus où ils peuvent interagir avec des cellules stromales présentant des antigènes tissulaires, puis en périphérie lors de la rencontre d'une CPA présentant également un

Introduction

antigène tissulaire dans un organe lymphoïde secondaire. Il n'est pas clair à ce jour à quel stade les précurseurs de Tregs tissulaires acquièrent leur phénotype spécifique. L'équipe de Mathis et Benoist suggère que les Tregs tissulaires ne migrent pas simplement des nœuds lymphatiques vers le tissu après leur activation, puisque les données de transcriptomiques réalisées par leurs soins montrent des différences d'expression génique partagées par tous les Tregs tissulaires et d'autres uniques à un tissu donné. Ainsi, d'après eux, l'hypothèse la plus probable serait que les Tregs acquièrent durant leur développement thymique un imprinting « grossier » restreignant quelque peu leur devenir, et qui serait ensuite affiné en périphérie.

L'adressage des Tregs à un tissu est principalement dicté par des récepteurs aux chimiokines ainsi que des intégrines qui permettent l'entrée dans le tissu. Concernant les récepteurs aux chimiokines, il a été suggéré que les Tregs suivraient deux switches consécutifs. Le premier aurait lieu dans le thymus et permettrait la sortie de Tregs du thymus et leur adressage aux organes lymphoïdes secondaires grâce à l'expression de CXCR4 par les Tregs. Peu de Tregs iraient directement du thymus vers les organes non lymphoïdes. *Via* le priming antigénique, ces Tregs subiraient ensuite un second switch leur permettant d'acquérir les capacités à migrer vers les tissus en exprimant des récepteurs tels que CCR2, CCR4, CCR6, CCR8 ou CCR9 (Lee et al., 2007).

Campbell et son équipe se sont également intéressés à ce sujet. Selon lui, l'expression de ces récepteurs aux chimiokines définit des populations de lymphocytes fonctionnellement spécialisés avec des tropismes tissulaires uniques. Ainsi, des Tregs CCR4⁺CD103^{hi} seraient spécialisés pour induire une tolérance de la peau et des poumons : une absence d'expression de CCR4 par les Tregs, les souris développent spécifiquement une pathologie inflammatoire de la peau et des poumons (Sather *et al.*, 2007). De même, CCR7 permettrait de distinguer deux populations de Tregs : les Tregs CCR7⁺ qui seraient sensibles à l'IL-2 et migreraient de ce fait vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires, alors que les Tregs n'exprimant pas CCR7 sont insensibles à une restriction en IL-2, plutôt ICOS-dépendants et migrent préférentiellement vers les tissus (Smigielski *et al.*, 2014). Les premiers sont appelés Tregs centraux (cTr), les seconds Tregs effecteurs (eTr) et ils se distinguent sur l'expression de divers marqueurs, comprenant CD44 et CD62L, mais aussi CXCR3, ICOS, CD25 et Bcl2. En utilisant des souris RAG-GFP, ils montrent que les Tregs CD62L⁺CD44⁻ (cTr) se développent dans le thymus et se différencient graduellement en CD62L⁻CD44⁺ (eTr) en périphérie. Ainsi, selon lui, ces populations dériveraient l'une de l'autre. Plus récemment, toujours la même équipe a trouvé un

Introduction

marqueur, Id3, qui scinde les eTr en deux populations : une population Id3⁺ présentant un phénotype plus similaire aux cTr et une population n'exprimant pas Id3 dont les analyses transcriptomiques montrent une signature tissulaire (Sullivan et al., 2019). Bien que ces résultats restent des analyses en « bulk », ils montrent que l'hétérogénéité des Tregs périphériques est complexe et nécessiterait des analyses par cellule unique (single cell RNAseq), couplées à des analyses de filiation afin de comprendre dans quelle mesure cette hétérogénéité est liée à une évolution des cellules dans le temps ou bien à une diversité fonctionnelle stable.

Malgré les suppositions de Campbell, il a été montré que les Tregs provenant des nœuds lymphatiques n'ont pas pour seul rôle de migrer d'un organe lymphoïde secondaire au prochain, en attendant de rencontrer l'antigène pour lequel ils sont spécifiques afin d'être adressés au tissu correspondant. En effet, il a été montré, grâce notamment à des expériences de parabiose, que tout comme pour les Tregs tissulaires qui sont majoritairement résidents, il existe des Tregs résidents dans les organes lymphoïdes secondaires dont la fonction est très certainement le maintien de l'homéostasie à l'intérieur de ceux-ci et le contrôle du déclenchement des réponses adaptatives et notamment des réponses T mémoires (Durand et al., 2018). Les Tregs présents dans les nœuds lymphatiques ne sont donc pas uniquement constitués de précurseurs attendant leur activation pour migrer vers les tissus, mais comprennent également des cellules résidentes dont les fonctions finales sont exercées au sein même de ces organes lymphoïdes.

Très récemment, via des analyses de single cell RNAseq, des chercheurs ont tenté de retracer un lien entre Tregs provenant de tissus lymphatiques et non lymphatiques (Miragaia et al., 2019). Leurs données montrent une acquisition progressive du phénotype tissulaire entre les Tregs du nœud lymphatique et des tissus, suggérant qu'une partie de l'imprinting tissulaire est déjà acquis dans les nœuds lymphatiques. On peut, de ce fait, se demander si cette acquisition de l'empreinte tissulaire des Tregs débute dans les organes lymphoïdes secondaires ou bien si une partie de l'acquisition d'une hétérogénéité des Tregs s'acquiert déjà lors du développement dans le thymus.

D. Réponses Tregs "type-spécifique" (Th1, Th2, Th17 et Tfr)

Les Tregs n'ont pas seulement pour fonction le maintien de l'homéostasie tissulaire, la réparation tissulaire, l'inhibition du développement de maladies auto-immunes, mais participent également activement aux réponses immunitaires en cas d'infection. Leur rôle est alors de contrôler et de

Introduction

participer à la fin de la réponse immunitaire pour éviter tout débordement de celle-ci qui pourrait entraîner des lésions tissulaires ou des inflammations chroniques.

Afin de répondre adéquatement à un pathogène donné, les Tconv CD4 se différencient principalement en populations Th1, Th2 et Th17 grâce aux signaux reçus lors de leur activation par les CPA. Il a été montré qu'une telle subdivision existait aussi au niveau des Tregs, afin que ceux-ci acquièrent partiellement un programme « helper-like » qui leur permette d'être adressé au site inflammatoire et de participer à la réponse immunitaire équivalente au phénotype qu'ils adoptent dans différents types de pathologies (Campbell and Koch, 2011) (Figure 4). Il faut cependant noter qu'étant en conditions inflammatoires, il est difficile de définir l'apport relatif des Tregs thymiques et périphériques aux différentes populations observées. De ce fait, certaines populations de Tregs décrites pourraient provenir du lignage pTreg plutôt que tTreg. Pour répondre directement à cette question il serait nécessaire de faire les expériences qui suivent avec des souris CNS1KO.

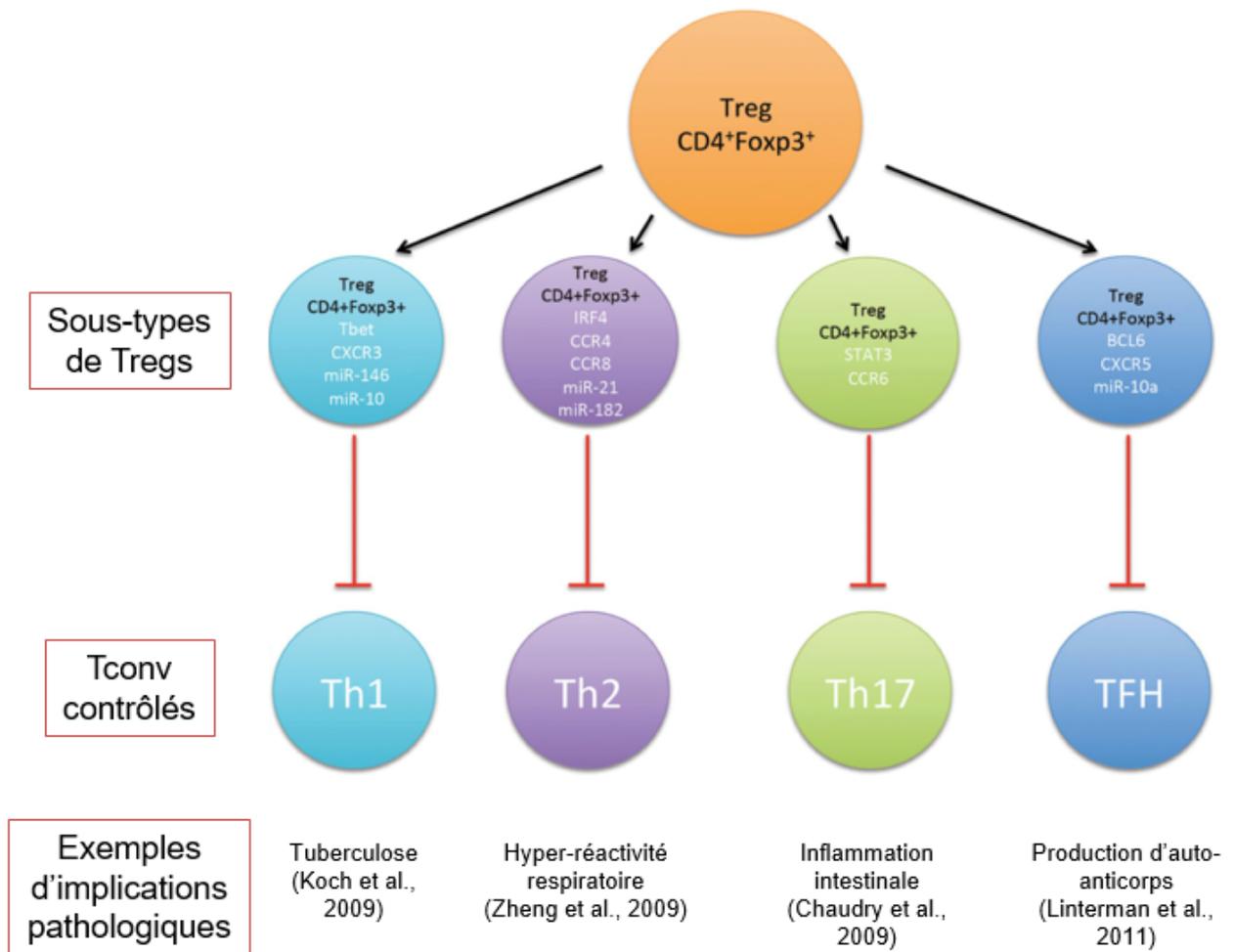


Figure 4 **Différents sous-types de Tregs** (adapté de Veiga-Parga, *Veterinary Pathology* 2016) Schéma illustrant les différents sous-types de Tregs contrôlant les populations T helper (Th). TBET, IRF4, STAT-3 et BCL6 sont les facteurs de transcription spécifiques des populations. Ces Tregs sont caractérisés par différents récepteurs aux chimiokines et micro-RNA qu'ils partagent avec les populations qu'ils contrôlent. BCL6, B-cell lymphoma 6; CCR4, CCR6, et CCR8, CC chemokine receptor type 4, 6, and 8; CXCR3 et CXCR5, CXC récepteur aux chimiokines de type 3 et 5; IRF4, interferon regulatory factor 4; miR, MicroRNA; STAT3, signal transducer and activator of transcription; TBET, T-box transcription factor.

Réponses Treg de type 1

Lors d'une réponse immunitaire de type 1, les Tregs sont capables d'acquies un programme Th1-like en exprimant Tbet, le « master regulator » de ce lignage (Koch et al., 2009). Ces Treg Foxp3⁺Tbet⁺ sont nécessaires pour contrôler des réponses Th1 durant une réponse inflammatoire dirigée contre un pathogène intracellulaire ou encore lors d'une réaction auto-immune, mais peuvent également empêcher l'élimination d'un pathogène lors d'une infection intracellulaire persistante (Scott-Browne et al., 2007) (tuberculose). L'expression de Tbet permet au Tregs d'exprimer le récepteur aux chimiokines CXCR3 et, de ce fait, d'être adressé au site inflammatoire. Néanmoins, cette expression de Tbet et CXCR3 est présente sur une partie des Tregs en conditions basales (environ 8% dans la rate

Introduction

Fig.1 Koch et al., Nat immunol 2009) en l'absence d'infection ; il s'agit donc possiblement de tTregs puisque dans ces conditions il n'y aurait pas de pTregs dans la rate. Ainsi, contrairement aux Tconv, la différenciation semble antérieure à l'infection, éventuellement afin de réprimer des réponses Th1 liées à des réponses auto-immunes. En effet, Koch et ses collègues montrent que les Tregs provenant de souris *Tbx21*^{-/-} ne sont pas capables de contrôler les réponses Th1 lorsqu'on les injecte dans des souris *scurfy*, contrairement aux Tregs sauvages. De plus, cette différenciation en Th1-like Treg est strictement contrôlée car elle peut s'avérer dangereuse pour l'organisme. Une E3 ubiquitine UPS21 restreint la génération de Treg Th-1 like, et des souris déplétées pour cette molécule présentent une différenciation anormale des Tregs en Treg Th-1 like ainsi qu'un développement spontané d'une lymphoprolifération excessive (Li et al., 2016). Ceci suggère que l'engagement des Tregs pour ce lignage est amorcé en conditions basales, du moins pour certains, et qu'une levée des signaux négatifs suffit à induire la différenciation. Il est donc possible que ce programme Th1-like se mette en place durant le développement de ces Tregs ou bien lors d'une rencontre avec leur antigène en périphérie avant toute infection et que l'infection puisse mener à la levée des signaux négatifs.

Réponses Treg de type 2

Les Tregs exprimant le facteur de transcription IRF4 semblent spécialisés dans le contrôle des réponses de type Th2 (Zheng et al., 2009). En effet, des souris sélectivement déficientes pour IRF4 dans les Tregs développent une maladie auto-immune avec une dérégulation sélective des réponses Th2 avec une production d'immunoglobulines de type 2 (dépendant de l'IL-4) et des lésions tissulaires. Il est à noter que certains Tregs thymiques expriment IRF4 à de faibles niveaux en conditions basales, bien que l'analyse ne permette pas de trancher entre des Tregs en développement ou bien des Tregs périphériques qui auraient acquis l'expression d'IRF4 avant de recirculer vers le thymus (Thiault et al., 2015). Néanmoins, tout comme pour les réponses Th1, des Tregs Th2-like sont déjà engagés, du moins partiellement, dans le lignage et prêts à participer à une réponse immunitaire type spécifique, suggérant une hétérogénéité à l'état basal de ces cellules.

Réponses Treg de type 3

Les souris *scurfy* présentent majoritairement des réponses Th1 et Th2 non contrôlées du fait de l'absence de Tregs, alors que les réponses Th17 sont bien moins importantes. Rudensky et ses collègues ont étudié le rôle des Tregs dans le contrôle des réponses immunitaires Th17 en utilisant des KO conditionnels de STAT3, important facteur de transcription du lignage Th17, dans les Tregs. Ces souris

Introduction

développent une inflammation intestinale qui leur est fatale, preuve que le contrôle des réponses Th17 est nécessaire et passe par des Tregs exprimant STAT3. Ces Tregs semblent également présenter des niveaux d'expression faibles de CD25, mais élevés pour CTLA4, ICOS et d'autres gènes, suggérant une sous-population de Tregs distincte (Zheng et al., 2009).

D'autres sous-populations mentionnées auparavant, tels que les Tregs TIGIT⁺, seraient également spécialisées dans le maintien des réponses de type Th1 et Th17 mais non Th2.

Il est fort probable que plusieurs populations de Tregs différentes participent au contrôle des réponses immunitaires des différents types cités ci-dessus.

Les Tfr

Pour chacune de ces réponses immunitaires une composante humorale est à prendre en compte. Une population de lymphocytes T spécifique pour la mise en place des réponses B T-dépendantes a été décrite récemment : les Tfh (Fazilleau et al., 2009). Les Tregs sont nécessaires au contrôle des Tfh et des lymphocytes B afin d'éviter une production d'auto-anticorps consécutive qui pourrait induire le développement d'une pathologie auto-immune. La réponse B se met principalement en place dans les centres germinatifs auxquels les Tfh ont accès grâce à un programme de différenciation spécifique mis en place par l'expression du master régulateur du lignage, Bcl6, qui leur permet d'exprimer différentes molécules d'adressage, notamment le récepteur aux chimiokines CXCR5. En 2011, des chercheurs ont décrit une population de Tregs, exprimant CXCR5, Blimp1 et Bcl6, capable de contrôler les réponses B dans les centres germinatifs (Linterman et al., 2011). Ces Tregs appelés Tfr partagent en effet un programme de transcription proche à la fois des Tregs et des Tfh, mais proviendraient de tTregs ayant acquis par la suite un programme de différenciation Tfh. Leur but serait, d'une part, de réguler la prolifération des Tfh pour maintenir une tolérance au soi et, d'autre part, de restreindre la prolifération des lymphocytes B afin de limiter une prolifération trop importante de cellules B non-spécifiques aux antigènes présents lors de l'infection. Pour appuyer l'origine thymique des Tregs, une autre équipe a comparé les répertoires des Tfh et des Tfr, montrant que la spécificité TCR de ces deux populations est différente et que, par conséquent, les Tfr ne proviendraient pas d'un pool de Tfh ayant acquis des propriétés régulatrices (Maceiras et al., 2017). Néanmoins, il semblerait que l'origine des TFR ne soit pas uniquement thymique puisqu'il a été montré qu'ils peuvent également provenir d'une différenciation périphérique à partir de Tconv (Aloulou et al., 2016). Bien que beaucoup de populations de Tregs soient décrites comme exprimant des niveaux élevés de CD25, il est également

Introduction

connu que l'IL-2 inhibe le programme de différenciation des Tfh. Une équipe a montré que les Tfr n'expriment pas des niveaux élevés de CD25 et que l'IL-2 aurait plutôt tendance à inhiber leur développement (Wing et al., 2017). Ainsi, les Tfr formeraient une sous-population de Tregs caractérisée par l'expression de CXCR5, PD1, Bcl6 et, pour une partie du moins, des niveaux faibles de CD25.

Bien que les réponses Th-like se mettent en place principalement lorsque les Tregs sont activés, il semblerait qu'il existe un certain degré de différenciation au sein de ces populations, préalable à toute activation. Il est possible qu'un pré-conditionnement des Tregs existe dans le but d'engager rapidement des Tregs ayant la meilleure capacité à gérer la réponse immunitaire engendrée par un pathogène du fait d'un transcriptome et/ou d'un répertoire TCR adapté. Il n'est pas clair à ce jour si ces Tregs sont déjà présents sur place, c'est-à-dire dans un tissu adéquat (ex : Treg STAT3⁺ dans le côlon) ou bien si une migration vers ces tissus ne se fait qu'après leur activation.

E. Quelle est l'origine de l'hétérogénéité des Tregs en périphérie

Il est difficile de relier les différents niveaux d'hétérogénéité décrits ci-dessus pour obtenir une image d'ensemble des mécanismes des Tregs en périphérie, dans différentes localisations et à des temps différents. Certains indices dans la littérature suggèrent tout de même que certains mécanismes effecteurs sont plus importants pour un tissu donné qu'un autre, comme par exemple l'IL-10, indispensable uniquement au niveau des muqueuses tout comme les Treg STAT3⁺ dont l'absence cause spécifiquement des inflammations au niveau des intestins. Néanmoins, il existe une certaine redondance dans les mécanismes inhibiteurs des Tregs qui floute sans doute l'importance de chacun d'eux dans un type de tissu donné. Il est fort probable que les Tregs tissulaires et lymphatiques possèdent des mécanismes propres à leur localisation et d'autres partagés. Une autre question est de savoir si ces mécanismes immunosuppresseurs sont uniquement acquis en périphérie ou s'il existe déjà un degré d'hétérogénéité des Tregs lors de leur développement.

Afin de créer une hétérogénéité, il est nécessaire que les Tregs reçoivent des signaux différents pour leur permettre d'exprimer des molécules d'adressage et fonctionnelles différentes. Après que les thymocytes CD4SP ont migré dans la médulla thymique, les Tregs, à l'inverse des Tconv, reçoivent ces signaux dès leur développement dans le thymus en interagissant avec les cellules stromales thymiques. Nous verrons par la suite que de nombreux signaux ont été en effet impliqués dans le développement

Introduction

des Tregs thymiques et nous étudierons leur contribution relative à la génération d'une éventuelle hétérogénéité thymique. Bien que cela n'ait pas encore été décrit pour les Tregs, il existe en effet des populations cellulaires qui se développent dans le thymus et y acquièrent différentes spécificités selon les signaux qu'elles y reçoivent.

Par exemple, il a été montré récemment que pour les MAIT et les NKT, l'adressage au tissu de ces cellules était conditionné dès leur développement dans le thymus *via* un programme de transcription commun (Salou et al., 2019). De même, les $LT\gamma\delta$ acquièrent dans le thymus, durant leur développement, un phénotype $IFN\gamma^+$ ou $IL-17^+$ selon qu'ils ont reçu ou non un signal *via* la molécule de co-stimulation CD27 (Ribot et al., 2009). Concernant les Tregs, récemment deux sous-populations de Tregs thymiques ont été décrites, distinguées sur la base de l'expression de GITR et PD-1 dès leur développement (Wyss et al., 2016). Il semblerait que, dans ce cas, ce soit l'affinité du signal TCR qui influe sur le développement de l'une ou l'autre population.

Après avoir déterminé à quelle étape du développement des lymphocytes T les Tregs s'engagent dans leur lignage, nous essayerons de comprendre dans quelle mesure les différentes molécules impliquées dans le développement des Tregs conditionnent en partie leur hétérogénéité.

II. Choix de lignage Treg

Les Tregs thymiques se développent dans le thymus à partir d'un précurseur commun partagé avec les T_{conv} . Néanmoins, il n'est à ce jour pas clairement établi à partir de quel(s) stade(s) le lymphocyte T a la possibilité de s'engager dans le lignage T régulateur plutôt que T conventionnel.

1. Modèle stochastique vs. instructif

Pour tout modèle de différenciation cellulaire qui donne naissance à des populations filles différentes se pose la question de comprendre si cette diversification est d'ordre stochastique ou bien instructif. Dans le premier cas, il s'agit d'une distribution aléatoire des « destins » aux différentes cellules filles (ex. : division asymétrique), alors que dans le second cas des signaux spécifiques instruisent la cellule pour son devenir. Concernant le développement des thymocytes, un modèle stochastique implique que le choix de lignage se fait indépendamment de la spécificité du TCR alors que le modèle instructif suggère une dépendance directe entre le choix de lignage et la spécificité du TCR.

Introduction

Ces choix de lignage s'opèrent tout au long du développement des lymphocytes T, depuis leur arrivée dans le thymus jusqu'à leur sortie. L'engagement du lymphocyte T dans le lignage Treg a été suggéré à différentes étapes du développement des lymphocytes T. Selon l'étape considérée, les signaux reçus par le précurseur Treg ne sont pas les mêmes du fait d'une localisation différente (ex. : cortex ou médulla) et d'une possibilité d'interaction avec des types cellulaires différents (ex. : cTEC, DC, mTEC). Il est donc important de comprendre à quel(s) moment(s) le développement Treg a lieu afin de connaître les facteurs accessibles aux précurseurs et qui pourraient induire une hétérogénéité lors de son développement. Le schéma ci-après résume les principales étapes de développement des lymphocytes T avec une indication pour les étapes auxquelles il a été suggéré qu'un engagement dans le lignage Treg pouvait avoir lieu (Figure 5).

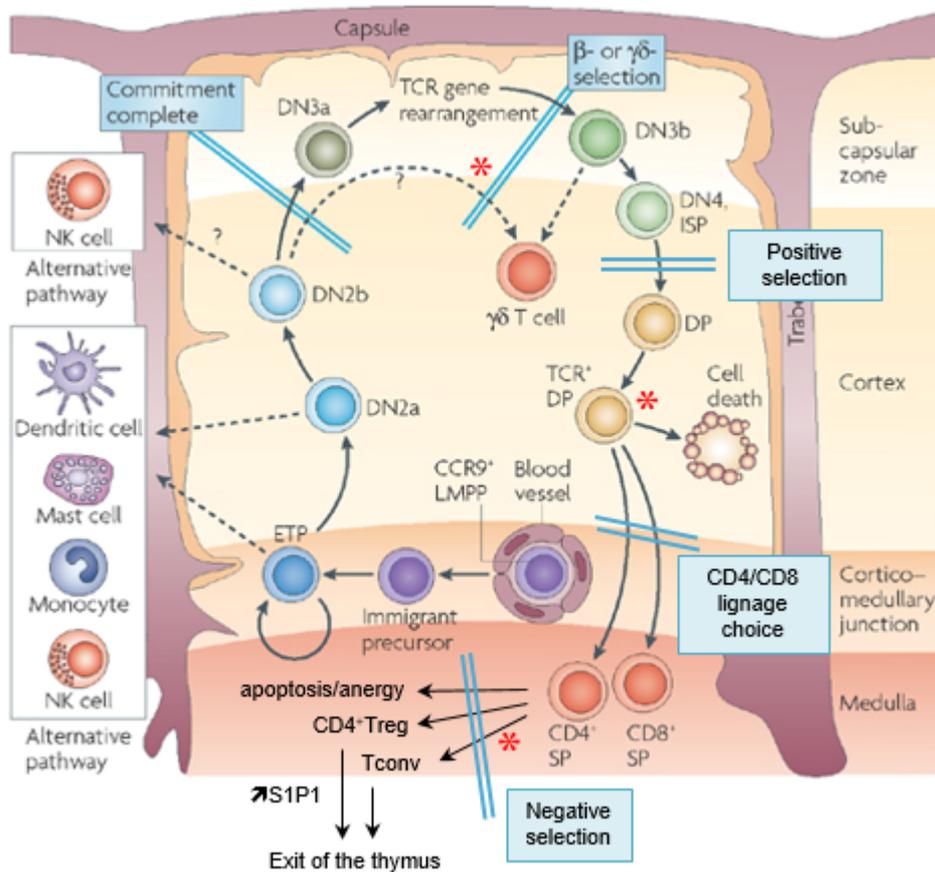


Figure 5 **Etapes de développement des lymphocytes T** (adapté de *Nat. reviews immunol.*) Schéma illustrant les différents points clés du développement des lymphocytes T ainsi que les différents choix de lignage auxquels les Tregs sont confrontés. ETP = Early Thymic Progenitor; DN = cellules doubles négatives CD4⁻CD8⁻; TCR = T-cell Receptor; DP = cellules doubles positives; SP = cellules simples positives; Treg = lymphocytes T régulateurs; Tconv = lymphocytes T conventionnels. * Indique les différentes étapes du développement T au cours desquelles des évidences de la littérature suggèrent un engagement dans le lignage Treg

2. De la moelle osseuse au thymus

Les Tregs, et plus globalement les lymphocytes T sont issus d'un progéniteur hématopoïétique commun aux cellules myéloïdes et lymphoïdes, appelé MPP (multipotent progenitors) qui quitte la moelle osseuse pour s'engager dans un lignage de plus en plus restreint tout en migrant vers le thymus. A l'heure actuelle, des modèles expérimentaux de souris IL-7R rapporteurs ont permis de décrire un progéniteur commun aux lymphocytes T qui n'aurait, contrairement aux MPPs, pas perdu son potentiel à donner des cellules myéloïdes : les TSPs (thymic seeding progenitors) (Schlenner et al., 2010). Il n'y a néanmoins pas de consensus établi pour définir si ces cellules sont les seuls « réels » progéniteurs de cellules T, puisque différents précurseurs hématopoïétiques présentent un potentiel à donner des cellules T.

Une fois arrivé dans le thymus, celui-ci fournit un microenvironnement essentiel pour le développement des lymphocytes T à partir de ces progéniteurs hématopoïétiques. Ce thymus est subdivisé en différentes zones dans lesquelles vont se dérouler successivement les étapes de développement des lymphocytes T : le cortex, la médulla et la jonction cortico-médullaire (JCM) séparant les deux qui sert de porte d'entrée et de sortie aux cellules du thymus. Les progéniteurs hématopoïétiques, plus souvent appelés ETP (Early Thymocyte Progenitors), entrent dans le thymus via la jonction cortico-médullaire et prolifèrent fortement suite aux signaux reçus par l'environnement thymique. L'un des signaux phares pour s'engager ensuite dans le lignage T est le signal Notch qui sera important tout au long du développement T. Néanmoins, ce processus vers un lignage restreint aux lymphocytes T est graduel et comprend des étapes successives de limitation du potentiel des cellules filles à se différencier en d'autres lignages (Koch and Radtke, 2011).

3. Développement précoce T général : DN1-4, DP, SP

Brièvement, les ETPs arrivent par voie sanguine dans le thymus au niveau la JCM, puis donnent des cellules doubles négatives (DN), caractérisées par l'absence d'expression de CD4 et de CD8, les corécepteurs du TCR des lymphocytes T. Elles sont parfois appelées triples négatives du fait de l'absence d'expression d'un TCR. Celles-ci peuvent être subdivisées en quatre différents stades de maturation basés sur l'expression de CD44 et CD25. Il s'agit des stades nommés DN1 à DN4 qui se déroulent dans le cortex. Au cours de leurs étapes de différenciation, elles perdent leur potentiel à donner respectivement des DCs/macrophages (discuté, puisque certains affirment que le potentiel

myéloïde est perdu au stade TSP), subissent un réarrangement du TCR puis s'engagent dans le lignage $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (Fahl et al., 2014).

A. A. Choix de lignage : $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$

Pour ce premier choix du lignage T, trois modèles ont été décrits (Figure 6). Le premier, stochastique (aussi appelé modèle de prédétermination), suggère que le devenir $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ est déterminé avant ou en parallèle de l'engagement du TCR. Pour les deux autres, il s'agit de modèles instructifs et donc d'un choix de lignage déterminé par la force du signal TCR : un signal TCR fort donnera un lymphocyte $T\gamma\delta$, alors qu'un signal plus faible permettra l'engagement dans le lignage $\alpha\beta$. Dans le premier modèle instructif, le choix de l'engagement dans les différentes sous-populations de $T\gamma\delta$ (innés, IFN γ , IL-17) sera concomitant et strictement dépendant de la force du signal TCR, alors que dans le second modèle instructif, une première étape permet le choix entre $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ puis, dans un second temps, le choix entre les différentes sous-populations de $T\gamma\delta$ (innés, IFN γ , IL-17) est fait. Ces modèles ne sont pas totalement mutuellement exclusifs puisque, par exemple, un état ouvert de la chromatine pour tel ou tel lignage nécessiterait un signal TCR pour terminer le processus de différenciation. De plus, il est certain que d'autres signaux entrent en jeu. En effet, Ribot et collaborateurs ont montré que l'expression ou non de CD27 sur les précurseurs des $T\gamma\delta$ détermine leur devenir entre le lignage IFN γ^+ et IL-17 $^+$ dans le thymus (Ribot et al., 2009). Il semble donc restrictif de déterminer l'avenir d'un lymphocyte T uniquement par l'importance ou non du signal TCR

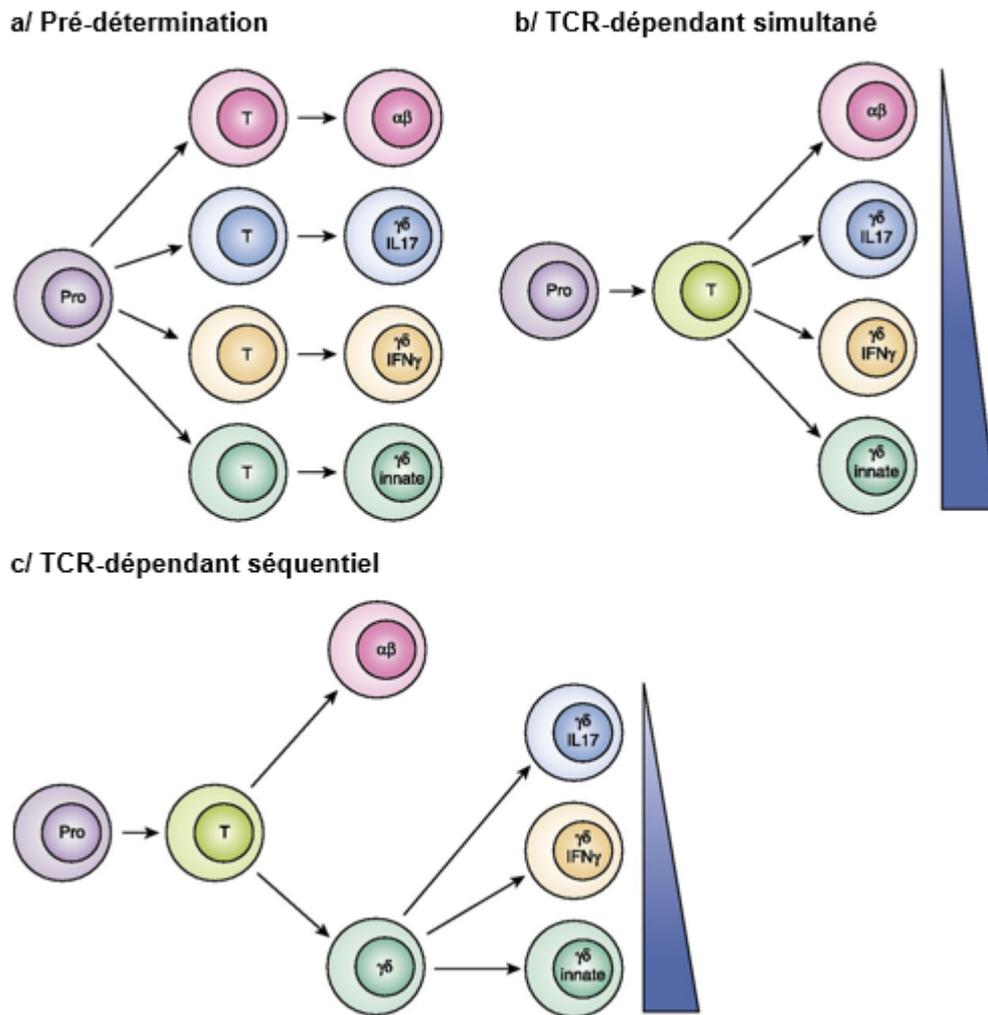


Figure 6 **Choix de lignage des lymphocytes entre $T\alpha\beta$ et $T\gamma\delta$** (issu de la référence (Fahl et al., 2014)) Schéma illustrant les différents modèles de choix de lignage du développement des lymphocytes $T\gamma\delta$. **a/** Dans le modèle de prédétermination, le choix de lignage est stochastique et antérieur ou concomitant avec l'expression du TCR. **b/** Dans le modèle TCR-dépendant simultané, le signal TCR dicte le choix de lignage entre $\alpha\beta$ (signal faible) et $\gamma\delta$ (signal fort) et de manière simultanée également le choix des sous-populations de $LT\gamma\delta$. **c/** Dans le modèle TCR-dépendant séquentiel le signal TCR détermine le devenir des $LT\gamma\delta$ en deux étapes.

B. Possibilité d'un engagement dans le lignage Treg au stade DN2

Dans notre cas, ces cellules $CD25^+CD44^{low}$ (DN2) réarrangent la chaîne bêta du TCR grâce notamment à l'expression des recombinaisons RAG (Recombination-Activating Genes) et s'apparient à une pré-chaîne invariante du TCRA ($pT\alpha$) pour former le pré-TCR. Durant ces stades, les DN vont up-réguler brièvement CD25, la chaîne alpha du récepteur de forte affinité à l'IL-2. Sachant que l'IL-2 est importante pour le développement des Tregs, on peut envisager une première « prédisposition » à devenir Treg à ce stade-là. Pennington et collaborateurs avaient évoqué une prédisposition des lymphocytes T à devenir Tregs au stade DN2 selon un modèle stochastique (Pennington et al., 2006).

Introduction

L'analyse de souris déficientes pour la chaîne pré-TCR α (et ayant donc très peu de DP) a montré que celles-ci sont enrichies en Tregs dans le thymus et la périphérie. Les thymocytes auraient donc une capacité à s'engager dans le lignage Treg dès le stade DN2 du développement des lymphocytes T, avant même la mise en place d'un TCR à proprement parler. D'après leurs observations, les DP agiraient en *trans* sur le développement des T dès leur stade DN2 pour limiter le développement de Tregs. Seuls les précurseurs n'ayant pas reçu de signal « contrôle » par les DP seraient susceptibles de devenir des Tregs, à condition d'interagir par la suite avec une cellule présentant un ligand agoniste, et cette interaction permettrait la différenciation en Tregs. Ainsi, une forte diminution de DP permettrait à un plus grand nombre de cellules d'échapper au contrôle stochastique par les DP et, de ce fait, d'acquérir un potentiel à s'engager dans le lignage Treg.

Bien que cette hypothèse n'ait pas été beaucoup reprise par la suite et qu'il est plus communément admis que la différenciation Tregs se fasse plus tard, cela suggère néanmoins une possibilité d'origine multiple des Tregs.

4. Sélection positive

Le signal donné par le pré-TCR permet aux cellules d'activer l'expression des gènes codant pour CD4 et CD8 et d'inhiber un réarrangement ultérieur du *Tcrb* (exclusion allélique). Une fois les cellules devenues doubles positives (DP), les gènes *Rag* sont ré-exprimés et permettent cette fois-ci le réarrangement du gène *Tcra*. La capacité à reconnaître le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) détermine si le TCR $\alpha\beta$ a été correctement assemblé. L'avidité de celui-ci pour le complexe CMH-peptide du soi présenté par des cTECs ou les DCs doit être suffisante pour permettre une sélection positive de la cellule T (Klein et al., 2009). La majorité des DP, qui ne sont donc pas sélectionnés positivement, meurent par négligence dans le thymus du fait de leur incapacité à passer la sélection positive. Or, plusieurs papiers soutiennent l'idée qu'une sélection négative a lieu au même moment si l'affinité ou l'avidité est trop importante pour le complexe CMH-peptide présenté. Il a été montré, en utilisant des souris BIM déficientes, que plus de 500 000 cellules sont éliminées dans le cortex d'une souris tous les jours (Klein et al., 2014; Stritesky et al., 2013). Les cTECs seraient en charge de délivrer le signal de haute affinité sans pour autant être capables d'éliminer les lymphocytes T autospécifiques et ce seraient ensuite les DC CD11c⁺ qui induiraient l'apoptose de ces

Introduction

cellules (McCaughy et al., 2008). Cette délétion concernerait principalement les lymphocytes T ayant un TCR spécifique pour des auto-antigènes ubiquitaires (Legoux et al., 2015; McCaughy et al., 2008).

Comme nous le verrons par la suite, le développement de Tregs thymiques est concomitant à la sélection négative de T conventionnels ayant une trop forte affinité pour le soi. Il est donc possible qu'un développement Treg ait lieu parallèlement à une sélection négative corticale à partir de thymocytes DP. Certains groupes ont en effet observé un développement de certains rares Tregs à partir de cellules DP (Liston et al., 2008; Ribot et al., 2007). Ces résultats sont néanmoins contestés par d'autres qui supposent qu'il ne s'agirait majoritairement que d'une mauvaise exclusion des doublets en cytométrie en flux (Lee and Hsieh, 2009).

Pourtant, si l'on considère le fait que les CD4SP, tout comme les CD8SP, comprennent des cellules Tregs Foxp3⁺, on peut se demander si ces Tregs CD4⁺ et CD8⁺ proviennent de deux programmes de différenciation distincts ou bien si un précurseur commun ou un imprinting vers le lignage Treg existe dès le stade DP. Une étude épigénétique menée sur le développement Treg suggère que Satb1, un facteur de transcription agissant en organisateur de chromatine, serait un facteur pionnier du développement Treg (Kitagawa et al., 2017). Satb1 est exprimé dès le stade DP à des niveaux très élevés et permettrait un remodelage épigénétique permissif pour des super-enhancers Treg spécifiques (Treg-SE). Ainsi, un imprinting épigénétique serait possible dès le stade DP et retranscrit dans les CD4SP et CD8SP. Cette partie sera abordée plus en détail par la suite.

L'étape de sélection positive permet donc non seulement l'engagement dans le lignage CD4SP (CD4⁺CD8⁻) ou CD8SP (CD4⁻CD8⁺) mais il est également possible que certaines cellules s'engagent déjà plus spécifiquement ou plus rapidement dans le lignage Treg à ce stade-là.

5. Choix de lignage CD4/CD8

Au stade DP, les lymphocytes T expriment les deux corécepteurs CD4 et CD8. Ces corécepteurs sont des protéines transmembranaires dont la fonction première est de promouvoir l'engagement du TCR avec le complexe CMH-peptide et, ensuite, de renforcer la transduction du signal TCR *via* leur partie intracellulaire. Les co-récepteurs CD4 et CD8 se lient de manière spécifique au CMH de classe II (CMH-II) et de classe I (CMH-I) respectivement. Ainsi, au stade DP, les cellules peuvent s'engager avec les deux classes de CMH et c'est cet engagement qui déterminera l'avenir du thymocyte vers un lignage donné. Plusieurs modèles ont été décrits pour le choix de lignage CD4/CD8. Un premier

Introduction

modèle stochastique propose une perte de l'expression aléatoire de CD4 ou du CD8 lors d'une première interaction du TCR, avec un complexe CMH-peptide donnant lieu à un thymocyte ayant une courte durée de vie et qui nécessite un second signal TCR de sauvetage pour donner un thymocyte mature et éviter une mort cellulaire dans le cas d'un mésappariement TCR-co-récepteur (Singer et al., 2008). En accord avec ce modèle, il a été montré que des souris $\beta 2M^0$, n'ayant donc pas de CMH-I, présentaient des cellules activées $CD4^{int}CD8^+$ mais pas de thymocytes $CD8^+$ matures. Cela suggère que l'engagement dans le lignage CD8 n'était pas dépendant de l'interaction du TCR avec le CMH et donc stochastique, mais que celui-ci était nécessaire pour finaliser l'engagement dans le lignage CD8 (Van Meerwijk and Germain, 1993).

Ce modèle a longtemps été opposé à des modèles instructifs pour lesquels la force du signal TCR ou bien sa durée instruisent le choix de lignage du thymocyte (Singer et al., 2008). Un signal TCR faible ou court induirait une perte de l'expression de CD4 et un engagement dans le lignage CD8, alors qu'un signal TCR fort ou de longue durée permettrait un maintien de l'expression de CD4 et donc un développement de thymocytes CD4SP. Une première interaction du TCR avec un complexe CMH-peptide donne des précurseurs $CD4^+CD8^{low}$ qui, d'après le modèle instructif, ne seraient pas encore engagés dans un lignage. En effet, il a été montré plus tard que ces cellules sont capables de donner à la fois des CD4SP et des CD8SP. D'après ce modèle, il s'agirait d'une internalisation du CD8 et non d'une diminution de sa transcription, permettant donc d'avoir des DP avec la même quantité d'ARN pour CD4 et CD8. Ces données ont été contredites par la suite et des expériences ont montré qu'il s'agissait bien d'une diminution de l'expression de *Cd8* (Singer et al., 2008).

Finalement, grâce à des modèles murins déficients pour CMH-I et CMH-II, Singer et ses collègues ont décrit un modèle qui prévaut jusqu'à ce jour : le modèle de signalisation cinétique (Brugnera et al., 2000) (Figure 7). Ce modèle est basé sur des observations qui ne pouvaient pas être réconciliées avec les modèles classiques stochastiques ou instructifs. Lors de la sélection positive, le signal TCR reçu par les DP entraîne un arrêt de la transcription du gène *Cd8*, alors que la transcription de *Cd4* est maintenue et ce de manière CMH-indépendante. Cette interaction donne des thymocytes $CD4^+CD8^{low}$ ayant toujours la capacité à s'engager dans les deux lignages. Dans les modèles classiques, la perte d'expression de l'un des co-récepteurs était irréversible. Ensuite, si le signal TCR persiste en l'absence de CD8, le thymocyte devient CD4SP. A l'inverse, si la perte d'expression de *Cd8* entraîne un arrêt du signal TCR, le thymocyte s'engagera dans le lignage CD8SP. Cette inversion du co-récepteur serait

sous l'influence de la signalisation *via* l'IL-7. Ainsi la différenciation en CD4SP serait sous l'influence du signal TCR, alors que la différenciation en CD8SP serait dépendante d'un signal cytokinique.

D'un point de vue transcriptionnel, deux facteurs de transcription essentiels pour l'induction des lignages T helper (CD4SP) et T cytotoxique (CD8SP) : ThPOK et RUNX3 respectivement (Taniuchi, 2018). Le signal TCR reçu lors de la sélection positive des DP permettrait l'expression de Th-POK et si le signal est maintenu, l'expression de Th-POK serait augmentée et permettrait une expression plus forte et stable de CD4 et une inhibition du signal IL-7 par la voie SOCS. Inversement, si le signal n'est pas maintenu, l'IL-7 permettrait l'expression de RUNX3 qui serait responsable de l'inhibition de l'expression de CD4 et l'up-régulation de l'expression de CD8.

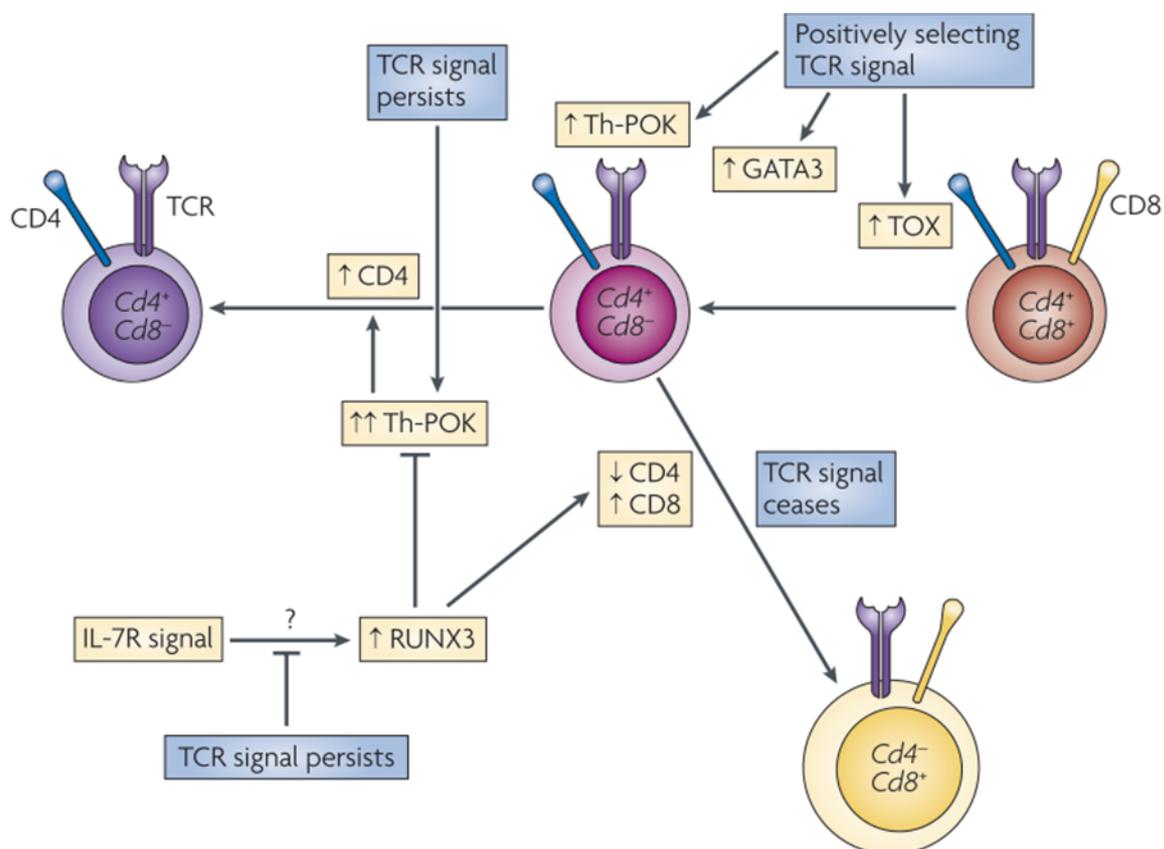


Figure 7 **Choix de lignage des lymphocytes entre lymphocytes T CD4 et CD8** (issu de Singer *et al.*, Nat. immunol. 2008) Schéma illustrant le choix de lignage entre T CD4 et CD8. Indépendamment de la spécificité du TCR, le signal TCR de la sélection positive des DP induit l'arrêt de l'expression de Cd8 et l'expression de facteurs de transcriptions (Th-POK, GATA3, TOX). Le thymocyte devient CD4⁺CD8^{low}. Si le signal TCR persiste, la production d'IL-7 est bloquée et donc l'expression de RUNX3 et l'engagement dans le lignage CD8. L'expression de Th-POK est augmentée et le lymphocyte T s'engage vers le lignage CD4. A l'inverse, si le signal TCR s'arrête, l'IL-7 induit l'expression de RUNX3 qui inhibe l'expression de Th-POK et CD4, permet la réexpression de CD8 et donc l'engagement dans le lignage CD8.

