

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**Modulation de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et impact
sur la réponse cellulaire dans des modèles occupationnels et
pathologiques**

Par

Guillaume Ricaud

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.) en Virologie et
Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examinateur interne

Pr Denis Girard
INRS - Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examinateur externe

Pr Caroline Gilbert
Département de microbiologie-infectiologie
et d'immunologie
Université Laval

Examinateur externe

Pr Mohamed Benderdour
Département de chirurgie
Université Montréal

Directeur de recherche

Pr Jacques Bernier
INRS - Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Pr Jacques Bernier pour m'avoir permis de vivre cette expérience au sein de son laboratoire. Merci pour tous les conseils que tu as pu me donner pendant toutes ces années. Merci d'avoir cru en moi pour représenter ton laboratoire.

Je voudrais également remercier les membres de mon laboratoire, Bruno, Marie-Noëlle et Merve, pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant ces cinq années.

Je tiens également à remercier le Pr Denis Girard et ses étudiants, Francis, Jessie, Isabelle, Maxime et Pascal pour tous leurs précieux conseils et leur bonne humeur au quotidien, mon doctorat n'aurait pas été le même sans eux. Je veux également les remercier, ainsi que tous les employés faisant partie de notre ligue de Hockey INRS pour m'avoir fait découvrir ce sport que nous avons pu pratiquer été comme hiver.

Je remercie le Pr Cathy Vaillancourt et ses étudiants pour leur aide et les bons moments que l'on a passés.

Merci à ma famille, et tout particulièrement mes parents, mes grands-parents et ma sœur pour m'avoir soutenue durant ces longues années.

Enfin, je remercie ma conjointe Mathilde d'avoir partagé cette aventure avec moi, malgré ce que représentait ce saut dans l'inconnu en quittant la France. Merci à elle pour tous les précieux conseils qu'elle m'a donnés pour la rédaction de ce manuscrit.

RÉSUMÉ

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire adaptative. On retrouve pour ces cellules plusieurs sous-types, capables d'activer ou d'inhiber la réponse immunitaire. En effet, la présence des sous-types Th1 et Th17 est associée à une réponse pro-inflammatoire alors que les cellules Th2 et Treg induisent une réponse anti-inflammatoire. Pour maintenir l'homéostasie dans l'organisme ou prévenir le développement de pathologies immunitaires, cette dynamique de polarisation est hautement régulée par le microenvironnement cellulaire. En plus des cytokines qui jouent un rôle essentiel dans la polarisation, les xénobiotiques peuvent aussi influencer ce processus. De plus la polarisation des lymphocytes T CD4 est déterminante dans l'implantation embryonnaire.

Récemment, il a été montré que des xénobiotiques, et plus particulièrement des ligands du AhR, ont la capacité de moduler la différenciation des cellules T CD4⁺ en se liant à ce récepteur. Dans une première partie, nous suggérons qu'une exposition occupationnelle à des contaminants environnementaux, tels que les xénobiotiques, peut moduler la différenciation des lymphocytes T CD4⁺. Pour cela, nous avons étudié chez des pompiers, couramment exposés à des xénobiotiques, la persistance des polluants environnementaux dans leur organisme, ainsi que le profil immunitaire des cellules T CD4⁺. Par la suite, nous avons utilisé des xénobiotiques pour traiter *in vitro*, des cellules T CD4⁺ non différencierées afin d'évaluer la capacité de ces composés à moduler leur différenciation. Nos résultats ont, entre autres, montré une forte concentration des xénobiotiques, et une augmentation des cellules Th17, Th22 et Treg chez les pompiers par rapport aux témoins. Par ailleurs, l'équilibre entre les cellules Th17 et Treg semble être perdu après une plus longue exposition aux xénobiotiques chez les pompiers. Enfin, nous avons observé, *in vitro*, que l'exposition aux xénobiotiques peut influencer la différenciation des cellules Th17 et Treg. Ces résultats laissent penser que l'activation du AhR, à la suite d'une exposition aux xénobiotiques, peut avoir un impact significatif sur la différenciation des lymphocytes T CD4⁺.

D'autre part, la modulation du système immunitaire est aussi importante dans plusieurs processus biologiques, tels que l'implantation embryonnaire. En effet, la grossesse s'accompagne par un changement d'environnement inflammatoire, d'un phénotype Th1 vers le phénotype Th2. Dans une seconde partie, nous suggérons que la différenciation des cellules T CD4⁺ participe au succès des traitements d'immunomodulation, utilisés pour les femmes en échec répétés d'implantation embryonnaire. Pour cela, nous avons étudié chez ces patientes le

profil des cellules T CD4⁺. Par la suite, nous avons évalué l'impact du traitement d'immunomodulation de l'endomètre sur de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺. Nos résultats ont principalement montré que les femmes en échecs répétés d'implantation présentaient une diminution des cellules Th2 et Treg circulantes. Toutefois, nous avons observé que le traitement d'immunomodulation de l'endomètre, utilisé dans notre protocole permet de favoriser la différenciation vers les sous-types de cellules Th2 et Treg. Ainsi, nous montrons que l'absence d'une réponse anti-inflammatoire chez ces patientes peut être l'une des causes des échecs d'implantation. Ainsi, le contrôle de la différenciation des cellules T CD4+ pourrait favoriser grandement la réussite de ce processus d'implantation.

Mots-clés : Lymphocytes T CD4, AhR, Pompiers, Inflammation, Échecs d'implantation, Immunomodulation

ABSTRACT

CD4 T cells play a major role in the adaptive immune response. In fact, these cells can differentiate into several lymphocyte subtypes characterized by their cytokine secretion, allowing the activation or the inhibition of the immune response. It should be noted that differentiation of CD4 T lymphocytes is highly impacted, among others, by the cellular microenvironment composition in cytokines. For example, while Th1 and Th17 cells are associated with a pro-inflammatory response, Th2 and Treg cells induce an anti-inflammatory profile. To maintain homeostasis or prevent immune pathology development, the equilibrium of T cell differentiation is seemingly essential.

Recently, it has been shown that some xenobiotics can modulate T cell differentiation by AhR binding. Firstly, we have supposed that an occupational exposure to environmental contaminants, such as xenobiotics, can interfere with the differentiation of CD4 T lymphocytes. In a cohort of firefighters, frequently exposed to xenobiotics, we have assessed the persistence of environmental pollutants in their sera and we have characterized the profile of circulant CD4 T cells. Finally, we have treated undifferentiated CD4 T cells *in vitro* to assess the ability of xenobiotics to modulate their differentiation. Our results have shown, among others, a high concentration of xenobiotics and an augmentation of Th17, Th22 and Treg in firefighters blood circulation. Likewise, Th17 and Treg balance is lost in older firefighters. Finally, we have observed *in vitro* that some xenobiotics can influence Th17 and Treg differentiation. These results suggest that AhR activation following xenobiotics exposition can influence significantly T lymphocyte CD4+ differentiation.

On the other hand, immune system modulation is important in some biological process, like embryonic implantation. Indeed, pregnancy is associated with inflammatory environment modification, from Th1 phenotype to Th2. In the second part, we have suggested that T CD4 cells differentiation is essential to endometrial immunomodulatory therapy success used for women with recurrent implantation failures. To understand the impact of modulating the differentiation of CD4 T cells, we have studied the profile of CD4 T cells in these patients. Also, we have evaluated the effect of endometrial immunomodulation on T CD4 profile. Our results have shown that women with recurrent implantation failures have less circulant Th2 and Treg cells. However, we have observed that endometrial immunomodulatory therapy helps to promote Th2 and Treg cell subtypes differentiation. Thereby, T CD4 cells differentiation control seems to greatly promote the success of embryonic implantation.

Keywords : T CD4 cells, AhR, Firefighters, Inflammation, Implantation failure, Immunomodulation

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIX
SECTION 1. SYNTHÈSE	1
CHAPITRE 1 LA RÉPONSE IMMUNITAIRE	3
1.1 ORGANISATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.	3
1.2 IMMUNITÉ INNÉE	4
1.2.1 Reconnaissance par le système immunitaire inné.....	5
1.2.2 Les cellules de la lignée myéloïde	6
1.3 L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE	8
1.3.1 Les lymphocytes B.....	9
1.3.2 Les lymphocytes T	9
1.3.3 Lymphocytes T CD8.....	10
1.3.4 Les lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs.....	11
1.3.5 L'hétérogénéité cellulaire T CD4 ⁺	14
1.3.6 Les lymphocytes Th1	14
1.3.7 Les lymphocytes Th2	17
1.3.8 Les lymphocytes Th17	20
1.3.9 Les lymphocytes Th22	22
1.3.10 Les lymphocytes T régulateurs	24
1.4 PLASTICITÉ DÉVELOPPEMENTALE DES LYMPHOCYTES T CD4 ⁺	28
CHAPITRE 2 LYMPHOCYTES T ET LEURS RÔLES DANS LES PATHOLOGIES	31
2.1 LES CANCERS.....	31
2.1.1 Capacité protumorale des cellules Th2.....	31
2.1.2 Ambivalence des cellules Th17 dans l'environnement tumorale	31
2.1.3 Rôle pro-tumoral des cellules Tregs	33
2.1.4 Émergence du rôle des cellules Th22 dans les cancers.....	34
2.2 MALADIES AUTO-IMMUNES	36
2.2.1 Implication des cellules Th1 dans l'auto-immunité.....	36
2.2.2 Rôle des cellules Th17 dans les maladies auto-immunes	36
CHAPITRE 3 LE RÉCEPTEUR AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES.....	38