Introduction

Une récente étude suggère que Satb1, un facteur de transcription exprimé au stade DP qui module l'accessibilité de la chromatine, participerait au choix de lignage CD4 versus CD8 en régulant l'accessibilité des gènes codant pour les facteurs de transcription Th-POK et RUNX3 (Kakugawa et al., 2017). L'absence de Satb1 altère fortement l'engagement dans les lignages CD4 et CD8 notamment en induisant une expression non contrôlée des gènes spécifiques pour ces lignages tels que Thpok et Runx, respectivement.

Ainsi, l'embranchement non réversible du lignage T permet une différenciation soit en CD8SP, futur potentiel cytotoxique, soit en CD4SP, les « helper » des réponses immunitaires T. Il s'agirait donc à nouveau d'un choix de lignage gouverné non seulement par une signalisation TCR, mais également d'autres signaux, notamment cytokiniques qui induisent l'expression de facteur de transcription dont l'accessibilité et l'action sont dépendants du contexte épigénétique.

Avant de pouvoir quitter le thymus et exercer leurs fonctions en périphérie, ces thymocytes compétents doivent passer une sélection dite négative afin d'éliminer les cellules au potentiel auto-spécifique. Lors de ce processus, une différenciation en Tregs est possible pour les deux lignages, bien que celle des CD4SP soit bien plus conséquente et étudiée à ce jour.

6. Sélection négative

A. Migration des thymocytes du cortex vers la médulla

Les CD4SP et CD8SP sélectionnés positivement dans le cortex doivent ensuite migrer vers la médulla pour une étape finale de sélection négative avant de pouvoir quitter le thymus. Cette migration est rendue possible au travers de l'expression de récepteurs aux chimiokines par les thymocytes SP post-sélection positive d'une part, et de l'expression de chimiokines par les différentes cellules stromales médullaires d'autre part. Deux axes chimiokiniques majeurs pour la migration cortico-médullaire des thymocytes ont été décrits dans la littérature.

Un premier axe chimiokinique permet la migration cellulaire des thymocytes après la sélection positive vers la médulla : CCR4-CCL17/22 (Hu *et al.*, 2016). CCR4 est exprimé très précocement après la sélection positive par les thymocytes et la production des ligands pour ce récepteur est assurée par cellules dendritiques thymiques présentes au niveau de la médulla.

Introduction

Un second récepteur aux chimiokines, CCR7, est exprimé par les thymocytes ayant passé la sélection positive et permet également leur migration vers la médulla où sont produits les ligands pour ce récepteur (CCL19/CCL21) par les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTECs) (Witt and Robey, 2004). Cet axe chimiokine-récepteur est indispensable pour la migration cortico-médullaire des thymocytes, mais semble également important pour l'établissement de la tolérance centrale en permettant une sélection négative des thymocytes auto-réactifs pour des antigènes tissulaires par des mTECs (Kurobe et al., 2006; Nitta et al., 2009).

Une absence d'expression de CCR7 ou CCR4 à la surface des cellules T en développement entraîne une accumulation de T autoréactifs dans le thymus, suivie du développement d'une auto-immunité sévère démontrant l'importance de ces axes chimiokiniques dans la mise en place d'une tolérance centrale. En effet, les chimiokines permettent d'attirer les thymocytes vers les cellules stromales, principalement les mTECs et les DCs, qui seront en charge de présenter des antigènes du soi afin de sélectionner négativement, par anergie ou délétion, les T autospécifiques (Gallegos and Bevan, 2004; Oukka *et al.*, 1996). Il faut cependant noter que ces axes chimiokiniques sont également importants pour d'autres types cellulaires : par exemple, CCR7 est exprimé par les DC Sirpa⁻ et une délétion de CCR7 entraîne l'apoptose de ces cellules, contrebalancée par une expansion des DC Sirpa⁺ qui induisent une proportion plus importante de Treg (Hu et al., 2017). De même, cet axe semble important dans le développement des NKT en leur permettant d'accéder à des sources d'IL-15 (White et al., 2014). Le récepteur aux chimiokines CCR2, quant à lui, est crucial pour recruter les cDC, pDC et macrophages depuis la périphérie vers le thymus (Lopes et al., 2018). Ces cellules étant importantes pour la sélection négative, une modulation de l'expression du récepteur ou du ligand impacte grandement ce mécanisme. En effet, Lopez et collaborateurs ont montré qu'une déficience en lymphotoxine alpha (Lta) conduit à une augmentation de l'expression des ligands de CCR2 dans le thymus et, de ce fait, à une augmentation de la sélection négative.

Les axes chimiokiniques sont donc importants pour l'adressage des thymocytes aux différentes cellules stromales et *a fortiori* aux signaux délivrés par ceux-ci. Ainsi, une hétérogénéité d'expression des récepteurs aux chimiokines pourrait engendrer des différences développementales pour une population donnée.

B. Présentation antigénique et composition cellulaire de la médulla

Les antigènes du soi présentés par le stroma médullaire sont composés principalement des antigènes tissulaires spécifiques (TSA), de gènes de ménage exprimés de manière ubiquitaire, ainsi que d'antigènes apportés de la périphérie par voie sanguine ou par certains types cellulaires recirculants vers le thymus. Quelle est la contribution de ces différents antigènes du soi à la sélection négative et au développement Treg ? D'après une récente publication, les antigènes exprimés de manière ubiquitaire seraient les seuls à induire la délétion clonale, alors que les TSA induiraient plutôt des Tregs et donc une tolérance périphérique (Legoux et al., 2015). Les Tconv reconnaissant ces mêmes TSA ne subiraient donc pas de sélection négative, mais seraient contrôlés dans le tissu par les Tregs ayant émigré du thymus. Néanmoins, des études comparatives de répertoires Tconv et Treg thymiques semblent indiquer un recoupement plutôt faible qui suggérerait une délétion d'une grande partie des Tconv autospécifiques ou bien leur différenciation en Tregs. De la même manière, des modèles doubles transgéniques, pour lesquels l'antigène est exprimé dans le thymus (Rip-OVA) et les thymocytes, sont TCR transgéniques (OT-II ou OT-I) et présentent une diminution drastique du développement des Tconv (Hubert et al., 2011).

Comme l'indique leur nom, les antigènes tissulaires ou TSA (Tissu Specific Antigens) ne sont exprimés normalement qu'en périphérie dans le tissu approprié. Pour permettre la mise en place d'une tolérance centrale, il est nécessaire que les cellules stromales soient capables de présenter directement ou indirectement ces TSA dans le thymus. Les mTECs possèdent divers mécanismes pour présenter dans le thymus différents TSA (Derbinski et al., 2001; St-Pierre et al., 2015). Les DCs, en revanche, ne possèdent pas ces mécanismes, mais peuvent présenter indirectement les TSA exprimés par les mTECs (Hubert et al., 2011) ou bien rapporter des antigènes rencontrés dans la périphérie.

Brièvement, les mTECs se développent à partir d'un précurseur commun partagé avec les cTECs, du moins chez la souris adulte (Ulyanchenko et al., 2016). Des signaux, principalement de la famille des TNF récepteurs (LT β R, CD40 et RANK), sont nécessaires au développement des mTECs afin d'inhiber l'expression de molécules cTEC-spécifiques (ex. : Ly51) et d'exprimer des molécules mTECs spécifiques (ex. : UEA-1). L'absence d'un seul de ces signaux conduit à une sélection anormale des thymocytes dans le thymus et au développement d'une pathologie auto-immune généralisée (Akiyama et al., 2008; Hikosaka et al., 2008). Ceci montre l'importance des mTECs dans la mise en place d'une tolérance centrale et/ou pour le développement de tTregs.

Introduction

Ce sont principalement les mTECs dites « matures », c'est-à-dire exprimant un niveau élevé de CMH-II et CD80/86, qui sont capables de sélectionner négativement des T ayant un potentiel auto-spécifique. Ces cellules sont capables d'exprimer un large panel de TSA grâce à deux régulateurs de transcriptions : AIRE (Derbinski et al., 2001) et Fezf2 (Takaba et al., 2015). L'absence d'expression de l'une ou l'autre molécule dans les mTECs induit un développement d'une pathologie auto-immune plus ou moins sévère, démontrant l'importance de celles-ci dans le processus de sélection négative. Néanmoins, ces deux molécules présentent un nombre important de différences listées ci-après dans le tableau (Table 3 inspiré de la référence (Takaba and Takayanagi, 2017)).

Table 3 Comparaison des deux régulateurs de transcription, AIRE et Fezf2

	FEZF2	AIRE
<i>METHODE D'EXPRESSION DES TSA</i>	Liaison à l'ADN. Régulation directe de l'expression	Pas de liaison à l'ADN. Régulation épigénétique
<i>POPULATION(S) L'EXPRIMANT</i>	mTEC ^{lo} , mTEC ^{hi}	mTECs matures, LB
<i>SIGNAL ACTIVATEUR</i>	LTβR ou RANK (Cosway et al., JEM 2017)	RANK/CD40
<i>INDUCTION DE CHIMIOKINES</i>	?	Oui
<i>SELECTION NEGATIVE</i>	Oui	Oui
<i>DEVELOPPEMENT TREG</i>	?	Oui
<i>DEVELOPPEMENT γδT</i>	?	Oui
<i>TRANSFERT DE TSA VERS DCS</i>	?	Oui

Il est important de souligner que les répertoires de TRAs exprimés grâce à ces deux molécules sont peu similaires (Takaba and Takayanagi, 2017). Fezf2 et AIRE ont donc des rôles complémentaires et non redondants pour assurer aux mTECs une couverture large en terme de TSAs exprimés et donc de sélection négative/développement Treg.

A cela s'ajoutent d'autres populations de CPA capables de participer à ce processus (Lopes et al., 2015) qui enrichissent encore cette diversité de présentation antigénique.

Introduction

Trois populations de DCs présentes dans le thymus participent à la sélection négative : les DCs résidentes du thymus ($CD8a^+Sirpa^-$), les DCs migratoires ($CD8a-CD11b^+Sirpa^+$) ainsi que les DC plasmocytoïdes (pDC) ($CD11c^{int}PDCA1^+$) (Wu and Shortman, 2005). Les DCs migratoires et les pDCs se développent en périphérie, puis migrent vers le thymus pour présenter des antigènes dérivés du sang et des tissus (Bonasio et al., 2006). Concernant leurs rôles respectifs dans la sélection négative et la différenciation Treg, il semblerait que les trois participent à la délétion clonale, mais que seuls cDC migratoires et résidentes participent également à l'induction de tTregs (Lopes et al., 2015). D'après Perry et ses collaborateurs, les DCs $Sirpa^+$ participeraient à la sélection Treg de TSA AIRE-indépendants alors que les DCs $CD8a^+$ auraient pour rôle de présenter des TSAs provenant de mTECs (Perry et al., 2014).

Cette complexité des DCs participant à la sélection négative permet de couvrir un large champ d'antigènes du soi et ainsi de supprimer une grande majorité des T autospécifiques. En effet, les répertoires antigéniques des mTECs et des DCs ne sont que partiellement redondants, puisqu'une délétion spécifique du CMH-II des DCs ou des mTECs induit un répertoire TCR différent de Tconv en développement (Perry et al., 2014).

C. Anergie, délétion ou différenciation en Treg ?

Pour ce qui suit, nous nous concentrerons principalement sur les lymphocytes T $CD4^+$. En effet, une fois les $CD4SP$ arrivés dans la médulla, ils peuvent être sélectionnés négativement s'ils présentent un TCR auto-spécifique reconnaissant un peptide présenté par les CPA thymiques. Cette sélection négative se traduit par la délétion ou l'anergie du lymphocyte T auto-spécifique selon la cellule stromale avec laquelle il interagit. Néanmoins, la mort ou l'anergie ne sont pas la seule issue de cette interaction : en effet, le $CD4SP$ peut également, à ce stade-là, se différencier en tTreg. Bien qu'il existe des modèles et des études concernant la raison pour laquelle la cellule va devenir un Treg plutôt qu'être délétée, il n'y a pas à ce jour de preuve absolue du ou des signaux qui orientent le devenir de la cellule vers sa suppression ou son développement en Treg.

La première question, traitée ci-dessus, est de savoir si, à ce stade-là, le lymphocyte est déjà ou non engagé dans le lignage Treg. Si c'est le cas, on peut supposer, comme suggéré dans les papiers de Kitagawa et collaborateurs, que le précurseur Treg possède déjà une conformation de la chromatine qui offre une accessibilité aux gènes permettant de devenir Treg (notamment *foxp3*) et que, par

Introduction

conséquent, les signaux que le précurseur reçoit par son environnement permettent son engagement dans le lignage Treg. En revanche, si la chromatine pour ces gènes est en conformation fermée, les signaux reçus induiront la mort de la cellule.

Outre la prédisposition à devenir un Treg ou non, ce serait donc le signal TCR qui jouerait un rôle majeur dans le choix de l'induction de la mort cellulaire versus la différenciation en Treg (Hassler et al., 2019; Li and Rudensky, 2016) (Figure 8). En effet, il a été montré qu'un signal TCR de forte intensité promeut le développement de Tregs, puisque ceux-ci expriment des niveaux plus élevés - notamment de Nur77, dont l'expression est proportionnelle à la force d'intensité du signal TCR -, que les Tconv (Moran et al., 2011). Néanmoins, une comparaison avec le niveau exprimé par des cellules mortes, c'est-à-dire des Tconv auto-spécifiques n'est pas possible, à moins de forcer la survie de ces cellules. Différentes équipes s'étaient attelées à comprendre la proportion de cellules qui seraient délétées lors du développement, avec des résultats très variables, de 5 à 50% de cellules ayant subi la délétion clonale (Klein et al., 2019; Van Meerwijk et al., 1997). Finalement, sur la base de ces travaux, l'équipe d'Hogquist a réussi l'exploit de mesurer la délétion clonale et de la relier à l'intensité du signal TCR en utilisant des souris rapportrices Nur77-GFP croisées avec des souris BIM-déficientes. L'expression de Bcl2l11, le gène codant pour les molécules proapoptotique Bim, est nécessaire à la délétion clonale. De ce fait, ils ont pu estimer le nombre de cellules qui, chez ces souris, auraient dû subir une délétion clonale. Ces cellules exprimaient un niveau élevé de Nur77, preuve que ce sont les cellules recevant un fort signal TCR qui sont délétées. Ces niveaux de Nur77 étaient comparables aux tTregs en développement, semblant indiquer que la seule force du signal TCR ne décide pas du devenir d'une cellule. En effet, il semblerait que la force du signal TCR ne soit pas le seul paramètre pour déterminer si une cellule auto-spécifique sera délétée ou deviendra Treg, puisqu'il a été montré qu'il existait un recoupement du répertoire TCR des Tregs et des Tconv ayant un potentiel auto-réactif (Hsieh et al., 2006). De plus, il a été montré que pour un TCR donné, si l'antigène qu'il reconnaît est absent, aucun Treg ne se développe, alors que, lorsqu'il est exprimé, aussi bien l'apoptose de Tconv que la différenciation en Treg ont lieu (Jordan et al., 2001; Klein and Jovanovic, 2011). Récemment, Klein et son équipe ont affiné ces résultats en montrant que pour un auto-antigène donné (ici PLP, un auto-antigène exprimé par le CNS) ce serait l'affinité du TCR, son degré de réactivité à l'antigène, qui dirigerait un thymocyte autospécifique vers une délétion ou un développement Treg (Hassler et al., 2019). Néanmoins, dans son modèle, il observe un nombre quasi équivalent de C4SP positives pour le

Introduction

tétramère spécifique des clones reconnaissant l'autoantigène en question. Il est donc probable que d'autres signaux limitants entrent en jeu pour orienter la destinée des thymocytes auto-spécifiques et nous discuterons par la suite de la contribution de chacun à la différenciation en Treg. Ainsi, l'importance prévalente du signal TCR dans le choix de lignage pour devenir un Treg en fait un modèle instructif pour le développement des Tregs, opposé au modèle stochastique de Pennington.

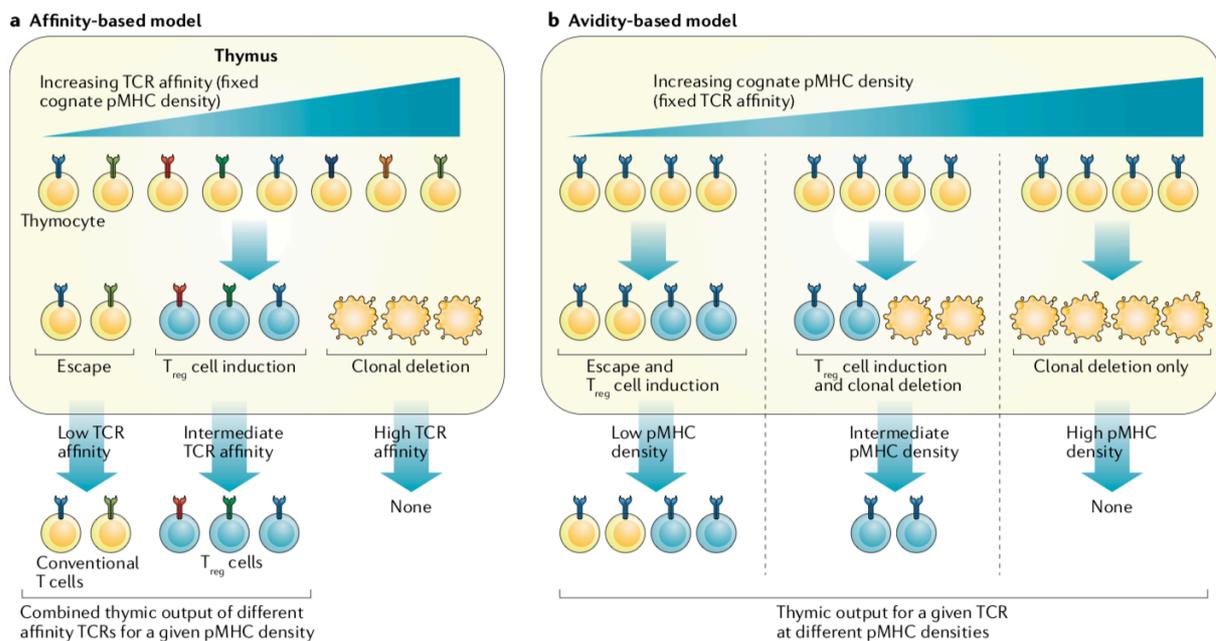


Figure 8 **Choix de lignage entre délétion et différenciation en lymphocytes T régulateurs basé sur la force du signal TCR.** (issu de la référence (Klein et al., 2019)) Le terme affinité décrit la force d'une interaction unique entre un récepteur de cellules T (TCR) et son ligand CMH-peptide (pMHC), alors que le terme avidité signifie que la force de signal est proportionnelle à la somme de ces interactions. **a/** Selon un modèle de développement des thymocytes basé sur l'affinité, lorsque la densité de peptide-MHC est fixée, les lymphocytes T portant les TCR de plus haute affinité sont supprimés par délétion clonale, tandis que les lymphocytes T portant des TCR d'affinité intermédiaire se différencient en lymphocytes T régulateurs (Treg). Les lymphocytes T portant des TCR de faible affinité s'échappent vers la périphérie sous forme de lymphocytes T conventionnels. **b/** Un modèle basé sur l'avidité postule qu'en plus de l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide, la densité de ce dernier est également cruciale. Si l'on fixe l'affinité du TCR (un seul ligand), l'augmentation ou la diminution de la densité de l'antigène présenté sur les cellules présentant l'antigène thymique biaisera le destin du thymocyte vers la délétion clonale ou la différenciation des cellules Treg, respectivement.

Un papier a tenté de réconcilier ces deux théories en utilisant un modèle de souris ayant une chaîne TCR β transgénique provenant d'un TCR de Treg (Ku et al., 2016). Contrairement à d'autres études préalables, le TCR transgénique de ces souris a été inséré sur le locus endogène du TCR permettant de ce fait une expression plus physiologique (SCNT-TCR). Dans ce modèle, la seule expression de la chaîne bêta du TCR permet de forcer un développement CD4 plutôt que CD8, sans pour autant augmenter le nombre de Tregs. En revanche, la capacité de ces CD4SP à se différencier *in vitro* en Treg

Introduction

est accrue. Ainsi, ceci réconcilierait les deux modèles, puisque le signal TCR prédisposerait mais ne serait pas suffisant pour donner des Tregs en l'absence d'autres signaux instructeurs limitants.

Les données de la littérature suggèrent que différents paramètres intrinsèques et extrinsèques aux thymocytes participent au choix du devenir d'un T possédant un TCR de haute affinité, voué soit à devenir Treg ou bien à être délété (Klein et al., 2019). Pour commencer, l'intensité du signal TCR ne dépend pas uniquement de l'affinité de celui-ci pour l'antigène présenté, mais également de l'avidité. En effet, l'affinité dépend de la force d'interaction entre un seul TCR et le complexe CMH-peptide alors que l'avidité donne un signal qui est supérieur à la somme des forces d'interaction. Ainsi, un antigène présenté de manière dense à la surface de la CPA n'aura pas le même impact que s'il est sous-représenté : autrement dit, pour une même affinité donnée, le devenir de la cellule T peut être différent. De même, la durée d'interaction entre le CD4SP et la cellule stromale pourrait être importante. Une seule interaction de longue durée serait délétère, alors qu'une succession d'interactions de courte durée permettrait une différenciation en Treg grâce à une accumulation progressive du signal.

Finalement, il est possible que des signaux limitants créent des « niches » pour le développement Treg. Qu'il s'agisse de molécules telles que les cytokines ou bien l'antigène lui-même, si ceux-ci sont présents en quantités restreintes, l'accessibilité à ces signaux pourrait décider du devenir d'une cellule vers le lignage Treg ou bien une délétion clonale. Ces signaux, notamment cytokiniques, permettraient la survie de la cellule en contrecarrant l'effet pro-apoptotique induit par la reconnaissance d'un complexe CMH-peptide du soi. Un papier décrit *foxp3* comme induisant un signal pro-apoptotique menant à la mort de la cellule, à moins d'un sauvetage par un signal cytokinique (Tai et al., 2013a). Dans ce cas, un CD4SP reconnaissant le soi pourrait exprimer *foxp3* et ainsi s'engager dans le lignage Treg mais sa survie serait conditionnée par la limitation en signaux de survie.

Dans la partie suivante nous traiterons donc des différents signaux intervenant lors de la sélection négative et leur influence sur le développement des Tregs dans le thymus.

7. Sortie du thymus

A leur arrivée dans la médulla, les CD4SP ont donc différentes destinées possibles : s'ils reconnaissent le soi, ils sont soit supprimés ou anergisés, ou bien s'engagent dans le lignage Tregs ; s'ils ne reconnaissent pas le soi avec une forte affinité, ou bien s'ils ont réussi à compléter leur différenciation

en Treg, ils sont aptes à quitter le thymus. Pour cela, il est nécessaire qu'ils expriment le récepteur à la sphingosine 1 phosphate (S1P1 ou S1PR1) qui leur permet de détecter le gradient du ligand à S1P1, S1P, sécrété par les péricytes situés au niveau de la jonction cortico-médullaire (JCM) et donc très enrichi dans la circulation sanguine (Matloubian et al., 2004; Thangada et al., 2010). Ceci leur permet alors de quitter le thymus pour aller exercer leurs fonctions respectives dans la périphérie.

III. Développement des lymphocytes T régulateurs

1. Précurseurs potentiels des Tregs

L'origine des Tregs thymiques reste à ce jour un sujet de discussion. En effet, même si l'on exclut la possibilité des Tregs de se développer avant le stade CD4SP (décrit ci-avant), plusieurs précurseurs potentiels des Tregs restent décrits à ce jour.

A. Les précurseurs CD25⁺Foxp3⁻

Les précurseurs « classiques » sont ceux décrits par Hsieh dans son two step model, à savoir les CD4SP exprimant CD25, la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2, sans pour autant avoir encore exprimé Foxp3 (CD25⁺Foxp3⁻) (Lio and Hsieh, 2008). Ces cellules auraient déjà reçu un signal *via* leur TCR et seraient en phase de devenir Treg, une fois le signal cytokinique reçu qui leur permettrait d'up-réguler Foxp3. Ces cellules proviendraient du pool de CD4SP n'exprimant ni CD25 ni Foxp3.

B. Les pré-précurseurs CD122⁺CD25⁻Foxp3⁻

Une autre équipe a décrit une population cellulaire de pré-précurseurs CD122⁺CD25⁻Foxp3⁻ qui serait prédisposée à exprimer CD25 dans un premier temps puis Foxp3 (Schuster et al., 2017). Dans ce papier ils se concentrent davantage sur les signaux intracellulaires nécessaires au développement des Tregs. Plus précisément, ils ont étudié l'implication des différentes sous-unités de NF-kB (cREL et I_{k_{BNS}}) dans le développement des différents précurseurs Tregs. D'après eux, l'expression de CD122, la chaîne bêta du récepteur à l'IL-2, est antérieure à celle de CD25 et leur expression ne dépend pas de la même sous-unité de NF-kB. L'expression de c-REL est importante pour la formation des précurseurs CD25⁺ à partir de cellules CD122⁺, pour ensuite donner des Treg CD25⁺Foxp3⁺. Par contre, une voie alternative passerait par l'expression de CD122 et I_{k_{BNS}} pour former des Tregs, mais serait indépendante de CD25 et c-REL. Cette hypothèse est soutenue par le fait que seul un double KO

cREL/I κ BNS supprime totalement le développement Treg. Ces résultats suggèrent donc une voie de développement alternative dépendante d'I κ B_{NS}, qui n'influe pas sur l'expression de CD25, mais est importante pour l'expression de Foxp3.

C. Les précurseurs CD25⁺ Foxp3⁺

On pourrait relier ces résultats à d'autres papiers suggérant une voie de développement alternative à celle passant par les précurseurs CD25⁺, à savoir celle passant par des cellules ayant une expression faible de *foxp3* et n'exprimant pas CD25. En effet, lorsqu'on observe le marquage en cytométrie de CD25 versus Foxp3 sur les CD4SP en développement, une partie de ces cellules exprime Foxp3 sans pour autant exprimer CD25. Deux papiers de la même équipe ont décrit ces cellules CD4⁺Foxp3^{lo} qui seraient également des précurseurs des Tregs CD25⁺ (Marshall et al., 2014; Owen et al., 2019). Très récemment, Schuster et collaborateurs ont publié des résultats complémentaires à leur papier initial sur l'implication des sous-unités NF κ B dans le développement Treg, indiquant en effet qu'I κ B_{NS} serait impliqué dans la voie dite « alternative » de développement Treg, passant par un précurseur Treg CD25⁺Foxp3^{lo} (Schuster et al., 2019).

A ce jour, deux voies de développement de Treg à partir de CD4SP sont considérées, l'une passant par l'expression de CD25 puis l'up-régulation de Foxp3, l'autre par l'expression faible de Foxp3 et une acquisition plus tardive de CD25.

Quelle que soit la voie de développement considérée, ces résultats montrent que les précurseurs Tregs nécessitent des signaux spécifiques ainsi que la mise en place de mécanismes moléculaires complexes pour devenir un Treg mature capable d'exercer ses fonctions immunosuppressives. La plupart de ces signaux sont reçus par les Tregs dès leur développement thymique, puisque même s'ils reçoivent des instructions complémentaires en périphérie, ces cellules sont fonctionnelles à leur sortie du thymus.

2. Signaux nécessaires au développement Treg

Tout comme pour la différenciation des Tconv en périphérie, la différenciation des thymocytes en Tregs nécessite trois principaux signaux : le signal TCR, le signal de co-stimulation ainsi qu'un signal cytokinique (Burchill et al., 2007). Ici nous discuterons du rôle et de la contribution relative de chacun de ces signaux dans le développement des tTregs, afin de comprendre la nécessité ou redondance de ces signaux et leur impact sur l'hétérogénéité éventuelle des Tregs ainsi formés (Figure 9).

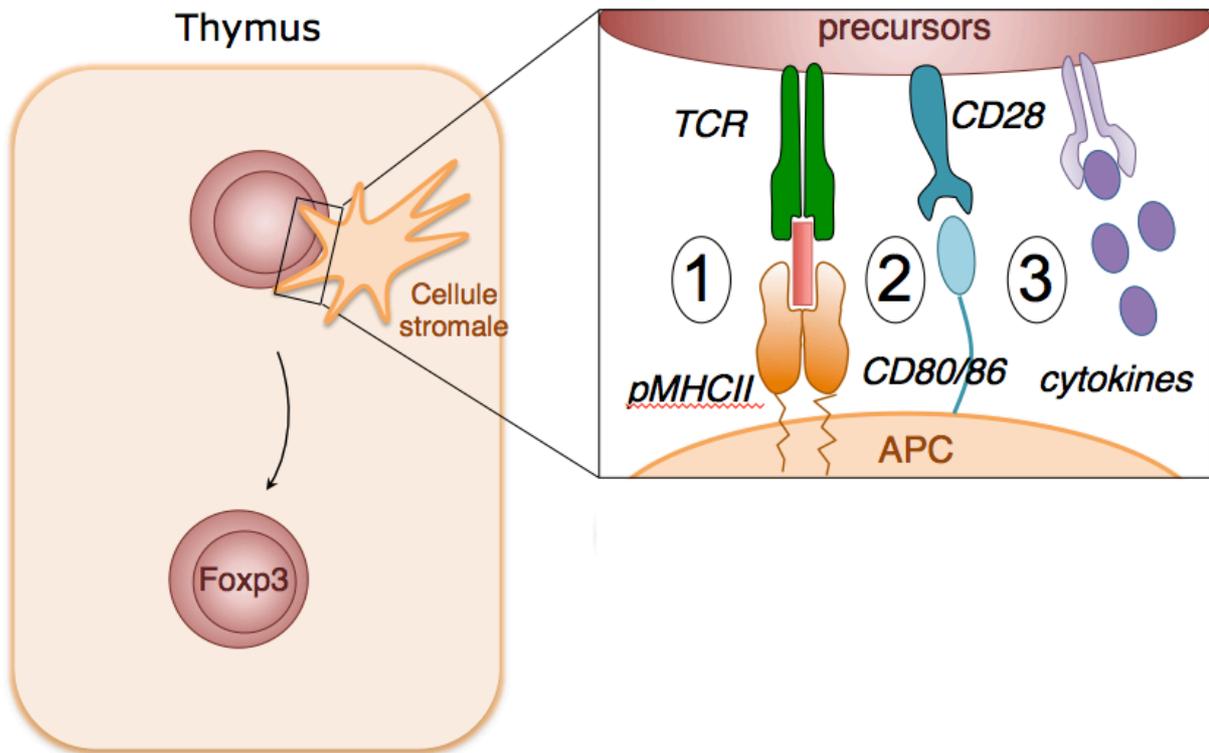


Figure 9 **Signaux nécessaires au développement des Tregs** Schéma illustrant les principaux signaux nécessaires au développement des lymphocytes T régulateurs (Tregs). Trois signaux ont été décrétés indispensables pour un développement correct de Treg dans le thymus: (1) Le signal TCR reçu lorsque le précurseur Treg reconnaît un complexe CMH-peptide avec une avidité suffisante, (2) le signal de co-stimulation et finalement (3) le signal cytokinique délivré par des cytokines possédant une chaîne gamma dans leur récepteur. Ces signaux sont délivrés par les cellules stromales, principalement les DCs et les mTECs.

A. Signal 1 : TCR

Le signal en aval du TCR est important pour décider du devenir du thymocyte. Les Tregs expriment fortement des molécules telles que CD5 ou SHP-1. Celles-ci traduisent un fort signal TCR reçu par le thymocyte, mais leur fonction est d'exercer un rétrocontrôle négatif de la force du signal TCR. Chez les souris déficientes pour ces molécules, une fréquence plus importante de Tregs se développe : un fort signal *via* le TCR favorise donc le développement en Treg (Josefowicz et al., 2012). De même, des modèles simples ou doubles transgéniques pour un TCR et son ligand montrent que pour obtenir un développement de Treg, il faut l'expression d'un TCR et de son ligand agoniste dans le thymus.

Concernant la force du signal en aval du TCR, celle-ci ne traduit pas uniquement l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide présenté, mais dépend également de l'avidité (Lee et al., 2012; Simons et al., 2010). En d'autres termes, l'affinité du TCR pour son ligand fait référence à la force de liaison pour

Introduction

celui-ci de manière individuelle, alors que l'avidité concerne la force globale de la liaison entre les TCR et les complexes CMH-peptide du thymocyte. Ainsi, la nature du ligand présenté peut influencer la force du signal pour un TCR donné, tout comme la quantité de ce ligand présenté par la cellule stromale avec laquelle le thymocyte interagit.

Lee et ses collègues montrent, en utilisant un modèle transgénique complexe avec des TCR ayant une affinité plus ou moins grande pour OVA et une présentation d'OVA par les mTECs (RipOVA), qu'une échelle assez large d'affinité pour l'antigène permet une différenciation en Treg, mais que celle-ci reste proportionnelle quantitativement au degré d'affinité. Les équipes de Simons et Hinterberger montrent que l'avidité est également importante pour la différenciation en Treg : une quantité trop importante d'antigène favoriserait la délétion plutôt que la différenciation en Treg, laquelle serait plutôt optimale lorsque l'antigène est présent en faibles quantités (Hinterberger et al., 2010; Simons et al., 2010).

Les premières études concernant l'importance du signal TCR pour le développement des Tregs suggéraient qu'il permet l'expression de CD25 à la surface des thymocytes CD4SP. Ceci permettrait de reconnaître l'interleukine-2 (IL-2) avec une forte affinité et celle-ci induirait l'expression de Foxp3 (Lio and Hsieh, 2008). Un an plus tard, l'équipe de Hsieh affine ce message et montre que le développement des Tregs nécessite un signal instructeur *via* le TCR qui induirait ou maintiendrait l'expression de Foxp3 (Bautista et al., Nat immunol 2009). En effet, Sauer et ses collègues montrent que le signal TCR permet l'expression de Foxp3 lorsque la voie PI3K/Akt/mTOR est inhibée (Sauer et al., 2008).

D'après Klein et ses collègues, le signal TCR à lui seul n'est pas suffisant pour induire une différenciation en Treg puisque pour un TCR donné, du moins ayant une affinité et/ou avidité moyennement élevée, le devenir d'un CD4SP peut tout aussi bien être la délétion clonale que la différenciation en Treg (Klein and Jovanovic, 2011). De même Hsieh et collaborateurs montrent qu'il existe un recoupement partiel entre les répertoires Tconv et Tregs, montrant qu'un TCR donné peut devenir Treg ou Tconv (Hsieh et al., 2004). Il doit donc exister des signaux complémentaires qui favorisent un développement en Treg plutôt qu'une délétion clonale pour un seuil intermédiaire d'avidité/affinité du TCR pour un complexe CMH-peptide donné.

Au-delà d'un certain seuil, néanmoins, la délétion est inévitable, même pour un Treg. En effet, dans un modèle murin ayant des délétions conditionnelles de CMHII dans des DCs et mTECs, on observe

Introduction

l'apparition de certains clones TCR parmi les Tregs chez les souris n'ayant pas de CMH-II à la surface des DCs, suggérant une délétion initiale de ces Tregs chez les souris sauvages (Perry et al., 2014). Il est possible que ces cellules aient reçu assez de signaux pour s'engager dans le lignage Treg, mais que la force de ce signal TCR soit trop grande pour être contrebalancée par des signaux de survie. Il ne s'agit probablement pas d'un problème de niche, c'est-à-dire d'un manque d'accessibilité à des signaux de survie limitants, puisque les TCR - qui sont sélectionnés négativement par les DCs chez les souris WT comparées aux souris déficientes en CMH-II - sont des TCR avec une spécificité donnée (Perry et al., 2014). Si l'élimination de certains Tregs était due à un problème de niche, c'est-à-dire à un facteur limitant, les TCR des Tregs éliminés seraient probablement aléatoires.

Ainsi, un signal trop fort du TCR empêchera toute différenciation en Treg, mais pour un large éventail d'affinités/d'avidités inférieures à ce seuil, d'autres signaux additionnés au signal TCR permettront d'orienter la cellule vers le lignage Treg. Ces signaux s'ajouteront au signal TCR pour permettre un signal assez élevé afin d'induire l'expression de *Foxp3*, ou bien ils serviront de niche limitante (ex. : cytokines) pour un développement Treg plutôt qu'une délétion.

B. Signal 2 : co-stimulation

Nécessité d'un signal via CD28 pour le développement des Tregs

Les signaux de co-stimulation participent également au développement Treg. Le plus important est CD28, en l'absence duquel il n'y a quasiment pas de développement Treg (Tai et al., 2005). En effet, la première observation a été faite chez des souris prédisposées à développer un diabète de type 1 (souris NOD), dont le développement de l'auto-immunité était, de façon inattendue, exacerbé en l'absence de CD28 (Salomon et al., 2000). Des études ont ensuite montré que des souris déficientes pour CD28 présentaient non seulement un développement T altéré dans le thymus, mais également une perte quasi-totale des Tregs thymiques (Tai et al., 2005; Tang et al., 2003). Ces travaux de Singer vont également à l'encontre du two step model, puisque ses données suggèrent qu'un signal TCR couplé à un signal de co-stimulation sont suffisants, du moins *in vitro*, pour induire l'expression de *Foxp3* en absence d'IL-2. En utilisant diverses doses d'anti-TCR et d'anti-CD28, mimant un signal TCR ou de co-stimulation d'intensités plus ou moins fortes, ils montrent qu'un cumul de l'intensité des deux signaux suffit à induire une expression de *Foxp3*. En d'autres termes, un signal TCR faible pourrait être compensé par un fort signal CD28 et, inversement, un signal TCR fort nécessiterait seulement un signal de co-stimulation de faible intensité pour que la cellule exprime *Foxp3*. Ceci rejoindrait

Introduction

l'hypothèse établie plus tôt concernant l'amplitude de la force de signal TCR ajouté à d'autres signaux reçus par la cellule pour qu'elle devienne un Treg. De plus, le niveau d'expression de certaines molécules (CD69, GITR, CTLA-4) change en fonction de la somme des signaux reçus (Tai et al., 2005). Par exemple, plus le signal de co-stimulation est fort, plus CD69 est exprimé. En revanche, si l'on augmente le signal *via* le TCR, CD69 a tendance à diminuer. Il est donc possible que ces signaux soient non seulement importants pour l'engagement dans le lignage Treg, mais participent aussi à une hétérogénéité des populations Treg qui se développent. Un papier de l'équipe de Hsieh rejoint davantage leur two step model et suggère que CD28 participerait déjà au développement des précurseurs Tregs CD25⁺Foxp3⁻ lors la première phase TCR-dépendante de la différenciation des Tregs, puisque ces précurseurs sont diminués dans différents modèles murins mutés pour CD28 (Lio et al., 2010). Ces données n'excluent pas pour autant une participation de CD28 à l'induction d'une expression de Foxp3 et donc au développement *per se* des Tregs thymiques. De plus, ils émettent l'hypothèse qu'un signal *via* CD28 pourrait servir à élargir le répertoire TCR des Tregs en permettant à des CD4SP recevant un signal TCR de faible intensité de devenir tout de même Treg par « addition des signaux ». Pour vérifier cette hypothèse, ils analysent les séquences TRAV14 du TCR α des souris sauvages ou mutantes pour CD28 et comparent le Top10 des TCR présents dans ces souris. Bien qu'ils observent quelques différences en termes de présence ou de fréquence de certains TCR, ils concluent que leur hypothèse est erronée. Une analyse plus approfondie de la diversité du répertoire aurait peut-être permis de déceler davantage de différences, d'autant plus que les Tregs provenant des souris CD28KO semblent enrichis en certains TCR du top10 des souris sauvages, bien que le nombre de Tregs totaux soit bien inférieur aux souris sauvages, suggérant une perte de Tregs avec un TCR moins représenté, probablement des Tregs dont le signal TCR est justement plus faible.

Le rôle exact du signal de co-stimulation dans le développement Treg reste ainsi encore discuté, mais il est certain de CD28 est important et fonctionne de pair avec le signal TCR pour permettre le développement de Tregs. La confusion de ces résultats peut provenir notamment du fait que CD28 est également important pour le développement des Tconv, ainsi que pour la production d'IL-2, nécessaire au développement et au maintien des Tregs. Certains papiers ont, de ce fait, tenté de séparer l'impact de la déficience en CD28 sur le développement T total et celui des Tregs, en mutant spécifiquement certains sites de liaison de CD28 (Lio et al., 2010; Tai et al., 2005). Il apparaît que, bien que certains sites soient importants spécifiquement pour le développement Treg et n'affectent pas

Introduction

les autres lignages, tel que le motif de liaison à la Lck PYAP, une mutation dans ceux-ci n'induit qu'une diminution de moitié du développement Treg. Il est de ce fait possible que différents sites de liaison de CD28 puissent induire un développement Treg et/ou que d'autres signaux de co-stimulation auxiliaires puissent participer au développement Treg, voire se substituer à celui-ci.

En effet, outre CD28, d'autres candidats semblent pouvoir influencer sur le développement des Tregs, à savoir CD27, CD40 et CTLA-4.

Contribution de CD27 au développement Treg

Une stimulation de CD27 à la surface des Tregs en développement par son ligand CD70, exprimés aussi bien par les DCs que les mTECs, induit un signal de survie en inhibant la voie pro-apoptotique mitochondriale (Coquet et al., 2013). Une stimulation par un agoniste de CD27 permettrait également de soutenir le développement Treg et induirait une expression plus forte de certains marqueurs Tregs (ICOS, GATA3, Helios, PD-1, CTLA-4), contribuant ainsi à l'hétérogénéité d'un développement Treg dans le thymus (Natalia Bowakim, Valérie Acolty, Maxime Dhainaut, Hideo Yagita, Guillaume Oldenhove, 2018).

Contribution de CD40 au développement Treg

L'axe CD40-CD40L jouerait également un rôle, bien qu'éventuellement indirect, dans le développement des Tregs thymiques. En effet, l'absence de CD40 induit un développement moindre de Tregs, ce signal est donc importante pour au moins une partie des Tregs, mais induit également une diminution de la maturation des tDCs (Oh et al., 2018). L'expression de CD40 sur les DCs serait donc importante pour un développement de Treg CD25⁺Foxp3⁺ et CD25⁻Foxp3⁺ mais n'impacte pas les précurseurs CD25⁺Foxp3⁻.

Contribution de CTLA-4 au développement Treg

CTLA-4 est l'homologue antagoniste de CD28, c'est-à-dire qu'il interagit avec les mêmes ligands, à savoir CD80/86, mais son rôle est souvent opposé à celui de CD28. En effet, pour un lymphocyte T, l'engagement du TCR et de CTLA-4 au lieu de CD28 conduira plutôt à l'inhibition de la prolifération du Tconv. Il s'agit également d'une molécule immunosuppressive exprimée en périphérie par les Tregs pour limiter la maturation des DCs, comme décrit précédemment. Néanmoins CTLA-4 n'est pas seulement une molécule immunosuppressive des Tregs mais serait également impliquée dans leur développement thymique. Des comparaisons entre souris TCR transgéniques et non transgéniques

Introduction

montrent que, selon le TCR exprimé, la proportion de Treg CTLA-4⁺ dans le thymus change (Verhagen et al., 2013). Dans ce même papier, ils analysent des répertoires TCR des Tconv et Tregs thymiques sur des souris sauvages ou déficientes pour CTLA-4. Les résultats montrent que l'absence de CTLA-4 induit des modifications dans les TRAV utilisés par les souris transgéniques sauvages comparées aux KO, mais également des changements de diversité et de séquences des régions CDR3 des Tregs. CTLA-4 influence donc la sélection du répertoire TCR. Une hypothèse serait que, du fait de la compétition de CTLA-4 avec CD28, ce dernier permettrait, contrairement au CD28, de diminuer le signal en aval TCR reçu par des thymocytes ayant une affinité élevée pour le soi, permettant ainsi la survie et la différenciation en Treg plutôt qu'une sélection négative. En ce sens, des Tregs provenant de souris CTLA-4 déficientes présentent un répertoire moins auto-réactif que celui des Tregs sauvages, suggérant que CTLA-4 est nécessaire pour échapper à la sélection négative pour des Tregs de haute affinité au soi (Yamaguchi et al., 2013). Ainsi, CTLA-4 n'aurait pas de rôle direct dans l'induction d'une expression de Foxp3, mais permettrait plutôt une survie des Tregs auto-réactifs.

Un signal de co-stimulation à double tranchant

Ces différents signaux de co-stimulation (et de co-stimulation auxiliaire) sont donc importants pour le développement des Tregs et contribuent éventuellement à la diversité des Tregs produits par le thymus. Néanmoins, il faut garder à l'esprit, pour ces axes de signalisation, que l'effet peut s'exercer autant sur les Tregs qu'inversement impacter les cellules stromales thymiques exprimant leurs ligands respectifs (Williams et al., 2014). Des défauts de maturation de ces cellules, engendrés par une absence de signalisation par ces différents axes, pourraient impacter leur capacité de présentation antigénique (même si cela ne semble pas être le cas pour les tDC CD40^{-/-}) et, de ce fait, perturber le répertoire Treg.

En somme, ces axes de co-stimulation permettent un crosstalk primordial entre les cellules stromales et les Tregs en développement et constitue, de ce fait, l'un des signaux importants pour la mise en place d'une tolérance périphérique optimale.

A cela s'ajoutent les Tregs recirculants qui pourraient impacter le développement des lymphocytes Tregs, en interagissant avec les cellules stromales et empêchant ainsi les Tregs en développement de recevoir un signal de co-stimulation. Selon la spécificité antigénique de ces derniers, ceci pourrait modifier le répertoire TCR des Tregs en développement en privant les Tregs de même spécificité antigénique des signaux qui leur sont nécessaires.

Introduction

Comme évoqué précédemment, les signaux TCR et de co-stimulation sont nécessaires, mais pas toujours suffisants pour induire un développement de Tregs, leur survie et une expression stable de Foxp3.

C. Signal 3 : cytokines

Les cytokines jouent un rôle important dans le développement des Tregs. Celles qui présentent une chaîne gamma dans leur récepteur (γ_c) semblent être les plus importantes, puisque des souris n'exprimant pas la γ_c ne présentent quasiment pas de développement Treg (Bayer et al., 2008; Burchill et al., 2008a; Fontenot et al., 2005b; Tai et al., 2013b). Néanmoins, cette chaîne gamma est exprimée par un large éventail de récepteurs aux cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, et IL-21) dont certaines influent également sur le développement général des lymphocytes T. D'autres études montrent qu'une signalisation *via* STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) est primordiale pour le développement des Tregs (Burchill et al., 2007). Or, STAT5 est phosphorylé et donc activé en aval de tous les récepteurs aux γ_c -cytokines citées ci-avant, et l'on peut rajouter TSLP dont le récepteur signale également par STAT5, mais ne possède pas de chaîne gamma dans son récepteur (IL7Ra+TSLPR) (Rochman et al., 2009). Basées sur ces deux points, de nombreuses études ont évalué la contribution de différentes cytokines au développement des Treg. De plus, il n'est pas certain, à ce jour, que leur contribution au développement des Tregs soit plutôt une promotion de la survie de ces cellules, ou bien une induction de l'expression de Foxp3, ou encore la stabilisation du lignage Treg. Nous discuterons de la contribution des différentes cytokines ainsi que de leur rôle dans le développement des Tregs.

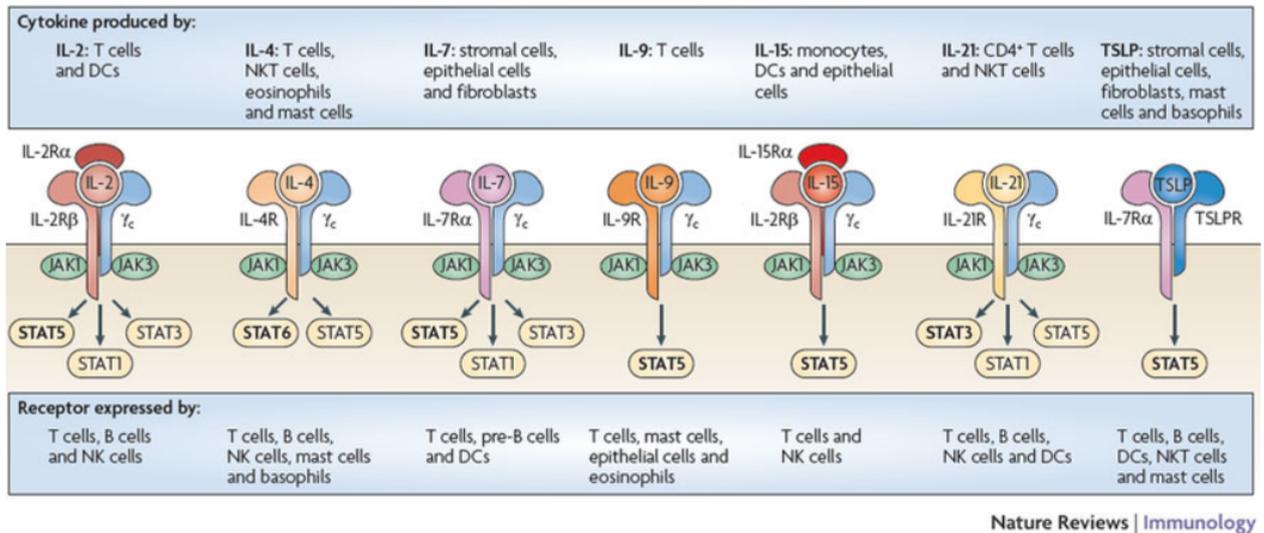


Figure 10 **Cytokines partageant la chaîne g dans leur récepteur et signalant par STAT5** (issu de la référence (Rochman et al., 2009)). Schéma décrivant les différents récepteurs aux cytokines partageant la chaîne gamma dans leur récepteur et signalant, entre autres, par la molécule STAT5, importante pour le développement Treg.