3.1	HISTORIQUE	38
3.2	STRUCTURE DU AHR	39
3.2.1	<i>Le domaine basic helix-loop-helix (bHLH)</i>	40
3.2.2	<i>Le domaine Per/Arnt/Sim (PAS)</i>	40
3.2.3	<i>Le motif PAS Associated C-terminal domain (PAC)</i>	40
3.2.4	<i>Le domaine de transactivation</i>	41
3.3	EXPRESSION ET RÉGULATION DU AHR	42
3.4	STRUCTURE DU COMPLEXE DU AHR	43
3.5	INTERACTION AHR-ARNT	45
3.6	VOIES D'ACTIVATION DU AHR	46
3.7	PROCESSUS D'ÉLIMINATION DES XÉNOBIOTIQUES	48
3.8	LES LIGANDS DU AHR	50
3.8.1	<i>Les ligands exogènes</i>	50
3.8.2	<i>Les ligands endogènes</i>	52
3.9	RÉGULATION DU AHR	54
3.10	EXPOSITION AUX LIGANDS DU AHR CHEZ L'HOMME	57
3.11	RELATION ENTRE L'EXPRESSION DU AHR ET L'IMMUNITÉ	59
CHAPITRE 4	ÉCHECS RÉPÉTÉS D'IMPLANTATION	64
4.1	PROCESSUS D'IMPLANTATION	64
4.1.1	<i>Développement embryonnaire</i>	64
4.1.2	<i>Réceptivité de l'endomètre</i>	65
4.1.3	<i>Implantation embryonnaire</i>	66
4.1.4	<i>Rôle du système immunitaire dans le processus d'implantation et de la grossesse</i>	68
4.2	LES ÉCHECS RÉPÉTÉS D'IMPLANTATION	70
4.2.1	<i>Description</i>	70
4.2.2	<i>Mécanismes physiopathologiques</i>	71
4.2.3	<i>Immunomodulation de l'endomètre par l'utilisation de PBMC</i>	72
MISE EN CONTEXTE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE	75	
SECTION 2.	ARTICLES SCIENTIFIQUES	79
PREMIER ARTICLE	81	
DEUXIÈME ARTICLE	118	
SECTION 3.	DISCUSSION ET CONCLUSIONS	151
PARTIE 1 : LES LIGANDS DU AHR PEUVENT IMPACTER LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES T CD4+ DANS UN CONTEXTE OCCUPATIONNEL CHEZ DES POMPIERS	154	
PARTIE 2 : LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES T CD4+ JOUE UN RÔLE DANS L'IMMUNOMODULATION DE L'ENDOMÈTRE CHEZ DES FEMMES EN ÉCHECS RÉPÉTÉS D'IMPLANTATION	162	

CONCLUSION GÉNÉRALE.....	171
SECTION 4. FIGURES ANNEXES	175
BIBLIOGRAPHIE	179
ARTICLE ANNEXE.....	261

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 :	COMPOSITION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE HUMAIN.....	4
FIGURE 2 :	REPRÉSENTATION DE <i>PATHOGEN ASSOCIATED MOLECULAR PATTERN</i> (PAMPs).....	5
FIGURE 3 :	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES IMMUNITAIRES DE LA LIGNÉE MYÉLOÏDE	7
FIGURE 4	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TH1	16
FIGURE 5	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TH2	19
FIGURE 6	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TH17	21
FIGURE 7	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TH22	23
FIGURE 8	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES iTREG	27
FIGURE 9	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DOMAINES DU AHR HUMAIN	39
FIGURE 10	STRUCTURE DES MEMBRES DE LA FAMILLE PAS : PER, ARNT ET SIM	41
FIGURE 11	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU COMPLEXE CYTOPLASMIQUE DU AHR.....	43
FIGURE 12	VOIE CANONIQUE DU AHR.....	47
FIGURE 13	MODE D'ÉLIMINATION DES XÉNOBIOTIQUES	49
FIGURE 14	EXEMPLES DE LIGANDS EXOGÈNES DU AHR	51
FIGURE 15	EXEMPLES DE LIGANDS ENDOGÈNES DU AHR	53
FIGURE 16	REPRÉSENTATION DES VOIES DE RÉGULATION DU AHR.....	55
FIGURE 17	REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENCES ENTRE LE AHR ET LE AHRR CHEZ LA SOURIS.....	56
FIGURE 18	REPRÉSENTATION DES MÉCANISMES DE RÉPRESSION DU AHR PAR LE AHRR.....	57
FIGURE 19	EXPOSITION À DES LIGANDS DU AHR DANS UN MODÈLE DE SOURIS EAE	60
FIGURE 20	EFFET DE LA SIGNALISATION DU AHR SUR LES CELLULES TH17 ET TREG	62
FIGURE 21	REPRÉSENTATION D'UN BLASTOCYSTE.....	65
FIGURE 22	ÉVOLUTION DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE PENDANT LES DIFFÉRENTS STADES DE GESTATIONS	70

FIGURE 1 :	COMPOSITION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE HUMAIN.....	4
FIGURE 2 :	REPRÉSENTATION DE <i>PATHOGEN ASSOCIATED MOLECULAR PATTERN</i> (PAMPs).....	5
FIGURE 3 :	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES IMMUNITAIRES DE LA LIGNÉE MYÉLOÏDE	7
FIGURE 4	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TH1	16
FIGURE 5	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TH2	19
FIGURE 6	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TH17	21
FIGURE 7	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES TH22	23
FIGURE 8	DIFFÉRENCIATION DES CELLULES iTREG	27
FIGURE 9	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DOMAINES DU AHR HUMAIN	39

FIGURE 10	STRUCTURE DES MEMBRES DE LA FAMILLE PAS : PER, ARNT ET SIM	41
FIGURE 11	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU COMPLEXE CYTOPLASMIQUE DU AHR.....	43
FIGURE 12	VOIE CANONIQUE DU AHR.....	47
FIGURE 13	MODE D'ÉLIMINATION DES XÉNOBIOTIQUES	49
FIGURE 14	EXEMPLES DE LIGANDS EXOGÈNES DU AHR	51
FIGURE 15	EXEMPLES DE LIGANDS ENDOGÈNES DU AHR.....	53
FIGURE 16	REPRÉSENTATION DES VOIES DE RÉGULATION DU AHR.....	55
FIGURE 17	REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENCES ENTRE LE AHR ET LE AHRR CHEZ LA SOURIS.....	56
FIGURE 18	REPRÉSENTATION DES MÉCANISMES DE RÉPRESSION DU AHR PAR LE AHRR.....	57
FIGURE 19	EXPOSITION À DES LIGANDS DU AHR DANS UN MODÈLE DE SOURIS EAE	60
FIGURE 20	EFFET DE LA SIGNALISATION DU AHR SUR LES CELLULES TH17 ET TREG	62
FIGURE 21	REPRÉSENTATION D'UN BLASTOCYSTE.....	65
FIGURE 22	ÉVOLUTION DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE PENDANT LES DIFFÉRENTS STADES DE GESTATIONS	70

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1	CORRÉLATION ENTRE LE SOUS-TYPE DE CELLULE T CD4 ⁺ INFILTRANT ET LE PRONOSTIC CLINIQUE.....	35
-----------	---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACAMPs :	<i>Apoptotic cells associated molecular patterns</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AhR :	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
AhRR :	<i>Aryl hydrocarbon receptor repressor</i>
AP-1 :	<i>Activating protein 1</i>
ARA9 :	<i>AhR associated protein 9</i>
ARE :	<i>Antioxydant response element</i>
ARNm :	Acide ribonucléique messager
ARNT :	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
BCR :	Récepteur des lymphocytes B
bHLH/PAS :	<i>Basic-helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM</i>
CCL :	Ligands de chimiokines C-C
CCR :	Récepteurs de chimiokines C-C
CD :	Cluster de différenciation
CLP :	Progéniteur lymphoïde commun
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
CTL :	Lymphocytes T cytotoxiques
CTLA-4 :	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated Antigen 4</i>
CYPs :	Cytochromes P450
DC :	Cellules dendritiques
DNMT1 :	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1</i>

DNMT3 β :	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3β</i>
EAE :	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EPF :	<i>Early pregnancy factor</i>
ERI :	Échecs répétés d'implantation
FICZ :	<i>6-formylindolo[3,2-b]carbazole</i>
FIV :	Fécondation <i>in vitro</i>
Foxp3 :	<i>Forkhead box P3</i>
GATA3 :	<i>GATA binding protein 3</i>
Gfi-1 :	<i>Growth factor independence 1</i>
GST :	Gluthation-S-transférase
HAPs :	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAHs :	Hydrocarbures aromatiques halogénés
hCG :	Hormone chorionique gonadotrope humaine
HDAC :	<i>Histone désacétylases</i>
HIF1 β :	<i>Hypoxia inducible factor 1β</i>
Hsp90 :	<i>Heat shock protein 90</i>
ICAM1 :	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICOS :	<i>Inducible T-cell costimulatory</i>
IDO:	<i>Indoléamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN- γ :	Interféron gamma
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
IL-R :	<i>Interleukine receptor</i>
IRF :	<i>Interferon regulatory factor</i>