Interleukine-2 & Interleukine 15

Du fait d'une expression de CD25, aussi appelée IL-2R α , la chaîne formant le récepteur de haute affinité pour l'IL-2, à la surface des Tregs et de leurs précurseurs, l'IL-2 est la cytokine la plus étudiée dans le développement Treg. De plus, des souris déficientes pour l'IL-2 (IL2^o) développent une pathologie auto-immune létale. Néanmoins, il semblerait que la pathologie causée par la déficience en IL-2 résulte plutôt d'un problème de maintien des Tregs en périphérie que d'un problème développemental des Tregs. Dans ces souris IL2^o, le développement Treg n'est que partiellement aboli, alors qu'en périphérie les Tregs sont totalement absents (Burchill et al., 2007). En revanche, en l'absence de CD122, la chaîne bêta du récepteur à l'IL-2, le développement Treg est totalement aboli (Soper et al., 2007). De plus, Soper et ses collègues n'observent qu'une diminution marginale du développement Treg chez une souris déficiente pour CD25. Cette différence observée par rapport aux souris IL2^o s'explique probablement par le fait qu'en l'absence de CD25, l'IL-2 peut tout de même signaler par son récepteur de plus faible affinité (CD122+ γ c). Une autre possibilité est une redondance des signaux : étant donné que l'IL-2R β constitue également une partie du récepteur à l'IL-15, certains groupes ont suggéré que ces deux signaux sont redondants et que seule l'absence combinée de l'IL-2 et l'IL-15 abolit le développement Treg. Pour tester cette hypothèse, Vang et ses collègues ont comparé des souris déficientes en IL-2 ou doubles déficientes pour l'IL-2 et l'IL-15 (Burchill et al., 2008b; Vang et al., 2008). Il en ressort que l'absence des deux cytokines confère un phénotype

Introduction

similaire à celui d'une souris γc^0 , à savoir une absence quasi-totale de Treg. En revanche, d'autres groupes suggèrent des rôles non redondants des cytokines IL-2 et IL-15 dans le développement Treg (Marshall et al., 2014). Selon eux, une voie de développement serait dépendante uniquement de l'IL-2, grâce à une up-régulation successive de CD25 puis Foxp3, alors qu'une autre voie de développement Treg passerait par une première expression de Foxp3 grâce à l'IL-15, suivie d'une up-régulation de CD25 grâce à l'IL-2. Un autre papier soutient également un rôle pour l'IL-15 dans le développement des Tregs, en montrant que CCR7 contrôle le développement des iNKT, mais aussi sans doute des Tregs thymiques, en leur permettant d'accéder à de l'IL-15 trans-présentée par les cellules stromales de la médulla thymique (Cowan et al., 2014).

D'autres papiers excluent totalement un rôle de l'IL-2 pour le développement des Tregs et maintiennent que ces cytokines ne sont importantes que pour la survie des Tregs en périphérie (D'Cruz and Klein, 2005). Néanmoins, il faut souligner que ces observations se basaient sur un modèle de souris TCR transgénique et non un répertoire polyclonal. Il est, de ce fait, possible que certaines sous-populations de Tregs avec des TCR bien spécifiques ne soient pas dépendantes de l'IL-2 pour leur développement, mais peut-être de l'IL-15, d'autres cytokines ou soient même indépendantes des cytokines. Ceci pourrait s'expliquer par les différences observées dans les répertoires antigéniques présentés par les cellules stromales (surtout mTEC et DC) et leurs capacités à produire ces cytokines (partie III.5).

Finalement, une étude récente suggère, à l'inverse, que l'IL-2 est bien importante pour le développement, la stabilité du lignage et la survie des Tregs dans le thymus, mais qu'en revanche celle-ci est dispensable en périphérie pour le maintien du lignage, car remplaçable par l'IL-7 pour une certaine période (Fan et al., 2018).

A ce jour, les données de la littérature semblent donc contradictoires sur l'implication et la fonction de l'IL-2 et l'IL-15 dans le développement des Tregs, même si les données plus récentes de la littérature sont en faveur d'un rôle important joué par ces cytokines pour celui-ci.

Les autres γc -cytokines

Pour l'IL-2 et l'IL-15, la contribution au développement Treg semble établie, même si leur contribution respective ou une éventuelle redondance reste à définir. Concernant d'autres cytokines ayant en

Introduction

commun la γc dans leur récepteur, l'IL-4 et l'IL-7 ont été étudiés pour leur implication dans le développement Treg.

Concernant l'IL-4, il semblerait qu'elle ne joue pas un grand rôle dans le développement Treg, puisque des souris IL-4R α déficientes ont un développement Treg inchangé (Vang et al., 2008). Néanmoins, d'après Owen et collaborateurs, les précurseurs CD25⁺Foxp3⁺ prolifèrent fortement en réponse à l'IL-4 *in vitro*, contrairement aux précurseurs CD25⁺ (Owen et al., 2019). Cela serait dû à une expression légèrement plus élevée de l'IL-4R α par les premiers précurseurs cités. L'IL-4 nécessaire à ces Tregs proviendrait des iNKT, source majeure d'IL-4 dans le thymus. Néanmoins, il n'y a pas de preuves concernant l'implication de cette cytokine dans le développement *in vivo* des Tregs et il est possible que *in vitro* l'IL-4 puisse avoir un effet uniquement sur la prolifération des précurseurs plutôt que sur leur différenciation.

Le récepteur à l'IL-7 contient la chaîne γc commune ainsi que la chaîne IL-7R α qu'elle partage avec le récepteur au TSLP. En effet, bien que le TSLP ne soit pas de la famille des γc , sa capacité à induire des Tregs a été testée, sans doute du fait d'un récepteur similaire à l'IL-7 et de la capacité de son récepteur à signaler via STAT-5, un acteur crucial du développement des Treg. Vang et collaborateurs ont exclu son implication dans ce processus (Vang et al., 2008). Concernant l'IL-7, le rôle semble minime dans la différenciation des précurseurs CD25⁺Foxp3⁻ en Tregs *in vitro* et les souris IL-7R α déficientes présentent un pourcentage normal de Tregs thymiques.

Il semblerait donc que les autres cytokines portant la γc dans leur récepteur ou qui signalisent *via* STAT5 ne soient pas des acteurs majeurs du développement Treg.

Transforming Growth Factor beta

Le TGF- β (Transforming Growth Factor beta) est une cytokine impliquée dans divers processus immunitaires. L'un des rôles clefs a été attribué à la capacité du TGF- β à induire des Tregs périphériques (pTregs) à partir de Tconv (Chen et al., 2003). Il a longtemps été supposé que cette cytokine ne joue pas de rôle pour le développement des tTregs. Néanmoins, certaines études récentes se contredisent sur ce point et suggèrent une implication du TGF- β dans le développement des Tregs (Chen et al., Eur J immunol 2015). D'autres affirment que le TGF- β ne joue pas de rôle dans le développement de tTregs et montrent même une augmentation du nombre de Tregs chez la souris adulte TGF- β ^o (Li et al., 2006; Marie et al., 2006). D'autres encore observent chez le nouveau-né, à 3-5

Introduction

jours de vie, une diminution du développement Treg, même si cette différence disparaît à l'âge adulte (Liu et al., 2008). Les différences de résultats peuvent donc s'expliquer par l'âge auquel les souris ont été analysées, mais également par le modèle murin utilisé : un papier utilise des souris TGF- β R1°, alors que les premiers utilisent un KO de la sous unité 2 du récepteur au TGF- β . Il est possible que ces deux sous-unités du récepteur au TGF- β n'aient pas les mêmes fonctions. Pour autant, il semblerait que le TGF- β soit produit en grande quantité dans le thymus, notamment par la phagocytose de cellules mortes et par les cellules mortes elles-mêmes (Konkel et al., 2014). On pourrait émettre l'hypothèse que ce TGF- β participe à la formation de pTregs dans le thymus. En effet, si l'on s'intéresse à la capacité du TGF- β à induire l'expression de Foxp3, l'équipe de Rudensky a montré que ce dernier signale uniquement au niveau du CNS1 et contribue donc essentiellement à la différenciation des pTregs (Zheng et al., 2010).

Un autre aspect à considérer serait que le TGF- β influence indirectement le développement des Tregs thymiques. En effet, une étude montre que le TGF- β influe sur le développement et la fonction des mTECs (Hauri-Hohl et al., 2014). Or, dans ce cas son rôle est plutôt négatif car il limite la maturation fonctionnelle des mTECs.

Le rôle du TGF- β sur le développement des Tregs thymiques est donc à ce jour discutable et discuté.

Autres signaux : Les TNFR

Comme discuté précédemment, les TNFR jouent un rôle en périphérie dans les fonctions immunosuppressives des Tregs, sans doute dans le maintien de celles-ci (Vasanthakumar et al., 2017). Ces molécules participent également à l'hétérogénéité des Tregs, puisque deux populations ont même été décrites en fonction de l'expression ou non de GITR (Wyss et al., 2016).

Or, certaines de ces molécules sont exprimées à des stades très précoces du développement Treg (ex. : GITR, OX-40, TNFR2), voire même utilisées pour décrire des populations précurseurs des Tregs (ex.: GITR). Leur implication dans le développement Treg a également été abordé : une inhibition d'un seul de ces TFNR affecte peu ou pas le développement des Tregs, mais une absence combinée de GITR, OX40 et TNFR2 l'inhibe fortement (Mahmud et al., 2014).

En périphérie, ces mêmes molécules signalent *via* NFkB qui, comme on le verra par la suite, est un axe important du développement Treg (Oh et al., 2017; Vasanthakumar et al., 2017). De ce fait, il est

Introduction

possible que ces différentes molécules régulent le développement des Tregs *via* cette voie de signalisation. On ignore à ce jour si ces molécules sont exprimées par tous les Tregs de la même manière ou si leur expression constitue un degré d'hétérogénéité au sein des Tregs en développement. L'expression de ces TNFR semble être dépendante du signal de co-stimulation CD28 (Mahmud et al., 2014). De plus, l'expression forcée de certains TNFR permet d'élargir le répertoire TCR des Tregs en développement, en permettant la sélection de Tregs ayant une plus faible affinité pour les antigènes présentés. Il semblerait donc que ces TNFR participent activement au développement des Tregs et on peut imaginer qu'une signalisation *via* ces molécules vient renforcer le signal TCR, permettant ainsi la sélection de TCR ayant initialement une trop faible affinité/avidité pour devenir Tregs. Une expression hétérogène de ces molécules sur les Tregs en développement pourrait ainsi contribuer à une diversité du répertoire et donc une hétérogénéité de populations pour les Tregs en développement.

L'environnement thymique comporte donc une panoplie très importante de signaux nécessaires au développement des Tregs. La diversité des molécules ainsi que la redondance de certains signaux est nécessaire pour assurer un processus optimal d'un mécanisme important pour la tolérance immunitaire qu'est de développement des Tregs. La délétion d'un seul de ces signaux entraîne rarement une absence totale de développement des Tregs, mais plutôt un effet faible ou intermédiaire. En revanche, la délétion de plusieurs signaux « du même groupe » induit souvent une diminution drastique de celui-ci. Cette observation suggère que les signaux ne sont pas complètement redondants, mais qu'éventuellement leur expression n'est pas identique sur toute la population de Tregs et que leur délétion n'affecte de ce fait qu'une partie des Tregs, stipulant une hétérogénéité de la population.

3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des tTregs

L'une des conséquences principales des signaux participant à la différenciation Treg est la transcription du master regulator Foxp3 ainsi que la survie de cellules auto-spécifiques soumises à un fort signal TCR.

A. Expression de Foxp3

Foxp3 est le « master regulator » du lignage Treg. En d'autres termes, ce facteur de transcription contrôle une grande partie du développement des Tregs ainsi que leurs fonctions

Introduction

immunosuppressives. En 2003, Fontenot et ses collègues ont généré une souris *Foxp3* déficiente et montré que cette molécule est requise pour le développement des Treg et n'affecte aucunement le compartiment Tconv (Fontenot et al., 2003). L'absence d'expression de cette molécule chez la souris induit un syndrome lymphoprolifératif qui ne peut être contrebalancé que par l'injection de Treg en période néonatale. Inversement, lorsqu'on induit l'expression de *Foxp3* par transduction rétrovirale dans une population de Tconv et qu'on injecte ces cellules dans une souris déficiente pour RAG, celle-ci ne développe pas de colite ni de lymphoprolifération excessive. De plus, les cellules transduites expriment certaines molécules immunosuppressives (CD25, IL-10). Ces résultats démontrent l'importance de *Foxp3*, à la fois pour le développement Treg mais suggèrent également que *Foxp3* confère donc des capacités immunosuppressives aux Tconv transduits.

Outre l'aspect développemental et fonctionnel, *Foxp3* est aussi impliqué dans le maintien de la stabilité du lignage Treg. Bien que certaines études évoquent une plasticité des Tregs vers des lignages Th lorsque ceux-ci sont exposés de manière répétitive à des cytokines pro-inflammatoires (ex. : IL-17) *in vitro*, ou bien lorsqu'elles sont transférées dans un hôte lymphopénique, il semblerait que ces résultats soient principalement liés à une différenciation incomplète en Treg de ces cellules (Hori, 2011). Bien que l'induction de l'expression de *Foxp3* soit donc primordiale pour le développement Treg, elle reste insuffisante pour un engagement complet dans le lignage Treg. En effet, des modifications de la chromatine sont nécessaires pour stabiliser l'expression de *Foxp3* en permettant une déméthylation complète des régions non codantes du locus *Foxp3*, suivie d'une boucle de rétrocontrôle positif de la transcription de *Foxp3* par lui-même. Cette induction de l'expression de *Foxp3* et son « verrouillage » ont lieu lors de la différenciation thymique des Tregs grâce aux divers signaux cités précédemment.

Structure du gène Foxp3 : les différents CNS

Le gène *Foxp3* est composé de 4 régions non codantes importantes pour sa régulation : un promoteur et trois régions appelées CNS1, CNS2 et CNS3 (Conserved Non-coding Sequence) (Huehn et al., 2009; Kim and Leonard, 2007; Tone et al., 2008) (Figure 10). L'équipe de Rudensky a décrit l'importance de chacune de ces régions codantes qui sont conservées entre les espèces (souris, humain, chien, rat) (Zheng et al., 2010).

Une souris déficiente pour le CNS3 ne présente pas de Treg dans le thymus, alors que la proportion de Treg en périphérie n'est que légèrement diminuée. L'induction de Treg *in vitro* à partir de Tconv CD4+

Introduction

CNS3KO est également altérée. Le CNS3 est donc important pour le développement des Tregs thymiques. Concernant la quantité de Treg retrouvée en périphérie, celle-ci serait majoritairement liée à une hyperprolifération des Tregs résiduels de la souris. Il semblerait donc que le CNS3 soit important pour le développement des Tregs thymiques, mais qu'il n'est pas impliqué dans la stabilité du lignage et donc le maintien des Tregs en périphérie.

Le CNS2 serait important pour le maintien et la stabilité de l'expression de *Foxp3*, dans le temps et au travers des divisions cellulaires. Bien que le pourcentage de Treg dans une souris CNS2KO soit normal chez une jeune souris, le transfert de ces Tregs mutants dans une souris lymphopénique résulte en la perte de l'expression de *Foxp3*. Cette région est donc importante pour le maintien de l'expression de *Foxp3*.

Finalement, le CNS1, comme mentionné précédemment, ne serait pas important pour les tTregs et ne jouerait de rôle que dans la différenciation des pTregs.

Plus récemment, un nouveau CNS a été défini : le CNS0, qui se situe en amont du promoteur du gène *Foxp3*. Le CNS0 participe au développement des tTregs en permettant notamment l'expression de Tregs super-enhancers que nous évoquerons plus tard (voir Partie III 4.C).

Contrôle de l'expression de Foxp3 par les signaux développementaux reçus par les Tregs

Zheng et collaborateurs ont tenté de définir les signaux à l'origine du recrutement de facteurs de transcription au niveau des différentes régions non codantes du gène *Foxp3* (Figure 10).

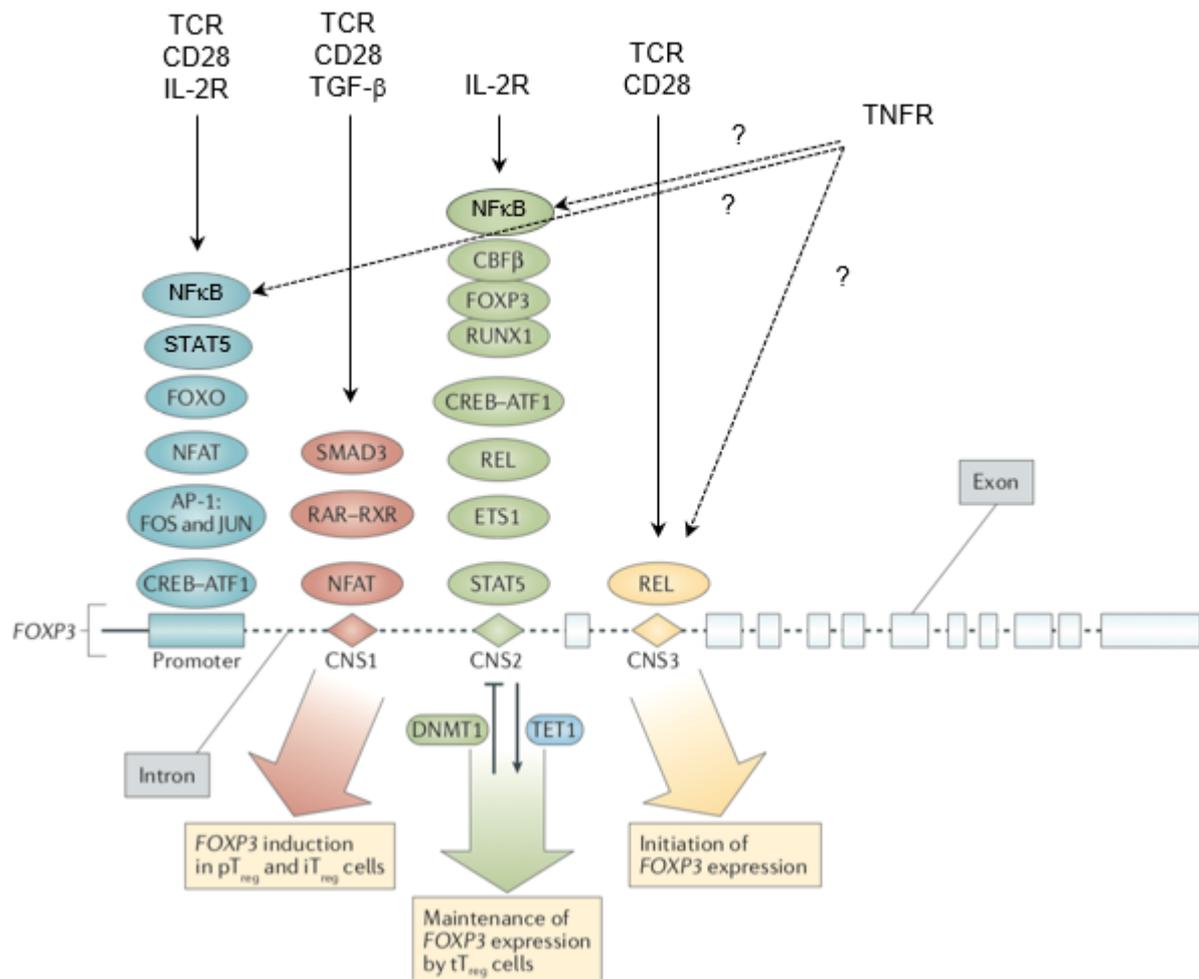


Figure 11 **Construction du gène *Foxp3* et signaux nécessaires à sa régulation** (adapté de la référence (Lu et al., 2017)) Schéma illustrant la construction du gène *Foxp3*, les cascades de signalisation et facteurs de transcription nécessaires à l'activation des différentes régions non codantes (CNS) du gène et la conséquence de leur activation.

Régulation de l'expression de *Foxp3* par le signal TCR et de co-stimulation

Précédemment, nous avons mentionné que le signal TCR couplé au signal de co-stimulation CD28 permet, du moins *in vitro*, l'expression de *Foxp3* (sous réserve d'une stimulation cumulée suffisante). Le signal TCR/CD28 permettrait d'une part le recrutement de facteurs de transcription clés au niveau du promoteur du gène *Foxp3* tels que AP-1 (Fos+Jun) et NFAT (Josefowicz et al., 2012).

D'autre part, ce signal permet la translocation de c-REL dans le noyau sa liaison au CNS3 (Zheng et al., 2010). C-REL fait partie des sous-unités de NFκB. P65 et IκBNS, deux autres sous-unités de NFκB, ont également été impliquées dans le développement des tTregs (Oh et al., 2017; Schuster et al., 2017). IκBNS serait impliqué dans les étapes précoces d'une voie alternative de développement Treg, possiblement *via* le CNS3 également. P65 (*Rela*), en revanche, jouerait plutôt un rôle dans le maintien

Introduction

des fonctions immunosuppressives des Tregs puisque, contrairement aux souris c-REL déficientes qui vont bien, les souris p65KO pour les Tregs développent une pathologie auto-immune conduisant à la mort des souris à 15 semaines de vie. P65 agirait de ce fait plutôt au niveau du CNS2. Néanmoins, c-REL et p65 semblent présenter une certaine redondance dans le contrôle de la stabilité du lignage Treg, puisque seule la délétion simultanée des deux protéines induit un phénotype *scurfy* et une perte totale de la signature transcriptomique des Tregs (Oh et al., 2017). Il est donc possible que ces deux molécules contrôlent de manière redondante la stabilité du lignage Treg en agissant sur le CNS2, bien que ceci n'ait pas encore été testé. A nouveau, il est possible que cette redondance transcrive une hétérogénéité des signaux en amont.

Régulation de l'expression de *Foxp3* par les cytokines via STAT5

Le rôle attribué au signal cytokinique dans le développement Treg est, soit de permettre la survie du Treg, soit de participer à la différenciation cellulaire.

De nombreuses évidences de la littérature suggèrent que les cytokines seraient capables de réguler de l'expression de *Foxp3* en grande partie *via* STAT5 (Burchill et al., 2007, 2008a; Lio and Hsieh, 2008; Soper et al., 2007; Wirnsberger et al., 2009; Yao et al., 2007). En effet, il a été montré que STAT5 est capable de se lier au promoteur et au CNS2 du gène *Foxp3* et qu'une induction constitutive de STAT5 dans des thymocytes de souris CD122^o suffit à rétablir un développement Treg normal (Burchill et al., 2007, 2008b; Yao et al., 2007). Ces résultats impliquent que les cytokines jouent un rôle important lors de l'initiation de la différenciation Treg lorsque STAT5 se fixe sur le promoteur, ainsi que dans le maintien du lignage et des fonctions immunosuppressives *via* son action sur le CNS2.

Pour d'autres auteurs, le signal cytokinique serait nécessaire, non pas pour induire un développement des Tregs, mais pour permettre la survie cellulaire des Tregs lors de leur développement. L'expression de *Foxp3* dans des CD4SP induirait un signal pro-apoptotique qui ne pourrait être contrebalancé que par un signal cytokinique signalisant *via* STAT5 (Tai et al., 2013a). Les chercheurs ont utilisé des souris femelles hétérozygotes *scurfy* (seule la moitié des cellules sont capables d'exprimer *Foxp3*) comprenant un transgène *Foxp3*^{GFP} pour montrer que les cellules n'ayant pas la capacité d'exprimer *Foxp3* présentaient une mortalité bien plus faible que les autres. Ceci indiquerait que *Foxp3* promeut l'apoptose cellulaire. Leurs résultats complémentaires suggèrent que *Foxp3* permet l'expression de

Introduction

molécules pro-apoptotiques telles que Puma et Bim et que cette apoptose pouvait être prévenue par une signalisation par des cytokines possédant une chaîne γ c dans leur récepteur.

Contribution des TNFR à la régulation de l'expression de Foxp3

Quant aux signaux émis par les TNFR, ceux-ci pourraient renforcer la transcription de STAT5 et donc participer à la modulation de l'expression de Foxp3 de manière synergique aux récepteurs des γ c-cytokines (Mahmud et al., 2014). En outre, les TNFR sont capables, du moins en périphérie, de maintenir les fonctions effectrices des Tregs *via* la voie NFkB (Vasanthakumar et al., 2017). Il est possible que cette voie serve également aux TNFR pour moduler le développement des Tregs dans le thymus.

Pour résumer, les signaux TCR, de co-stimulation, *via* les γ c-cytokines et *via* les TNFR semblent tous participer à l'expression de Foxp3 ainsi qu'à son maintien *via* une régulation des différentes régions non codantes du gène. Il est probable que ce soit la somme de ces trois différents signaux qui soit nécessaire pour une induction complète de l'expression de Foxp3, mais que la proportion apportée par chacun soit différente d'un Treg à l'autre. On peut, en effet, imaginer qu'un futur Treg possédant un TCR avec une affinité ou avidité moyenne pour l'antigène présenté aura besoin de signaux complémentaires pour venir renforcer le signal en aval du TCR et ainsi permettre une meilleure induction de l'expression de Foxp3 ou de son maintien (Mahmud et al., 2014). A l'inverse, un Treg possédant un TCR de « trop » forte affinité ou avidité pour l'antigène présenté risquerait d'être délété (Perry et al., 2014). Il est possible que certains signaux cytokiniques ou autres puissent contribuer à sa survie. Dans les deux cas, cela élargirait et diversifierait le répertoire TCR sélectionné, contribuant ainsi à la sélection de Tregs avec un répertoire, un phénotype et, éventuellement, des fonctions différentes. De plus, Foxp3 à lui seul n'est pas suffisant pour permettre le développement d'un Treg stable, d'autres cofacteurs de Foxp3 entrent en jeu, ainsi que des mécanismes indépendants de Foxp3, nécessaires sans doute pour un contrôle optimal du développement Treg, mais également susceptibles de participer à l'hétérogénéité des Tregs en développement.

B. Cofacteurs de Foxp3

Foxp3 possède aux alentours de 361 partenaires protéiques formant un réseau de régulation transcriptionnelle complexe (Rudra et al., 2012). L'expression de certains de ces cofacteurs est régulée par Foxp3 lui-même et l'association de Foxp3 avec le cofacteur permet ensuite de réguler la boucle de

Introduction

rétrocontrôle positif pour le maintien de l'expression de Foxp3, ou bien de réguler les différentes fonctions des Tregs. Or, Foxp3 ne ciblerait pas lui-même les gènes à réguler, mais agirait plutôt en « opportuniste » en se fixant sur des régions chromatiniennes déjà rendues accessibles en amont *via* des signaux reçus par les Tregs (Samstein et al., 2012). En d'autres termes, Foxp3 agit tardivement lors du développement des Tregs et d'autres signaux agissent en amont pour permettre, d'une part, l'ouverture de la chromatine au niveau des gènes dont l'expression est nécessaire pour obtenir un Treg fonctionnel, d'autre part permettent à des cofacteurs de se lier à ces sites. Nous aborderons par la suite les différents mécanismes épigénétiques nécessaires au développement des Tregs afin de comprendre comment ceux-ci sont contrôlés par les signaux que reçoivent les précurseurs des Tregs.

C. Régulation négative de Foxp3

Comme mentionné précédemment, le signal TCR permet l'expression de Foxp3, mais uniquement lorsque la voie PI3K/Akt/mTOR est inhibée (Li and Rudensky, 2016; Sauer et al., 2008). Cette voie de régulation négative est activée en aval du signal de costimulation et du signal cytokinique. Elle inhibe, par exemple, la translocation de certains facteurs de transcription importants pour le lignage Treg du cytosol vers le noyau, par exemple les protéines Foxo. Foxo1 et Foxo3 se lient au promoteur du gène *Foxp3* ainsi qu'à d'autres gènes associés au lignage Treg tels que *CTLA-4* et favorisent leur expression (Kerdiles et al., 2010). L'absence de ces facteurs de transcription induit un désordre inflammatoire fatal du fait que ces protéines ont un rôle crucial dans le développement et la régulation fonctionnelle des Tregs (Ouyang et al., 2010). Dans les Tregs en périphérie, c'est PTEN qui contrecarre la signalisation TCR inhibitrice de Foxo1 en bloquant la phosphorylation d'Akt par PI3K. Ceci permet à Foxo1 de transloquer dans le noyau. L'expression de PTEN dépend d'un signal *via* le ligand Semaphorine 4 reconnu par son récepteur Nrp1, ainsi que *via* l'axe de signalisation PD-L1-PD-1 (Luo and Li, 2013). Les Tregs en développement exprimant fortement PD-1 et/ou Nrp1 seraient donc capables d'exprimer PTEN et de lever l'inhibition du signal TCR, alors que des Tregs exprimant plus faiblement ou pas ces molécules auraient tendance à freiner le signal TCR reçu.

Lors du développement Treg, il est nécessaire que d'autres facteurs, notamment indépendants de Foxp3, permettent de guider les CD4SP auto-réactifs vers un lignage Treg plutôt que vers une délétion.

D. Mécanismes indépendants de Foxp3 pour le développement Treg

Pour analyser le degré d'implication de Foxp3 dans le développement Treg, des chercheurs ont utilisé une souris dont le gène *Foxp3* code pour une protéine de fusion Foxp3-EGFP non fonctionnelle (Lin et al., 2007). Ces souris développent une pathologie comparable aux souris scurfy. Or, de manière intrigante, le développement des Tregs thymiques chez cette souris (mâle ou femelle hétérozygote) est comparable au développement d'une souris sauvage, excepté pour l'intensité de fluorescence qui est diminuée pour certains marqueurs (CD25, CTLA-4, CD103). En revanche, ces Tregs ne possèdent pas de capacités immunosuppressives. De ce fait, les auteurs suggèrent que Foxp3 n'est pas tant impliqué dans le développement *per se* des Tregs, mais son expression serait davantage une finalité de la différenciation des Tregs dans le thymus pour permettre ensuite l'exercice des fonctions immunosuppressives des Tregs en périphérie.

Une autre équipe a utilisé des Tregs provenant de différentes conditions (activés *in vivo*, induits *in vitro* par TGF- β ..) ainsi que des Tconv transduits avec le gène Foxp3 pour montrer qu'un set important de gènes appartenant à la « signature Treg » ne sont en réalité pas contrôlés par Foxp3 (Hill et al., 2007). Néanmoins, il est fort probable que dans les Tconv transduits avec Foxp3, la conformation chromatinienne ne permette pas une action complète de Foxp3 sur tous ses gènes cibles « naturels ».

La plupart des mécanismes « indépendants » de Foxp3 pour la différenciation de Tregs sont des facteurs de transcription cités précédemment, induits par le signal TCR/co-stimulation et régulant l'expression de (c-REL, NFAT, AP-1, Foxo...) (Luo and Li, 2013). Néanmoins, quel que soit le facteur de transcription considéré permettant d'induire des Tregs thymiques, l'absence d'une seule de ces molécules ne conduit souvent qu'à une diminution partielle du développement des Tregs thymiques ou de leurs fonctions immunosuppressives, sans pour autant provoquer une abolition totale. Il est possible que certaines de ces molécules présentent des fonctions redondantes ou bien soient nécessaires au développement de différents subsets de Tregs et présentent, de ce fait, une hétérogénéité n'ayant pas été prise en compte à ce jour.

Ainsi, les trois signaux initiateurs du développement Treg activent différentes voies de signalisation afin de permettre une expression de Foxp3, ainsi que d'autres voies moléculaires. De plus, une réorganisation épigénétique en amont, ou parallèlement à l'expression de Foxp3, est nécessaire afin que Foxp3 (ou d'autres molécules) puisse agir sur ses gènes cibles.

4. Epigénétique & développement des tTregs

Les modifications du paysage épigénétique durant le développement des Tregs conditionnent leur devenir, impactent la formation du répertoire TCR et leur stabilité fonctionnelle. Dans des T périphériques qui ne sont pas des Tregs, le promoteur et la région CNS2 du gène *foxp3* sont fortement méthylés (ref). PIAS1, une enzyme répressive de STAT1, occupe le locus du promoteur de *foxp3* et recrute des histones déacétylases (HDACs) ainsi que HP1 (Heterochromatin Protein 1) et maintient ainsi un état répressif de la chromatine au niveau du gène *foxp3* (Liu et al., 2010). Afin de permettre une dérpression et une activation du gène *foxp3*, plusieurs signaux, TCR/costimulation et cytokiniques vont devoir se mettre en place. De plus, les modifications épigénétiques nécessaires à l'engagement et au maintien du lignage Treg dépassent la simple modulation de Foxp3.

A. Modifications épigénétiques induites par le signal TCR et de costimulation

Durant le développement des Tregs, les signaux reçus par les précurseurs en aval du TCR participent à la fois à l'induction de l'expression de Foxp3, mais également à la mise en place de modifications de la chromatine, à savoir des changements épigénétiques.

D'après une étude, ces deux événements sont indépendants, complémentaires et nécessaires pour le développement des Tregs thymiques (Ohkura *et al.*, 2012). Des modifications épigénétiques telles que la (dé)méthylation de l'ADN et les modifications histones sont transmises lors des divisions cellulaires et contribuent, de ce fait, à la stabilité du lignage. Ceci est important pour les Tregs, puisque ces cellules subissent de nombreuses divisions, notamment suite à leur rencontre avec des antigènes agonistes en périphérie.

D'une part, des modifications épigénétiques du gène *foxp3* sont nécessaires au développement Treg. Il a, par exemple, été montré que la déméthylation de l'ADN sur la région CNS2 du gène *FoxP3* était cruciale pour le maintien de la stabilité du lignage (Morikawa and Sakaguchi, 2014) et que l'hypométhylation des îlots CpG au niveau du promoteur et du CNS3 était indispensable pour l'initiation du développement Treg (Zheng et al., 2010).

D'autre part, des analyses ont permis d'identifier environ 300 régions de l'ADN spécifiquement déméthylées pour les tTregs, appelées Treg specific demethylated regions ou TSDR. Ces régions sont souvent situées sur des corps de gènes tels que *Ctla4*, *Il2ra*, *Tnfrsf18* (codant pour GITR), *Ikzf2*

(codant pour Helios) et *Ikzf4* (codant pour Eos). La déméthylation de ces gènes dépendrait du signal TCR (Ohkura et al., 2012) et cette déméthylation, tout comme l'expression de ces gènes, serait indépendante de Foxp3, puisque même des souris scurfy possèdent des cellules ayant un épigénome semblable aux Tregs et expriment certains gènes considérés comme « signature Treg » (identifiés notamment par l'expression de CTLA-4, GITR et CD25) (Ohkura et al., 2012).

B. Modifications épigénétiques induites par les cytokines

Jusqu'à récemment, les études de modifications de l'épigénome lors du développement Treg s'étaient limitées à étudier l'impact du signal TCR et de co-stimulation. Récemment, une étude a montré que le signal cytokinique agirait également sur l'épigénome du tTreg en devenir (Chorro et al., 2018). En utilisant des souris portant une mutation sur le gène *il2ra* de manière que celles-ci soient moins sensibles à l'IL-2, les chercheurs ont observé, grâce à des expériences d'ATAC-seq, que l'accessibilité de la chromatine était modifiée chez ces souris. La signalisation *via* le récepteur à l'IL-2 modifie donc l'épigénome. Cette modification serait indépendante de Foxp3, mais dépendante de SATB1, un acteur important précoce de la modulation épigénétique du développement Treg thymique.

C. Satb1

Le rôle de Satb1 dans le développement Treg a été découvert en 2016 chez des souris ayant un KO conditionnel de la molécule dans les cellules hématopoïétiques (Kondo et al., 2016). Chez ces souris, le développement T – et, en particulier, Treg - était affecté, avec des souris développant une auto-immunité à 16 semaines de vie et présentant des Tregs moins fonctionnels que les souris sauvages.

Comme déjà mentionné, Satb1 est un facteur de transcription exprimé dès le stade DP dont le rôle est d'organiser la chromatine et il serait un facteur pionnier du développement Treg (Beyer and Huehn, 2017; Kitagawa et al., 2017). Il permet un remodelage épigénétique permissif pour des super-enhancers Treg spécifiques (Treg-SE), souvent situés près de gènes propres à la signature Treg, tels que ceux cités précédemment (ex : *Foxp3*, *Ctla4*, *Il2ra*, *Ikzf2*) (Kitagawa et al., 2017) (Figure 11).

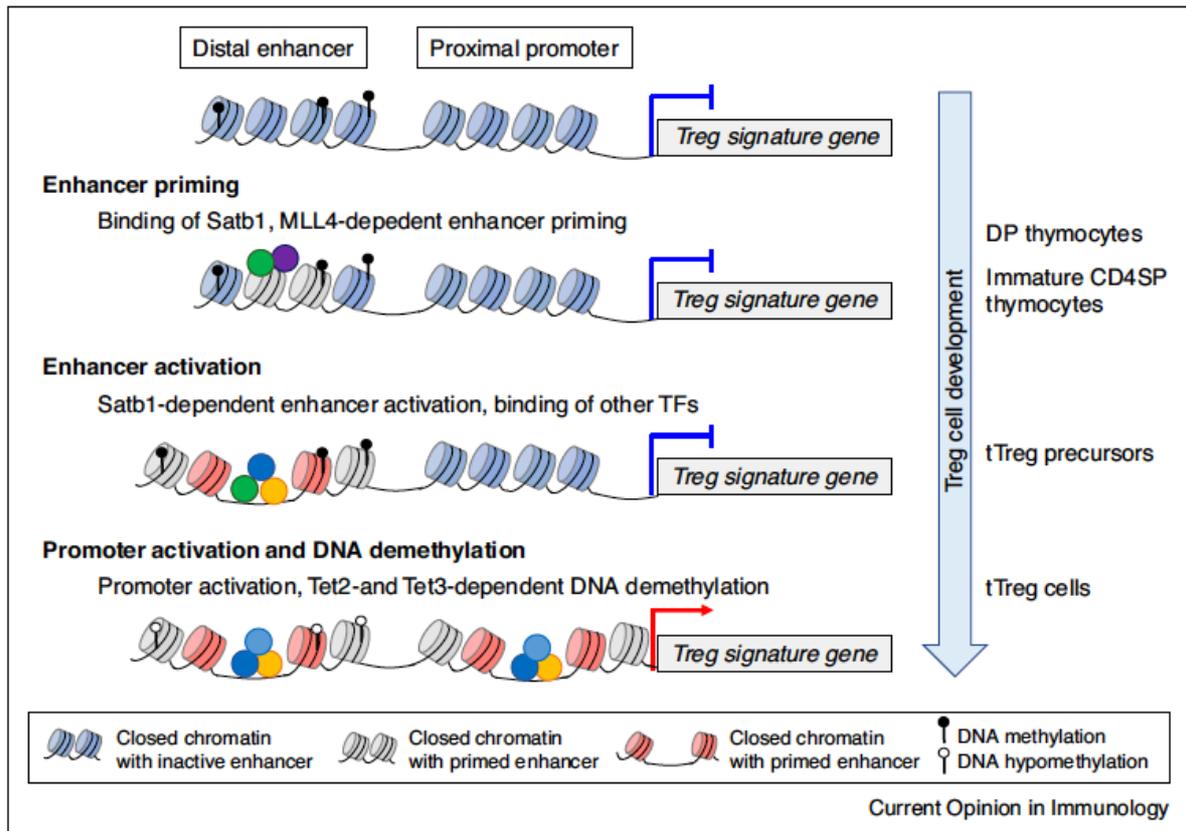


Figure 12 **Régulation épigénétique du développement des Tregs** (issu de la référence (Kitagawa and Sakaguchi, 2017)) Schéma illustrant les changements épigénétiques préparant étape par étape l'expression d'un transcriptome nécessaire aux Tregs pour leur développement. Satb1 permet le priming de l'enhancer et son activation suivie de la liaison de facteurs de transcriptions (TF) sur les sites ouverts de la chromatine. Ceci permet ensuite l'activation du promoteur et la déméthylation de l'ADN lorsque le précurseur Treg est engagé dans son lignage. Il est fort probable que ces changements épigénétiques sont la conséquence de signaux cellulaires spécifiques tels que le signal TCR, de co-stimulation, cytokinique et autres.

Certains de ces gènes vont par ailleurs directement impacter la différenciation Treg. Il a été suggéré que l'expression précoce de *Ctla4* permettrait de diminuer la force du signal TCR reçu par le précurseur Treg, sans doute en rentrant en compétition avec CD28, et, de ce fait, façonner le répertoire Treg en permettant la sélection de thymocytes avec une très haute affinité pour le soi, sans pour autant que leur délétion soit induite (Morikawa and Sakaguchi, 2014).

Pour résumer, les trois signaux nécessaires au développement Treg permettent l'ouverture et la transcription de gènes propres à la signature Treg, notamment en faisant intervenir un organisateur de la chromatine Satb1, avant même l'initiation de la transcription de *Foxp3*. L'ouverture de la chromatine permet aux voies de signalisation, en aval de ces trois signaux, d'activer *Foxp3* ainsi que d'autres gènes (notamment ceux à proximité des Treg-SE), et ceux-ci pourront alors accéder

facilement à leurs gènes cibles et permettre la stabilisation du lignage et la mise en place du potentiel immunosuppresseur des Tregs (Kwon et al., 2017). On peut se demander si les modulations épigénétiques exercées par ces trois signaux sont toutes identiques ou bien si elles varient en fonction, par exemple, de la force et du type de signal reçu par la cellule. Une hétérogénéité de l'expression des marqueurs de la signature Treg au sein des Tregs en développement n'a pas encore été évaluée à ce jour, excepté pour *Tnfrsf18* (GITR) (Wyss et al., 2016). De même, il n'est pas certain que Foxp3 se lie aux mêmes complexes multi-moléculaires dans chaque Treg, puisque l'expression des molécules constituant ces complexes est sans doute également soumise à différents signaux reçus lors du développement Treg.

5. Implication du stroma thymique dans le développement Treg

Le stroma thymique est composé d'une multitude de populations cellulaires présentant des antigènes *via* leur CMH et susceptibles d'agir sur le développement des Tregs en fournissant les différents signaux nécessaires. Parmi les cellules capables de présenter des antigènes du soi dans le thymus, certaines ne participeraient qu'à la délétion clonale (pDC), alors que d'autres participeraient aussi ou seulement au développement Treg (mTECs, cDCs, lymphocytes B) (Lopes *et al.*, 2015) (Figure 12).

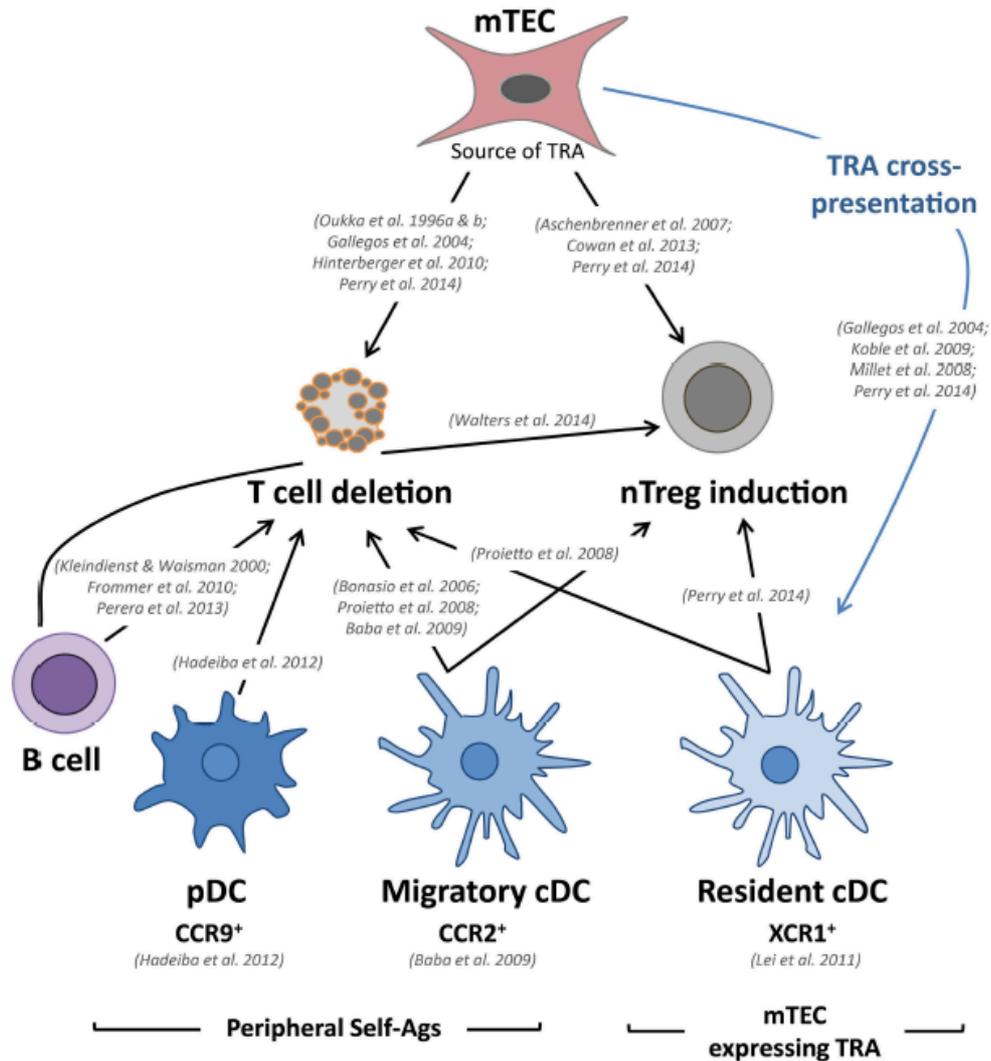


Figure 13 **Populations cellulaires impliquées dans le développement des Tregs** (issu de la référence(Lopes et al., 2015)) Schéma illustrant les différentes populations cellulaires constituant le stroma thymique qui participent au développement des lymphocytes T régulateurs. Les mTECs sont la source principale de TRAs mais ils peuvent les transférer aux DCs résidentes pour permettre une induction de Treg. Les cDCs migratoires participent également au développement des Tregs en apportant des antigènes capturés en périphérie. Le rôle des pDCs dans ce développement est discuté à ce jour. Les lymphocytes B seraient aussi capables de participer à ce processus, notamment du fait qu'ils sont capables d'exprimer AIRE et donc de présenter des TRAs. DC = Cellule Dendritique; mTEC = Cellule Epithéliale Thymique médullaire; B cell = lymphocyte B; TRA = Tissue Restricted Antigens; Ags = Antigènes.

Les mTECs et les lymphocytes B maturent dans le thymus et nécessitent l'expression de AIRE (et éventuellement de Fezf2) pour présenter des antigènes tissulaires (Aschenbrenner et al., 2007; Yamano et al., 2015).

Concernant les cellules dendritiques, certaines sont résidentes du thymus (caractérisées par l'expression de XCR1 ou bien CD8α) et présentent donc des antigènes présents dans le thymus,

Introduction

notamment grâce à l'expression du récepteur « scavenger » CD39 qui leur permet d'acquérir et de présenter des TRA provenant des mTECs (Perry et al., 2018). Ce processus serait par ailleurs crucial pour promouvoir la sélection de Treg par les DCs CD8 α ⁺. Afin de permettre cette acquisition des TRA par les DCs CD8 α ⁺, les mTECs produisent la chimiokine XCL-1, qui permet d'attirer les DCs exprimant le récepteur XCR1. D'autres cDCs, caractérisées par l'expression de Sirp α , proviennent de la périphérie et migrent vers le thymus en apportant des antigènes issus des tissus dans lesquels ils ont résidé (Li et al., 2009). Des études ont ainsi montré que les DCs et les mTECs ne présentent pas le même répertoire antigénique, en raison de leur origine partiellement distincte, mais également parce que ces cellules présentent des processus intracellulaires de peptides impliquant des protéases différentes (Perry et al., 2014). Ce large répertoire antigénique présenté contribue à une diversité importante des Tregs sélectionnés pour leur développement. Ainsi, le répertoire TCR des Tregs en développement sera différent en fonction du type cellulaire avec lequel le précurseur Treg interagit, si celui interagit spécifiquement avec un seul type cellulaire donné.