ITE :	<i>2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylic acid methyl ester</i>
iTreg :	T régulateurs induits
JAK :	Janus kinase
LFA-1 :	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LIF :	<i>Leukemia inhibiting factor</i>
LPS :	Lipopolysaccharides
LT CD4+ :	Lymphocytes T CD4+
LT CD8+ :	Lymphocytes T CD8+
MDR :	<i>Multiple drug resistance</i>
NES :	<i>Nuclear export signal</i>
NF-kB :	Facteur nucléaire-kappa B
NK :	Cellule tueuse naturelle
NKT :	Cellule T tueuse naturelle
NLRP3 :	<i>NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3</i>
NLS :	<i>Nuclear localization signal</i>
NQO1 :	Quinone oxydoréductase
NRF2 :	<i>NF-E2-related factor 2</i>
nTreg :	T régulateurs naturels
OH :	<i>Radical hydroxyle</i>
PAC :	<i>PAS associated C-terminal domaine</i>
PAF :	<i>Platelet activatin factor</i>
PAMPs :	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC :	Cellules mononucléaires de la circulation périphérique
PD-1 :	<i>Programmed cell death protein 1</i>

PD-L1 :	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
pDC :	Cellules dendritiques plasmacytoides
PHA :	Phytohémagglutinine
PR :	Polyarthrite rhumatoïde
PXR :	<i>Pregnane X receptor</i>
RORyt :	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
SNC :	Système nerveux central
STAT :	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SULT :	Sulfotransférase
T-bet :	<i>T-box transcription factor</i>
TCDD :	2,3,7,8 -tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TCR :	Récepteur des cellules T
TGF-β :	<i>Tumor growth factor beta</i>
Th :	<i>T helper</i>
TNF-α :	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TPA :	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
Tr1 :	Cellules T régulatrices 1
Treg :	Cellules T régulatrices
TSDR :	<i>Treg-specific demethylated region</i>
UGT :	<i>UDP-glucuronyl transférase</i>
VEGF :	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WOI :	<i>Window of implantation</i>
XRE :	<i>Xenobiotic response elements</i>

SECTION 1. SYNTHÈSE

CHAPITRE 1 LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des défenses permettant de protéger l'organisme contre le non-soi, c'est-à-dire des pathogènes, ou des molécules du soi modifiées (Nicholson 2016). La reconnaissance peut se faire de façon non spécifique ou spécifique. Ainsi, la réponse immunitaire a été divisée en réponse innée (non spécifique) et réponse acquise (spécifique) (Chaplin 2010). Le déclenchement de la réponse immunitaire est étroitement contrôlé par différents types cellulaires, ainsi qu'un ensemble de signaux régulateurs nécessaires au bon fonctionnement de cette réponse pour éviter de causer des dommages à l'organisme.

1.1 Organisation du système immunitaire.

Le système de défense humain est constitué de trois niveaux : les barrières anatomiques et physiologiques, l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Figure 1**). En cas d'infection, à la suite d'un échec des barrières physiologiques et anatomiques à protéger l'organisme, les cellules du système immunitaire inné se trouvent en première ligne et réagissent rapidement. En effet, on retrouve plusieurs types cellulaires, comme les macrophages, qui résident dans certains tissus, comme la peau (A. V. Nguyen et Soulika 2019). Ce système est généralement associé à une reconnaissance peu spécifique des antigènes, mais permettant une mise en place rapide d'une défense immunitaire. En cas d'échec ou de débordement de cette réponse immunitaire innée, la réponse immunitaire adaptative prend le relai. Cette réponse extrêmement spécifique est cependant plus longue à mettre en place. Elle implique un ensemble de cellules, comme les lymphocytes T et B, et de signaux amenant à une réponse cellulaire ou humorale (Sebina et Pepper 2018 ; Chaplin 2010). Cette réponse est caractérisée par l'établissement d'une mémoire immunologique permettant une réponse plus rapide lors d'une seconde infection (Ratajczak et al. 2018). Nous verrons dans un premier temps les cellules participant à la réponse immunitaire innée et ensuite dans une seconde partie les cellules de l'immunité adaptative.

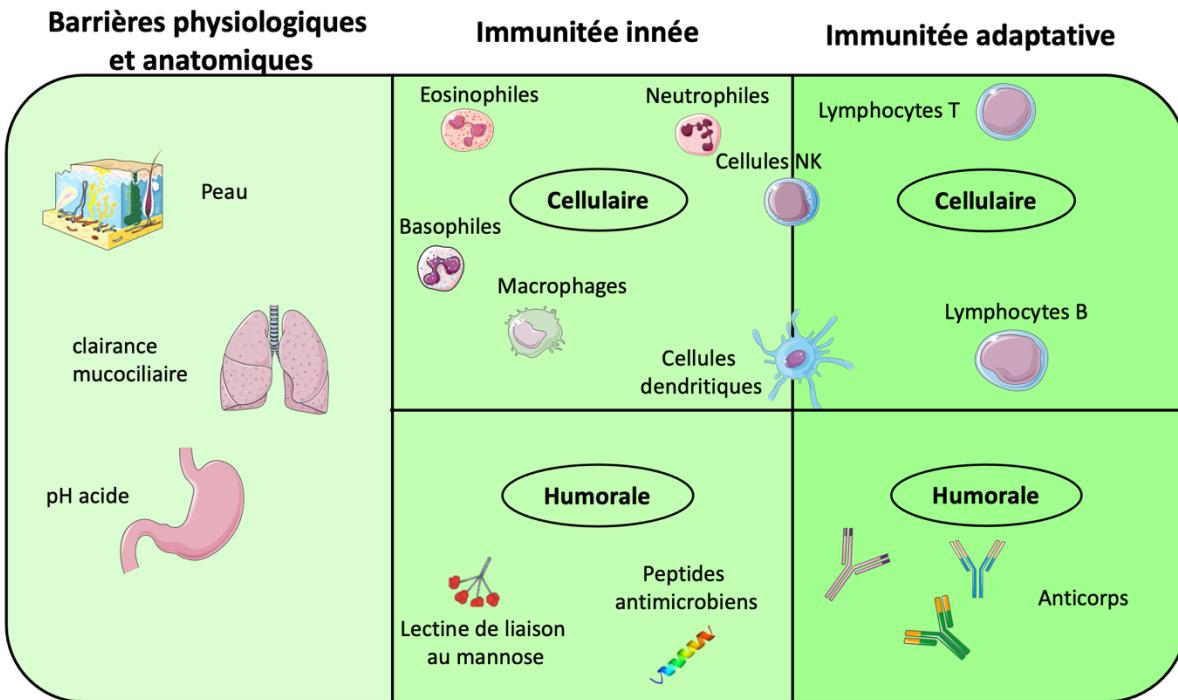


Figure 1 : Composition du système immunitaire humain

Le système immunitaire antimicrobien peut être séparé en trois niveaux différents : (I) les barrières anatomiques et physiologiques (II) l'immunité innée et (III) l'immunité adaptative. Certains types cellulaires interviennent dans plusieurs niveaux, comme les cellules NK et les cellules dendritiques qui participent à l'immunité innée et adaptative. Adapté de Stuart E. Turvey. Réalisé avec Servier Médical Art.

1.2 Immunité innée

L'immunité innée est constituée des barrières naturelles de l'organisme (épithélium et épidermes), de protéines sériques et d'un grand ensemble de cellules résidant dans les tissus ou circulant dans le sang, telles que les granulocytes, les macrophages et les cellules NK. Les cellules de l'immunité innée sont les premières à intervenir au début d'une infection (Turvey et Broide 2010). Les acteurs de l'immunité innée reconnaissent leurs cibles de façon peu spécifique et sont présents dans la circulation sanguine et certains organes, c'est pourquoi ils ont la capacité de répondre rapidement en cas d'agression de l'organisme. Cette reconnaissance entraîne l'activation de deux systèmes effecteurs : le système du complément et la phagocytose permettant de détruire la cible (Rosales et Uribe-Querol 2017).

1.2.1 Reconnaissance par le système immunitaire inné

Les cellules qui composent l'immunité innée sont continuellement en action pour éliminer les débris, les cellules en apoptoses de l'organisme et les parasites extracellulaires (Birge et Ucker 2008). Pour permettre la reconnaissance des pathogènes, ces cellules disposent d'un ensemble de récepteurs spécifiques à des composantes étrangères comme les *pattern recognition receptors* (PRRs) (Mogensen 2009). Ainsi ces récepteurs peuvent être spécifiques à des lipides, à des protéines, à des sucres ou à des acides nucléiques. Par exemple, le virus de la grippe possède des protéines qui lui sont propres : la neuraminidase et l'hémagglutinine (**Figure 2**). En revanche, les bactéries à Gram négatif expriment à leur surface des peptidoglycane et les lipopolysaccharides (LPS), des molécules absentes chez les cellules eucaryotes et les virus (Raetz et Whitfield 2002).

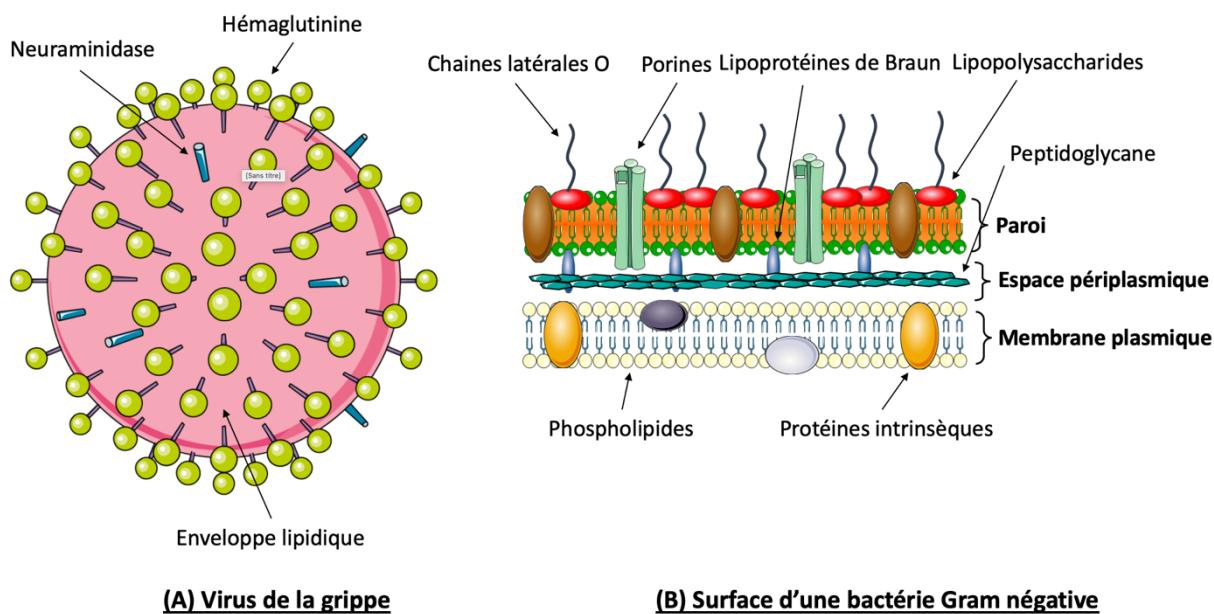


Figure 2 : Représentation de *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMPs).

(A) Structure représentative du virus de la grippe, composé d'une enveloppe lipidique, de neuramidase et d'hémagglutinine (B) Structure de la membrane bactérienne Gram négatif, avec sa membrane plasmique, sa paroi et l'ensemble de ses protéines associées.

Les signaux du non-soi ou PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) sont l'ensemble des molécules reconnues par les récepteurs des cellules de l'immunité innée. Ces signaux sont des motifs moléculaires, organisés en répétition, présents à la surface des pathogènes (Kumar, Kawai et Akira 2011).

Les signaux du soi modifié peuvent être associés à deux grandes catégories ; les cellules en apoptose et les cellules cancéreuses. L'apoptose est primordiale pour le développement et le renouvellement tissulaire. Ce processus de mort cellulaire programmée permet à l'organisme d'éliminer les cellules détériorées ou rendues inutiles sans induire d'inflammation (Birge et Ucker 2008). Pour déclencher la reconnaissance de la cellule apoptotique par le système immunitaire, plusieurs mécanismes sont mis en place : dans la membrane plasmique, les phospholipides sont modifiés, entraînant l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface de la cellule. On observe, également, une perte des acides sialiques qui entraîne une exposition des chaînes glycosidiques. Ces nouveaux motifs présents à la surface cellulaire sont appelés ACAMPs (*Apoptotic Cells Assosciated Molecular Patterns*) et permettent la reconnaissance des cellules mourantes par les cellules de l'immunité innée et leur phagocytose (Sangiuliano et al. 2014).

1.2.2 Les cellules de la lignée myéloïde

Les progéniteurs myéloïdes sont issus des cellules hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse. Ces progéniteurs se différencient en plusieurs sous-populations : les granulocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (**Figure 3**). Les cellules de la lignée myéloïde sont capables de phagocytter et ont pour principale fonction d'éliminer les particules et pathogènes dangereux pour l'organisme. On retrouve dans certaines de ces cellules des capacités à coopérer avec les cellules de l'immunité adaptative pour déclencher leur réponse immunitaire acquise (Willermain et al. 2012).

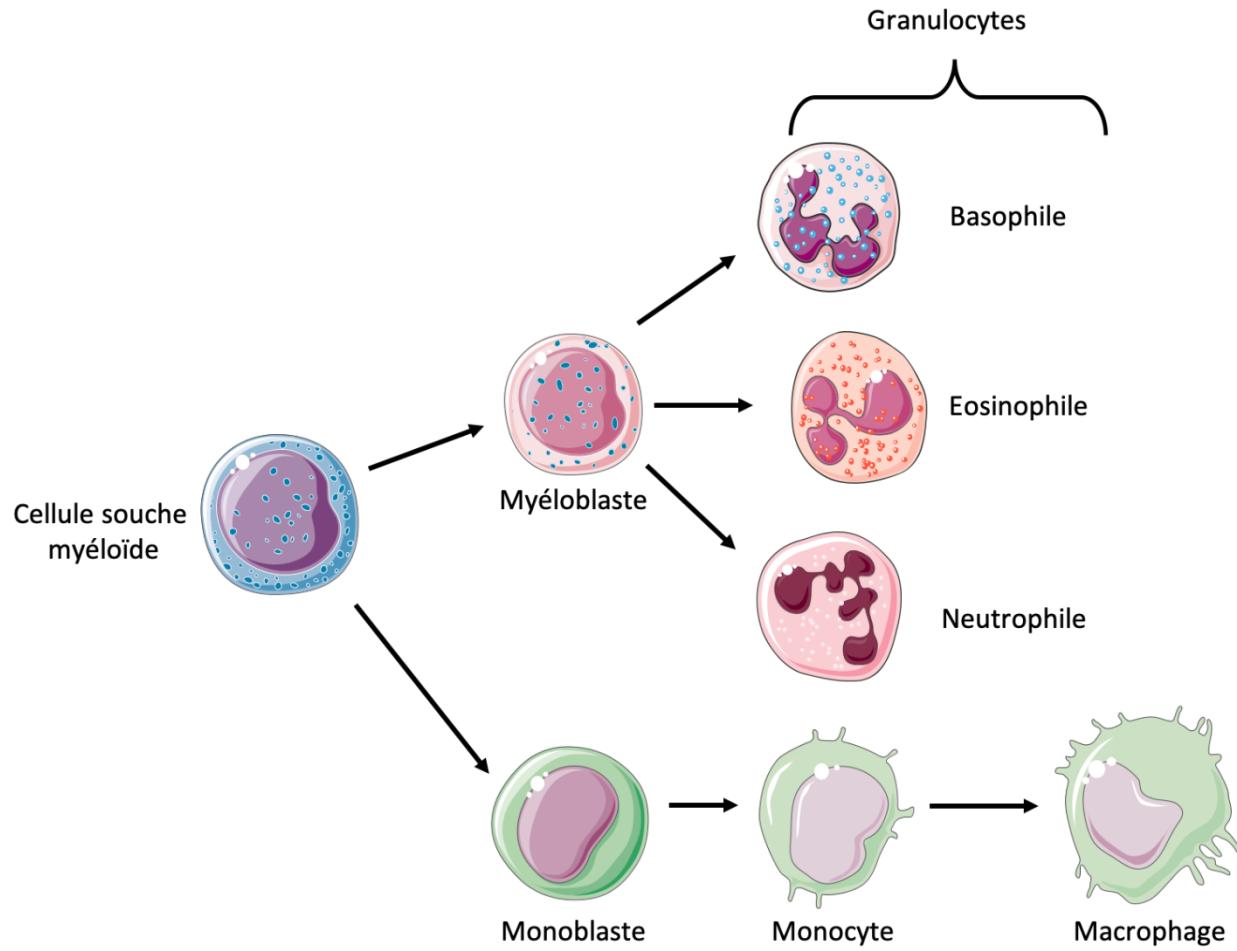


Figure 3 : Différenciation des cellules immunitaires de la lignée myéloïde

La cellule souche myéloïde se différencie en myéloblaste ou monoblaste. La lignée myéloblaste permet la différenciation en granulocytes neutrophiles, éosinophile ou basophile. La lignée monoblaste peut se différencier en monocyte, puis en macrophage dans les tissus.