Concernant les molécules de co-stimulation, les DCs tout comme les mTECs présentent des niveaux différents de CD80/86 selon leur niveau de maturité. En effet, DC Sirp α ⁺ murent en périphérie et présentent donc un phénotype mature CMHII^{hi}CD80/86^{hi} dans le thymus (Proietto et al., 2008). De même, les DCs thymiques acquièrent un phénotype mature pour participer à la sélection négative et au développement Treg. En revanche, pour les mTECs, certains résultats semblent suggérer que les mTECs immatures, exprimant de faibles niveaux de CD80/86, participeraient également, voire davantage, au développement Tregs que les mTECs matures dont le rôle serait plutôt la sélection négative (Hinterberger et al., 2010). Néanmoins, ces conclusions paraissent surprenantes puisque les mTECs évoluent d'un stade immature à un stade mature, puis expriment AIRE, et que les mTECs AIRE⁺ jouent un rôle important dans le développement des Tregs (Perry et al., 2014). De même, les DCs tout comme les mTECs, seraient capables de favoriser ce développement *via* l'axe CD27/CD70, mais ce seraient majoritairement les cDC CD8 α ⁺ (Coquet *et al.*, 2013). L'axe CD40/CD40L serait lui aussi important à la fois pour le développement de certains Tregs, mais aussi et surtout pour la maturation du stroma thymique, en particulier des mTECs (Irla et al., 2008). Il faut cependant noter que pour le développement Treg, CD40 exprimé par les Tregs est important, alors que pour la maturation des mTECs, ce sont eux qui expriment CD40, le signal CD40L étant fourni par les CD4SP.

Introduction

De la même manière, les cellules stromales ne produisent pas toutes les mêmes cytokines. D'après la littérature, une étude menée sur des souris exprimant une molécule fluorescente sous contrôle du promoteur de l'IL-15 a montré que ce seraient les mTEC CMHII^{hi} qui produiraient le plus d'IL-15 dans le thymus (Cui et al., 2014). Néanmoins, certaines études transcriptomiques suggèrent que des DCs thymiques XCR1⁺ sont capables d'exprimer le gène *Il15*, bien que la confirmation d'une expression protéique reste à démontrer (Ardouin *et al.*, 2016). Quant à la source majoritaire d'IL-2 pour le développement Treg, les avis sont partagés. Certains affirment que c'est l'IL-2 produite par les Tconv qui permet le développement des Tregs, d'autres, en revanche, stipulent que l'IL-2 des DCs est nécessaire et limitante et que sa diffusion étant très faible, ceci nécessite un contact cellule-cellule (Owen et al., 2018; Weist et al., 2015). Weist et collaborateurs ont directement montré, en utilisant des coupes fines de thymus repeuplées avec des thymocytes et des DCs, les secondes provenant soit de souris sauvages ou bien IL2^o, que l'IL2 produite par les DCs est nécessaire dans un environnement thymique normal pour le développement d'au moins la moitié des Tregs. Cela n'exclut pas que d'autres sources d'IL-2 pourraient contribuer au développement des Tregs, mais suggère fortement que l'IL-2 provenant des DCs est indispensable pour au moins une partie des Tregs. Owen et collaborateurs ont abordé la question en utilisant un modèle de souris ayant un KO inducible du gène IL-2 (IL2cKO), soit dans les DCs (CD11c-Cre), soit dans les thymocytes exprimant CD4 (CD4-Cre) (Owen *et al.*, 2018). Leurs résultats dans le thymus montrent une diminution des Tregs thymiques à la fois chez les souris CD4-Cre et les souris CD11c-Cre, par comparaison aux souris sauvages, bien que la diminution soit plus importante dans les souris CD4-Cre. Bien que l'âge ne soit pas indiqué pour ces souris, on peut supposer que celles-ci ont été analysées à un âge où les Tregs recirculants représentent une partie non négligeable des Tregs thymiques. Or, en périphérie, l'IL-2 nécessaire au maintien de l'homéostasie des Tregs provient en grande partie des Tconv, comme leur publication le stipule par ailleurs. De ce fait, chez les souris CD4-Cre, le maintien des Tregs périphériques n'est pas assuré, contrairement aux CD11c-Cre (comme le montrent par ailleurs leurs analyses sur la rate), et, de ce fait, la recirculation est abolie. Ainsi, l'importance de l'IL-2 produite par les CD4SP thymiques reste discutée à ce jour.

Mahmud et collaborateurs affirment que les ligands des TNFR (GITRL, OX40L, TNF) sont exprimés par des cellules présentatrices d'antigènes incluant les cellules dendritiques, mais la distribution exacte de ces marqueurs pour les différentes populations stromales n'est pas indiquée (Mahmud et al., 2014).

Introduction

Bien que non traité de manière exhaustive ici, il faut prendre en considération le fait que les signaux mentionnés comme importants pour le développement des Tregs peuvent, à leur tour, également affecter le développement du stroma thymique. Par exemple, les TNFR sont importants pour la maturation des cellules stromales et notamment celle des mTECs. De plus, comme mentionné précédemment, Irla, Hugues et collaborateurs ont démontré l'importance d'une interaction des CD4SP auto-spécifiques avec les mTECs, *via* l'axe de signalisation CD40-CD40L, pour l'établissement d'un stroma thymique correctement développé (Irla et al., 2008). D'autres signaux tels que le signal RANK/RANKL et Lt β R (TNFRSF3) ont été jugés importants pour le développement et la maturation des mTECs et une modification de ces signaux peut entraîner une déstructuration de la médulla ou des défauts de maturation de ces cellules, et impacter, de ce fait, le développement Treg (Cowan et al., 2015). Il serait intéressant de dissocier l'importance de ces différents signaux pour le développement du stroma thymique versus un rôle direct dans le développement des Tregs, puisque les deux sont intimement liés. Ceci permettrait éventuellement de mettre en lumière l'impact des fines modulations de ces différents signaux sur le développement des Tregs et donc sur l'établissement d'une hétérogénéité à ce niveau.

6. Conclusion & objectifs : une hétérogénéité au sein des tTregs ?

Malgré l'importance des Tregs pour le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et leur implication dans un nombre important et très varié de pathologies, la diversité fonctionnelle de cette population n'est étudiée que depuis peu. Ces dernières années, différentes sous-populations de Tregs, notamment tissulaires, ont été décrites et il est désormais de notoriété publique que leur fonction va au-delà du contrôle de développement de pathologies auto-immunes. De récentes études stipulent que les Tregs acquièrent, du moins en partie, leur hétérogénéité en périphérie. Par exemple, les VAT-Tregs possèdent des précurseurs dans la rate qui expriment PPAR γ , avant d'être activés et de migrer dans le tissu adipeux. Néanmoins, des chercheurs experts dans le domaine des Tregs tissulaires tels que Matis et Benoist, n'excluent pas une origine thymique pour l'acquisition d'un premier degré d'hétérogénéité qui, selon eux, est ensuite renforcée en périphérie lorsque le Treg est activé par une CPA présentant l'antigène pour lequel il est spécifique (Panduro et al., 2016).

En effet, lors de leur développement, les précurseurs des Tregs engagent déjà leur TCR et la force de ce signal jouera un rôle majeur pour le devenir de ce thymocyte, à savoir sa délétion ou bien son

Introduction

développement en Treg. Néanmoins, un large panel d'affinité/d'avidité de TCR pour un antigène donné permet le développement des Tregs et, pour un TCR donné, un thymocyte peut être délété, devenir Tconv ou bien Treg. Le signal TCR n'est donc pas seul responsable du développement en Treg d'un CD4SP. Les précurseurs des Tregs sont soumis à une multitude d'autres signaux dont la plupart sont décrits comme importants pour au moins une partie des Tregs. Ces signaux sont majoritairement impliqués dans la différenciation en Treg et dans la survie de ceux-ci lors de leur développement. Il est possible que certains de ces signaux compensent un signal TCR initial trop faible pour l'engagement dans le lignage Treg, alors que d'autres permettent la survie de certains Treg qui auraient pu être délétés du fait d'un signal trop fort. De plus, le signal TCR et le signal cytokinique sont importants pour mettre en place un paysage épigénétique nécessaire à un développement de Treg et à l'expression des gènes de signature des Tregs.

Un aspect non ou peu abordé à ce jour est, premièrement, de savoir si une hétérogénéité au sein des Tregs se met déjà en place durant ce développement thymique et, deuxièmement, comment les signaux auxquels sont soumis les Tregs peuvent influencer cette hétérogénéité. Pour ma thèse, je me suis donc intéressée à ces deux points. Notre laboratoire avait montré précédemment que les Tregs sont capables de regagner leur organe d'origine, le thymus, et d'inhiber le développement de leurs précurseurs, notamment *via* une déprivation en IL-2, une cytokine importante pour le développement des Tregs selon certaines sources. Les cytokines doivent donc jouer un rôle primordial dans le développement Treg puisqu'un mécanisme de rétrocontrôle négatif du développement module celles-ci. Nous nous sommes donc attachés à comprendre dans quelle mesure l'IL-2, mais aussi l'IL-15 - une cytokine décrite comme jouant éventuellement un rôle redondant avec l'IL-2 dans le développement Treg - influent sur ce dernier. Des analyses en cytométrie menées sur des souris déficientes en IL-2 et en IL-15, dans lesquelles nous pouvions discriminer les Tregs en développement des recirculants, ont montré que non seulement l'IL-2 et l'IL-15 jouent un rôle quantitatif non redondant pour le développement des Tregs, mais aussi que ces cytokines affectent différentes sous-populations de Tregs thymiques. Pour comprendre l'étendue réelle de l'hétérogénéité des Tregs thymiques, nous avons choisi une première approche en cytométrie en flux, grâce à un panel de 6 marqueurs différents, déterminé par des analyses de single cell RNAseq et complété par une analyse CITEseq, afin de faire apparaître des différences transcriptomiques, voire potentiellement fonctionnelles, entre les différentes sous-populations de Tregs mises en évidence. Finalement nous avons analysé la

Introduction

dépendance cytokinique des populations identifiées de cette manière. Nos résultats suggèrent que l'IL-2 et l'IL-15 jouent un rôle à la fois quantitatif et qualitatif dans le développement des Tregs thymiques dont l'hétérogénéité a été sous-évaluée à ce jour.

RESULTATS

IL-2 and IL-15 drive intrathymic differentiation of phenotypically and functionally distinct regulatory T lymphocytes

Cécile Apert¹, Jérémy Santamaria¹, Ariel Galindo-Albarran¹, Sarah Castan¹, Nicola McJannett¹, Manuel Lebeurrier¹, Olivier Joffre¹, Simon Fillatreau², Nathalie Vialaneix³, Claire Hoede³, Paola Romagnoli¹, and Joost P.M. van Meerwijk¹

¹CPTP, Université de Toulouse, CNRS, Inserm, UPS, Toulouse, France; ²Institut Necker-Enfants Malades, INSERM U1151-CNRS UMR 8253, Paris, France; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France; AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France; ³Unité MIAT, INRA de Toulouse

Abbreviations: RTE, recent thymic emigrants; CD4SP, CD4⁺CD8⁻TCR^{high}; Treg, regulatory T cells; TCR, T-Cell Receptor; IL-2, Interleukin 2; IL-15, Interleukin 15; MHC, Major Histocompatibility Complex ;

Abstract

Intrathymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes (Treg) depends on signals from the TCR, cytokine-receptors, and other cell-surface receptors. The cytokines IL-2 and IL-15 have been suggested to quantitatively modulate Treg-development. However, recent evidence showed that very large proportions of thymic Treg are cells that had migrated from the periphery back to the thymus. The role of IL-2 and IL-15 therefore needs to be reassessed. These cytokines may also contribute to the differentiation of functionally distinct Treg subsets. Using an experimental setting in which we unambiguously distinguish newly developing from recirculating Treg, we here address the quantitative and qualitative roles of IL-2 and IL-15 in Treg-development, selection, and differentiation. Our results definitively demonstrate that in absence of IL-2 or IL-15 the thymus produces substantially less Treg. Importantly, these cytokines drove the differentiation of functionally apparently distinct Treg subsets, the number of which is higher than previously appreciated. They also differentially modulate the TCR-repertoire expressed by newly developing Treg. Given probable variations in the intrathymic availability of IL-2 and IL-15, our data suggest that the thymic output of distinct Treg subsets with in part different antigen-specificities may vary with age and/or immune-status.

Introduction

Regulatory T lymphocytes expressing the forkhead/winged helix transcription factor *Foxp3* (Treg) play a central role in the control of innate and adaptive immune responses (Sakaguchi, 2000). Absence of these cells in individuals and animals carrying mutations in the gene encoding *Foxp3* leads to a rapidly lethal inflammatory autoimmune syndrome (Brunkow et al., 2001a; Khattri et al., 2017; Wildin et al., 2001). Whereas probably most Treg develop in the thymus (Sakaguchi et al., 2006), others can differentiate in the periphery from conventional T cells (Tconv) (Shevach and Thornton, 2014).

Thymic development of Treg distinguishes itself from that of Tconv in several aspects. In contrast to Tconv, the Treg population is enriched in autospecific cells (Hsieh et al., 2004; Romagnoli et al., 2002), and the selection-criteria for the development of Tconv vs. Treg are therefore different. It was shown that high affinity interactions between the precursor's TCR and MHC/peptide complexes expressed by thymic stromal cells are required for Treg development (Jordan et al., 2001; Picca et al., 2006). Moreover, co-stimulatory molecules and other cell-surface receptors as CD28, LFA-1, and CD27 promote Treg (but not Tconv) development (Romagnoli and Van Meerwijk, 2010). Also the cytokines IL-2 and IL-15 are thought to favour Treg (but not Tconv) development (Apert et al., 2018), potentially by preventing apoptotic cell death of the autospecific Treg-precursors (Tai et al., 2013b).

We and others recently showed that a very large part (up to >90% in old mice) of the thymic Treg-pool is composed of cells that had recirculated from the periphery back to the thymus (Cowan et al., 2016; Thiault et al., 2015). Interestingly, these recirculating Treg appeared to inhibit the intrathymic development of their precursors. Given that in adult mice only a minority of intrathymic Treg are cells that had recently developed, it is essential to distinguish between newly developing and recirculating Treg when studying Treg-differentiation in the thymus. This is best done using mutant mice expressing GFP under control of the *Rag2* promoter and cell-surface Thy1.1 under control of the *Foxp3* promoter. In such mice, green-fluorescent *Foxp3*⁺ Treg are newly developing cells and Treg that had lost GFP are recirculating cells (Thiault et al., 2015; Yu et al., 1999).

Treg employ a large battery of suppressor effector functions to exert their immunosuppressive action (Josefowicz et al., 2012). Moreover, they are also involved in tissue repair using even other effector mechanisms (Panduro et al., 2016). Distinct Treg-subsets appear to ensure these different functions.

Résultats

Thus, Treg-subsets specialised in the control of type 1, type 2, type 3, and antibody responses and of immune homeostasis in specific tissues (e.g. visceral adipose tissue) have been identified, each expressing characteristic transcription factors (Campbell and Koch, 2011). It would appear likely that these Treg-subsets differentiate in the periphery as a consequence of the cytokine milieu, TCR-signals, and probably other factors, and evidence for this has indeed been published (Li et al., 2018a). However, it was recently shown that distinct Treg subsets can also differentiate in the thymus (Wyss et al., 2016). A newly developing Treg-subset characterised by high level-expression of CD25, GITR, and PD-1 may control autoimmune-responses whereas Treg expressing low levels of these three markers were involved in control of intestinal immune-homeostasis.

In this study we assessed the respective roles of IL-2 and IL-15 in the differentiation of Treg-subsets in the thymus. We provide definitive data on the quantitative roles of these interleukins. We characterised their involvement in the intrathymic differentiation of known Treg-subsets. We identified novel, apparently functionally distinct Treg subsets and assessed the involvement of IL-2 and IL-15 in their differentiation in the thymus. Finally, we studied the implication of these interleukins in shaping of the TCR-repertoire expressed by newly developing Treg. Our results demonstrate substantial quantitative and qualitative roles of IL-2 and IL-15 in the differentiation of Treg in the mouse thymus.

Results

IL-2 and IL-15 play major non-redundant roles in intrathymic Treg development

Previous reports indicated important roles for the γ_c -cytokines IL-2 and IL-15 in the intrathymic development of Treg (Apert et al., 2018; Bayer et al., 2005; Burchill et al., 2007; Marshall et al., 2014; Vang et al., 2008)(Malek, 2008). However, we and others recently demonstrated that very substantial proportions of thymic Treg are cells that had recirculated from the periphery back to the thymus (Cowan et al., 2016; Thiault et al., 2015). Moreover, IL-2 is now known to play an important role in the peripheral survival of Treg (Setoguchi et al., 2005), suggesting that at least part of the reduction in Treg-levels found in the thymus of mice deficient in IL-2 or its receptor is due to lower levels of recirculating cells. We therefore revisited the role of IL-2 and IL-15 in the intrathymic differentiation of Treg using *Rag2-Gfp* transgenic mice in which newly developing T cells express GFP whereas recirculating cells do not (McCaughy et al., 2007; Thiault et al., 2015). The studied mice also carried the *Foxp3-Thy1a* mutation (Liston et al., 2008). In these mice, $Foxp3^+$ Treg express the Thy1.1 allele at their cell-surface and can therefore be detected without fixation/permeabilization which is required for intracellular Foxp3-detection but leads to loss of the GFP fluorescence and thus of a reliable flow-cytometry-mediated distinction between newly developing GFP^+ and recirculating GFP^- T cells. To avoid effects due to the thymic involution associated with immune-pathology in IL-2-deficient mice, we analysed thymi of three-week-old IL-2-deficient (*Il2^o*) *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* mice and *Il2^{wt/wt}* (“wt”) littermates. Newly developing $CD4^+CD8^-TCR^{high}$ ($CD4SP$) were gated as shown in Fig. S1 and the proportions of $Foxp3^+$ Treg among these cells calculated. We thus demonstrated that in absence of IL-2 substantially (39%) less $Foxp3^+$ Treg develop in the thymus (Figs. 1A, B). By contrast, we did not observe a substantial difference in the proportions of total $CD4SP$ cells among total thymocytes (Fig. 1C). Similar analysis revealed substantially less (25%) newly developing Treg (but not Tconv) in IL-15-deficient as compared to wt littermates (Fig. 1A, B, C). To investigate if IL-2 and IL-15 play redundant roles in intrathymic Treg-development, we next analysed *Il2^oIl15^o* thymi. As compared to *Il2^o* or *Il15^o* thymi, the proportions of newly developing Treg along $CD4SP$ cells dropped even further (reduction of 74%, Fig. 1A, B), but the development of $CD4SP$ Tconv appeared unaltered (Fig. 1C). Analysis of the

Résultats

absolute numbers of Treg newly developing in the thymus of wt and mutant mice confirmed that IL-2 and IL-15 play non-redundant roles in intrathymic Treg development (Fig. 1D).

Not all these cells are fully mature and ready to leave this organ. To assess the involvement of IL-2 and IL-15 in the development of fully mature Treg, we therefore performed flow-cytometry analyses with antibody to the receptor for S1P, S1P1, critically involved in thymic egress of T lymphocytes (Schwab and Cyster, 2007). A large proportion (but not all) Treg expressed S1P1 (Fig. 1E). Analyses of thymocytes from wt, IL-2^o, IL-15^o and IL-2^oIL-15^o mice revealed substantial lower levels of Treg among newly developing GFP⁺S1P1⁺CD4SP thymocytes in IL-2^o and IL-15^o mice, as compared to wt littermates (Fig. 1F). Again, we found even less Treg in IL-2^oIL-15^o mice, confirming the non-redundant nature of the implication of IL-2 and IL-15 in Treg differentiation. Finally, we also assessed cytokine-involvement in the thymic production, *i.e.* egress, of Treg by analysing recent thymic emigrants (RTE), which express low but detectable levels of GFP in *Rag2-Gfp* transgenic mice (Fig. 1G, H). Again, in IL-2^o and IL-15^o spleens we found substantially less Foxp3⁺ Treg among CD4⁺ RTE than in wt spleens, and in IL-2^oIL-15^o mice even less (Fig. 1H). Combined, these data firmly demonstrate that IL-2 and IL-15 play quantitatively substantial and non-redundant roles in the intrathymic development and thymic production of Treg.

Development of CD25⁺ Treg depends on IL-2 but not on IL-15

Most of the studies on CD4⁺Foxp3⁺ Treg reported in the literature focused on cells expressing high levels of the IL-2 receptor α chain CD25. We therefore next first analysed the involvement of IL-2 and IL-15 in the differentiation of CD25⁺ Treg in the thymus. As shown in Figs. 2A and B, whereas almost no CD25⁺ Treg newly developed in IL-2^o mice, the deficiency in IL-15 had only a minor impact on development of this population. Also among the most mature S1P1-expressing CD4SP cells, we observed an almost complete disappearance of newly developing CD25⁺ Treg in IL-2^o but not in IL-15^o mice (Fig. 2C). Finally, among RTE we found practically no CD25⁺ Treg in IL-2^o mice but, again, we only observed a small reduction in IL-15^o thymi (Fig. 2D). These data firmly establish that IL-2 plays an essential and non-redundant role in the differentiation of CD25⁺ Treg. By contrast, we revealed only a minor role for IL-15 in this process.

Résultats

One might argue that since IL-2 induces expression of CD25 in mature T cells, Treg normally developed in IL-2^o mice but simply did not express CD25. However, this hypothesis is inconsistent with our observation that numerically almost half of the Treg did not develop in the absence of IL-2. Moreover, CD25 is also highly expressed by some very immature CD4⁻CD8⁻ thymocytes and in this population, wt and IL-2^o cells expressed similar levels of CD25 (Fig. S2). This observation demonstrates that IL-2 is not strictly required for expression of high levels of this component of its receptor. Combined, these data indicate that IL-2 is involved in the development and/or survival of CD25⁺ Treg.

Development of CD25⁻ Treg partially depends on IL-15 but not on IL-2

We next analysed the implication of IL-2 and IL-15 in the development of Treg that do not express CD25. Whereas we found less CD25⁻ Treg among CD4SP thymocytes in IL-15^o than in wt mice, a deficiency in IL-2 did not lead to a reduction in the development of this population, and even increased it somewhat (Fig. 2E). Also among the most mature (S1P1⁺) newly developing CD4SP and among splenic RTE, we observed substantially less CD25⁻ Treg in IL-15^o (but not in IL-2^o) mice than in wt animals (Fig. 2F, G). Interestingly, the absence of IL2 rather appeared to substantially increase thymic export of newly developing CD25⁻ Treg (Fig. F, G). We therefore conclude that IL-15 plays an important, though not exclusive, role in the intrathymic development of CD25⁻ Treg.

It has been argued that CD25⁻Foxp3⁺ thymocytes are not fully mature Treg but precursors of CD25⁺ cells (Marshall et al., 2014). However, we found that there are as many fully mature S1P1⁺ CD25⁻ as CD25⁺ Treg (Fig. 2H) and that these cells leave the thymus and persist in the periphery, also when they had totally lost GFP-expression (Fig. 2I).

Development of GITR^{high}PD-1^{high} Treg depends on IL-2 but not IL-15

Résultats

Since CD25⁺ but not CD25⁻ Treg express the high affinity IL-2 receptor involved in the suppressive activity of these cells (Busse et al., 2010; Chinen et al., 2016; Scheffold et al., 2005), these two populations may have at least partially distinct suppressor-effector functions, but more work will need to be performed to firmly establish this possibility. However, other functionally distinct Treg subsets are known to develop in the thymus (Smigielski et al., 2014). Thus, whereas CD25^{high}GITR^{high}PD-1^{high} (“triple-high”) Treg appear to control autoreactivity, CD25^{low}GITR^{low}PD-1^{low} (“triple-low”) Treg appear involved in the control of immune responses in the gut (Wyss et al., 2016). Since CD25⁺ Treg do not develop in IL-2^o mice, “triple-high” cells obviously don’t either. We nevertheless analysed expression of GITR and PD-1 on Treg newly developing in the thymus of wt, IL-2^o and IL-15^o mice. In IL-15^o (but not in IL-2^o) mice, we found somewhat lower proportions of GITR^{high}PD-1^{high} cells among CD25^{+/low} Treg than in wt animals (Fig. 2J, K). These data confirm our conclusion that the absence of CD25⁺ Treg in IL-2^o mice is not simply due to the lack of CD25-expression but implies the absence of (or at least a substantial reduction in) one or more functionally distinct Treg-subsets. We also found a substantial drop in the proportions of GITR^{low}PD-1^{low} cells among CD25^{low} Treg in IL-2^o mice and a small increase in IL-15^o animals (Fig. 2J, L).

Several apparently functionally distinct Treg subsets develop in the mouse thymus

It appears likely that more Treg-subsets develop in the thymus than the few that have been described to date. To identify novel cell surface markers for distinct Treg-subsets, we screened a panel of antibodies to cell-surface antigens expressed by newly developing (*i.e.* Rag2-GFP⁺) fully mature Treg ready to leave the thymus. These cells were identified, as for Foxp3⁻ Tconv (Bankovich et al., 2010; Xing et al., 2016), based on expression of the S1P-receptor S1P1 and low-levels of CD69 (Fig. 3A). We thus confirmed or found that CD25, PD-1 (CD279), GITR (CD357), CD73, 4-1BB (CD137), and OX-40 (CD134) are expressed at variable levels on newly developing fully mature thymic Treg (Fig. 3B).

Phenograph-analysis of flow-cytometry data obtained with these antibodies revealed ten newly developing Treg subsets in the thymus (Fig. 3C, S3). These subsets expressed CD25 at various low levels. The distinct subsets were furthermore characterised by differential expression of distinct levels

Résultats

of CD73, OX-40, 4-1BB, CD69, GITR and PD-1 (Fig. 3D). Also among RTE we found multiple Treg subsets (Fig. S4). These data indicated that the thymus produces more distinct Treg subsets than the ones reported to date (Wyss et al., 2016).

To further assess the differences between the thymic Treg-subsets identified by flow-cytometry, we then performed CITEseq analysis on S1P1⁺ Treg using the same antibody-panel. With the CITEseq data we identified 11 Treg-subsets based on the antibody signals (Fig. 3E, S5). One of these apparent subsets expressed high levels of CD69 and should be considered not totally mature (subset #3 in Fig. 3F). To assess potential functional differences between the thus identified Treg subsets, we performed a gene ontology analysis of the genes differentially expressed between them. Among the top ten differentially expressed gene sets, two concerned peripheral T cell differentiation and four were involved in immune-tolerance (Fig. 3G). Another one concerned amino-acid biosynthesis, a process targeted by Treg to suppress immune responses (Howie et al., 2014). These data suggested that the Treg subsets identified by CITEseq had distinct functional capacities.

Taken together, these data indicate that more Treg subsets develop in the mouse thymus than previously anticipated. Further studies will be required to determine the homing and the function of these subsets.

IL-2 and IL-15 drive development of partially distinct Treg-subsets

We next assessed the IL-2 vs. IL-15-requirement for the development of the Treg subsets identified by flow-cytometry. As shown in Fig. 3H and S6, development of all identified CD25^{high} potential Treg subsets (# 5, 8, 9, 10) depended on IL-2. Development of at least two (# 3 and 7) out of four (# 1, 3, 2, 7) CD25⁻ potential Treg-subsets partially depended on IL-15. More surprisingly, five of the six CD25⁻ potential Treg subsets (numbers 1, 2, 3, 4, 6 in Fig. 3H, S6) were more abundant in IL-2^o animals. These potential Treg-subsets therefore appeared to be able to integrate, directly or indirectly, IL-2 and IL-15-dependent signals during their development. Another potential Treg subset (number 7 in Fig. 3H,

Résultats

S6), representing 16% of CD25^{-low} Treg in wt animals, appeared to integrate IL-15 but not IL-2 signals during its development.

The TCR-repertoires expressed by Treg that developed in an IL-2 vs. IL-15 dependent manner are partially distinct

The IL-2 involved in thymic Treg differentiation appears produced by thymic T cells and dendritic cells (DC) and the IL-15 by medullary epithelial cells (mTEC) (Cui et al., 2014; Hemmers et al., 2019; Marshall et al., 2014; Weist et al., 2015). Since DC and mTEC select Treg expressing distinct TCR repertoires (Perry et al., 2014), we therefore hypothesised that the TCR-repertoires expressed by Treg that developed in an IL-2 or IL-15-dependent manner are dissimilar. To address this issue, we bred *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* mice expressing a transgene encoding the public TCR β clonotype (“Kaa”) of the MOG-reactive CD4⁺ T cell response during EAE in C57BL/6 mice (Fazilleau et al., 2006; Kieback et al., 2016) and that were either IL-2^o, IL-15^o, or wt littermates. We analysed the development of MOG(35-55)/I-A^b-specific Treg by flow-cytometry. A quite substantial proportion (26 \pm 6%) of newly developing Treg stained positive with the MOG(35-55)/I-A^b-tetramer in Kaa TCR β -transgenic but not in non-transgenic littermates (Fig. 4A, B). We did not observe a significant difference between wt and IL-2^o mice (Fig. 4B). By contrast, we found 25% less MOG(35-55)/I-A^b-specific cells among newly developing Treg in IL-15^o mice (Fig. 4B). We therefore concluded that at least IL-15 conditions selection of the TCR-repertoire expressed by developing Treg.

To investigate the involvement of IL-2 and IL-15 in shaping of the TCR-repertoire expressed by Treg in further detail, we next bred *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* mice that expressed the transgenic Kaa TCR β chain, that were heterozygous for a *Tcra* null-mutation, and that were either IL-2^o, IL-15^o, or homozygous wt littermates. We analysed the TCR α -repertoires expressed by newly developing Treg in the thymus by high-throughput sequencing of *Tcra* mRNAs. The diversity of the TCR α -repertoires expressed by Treg populations developing in wt and mutant animals appeared similar (Fig. 4C). However, comparison of the public TCR repertoires (defined as sequences we found in all four analysed animals per genotype) revealed major differences. Thus, a substantial part (51%) of TCRs we detected in wt animals did not develop in IL-2^o mice (Fig. 4D). Surprisingly, 27% of the TCR-

Résultats

repertoire we detected in IL-2^o mice did not develop in wt animals. Similarly, 59% of the TCRs detected in wt animals did not develop in IL-15^o mice and 36% of the TCR-repertoire we detected in IL-15^o mice did not develop in wt animals. A quite large proportion (59%) of the IL-2 or IL-15-dependent TCR α clonotypes required both of these two interleukins (Fig. 4E). These results indicate that IL-2 and IL-15 drive the development of Treg expressing in part distinct TCR-repertoires.

We next analysed the TCR α -characteristics of Treg that required IL-2, IL-15, both or none of these two cytokines for their development. The distribution of the CDR3-length was very similar between the four groups of Treg (Fig. 4F). Also the number of non-germline-encoded (N and P) nucleotides was similar (Fig. 4G). Interestingly, analysis of TRAV-usage revealed some differences (Fig. 4H, S7). Analysis of TRAV-TRAJ association did not reveal any obvious difference (Fig. S8). It was shown that the amino-acid characteristics of the TCR β CDR3 can predict autoreactivity. In our experimental setup only the TCR α chain was variable. We therefore analysed the representation of hydrophobic, acidic, and basic amino-acids in the different TCR α CDR3-positions. We did not observe any major differences in the representation of hydrophobic and basic amino-acids (Fig. S8). However, in position 4 of CDR3, acidic amino-acids were found in 20% of the IL-2 and IL-15 independent TCR α , and in 36% of IL-2 dependent TCR α (Fig. 4I).

Discussion

We here firmly demonstrated that IL-2 and IL-15 play substantial, non-redundant quantitative roles in the intrathymic development of Treg. Importantly, our data also show that these cytokines are involved in shaping the subset-composition of the Treg-population developing in the thymus, and that the number of these functionally distinct subsets is larger than previously anticipated. Finally, the TCR-repertoires expressed by Treg developing in an IL-2 vs. IL-15-dependent manner are in part different. Given potential variations in the intrathymic availability of IL-2 and IL-15, our data suggest that the thymic output of distinct Treg subsets with in part different antigen-specificities may vary with age and/or immune-status.

Mice deficient in the IL-2R α or β chains, in IL-2, IL-15 or both of these cytokines, have fewer Treg in the thymus (Burchill et al., 2008a; Marshall et al., 2014; Vang et al., 2008). However, IL-2 plays a crucial role in the peripheral survival of Treg (Setoguchi et al., 2005) and, since the pool of recirculating Treg in the thymus can be, depending on the age, very large (Thiault et al., 2015), these data failed to firmly demonstrate a role for IL-2 and IL-15 in Treg development in the thymus. In our experimental mouse model, we could unambiguously identify newly developing Treg. Our results firmly demonstrate quantitatively substantial and non-redundant roles for IL-2 and IL-15 in Treg development.

More importantly, IL-2 and IL-15 drive the development of in part distinct Treg subsets. An important marker to distinguish Treg subsets is CD25. IL-2 is required for the differentiation of CD25⁺ but not CD25⁻ Treg. Since we observed a substantial reduction in the total number of developing Treg, the role of IL-2 is not only to drive expression of the high affinity IL-2-receptor (that includes CD25) but more likely to drive differentiation of the distinct CD25⁺ Treg subset and/or to avoid apoptosis of its precursors, as previously proposed (Tai et al., 2013a). Treg expressing high levels of CD25, GITR, and PD-1 were proposed to protect from autoimmune-pathology and cells expressing low levels of these three markers appear to play a role in prevention of chronic inflammation (Wyss et al., 2016). Since in IL-2^o mice no CD25^{high} Treg developed, this cytokine is critically involved in the development of these “triple-high” Treg. We also found a population of GITR^{high}PD-1^{high} cells among CD25^{-low} Treg

Résultats

and that IL-15 favours their development. These data indicate that IL-2 and IL-15 favour development of potentially functionally distinct Treg subsets.

To investigate extensively the respective roles of IL-2 and IL-15 in the differentiation of Treg-subsets, we first searched for cell-surface markers allowing identification of the subsets. We verified that thus identified markers were expressed at varying levels on newly developing Treg and then used them to identify Treg-subsets. CITEseq analysis indicated that the thus identified distinct fully mature Treg subsets ready to leave the thymus (*i.e.* S1P1⁺CD69^{-/low}) have functionally distinct potentials: They differed in expression of gene-sets involved, most notably, in T cell-differentiation in the periphery and in immune-tolerance. Further work will be required to confirm the functional differences between the Treg-subsets.

Using the same set of antibodies to cell-surface markers, we then assessed the involvement of IL-2 and IL-15 in the intrathymic differentiation of fully mature (*i.e.* S1P1⁺CD69^{-/low}) Treg-subsets. The four CD25^{high} subsets all depended upon IL-2 for their development. By contrast, the absence of IL-15 did not change their development. Differentiation of at least two out of the six CD25^{-/low} subsets depend, in part, on IL-15. Five of these six subsets were greater in IL-2^o than in wt animals. Given their very mature phenotype, it appears quite unlikely that these CD25^{-/low} subsets are precursors of CD25⁺ Treg. Among RTE we identified five CD25^{-/low} Treg-subsets, indicating the reality of the thymic production of multiple distinct CD25^{-/low} Treg-subsets. We therefore favour the hypothesis that the thymic CD25^{-/low} Treg-subsets that were greater in IL-2^o than in wt mice compete, in wt mice, with IL-2 dependent Tregs for survival and/or differentiation factors.

We hypothesised that the TCR-repertoires expressed by Treg requiring IL-2 vs. IL-15 for their development are distinct. We indeed found that more than half of the (public) clonotypes we found in wt animals were absent in interleukin-deficient animals. Local production and action of IL-2 (produced by e.g. DC) vs. IL-15 (produced and presented by TEC) may allow these cytokines to drive differentiation of Treg interacting with MHC/peptide complexes expressed by the distinct thymic stromal cell-types. It has indeed previously been shown that DC and TEC drive selection of Treg expressing distinct TCR-repertoires (Perry and Hsieh, 2016). However, Treg-expression of a large fraction of IL-15 dependent TCR clonotypes also required IL-2 (and *vice versa*). This may be due to

Résultats

the previously proposed anti-apoptotic action of IL-2 (Tai et al., 2013a) which would allow selection of Treg expressing TCRs recognising self-MHC/peptide complexes with higher affinity. In this case the locally acting IL-2 would be derived from thymocytes negatively selecting upon interaction with TEC.

Intriguingly, in the absence of IL-2 or IL-15, some TCR-clonotypes arose that we did not observe in wt animals. A hypothesis that may explain this observation is that signals through the TCR synergise with signals through the receptors for IL-2 and IL-15 to drive differentiation and selection of Treg-precursors. Rather than only antagonising apoptosis, the cytokines would act as a rheostat.

Combined, the data presented here indicate a much more complex role for the cytokines IL-2 and IL-15 in the intrathymic differentiation of Treg than that previously anticipated. Rather than only quantitatively controlling this process, they also appear to qualitatively do so and guide differentiation of distinct Treg subsets and contribute to shaping the specificity of Treg emerging from the thymus. The relative availability of IL-2 and IL-15 in the thymus may change during life. It has thus been described that Treg recirculating from the periphery back to the thymus limit the availability of IL-2 and thus inhibit Treg development (Thiault et al., 2015). It will now be important to assess how such potential changes influence the development of Treg in the thymus and the immunosuppressive activity of these cells in the periphery.

Materials & Methods

Mice

Rag2-Gfp mice (Yu et al., 1999) on a B6 genetic background (Boursalian et al., 2004) were kindly provided by Drs. A. Liston and P. Fink; B6 *Foxp3-Thy1a* mice (Liston et al., 2008) were kindly provided by Dr. A. Liston. *Il2*^o (B6.129P2-Il2tm1Hor/J) mice and *Tcra*^o mice (Schorle et al., 1991) were purchased at JAX laboratories, *Il15*^o mice (Kennedy et al., 2000) were kindly provided by Dr. Yakub Tanriver (Freiburg, Germany). Kaa *Tcrb*-transgenic B6 mice (Fazilleau et al., 2006) were provided by Dr. Simon Fillatreau (Charité, Berlin, Germany). Unless stated otherwise, mice were used at three weeks of age for the analyses. All experiments involving animals were performed in compliance with governmental and institutional guidelines (ethical approval APAFIS#4151-201602171 0481496.v6).

Flow cytometry

Sample preparation and staining was performed as previously described (Thiault et al., 2015). Labelled cells were acquired using an LSRII or a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and the data analysed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Doublets and dead cells were excluded from the analysis by using appropriate FSC/SSC gates. 13-color flow-cytometry acquisition was performed on a LSRII SORP platform (BD Biosciences). Antibodies are described in Table S1. For the *t*SNE analysis on 13-color cytometry panels, the Fortessa flow-cytometer was standardized allowing perfect reproducibility between samples analysed on different days. The “Phenograph” plugin of the FlowJo software was used to determine different Treg-subsets in a non-overseen manner.

CITEseq analysis

Thymocytes from three-week-old *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* B6 mice were stained with the fluorochrome-labelled and nucleotide-labelled antibodies listed in Table S2. GFP⁺CD4⁺CD8⁻S1P1⁺Thy1.1⁺ Tregs were FACS sorted. 5000 cells per sample (n=3) were injected into the 10X Genomics CITEseq platform according to the manufacturer’s protocols. Libraries were sequenced using the Illumina hiSeq platform. Thus obtained data were processed as described in the supplemental Materials and Methods.

Tetramer staining

Tetramer staining was performed on thymocytes from three-week-old *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a Kaa Tcrb*-transgenic wt, *Il2^o* or *Il15^o* B6 mice. After organ digestion, cells were washed, resuspended in RPMI medium, and incubated 15min on ice with an Fc block mix (24G2 at 10µg/ml; mouse and rat IgG at 25µg/ml) and 100nM dasatinib (Sigma-Aldrich). $6 \cdot 10^6$ cells were then incubated for 2 hours at 25°C with 1,5 µl tetramer (NIH tetramer facility) in 100 µl RPMI medium. Data were acquired on a Fortessa flow-cytometer (BD) and analysed with FlowJo software.

TCR repertoire analysis

10^5 GFP⁺CD4⁺CD8⁺Thy1.1⁺ Tregs were FACS sorted from thymi of individual 3-week-old *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a Kaa Tcrb*-transgenic *Tcra^{+/o}* wt, *Il2^o* or *Il15^o* B6 mice. Four biological replicates were analysed for each of the three different genotypes. The generation of the *Tcra*-libraries was performed as described (Feng et al., 2015a). Libraries were sequenced on the Illumina miSeq platform. Data were processed as described in the supplemental Materials and Methods.

Statistical Analysis

The statistical significance of differences between groups of paired data was analysed using the two-tailed Wilcoxon matched pairs signed-rank test, that of unpaired data using the two-tailed Mann-Whitney test.

Accession codes

The CITEseq data reported in this study are available from Gene Expression Omnibus with accession code GSEXXXXX. All the command lines used can be found at: <https://github.com/mlebeur/citeseqcommandlines>.

Acknowledgements

We thank Adrian Liston and Pamela Fink for providing *Rag-Gfp Foxp3-Thy1a* mutant mice. We are also very grateful to the following persons for excellent technical assistance: Fatima L'Faqihi, Valérie Duplan-eche, Anne-Laure Iscache, Lidia De la Fuente, Paul Menu of the CPTP Cytometry platform; Frédéric Martins and Adrien Castinel of the GeT-PlaGE Genotoul; and the personnel of the Inserm US006 ANEXPLO/Creffre animal facility.

References

- Apert, C., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M.J.P.M. (2018). IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein Cell* 9, 322–332.
- Bankovich, A.J., Shioh, L.R., and Cyster, J.G. (2010). CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J. Biol. Chem.* 285, 22328–22337.
- Bayer, A.L., Yu, A., Adeegbe, D., and Malek, T.R. (2005). Essential role for interleukin-2 for CD4+ CD25+ T regulatory cell development during the neonatal period. *J. Exp. Med.* 201, 769–777.
- Boursalian, T.E., Golob, J., Soper, D.M., Cooper, C.J., and Fink, P.J. (2004). Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol* 5, 418–425.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68–73.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280–290.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.W.J., Vegoe, A.L., Hsieh, C.S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008). Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire. *Immunity* 28, 112–121.
- Busse, D., de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A., and Höfer, T. (2010). Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3058–3063.
- Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 119–130.
- Chinen, T., Kannan, A.K., Levine, A.G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nat. Immunol.* 17, 1322–1333.
- Cowan, J.E., McCarthy, N.I., and Anderson, G. (2016). CCR7 Controls Thymus Recirculation, but Not

Résultats

Production and Emigration, of Foxp3(+) T Cells. *Cell Rep* 14, 1041–1048.

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-Ichi, S., and Ikuta, K. (2014). Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1915–1920.

Fazilleau, N., Delarasse, C., Sweenie, C.H., Anderton, S.M., Fillatreau, S., Lemonnier, F.A., Pham-Dinh, D., and Kanellopoulos, J.M. (2006). Persistence of autoreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell repertoires in MOG-expressing mice. *Eur. J. Immunol.* 36, 533–543.

Feng, Y., van der Veeken, J., Shugay, M., Putintseva, E. V, Osmanbeyoglu, H.U., Dikiy, S., Hoyos, B.E., Moltedo, B., Hemmers, S., Treuting, P., et al. (2015). A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature* 528, 132–136.

Hemmers, S., Schizas, M., Azizi, E., Dikiy, S., Zhong, Y., Feng, Y., Altan-Bonnet, G., and Rudensky, A.Y. (2019). IL-2 production by self-reactive CD4 thymocytes scales regulatory T cell generation in the thymus. *J. Exp. Med.* jem.20190993.

Howie, D., Waldmann, H., and Cobbold, S.P. (2014). Nutrient sensing via mTOR in T cells maintains a tolerogenic microenvironment. *Front. Immunol.* 5, 1–14.

Hsieh, C.S., Liang, Y., Tzysnik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21, 267–277.

Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Hohenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2, 301–306.

Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F.F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30, 531–564.

Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 771–780.

Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. (2017). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+T regulatory cells. *J. Immunol.* 198, 993–998.

Kieback, E., Hilgenberg, E., Stervbo, U., Lampropoulou, V., Shen, P., Bunse, M., Jaimes, Y., Boudinot, P., Radbruch, A., Klemm, U., et al. (2016). Thymus-Derived Regulatory T Cells Are

Résultats

Positively Selected on Natural Self-Antigen through Cognate Interactions of High Functional Avidity. *Immunity* 44, 1114–1126.

Li, C., DiSpirito, J.R., Zemmour, D., Spallanzani, R.G., Kuswanto, W., Benoist, C., and Mathis, D. (2018). TCR Transgenic Mice Reveal Stepwise, Multi-site Acquisition of the Distinctive Fat-Treg Phenotype. *Cell* 174, 285-299.e12.

Liston, A., Nutsch, K.M., Farr, A.G., Lund, J.M., Rasmussen, J.P., Koni, P.A., and Rudensky, A.Y. (2008). Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11903–11908.

Malek, T.R. (2008). The Biology of Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 453–479.

Marshall, D., Sinclair, C., Tung, S., and Seddon, B. (2014). Differential requirement for IL-2 and IL-15 during bifurcated development of thymic regulatory T cells. *J Immunol* 193, 5525–5533.

McCaughy, T.M., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2007). Thymic emigration revisited. *J Exp Med* 204, 2513–2520.

Panduro, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2016). Tissue Tregs. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 609–633.

Perry, J.S., and Hsieh, C.S. (2016). Development of T-cell tolerance utilizes both cell-autonomous and cooperative presentation of self-antigen. *Immunol Rev* 271, 141–155.

Perry, J.S.A., Lio, C.W.J., Kau, A.L., Nutsch, K., Yang, Z., Gordon, J.I., Murphy, K.M., and Hsieh, C.S. (2014). Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus. *Immunity* 41, 414–426.

Picca, C.C., Larkin, J., Boesteanu, A., Lerman, M.A., Rankin, A.L., and Caton, A.J. (2006). Role of TCR specificity in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell selection. *Immunol. Rev.* 212, 74–85.

Romagnoli, P., and Van Meerwijk, J.P.M. (2010). Thymic selection and lineage commitment of CD4 + Foxp3 + regulatory t lymphocytes (Elsevier Inc.).

Romagnoli, P., Hudrisier, D., and van Meerwijk, J.P. (2002). Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Immunol* 168, 1644–1648.

Sakaguchi, S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101, 455–458.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and

Résultats

autoimmune disease. *Immunol. Rev.* *212*, 8–27.

Scheffold, A., Hühn, J., and Höfer, T. (2005). Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: It takes (IL-)two to tango. *Eur. J. Immunol.* *35*, 1336–1341.

Schorle, H., Holtschke, T., Hünig, T., Schimpl, A., and Horak, I. (1991). Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* *352*, 621–624.

Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2007). Finding a way out: Lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* *8*, 1295–1301.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural *Foxp3*⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* *201*, 723–735.

Shevach, E.M., and Thornton, A.M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev* *259*, 88–102.

Smigielski, K.S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K.R., Dudda, J.C., Klonowski, K.D., and Campbell, D.J. (2014). CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J Exp Med* *211*, 121–136.

Tai, X., Erman, B., Alag, A., Mu, J., Kimura, M., Katz, G., Guinter, T., McCaughy, T., Etzensperger, R., Feigenbaum, L., et al. (2013a). Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. *Immunity* *38*, 1116–1128.

Tai, X., Erman, B., Alag, A., Mu, J., Kimura, M., Katz, G., Guinter, T., McCaughy, T., Etzensperger, R., Feigenbaum, L., et al. (2013b). Foxp3 Transcription Factor Is Proapoptotic and Lethal to Developing Regulatory T Cells unless Counterbalanced by Cytokine Survival Signals. *Immunity* *38*, 1116–1128.

Thiault, N., Darrigues, J., Adoue, V.V., Gros, M., Binet, B.B., Perals, C., Leobon, B., Fazilleau, N., Joffre, O.P., Robey, E.A., et al. (2015). Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.* *16*, 628–634.

Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* *181*, 3285–3290.

Weist, B.M., Kurd, N., Boussier, J., Chan, S.W., and Robey, E.A. (2015). Thymic regulatory T cell

Résultats

niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat Immunol* *16*, 635–641.

Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* *27*, 18–20.

Wyss, L., Stadinski, B.D., King, C.G., Schallenberg, S., McCarthy, N.I., Lee, J.Y., Kretschmer, K., Terracciano, L.M., Anderson, G., Surh, C.D., et al. (2016). Affinity for self antigen selects Treg cells with distinct functional properties. *Nat Immunol* *17*, 1093–1101.

Xing, Y., Wang, X., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2016). Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF- κ B and tonic type I interferon signaling. *Nat. Immunol.* *17*, 565–573.

Yu, W., Nagaoka, H., Jankovic, M., Misulovin, Z., Suh, H., Rolink, A., Melchers, F., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (1999). Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* *400*, 682–687.