Les granulocytes représentent 60 à 70 % des leucocytes humains retrouvés dans la circulation sanguine. On dénombre trois types de cellules : tout d'abord les neutrophiles sont les granulocytes majoritairement retrouvés dans le sang (90 %) et sont caractérisés par une durée de vie très courte d'environ 24 heures après activation (Garley et Jablonska 2018). Ces cellules migrent vers le site infectieux par chimiotactisme pour ensuite phagocytter et digérer des particules étrangères, comme les bactéries (Petri et Sanz 2018). Les éosinophiles représentent, quant à eux, 2 à 5 % des granulocytes et sont retrouvés majoritairement dans les tissus (Kovalszki et Weller 2016). Leur mécanisme d'action passe par la libération d'enzymes qui permettent la

lyse des pathogènes (Acharya et Ackerman 2014). Les éosinophiles peuvent aussi faire de la phagocytose. On retrouve très souvent ces cellules en cas d'hypersensibilité, via la présence de récepteurs aux IgE à leur surface (Capron 1989). Enfin, les basophiles sont les granulocytes les moins abondants (1 à 2 % des granulocytes). Les basophiles libèrent de nombreuses molécules, comme l'histamine et l'héparine, permettant entre autres d'augmenter la perméabilité des capillaires sanguins et d'empêcher la coagulation (Borriello, Iannone et Marone 2017 ; Antczak-Marczak et Kuna 1997). Les basophiles contribuent également au développement des réactions d'hypersensibilité, comme les éosinophiles (Mahapatro et Mahapatro 1984).

Les monocytes font partie du système phagocytaire mononucléé (Hume, Irvine et Pridans 2019). Elles sont caractérisées, comme les granulocytes, par une courte durée de vie (Hunter et al. 2009). La fonction principale des monocytes est la phagocytose, mais ces cellules effectuent également de la cytolysé (Kakita et al. 1989). Les monocytes sécrètent des médiateurs solubles, comme des protéines du complément, des enzymes et des cytokines. La migration de ces cellules dans les tissus induit leur activation et différenciation en macrophage (J. Yang et al. 2014).

Enfin, les cellules dendritiques sont des cellules présentatrice d'antigène professionnelles (CPA) majeur (Gaudino et Kumar 2019). Elles ont pour fonction principale la présentation d'antigènes aux lymphocytes T auxiliaires, composante clé de l'immunité acquise (Hugues 2010). Pour ce faire, elles doivent d'abord réaliser la capture de l'antigène, via la phagocytose des cellules cibles, puis digérer celui-ci pour ensuite présenter certaines parties spécifiques sur leurs récepteurs membranaires (Thery et Amigorena 2001).

1.3 L'immunité adaptative

Lorsque la réponse de l'immunité innée est insuffisante contre un pathogène, c'est l'immunité adaptative qui est alors mise en place. Cet échec de l'immunité innée peut survenir quand une très grande quantité de micro-organismes se développent rapidement ou qu'ils possèdent certains mécanismes d'échappement immunitaire. L'immunité adaptative implique une défense de type humorale et cellulaire. La défense humorale correspond à l'activation des lymphocytes B tandis que la défense cellulaire met en jeu les lymphocytes T (Pennock et al. 2013).

1.3.1 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont également issus des cellules souches hématopoïétiques, mais cette fois ces dernières se sont différenciées en précurseur lymphoïde. Les lymphocytes B se développent dans la moelle osseuse (LeBien et Tedder 2008). Le processus de maturation des lymphocytes B dépend de leur contact étroit avec les cellules stromales de la moelle osseuse. Cette maturation permet aux cellules pro-B d'exprimer le BCR et le dimère Ig α -Ig β . Le BCR est exprimé suite aux recombinaisons V(D)J, un processus biologique permettant de créer une grande diversité de récepteurs et d'immunoglobulines (Kindt T 2008). La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps, se fait de façon thymodépendante ou thymo-indépendante (Cyster et Allen 2019). Dans le premier cas, une collaboration entre cellules B et lymphocytes T conduit à la formation de cellules productrices d'anticorps. Tandis que, dans la réponse thymo-indépendante, seuls les lymphocytes B sont retrouvés (Vos et al. 2000 ; Parker 1993).

1.3.2 Les lymphocytes T

Contrairement aux progéniteurs B, qui subissent leur maturation dans la moelle osseuse, les progéniteurs T migrent jusqu'au thymus pour effectuer leur maturation. Dans le thymus, les cellules T immatures, appelées thymocytes, prolifèrent et se différencient. On retrouve pour ces cellules plusieurs marqueurs de surfaces qui permettent de suivre l'évolution de cette maturation. Pendant ce développement, ces cellules subissent un réarrangement des gènes codant pour récepteur des cellules T (TcR). Cette étape est primordiale pour évaluer le caractère fonctionnel du TcR grâce à des sélections positives et négatives (Klein et al. 2014). À la fin de ce processus de sélection, les cellules expriment soit le marqueur CD8 spécifique des lymphocytes T CD8 ou le marqueur CD4 $^{+}$ spécifique des cellules T CD4 $^{+}$. On estime que seulement 10 % des cellules T sont sélectionnées et constitueront les lymphocytes T matures (Starr, Jameson et Hogquist 2003).

1.3.3 Lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T CD8 ou lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont des cellules spécialisées dans l'élimination de cellules infectées (particulièrement par des virus) ou des cellules malignes (St Paul et Ohashi 2020 ; N. Zhang et Bevan 2011). La stimulation des LT CD8⁺ à la suite de la présentation d'un antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH I) d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) induit leur activation. De plus, des signaux de co-stimulation sont également indispensables pour compléter cette activation. Ceux-ci sont induits par l'interaction entre le CD28 présent à la surface des cellules T CD8⁺ et le récepteur B7 présent à la surface de certaines CPA professionnelles (cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes B)(Y. Q. Zhang et al. 1997). Dans certains cas, une expression trop faible de B7 par une cellule CPA limite la costimulation. Alors, l'interaction du CD40 ligand (CD40L) des lymphocytes T CD4⁺ avec le récepteur CD40 des CPA permet d'augmenter l'expression de B7 par les CPA pour compléter l'activation (Ara, Ahmed et Xiang 2018). L'amplification de l'activation et la prolifération des cellules T CD8⁺ se fait via la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-2 elle-même produite par les cellules T CD4⁺, les cellules T CD8⁺ stimulées et les CPA (Au-Yeung et al. 2017).

L'interaction entre le TCR des lymphocytes T CD8⁺ activée et le complexe peptide-CMH de classe 1 permet la reconnaissance d'une cellule infectée et induit leur adhésion. L'expression d'intégrines, tel que LFA-1, permet de renforcer la stabilité de l'adhésion. Les lymphocytes T CD8⁺ activés ayant trouvé leurs cibles libèrent alors le contenu de leurs granules (perforines et granzymes) par exocytose. La perforine permet la perméabilisation de la cellule cible et l'apoptose est induite entre autres par l'action des granzymes. De plus, le Fas-ligand (Fas-L), présent à la surface des cellules T CD8⁺, se lie à un récepteur de surface cellulaire, le Fas (CD95), et induit l'apoptose. Enfin, les cellules T CD8⁺ possèdent également des fonctions effectrices, notamment en secrétant des cytokines telles que l'IL-2, l'IFN-γ, le TNF-α et d'autres chimiokines qui permettent de favoriser la réponse anti-infectieuse et anti-tumorale (L. L. Ye et al. 2018 ; Biller et al. 2001).

1.3.4 Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs

Une cellule T CD4⁺ qui n'a pas encore rencontré d'antigène est appelée cellule T CD4⁺ naïve. Elle exprime à sa surface les marqueurs CD62L (sélectine L) et CCR7 (récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21). Cette cellule est caractérisée par l'absence d'expression de marqueurs de cellules effectrices comme le CD44 et le CD25 (Desbarats et al. 1999). Leur maintien dans les organes lymphoïdes secondaire est garanti par la présence du CCR7 et CD62L à leur surface, ainsi que les molécules CCL19, abondamment exprimées dans ces organes. Leur perte entraîne la sortie des lymphocytes T CD4⁺ vers des organes non lymphoïdes (Belikan et al. 2018).

1.3.4.1 Initiation de la différenciation des cellules T CD4⁺

L'intervention de trois signaux est nécessaire pour la différenciation des cellules T naïves en cellules T effectrices. Le premier signal nécessaire à la différenciation des lymphocytes CD4⁺ est induit par l'interaction du TCR, associé à son corécepteur CD4, et le complexe du CMH-II/peptide antigénique présenté par une CPA, comme les cellules dendritiques (Jenkins et al. 2001). La durée et l'intensité de ce signal sont renforcées du côté des lymphocytes par les molécules d'adhésion CD2 et LFA-1 et les molécules LFA-3 et ICAM1 pour les CPA. Par la suite, une réorganisation du cytosquelette est alors engagée et permet la mise en place d'une zone de contact privilégié, appelée synapse immunologique (Dustin 2014). Il en résulte un contact étroit entre les lymphocytes T CD4⁺ et les CPA qui permet d'optimiser la signalisation initiale et de maximiser les inactivations tardives des complexes TCR/CMH-II.

Le second signal provient de l'interaction entre deux molécules costimulatrices ; le CD28, constitutivement exprimé par les lymphocytes T et le CD80 ou le CD86 présent à la surface des cellules dendritiques activées (Theodore J. Yun 1998). La liaison du CD28 au CD80/CD86 permet l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺. Ce signal de costimulation est indispensable afin d'éviter une apoptose précoce ou l'apparition de cellules T anergiques. De plus, l'expression des molécules de costimulation (CD40 et CD40-L) est induite par ce signal et permet d'augmenter la signalisation du CD28, amplifiant ainsi la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (Beyersdorf, Kerkau et Hunig 2015). Le dernier signal nécessaire à l'activation des cellules T CD4⁺ est induit par des cytokines présentes dans le microenvironnement (L. Zhou, Chong et Littman 2009). Plusieurs de ces cytokines sont secrétées par les cellules dendritiques suite aux

signaux de stimulation TCR et CD28 (Sallusto et Lanzavecchia 2002). D'autres cellules, telles que les cellules NK, présentes dans le microenvironnement, peuvent également secréter des cytokines nécessaires à l'activation des cellules T CD4⁺ (Cook, Waggoner et Whitmire 2014). Ces cytokines agissent de façon paracrine et permettent aux lymphocytes T naïfs de favoriser leur différenciation vers un sous-type lymphocytaire distinct. La nature des cytokines présentes dans le microenvironnement sera décisive dans la différenciation en l'un des sous-types de cellule T CD4⁺ (Zhu, Yamane et Paul 2010).

1.3.4.2 **La voie JAK/STAT**

La présence des différents signaux présentés précédemment entraîne l'activation de la voie JAK/STAT. Cette voie joue un rôle majeur dans le transfert des signaux des récepteurs membranaires vers le noyau (Renauld 2003). En effet, les récepteurs aux cytokines, présents à la surface des cellules T CD4⁺, utilisent cette voie pour transmettre leurs signaux et permettre la différenciation des cellules T CD4⁺ en plusieurs sous-types (Sasaki et al. 2000).

La liaison d'une cytokine à son récepteur entraîne la dimérisation du récepteur et la transphosphorylation d'une protéine JAK (O'Shea et Murray 2008). Les JAK sont des tyrosines kinases, liées aux régions cytoplasmiques des récepteurs de cytokines (Seif et al. 2017). On retrouve chez l'humain quatre membres de cette famille de protéines JAK : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (Stark et al. 1998). Leur activation permet le recrutement ultérieur d'une ou plusieurs protéines STAT à phosphoryler (O'Shea et Murray 2008). Finalement, le processus de dimérisation des protéines STAT induit leur entrée dans le noyau et la transcription d'une multitude de gènes cibles, tels que des facteurs de transcriptions spécifiques aux cellules T CD4⁺. On retrouve chez l'humain sept membres dans la famille des protéines STAT : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6 (Darnell 1997).

La voie JAK/STAT présente deux modes d'action. Tout d'abord, la voie canonique qui est caractérisée par une activation, à la suite de la liaison d'un ligand à son récepteur, et une inactivation, grâce à des régulateurs négatifs, tels que les protéines SOCS et SHP (W. X. Li 2008). En revanche, la voie non-canonique est caractérisée par la présence de protéines STAT non-phosphorylées, qui ne sont pas dans le cytoplasme, tel que présenté dans la voie canonique, mais fixé à l'hétérochromatine, permettant de favoriser sa stabilité (W. X. Li 2008).

La voie JAK/STAT joue un rôle critique dans l'acquisition des caractéristiques effectrices des cellules T CD4⁺ (Seif et al. 2017). Les différentes protéines STAT retrouvées spécifiquement

dans chaque sous-population de cellules T CD4 seront présentées dans les prochains paragraphes.

1.3.4.3 Régulation des cellules T CD4⁺

Afin d'éviter une prolifération aberrante des cellules T CD4+, plusieurs mécanismes peuvent également intervenir. L'expression du CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4*) par les cellules T permet un rétrocontrôle négatif du processus d'amplification en agissant en compétition avec le CD28 (Sansom 2000). Le CTLA-4 possède une affinité pour les molécules CD80/CD86 plus importante que le CD28 (van der Merwe et al. 1997). Le second mécanisme de contrôle de la prolifération est induit par l'expression de PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*) à la surface des cellules T. La liaison du PD-L1 (*Programmed cell Death 1 Ligand 1*) des CPA avec le PD-1 des lymphocytes T induit un blocage de la prolifération ou l'apoptose des lymphocytes (Parry et al. 2005). Des études ont montré que les cellules immunitaires infiltrées dans l'environnement tumoral exprimaient plus fortement CTLA-4 que les cellules circulantes. L'augmentation de l'expression de CTLA-4 dans l'environnement tumoral favorise le phénotype régulateur des lymphocytes T (Lohr et al. 2003 ; H. Zhang et al. 2019). D'autre part, une augmentation de PD-L1 dans les tumeurs a aussi été montrée dans plusieurs cas de cancer (Thompson et al. 2007 ; Ghebeh et al. 2007 ; Azuma et al. 2008). En revanche, même si le mécanisme PD1/PD-L1 participe à l'échappement tumoral, son expression n'est pas forcément associée à un mauvais pronostique pour tous les cas de cancer. En effet, certaines études ont montré qu'une surexpression de PD-1/PD-L1 pouvait indiquer un processus favorable dans des cas de lymphome folliculaire (Carreras et al. 2009), de mélanome (Taube et al. 2012) ou du cancer de l'oropharynx (Badoual et al. 2013). Dans ces contextes, l'expression de PD-1 dans l'environnement tumoral peut correspondre à un marqueur d'activation des cellules T CD4⁺ et donc indiquer la présence d'une réponse immunitaire anti tumorale. Certains traitements antitumoraux utilisent des anticorps dirigés contre les molécules PD-1 et PD-L1 afin de supprimer leurs effets protumoraux dans certains types de cancer (Ohaegbulam et al. 2015).

1.3.5 L'hétérogénéité cellulaire T CD4⁺

Les immunologistes ont d'abord étudié la différenciation des cellules T naïves, induite par une stimulation antigénique, permettant alors de distinguer deux sous-populations, les cellules Th1 et les cellules Th2 (Mosmann et al. 1986). Cependant, avec les avancées technologiques, notamment en cytométrie en flux, d'autres études ont mis en évidence une plus grande hétérogénéité fonctionnelle avec des profils de sécrétion en cytokines bien définis (Golubovskaya et Wu 2016). La plupart de ces cellules ont d'ailleurs été nommées d'après leurs propres productions en cytokine spécifique. On peut distinguer aujourd'hui de nombreux sous-types de cellules T CD4⁺ : les cellules Th1, Th2, Th17, Th22, Treg et Tr1. Certaines d'entre elles sont plutôt associées à une réponse immunitaire pro-inflammatoire, comme les cellules Th1, Th17 et Th22. Alors que d'autres sous-types sont associés à une réponse immunitaire anti-inflammatoire, comme les cellules Th2, Treg et Tr1 (Luckheeram et al. 2012). Cette diversité de cellules T effectrices permet d'adapter spécifiquement la réponse immunitaire suivant la nature du pathogène/danger détecté. Les différentes populations de cellules T CD4⁺ sont au cœur de cette thèse et seront décrites dans les pages qui suivent.

1.3.6 Les lymphocytes Th1

La différenciation des cellules Th1 est initiée par la production d'IL-12 et d'IFN-γ (**Figure 4**) (Trinchieri, Pflanz et Kastlein 2003). En effet, après la stimulation du PRR (*Pattern recognition receptor*) des cellules CPA activées, en particulier les cellules dendritiques, vont sécréter de l'IL-12 nécessaire à la différenciation des cellules Th1. Des cellules accessoires, comme les cellules NK, présentes dans le microenvironnement, produisent à leur tour de l'IFN-γ (Arase, Arase et Saito 1996).

L'IFN-γ et l'IL-12 stimulent l'activation des facteurs de transcription cytoplasmique STAT1 et STAT4, via l'activation de Jak2 et Tyk2 (M. H. Kaplan et al. 1996 ; Thierfelder et al. 1996). La translocation au noyau de STAT1 et STAT4 permet l'expression du facteur de transcription T-bet, responsable de la production d'IFN-γ par les cellules Th1 et de l'expression du récepteur de l'IL-12 (IL-12R). Ces mécanismes participent à l'activation autocrine des cellules Th1. L'expression de T-bet dans les cellules Th1 permet, en plus de l'activation de gènes spécifiques Th1 (Afkarian et al. 2002), de réprimer la différenciation de ces cellules en d'autres sous-types de lymphocytes

T CD4⁺ (Lazarevic et al. 2011 ; Lugo-Villarino et al. 2003). En effet, l'expression de T-bet a pour conséquence de bloquer l'expression du gène Rorc (Lazarevic et al. 2011). De plus, T-bet a aussi été décrit comme un répresseur transcriptionnel agissant sur les régions promotrices des gènes Socs1 et Socs3 (*Supressor of cytokine signaling*). L'inhibition de ces gènes engendre une augmentation de la production d'IFN-γ par les cellules Th1 (Oestreich, Huang et Weinmann 2011). Les protéines SOCS jouent un rôle dans la régulation négative des protéines STAT. Dans les derniers stades de la différenciation en cellule Th1, T-bet est capable d'interagir avec le répresseur transcriptionnel Bcl-6 (*B-Cell Lymphoma 6*) afin de réguler négativement l'activité du locus IFN-γ. Ce mécanisme permet de limiter une production aberrante d'IFN-γ et de prévenir le développement d'une réponse auto-immune (Nakayamada et al. 2011). Un autre mécanisme présent dans les cellules Th1 permet à celles-ci de produire de l'IL-10, cytokine produite en majorité par les cellules Treg comme nous le verrons plus bas. Ce mécanisme permet aussi d'effectuer une boucle de rétrocontrôle négatif de l'expression de l'IFN-γ (Trinchieri 2007).