Legends to the figures

Figure 1

IL-2 and IL-15 quantitatively regulate intrathymic Treg-development

Thymocytes from 3-week-old *Rag-Gfp Foxp3-Thy1a* mice were stained with fluorescent antibodies against the indicated markers and analyzed by flow cytometry. (A) Representative histograms of Foxp3-Thy1.1 expression on newly developing Treg (CD4SP: GFP⁺CD4⁺CD8⁻TCR^{high}). Indicated gates were used for the quantification in Fig. 1B. (B) Quantification of developing Tregs in wt (n=30), IL-2^o (n=16), IL-15^o (n=11) and IL-2^o IL-15^o mice (n=4). (C) Percentage of developing CD4SP cells in indicated mice. (D) Absolute numbers of developing Tregs. (E) S1P1-expression on CD4SP Foxp3⁺ and Foxp3⁻ thymocytes in wt animals. Indicated gates were for the gating strategy used in Fig. 1F. (F) Quantification of Tregs among fully mature CD4SP thymocytes from wt (n=18), IL-2^o(n=12), IL-15^o(n=10) and IL-2^o IL-15^o mice (n=2). (G) Gating strategy used to quantify Tregs among RTE (GFP⁺CD4⁺CD8⁻) in the spleen. (H) Quantification of Tregs among RTE in the spleen. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 (Mann-Whitney test). Bars indicate mean ± SD.

Figure 2

Treg developing in an IL-2 vs. IL-15 dependent manner are phenotypically different

Thymocytes from 3-week-old *Rag-Gfp Foxp3-Thy1a* wt (n=18), IL2^o (n=12) and IL15^o (n=10) mice were stained with fluorescent antibodies against indicated markers and analyzed by flow cytometry. (A) CD25-expression on electronically gated CD4SP GFP⁺ Thy1.1⁺ newly developing Treg. (B) Quantification of the proportion of CD25⁺ Treg among GFP⁺ CD4SP thymocytes. (C) Quantification of the proportion of CD25⁺ Treg among GFP⁺ S1P1⁺ CD4SP thymocytes. (D) Quantification of the proportion of CD25⁺ Treg among CD4⁺ GFP⁺ RTE in the spleen from wt (n=30), IL-2^o (n=16) and IL-15^o (n=11) mice. (E) Quantification of the proportion of CD25⁻ Treg among GFP⁺ CD4SP thymocytes. (F) Quantification of the proportion of CD25⁻ Treg among GFP⁺ S1P1⁺ CD4SP thymocytes. (G) Quantification of the proportion of CD25⁻ Treg among CD4⁺ GFP⁺ RTE in the spleen. Proportions of CD25⁺ and CD25⁻ Treg among (H) GFP⁺ S1P1⁺ CD4SP thymocytes and (I) among peripheral Treg. (J)

Résultats

GITR vs. PD-1 expression on GFP⁺ Thy1.1⁺ CD4SP thymocytes from indicated mice. Proportions of GITR^{hi}PD-1^{hi} (K) and GITR^{lo}PD-1^{lo} Tregs (L) among GFP⁺Thy1.1⁺CD25⁻CD4SP thymocytes from indicated mice, gated as in J. ns= not significant, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 (Mann-Whitney test). Bars indicate mean values ± SD.

Figure 3

Distinct Treg subsets develop in the mouse thymus

Thymocytes from 3-week-old *Rag-Gfp Foxp3-Thy1a* mice were analysed by multicolour flow cytometry (A,B,C,D,H) or by CITE-seq analysis (E,F,G). (A) S1P1 vs. CD69 expression on Foxp3⁺ and Foxp3⁻ GFP⁺CD4SP thymocytes from a wt mouse. Electronic gates encompass the most mature CD69⁻S1P1^{low} cells. (B) Representative histograms of expression of indicated markers on wt Treg gated as in A, right panel. (C) tSNE representation of the ten mature Treg subsets identified, using flow-cytometry data, using Phenograph (k=125). (D) Heatmap of expression of indicated markers on the identified Treg subsets (*cf.* C), ordered by increasing CD25-expression. (E) tSNE representation of the 11 Treg subsets identified, using CITEseq antibody-data, using Phenograph (k=300). (F) Heatmap of expression of indicated markers on the identified Treg subsets (*cf.* E), ordered by increasing CD25-expression. (G) Gene-ontology (KEGG) pathway analysis of the genes differentially expressed between the 11 subsets as identified using CITE-seq analysis. Only top-ten pathways are indicated. (H) Representation of the ten Treg-subsets, as determined by flow-cytometry, among GFP⁺ S1P1⁺ in wt (n=8), IL-2^o (n=5) and IL-15^o (n=4) mice. ns= not significant, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 (Mann-Whitney test). Bars indicate mean values ± SD.

Figure 4

The TCR-repertoires expressed by IL-2 and IL-15-dependent Tregs are distinct

(A) Flow-cytometry analysis of thymocytes from *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* Kaa TCRβ⁻-transgenic (or non-transgenic) mice. Representative I-A^b/MOG(35-55) tetramer-stainings on GFP⁺Thy1.1⁺CD4SP wt

Résultats

thymocytes are shown. (B) Proportions of tetramer positive cells, gated as in A, in wt (n=17), IL-15^o(n=10) and IL-2^o(n=5) mice. (C) Diversity of the TCR α repertoires expressed by GFP⁺Thy1.1⁺CD4SP thymocytes from *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a Tcra^{+/-}* Kaa TCR β -transgenic wt (n=4), IL-2^o(n=4) and IL-15^o(n=4) mice, as determined by TCRseq. (D) Representation of public clonotypes among Treg from wt, IL-2^o, and IL-15^o mice. n.d. not detected. (E) Overlap of the IL-2 and the IL-15-dependent public clonotypes, identified as in D. (F) Distribution of the TCR α CDR3-length of IL-2- or IL-15-dependent, IL-2 and IL-15-dependent, and IL-2 and IL-15-independent public clonotypes, identified by TCRseq. (G) Distribution of the number of N and P nucleotides and proportion of TCR β sequences with P nucleotides, in the indicated groups of TCR α sequences. (H) TRAV-usage in the indicated groups of TCR α sequences. Only TRAV with statistically significant differences between sequences found in IL-2 and IL-15-independent and one or more of the other groups, and represented at $\geq 5\%$ in IL-2 and IL-15-independent Treg are shown. (I) Proportion of acidic amino-acids (AA) at the different CDR3 AA positions of the indicated groups. ns = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Mann-Whitney test). Bars indicate mean values \pm SD.

Figure 1

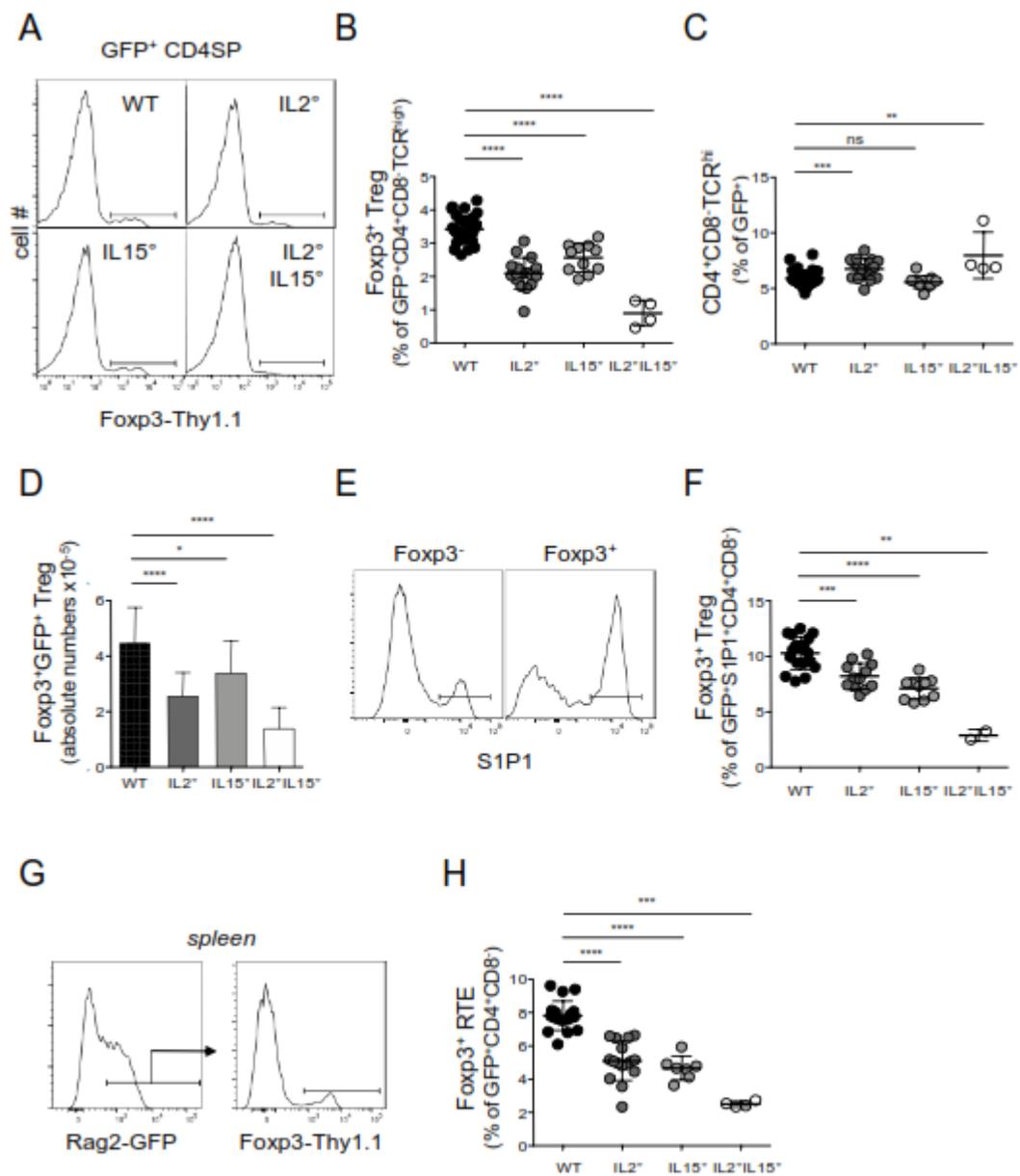


Figure 2

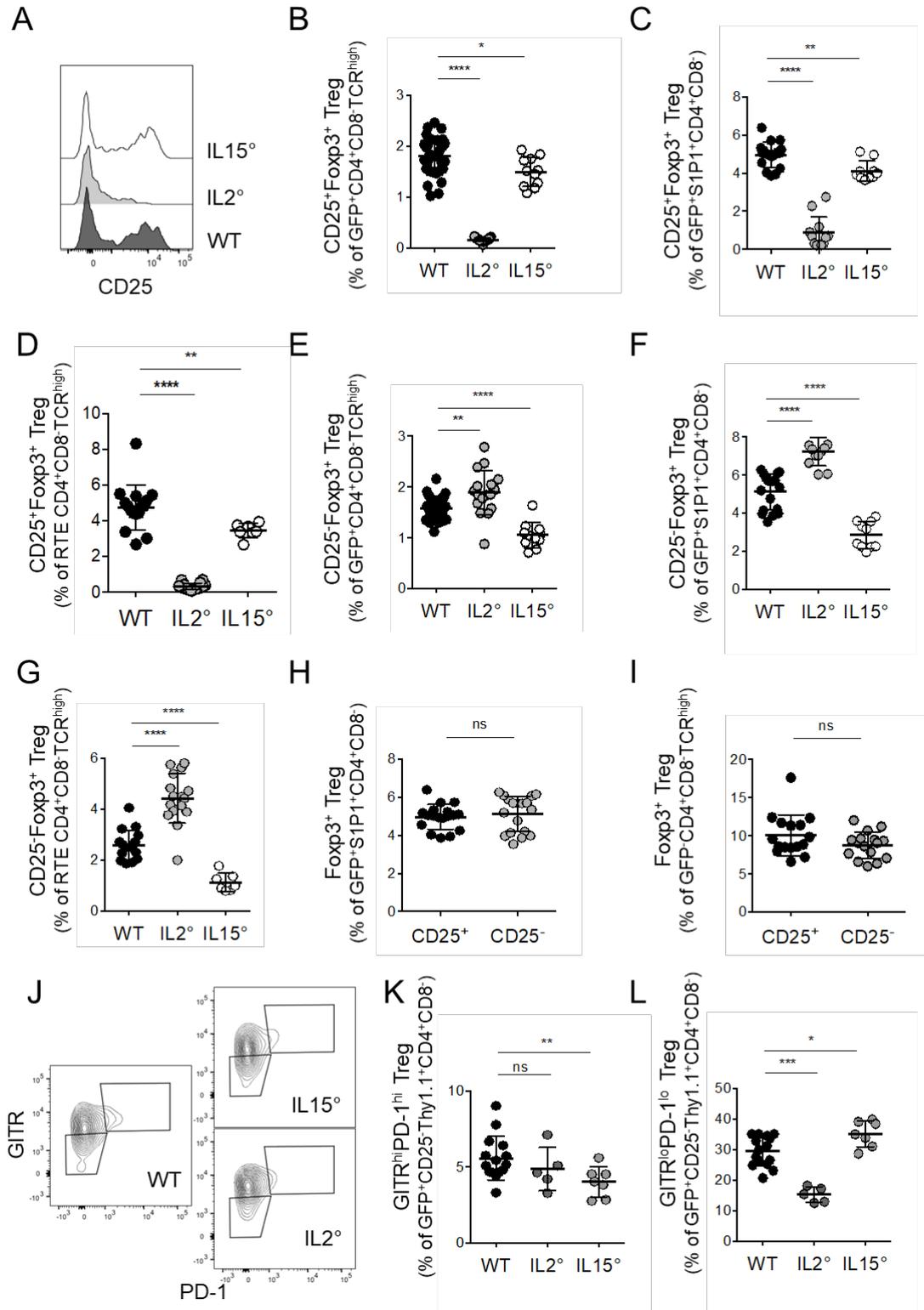


Figure 3

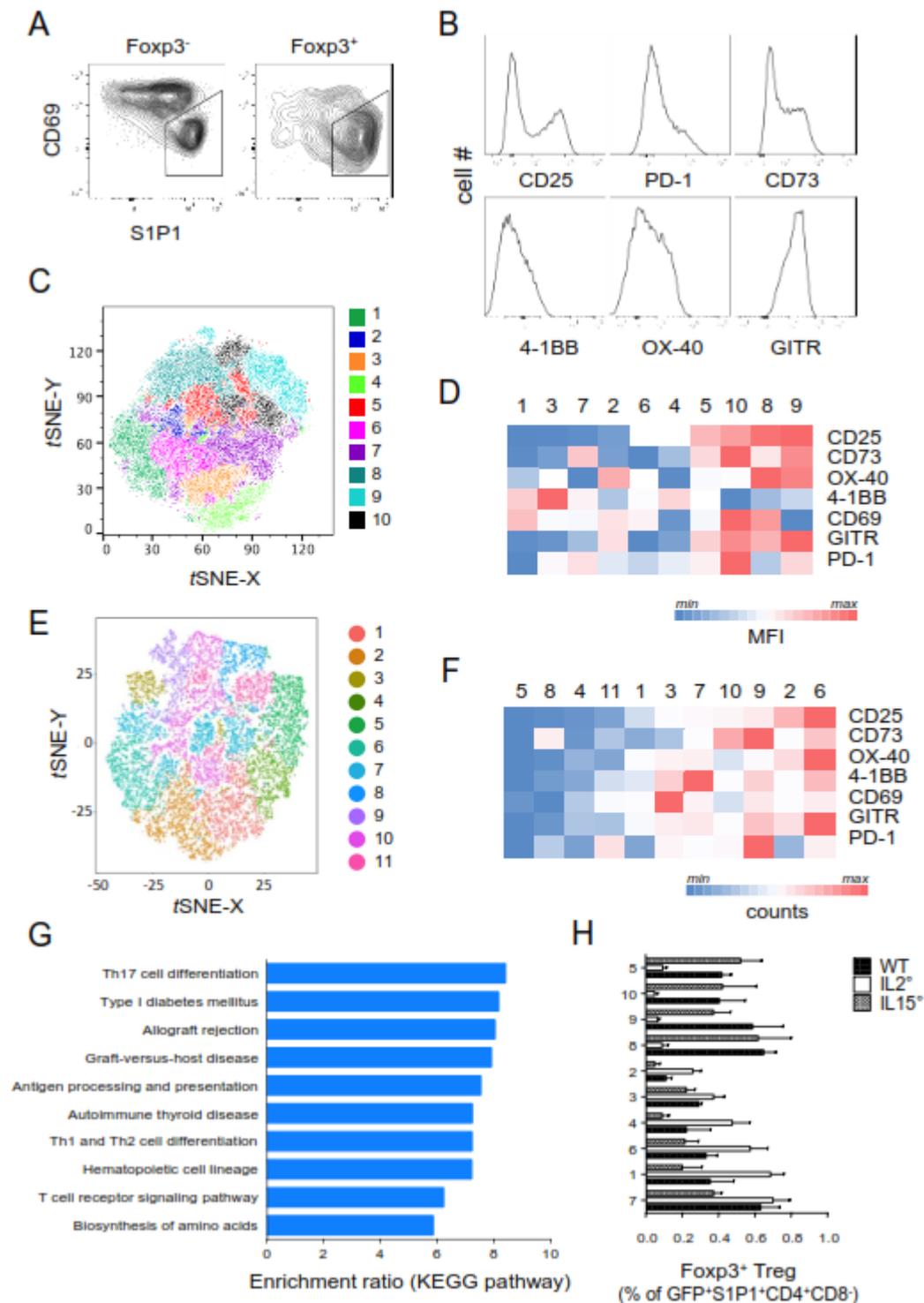
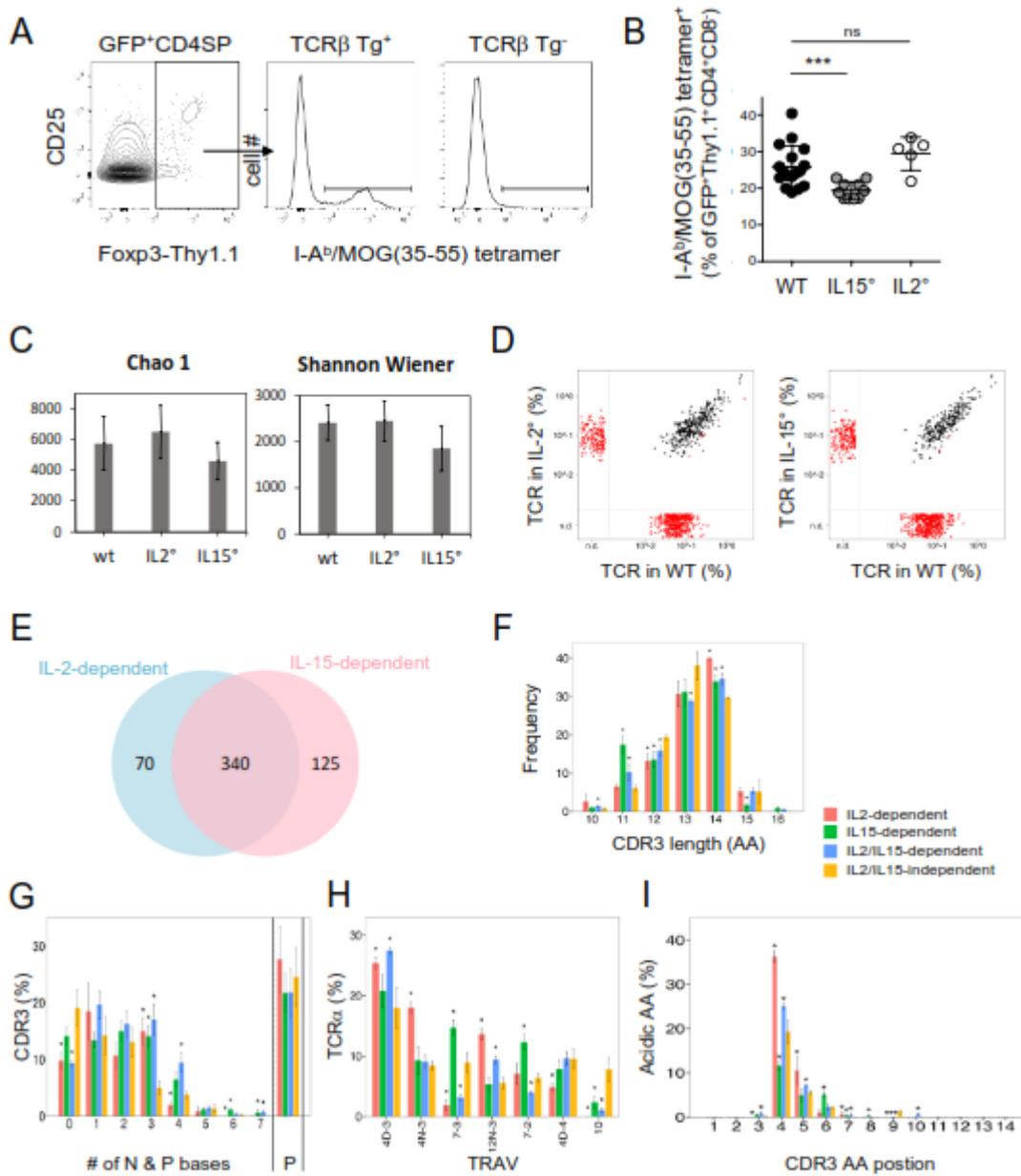


Figure 4



Supplemental Material & Methods

TCRseq analysis of newly developing Tregs

CD4⁺CD8⁻Thy1.1⁺GFP⁺S1P1⁺ thymic Treg (10⁵) were FACS sorted from individual three-week-old wt (n=4), IL-2^o (n=4), or IL-15^o (n=4) *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a Tcr^α+/o* Kaa TCRβ-transgenic B6 mice. RNA was extracted by Nucleospin RNA XS (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions, and was quality controlled (RIN > 8) using Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent technology).

cDNA synthesis and library preparation were performed as previously described (Feng et al., 2015b), and adjusted to our different conditions. In brief, cDNA synthesis was performed in a thermocycler using 1 μM of reverse transcription oligonucleotides mixture corresponding to the TCRα constant region (Table SI: TRAC_RT_1-9), a DNA-RNA hybrid template-switch oligonucleotide with 12 random nucleotides serving as unique molecular identifier (UMI) to tag individual mRNA molecules (Table SI: UNIV5_TSv2), 5 U/μl of SMART Scribe reverse transcriptase (Clontech), 2 U/μl of Recombinant RNase inhibitor (Clontech), 0.5 mM of each dNTP, Ultra low fast first strand buffer, 5mM of DTT, 1M of Betaine, 6 mM of MgCl₂, incubated during 45' at 42°C, 10' at 70°C. After removal of hybrid oligonucleotide with 1U of Uracil-DNA Glycosylase (Biolabs) incubated during 40' at 37°C, the cDNA was purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) according to the manufacturer's instructions. The first PCR reaction was performed with 0.2 μM of the oligonucleotides UNIV5_P12v2 and TRAC3_P1v2 (Table SI), in the PCR-mix-solution (manufacturer's buffer with 1.5 mM of MgSO₄, 0.2 mM of each dNTP, and 0.02 U/μL of Hot Start DNA Polymerase (Millipore)), with the parameters 2' at 95°C; 10 cycles of 20" at 95°C, 15" at 59°C, 45" at 70°C; and a final incubation of 3.5' at 70°C. The amplicons were then purified using Agencourt AMPure XP beads. The second, semi-nested PCR was done using 2' at 95°C followed by 20 cycles of 20" at 95°C, 15" at 59°C, 45" at 70°C; and a final incubation of 3.5' at 70°C with UNIV5_P12v2 and TRAC3_P2v2 (Table SI). In the third PCR a 3' index, P5 and P7 Illumina sequences, and read1, read2, and index sequencing sequences were added. It was performed using UNIV5_P3v2 and TRAC3_P3v2-index (Table SI), as follows: 2' at 95°C, 1 cycle of 20" at 95°C, 15" at 59°C, 45" at 70°C; 5 cycles of 20" at 95°C, 15" at 75°C, 45" at 70°C; and a final

Résultats

incubation of 3.5' at 70°C. For the fourth amplification PCR, primers UNIV5_P4v2 and UNIV3_P4v2 (Table SI) and thermocycler parameters 2' at 95°C, 5 cycles of 20" at 95°C, 15" at 60°C, 45" at 70°C; and a final incubation of 3.5' at 70°C, were used. The quality of each library was checked by using Agilent 2100 BioAnalyzer with a 640pb mean peak size. The samples were indexed and sequenced with 300pb paired end on Illumina MiSeq sequencer (Illumina).

Computational methods for TCRseq analysis

Processing of the thus generated data was performed as follows. Reads containing identical unique molecular identifier (UMI) were grouped using the toolkit pRESTO (Vander Heiden et al., 2014). Using FilterSeq, reads with a quality higher than 20 were selected. Using MaskPrimers and PairSeq algorithms, the sequences corresponding to the *Tcra* constant region (AGCAGGTTCTGGGTTCTGGA) and indicating the UMI location (CTTGGGGG) were searched for and indexed to the head of the paired reads. Using BuildConsensus, a consensus of the reads with the same UMI was constructed. Next, the two reads (forward and reverse) were aligned to assemble the TCR α sequenced (AssemblePairs) and the UMI groups containing at least two reads were selected. The sequenced fragments from each selected UMI were aligned to the *Tcra* genomic region using the toolkit MiXCR (Bolotin et al., 2015), with the tools "align" and "assemble". The aligned fragments were exported as data tables using the tool "exportClones". Using VDJtools (Shugay et al., 2015) these data tables were then processed to calculate the diversity of the TCR α repertoires (CalcDiversityStats), the distribution of the number of nucleotides forming the CDR3 (PlotSpectratypeV), and the correlation and frequency of used V and J segments (PlotFancyVJUsage). Finally, calculations and graphics were performed using R software (R Core Team: <https://www.r-project.org/>). Shown clonotypes were selected according to their differences in the nucleotide sequences at the CDR3 region between the different conditions (wt, IL2° and IL15°). For each condition, the clonotypes present in the four replicates were considered as public clonotypes. We defined the following groups according to the wt samples: IL2-dependent clonotypes were the ones absent in an IL2° when compared to the wt and not comprised in the IL15-dependent ones; in the same way, IL15-dependent clonotypes were the ones absent in an IL15° when compared to the wt and not comprised in the IL2-dependent ones; IL2/IL15-dependent clonotypes were the ones absent both in IL2° and IL15° mice when compared to a wt; IL2/IL15-independent clonotypes were

Résultats

not affected by the absence of IL2 nor IL15 and therefore present in both as well as in wt. For the Dotplots (Fig.4D) the percentage of the clonotypes was calculated doing the sum of number of UMIs per clonotype over the number of total clonotypes for each condition; the statistical analysis was performed with a LIMMA analysis indicating the clonotypes with a pValue < 0.05. The CDR3 length (Fig.4F) shows the frequency of clonotypes with the corresponding number of amino-acids and was calculated adding the number of clonotypes of determined size over the total of clonotypes for each subset. For the usage of V segments (Fig.4H,S7), the percentage was calculated adding the number of clonotypes with corresponding V segment over the total of clonotypes for each subset. The association of V and J segments (Fig.S9), shown the frequency calculated like in the usage of V segments for the V and J segments. All custom scripts that have been made, are available at:

https://github.com/arielgalindoalbarran/IL2_IL15_Tregdependents.

Data generated during the current study are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) under accessions GSE#####

Computational methods for CITE-seq analysis

10x data were processed using Cell Ranger (10X Genomics version 3.0.2) using default parameters except (-expect-cells=8000 --r1-length=26). Reads were aligned to the mouse reference sequence mm10. Then the 3 runs were aggregated. Filtered gene-barcodes matrices containing only barcodes with UMI counts passing threshold for cell detection were used for further analysis. On average, we obtained between 27,077 reads per cell (median: 1,432) for a total of 24,813 cells.

Once the gene-cell data matrix was generated, poor quality cells were excluded using Scater R package (version1.12.2). Cells with library size detected as lower outliers (nmads = 2), cells with expressed gene-numbers detected as lower outliers (nmads = 2) and cells with mitochondrial expression detected as upper outliers (nmads=2) were removed from the analysis. Genes without variability were filtered. Cells having expression mean <0.005 were filtered out. Genes expressed in less than ten cells were filtered out. We ended up with 10,427 transcripts and 20,968 cells (McCarthy et al., 2017).

Résultats

Treg clusters were determined based on the antibody-signals and using the Louvain clustering-based RPhenograph algorithm with the hyper-parameter $k=300$ (Levine et al., 2015).

We used the Seurat R package (version 3.0.1) for normalization and scaling the transcriptome-data. Then PCA was performed using the variable genes as input. The 50 first PCs were selected as input for *t*-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (*t*SNE). Cluster-specific marker-genes were identified in two stages. The first set of differentially expressed genes (DEGs) was identified by comparing the genes expressed in one cluster to all other clusters. Next, cells in a specific cluster were compared to cells in every other cluster in a pairwise manner to identify a second set of DEGs (Stuart et al., 2019).

This first set of gene was submitted to WEB-based Gene Set Analysis Toolkit 2019 for pathway analyses using KEGG database (Kanehisa, 2000; Liao et al., 2019).

Bibliography

Bolotin, D.A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I.Z., Putintseva, E. V., and Chudakov, D.M. (2015). MiXCR: Software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* *12*, 380–381.

Feng, Y., van der Veecken, J., Shugay, M., Putintseva, E. V., Osmanbeyoglu, H.U., Dikiy, S., Hoyos, B.E., Moltedo, B., Hemmers, S., Treuting, P., et al. (2015). A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature*.

Vander Heiden, J.A., Yaari, G., Uduman, M., Stern, J.N.H., O'connor, K.C., Hafler, D.A., Vigneault, F., and Kleinstein, S.H. (2014). PRESTO: A toolkit for processing high-throughput sequencing raw reads of lymphocyte receptor repertoires. *Bioinformatics* *30*.

Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* *28*, 27–30.

Levine, J.H., Simonds, E.F., Bendall, S.C., Davis, K.L., Amir, E.A.D., Tadmor, M.D., Litvin, O., Fienberg, H.G., Jager, A., Zunder, E.R., et al. (2015). Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell* *162*, 184–197.

Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E.J., Shi, Z., and Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* *47*, W199–W205.

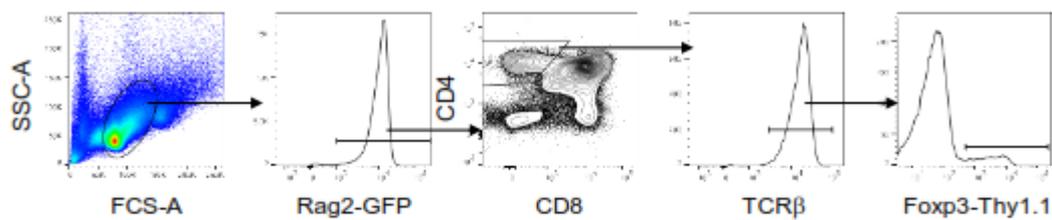
McCarthy, D.J., Campbell, K.R., Lun, A.T.L., and Wills, Q.F. (2017). Scater: Pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics* *33*, 1179–1186.

Shugay, M., Bagaev, D. V., Turchaninova, M.A., Bolotin, D.A., Britanova, O. V., Putintseva, E. V., Pogorelyy, M. V., Nazarov, V.I., Zvyagin, I. V., Kirgizova, V.I., et al. (2015). VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Comput. Biol.* *11*, 1–16.

Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* *177*, 1888-1902.e21.

Supplementary figures

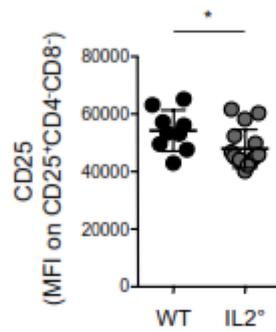
Fig. S1



Gating strategy used to calculate the proportions of Tregs among newly developing CD4⁺CD8⁻TCR^{high}

Thymocytes from three week-old *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* mice were stained with fluorescent antibodies against the indicated markers and analyzed by flow cytometry. Live cells were electronically gated on FCS/SSC, doublets eliminated (not shown) and then developing cells were gated as GFP⁺. Among these, CD4SP (CD4⁺CD8⁻) cells were gated and among those TCRβ high cells. Finally Thy1.1 expression was analyzed to determine the proportions of Foxp3⁺ Treg cells.

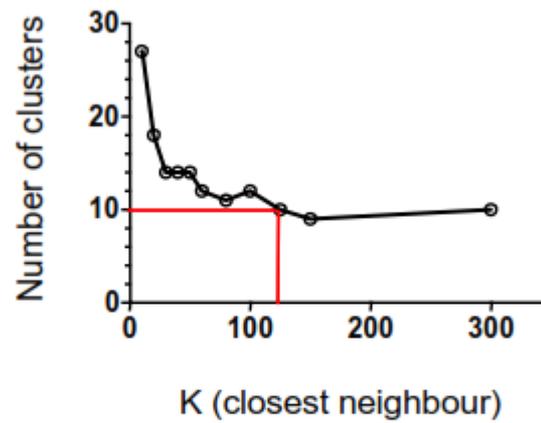
Fig. S2



Expression-levels of CD25 on DN thymocytes

Thymocytes from 3 week old *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* mice were stained with fluorescent antibodies against the indicated markers and analyzed by flow cytometry. MFI measured on double negative (CD4-CD8-) CD25⁺ thymocytes for WT and IL2^{-/-} mice. * $P < 0.05$, (*Mann-whitney test*). Bars indicate mean values \pm SD.

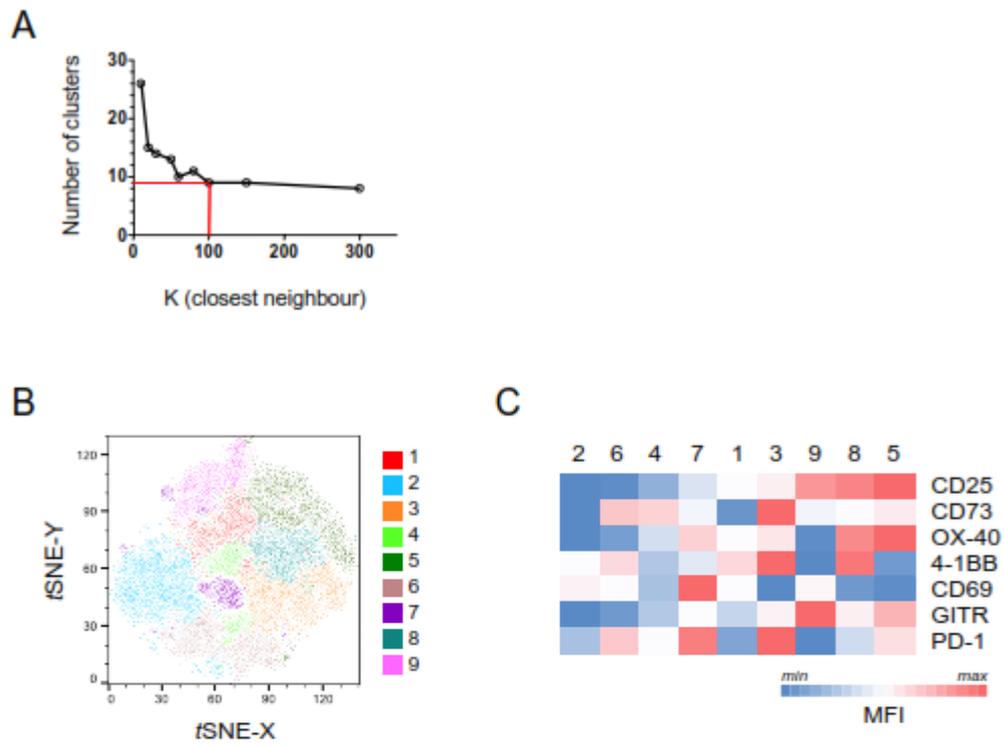
Fig. S3



Determination of the closest neighbour value for Phenograph analysis of cytometry-data

Phenograph-analysis was performed using indicated K values (number of closest neighbours) and the number of identified clusters monitored. The K value at which plateau is reached was used for analysis shown in Fig. 3C, D, H.

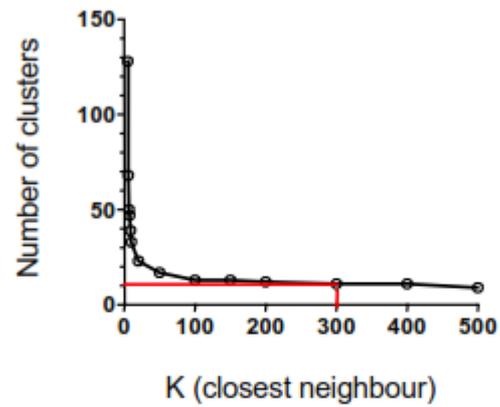
Fig. S4



Phenograph analysis of recent thymic emigrant Treg

Splenocytes from 3-week-old wt *Rag-GFP Foxp3-Thy1a* mice (n=5) were analysed by multicolour flow cytometry. CD4⁺CD8⁻GFP⁺Thy1.1⁺ RTE Treg from 5 concatenated samples were electronically gated and their expression levels of the indicated markers analysed by Phenograph to identify Treg-subsets. (A) Number of clusters obtained using Phenograph as a function of the K value (closest neighbour). Red lines indicate the K value used for the subsequent analysis. (B) tSNE representation of the nine Treg subsets identified by Phenograph. (C) Heatmap representing the relative expression levels of indicated surface markers for the nine identified Treg subsets.

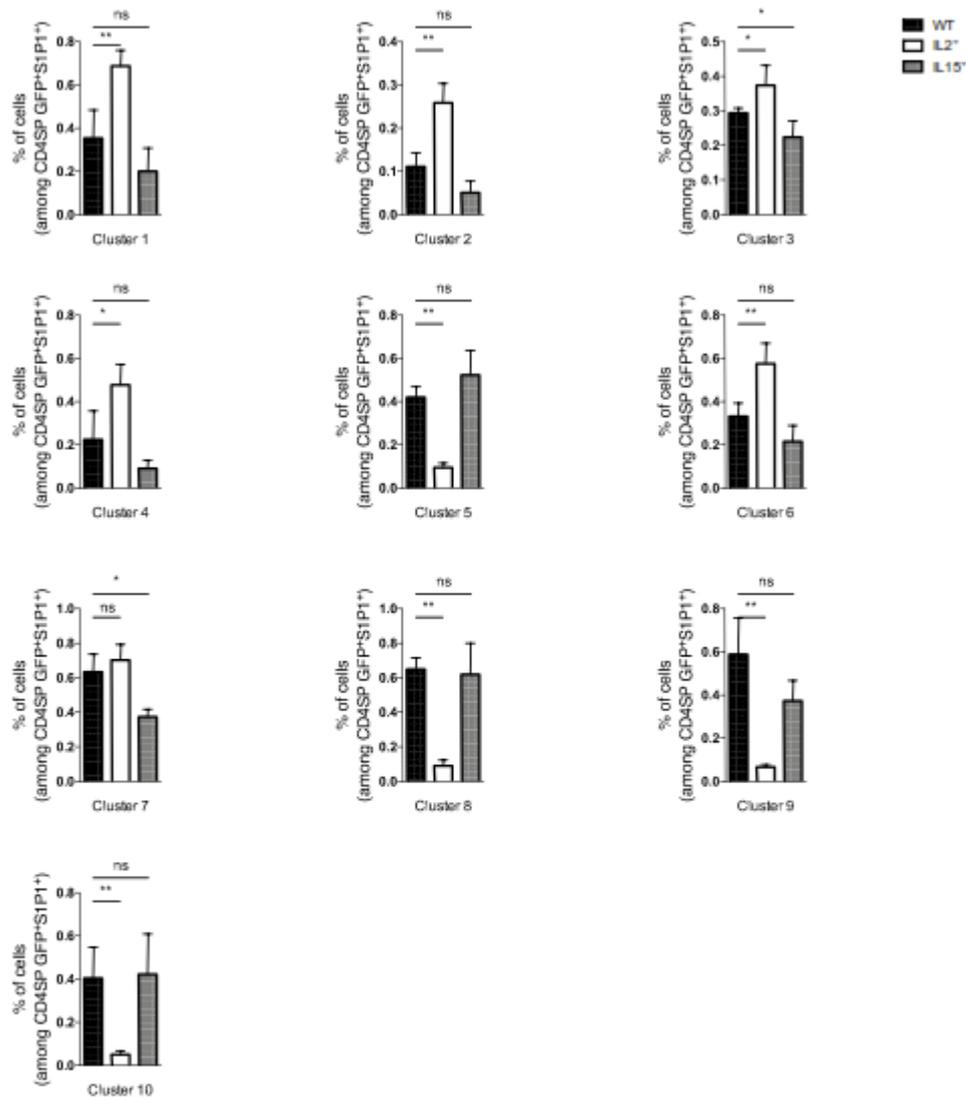
Fig. S5



Determination of the closest neighbour value for Phenograph analysis of CITEseq

Phenograph-analysis was performed using indicated K values (number of closest neighbours) and the number of identified clusters monitored. The K value at which plateau is reached was used for analysis shown in Fig. 3E, F, G.

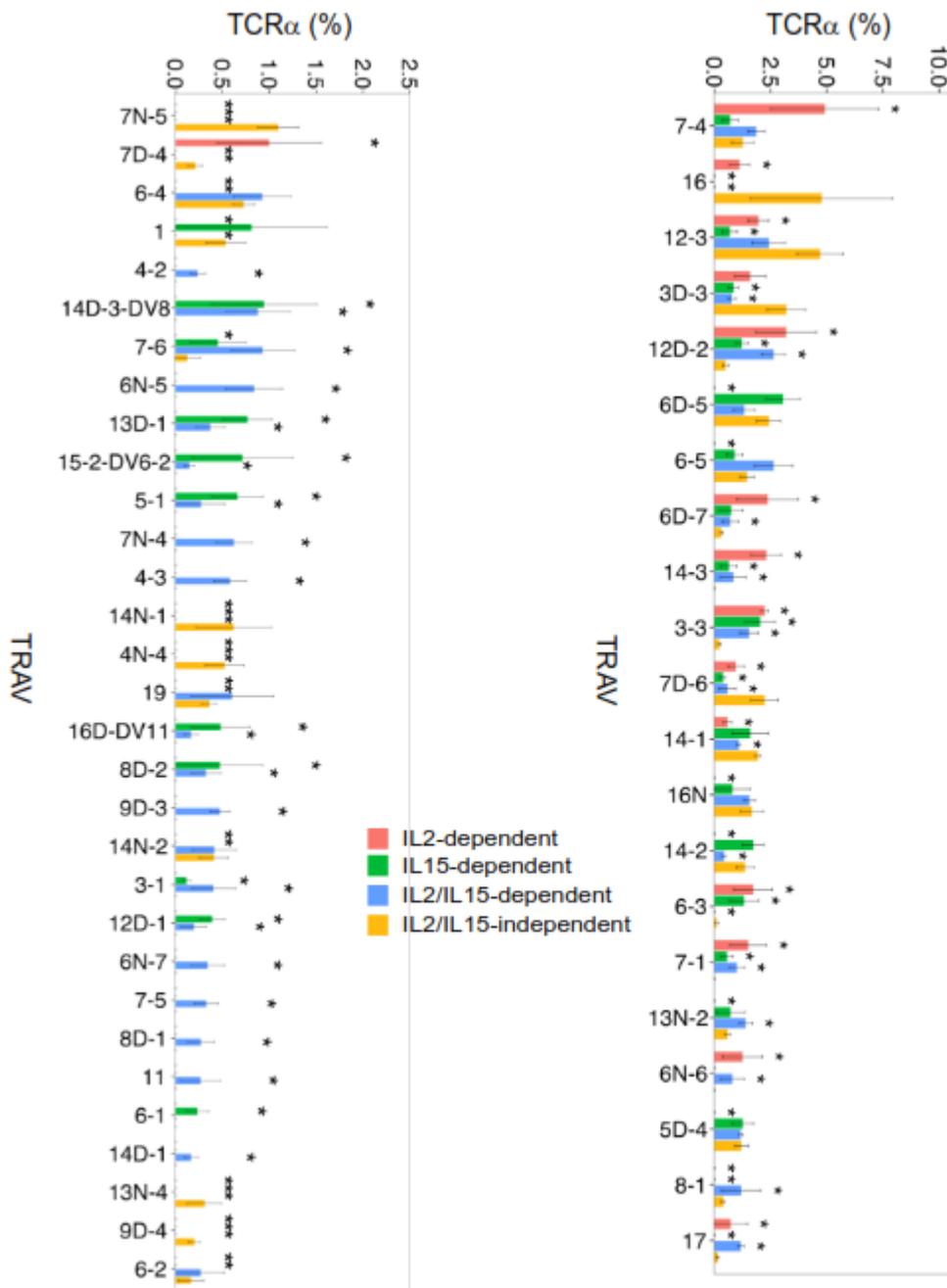
Fig. S6



Development of distinct Treg clusters in wt, IL2^{-/-} and IL-15^{-/-} mice, statistical analysis

The same data as in Fig. 3H are shown with indication of the statistical significance between the values. ns, not significant; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Mann-Whitney test). Bars indicate mean values ± SD

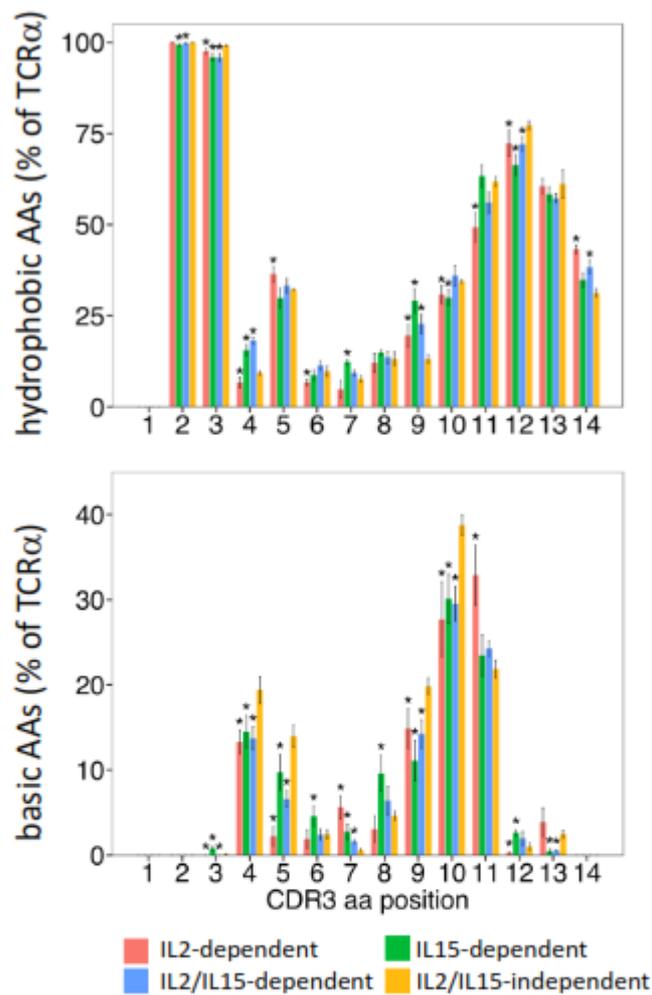
Fig. S7



Representation of the distinct TRAVs in the public repertoire developing in an IL-2 and/or IL-15-dependent manner

As in Fig. 4H, but all TRAV are shown. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Mann-Whitney test). Bars indicate mean values ± SD

Fig. S8



Chemical characteristics of TCRα CDR3 amino-acids

Public TCRα clonotypes developing in *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a Tcrα^{+/o} Kaa* TCRβ-transgenic mice (n=4) in an IL2- or IL15 or IL2 and IL15 dependent manner or independently of these two cytokines, were analysed for the chemical characteristics of the CDR3 amino-acids. The representation of hydrophobic and basic amino-acids in CDR3 positions 1 through 14 are shown as percentage of TCRα sequences analysed. *P < 0.05 (Mann-Whitney test). Bars indicate mean values ± SD. For acid amino-acids, see Fig. 4I.