Les cellules Th1 interviennent en réponse à des pathogènes intracellulaires, tel que les virus et les bactéries et sont associés à une voie dite cellulaire (J. Chen et Liu 2009 ; Mosmann et Coffman 1989). Les cellules Th1 tout comme les autres sous-types de cellules T CD4⁺ exercent leur fonction de façon indirecte, via leurs cytokines sécrétées. Les cellules Th1 produisent majoritairement de l'IFN-γ, de l'IL-2 et dans une moindre mesure du TNF-α/b (**Figure 4**). Le rôle des cellules Th1 est d'activer les cellules NK, de favoriser la maturation des cellules dendritiques (Pan et al. 2004) et de permettre un soutien aux fonctions phagocytaires et bactéricides des macrophages (Suzuki et al. 1988). Les cellules Th1 permettent également la prolifération des cellules lymphocytes T CD8 grâce à leur production d'IL-2 (H. Huang et al. 2007 ; Ekkens et al. 2007). Elles jouent aussi un rôle majeur dans l'efficacité des LT CD8. Cependant, en cas d'infection chronique ces cellules peuvent être responsables de l'apparition de lésions immunopathologiques tissulaires. Il a été montré que les cellules Th1 sont souvent associées à des pathologies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde (Paparo 2019 ; J. Chen et Liu 2009), le diabète insulinodépendant (L. S. Walker et von Herrath 2016) et la sclérose en plaques (Nagelkerken 1998).

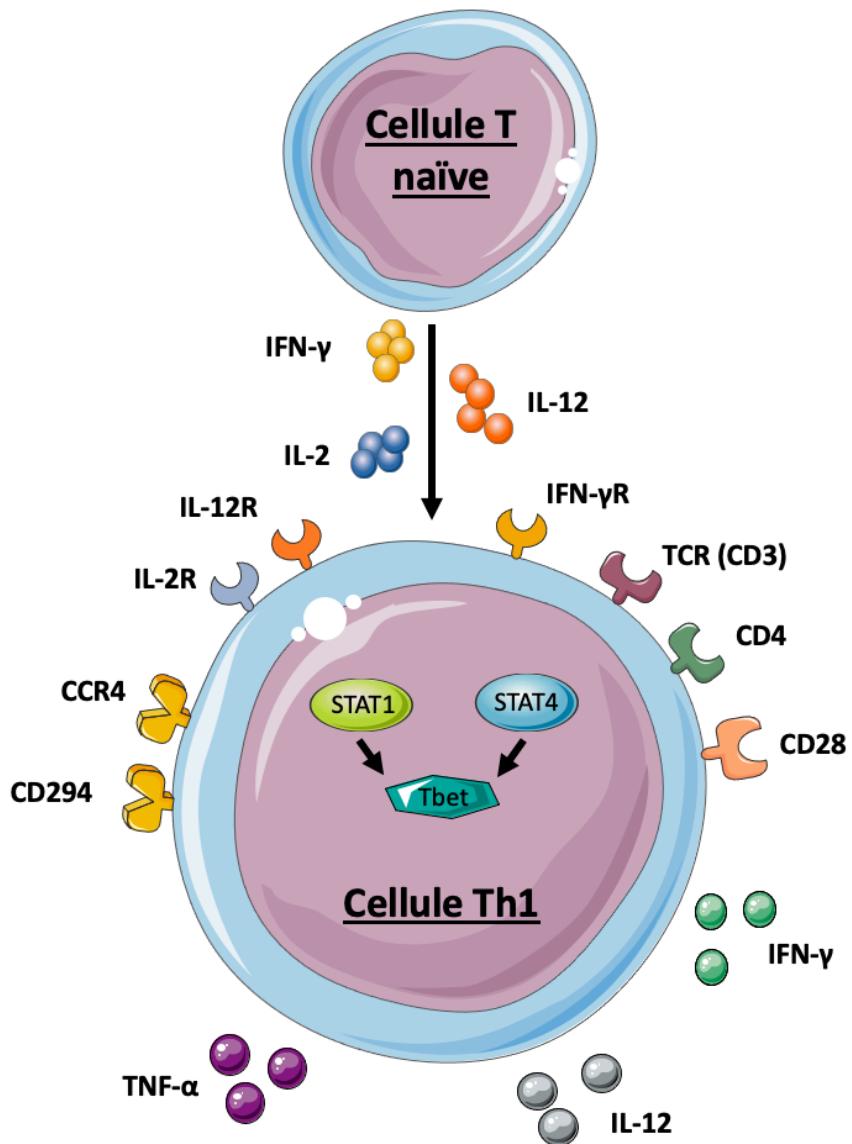


Figure 4 Différenciation des cellules Th1

Ensemble des cytokines produites par les cellules Th1 et nécessaires à leur différenciation. Représentation des marqueurs présents à la surface de ces cellules. Réalisé avec Servier Art.

1.3.7 Les lymphocytes Th2

Les cellules Th2 se différencient grâce à la présence de l'IL-2, produite par les lymphocytes T activés et les DC, et de l'IL-4, produit majoritairement par les basophiles et les cellules NK, dans le microenvironnement (**Figure 5**) (Yoshimoto 2018 ; Zelante et al. 2012). La liaison de l'IL-4 à son récepteur sur les cellules T CD4⁺ déclenche une cascade d'activation qui permet la phosphorylation du facteur de transcription STAT6 par la voie JAK/STAT (Mark H Kaplan 1996 ; Takeda et al. 1996 ; Zhu et al. 2001). La translocation au noyau de STAT6 phosphorylé permet la transcription du gène codant pour GATA3 (GATA-binding protein 3), spécifique de la différenciation des cellules Th2 (Zhu et al. 2006). Pour induire la sécrétion d'IL-4, STAT6 se lie à IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*), le dimère intervient sur des régions promotrices du gène de l'IL-4 (Gao et al. 2013). La liaison du complexe protéique (IRF4/NFATc2 (Nuclear Factor of Activated T cell 2) favorise la transcription du gène *Il4* (Rengarajan et al. 2002). En outre, l'activité transcriptionnelle de GATA3 permet la production d'IL-5 et d'IL-13 (Kozuka et al. 2011 ; Schwenger et al. 2001). La différenciation vers le profil Th2 est étroitement liée à l'expression de GATA3 puisque son inhibition empêche la différenciation vers le type Th2 (W Zheng 1997 ; Pai, Truitt et Ho 2004 ; Zhu et al. 2004). Il a été récemment montré que la régulation des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 est dépendante de l'interaction de GATA3 avec le facteur de transcription Bcl11b (*B cell lymphoma 11b*) (Fang et al. 2018). De plus, GATA3 est participé à l'inhibition du phénotype Th1. Son action bloque l'expression de STAT4 et la transcription du gène *Ifn-γ*, responsable de la différenciation Th1 (Usui et al. 2003). De façon similaire, la phosphorylation de STAT5 est activée par l'IL-2 via la voie JAK/STAT (Cote-Sierra et al. 2004 ; Zhu et al. 2003). L'activation de STAT5 reste indépendante de la production IL-5 par la cellule Th2 et ne conduit pas à l'expression de GATA3, mais reste essentiel à la différenciation du phénotype Th2 puisqu'elle permet le maintien de la prolifération et la survie cellulaire (Owen et Farrar 2017 ; Zhu et al. 2003). Enfin, il a été montré que la protéine NLRP3 (*NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3*) permet la transcription du gène codant pour l'IL-4 par son interaction avec IRF4 avec le locus de ce gène (Bruchard et al. 2015). En outre, dans les cellules Th1 décrites au chapitre 1.3.4 l'expression du facteur de transcription T-bet a pour effet d'inhiber l'expression du gène codant pour l'IL-4 (Zhuang et al. 2009) et le facteur de transcription GATA3 (Hwang et al. 2005).