Table SI Oligonucleotides used for TCRseq analysis

UNIV5_TSv2	5'-TACACGACGCTCTCCGATCUNNNNNUNNNNUNNNNUCTTTrGrGrGrG-3' (U = dU)
TRAC_RT1	5'-CTCAGCGTCATGAGCAGGTTAAAT-3'
TRAC_RT2	5'-CAGGAGGATTCGGAGTCCCATAA-3'
TRAC_RT3	5'-TTTACAAACATTCCTCAAAGA-3'
TRAC_RT4	5'-TTCTGAATCACCTTTAATGA-3'
TRAC_RT5	5'-ATGAGATAATTTCTACACCT-3'
TRAC_RT6	5'-TTTGGCTTGAAGAAGGAGCG-3'
TRAC_RT7	5'-TTCAAAAGCTTTTCTCAGTCA-3'
TRAC_RT9	5'-TGGTCTCTTTGAAGATATCT-3'
UNIV5_P12v2	5'-TACACGACGCTCTTCCGATC-3'
UNIV5_P3v2	5'-AATGATACGGCGACCCAGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC-3'
UNIV5_P4v2	5'-AATGATACGGCGACCCAGAG-3'
UNIV3_P4v2	5'-CAAGCAGAAAGACGGCATACGA-3'
TRAC3_P1v2	5'-AAGTCGGTGAACAGGCAGAG-3'
TRAC3_P2v2	5'-AGCAGGTTCTGGGTTCTGGA-3'
TRAC3_P3v2index1	5'CAAGCAGAAAGACGGCATACGAGATTTCCGGAGAGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTAGC TTCCGATCTAGCAGGTTCTGGGTTCTGGA-3'
TRAC3_P3v2index2	5'CAAGCAGAAAGACGGCATACGAGATTTCCGGAGAGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTCTTCCGATCTAGC AGGTTCTGGGTTCTGGA-3'
TRAC3_P3v2index3	5'CAAGCAGAAAGACGGCATACGAGATCGCTCATTTGTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTC TTCCGATCTAGCAGGTTCTGGGTTCTGGA-3'
TRAC3_P3v2index4	5'CAAGCAGAAAGACGGCATACGAGATTCGCTGACTGGAGTTCAGACCGTGTGCTC TTCCGATCTAGCAGGTTCTGGGTTCTGGA-3'

Table S2 Antibodies used for flow-cytometry and CITEseq analysis

Specificity	Label	Clone	Provider
CD4	Allophycocyanin-H7 (APC-H7)	GK1.5	BD Science
CD8	Brilliant Violet-510 (BV-510)	H35-17.2	BD Optibuild
Thy1.1	BV-421	OX-7	BD Science
CD25	allophycocyanin (APC)	PC61	BD Science
PD-1	PerCP-ef710	J43	eBioscience
Streptavidin (SAV)	R-phycoerythrin (PE)	N/A	BD pharmingen
CD69	PE CF596	H1.2F3	BD Horizon
GITR	PE-cyanine-7 (PE-Cy7)	DTA-1	eBioscience
4-1BB	BV-785	1AH2	BD Optibuild
OX-40	BV-711	OX-86	Biolegend
CD73	BV-605	T1/11.8	Biolegend
Thy1.1	APC	OX-7	BD bioscience
CD4	Pacific blue (PB)	RM4-5	BD Bioscience
CD25	PE	PC61	BD Pharmingen
TCR β	PE	H57-597	eBioscience
CD4	PB	RM4-5	BD Sscience
CD45.1	PE-Cy7	A20	eBioscience
CD4	PE	GK1.5	Bioscience
CD8	PE-CF594	50-6.7	BD Bioscience

Résultats

Reference	antibody	oligonucleotide
TotalSeqTM-A 0004	anti-mouse CD279 (PD-1)	GAAAGTCAAAGCACT
TotalSeqTM-A 0077	anti-mouse CD73	ACACTTAACGTCTGG
TotalSeqTM-A 0097	anti-mouse CD25	ACCATGAGACACAGT
TotalSeqTM-A 0193	anti-mouse CD357 (GITR)	GGCACTCTGTAACAT
TotalSeqTM-A 0194	anti-mouse CD137	TCCCTGTATAGATGA
TotalSeqTM-A 0195	anti-mouse CD134 (OX-40)	CTCACCTACCTATGG
TotalSeqTM-A 0197	anti-mouse CD69	TTGTATTCCGCCATT

Résultats annexes

CD25 expression distinguishes two mature functional thymic Treg populations

Regulatory T cells (Treg) expressing the transcription factor Forkhead box P3 (Foxp3) are a subset of CD4 T cells that play a crucial role in controlling immune responses and thus prevent development of most notably autoimmune diseases and chronic inflammation. While some Tregs arise in the periphery from conventional T cells, most Treg develop in the thymus and are therefore called thymic Treg (tTreg). Concomitant to negative selection, some autospecific CD4⁺CD8⁻ (CD4SP) thymocytes can engage into the Treg development. CD4SP CD25⁺Foxp3⁻ thymocytes were the first to be considered as Treg precursors, as described in the “two-step model” for thymic Treg development (Lio and Hsieh, 2008). CD4SP thymocytes would, upon TCR stimulation, first upregulate CD25 and then acquire Foxp3 expression through cytokine-receptor signaling. Nevertheless recent data suggest that both TCR and cytokine signaling are involved in Foxp3 expression (Apert et al., 2018; Burchill et al., 2008b; Soper et al., 2007; Wirnsberger et al., 2011). In this sense, recent indications in the literature suggest that some Tregs may develop via a CD25⁻Foxp3⁺ pathway (Marshall et al., 2014; Owen et al., 2019). These cells can upregulate CD25 upon exposure to IL-2, and in one study were described as precursors to CD25⁺Foxp3⁺ cells (Owen et al., 2019). Whether they can maintain their CD25⁻ phenotype into maturity has not been resolved.

A significant proportion of thymic Foxp3⁺ cells represent Tregs that recirculated from the periphery back to the thymus (Thiault et al., 2015). Since these cells are mostly CD25⁺ (data not shown), the representation of CD25⁻ cells among developing Treg may have been underestimated.

We distinguished newly developing from recirculating Treg using mutant mice expressing GFP under control of the *Rag2* promoter. We studied the kinetics of appearance of CD25⁺ and CD25⁻ Treg in thymi from neonate mice (Fig. 1). Our results show a concomitant development of these two populations.

We also analyzed the presence of CD25⁺ and CD25⁻ Tregs among newly developing CD4SP thymocytes and among the most mature CD4SP cells in the thymus of three-week-old mice, i.e. those expressing S1P1. In both cases we found similar proportions of CD25⁻ and CD25⁺ Treg (Fig. 2A, B).

If really totally mature, CD25⁻ Treg should as well be found among recent thymic emigrants (RTE) and among fully mature peripheral Treg that had completely lost GFP expression. Among these two populations we again found substantial proportions of CD25⁻ Treg (Fig. 2C, D).

Combined, these results indicate that, just as CD25⁺ Treg, the CD25⁻ Treg population comprises fully mature cells.

We therefore postulated that CD25⁻ Treg can regulate immune responses. To test this hypothesis, we compared the ability of CD25⁺ and CD25⁻ Treg cells to prevent autoimmune disease. *Scurfy* (Foxp3⁰) mice very rapidly develop a lethal autoimmune pathology (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001b; Wildin et al., 2001). Injection of Foxp3-expressing Treg prevents the disease (Fontenot et al., 2003). We therefore injected, into newborn *scurfy* mice, newly developing CD25⁻ or CD25⁺ Treg isolated from the thymus of *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* mice and monitored development of pathology over a three week-period, after which the mice were euthanised. Even if the results need to be considered preliminary at this point, CD25⁺ as well as CD25⁻ Treg appeared to prevent the stop in the weight-increase observed in the PBS-injected animals (Fig. 3A). Both populations also prevented the shaggy appearance, the desquamation observed most notably on the tail, and the spleno- and lymphadenomegaly (Fig. 3B, C, D). Upon euthanasia of the mice, we found as many CD25⁺ as CD25⁻ Treg in the spleens, and cells of both populations had also migrated to the thymus (Fig. 3E). In PBS-injected control mice we observed that most of the CD4⁺ or CD8⁺ conventional T cells had an activated CD62L⁻CD44^{high} phenotype. Many Tconv in the control mice produced IFN- γ or IL-4. Both CD25⁺ and CD25⁻ Treg had prevented activation of and cytokine production by Tconv (Fig. 3F, G). We next looked for antibodies to self-antigens. In sera from PBS-injected *Scurfy* mice we found antibodies against pancreas, salivary glands, stomach, lungs, liver, and heart. By contrast, we found much lower levels of these autoantibodies in sera from *Scurfy* mice injected with CD25⁺ or CD25⁻ Treg (Fig. 3H).

Combined, the results described here demonstrate that the newly developing CD25⁻ Treg migrate to and persist in the periphery and can control autoimmune-responses *in vivo*. They thus show that the CD25⁻Foxp3⁺ population in the thymus is, at least in part, a fully mature Treg population.

References

1. Lio, C. W. J. & Hsieh, C. S. A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* **28**, 100–111 (2008).
2. Burchill, M. A. *et al.* Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* **28**, 112–121 (2008).
3. Wirnsberger, G., Hinterberger, M. & Klein, L. Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes. *Immunol Cell Biol* **89**, 45–53 (2011).
4. Soper, D. M., Kasprovicz, D. J. & Ziegler, S. F. IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol* **37**, 1817–1826 (2007).
5. Apert, C., Romagnoli, P. & van Meerwijk, J. P. M. J. P. M. IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein Cell* **9**, 322–332 (2018).
6. Owen, D. L. *et al.* Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nat. Immunol.* **20**, 195–205 (2019).
7. Marshall, D., Sinclair, C., Tung, S. & Seddon, B. Differential requirement for IL-2 and IL-15 during bifurcated development of thymic regulatory T cells. *J Immunol* **193**, 5525–5533 (2014).
8. Thiault, N. *et al.* Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.* **16**, 628–634 (2015).
9. Brunkow, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68–73 (2001).
10. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20–21 (2001).
11. Wildin, R. S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **27**, 18–20 (2001).
12. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330–336 (2003).

Legends to the figures

Figure 1

CD25⁺ and CD25⁻ Treg both develop in the thymus of neonatal mice

Thymocytes from 1 to 7 day-old *Rag-Gfp Foxp3-Thy1a* mice were stained with fluorescent antibodies against the indicated markers and analysed by flow cytometry. (A) Representative histograms of CD25 vs. Foxp3-Thy1.1 expression on newly developing CD4SP (GFP⁺CD4⁺CD8⁻TCR^{high}) thymocytes. Indicated gates were used for the quantification in Fig. 1B. (B) Quantification of developing CD25⁺ and CD25⁻ Tregs in 1 day-old (n=2), 2-4 day-old (n=7 for each day) and 7 day-old mice (n=8). Mean values \pm SD.

Figure 2

CD25⁺ and CD25⁻ Tregs are present in every stage of Treg development and maturation

Thymocytes (n=18) or splenocytes (n=30) from 3-week-old *Rag-Gfp Foxp3-Thy1a* mice were stained with fluorescent antibodies against indicated markers and analysed by flow cytometry. (A) CD25⁻ vs. Foxp3-Thy1.1-expression on electronically gated newly developing GFP⁺ CD4SP thymocytes (left) and on GFP⁺ S1P1⁺ CD4SP mature developing cells (right). (B) Quantification of the proportion of CD25⁺ and CD25⁻ Treg among GFP⁺ CD4SP thymocytes (left) and S1P1⁺ GFP⁺ CD4SP cells (right). (C) CD25⁻ vs. Foxp3-Thy1.1 expression on electronically gated GFP⁺CD4⁺ RTE (left) and CD4⁺GFP⁻ cells (right) of the spleen. (D) Quantification of the proportion of CD25⁺ and CD25⁻ Treg among GFP⁺CD4⁺ RTE (left) or among CD4⁺GFP⁻ cells (right) in the spleen. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 (Mann-Whitney test). Bars indicate mean values \pm SD.

Figure 3

CD25⁺ and CD25⁻ Tregs rescue lethal auto-immune disease in Scurfy mice

CD25⁺ and CD25⁻ GFP⁺CD4SP Foxp3-Thy1.1⁺ Tregs were sorted from thymi of 3-week-old *Rag-Gfp Foxp3-Thy1a* mice and injected i.v. into newborn (d0) *Scurfy* mice (CD25⁺Treg (n=4), CD25⁻Treg (n=3), total Treg (n=4), PBS (n=13)). (A) Evolution of the weight of the mice, represented as percentage of initial weight for each individual mouse. Whereas positive controls were injected with total thymic Tregs, negative controls received PBS. Representative pictures of mice at day of sacrifice (21) to appreciate body size and general aspect (B), desquamation of the tail (C), and size of spleen and lymphnodes (D). (E) Quantification of the cellularity in the spleen (left) and the lymphnodes (right) of injected mice. (F) Quantification of Foxp3⁺Treg in the spleen (left) and thymus (middle) of injected mice, and of the proportions of CD25⁺ cells among splenic Treg (right). (G) Quantification of activated CD62L⁻CD44⁺ cells among CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) Foxp3⁻ Tconv in the spleen of injected mice. (H) Quantification of IFN- γ (left), IL-13 (middle) and IL-17 (right) producing cells among CD4⁺Foxp3⁻ Tconv in injected mice. (I) Representative tissue blot analysis of sera collected from the injected mice. The tissues from which protein extracts were prepared were from Rag2-deficient mice.

Figures résultats annexes

Fig. 1

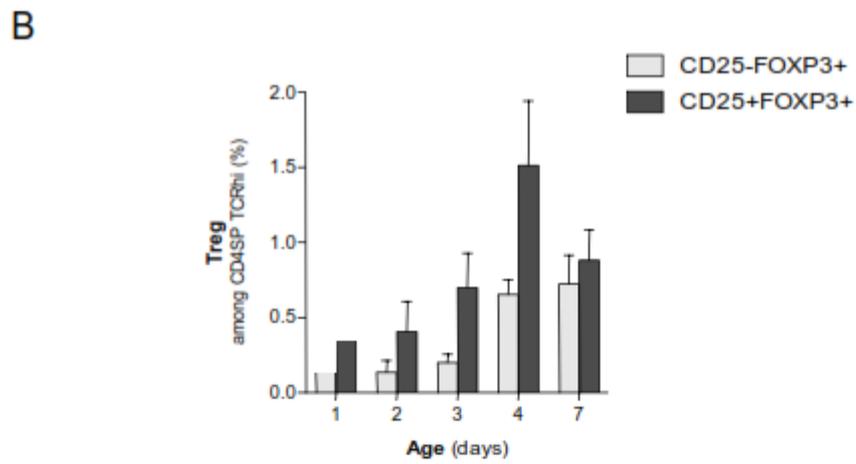
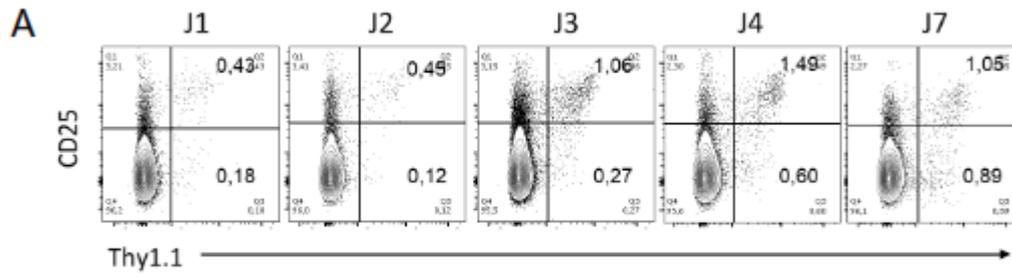


Fig. 2

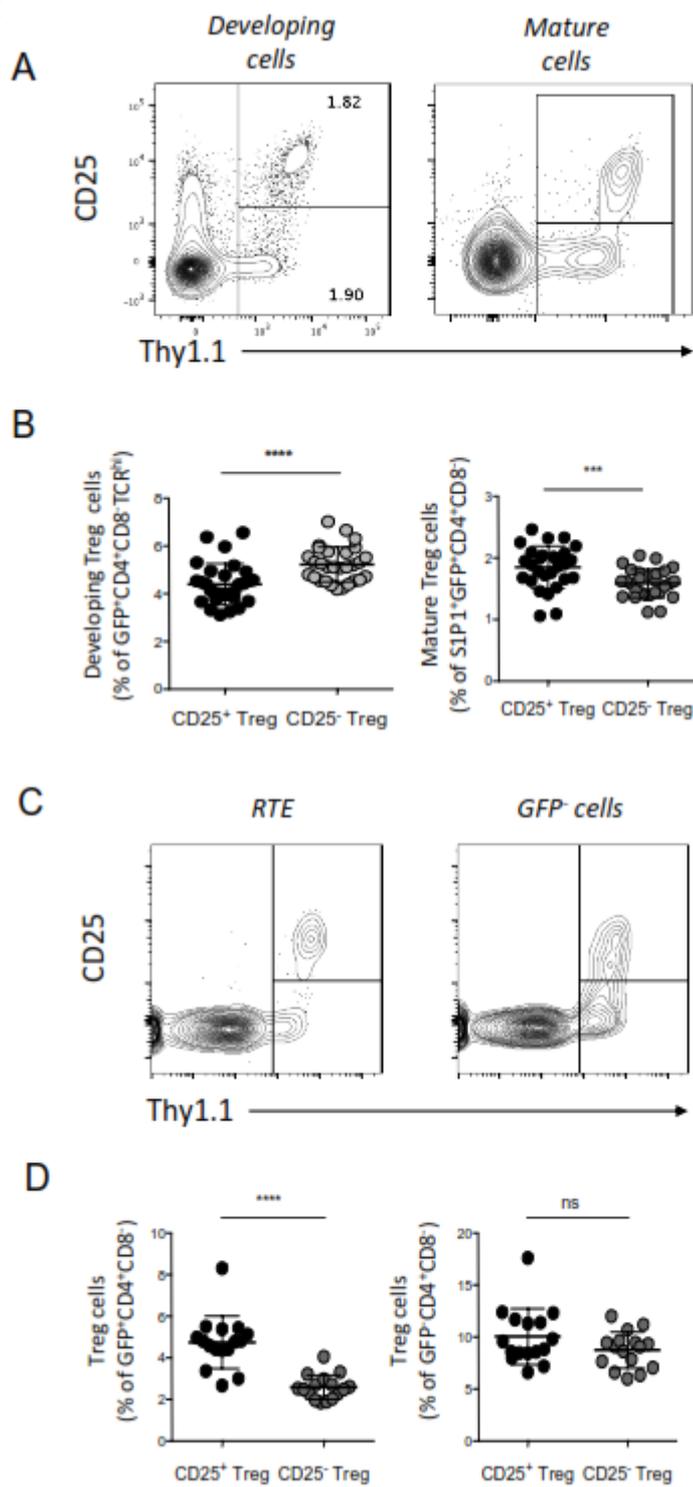


Fig. 3

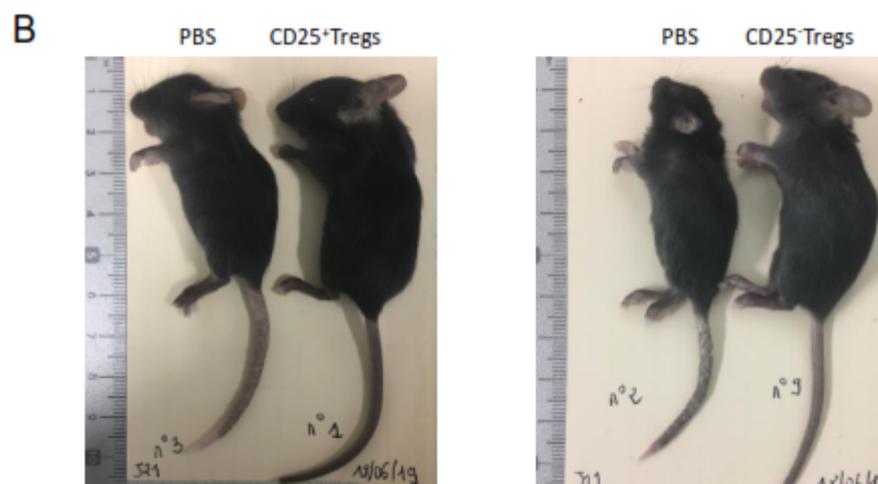
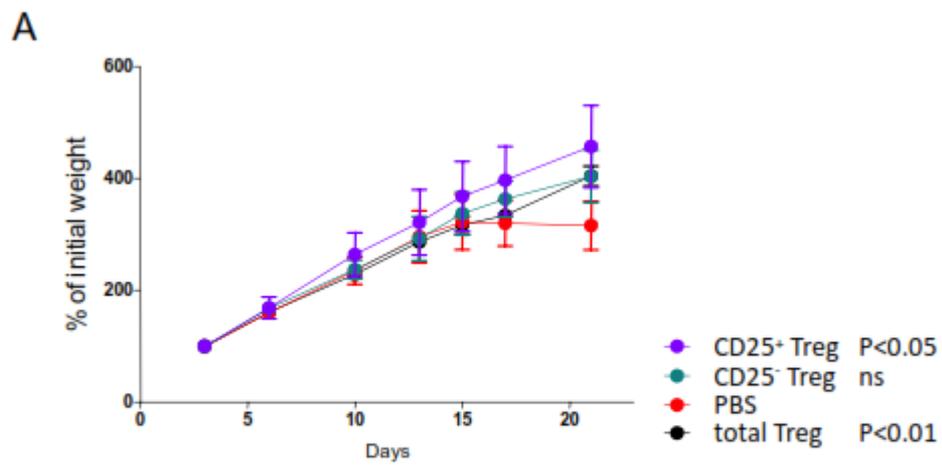
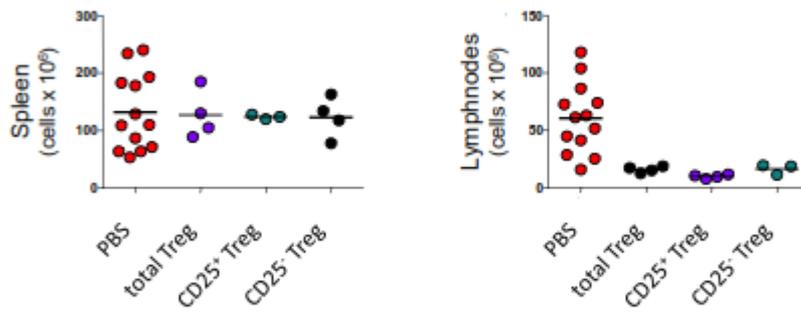
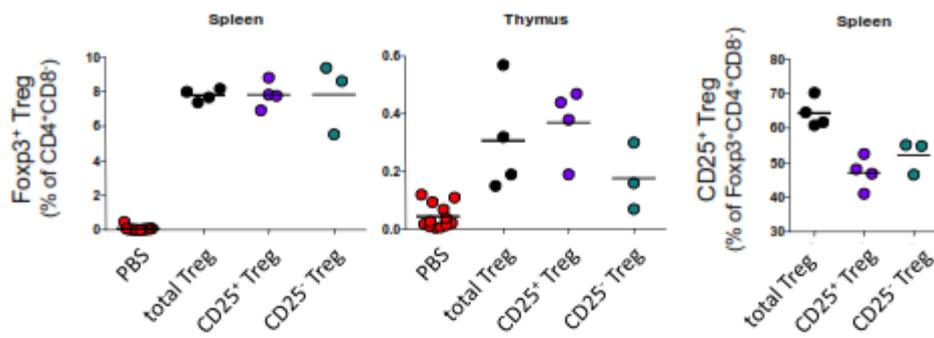


Fig. 3

E



F



G

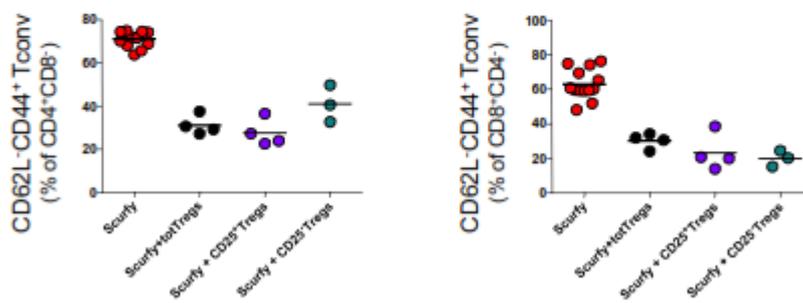
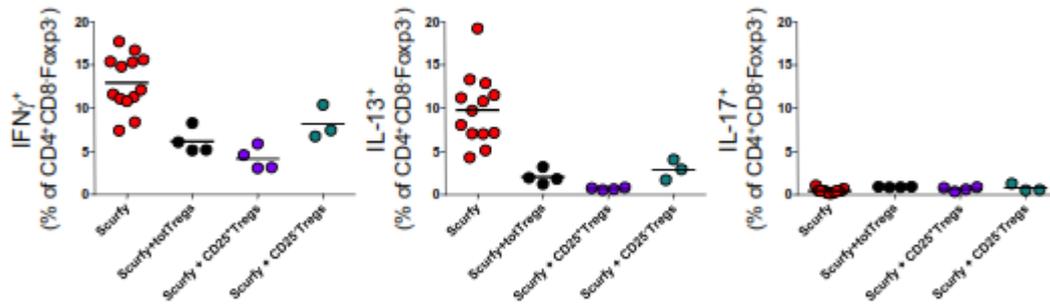
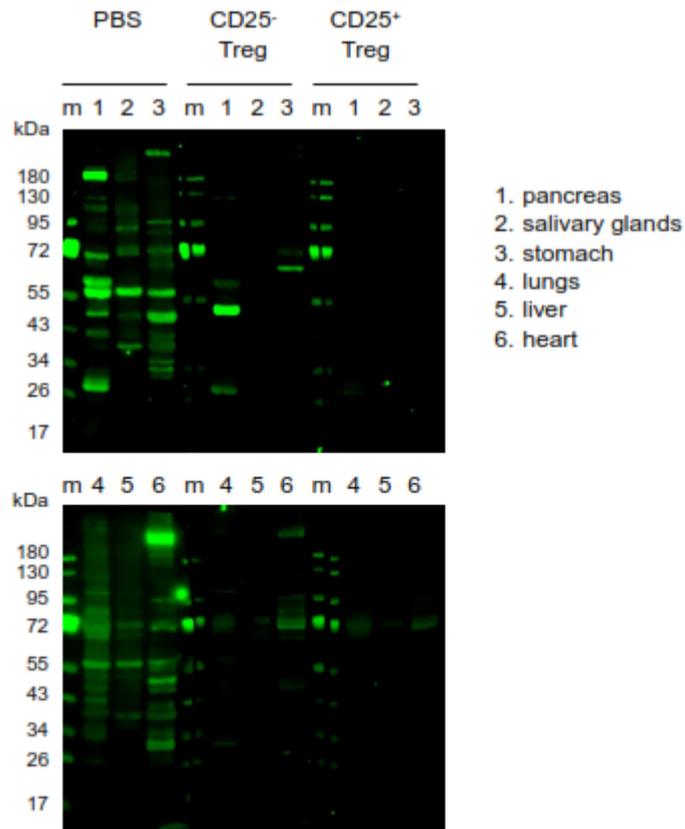


Fig. 3

H



I



DISCUSSION

Discussion

Les cellules T régulatrices Foxp3⁺ (Treg) constituent une sous-population spécifique de lymphocytes T CD4⁺. Leur rôle n'est pas de déclencher une immunité adaptative, mais au contraire d'inhiber les réponses immunitaires. Les Treg résident dans les organes lymphoïdes et les tissus périphériques et y contribuent à la tolérance immunitaire. Leur rôle est crucial puisqu'une absence totale de ces cellules chez la souris (Scurfy) ou chez l'humain (IPEX) entraîne une pathologie auto-immune rapidement létale. Or les Tregs sont impliqués dans un éventail beaucoup plus large de pathologies, et de légères modifications dans leur développement ou leurs fonctions effectrices peuvent entraîner non seulement des pathologies auto-immunes, mais également, entre autres, cardiovasculaires (Meng et al., 2016), des cancers (Shitara and Nishikawa, 2016), des troubles métaboliques (Feuerer et al., 2009), des avortements spontanés (Tsuda et al., 2019). Cela tient au fait que les Tregs ont un très large éventail de fonctions dans l'organisme, allant du contrôle des réponses immunitaires « normales » ou dirigées contre le soi, à la réparation tissulaire ou bien la tolérance fœto-maternelle. Bien que le lien ne soit pas clairement établi, ces différences fonctionnelles s'accompagnent de différences phénotypiques. Ainsi, les Tregs ont été classés dans différentes sous-populations, parfois en fonction de leur localisation tissulaire, de l'expression de certaines molécules effectrices spécifiques ou encore selon leur ressemblance aux différentes sous-populations de T helper en termes d'expression de récepteurs au chimiokines et/ou facteurs de transcription.

D'après la littérature, une partie au moins de cette hétérogénéité est acquise en périphérie suite à la pression environnementale subie par le Treg (ex. : empreinte tissulaire, production de cytokines lors d'une inflammation). Or l'acquisition de cette hétérogénéité semble graduelle : en effet, qu'il s'agisse de facteurs de transcription T-helper spécifiques (ex. : GATA3) ou de marqueurs tissulaires (ex. : PPAR γ), ceux-ci semblent exprimés par des « précurseurs » en amont de leur activation et/ou migration vers un tissu donné. Il existe donc la possibilité d'une acquisition graduelle d'une hétérogénéité qui pourrait commencer « grossièrement » dès le développement Treg pour, ensuite, être affinée en périphérie grâce à une empreinte tissulaire (spécifique du tissu) ou environnementale (dépendante du contexte inflammatoire) donnée. Peu d'études abordent l'hétérogénéité des Tregs dans le thymus, la plupart comparent les Tregs de la rate avec les Tregs d'un tissu donné par exemple, ou encore les Tregs pré- et post-infection. En revanche, pour d'autres populations se développant dans le

thymus, une différenciation phénotypique et fonctionnelle a été décrite dès leur développement thymique (ex : LT $\gamma\delta$, NKT) (Bennstein, 2018; Ribot et al., 2009). Concernant les Tregs, un seul exemple est connu à ce jour, à savoir les Tregs « triple high » et « triple low » définis par Palmer et collègues, et même, dans cet exemple, la description phénotypique des cellules a été réalisée en grande partie en périphérie et seuls les marqueurs GITR et PD-1 ont été utilisés dans la population thymique (Wyss et al., 2016).

Afin de permettre l'émergence d'une hétérogénéité dans une population donnée, il est nécessaire que les cellules soient soumises à des signaux différents. Durant leur développement dans le thymus, les Tregs sont soumis à un large éventail de signaux qu'on peut classer dans trois groupes : le signal TCR, le signal de costimulation et, finalement, les signaux cytokiniques. D'après la littérature, ce seraient les cytokines possédant une chaîne gamma dans leur récepteur qui sont importantes pour le développement Treg. En croisant les données de la littérature, on pourrait conclure que l'IL-2 et l'IL-15 jouent un rôle dans le développement Treg, même si ceci reste discuté (Wirnsberger et al., 2009). Les différences observées entre ces études pourraient provenir du fait que celles-ci n'ont pas été conduites en distinguant les Tregs en développement des cellules recirculantes qui représentent une proportion conséquente des Tregs thymiques et qui tend à augmenter avec l'âge (Thiault et al., 2015). Nous avons donc revisité, dans un premier temps, l'importance de ces cytokines pour le développement des Tregs.

Dépendance à l'IL-2 ou l'IL-15 des tTregs en développement

Pour ce faire, nous avons croisé des souris *Rag2-Gfp Foxp3-Thy1a* avec des souris déficientes pour l'IL-2 et/ou l'IL-15. En analysant les cellules en développement dans le thymus, nous avons observé une diminution importante des Tregs, y compris parmi les cellules les plus matures, aussi bien chez les souris IL-2^o que IL-15^o, ainsi qu'une diminution drastique chez les souris doubles déficientes (Fig.1). Ces résultats montrent que les deux cytokines contribuent de manière non-redondante au développement des Tregs et que, ensemble, ces cytokines représentent celles qui ont la contribution majoritaire pour le développement des Tregs, même si on ne peut pas exclure la participation d'autres cytokines. La non-redondance des rôles de l'IL-2 et de l'IL-15 est surprenante, car les chaînes qui transmettent le signal *via* le récepteur sont les mêmes pour l'IL-2 et l'IL-15 (chaîne bêta + gamma). En effet, CD25, la chaîne α spécifique du récepteur à l'IL-2, ne possède pas de domaine

intracytoplasmique et la chaîne α du récepteur à l'IL-15 serait située sur la cellule stromale productrice de la cytokine, permettant une présentation en trans.

Une hypothèse pour expliquer la non-redondance des signaux IL-2 et IL-15 serait que ceux-ci soient distribués par des cellules stromales différentes. En effet, les données de la littérature suggèrent que les DCs soient producteurs d'IL-2, alors que les mTECs produiraient davantage d'IL-15. Sachant que les répertoires antigéniques présentés par ces cellules sont différents, on peut supposer qu'elles sélectionnent des précurseurs Tregs ayant un répertoire TCR différent. Ainsi, les précurseurs ayant un TCR affin pour un antigène seulement présenté par l'un ou l'autre type cellulaire, ne pourraient pas substituer une cytokine à l'autre pour sa différenciation en Treg et sa survie. Une façon de répondre à cette question serait de générer une mutation invalidante des gènes *Il2* ou *Il15* en ciblant spécifiquement une sous-population de cellules stromales thymiques impliquées dans le développement Treg, à savoir les DCs et mTECs. Par exemple, si une absence d'IL-15 produite par les mTECs induisait une diminution du développement Treg similaire à celle observée chez une souris IL-15^o, cela confirmerait l'hypothèse selon laquelle la non-redondance des signaux IL-2 et IL-15 serait due à une distribution cellulaire différente de ces signaux. De plus, il est fort probable que ces cellules, outre des signaux cytokiniques et antigéniques différents, présentent également d'autres signaux environnementaux différents qui pourraient entraîner une hétérogénéité au sein des Tregs en développement.

L'exemple des Tregs CD25⁺ et CD25⁻

Dans la littérature, la plupart des études sur les Tregs Foxp3⁺ comprennent uniquement les Tregs exprimant des niveaux élevés de CD25 (IL-2R α) pour des raisons historiques (CD25 a été la première molécule utilisée pour identifier les Tregs), mais aussi parce que, dans le thymus, les Tregs matures sont considérés comme exprimant des niveaux élevés de CD25. En effet, les Treg Foxp3⁺ exprimant des niveaux faibles de CD25 ont été décrits comme des précurseurs (ref). Nous avons revisité ce concept en analysant l'expression de CD25 parmi les cellules les plus matures, prêtes à quitter le thymus (i.e. Rag2-GFP⁺ S1P1⁺). Il en ressort que, contrairement aux idées reçues, les Tregs matures, tout comme les RTE, comprennent des proportions similaires de Tregs CD25⁺ et CD25⁻. CD25 est donc un premier marqueur distinguant des sous-populations de Tregs. Nous avons également effectué des analyses fonctionnelles *in vivo* dans un modèle de souris *scurfy*. Nous avons reconstitué ces souris

avec des tTregs CD25⁺ ou CD25⁻. Nos résultats préliminaires montrent que les deux sous-populations de Tregs préviennent le développement de la pathologie auto-immune avec une efficacité similaire (Annexe 1). CD25 n'est donc pas un marqueur de maturité des Tregs thymiques, mais son expression décrit plutôt deux sous-populations de Tregs possédant toutes deux des fonctions immunosuppressives *in vivo*.

Nous avons ensuite étudié la dépendance à l'IL-2 et l'IL-15 du développement des sous-populations des Tregs CD25⁺, CD25⁻, ainsi que les populations GITR^{high}PD-1^{high} et GITR^{low}PD-1^{low} d'ores et déjà décrites dans la littérature (Fig.2). Nos résultats indiquent que les Tregs CD25⁺ ainsi que les Tregs GITR^{high}PD-1^{high} dépendent de l'IL-2 pour leur développement, alors que les Tregs CD25⁻ dépendent partiellement de l'IL-15. En revanche, les Tregs GITR^{low}PD-1^{low} ne présentent pas de dépendance spécifique à l'IL-2 ou l'IL-15 pour leur développement. Il est possible que cette dernière population nécessite un autre signal pour son développement ou bien ne nécessite pas de signaux cytokiniques. En effet, l'un des rôles des signaux cytokiniques, outre la participation à la différenciation Treg, serait de contrebalancer les signaux pro-apoptotiques engendrés par Foxp3 (Tai et al., 2013a). Si tel est le cas, sachant que les Tregs GITR^{low}PD-1^{low} nécessitent un signal TCR faible pour leur développement, il est possible que les signaux pro-apoptotiques soient moins transmis et ne nécessitent, de ce fait, pas de signal cytokinique pour les contrebalancer. CD25, GITR et PD-1 permettent donc de différencier des populations de Tregs thymiques ayant des besoins différents en cytokines pour leur développement.

Divers autres marqueurs ont été décrits pour les Tregs, dont certains impliqués dans leur développement, et il est de ce fait plausible que d'autres populations différentes de celles d'ores et déjà décrites se développent dans le thymus. Nous avons donc entrepris, par la suite, d'étudier la mise en place d'une hétérogénéité des Tregs dès leur développement thymique et de relier celle-ci à leur dépendance en cytokines.

L'hétérogénéité des Tregs thymiques

Pour étudier plus avant l'hétérogénéité des Tregs qui se développent dans le thymus, nous avons utilisé divers marqueurs définis par un screening d'anticorps dirigés contre des antigènes exprimés à la surface de Treg matures (i.e. CD69^{-/low}S1P1⁺). Les marqueurs CD25, PD-1 (CD279), GITR (CD357), CD73, 4-1BB (CD137) et OX-40 (CD134) nous ont permis de décrire en cytométrie dix clusters de Tregs différents. Cette caractérisation a été effectuée en utilisant une technique de réduction de

Discussion

dimension t-SNE, couplée à un algorithme de clustérisation non-supervisé, permettant de grouper les cellules phénotypiquement similaires (Phenograph). Afin de comprendre si ces clusters représentent des sous-populations distinctes de Tregs, nous avons ensuite effectué, en utilisant les mêmes marqueurs de surface, une analyse de CITEseq sur des Tregs Rag2-GFP+S1P1⁺ triés. En effet, cette technique permet de lier l'expression protéique de surface et le transcriptome de cellules individuelles. Les données anticorps ont été analysées en utilisant R-phenograph, ce qui a permis de définir 11 sous-populations différentes. L'une de ces sous-populations exprime des niveaux élevés de CD69 et est donc probablement plus immature que les autres. Une comparaison des transcriptomes des différentes populations a permis de mettre en évidence un nombre important de gènes différentiellement exprimés entre ces sous-populations. Une analyse des voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de ces gènes nous a permis d'identifier des voies de signalisation reliées pour la plupart à des fonctions immunitaires des Tregs, comme par exemple la prévention de pathologies auto-immunes ou le contrôle des réponses Th1 ou Th17 (Fig.3). Ces résultats s'inscrivent en faveur de l'hypothèse selon laquelle une hétérogénéité se mettrait en place dès le développement des Tregs dans le thymus. Les marqueurs phénotypiques choisis pour décrire différents clusters de Tregs représentent donc bien des marqueurs pour différencier des sous-populations de Tregs thymiques.

Vu ce constat, nous avons utilisé ces marqueurs en cytométrie pour analyser l'impact d'une absence d'IL-2 ou d'IL-15 sur le développement des différentes sous-populations. Nos résultats confirment que ces cytokines contrôlent des subsets de Tregs différents. Les populations dépendantes de l'IL-2 sont CD25⁺ et disparaissent quasi totalement, alors que les populations CD25⁻ ne diminuent que partiellement en l'absence d'IL-15. Il est possible que certaines de ces sous-populations puissent substituer une autre cytokine à l'IL-15. Le développement Treg étant très fortement diminué chez des souris déficientes en IL-2 et IL-15, il est possible que certaines cellules, initialement dépendantes de l'IL-15 chez une souris saine, puissent avoir accès à l'IL-2, puisque celle-ci serait reconnue par le récepteur de faible affinité (IL2R β , γ_c).

En effet, à ce jour, la source cellulaire de ces cytokines n'est pas certaine. Concernant la production de cytokines par les cellules stromales impliquées dans le développement Treg, l'IL-2 produite par les DCs semble importante pour le développement Treg (Weist et al., 2015), alors que la source majeure d'IL-15 dans le thymus semble être les mTECs matures (Cui et al., 2014). Ces deux populations présentent un répertoire antigénique partiellement différent (ref). Nous avons donc émis l'hypothèse

Discussion

que les Tregs se développant en présence d'IL-2 ou d'IL-15 expriment des répertoires TCR partiellement différents. Néanmoins, il faut également considérer de récentes publications qui semblent montrer que l'IL-2 produite par les lymphocytes T CD4 est également importante pour le développement Treg (Hemmers et al., 2019; Owen et al., 2019). Bien que ces cellules ne soient pas des cellules stromales et ne puissent pas, de ce fait, induire directement une différenciation des Tregs, on peut imaginer plusieurs hypothèses pour expliquer l'importance de l'IL-2 produite par les Tconv sur le développement Treg :

- L'IL-2 est largement diffusée dans le thymus et permet de participer de manière aléatoire au développement des Tregs : ceci est peu probable, puisqu'il a été montré que l'IL-2 ne signale qu'à une distance très faible et nécessiterait un contact cellule-cellule (Owen et al., 2018; Weist et al., 2015).
- Les Tconv interagissent avec les cellules stromales et produisent ainsi de l'IL-2 qui est directement apportée aux futurs Tregs interagissant à proximité avec la même cellule stromale. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'IL-2 proviendrait de Tconv qui possède un répertoire auto-spécifique, voire même de précurseurs Tregs CD25⁺ (Hemmers et al., 2019). Il serait, de ce fait, intéressant de comparer le répertoire auto-spécifique de ces Tconv avec celui des Tregs se développant sur les mTECs ou les DCs. En effet, si la source d'IL-2 provient également en partie des Tconv, il serait intéressant de comprendre si ceux-ci n'interagissent qu'avec des DCs ou bien également avec les mTECs.

Une première analyse des thymocytes de souris exprimant un TCR β transgénique provenant d'un TCR I-A^b/MOG-spécifique nous a révélé que l'IL-15 (mais pas l'IL-2) est impliquée dans le développement des Tregs spécifiques de ce ligand.

Nous avons par la suite analysé le répertoire TCR exprimé par les Tregs en développement de ces mêmes souris, de manière plus globale, par séquençage des ARNm du TCR α . En comparant les répertoires publics des Tregs provenant de souris wt avec ceux provenant de souris IL-2^o ou IL-15^o, nous avons pu observer une disparition de plus de 50% des TCRs chez les souris déficientes en cytokines.

Pour comprendre si les clonotypes perdus chez les souris IL-2^o et ceux perdus chez les souris IL-15^o étaient uniquement dépendants de ces cytokines, nous les avons comparés entre eux. Il s'avère que

Discussion

10% des clonotypes du répertoire public sont uniquement IL-2-dépendants et 18% sont uniquement dépendants de l'IL-15. Les Tregs dépendants de l'IL-2 ou l'IL-15 présentent donc, non seulement des différences phénotypiques et transcriptomiques, mais également des différences de répertoire TCR. Concernant les clonotypes partagés, il est fort probable que cela soit dû au fait que les différentes cellules stromales possèdent un répertoire antigénique partiellement redondant, notamment, par exemple, grâce aux transferts de TRA ayant lieu entre mTECs et DCs. De plus, il serait utile que des Tregs ayant des phénotypes et fonctions différentes migrent dans les mêmes tissus afin que ceux-ci puissent parer à différentes éventualités (infections, réparation tissulaire, etc...).

L'hétérogénéité des Tregs thymiques, en termes de phénotype, de fonction, et de spécificité, provient donc en partie des signaux cytokiniques auxquels les précurseurs sont soumis pendant leur développement.

Relevance physiopathologique d'une hétérogénéité thymique des Tregs

Les Tregs thymiques en développement que nous avons analysés présentent des différences dans le répertoire TCR, des transcriptomes et des phénotypes : il est, de ce fait, probable qu'une fois arrivés en périphérie, ces thymocytes évoluent vers des populations de Tregs ayant des fonctions et une localisation différente. Comme évoqué précédemment, ceci renforcerait l'hypothèse selon laquelle un premier imprinting ait lieu dans le thymus, ce qui pourrait permettre, par la suite, une différenciation plus spécifique en périphérie pour permettre l'adressage aux différents tissus et l'exercice de leurs fonctions. Les Tregs quittant le thymus auraient ainsi déjà une restriction quant à leur possible devenir . Quelle serait la relevance physiologique d'une telle première restriction dans le thymus ?

Les Tregs quittent le thymus pour être ensuite distribués dans les différents organes lymphoïdes et les différents tissus afin d'y exercer leurs fonctions. Il faut considérer que ces cellules quittent un organe quelque peu immunoprivilégié (Nieuwenhuis et al., 1988) pour arriver dans une périphérie où ils peuvent être très rapidement confrontés à un nombre important de signaux, notamment en cas, par exemple, d'inflammation en cours dans l'organisme. Si tous ces Tregs étaient également aptes à répondre à ces signaux, cela ne permettrait pas une distribution égale des Tregs dans les différents tissus. Or, l'activation des Tregs se fait de manière antigène spécifique *via* son TCR. La spécificité du TCR est donc directement liée à son activation et son adressage par la suite et *a fortiori* à sa fonction. Puisqu'une première implication de la spécificité du TCR a déjà lieu lors du développement Treg, il est

possible que cette première étape permette une acquisition d'un phénotype, mais aussi d'un paysage épigénétique associé à la spécificité du TCR, lequel permettra, lors de la seconde interaction de celui-ci, une activation rapide des gènes « ouverts » ou « poised » (donc accessibles à la machinerie transcriptionnelle). Comme nous l'avons mentionné précédemment, les cytokines, du moins l'IL-2, seraient également capables de participer à cette modulation du paysage épigénétique (Chorro et al., 2018). Il est difficile de prédire si l'IL-2 et l'IL-15 induiraient d'elles-mêmes une modulation différente de l'épigénome ou bien si les différences épigénétiques constatées seraient davantage liées au fait que ces cytokines sont produites par des cellules stromales différentes et incluent donc, probablement, des signaux différents.

Outre l'avantage de permettre un adressage rapide du Treg, cette restriction des sites potentiellement activables au niveau du génome du Treg éviterait une influence de signaux parasites (liés par exemple à une inflammation en cours) qui pourraient faire dévier le Treg de sa destination initiale et ainsi gaspiller « l'énergie » de l'organisme en envoyant une cellule à un endroit où elle sera inefficace du fait d'une incompatibilité de spécificité. Une analyse de single cell ATACseq sur les Tregs en développement pourrait permettre de valider cette hypothèse. Cette technique permet de connaître les sites du génome accessibles à la transcription et ces informations pourraient être reliées aux données transcriptomiques qui se retrouvent dans nos analyses.

Les marqueurs utilisés pour décrire nos populations font partie, pour certains, des TNFR. Ceci est intéressant car de nombreux traitements ciblent ces molécules dans diverses pathologies. Il serait, de ce fait, intéressant d'étudier l'impact de ces différents traitements sur le développement des Tregs, ainsi que sur les différentes populations exprimant ces récepteurs à différents niveaux, dans un premier temps chez la souris et, par la suite, chez l'Homme. En effet, les informations de la littérature restent contradictoires quant au rôle du TNF sur les Tregs, lequel inhiberait, pour certains, l'efficacité suppressive des Tregs dans des pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde (Ehrenstein et al., 2004), alors que, pour d'autres, leur efficacité suppressive en serait augmentée (Chen et al., 2008).

Quels parallèles possibles pour le développement des tTregs humains ?

Tout comme pour la souris, les Tregs humains ont été caractérisés d'abord par l'expression forte de CD25 à la surface des lymphocytes T CD4⁺ (Jonuleit et al., 2001). Puis le laboratoire de Roncarolo a montré que ceux-ci étaient caractérisés par l'expression de Foxp3 et qu'une mutation de ce gène était à

l'origine d'un défaut de fonctions des Tregs chez les patients souffrant d'IPEX (Bacchetta et al., 2006). Il apparaît donc que les Tregs humains sont nécessaires au maintien de la tolérance au soi chez l'Homme afin d'éviter, entre autres, le développement de pathologies auto-immunes et d'allergies, le rejet de greffe ou du fœtus par la mère pendant la grossesse (Wing and Sakaguchi, 2010). Pour permettre de les différencier des Tconv humains activés, qui expriment à la fois CD25 et, de manière transitoire, aussi Foxp3 (Gavin et al., 2006), d'autres marqueurs ont été proposés. Ainsi, une expression forte de CD25, associée à une faible expression de CD127, la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (Liu et al., 2006). Chez l'Homme, l'origine thymique des Tregs a été montrée en analysant l'état de maturité des cellules Foxp3⁺ dans le thymus (Lee and Hsieh, 2009; Tuovinen et al., 2008) ainsi qu'en corrélant des niveaux moins élevés de Tregs dans le sang de patients atteints du syndrome de DiGeorge, lequel entraîne une hypoplasie du thymus (Sullivan et al., 2002). Sur la base de ces similitudes entre Tregs humains et murins, Sakaguchi et collègues ont émis l'hypothèse que les signaux requis pour le développement des Tregs humains devaient sans doute concorder avec ceux identifiés chez la souris, à savoir le signal TCR, le signal de co-stimulation, ainsi que le signal cytokinique (Wing and Sakaguchi, 2010). Néanmoins, les évidences dans la littérature en faveur de cette hypothèse sont limitées à ce jour. En 2015, l'équipe de Sousa a étudié l'importance du signal cytokinique pour le développement des Tregs humains (Caramalho et al., 2015). Pour ce faire, elle a utilisé des modèles expérimentaux de co-cultures et de cultures d'organes thymiques (TOC) sur lesquels elle a modulé la disponibilité de différentes cytokines pour le développement Treg. Ses résultats suggèrent que les Tregs humains dépendraient de l'IL-2 et de l'IL-15 pour leur développement, et ce de manière non redondante. De plus, l'origine cellulaire de ces cytokines serait différente, créant de ce fait des niches pour le développement des Tregs dépendants de l'IL-2 ou de l'IL-15. En s'appuyant sur ces observations, on pourrait imaginer que, tout comme chez la souris, cette dépendance cytokinique différente permet le développement de sous-populations de Tregs hétérogènes. Des analyses, similaires à celles menées chez la souris, sur des thymocytes humains provenant de chirurgies cardiaques chez l'enfant, pourraient nous permettre de répondre à cette question.

L'hétérogénéité des Tregs humains est encore peu connue à ce jour. L'expression mutuellement exclusive de CD45RA et CD45RO par les Tregs constitue un premier niveau d'hétérogénéité selon Sakaguchi et collègues (Wing and Sakaguchi, 2010). Selon l'article originel, les Tregs CD45RA⁺Foxp3^{lo}

Discussion

et CD45RA⁻CD45RA⁺ sont phénotypiquement distinctes, capables toutes deux d'immunosuppression, mais liées d'un point de vue développemental puisque les CD45RA⁺Foxp3^{lo} seraient capables de se différencier en CD45RA⁻Foxp3^{high} (Miyara et al., 2009). Ceci a été montré en transférant ces deux populations dans des souris NSG (Nod Scid γ_c -deficient), puis en récupérant la rate de ces souris cinq jours plus tard pour analyser le phénotype des cellules injectées. Ne regarder néanmoins qu'un seul organe paraît restrictif, et bien que l'expression de Foxp3 augmente suite au transfert, cela n'implique pas, de façon certaine, que tous les CD45RA⁺Foxp3^{lo} soient les précurseurs des CD45RA⁻Foxp3^{high}. Outre les différences phénotypiques observées, ces populations sont également représentées à divers niveaux dans différentes pathologies (Sarcoïdose, Lupus érythémateux), suggérant que ces populations ont des fonctions différentes (Miyara et al., 2009). De même, deux populations différentes de Tregs, caractérisées par l'expression ou non d'ICOS, ont été décrites pour le thymus et la périphérie chez l'Homme (Ito et al., 2008). Ces populations semblent diverger d'un point de vue fonctionnel puisque les Tregs ICOS⁺ produisent davantage d'IL-10, alors que les Tregs ICOS⁻ produisent des niveaux élevés de TGF- β .

La répartition tissulaire des Tregs humains a également été prise en considération après la découverte des Tregs tissulaires chez la souris (Panduro et al., 2016). Il existerait, par exemple, un équivalent aux VAT-Tregs dans le tissu adipeux humain, et la présence de ces Tregs serait inversement corrélée à la masse corporelle, suggérant un lien éventuel avec l'inflammation et les désordres métaboliques observés chez les personnes atteintes de surpoids. Il existe donc, effectivement, une hétérogénéité périphérique chez les Tregs humains qui nécessiterait d'être approfondie et dont il serait important de définir si elle est définie en partie lors du développement Treg.

Avec l'augmentation croissante des maladies auto-immunes, des maladies inflammatoires chroniques et des cancers - trois types de pathologies dans lesquels les Tregs sont impliqués -, ces cellules ont été considérées comme un moyen éventuel de prévenir ou de guérir ces pathologies en alternative aux immuno-suppresseurs. Bien que certains traitements immuno-suppresseurs se soient montrés efficaces à ce jour, tels que les anti-TNF α pour certaines pathologies auto-immunes et inflammatoires, leur mode d'action est encore incertain et il n'y a pas d'explication au fait que certaines thérapies fonctionnent et d'autres non, selon le type de pathologie ou même d'un patient à l'autre. Il a été montré qu'un nombre important de ces thérapies impactent les Tregs chez les personnes traitées (Furukawa et al., 2016). Néanmoins, ces traitements induisent un état général immunosuppresseur chez

le patient, puisque même si les Tregs sont boostés et les Tconv auto-réactifs inhibés, le reste du système immunitaire est également fortement affaibli. De ce fait, l'un des axes thérapeutiques étudié à ce jour serait l'utilisation de Tregs (Romano et al., 2019). Bien que des études pré-cliniques aient montré la capacité des Tregs administrés *in vivo* à retarder ou à prévenir un rejet de greffe, ou encore à contrôler les réponses auto-immunes, et que certaines études cliniques soient en cours à ce jour, ces thérapies ne sont pas encore prêtes à remplacer les traitements immuno-suppresseurs. L'un des problèmes réside éventuellement dans la façon de produire ces Tregs. En effet, dans la majorité des études, la différenciation des Tregs est induite *in vitro* à partir de Tconv en utilisant, entre autres, du TGF- β . Or, comme le stipule les données de la littérature, cette méthode expérimentale ne permet pas de récapituler les modifications épigénétiques et transcriptionnelles qui ont lieu lors du développement thymique des Tregs. Elle permet seulement l'acquisition de capacités immunosuppressives transitoires, et non une stabilité de lignage. Il serait donc important d'établir un lien précis chez l'Homme entre les signaux reçus par les Tregs lors de leur développement et la mise en place de leurs capacités fonctionnelles, vraisemblablement retranscrites par des différences phénotypiques. Ainsi, pouvoir distinguer les différentes sous-populations de Tregs qui se développent chez l'humain, de même que les signaux nécessaires à leur développement, pourrait, dans un premier temps, permettre l'analyse de la présence et de la fonctionnalité de ces différentes populations dans diverses pathologies, ou bien celle des processus dans lesquels ils pourraient être impliqués (ex : rejet de greffe) afin, dans un second temps, d'utiliser ces connaissances pour générer des sous-populations de Tregs efficaces et adaptés à chaque pathologie en thérapie cellulaire.

ANNEXES

REVIEW

IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes

Cécile Apert, Paola Romagnoli[✉], Joost P. M. van Meerwijk[✉]

CPTP, Université de Toulouse, CNRS, Inserm, UPS, Toulouse, France

✉ Correspondence: Paola.Romagnoli@inserm.fr (P. Romagnoli), Joost.van-Meerwijk@inserm.fr (J. P. M. van Meerwijk)

Received February 6, 2017 Accepted May 4, 2017

ABSTRACT

Immunosuppressive regulatory T lymphocytes (Treg) expressing the transcription factor Foxp3 play a vital role in the maintenance of tolerance of the immune-system to self and innocuous non-self. Most Treg that are critical for the maintenance of tolerance to self, develop as an independent T-cell lineage from common T cell precursors in the thymus. In this organ, their differentiation requires signals from the T cell receptor for antigen, from co-stimulatory molecules, as well as from cytokine-receptors. Here we focus on the cytokines implicated in thymic development of Treg, with a particular emphasis on the roles of interleukin-2 (IL-2) and IL-15. The more recently appreciated involvement of TGF- β in thymic Treg development is also briefly discussed. Finally, we discuss how cytokine-dependence of Treg development allows for temporal, quantitative, and potentially qualitative modulation of this process.

KEYWORDS regulatory T cells, thymus, differentiation, IL-2, IL-15

INTRODUCTION

Several populations of T lymphocytes with immunosuppressive activity have been identified to date (Josefowicz et al., 2012a; Kim and Cantor, 2011; Sakaguchi et al., 2010; Shevach, 2011; Vuddamalay and van Meerwijk, 2017; Xu et al., 2016). The most critical population of Treg expresses Foxp3: Humans and mice carrying mutations in the gene encoding this forkhead/winged helix transcription factor develop a rapidly lethal autoimmune and inflammatory pathology (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001; Fontenot et al., 2003). Treg therefore prevent the development of autoimmune pathology and chronic inflammation in interfaces with the environment such as the intestines, lungs, and skin.

As other T lymphocytes, activation of Treg requires that they recognize antigenic peptides presented by cell-surface expressed molecules encoded in the major histocompatibility complex (MHC). Autoimmune pathology develops upon activation of auto-specific conventional T cells (Tconv) and suppression of these immune-responses involves auto-specific Treg (Kieback et al., 2016; Yang et al., 2015). The antigen-specificity of Treg involved in the prevention of chronic inflammatory diseases remains less well defined, but antigens from commensals as well as from infectious agents are most certainly recognized. It therefore appears appealing to postulate that Treg preventing autoimmune pathology develop mostly in the thymus where auto-specific T cell precursors can recognize self-antigens presented by thymic stromal cells (Klein and Jovanovic, 2011). It needs to be emphasized, however, that auto-specific Treg can also differentiate from Tconv precursors in peripheral lymphoid organs (Sun et al., 2015). The Treg preventing chronic inflammation likely mostly differentiate in peripheral (lymphoid) organs where Tconv involved in immune-responses, and therefore specific for the agents that provoked the inflammation, differentiate into Treg under tolerogenic conditions (Bilate and Lafaille, 2012; Josefowicz et al., 2012b). Nevertheless, colonic Treg express T cell receptors for antigen (TCR) that were also found on thymic Treg, suggesting that Treg involved in the prevention of chronic inflammation may develop in the thymus (Cebula et al., 2013). Recent data showing that peripheral Treg recirculate back to the thymus and that they represent a very substantial proportion of thymic Treg in adult mice (Cowan et al., 2016; Thiault et al., 2015), however, urge for a reinvestigation of this issue.

In addition to signals via the TCR, cytokine signaling plays a central role in Treg differentiation in the thymus and the periphery. In this review, we focus on Treg development in the thymus and will discuss TCR- and cytokine receptor-derived signals. We will discuss how and where these

distinct signals intersect to drive development of a Treg repertoire which efficiently protects the organism from autoimmune pathology.

TCR-SIGNALING AND THYMIC TREG-DIFFERENTIATION

Within the thymus two anatomically and functionally distinct compartments can be distinguished; the cortex and the medulla. Hematopoietic precursors enter the thymus at the cortico-medullary junction. During their differentiation, thymocytes will first migrate into the cortex, then back to the medulla before leaving the thymus at the cortico-medullary junction (Love and Bhandoola, 2011). Thymocytes acquire the expression of the heterodimeric TCR $\alpha\beta$. The genes encoding the TCR undergo random somatic rearrangements that allow for the generation of a wide repertoire of TCR capable of recognizing a vast variety of rapidly evolving infectious agents. Distinct TCR-based selection processes ensure that only functional and harmless T cells leave the thymus (Kurd and Robey, 2016; Lucas et al., 2016; Ohigashi et al., 2016).

In the thymic cortex, only thymocytes bearing a TCR with a certain affinity for peptide/MHC complexes presented by cortical thymic epithelial cells (cTEC) survive. This process, called positive selection, ensures the selection of developing T cells expressing a “functional” TCR and contributes to the generation of a repertoire of T cells expressing TCR that can recognize antigens in the context of self MHC-molecules. Positively selected thymocytes rapidly upregulate the chemokine receptor CCR4 which attracts these cells to CCL17 and CCL22-producing, Sirp α^+ dendritic cells (DC) and to the medulla (Hu et al., 2015). Too high affinity interactions of the TCR with peptide/MHC complexes, expressed by presumably DC, lead to a first wave of negative selection of autospecific and therefore dangerous T cell-precursors (McCaughy et al., 2008; Stritesky et al., 2013). Thus deleted T cell-precursors are likely specific for ubiquitously expressed and potentially for epithelial antigens. T lymphocytes that developed in a thymus in which MHC molecules were exclusively expressed by cTEC are strongly autoreactive, suggesting that cTEC contribute little, if at all, to negative selection (Capone et al., 2001; Laufer et al., 1996). Interestingly, high affinity interactions in the cortex may also lead to the differentiation of Treg (Liston et al., 2008; Ribot et al., 2007), but Treg-differentiation in the cortex remains a little-studied process. Thymocytes surviving cortical selection upregulate the chemokine-receptor CCR7 and migrate to the medulla in response to CCL19 and CCL21 produced by medullary thymic epithelial cells (mTEC) (Ueno et al., 2004).

In the thymic medulla, thymocytes interact via their TCR with peptide/MHC complexes presented by mTEC, DC, and B lymphocytes. High avidity interactions of thymocytes with medullary stromal cells can lead to their negative selection

through induction of apoptosis (“deletion”) or clonal anergy (Kyewski and Klein, 2006). High avidity interactions of developing T cells with all cited types of thymic stromal cells also lead to the differentiation of Treg (Klein et al., 2009) and the majority of developing Treg is localized in the medulla rather than in the cortex (Thiault et al., 2015). Combined, the processes of negative selection and Treg-differentiation in the thymus play a major role in the establishment of immune-tolerance to self-antigens.

It has therefore been clearly established that high avidity interactions of the developing T cells with thymic stromal cells can lead to two quite distinct outcomes: negative selection and differentiation of Treg. It remains less clear what tips the balance between these two fates. The mere affinity of the TCR with peptide/MHC complexes is not responsible. In mice expressing a single TCR specific for a non-self-antigen, no Treg develop. When the recognized antigen is introduced as a transgene, deletion as well as Treg-differentiation take place (Klein and Jovanovic, 2011). Other factors must therefore be involved. The observation that the distinct medullary stromal cell-types induce Treg-differentiation at distinct doses of antigenic peptide *in vitro*, suggests that the stromal cell with which thymocytes interact *in vivo* may in part determine the choice between deletion and Treg-differentiation (Wirnsberger et al., 2009). This may be due to the distinct surface expression levels of ligands for e.g. CD28, CD27 or other members of the TNF-receptor superfamily, or other molecules involved in deletion and Treg-differentiation (Coquet et al., 2013; Mahmud et al., 2014; Tai et al., 2005; Tang et al., 2003). However, even in experimental systems in which agonist peptide/MHC ligand was presumably exclusively presented by a single stromal cell-type, i.e., mTEC, deletion as well as Treg-differentiation were observed (Aschenbrenner et al., 2007). At least two explanations can be proposed. First, Treg-lineage commitment may take place independently of the thymocyte’s TCR (Pennington et al., 2006) and distinct selection criteria for Tconv and Treg precursors determine development of these two populations. Second, heterogeneity among mTEC (and potentially the other stromal cell-types) (Brennecke et al., 2015; Meredith et al., 2015) may be involved. These issues would merit further investigation.

EPIGENETIC MODIFICATIONS AND THYMIC DEVELOPMENT OF TREG

Epigenetic gene regulation, such as DNA methylation and histone modifications, is implicated in lineage specification and maintenance. Several groups have demonstrated that DNA demethylation at conserved non-coding sequence within the *Foxp3* locus ensures the stability of its expression in thymic derived Treg (Floess et al., 2007; Kim and Leonard, 2007; Zheng et al., 2010). It was shown that DNA methylation is lost during the last (i.e., *Foxp3*-expressing) stages of thymic Treg-development through oxidation of 5-methylcytosine

and other intermediates in the demethylation process. It was suggested that two enzymes, TET2 and TET3, initiate this reaction (Toker et al., 2013). Indeed, in *Tet2/Tet3* double deficient mice, in which regulatory regions remain methylated, *Foxp3* expression is unstable and Treg lose their suppressive functions (Yue et al., 2016). Interestingly, Treg-specific demethylated regions (TSDRs) are also found in other genes encoding for factors essential for Treg function, such as CD25, CTLA-4, Eos, and GITR (Ohkura et al., 2012). While TCR signaling is required for demethylation of TSDRs, *Foxp3* gene expression is dispensable. These data indicate that to establish Treg lineage two independent but complementary molecular mechanisms are in play: *Foxp3* gene expression and epigenetic changes (Ohkura et al., 2012). Establishment of a Treg epigenetic landscape may therefore precede and promote *Foxp3* gene expression. CpG demethylation (or initiation of this process) in the TSDR or CNS2 of the *Foxp3* gene strictly correlated with expression of this gene, yielding little insight into this question (Toker et al., 2013; Yue et al., 2016). However, the recently described binding of a global chromatin organizer, *Satb1*, to another regulatory region of the *Foxp3* locus (CNS0) in immature CD4/CD8 double positive thymocytes and its requirement for Treg development suggest that early epigenetic modifications control the expression of *Foxp3* and Treg signature genes (Kitagawa et al., 2017). How the expression and activity of *Satb1* are regulated remains to be determined.

INVOLVEMENT OF IL-2 AND IL-15 IN TREG DIFFERENTIATION IN THE THYMUS

Early studies with mice genetically deficient in production of the “T cell growth factor” IL-2 or expression of its receptor surprisingly showed that these animals developed severe autoimmune pathology instead of immunodeficiency (Sadlack et al., 1995; Suzuki et al., 1995; Willerford et al., 1995). Initially, defects in IL-2 dependent activation induced cell-death (AICD) of autoreactive T cells were suspected. However, complementation of mice deficient in IL-2 or its receptor with WT Treg prevented pathology (Suzuki et al., 1999; Wolf et al., 2001). The latter data indicated that a lack of Treg or Treg-functional capacity was responsible for the lymphoproliferation and lethal autoimmune pathology in mutant mice. It was later appreciated that IL-2 plays a major role in Treg homeostasis. The role of IL-2 in the differentiation of Treg from Tconv precursors in peripheral lymphoid organs (and potentially in tissues) and in survival and function of mature Treg has recently been discussed (Chinen et al., 2016) and is beyond the scope of this review.

One of the earliest indications that IL-2 may play a role in the thymic development of Treg came from studies by Malek and colleagues showing that mice in which the IL-2R β was exclusively expressed by developing thymocytes, survived substantially longer than IL-2R β -deficient animals (Malek et al., 2000). Later studies showed that substantially reduced proportions of mature CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes

developed in IL-2R β -deficient mice and that differentiation of Treg with *in vitro* immunosuppressive activity was fully restored in mice in which IL-2R β expression was restricted to thymocytes (Burchill et al., 2007; Fontenot et al., 2005; Malek et al., 2002; Soper et al., 2007; Vang et al., 2008).

Several other studies further addressed the role for IL-2 in Treg development in the thymus using distinct mutant mice. Rudensky and colleagues found approximately half the number of Treg in the thymus of IL-2-deficient as compared to that of WT mice (Fontenot et al., 2005). However, other studies found practically normal numbers of Treg in IL-2 deficient mice (Burchill et al., 2007; D’Cruz and Klein, 2005). Similarly discordant results were found in studies with mice deficient in the IL-2R α chain (D’Cruz and Klein, 2005; Fontenot et al., 2005; Soper et al., 2007). It therefore appears that IL-2 may play a role in Treg development, but that it is not strictly required.

How then to explain the substantially reduced numbers of Treg in the thymus of IL-2R β deficient mice, a very consistent observation? The IL-2R β chain is shared between the receptors for IL-2 and for IL-15. The latter cytokine may therefore play an important role in Treg development. Farrar and colleagues found approximately half the number of Treg in the thymus of IL-15 deficient mice as compared to WT animals (Burchill et al., 2007). In IL-2 and IL-15 doubly deficient thymuses, they found as few Treg as in the thymus of IL2R β -deficient mice. However, Ziegler and colleagues found normal proportions of Treg in the thymus of mice lacking expression of the IL-15R α chain, which is only involved in signalling via the receptor for IL-15 (Soper et al., 2007). It therefore appears likely that IL-15 is involved in Treg development in the thymus but, again, that it is not absolutely required.

Therefore, whereas in mice lacking expression of both IL-2 and IL-15 or both of their receptors substantially reduced numbers of Treg were consistently found in the thymus, in mice deficient for one or the other cytokine or receptor discordant results were obtained. These data therefore clearly demonstrate that the cytokines IL-2 and IL-15 play important roles in the thymic development of Treg. What then explains the discordant results when only one of the two cytokines or receptors is missing? In transgenic mice in which the green fluorescent protein is expressed under control of the *Rag2* promoter (“*Rag2*-GFP mice”), newly developing T cells are GFP⁺ and cells that are “older” do no longer express GFP (Yu et al., 1999). Using *Rag2*-GFP mice, it was observed that only a small proportion of thymic Treg are actually newly developing cells (Cuss and Green, 2012; McCaughy et al., 2007; Thiault et al., 2015). It was therefore important to assess the roles for IL-2 and IL-15 in *de novo* development of Treg. Seddon and colleagues used a particularly original approach to study *de novo* T cell development in which the developmental blockade of T cells in ZAP-70 deficient mice can be lifted by inducing ZAP70 expression using a TetOn transgenic system (Marshall et al., 2014). It was thus unambiguously shown that in absence of signaling through

the receptors for IL-2 or of IL-15 Treg development was severely hampered. These results strongly indicate important and non-redundant roles for IL-2 and IL-15 in Treg development in the murine thymus. Importantly, using *in vitro* culture systems, Sousa and colleagues demonstrated quantitatively important and non-redundant roles for IL-2 and IL-15 in the development of Foxp3-expressing human Treg from immature thymic precursors (Caramalho et al., 2015).

THE MECHANISMS BY WHICH IL-2 AND IL-15 CONTROL TREG-DEVELOPMENT IN THE THYMUS

To investigate how IL-2 and IL-15 impinge on Treg development in the thymus, it was important to determine at what stage these cytokines act. Treg and Tconv develop from common precursors. The CD4⁺CD8⁻TCR^{high} ("CD4SP") stage of development is apparently the last one shared between Treg and Tconv. The CD4SP stage can be further dissected into four subpopulations using expression of CD25 and of Foxp3 as criterion. In cultures of electronically sorted CD4SP CD25⁻Foxp3⁻ thymocytes, no Foxp3⁺ cells develop and the addition of IL-2 or IL-15 does not change this result (Lio and Hsieh, 2008). By contrast, some CD25⁺Foxp3⁻ cells expressed Foxp3 upon *in vitro* culture and this Treg differentiation was greatly increased by addition of IL-2 or IL-15 (Lio and Hsieh, 2008; Tai et al., 2013; Vang et al., 2008). Similar results were obtained using human CD4SP CD25⁺ CD127⁺ (in large majority Foxp3⁻) thymocytes (Caramalho et al., 2015). These results suggested that CD4SP CD25⁺Foxp3⁻ thymocytes, which develop independently of IL-2 and IL-15 (Marshall et al., 2014), are the Treg-precursors that require IL-2 or IL-15 for their final steps of differentiation. However, in absence of signaling through the receptor for IL-15 (but not IL-2) the development of another CD4SP subpopulation, CD25⁻Foxp3⁺ cells, was found to be reduced (Marshall et al., 2014). Upon *in vitro* culture of WT CD4SP CD25⁻Foxp3⁺ thymocytes in presence of IL-2, these cells become CD25⁺Foxp3⁺ Treg (Marshall et al., 2014; Tai et al., 2013).

These and other data indicate that CD4SP CD25⁺Foxp3⁺ Treg can develop via two distinct pathways. In the first pathway, TCR-signaling allows CD4SP CD25⁻Foxp3⁻ thymocytes to become CD25⁺Foxp3⁻ cells which, when stimulated through their receptors for IL-2 or IL-15, will become CD25⁺Foxp3⁺ Treg. In the second pathway, signaling through the TCR and the IL-15 receptor allows CD4SP CD25⁻Foxp3⁻ thymocytes to become CD25⁻Foxp3⁺ cells which, when stimulated through their receptor for IL-2, will become CD25⁺Foxp3⁺ Treg. Interestingly, experiments in which a Nur77-GFP reporter indicated the affinity of TCR-peptide/MHC interactions suggested that the development of CD4SP CD25⁺Foxp3⁻ precursors involves higher affinity interactions with stromal cells than differentiation of CD25⁻Foxp3⁺ precursors (Marshall et al., 2014).

In both proposed developmental pathways, the cytokines IL-2 and IL-15 therefore appear to induce expression of

Foxp3. Signaling downstream of the receptors for IL-2 and IL-15 involves the JAK3-STAT5 pathway. Consistent with the roles for these cytokines in Treg differentiation in the thymus, in mice with a T cell-specific deficiency in STAT5 expression a severe defect in Treg development was observed (Burchill et al., 2007). Moreover, transgenic expression of constitutively active STAT5 rescued Treg development in IL-2Rβ-deficient mice (Burchill et al., 2003; Burchill et al., 2007). The *Foxp3* gene contains several conserved potential STAT5 binding sites, some of which demonstrated binding of STAT5 in Treg but not Tconv (Burchill et al., 2007; Yao et al., 2007). It therefore appears that signaling through the receptors for IL-2 and IL-15 induces, via STAT5 activation, expression of Foxp3.

An alternative but not mutually exclusive explanation for the action of IL-2 (and potentially IL-15) was reported by Singer and colleagues. They showed that Foxp3 expression promotes cell-death by inducing expression of pro-apoptotic (e.g., PUMA and BIM) and repressing pro-survival proteins (e.g., Bcl-2) (Tai et al., 2013). *In vitro* experiments showed that IL-2 protected Foxp3⁺ but not Foxp3⁻ CD4SP cells from apoptosis by increasing the expression of Bcl-2, which was mediated by STAT5. Though intriguing, these results will need to be reconciled with the observation that transgenic expression of Foxp3 restored Treg development and prevented autoimmune pathology in IL-2Rβ deficient mice (Soper et al., 2007).

IL-2 and IL-15 appear not implicated in the induction of the demethylation of the regulatory region of the *Foxp3* locus of Treg precursors. Compared to the strong TSDR demethylation observed in CD25⁺Foxp3⁻ cells stimulated via their TCR in the presence of IL-2, precursors cultured *in vitro* with IL-2 or IL-15 alone display only a minor TSDR demethylation (8%–14%) (Toker et al., 2013).

THE CELLULAR ORIGINS OF THE IL-2 AND IL-15 INVOLVED IN TREG DEVELOPMENT

Identification of the cellular sources of the IL-2 and IL-15 involved in Treg differentiation may reveal important regulatory mechanisms of this process (*cf. infra*). In hematopoietic chimeras in which only radioresistant stromal cells carried an invalidating mutation in the *Il2* gene, normal numbers of Treg developed, strongly suggesting that the IL-2 involved in Treg development is produced by (radiosensitive) hematopoietic cells (Marshall et al., 2014). Probably the most obvious candidates for the cells producing IL-2 in the thymus are (developing) T cells. IL-2 would then potentially act in an autocrine manner to stimulate Treg differentiation. In mixed hematopoietic chimeras, *Il2*-mutant thymocytes can efficiently differentiate into Treg when other hematopoietic cells can produce IL-2 (Tai et al., 2005), suggesting that an autocrine loop does not play a major role. Robey and colleagues showed that IL-2 derived from DC added to *in vitro* thymic slice cultures could drive Treg development (Weist

et al., 2015). In the human thymus, IL-2 protein was found in the cortex and the medulla, and the *Il2* gene appeared expressed mostly by mature T cells (Caramalho et al., 2015). No evidence was found for IL-2-production by human thymic dendritic cells. It will now be important to identify the precise thymic cell-type(s) that produce(s) the IL-2 involved in Treg differentiation using conditional *Il2* KO mice (Popmihajlov et al., 2012) bred to mice expressing the Cre-recombinase under control of appropriate promoters, e.g., those controlling the genes encoding CD11c, CD4, or p56^{lck}.

The identity of the thymic population producing the IL-15 involved in Treg development is probably clearer, at least in the mouse. In hematopoietic chimeras in which radioresistant cells could not present, via their IL-15 receptor α -chain, IL-15 to developing thymocytes, strongly reduced proportions of Treg developed (Marshall et al., 2014). The thymic development of iNKT cells also requires IL-15, which is presented by radioresistant stromal (but not dendritic) cells (Castillo et al., 2010). Using reporter mice, Ikuta and co-workers showed that, in the thymus, IL-15 is produced mainly by mTEC and, at lower levels, by some pericytes and blood endothelial cells (Cui et al., 2014). Flow-cytometry analysis identified mTEC expressing high levels of MHC class II ("mTEC^{high}") as the main IL-15 producing stromal cell-type in the thymus. By contrast, dendritic cells and macrophages did not produce IL-15. Lefrançois and co-workers demonstrated, using reporter mice, that very immature (and therefore cortical) thymocytes can produce high levels of IL-15 and that these cells rapidly lose this capacity during T cell development (Colpitts et al., 2013). However, given that Treg mainly develop in the thymic medulla suggests that this source of IL-15 is irrelevant to Treg differentiation. Combined, the published data strongly indicate that the IL-15 involved in Treg development in the murine thymus is produced and presented by mTEC^{high}. Intriguingly, these stromal cells ectopically express tissue-antigens known to be involved in selection of the Treg's TCR-repertoire (Aschenbrenner et al., 2007; Malchow et al., 2013; Takaba et al., 2015; Yang et al., 2015). Also in the human thymus, IL-15 was mainly found in the medulla. As in mice, mTEC expressed the *Il15* gene. However, also B cells, monocytes/macrophages, and NK cells produced this cytokine (Caramalho et al., 2015). Given that B lymphocytes can induce T cell-tolerance in the mouse thymus, the latter observation may prove of importance (Yamano et al., 2015).

The distinct signals involved in T cell differentiation in peripheral tissue are not necessarily derived from the same cell. Thus, differentiation of Th2 cells, specialized in the defense against large extracellular parasites such as helminthes, requires TCR triggering through interactions with peptide/MHC complexes, presented by dendritic cells, and the Th2-polarizing cytokine IL-4, which can be derived from type 2 innate lymphoid cells (Pelly et al., 2016). Signals involved in T cell development and activation do not need to be delivered all at once neither and can be accumulated through multiple sequential interactions with different

antigen-presenting cells in a multistep process (Khailaie et al., 2014; Kisielow and Miazek, 1995; Valitutti et al., 1995; Wilkinson et al., 1995). Similar mechanisms may act within the thymus to drive Treg differentiation. In the "two-step model" for Treg differentiation in the thymus proposed by Hsieh and colleagues, the first step involves TCR-triggering which leads to upregulation of the high-affinity receptor for IL-2. The second step involves engagement of the latter receptor by IL-2 which, in the experimental setup used by these authors, was not derived from the same stromal cell (Lio and Hsieh, 2008). Using biphoton microscope analysis of explanted thymic tissue, Robey and colleagues demonstrated that thymocytes migrate very rapidly during their development, which is consistent with the notion that involved stimuli may be derived from distinct stromal cells (Le Borgne et al., 2009). On the other hand, in order to drive Treg differentiation in explanted WT thymic tissue, the dendritic cells that presented the peptide/MHC complexes involved in TCR triggering, that were dropped onto the cultures, also needed to produce IL-2 (Weist et al., 2015). It remains therefore unclear if TCR and IL-2-receptor engagements take place simultaneously or sequentially, and if the involved ligands are expressed by the same or by distinct stromal cells.

HOW THE REQUIREMENT FOR IL-2 AND IL-15 MAY ALLOW MODULATION OF THE GENERATION OF THE TREG REPERTOIRE

The involvement of IL-2 and IL-15 may allow for control of Treg development in the thymus in quantitative and qualitative terms. Transgenic mice expressing constitutively active STAT5 had three- to seven-fold increased numbers of Treg, suggesting that STAT5 activation (through the receptors for IL-2 or IL-15) is a limiting factor in Treg differentiation in the thymus (Burchill et al., 2008; Burchill et al., 2007). In mutant mice lacking the pro-apoptotic proteins Puma and Bim or expressing anti-apoptotic Bcl-2, substantially increased numbers of Treg were found in the thymus, showing that the large majority of developing Treg normally die (Tai et al., 2013). In mixed hematopoietic chimeras in which growing numbers of Treg precursors expressed the common cytokine receptor γ -chain (" γ_c ", a constituent of, among others, the receptors for IL-2 and IL-15), the numbers of thymic Treg saturated at approximately 10^6 cells, suggesting that availability of IL-2 and IL-15 quantitatively controls Treg development (Tai et al., 2013). Using cultures of explanted thymic tissue, Robey and colleagues showed that thymic Treg limited the differentiation of new Treg by competing for IL-2 (Weist et al., 2015). In *in vitro* cultures of human thymocytes, addition of IL-2 or IL-15 substantially increased the development of Treg (Caramalho et al., 2015). Interestingly, also in TCR-ligand doubly transgenic mice, the absolute numbers of Treg found in the thymus were well below the numbers expected if all autospecific T cell-precursors had differentiated into Treg (reviewed in ref. Romagnoli et al., 2008), but the potential involvement of

limiting availability of cytokines has, to our knowledge, not been demonstrated.

It therefore appears that the availability of IL-2 (and potentially IL-15) may be a limiting factor in Treg development. IL-2 thus appears to quantitatively regulate the numbers of Treg developing in the thymus. Importantly, the availability of IL-2 appears to diminish with age. T cells activated in the periphery during immune responses can migrate back to the thymus (Hale and Fink, 2009) and Treg are not an exception to this phenomenon. Probably because of their repertoire enriched in auto-specific cells and the resulting massive activation of peripheral Treg (Fisson et al., 2003; Hsieh et al., 2004; Romagnoli et al., 2002), a very high proportion of thymic Treg are cells that had re-entered the thymus from the periphery (Cowan et al., 2016; Thiault et al., 2015). We showed that recirculating Treg inhibit the differentiation of their precursors and that they do so by limiting the availability of IL-2. Importantly, the proportion of recirculating Treg among thymocytes grows substantially with age, which results in a strongly fading *de novo* development of Treg (Thiault et al., 2015). Treg recirculation may also be modulated by e.g., infection, stress or other factors, which thus would potentially lead to increased or decreased Treg differentiation in the thymus.

Intriguingly, recirculating Treg appeared to control IL-2-dependent but not IL-2-independent Treg differentiation in the thymus (Thiault et al., 2015). Given that the proportion of recirculating Treg among thymocytes substantially increases with age, IL-2- (but not IL-15-) dependent Treg differentiation will strongly decline. It is tempting to speculate that, with age, Treg differentiation will increasingly depend on IL-2-producing dendritic cells and progressively on interactions with IL-15-producing mTEC. The potential consequences of this shift on e.g., selection of the TCR-repertoire expressed by developing Treg would merit thorough examination.

INVOLVEMENT OF OTHER γ_c AND RELATED CYTOKINES IN TREG DEVELOPMENT

In mice carrying mutations in the gene encoding the common cytokine receptor γ -chain γ_c , very low proportions of Treg develop in the thymus (Bayer et al., 2008; Burchill et al., 2008; Burchill et al., 2007; Tai et al., 2013). Since γ_c is a constituent of the receptors to the cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21, " γ_c cytokines" other than IL-2 and IL-15 may be involved in Treg development in the thymus. IL-4R α -deficient mice appear to have normal proportions of thymic Foxp3⁺ Treg (Vang et al., 2008). Similar to IL-2 and IL-15, IL-7 induced the conversion of murine CD4SP CD25⁺Foxp3⁻ precursors into Foxp3⁺ Treg in *in vitro* cultures (Vang et al., 2008). IL-7 also drives Treg differentiation of human non-regulatory thymocytes stimulated in presence of TGF- β , but the relevance of this observation for physiological Treg development in the thymus requires clarification (Caramalho et al., 2015). IL-7, presumably produced by thymic epithelial cells (Shitara et al., 2013), plays a major role in early stages

of T-lymphocyte development. Therefore, mice deficient in IL-7 or the IL-7R α chain have severely reduced thymocyte-counts and, consequently, absolute numbers of thymic Treg (Bayer et al., 2008; von Freeden-Jeffry et al., 1995). However, the proportion of Foxp3⁺ cells among CD4SP thymocytes appeared unaltered (Bayer et al., 2008; Vang et al., 2008). To circumvent the effects of IL-7 on early T cell-development, Ikuta and colleagues generated mice in which the gene encoding the IL-7R α chain is deleted at the CD4⁺CD8⁺ stage of thymocyte development. The proportion of Foxp3⁺ Treg among CD4SP thymocytes appeared unaltered in these mice (Tani-ichi et al., 2013). It therefore appears unlikely that IL-7 plays a role in the final stages of Treg differentiation in the thymus. This conclusion is coherent with the observation that mice deficient in IL-7 or its receptor do not develop immunopathology (von Freeden-Jeffry et al., 1995).

To the best of our knowledge, the involvement of the γ_c cytokines IL-9 and IL-21 in Treg development in the mouse thymus has not been reported. In humans, IL-9 appears to play a role in T cell-development, but involvement in Treg differentiation was not investigated (De Smedt et al., 2000). *In vitro* stimulation of non-regulatory thymocytes in presence of TGF- β leads to Foxp3⁺ Treg differentiation in presence of IL-2 or IL-15, but not of IL-4 nor of IL-21 (Caramalho et al., 2015). Whereas very convincing evidence has been reported for a key-role for IL-2 and IL-15 in intrathymic Treg differentiation, evidence that other γ_c cytokines are involved is therefore currently lacking.

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is an IL-7-related cytokine, the receptor of which shares the IL-7R α chain with the receptor for IL-7. It was reported that human Hassall's corpuscles produce TSLP which activates thymic dendritic cells to upregulate expression of CD80 and CD86. *In vitro*, these dendritic cells then appeared to induce the differentiation of Treg from thymocyte precursors (Hanabuchi et al., 2010; Watanabe et al., 2005). Whereas IL-7 induces the differentiation of murine Treg from CD4SP CD25⁺Foxp3⁻ precursors, TSLP does not (Vang et al., 2008). Deficiency of the IL-7R α chain, and therefore in signaling through the TSLP-R, leads to strongly reduced thymocyte numbers but not to a specific Treg defect (Bayer et al., 2008). Durum and colleagues argued that Treg development requires IL-7 or TSLP mediated stimulation through IL-7R α (Mazzucchelli et al., 2008). However, it remains unclear why these authors found normal absolute numbers of Treg in the thymus from mice in which radioresistant thymic stromal cells did not produce IL-7 (cf. ref. Shitara et al., 2013). Whereas in humans TSLP may have an indirect role in the thymic generation of Treg, it appears therefore unlikely that TSLP plays a role in this process in mice.

INVOLVEMENT OF TGF- β IN TREG DEVELOPMENT IN THE THYMUS

Transforming growth factor- β (TGF- β) plays a central role in the differentiation of conventional T cells into Treg in the

bioavailability by peripheral Treg that recirculate back to the thymus reveals a connection between peripheral immune responses and thymocyte differentiation and offers a new perspective on Treg function. Activated peripheral Treg, therefore, not only control the homeostasis of the immune system in the periphery, but also the development of new Treg in the thymus. Studying the involvement of cytokines in the development of Treg and other T cell-subsets will shed light on modulation, by peripheral immune-responses, of T cell differentiation and TCR-repertoire selection in the thymus.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the members of the TMIT team for critical discussions on the topic of the involvement of cytokines in thymic Treg development. This work was financially supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM-DEQ20160334920), the “Agence Nationale pour la Recherche” (ANR-16-CE15-0015-01), and the IdEx Toulouse.

ABBREVIATIONS

AICD, activation induced cell-death; cTEC, cortical thymic epithelial cells; DC, dendritic cells; IL-2, interleukin-2; MHC, major histocompatibility complex; mTEC, medullary thymic epithelial cells; Tconv, conventional T cells; TCR, T cell receptors for antigen; Treg, regulatory T lymphocytes; TSDRs, Treg-specific demethylated regions

COMPLIANCE WITH ETHICS GUIDELINES

Cécile Apert, Paola Romagnoli, and Joost van Meerwijk have no conflict of interest. All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

OPEN ACCESS

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

REFERENCES

- Aschenbrenner K, D’Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, Rolink A, Klein L (2007) Selection of Foxp3(+) regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire(+) medullary thymic epithelial cells. *Nature Immunol* 8:351–358
- Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, Surh CD, Malek TR (2008) A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 181:225–234
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genet* 27:20–21
- Bilate AM, Lafaille JJ (2012) Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol* 30:733–758
- Brennecke P, Reyes A, Pinto S, Rattay K, Nguyen M, Kuchler R, Huber W, Kyewski B, Steinmetz LM (2015) Single-cell transcriptome analysis reveals coordinated ectopic gene-expression patterns in medullary thymic epithelial cells. *Nature Immunol* 16:933–941
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* 27:68–73
- Burchill MA, Goetz CA, Prlic M, O’Neil JJ, Harmon IR, Bensinger SJ, Turka LA, Brennan P, Jameson SC, Farrar MA (2003) Distinct Effects of STAT5 Activation on CD4+ and CD8+ T Cell Homeostasis: Development of CD4+CD25+ Regulatory T Cells versus CD8+ Memory T Cells. *J Immunol* 171:5853–5864
- Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA (2007) IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178:280–290
- Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, Vegoe AL, Hsieh CS, Jenkins MK, Farrar MA (2008) Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28:112–121
- Capone M, Romagnoli P, Beermann F, MacDonald HR, van Meerwijk JPM (2001) Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* 97:1336–1342
- Caramalho I, Nunes-Silva V, Pires AR, Mota C, Pinto AI, Nunes-Cabaco H, Foxall RB, Sousa AE (2015) Human regulatory T-cell development is dictated by Interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus. *J Autoimmun* 56:98–110
- Castillo EF, Acero LF, Stonier SW, Zhou D, Schluns KS (2010) Thymic and peripheral microenvironments differentially mediate development and maturation of iNKT cells by IL-15 transpresentation. *Blood* 116:2494–2503
- Cebula A, Seweryn M, Rempala GA, Pabla SS, McIndoe RA, Denning TL, Bry L, Kraj P, Kisielow P, Ignatowicz L (2013) Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature* 497:258–262
- Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, Gasteiger G, Feng Y, Fontenot JD, Rudensky AY (2016) An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol* 17:1322–1333
- Colpitts SL, Stonier SW, Stoklasek TA, Root SH, Aguila HL, Schluns KS, Lefrancois L (2013) Transcriptional regulation of IL-15 expression during hematopoiesis. *J Immunol* 191:3017–3024
- Coquet JM, Ribot JC, Babala N, Middendorp S, van der Horst G, Xiao Y, Neves JF, Fonseca-Pereira D, Jacobs H, Pennington DJ et al (2013) Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla

- promote CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *J Exp Med* 210:715–728
- Cowan JE, McCarthy NI, Anderson G (2016) CCR7 controls thymus recirculation, but not production and emigration, of Foxp3(+) T Cells. *Cell reports* 14:1041–1048
- Cui G, Hara T, Simmons S, Wagatsuma K, Abe A, Miyachi H, Kitano S, Ishii M, Tani-ichi S, Ikuta K (2014) Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:1915–1920
- Cuss SM, Green EA (2012) Abrogation of CD40-CD154 signaling impedes the homeostasis of thymic resident regulatory T cells by altering the levels of IL-2, but does not affect regulatory T cell development. *J Immunol* 189:1717–1725
- D'Cruz LM, Klein L (2005) Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6:1152–1159
- De Smedt M, Verhasselt B, Kerre T, Vanhecke D, Naessens E, Leclercq G, Renauld JC, Van Snick J, Plum J (2000) Signals from the IL-9 receptor are critical for the early stages of human intrathymic T cell development. *J Immunol* 164:1761–1767
- Fahlen L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, Powrie F (2005) T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 201:737–746
- Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL (2003) Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T Cells in the steady state. *J Exp Med* 198:737–746
- Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang H-D, Bopp T, Schmitt E et al (2007) Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e38
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nat Immunol* 3:3
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY (2005) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142–1151
- Hale JS, Fink PJ (2009) Back to the thymus: peripheral T cells come home. *Immunol Cell Biol* 87:58–64
- Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, Arima K, Wang YH, Voo KS, Cao W et al (2010) Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 184:2999–3007
- Hsieh CS, Liang Y, Tzgnik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY (2004) Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 21:267–277
- Hu Z, Lancaster JN, Sasipongnan C, Ehrlich LI (2015) CCR4 promotes medullary entry and thymocyte-dendritic cell interactions required for central tolerance. *J Exp Med* 212:1947–1965
- Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY (2012a) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30:531–564
- Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, Umetsu DT, Rudensky AY (2012b) Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 482:395–399
- Khailaie S, Robert PA, Toker A, Huehn J, Meyer-Hermann M (2014) A signal integration model of thymic selection and natural regulatory T cell commitment. *J Immunol* 193:5983–5996
- Kieback E, Hilgenberg E, Stervbo U, Lampropoulou V, Shen P, Bunse M, Jaimes Y, Boudinot P, Radbruch A, Klemm U et al (2016) Thymus-derived regulatory T cells are positively selected on natural self-antigen through cognate interactions of high functional avidity. *Immunity* 44:1114–1126
- Kim HJ, Cantor H (2011) Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8(+) regulatory T cells. *Sem Immunol* 23:446–452
- Kim HP, Leonard WJ (2007) CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med* 204:1543–1551
- Kisielow P, Miazek A (1995) Positive selection of T cells: rescue from programmed cell death and differentiation require continual engagement of the T cell receptor. *J Exp Med* 181:1975–1984
- Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenbon A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M et al (2017) Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nature Immunol* 18:173–183
- Klein L, Jovanovic K (2011) Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Sem Immunol* 23:401–409
- Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B (2009) Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9:833–844
- Konkel JE, Jin W, Abbatiello B, Grainger JR, Chen W (2014) Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E465–E473
- Kurd N, Robey EA (2016) T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev* 271:114–126
- Kyewski B, Klein L (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24:571–606
- Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH (1996) Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383:81–85
- Le Borgne M, Ladi E, Dzhagalov I, Herzmark P, Liao YF, Chakraborty AK, Robey EA (2009) The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla. *Nat Immunol* 10:823–830
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA (2006) Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455–471
- Lio CW, Hsieh CS (2008) A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100–111
- Liston A, Nutsch KM, Farr AG, Lund JM, Rasmussen JP, Koni PA, Rudensky AY (2008) Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11903–11908
- Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W (2008) A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 9:632–640
- Love PE, Bhandoola A (2011) Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat Rev Immunol* 11:469–477
- Lucas B, McCarthy NI, Baik S, Cosway E, James KD, Parnell SM, White AJ, Jenkinson WE, Anderson G (2016) Control of the

- thymic medulla and its influence on alphabetaT-cell development. *Immunol Rev* 271:23–37
- Mahmud SA, Manlove LS, Schmitz HM, Xing Y, Wang Y, Owen DL, Schenkel JM, Boomer JS, Green JM, Yagita H et al (2014) Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat Immunol* 15:473–481
- Malchow S, Leventhal DS, Nishi S, Fischer BI, Shen L, Paner GP, Amit AS, Kang C, Geddes JE, Allison JP (2013) Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science* 339:1219–1224
- Malek TR, Porter BO, Codias EK, Scibelli P, Yu A (2000) Normal lymphoid homeostasis and lack of lethal autoimmunity in mice containing mature T cells with severely impaired IL-2 receptors. *J Immunol* 164:2905–2914
- Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L (2002) CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17:167–178
- Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY (2005) TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:1061–1067
- Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY (2006) Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25:441–454
- Marshall D, Sinclair C, Tung S, Seddon B (2014) Differential requirement for IL-2 and IL-15 during bifurcated development of thymic regulatory T cells. *J Immunol* 193:5525–5533
- Mazzucchelli R, Hixon JA, Spolski R, Chen X, Li WQ, Hall VL, Willette-Brown J, Hurwitz AA, Leonard WJ, Durum SK (2008) Development of regulatory T cells requires IL-7/Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112:3283–3292
- McCaughy TM, Wilken MS, Hogquist KA (2007) Thymic emigration revisited. *J Exp Med* 204:2513–2520
- McCaughy TM, Baldwin TA, Wilken MS, Hogquist KA (2008) Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med* 205:2575–2584
- Meredith M, Zemmour D, Mathis D, Benoist C (2015) Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nat Immunol* 16:942–949
- Ohigashi I, Kozai M, Takahama Y (2016) Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells. *Immunol Rev* 271:10–22
- Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, Osaki M, Tanaka Y, Yamashita R, Nakano N et al (2012) T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 37:785–799
- Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO (2010) Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 32:642–653
- Pelly VS, Kannan Y, Coomes SM, Entwistle LJ, Ruckerl D, Seddon B, MacDonald AS, McKenzie A, Wilson MS (2016) IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol* 9:1407–1417
- Pennington DJ, Silva-Santos B, Silberzahn T, Escorcio-Correia M, Woodward MJ, Roberts SJ, Smith AL, Dyson PJ, Hayday AC (2006) Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature* 444:1073–1077
- Popmihajlov Z, Xu D, Morgan H, Milligan Z, Smith KA (2012) Conditional IL-2 gene deletion: consequences for T cell proliferation. *Front Immunol* 3:102
- Ribot J, Enault G, Pilipenko S, Huchenq A, Calise M, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JPM (2007) Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J Immunol* 179:6741–6748
- Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JPM (2002) Preferential recognition of self-antigens despite normal thymic deletion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 168:1644–1648
- Romagnoli P, Ribot J, Tellier J, van Meerwijk JPM (2008) Thymic and peripheral generation of CD4+Foxp3+ regulatory T cells. In: Jiang S (ed) *Regulatory T cells and clinical application*. Springer Science+Business Media, New York, pp 29–55
- Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, Noelle RJ, Horak I (1995) Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 25:3053–3059
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10:490–500
- Shevach EM (2011) Biological functions of regulatory T cells. *Adv Immunol* 112:137–176
- Shitara S, Hara T, Liang B, Wagatsuma K, Zuklys S, Hollander GA, Nakase H, Chiba T, Tani-ichi S, Ikuta K (2013) IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCRgamma/delta+ intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 190:6173–6179
- Soper DM, Kasproicz DJ, Ziegler SF (2007) IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol* 37:1817–1826
- Stritesky GL, Xing Y, Erickson JR, Kalekar LA, Wang X, Mueller DL, Jameson SC, Hogquist KA (2013) Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:4679–4684
- Sun J, Furio L, Mecheri R, van der Does AM, Lundeberg E, Saveanu L, Chen Y, van Ender P, Agerberth B, Diana J (2015) Pancreatic beta-cells limit autoimmune diabetes via an immunoregulatory antimicrobial peptide expressed under the influence of the gut microbiota. *Immunity* 43:304–317
- Suzuki H, Kundig T, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Simard J, Ohashi P, Griesser H et al (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268(5216):1472–1476
- Suzuki H, Zhou YW, Kato M, Mak TW, Nakashima I (1999) Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med* 190:1561–1572
- Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A (2005) CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6:152–162
- Tai X, Erman B, Alag A, Mu J, Kimura M, Katz G, Guintier T, McCaughy T, Etzensperger R, Feigenbaum L et al (2013) Foxp3

- transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. *Immunity* 38:1116–1128
- Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, Kodama T, Takayanagi H (2015) *Fezf2* orchestrates a thymic program of self-antigen expression for immune tolerance. *Cell* 163:975–987
- Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA (2003) Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348–3352
- Tani-ichi S, Shimba A, Wagatsuma K, Miyachi H, Kitano S, Imai K, Hara T, Ikuta K (2013) Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:612–617
- Thiault N, Darrigues J, Adoue V, Gros M, Binet B, Perals C, Leobon B, Fazilleau N, Joffre OP, Robey EA et al (2015) Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat Immunol* 16:628–634
- Toker A, Engelbert D, Garg G, Polansky JK, Floess S, Miyao T, Baron U, Duber S, Geffers R, Giehr P et al (2013) Active demethylation of the *Foxp3* locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J Immunol* 190:3180–3188
- Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y (2004) CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 200:493–505
- Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A (1995) Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148–151
- Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA, Vegoe AL, Farrar MA (2008) IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+*Foxp3*+ regulatory T cell development. *J Immunol* 181:3285–3290
- von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519–1526
- Vuddamalay, Y., and van Meerwijk, J. (2017). CD28neg and CD28low CD8+ regulatory T cells: Of Mice and Men. *Front Immunol* 8.
- Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ (2005) Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436:1181–1185
- Weist BM, Kurd N, Boussier J, Chan SW, Robey EA (2015) Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat Immunol* 16:635–641
- Wilkinson RW, Anderson G, Owen JJ, Jenkinson EJ (1995) Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J Immunol* 155:5234–5240
- Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW (1995) Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3(4):521–530
- Wirmsberger G, Mair F, Klein L (2009) Regulatory T cells differentiation of thymocytes does not require a dedicated antigen-presenting cell but is under T cell-intrinsic developmental control. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:10278–10283
- Wolf M, Schimpl A, Hunig T (2001) Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)*CD25*(-) and CD4(+)*CD25*(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur J Immunol* 31:1637–1645
- Xu Z, Ho S, Chang CC, Zhang QY, Vasilescu ER, Vlad G, Suciuc-Foca N (2016) Molecular and cellular characterization of human CD8 T suppressor cells. *Front Immunol* 7:549
- Yamano T, Nedjic J, Hinterberger M, Steinert M, Koser S, Pinto S, Gerdes N, Lutgens E, Ishimaru N, Busslinger M et al (2015) Thymic B cells are licensed to present self antigens for central T cell tolerance induction. *Immunity* 42:1048–1061
- Yang S, Fujikado N, Kolodin D, Benoist C, Mathis D (2015) Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science* 348:589–594
- Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, Laurence A, Robinson GW, Shevach EM, Moriggi R et al (2007) Nonredundant roles for *Stat5a/b* in directly regulating *Foxp3*. *Blood* 109:4368–4375
- Yu W, Nagaoka H, Jankovic M, Misulovin Z, Suh H, Rolink A, Melchers F, Meffre E, Nussenzweig MC (1999) Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* 400:682–687
- Yue X, Trifari S, Aijo T, Tsagaratou A, Pastor WA, Zepeda-Martinez JA, Lio CW, Li X, Huang Y, Vijayanand P et al (2016) Control of *Foxp3* stability through modulation of TET activity. *J Exp Med* 213:377–397
- Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY (2010) Role of conserved non-coding DNA elements in the *Foxp3* gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463:808–812

Bibliographie

Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., et al. (2008). The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-Tolerance. *Immunity* 29, 423–437.

Aloulou, M., Carr, E.J., Gador, M., Bignon, A., Liblau, R.S., Fazilleau, N., and Linterman, M.A. (2016). Follicular regulatory T cells can be specific for the immunizing antigen and derive from naive T cells. *Nat. Commun.* 7, 1–10.

Apert, C., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M.J.P.M. (2018). IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein Cell* 9, 322–332.

Ardouin, L., Luche, H., Chelbi, R., Carpentier, S., Shawket, A., Montanana Sanchis, F., Santa Maria, C., Grenot, P., Alexandre, Y., Grégoire, C., et al. (2016). Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. *Immunity* 45, 305–318.

Arpaia, N., Green, J.A., Moltedo, B., Arvey, A., Hemmers, S., Yuan, S., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2015). A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* 162, 1078–1089.

Asano, M. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* 184, 387–396.

Aschenbrenner, K., D’Cruz, L.M., Vollmann, E.H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L.K., Rolink, A., and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 8, 351–358.

Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S.E., Perroni, L., Dagna-Bricarelli, F., Sartirana, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., et al. (2006). Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest.* 116, 1713–1722.

Bankovich, A.J., Shio, L.R., and Cyster, J.G. (2010). CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J. Biol. Chem.* 285, 22328–

Bibliographie

22337.

Bayer, A.L., Yu, A., Adeegbe, D., and Malek, T.R. (2005). Essential role for interleukin-2 for CD4+ CD25+ T regulatory cell development during the neonatal period. *J. Exp. Med.* 201, 769–777.

Bayer, A.L., Lee, J.Y., de la Barrera, A., Surh, C.D., and Malek, T.R. (2008). A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 181, 225–234.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21.

Bennstein, S.B. (2018). Unraveling natural killer T-cells development. *Front. Immunol.* 8.

Beyer, M., and Huehn, J. (2017). Epigenetic orchestration of thymic T reg cell development. *Nat. Immunol.* 18, 144–146.

Billingham, R.E., Brent, L., and Medawar, P.B. (1953). “Actively acquired tolerance” of foreign cells. *Nature* 172, 603–606.

Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory. *Immunology* 3, 3–7.

Bolotin, D.A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I.Z., Putintseva, E. V., and Chudakov, D.M. (2015). MiXCR: Software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* 12, 380–381.

Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* 7, 1092–1100.

Boursalian, T.E., Golob, J., Soper, D.M., Cooper, C.J., and Fink, P.J. (2004). Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol* 5, 418–425.

Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T.I., Yamashita, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: Signaled CD4 + 8 + thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8 + T cells. *Immunity* 13, 59–71.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E.,

Bibliographie

- Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001a). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68–73.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepker, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001b). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68–73.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280–290.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.W.J., Vegoe, A.L., Hsieh, C.S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008a). Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire. *Immunity* 28, 112–121.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.W., Vegoe, A.L., Hsieh, C.S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008b). Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28, 112–121.
- Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J.L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T.G., Wagers, A.J., Benoist, C., et al. (2013). A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* 155, 1282–1295.
- Busse, D., de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A., and Höfer, T. (2010). Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3058–3063.
- Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 119–130.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity* 27, 635–646.
- Caramalho, I., Nunes-Silva, V., Pires, A.R., Mota, C., Pinto, A.I., Nunes-Cabaco, H., Foxall, R.B., Sousa, A.E., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R.B., et al. (2015). Human regulatory T-cell development is dictated by

Bibliographie

- Interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus. *J Autoimmun* 56, 98–110.
- Cekic, C., and Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 177–192.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875–1886.
- Chen, X., Subleski, J.J., Kopf, H., Howard, O.M.Z., Männel, D.N., and Oppenheim, J.J. (2008). Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells . *J. Immunol.* 180, 6467–6471.
- Chinen, T., Kannan, A.K., Levine, A.G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. *Nat. Immunol.* 17, 1322–1333.
- Chorro, L., Suzuki, M., Chin, S.S., Williams, T.M., Snapp, E.L., Odagiu, L., Labrecque, N., and Lauvau, G. (2018). Interleukin 2 modulates thymic-derived regulatory T cell epigenetic landscape. *Nat. Commun.* 9, 1–17.
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2012). PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue T reg cells. *Nature* 486, 549–553.
- Cohen, J.L., and Wood, K.J. (2017). TNFR2: The new Treg switch? *Oncoimmunology* 7, 1–6.
- Coquet, J.M., Ribot, J.C., Babala, N., Middendorp, S., van der Horst, G., Xiao, Y., Neves, J.F., Fonseca-Pereira, D., Jacobs, H., Pennington, D.J., et al. (2013). Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote cd4⁺foxp3⁺ regulatory t cell development via the cd27-cd70 pathway. *J. Exp. Med.* 210, 715–728.
- Cowan, J.E., McCarthy, N.I., Parnell, S.M., White, A.J., Bacon, A., Serge, A., Irla, M., Lane, P.J.L., Jenkinson, E.J., Jenkinson, W.E., et al. (2014). Differential Requirement for CCR4 and CCR7 during the Development of Innate and Adaptive $\alpha\beta$ T Cells in the Adult Thymus. *J. Immunol.* 193.

Bibliographie

Cowan, J.E., Jenkinson, W.E., and Anderson, G. (2015). Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant $\gamma\delta$ T cells, and invariant NKT cells: What we learn from intrathymic migration. *Eur. J. Immunol.* *45*, 652–660.

Cowan, J.E., McCarthy, N.I., and Anderson, G. (2016). CCR7 Controls Thymus Recirculation, but Not Production and Emigration, of Foxp3(+) T Cells. *Cell Rep* *14*, 1041–1048.

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-Ichi, S., and Ikuta, K. (2014). Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1915–1920.

D’Cruz, L.M., and Klein, L. (2005). Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat. Immunol.* *6*, 1152–1159.

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

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

DiPaolo, R.J., Glass, D.D., Bijwaard, K.E., and Shevach, E.M. (2005). CD4 + CD25 + T Cells Prevent the Development of Organ-Specific Autoimmune Disease by Inhibiting the Differentiation of Autoreactive Effector T Cells . *J. Immunol.* *175*, 7135–7142.

Dombrowski, Y., O’Hagan, T., Dittmer, M., Penalva, R., Mayoral, S.R., Bankhead, P., Fleville, S., Eleftheriadis, G., Zhao, C., Naughton, M., et al. (2017). Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat. Neurosci.* *20*, 674–680.

Dudda, J.C., Perdue, N., Bachtanian, E., and Campbell, D.J. (2008). Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *J. Exp. Med.* *205*, 1559–1585.

Durand, A., Audemard-Verger, A., Guichard, V., Mattiuz, R., Delpoux, A., Hamon, P., Bonilla, N., Rivière, M., Delon, J., Martin, B., et al. (2018). Profiling the lymphoid-resident T cell pool reveals modulation by age and microbiota. *Nat. Commun.* *9*, 1–12.

Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004).

Bibliographie

Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J. Exp. Med.* 200, 277–285.

Fahl, S.P., Coffey, F., and Wiest, D.L. (2014). Origins of $\gamma\delta$ T Cell Effector Subsets: A Riddle Wrapped in an Enigma. *J. Immunol.* 193, 4289–4294.

Fan, M.Y., Low, J.S., Tanimine, N., Finn, K.K., Priyadharshini, B., Germana, S.K., Kaech, S.M., and Turka, L.A. (2018). Differential Roles of IL-2 Signaling in Developing versus Mature Tregs. *Cell Rep.* 25, 1204-1213.e4.

Fazilleau, N., Delarasse, C., Sweenie, C.H., Anderton, S.M., Fillatreau, S., Lemonnier, F.A., Pham-Dinh, D., and Kanellopoulos, J.M. (2006). Persistence of autoreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell repertoires in MOG-expressing mice. *Eur. J. Immunol.* 36, 533–543.

Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* 10, 375–384.

Feng, Y., van der Veen, J., Shugay, M., Putintseva, E. V., Osmanbeyoglu, H.U., Dikiy, S., Hoyos, B.E., Moltedo, B., Hemmers, S., Treuting, P., et al. (2015a). A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature* 528, 132–136.

Feng, Y., van der Veen, J., Shugay, M., Putintseva, E. V., Osmanbeyoglu, H.U., Dikiy, S., Hoyos, B.E., Moltedo, B., Hemmers, S., Treuting, P., et al. (2015b). A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature*.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15, 930–939.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330–336.

Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005a). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202, 901–906.

Bibliographie

- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005b). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6, 1142–1151.
- Freyschmidt, E.-J., Mathias, C.B., Diaz, N., MacArthur, D.H., Laouar, A., Manjunath, N., Hofer, M.D., Wurbel, M.-A., Campbell, J.J., Chatila, T.A., et al. (2010). Skin Inflammation Arising from Cutaneous Regulatory T Cell Deficiency Leads to Impaired Viral Immune Responses. *J. Immunol.* 185, 1295–1302.
- Friedline, R.H., Brown, D.S., Nguyen, H., Kornfeld, H., Lee, J., Zhang, Y., Appleby, M., Der, S.D., Kang, J., and Chambers, C.A. (2009). CD4 + regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J. Exp. Med.* 206, 421–434.
- Furukawa, A., Wisel, S.A., and Tang, Q. (2016). Impact of Immune-Modulatory Drugs on Regulatory T Cell. *Transplantation* 100, 2288–2300.
- Gagliani, N., Magnani, C.F., Huber, S., Gianolini, M.E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D.R., Bulfone, A., Trentini, F., et al. (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* 19, 739–746.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med.* 200, 1039–1049.
- Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E.L., Greenberg, P.D., Ochs, H.D., and Rudensky, A.Y. (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6659–6664.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4 + CD25 + Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism . *J. Immunol.* 174, 1783–1786.
- Haas, M., Dimmler, A., Hohenberger, W., Grabenbauer, G.G., Niedobitek, G., and Distel, L. V. (2009). Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BMC Gastroenterol.* 9, 1–10.
- Han, S.J., Toker, A., Liu, Z.Q., and Ohashi, P.S. (2019). Turning the tide against regulatory T cells.

Bibliographie

Front. Oncol. 9, 1–16.

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

Hassler, T., Urmann, E., Teschner, S., Federle, C., Dileepan, T., Schober, K., Jenkins, M.K., Busch, D.H., Hinterberger, M., and Klein, L. (2019). Inventories of naive and tolerant mouse CD4 T cell repertoires reveal a hierarchy of deleted and diverted T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201907615.

Hauri-Hohl, M., Zuklys, S., Hollander, G.A., and Ziegler, S.F. (2014). A regulatory role for TGF-beta signaling in the establishment and function of the thymic medulla. *Nat Immunol* 15, 554–561.

Vander Heiden, J.A., Yaari, G., Uduman, M., Stern, J.N.H., O'connor, K.C., Hafler, D.A., Vigneault, F., and Kleinstein, S.H. (2014). PRESTO: A toolkit for processing high-throughput sequencing raw reads of lymphocyte receptor repertoires. *Bioinformatics* 30.

Hemmers, S., Schizas, M., Azizi, E., Dikiy, S., Zhong, Y., Feng, Y., Altan-Bonnet, G., and Rudensky, A.Y. (2019). IL-2 production by self-reactive CD4 thymocytes scales regulatory T cell generation in the thymus. *J. Exp. Med.* jem.20190993.

Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., et al. (2008). The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. *Immunity* 29, 438–450.

Hill, J.A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2007). Foxp3 Transcription-Factor-Dependent and -Independent Regulation of the Regulatory T Cell Transcriptional Signature. *Immunity* 27, 786–800.

Hinterberger, M., Aichinger, M., Da Costa, O.P., Voehringer, D., Hoffmann, R., and Klein, L. (2010). Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4 + T cell tolerance. *Nat. Immunol.* 11, 512–519.

Hori, S. (2011). Regulatory T cell plasticity: Beyond the controversies. *Trends Immunol.* 32, 295–300.

Bibliographie

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* (80-.). *299*, 1057–1061.

Howie, D., Waldmann, H., and Cobbold, S.P. (2014). Nutrient sensing via mTOR in T cells maintains a tolerogenic microenvironment. *Front. Immunol.* *5*, 1–14.

Hsieh, C.S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* *21*, 267–277.

Hsieh, C.S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* *7*, 401–410.

Hu, D.Y., Yap, J.Y., Wirasinha, R.C., Howard, D.R., Goodnow, C.C., and Daley, S.R. (2016). A timeline demarcating two waves of clonal deletion and Foxp3 upregulation during thymocyte development. *Immunol Cell Biol* *94*, 357–366.

Hu, Z., Li, Y., Van Nieuwenhuijze, A., Selden, H.J., Jarrett, A.M., Sorace, A.G., Yankeelov, T.E., Liston, A., and Ehrlich, L.I.R. (2017). CCR7 Modulates the Generation of Thymic Regulatory T Cells by Altering the Composition of the Thymic Dendritic Cell Compartment. *Cell Rep.* *21*, 168–180.

Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* *21*, 503–513.

Hubert, F.X., Kinkel, S.A., Davey, G.M., Phipson, B., Mueller, S.N., Liston, A., Proietto, A.I., Cannon, P.Z., Forehan, S., Smyth, G.K., et al. (2011). Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* *118*, 2462–2472.

Huehn, J., Polansky, J.K., and Hamann, A. (2009). Epigenetic control of FOXP3 expression: The key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 83–89.

Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I.R., Hubert, F.X., Scott, H.S., Takahama, Y., Holländer, G.A., et al. (2008). Autoantigen-Specific Interactions with CD4+ Thymocytes Control Mature Medullary Thymic Epithelial Cell Cellularity. *Immunity* *29*, 451–463.

Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X.F., Gilliet, M., and Liu, Y.J. (2008). Two Functional Subsets of FOXP3 + Regulatory T Cells in Human Thymus and Periphery. *Immunity* *28*, 870–880.

Bibliographie

Jia, X., Wang, B., Zhai, T., Yao, Q., Li, Q., and Zhang, J. (2018). T cell receptor revision and immune repertoire changes in autoimmune diseases. *Clin. Immunol.* #pagerange#.

Joller, N., Lozano, E., Burkett, P.R., Patel, B., Xiao, S., Zhu, C., Xia, J., Tan, T.G., Sefik, E., Yajnik, V., et al. (2014). Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* 40, 569–581.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285–1294.

Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Holenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2, 301–306.

Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F.F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30, 531–564.

Kakugawa, K., Kojo, S., Tanaka, H., Seo, W., Endo, T.A., Kitagawa, Y., Muroi, S., Tenno, M., Yasmin, N., Kohwi, Y., et al. (2017). Essential Roles of SATB1 in Specifying T Lymphocyte Subsets. *Cell Rep.* 19, 1176–1188.

Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30.

Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 771–780.

Kerdiles, Y.M., Stone, E.L., Beisner, D.L., McGargill, M.A., Ch'en, I.L., Stockmann, C., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (2010). Foxo Transcription Factors Control Regulatory T Cell Development and Function. *Immunity* 33, 890–904.

Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. (2017). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+T regulatory cells. *J. Immunol.* 198, 993–998.

Kieback, E., Hilgenberg, E., Stervbo, U., Lampropoulou, V., Shen, P., Bunse, M., Jaimes, Y., Boudinot,

Bibliographie

- P., Radbruch, A., Klemm, U., et al. (2016). Thymus-Derived Regulatory T Cells Are Positively Selected on Natural Self-Antigen through Cognate Interactions of High Functional Avidity. *Immunity* 44, 1114–1126.
- Kim, H.P., and Leonard, W.J. (2007). CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: A role for DNA methylation. *J. Exp. Med.* 204, 1543–1551.
- Kitagawa, Y., and Sakaguchi, S. (2017). Molecular control of regulatory T cell development and function. *Curr. Opin. Immunol.* 49, 64–70.
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., Kidani, Y., Vandenbon, A., Hirota, K., Kawakami, R., Yasuda, K., Motooka, D., Nakamura, S., Kondo, M., et al. (2017). Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* 18, 173–183.
- Klein, L., and Jovanovic, K. (2011). Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Semin. Immunol.* 23, 401–409.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 833–844.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 14, 377–391.
- Klein, L., Robey, E.A., and Hsieh, C.S. (2019). Central CD4 + T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 7–18.
- Koch, U., and Radtke, F. (2011). Mechanisms of T Cell Development and Transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 539–562.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* 10, 595–602.
- Kondo, M., Tanaka, Y., Kuwabara, T., Naito, T., Kohwi-Shigematsu, T., and Watanabe, A. (2016). Correction: SATB1 Plays a Critical Role in Establishment of Immune Tolerance. *J. Immunol.* 196, 3495–3495.
- Konkel, J.E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J.R., and Chen, W. (2014). Thymocyte apoptosis drives

Bibliographie

the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E465-73.

Konkel, J.E., Zhang, D., Zanvit, P., Chia, C., Zangarle-Murray, T., Jin, W., Wang, S., and Chen, W.J. (2017). Transforming Growth Factor- β Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* *46*, 660–674.

Ku, M., Chang, S.-E., Hernandez, J., Abadejos, J.R., Sabouri-Ghomi, M., Muenchmeier, N.J., Schwarz, A., Valencia, A.M., and Kirak, O. (2016). Nuclear transfer nTreg model reveals fate-determining TCR- β and novel peripheral nTreg precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E2316--E2325.

Kurobe, H., Liu, C., Ueno, T., Saito, F., Ohigashi, I., Seach, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Kitagawa, T., Lipp, M., et al. (2006). CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* *24*, 165–177.

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

Leclerc, M., Naserian, S., Pilon, C., Thiolat, A., Martin, G.H., Pouchy, C., Dominique, C., Belkacemi, Y., Charlotte, F., Maury, S., et al. (2016). Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* *128*, 1651–1659.

Lee, H.M., and Hsieh, C.-S. (2009). Rare Development of Foxp3 + Thymocytes in the CD4 + CD8 + Subset. *J. Immunol.* *183*, 2261–2266.

Lee, H.M., Bautista, J.L., Scott-Browne, J., Mohan, J.F., and Hsieh, C.S. (2012). A broad range of self-reactivity drives thymic regulatory T cell selection to limit responses to self. *Immunity* *37*, 475–486.

Lee, J.H., Kang, S.G., and Kim, C.H. (2007). FoxP3 + T Cells Undergo Conventional First Switch to Lymphoid Tissue Homing Receptors in Thymus but Accelerated Second Switch to Nonlymphoid Tissue Homing Receptors in Secondary Lymphoid Tissues. *J. Immunol.* *178*, 301–311.

Legoux, F.P., Lim, J.B., Cauley, A.W., Dikiy, S., Ertelt, J., Mariani, T.J., Sparwasser, T., Way, S.S., and Moon, J.J. (2015). CD4+ T Cell Tolerance to Tissue-Restricted Self Antigens Is Mediated by Antigen-Specific Regulatory T Cells Rather Than Deletion. *Immunity* *43*, 896–908.

Levine, A.G., Arvey, A., Jin, W., and Rudensky, A.Y. (2014). Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat Immunol* *15*, 1070–1078.

Bibliographie

- Levine, J.H., Simonds, E.F., Bendall, S.C., Davis, K.L., Amir, E.A.D., Tadmor, M.D., Litvin, O., Fienberg, H.G., Jager, A., Zunder, E.R., et al. (2015). Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell* *162*, 184–197.
- Li, M.O., and Rudensky, A.Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 220–233.
- Li, C., DiSpirito, J.R., Zemmour, D., Spallanzani, R.G., Kuswanto, W., Benoist, C., and Mathis, D. (2018a). TCR Transgenic Mice Reveal Stepwise, Multi-site Acquisition of the Distinctive Fat-Treg Phenotype. *Cell* *174*, 285-299.e12.
- Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* *206*, 607–622.
- Li, J., Tan, J., Martino, M.M., and Lui, K.O. (2018b). Regulatory T-cells: Potential regulator of tissue repair and regeneration. *Front. Immunol.* *9*, 1–11.
- Li, M.O., Sanjabi, S., and Flavell, R.A. (2006). Transforming Growth Factor- β Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms. *Immunity* *25*, 455–471.
- Li, Y., Lu, Y., Wang, S., Han, Z., Zhu, F., Ni, Y., Liang, R., Zhang, Y., Leng, Q., Wei, G., et al. (2016). USP21 prevents the generation of T-helper-1-like Treg cells. *Nat. Commun.* *7*, 1–10.
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E.J., Shi, Z., and Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* *47*, W199–W205.
- Lin, W., Haribhai, D., Relland, L.M., Truong, N., Carlson, M.R., Williams, C.B., and Chatila, T.A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat. Immunol.* *8*, 359–368.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* *17*, 975–982.
- Lio, C.W.J., and Hsieh, C.S. (2008). A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* *28*, 100–111.

Bibliographie

- Lio, C.-W.J., Dodson, L.F., Deppong, C.M., Hsieh, C.-S., and Green, J.M. (2010). CD28 Facilitates the Generation of Foxp3 – Cytokine Responsive Regulatory T Cell Precursors . *J. Immunol.* *184*, 6007–6013.
- Lippens, C., Duraes, F. V., Dubrot, J., Brighthouse, D., Lacroix, M., Irla, M., Aubry-Lachainaye, J.P., Reith, W., Mandl, J.N., and Hugues, S. (2016). IDO-orchestrated crosstalk between pDCs and Tregs inhibits autoimmunity. *J. Autoimmun.* *75*, 39–49.
- Liston, A., Nutsch, K.M., Farr, A.G., Lund, J.M., Rasmussen, J.P., Koni, P.A., and Rudensky, A.Y. (2008). Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 11903–11908.
- Liu, B., Tahk, S., Yee, K.M., Fan, G., and Shuai, K. (2010). The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. *Science (80-)*. *330*, 521–525.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Barbara, B.F., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1701–1711.
- Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A.B., Perruche, S., and Chen, W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* *9*, 632–640.
- Lopes, N., Sergé, A., Ferrier, P., and Irla, M. (2015). Thymic crosstalk coordinates medulla organization and T-cell tolerance induction. *Front. Immunol.* *6*.
- Lopes, N., Charaix, J., Cédile, O., Sergé, A., and Irla, M. (2018). Lymphotoxin α fine-tunes T cell clonal deletion by regulating thymic entry of antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* *9*, 1–16.
- Lu, L., Barbi, J., and Pan, F. (2017). The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 703–717.
- Luo, C.T., and Li, M.O. (2013). Transcriptional control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol.* *34*, 531–539.
- Ma, A., Koka, R., and Burkett, P. (2006). Diverse Functions of Il-2, Il-15, and Il-7 in Lymphoid Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 657–679.

Bibliographie

Maceiras, A.R., Almeida, S.C.P., Mariotti-Ferrandiz, E., Chaara, W., Jebbawi, F., Six, A., Hori, S., Klatzmann, D., Faro, J., and Graca, L. (2017). T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nat. Commun.* 8, 1–12.

Mahmud, S.A., Manlove, L.S., Schmitz, H.M., Xing, Y., Wang, Y., Owen, D.L., Schenkel, J.M., Boomer, J.S., Green, J.M., Yagita, H., et al. (2014). Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat Immunol* 15, 473–481.

Malchow, S., Leventhal, D.S., Nishi, S., Fischer, B.I., Shen, L., Paner, G.P., Amit, A.S., Kang, C., Geddes, J.E., Allison, J.P., et al. (2013). Aire-Dependent Thymic Development of Tumor-Associated Regulatory T Cells. *Science* 339, 1219–1224.

Malek, T.R. (2008). The Biology of Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 453–479.

Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25, 441–454.

Marshall, D., Sinclair, C., Tung, S., and Seddon, B. (2014). Differential requirement for IL-2 and IL-15 during bifurcated development of thymic regulatory T cells. *J Immunol* 193, 5525–5533.

Martin, B., Auffray, C., Delpoux, A., Pommier, A., Durand, A., Charvet, C., Yakonowsky, P., de Boysson, H., Bonilla, N., Audemard, A., et al. (2013). Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat Commun* 4, 2209.

Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355–360.

Matzinger, P. (1994). TOLERANCE , DANGER , AND THE EXTENDED FAMILY *. 991–1045.

McCarthy, D.J., Campbell, K.R., Lun, A.T.L., and Wills, Q.F. (2017). Scater: Pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics* 33, 1179–1186.

McCaughy, T.M., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2007). Thymic emigration revisited. *J Exp Med*

Bibliographie

204, 2513–2520.

McCaughy, T.M., Baldwin, T.A., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2008). Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J. Exp. Med.* 205, 2575–2584.

Van Meerwijk, J.P.M., and Germain, R.N. (1993). Development of mature CD8+ thymocytes: Selection rather than instruction? *Science (80-.)*. 261, 911–915.

Van Meerwijk, J.P.M., Marguerat, S., Lees, R.K., Germain, R.N., Fowlkes, B.J., and MacDonald, H.R. (1997). Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J. Exp. Med.* 185, 377–383.

Meng, X., Yang, J., Dong, M., Zhang, K., Tu, E., Gao, Q., Chen, W., Zhang, C., and Zhang, Y. (2016). Regulatory T cells in cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Cardiol.* 13, 167–179.

Miller, J.F.A.P. (1961). Immunological Function of the Thymus. *Lancet* 278, 748–749.

Miller, J.F.A.P. (1962). Immunological Significance of the Non-Antigenicity of Synthetic. *Nature* 195, 1318–1319.

Miragaia, R.J., Gomes, T., Chomka, A., Jardine, L., Riedel, A., Hegazy, A.N., Whibley, N., Tucci, A., Chen, X., Lindeman, I., et al. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Regulatory T Cells Reveals Trajectories of Tissue Adaptation. *Immunity* 50, 493-504.e7.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* 30, 899–911.

Mizui, M., and Kikutani, H. (2008). Neuropilin-1: The Glue between Regulatory T Cells and Dendritic Cells? *Immunity* 28, 302–303.

Modigliani, Y., Thomas-Vaslin, V., Bandeira, A., Coltey, M., Le Douarin, N.M., Coutinho, A., and Salaün, J. (1995). Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7555–7559.

Moran, A.E., Holzapfel, K.L., Xing, Y., Cunningham, N.R., Maltzman, J.S., Punt, J., and Hogquist, K.A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* 208, 1279–1289.

Bibliographie

- Morikawa, H., and Sakaguchi, S. (2014). Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev* 259, 192–205.
- Motea, E.A., and Berdis, A.J. (2010). Terminal deoxynucleotidyl transferase: The story of a misguided DNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 1151–1166.
- Natalia Bowakim, Valérie Acolty, Maxime Dhainaut, Hideo Yagita, Guillaume Oldenhove, O.L. and M.M. (2018). Role of the CD27/CD70 pathway in regulatory T cell function. *J Immunol* 200 n.
- Nieuwenhuis, P., Wubbena, A.S., and Karrenbeld, A. (1988). Transcapsular Route : 9.
- Nikolich-Žugich, J., Slifka, M.K., and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 123–132.
- Nishizuka, Y., and Cancer, A. (1981). Experimental autoimmune. 425–434.
- Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969). Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice. *Science* (80-.). 166, 753–755.
- Nitta, T., Nitta, S., Yu, L., Lipp, M., and Takahama, Y. (2009). CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17129–17133.
- Oh, H., Grinberg-Bleyer, Y., Liao, W., Maloney, D., Wang, P., Wu, Z., Wang, J., Bhatt, D.M., Heise, N., Schmid, R.M., et al. (2017). An NF-κB Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* 47, 450-465.e5.
- Oh, J., Wu, N., Barczak, A.J., Barbeau, R., Erle, D.J., and Shin, J.-S. (2018). CD40 Mediates Maturation of Thymic Dendritic Cells Driven by Self-Reactive CD4 + Thymocytes and Supports Development of Natural Regulatory T Cells . *J. Immunol.* 200, 1399–1412.
- Ohki, H., Martin, C., Corbel, C., Coltey, M., and Le Douarin, N.M. (1987). Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds. *Science* (80-.). 237, 1032–1035.
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., et al. (2012). T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development.

Bibliographie

Immunity 37, 785–799.

Oukka, M., Kosmatopoulos, K., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., and Tanaka, Y. (1996). Medullary thymic epithelial cells induce tolerance to intracellular proteins. *J. Immunol.* 156, 968–975.

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

Owen, D.L., Mahmud, S.A., Vang, K.B., Kelly, R.M., Blazar, B.R., Smith, K.A., and Farrar, M.A. (2018). Identification of Cellular Sources of IL-2 Needed for Regulatory T Cell Development and Homeostasis. *J. Immunol.* 200, 3926–3933.

Owen, D.L., Mahmud, S.A., Sjaastad, L.E., Williams, J.B., Spanier, J.A., Simeonov, D.R., Ruscher, R., Huang, W., Proekt, I., Miller, C.N., et al. (2019). Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nat. Immunol.* 20, 195–205.

Pandiyani, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 8, 1353–1362.

Panduro, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2016). Tissue Tregs. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 609–633.

Paterson, A.M., Lovitch, S.B., Sage, P.T., Juneja, V.R., Lee, Y., Trombley, J.D., Arancibia-Cárcamo, C. V., Sobel, R.A., Rudensky, A.Y., Kuchroo, V.K., et al. (2015). Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J. Exp. Med.* 212, 1603–1621.

Pennington, D.J., Silva-Santos, B., Silberzahn, T., Escorcio-Correia, M., Woodward, M.-J., Roberts, S.-J., Smith, A.L., Dyson, J., Hayday, A.C., and In (2006). Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature* 444, 1073–1077.

Perry, J.S., and Hsieh, C.S. (2016). Development of T-cell tolerance utilizes both cell-autonomous and cooperative presentation of self-antigen. *Immunol Rev* 271, 141–155.

Perry, J.S.A., Lio, C.W.J., Kau, A.L., Nutsch, K., Yang, Z., Gordon, J.I., Murphy, K.M., and Hsieh, C.S. (2014). Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus. *Immunity* 41, 414–426.

Perry, J.S.A., Russler-Germain, E. V., Zhou, Y.W., Purtha, W., Cooper, M.L., Choi, J., Schroeder, M.A.,

Bibliographie

Salazar, V., Egawa, T., Lee, B.C., et al. (2018). CD36 Mediates Cell-Surface Antigens to Promote Thymic Development of the Regulatory T Cell Receptor Repertoire and Allo-tolerance. *Immunity* *48*, 923-936.e4.

Picca, C.C., Larkin, J., Boesteanu, A., Lerman, M.A., Rankin, A.L., and Caton, A.J. (2006). Role of TCR specificity in CD4+CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol. Rev.* *212*, 74-85.

Proietto, A.I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., et al. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 19869-19874.

Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., and Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Cell Death Differ.* *14*, 2076-2084.

Ribot, J., Enault, G., Pilipenko, S., Huchenq, A., Calise, M., Hudrisier, D., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P. (2007). Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J Immunol* *179*, 6741-6748.

Ribot, J.C., deBarros, A., Pang, D.J., Neves, J.F., Peperzak, V., Roberts, S.J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A.C., Pennington, D.J., et al. (2009). CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- γ - and interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nat. Immunol.* *10*, 427-436.

Rochman, Y., Spolski, R., and Leonard, W.J. (2009). New insights into the regulation of T cells by γc family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 480-490.

Romagnoli, P., and Van Meerwijk, J.P.M. (2010). Thymic selection and lineage commitment of CD4 + Foxp3 + regulatory t lymphocytes (Elsevier Inc.).

Romagnoli, P., Hudrisier, D., and van Meerwijk, J.P. (2002). Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *J Immunol* *168*, 1644-1648.

Romano, M., Fanelli, G., Albany, C.J., Giganti, G., and Lombardi, G. (2019). Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front. Immunol.* *10*.

Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., et al. (2008). Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits

Bibliographie

Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* 28, 546–558.

Rudra, D., Deroos, P., Chaudhry, A., Niec, R.E., Arvey, A., Samstein, R.M., Leslie, C., Shaffer, S.A., Goodlett, D.R., and Rudensky, A.Y. (2012). Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat. Immunol.* 13, 1010–1019.

S Sakaguchi, N Sakaguchi, M Asano, M.I. and M.T. (1995). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25). *J. Immunol.* 1–6.

Saito, T., Nishikawa, H., Wada, H., Nagano, Y., Sugiyama, D., Atarashi, K., Maeda, Y., Hamaguchi, M., Ohkura, N., Sato, E., et al. (2016). Two FOXP3 + CD4 + T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat. Med.* 22, 679–684.

Sakaguchi, S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101, 455–458.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212, 8–27.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787.

Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431–440.

Salou, M., Legoux, F., Gilet, J., Darbois, A., Du Halgouet, A., Alonso, R., Richer, W., Goubet, A.G., Daviaud, C., Menger, L., et al. (2019). A common transcriptomic program acquired in the thymus defines tissue residency of MAIT and NKT subsets. *J. Exp. Med.* 216, 133–151.

Samstein, R.M., Arvey, A., Josefowicz, S.Z., Peng, X., Reynolds, A., Sandstrom, R., Neph, S., Sabo, P., Kim, J.M., Liao, W., et al. (2012). Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* 151, 153–166.

Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition.

Bibliographie

Immunity 28, 402–413.

Sather, B.D., Treuting, P., Perdue, N., Miazgowiec, M., Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y., and Campbell, D.J. (2007). Altering the distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J. Exp. Med.* 204, 1335–1347.

Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., et al. (2008). T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7797–7802.

Schaer, D.A., Murphy, J.T., and Wolchok, J.D. (2012). Modulation of GITR for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 217–224.

Scheffold, A., Hühn, J., and Höfer, T. (2005). Regulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity: It takes (IL-)two to tango. *Eur. J. Immunol.* 35, 1336–1341.

Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Fröhlich, A., Adelman, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., et al. (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 513, 564–568.

Schlenner, S.M., Madan, V., Busch, K., Tietz, A., Läufler, C., Costa, C., Blum, C., Fehling, H.J., and Rodewald, H.R. (2010). Fate Mapping Reveals Separate Origins of T Cells and Myeloid Lineages in the Thymus. *Immunity* 32, 426–436.

Schorle, H., Holtschke, T., Hünig, T., Schimpl, A., and Horak, I. (1991). Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352, 621–624.

Schuster, M., Plaza-Sirvent, C., Matthies, A.-M., Heise, U., Jeron, A., Bruder, D., Visekruna, A., Huehn, J., and Schmitz, I. (2017). c-REL and IκB NS Govern Common and Independent Steps of Regulatory T Cell Development from Novel CD122-Expressing Pre-Precursors. *J. Immunol.* 199, 920–930.

Schuster, M., Plaza-Sirvent, C., Visekruna, A., Huehn, J., and Schmitz, I. (2019). Generation of Foxp3⁺CD25[–] Regulatory T-Cell Precursors Requires c-Rel and IκBNS. *Front. Immunol.* 10, 1–6.

Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2007). Finding a way out: Lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* 8, 1295–1301.

Scott-Browne, J.P., Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Ishida-Tsubota, K., Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y.,

Bibliographie

Bevan, M.J., and Urdahl, K.B. (2007). Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J. Exp. Med.* 204, 2159–2169.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201, 723–735.

Shevach, E.M., and Thornton, A.M. (2014). *t*Tregs, *p*Tregs, and *i*Tregs: similarities and differences. *Immunol Rev* 259, 88–102.

Shitara, K., and Nishikawa, H. (2016). Regulatory T cells: A potential target in cancer immunotherapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1417, 104–115.

Shugay, M., Bagaev, D. V., Turchaninova, M.A., Bolotin, D.A., Britanova, O. V., Putintseva, E. V., Pogorelyy, M. V., Nazarov, V.I., Zvyagin, I. V., Kirgizova, V.I., et al. (2015). VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Comput. Biol.* 11, 1–16.

Simons, D.M., Picca, C.C., Oh, S., Perng, O.A., Aitken, M., Erikson, J., and Caton, A.J. (2010). How specificity for self-peptides shapes the development and function of regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 88, 1099–1107.

Singer, A., Adoro, S., and Park, J.H. (2008). Lineage fate and intense debate: Myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 788–801.

Smigielski, K.S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K.R., Dudda, J.C., Klonowski, K.D., and Campbell, D.J. (2014). CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J Exp Med* 211, 121–136.

Soper, D.M., Kasprowitz, D.J., and Ziegler, S.F. (2007). IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol* 37, 1817–1826.

St-Pierre, C., Trofimov, A., Brochu, S., Lemieux, S., and Perreault, C. (2015). Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol.* 195, 498–506.

Stritesky, G.L., Xing, Y., Erickson, J.R., Kalekar, L.A., Wang, X., Mueller, D.L., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2013). Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T

Bibliographie

cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4679–4684.

Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* *177*, 1888–1902.e21.

Sullivan, J.M., Höllbacher, B., and Campbell, D.J. (2019). Cutting Edge: Dynamic Expression of Id3 Defines the Stepwise Differentiation of Tissue-Resident Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *202*, 31–36.

Sullivan, K.E., McDonald-McGinn, D., and Zackai, E.H. (2002). CD4⁺ CD25⁺ T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *9*, 1129–1131.

Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *203*, 505–511.

Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* *6*, 152–162.

Tai, X., Erman, B., Alag, A., Mu, J., Kimura, M., Katz, G., Guintert, T., McCaughtry, T., Etzensperger, R., Feigenbaum, L., et al. (2013a). Foxp3 Transcription Factor Is Proapoptotic and Lethal to Developing Regulatory T Cells unless Counterbalanced by Cytokine Survival Signals. *Immunity* *38*, 1116–1128.

Tai, X., Erman, B., Alag, A., Mu, J., Kimura, M., Katz, G., Guintert, T., McCaughtry, T., Etzensperger, R., Feigenbaum, L., et al. (2013b). Foxp3 transcription factor is proapoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. *Immunity* *38*, 1116–1128.

Takaba, H., and Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* *38*, 805–816.

Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., and Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* *163*, 975–987.

Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L.C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K., and Ishii, N.

Bibliographie

(2004). Distinct Roles for the OX40-OX40 Ligand Interaction in Regulatory and Nonregulatory T Cells. *J. Immunol.* *172*, 3580–3589.

Tanaka, S., Pflieger, C., Lai, J.F., Roan, F., Sun, S.C., and Ziegler, S.F. (2018). KAP1 Regulates Regulatory T Cell Function and Proliferation in Both Foxp3-Dependent and -Independent Manners. *Cell Rep.* *23*, 796–807.

Tang, Q., and Krummel, M.F. (2006). Imaging the function of regulatory T cells in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 496–502.

Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Bluestone, J.A. (2003). Cutting Edge: CD28 Controls Peripheral Homeostasis of CD4 + CD25 + Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *171*, 3348–3352.

Taniuchi, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* *36*, 579–601.

Thangada, S., Khanna, K.M., Blaho, V.A., Oo, M.L., Im, D.S., Guo, C., Lefrancois, L., and Hla, T. (2010). Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. *J. Exp. Med.* *207*, 1475–1483.

Thiault, N., Darrigues, J., Adoue, V.V., Gros, M., Binet, B.B., Perals, C., Leobon, B., Fazilleau, N., Joffre, O.P., Robey, E.A., et al. (2015). Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.* *16*, 628–634.

Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* *9*, 194–202.

Tsuda, S., Nakashima, A., Shima, T., and Saito, S. (2019). New paradigm in the role of regulatory T cells during pregnancy. *Front. Immunol.* *10*, 1–11.

Tuovinen, H., Kekäläinen, E., Rossi, L.H., Puntila, J., and Arstila, T.P. (2008). Response to Comment on “Cutting Edge: Human CD4 – CD8 – Thymocytes Express FOXP3 in the Absence of a TCR” . *J. Immunol.* *181*, 858–858.

Ulyanchenko, S., O'Neill, K.E., Medley, T., Farley, A.M., Vaidya, H.J., Cook, A.M., Blair, N.F., and Blackburn, C.C. (2016). Identification of a Bipotent Epithelial Progenitor Population in the Adult

Bibliographie

Thymus. *Cell Rep.* *14*.

Vahl, J.C., Drees, C., Heger, K., Heink, S., Fischer, J.C., Nedjic, J., Ohkura, N., Morikawa, H., Poeck, H., Schallenberg, S., et al. (2014). Continuous T Cell Receptor Signals Maintain a Functional Regulatory T Cell Pool. *Immunity* *41*, 722–736.

Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* *181*, 3285–3290.

Vasanthakumar, A., Liao, Y., Teh, P., Pascutti, M.F., Oja, A.E., Garnham, A.L., Gloury, R., Tempany, J.C., Sidwell, T., Cuadrado, E., et al. (2017). The TNF Receptor Superfamily-NF- κ B Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *Cell Rep.* *20*, 2906–2920.

Verhagen, J., Genolet, R., Britton, G.J., Stevenson, B.J., Sabatos-Peyton, C.A., Dyson, J., Luescher, I.F., and Wraith, D.C. (2013). CTLA-4 controls the thymic development of both conventional and regulatory T cells through modulation of the TCR repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E221–30.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 523–532.

Weinberg, S.E., Singer, B.D., Steinert, E.M., Martinez, C.A., Mehta, M.M., Martínez-Reyes, I., Gao, P., Helmin, K.A., Abdala-Valencia, H., Sena, L.A., et al. (2019). Mitochondrial complex III is essential for suppressive function of regulatory T cells. *Nature* *565*, 495–499.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* *209*, 1723–1742.

Weist, B.M., Kurd, N., Boussier, J., Chan, S.W., and Robey, E.A. (2015). Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat Immunol* *16*, 635–641.

Bibliographie

- White, A.J., Jenkinson, W.E., Cowan, J.E., Parnell, S.M., Bacon, A., Jones, N.D., Jenkinson, E.J., and Anderson, G. (2014). An Essential Role for Medullary Thymic Epithelial Cells during the Intrathymic Development of Invariant NKT Cells. *J. Immunol.* *192*, 2659–2666.
- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* *27*, 18–20.
- Williams, J.A., Zhang, J., Jeon, H., Nitta, T., Ohigashi, I., Klug, D., Kruhlak, M.J., Choudhury, B., Sharrow, S.O., Granger, L., et al. (2014). Thymic Medullary Epithelium and Thymocyte Self-Tolerance Require Cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L Costimulatory Pathways. *J. Immunol.* *192*, 630–640.
- Wing, K., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* *11*, 7–13.
- Wing, J.B., Kitagawa, Y., Locci, M., Hume, H., Tay, C., Morita, T., Kidani, Y., Matsuda, K., Inoue, T., Kurosaki, T., et al. (2017). A distinct subpopulation of CD25 – T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E6400–E6409.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* (80-.). *322*, 271–275.
- Wirnsberger, G., Mair, F., and Klein, L. (2009). Regulatory T cell differentiation of thymocytes does not require a dedicated antigen-presenting cell but is under T cell-intrinsic developmental control. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 10278–10283.
- Wirnsberger, G., Hinterberger, M., and Klein, L. (2011). Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes. *Immunol Cell Biol* *89*, 45–53.
- Witt, C.M., and Robey, E.A. (2004). The ins and outs of CCR7 in the thymus. *J Exp Med* *200*, 405–409.
- Wu, L., and Shortman, K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin. Immunol.* *17*, 304–312.

Bibliographie

- Wyss, L., Stadinski, B.D., King, C.G., Schallenberg, S., McCarthy, N.I., Lee, J.Y., Kretschmer, K., Terracciano, L.M., Anderson, G., Surh, C.D., et al. (2016). Affinity for self antigen selects Treg cells with distinct functional properties. *Nat Immunol* *17*, 1093–1101.
- Xing, S., Gai, K., Li, X., Shao, P., Zeng, Z., Zhao, X., Zhao, X., Chen, X., Paradee, W.J., Meyerholz, D.K., et al. (2019). Tcf1 and Lef1 are required for the immunosuppressive function of regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *216*, 847–866.
- Xing, Y., Wang, X., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2016). Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF- κ B and tonic type I interferon signaling. *Nat. Immunol.* *17*, 565–573.
- Yaday, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* *209*, 1713–22, S1–19.
- Yamaguchi, T., Kishi, A., Osaki, M., Morikawa, H., Prieto-Martin, P., Wing, K., Saito, T., and Sakaguchi, S. (2013). Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*.
- Yamano, T., Nedjic, J., Hinterberger, M., Steinert, M., Koser, S., Pinto, S., Gerdes, N., Lutgens, E., Ishimaru, N., Busslinger, M., et al. (2015). Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity* *42*, 1048–1061.
- Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Moriggl, R., et al. (2007). Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp. *Blood* *109*, 4368–4375.
- Yu, W., Nagaoka, H., Jankovic, M., Misulovin, Z., Suh, H., Rolink, A., Melchers, F., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (1999). Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* *400*, 682–687.
- Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J., and Shevach, E.M. (2006). Activated CD4 + CD25 + T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* *107*, 3925–3932.
- Zhao, H., Liao, X., and Kang, Y. (2017). Tregs: Where we are and what comes next? *Front. Immunol.* *8*.

Bibliographie

Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., DeRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351–356.

Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the *Foxp3* gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808–812.