Les cellules Th2 interviennent dans la voie humorale dirigée contre les pathogènes extracellulaires, comme les bactéries, les parasites et les toxines. Elles agissent en stimulant les lymphocytes B, qui une fois différenciés en plasmocytes, sécrètent des anticorps (Smith et al. 2000). On retrouve à la surface de ces cellules la molécule CCR4 et le récepteur à la prostaglandine D2 (CD294) (Morimoto et al. 2005 ; De Fanis et al. 2007). Les cellules Th2 produisent majoritairement les cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-5 et IL-13 (**Figure 5**). D'autres cytokines, comme IL-9, IL-10 et IL-25 sont également produites par ces cellules (Hartenstein et al. 2002 ; Luckheeram et al. 2012). En outre, les cytokines IL-4 et IL-13, produites par les Th2, permettent d'activer la prolifération des cellules B et favorisent leur production d'anticorps IgE (Z. Li, Zhang et Sun 2011). Ces IgE se lient par leur fragment Fc à des récepteurs présents à la surface des polynucléaires basophiles et des mastocytes. En contact avec l'allergène, ces cellules libèrent une grande quantité de médiateurs, comme l'histamine et la sérotonine (Steinke et Borish 2001). Les cellules Th2 contribuent à la persistance de l'asthme et d'autres pathologies allergiques (Bosnjak et al. 2011 ; Sokol et al. 2009 ; Del Prete 1992). Les cellules Th2 agissent également en coopération avec des cellules de l'immunité innée en activant les macrophages de type M2 et les granulocytes éosinophiles contre les infections aux helminthes (Webb et Tait Wojno 2017 ; Spencer et Weller 2010).

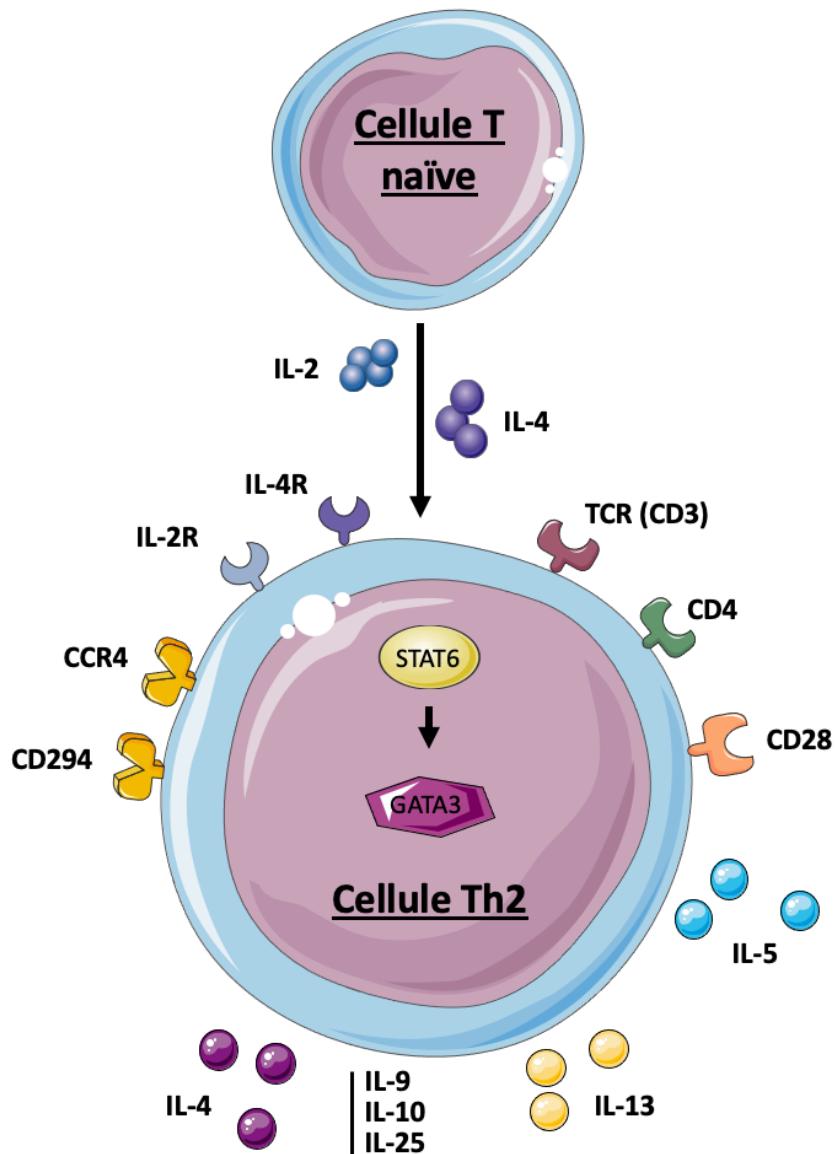


Figure 5 Différenciation des cellules Th2

Ensemble des cytokines produites par les cellules Th2 et nécessaires à leur différenciation. Représentation des marqueurs présents à la surface de ces cellules. Réalisé avec Servier Art.

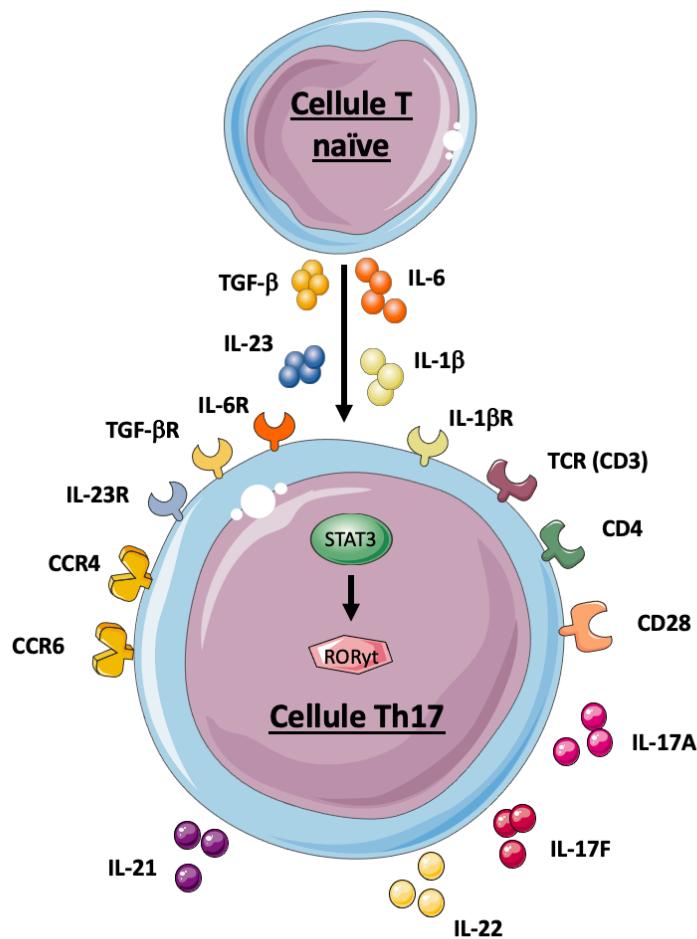
1.3.8 Les lymphocytes Th17

La différenciation des cellules T CD4⁺ en Th17 nécessite l'action de plusieurs cytokines. Leur processus de différenciation peut être séparé en trois étapes : l'initiation, l'amplification et la stabilisation (Bettelli, Korn et Kuchroo 2007). L'initiation de la différenciation des cellules Th17 nécessite à la fois la présence d'IL-6 et de TGF-β (Veldhoen et al. 2006). La production autocrine d'IL-21, par les cellules T CD4⁺ engagées dans la voie de différenciation Th17, est induite par la fixation de l'IL-6 à son récepteur, maintenant ainsi cette différenciation (**Figure 6**). En outre, la production d'IL-21 favorise l'expression du récepteur de l'IL-23, ainsi que le facteur de transcription RORyt (Ivanov et al. 2006 ; L. Zhou et al. 2007). La sécrétion d'IL-23 par les CPA permet donc le maintien et l'expansion des cellules Th17 (Langrish et al. 2005 ; Stritesky, Yeh et Kaplan 2008). La phosphorylation de STAT3, en réponse à la présence des cytokines IL-6, IL-21 et IL-23, augmente l'expression du facteur de transcription RORyt et stimule la production d'IL-17A et d'IL-17F (J. S. Kim et Jordan 2013 ; X. O. Yang et al. 2008). En plus de permettre l'expression de STAT3, les cytokines IL-6, IL-21 et IL-23 induisent l'activation de SOCS3, un des principaux répresseurs de STAT3, essentiel dans le rétrocontrôle des cellules Th17 (Z. Chen et al. 2006 ; Carow et Rottenberg 2014 ; Qin et al. 2009). D'autres mécanismes interviennent également dans la différenciation des cellules T CD4⁺ vers le phénotype Th17. En effet, le facteur de transcription RORα agit conjointement avec RORyt pour favoriser la différenciation Th17 (Castro et al. 2017 ; X. O. Yang et al. 2008). Enfin, d'autres facteurs de transcription, comme le AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) participe aussi à la différenciation des cellules Th17 (Mohinta et al. 2015).

Les cellules Th17 interviennent dans la défense anti-infectieuse en réponse à des bactéries extracellulaires et des champignons (Szulc-Dabrowska et al. 2015 ; Curtis et Way 2009 ; Puel et al. 2011). Leurs propriétés inflammatoires proviennent de leur capacité à produire de l'IL-17A (**Figure 6**), une cytokine considérée comme extrêmement pro-inflammatoire (Ahn et al. 2015). De plus, ces cellules sont caractérisées par la sécrétion d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22 (Dong 2008 ; Coquet et al. 2008 ; Suto et al. 2008). Les cellules Th17 expriment les marqueurs membranaires CCR6 et CCR4 (F. Zhao et al. 2012). Ces cellules contribuent au recrutement des granulocytes neutrophiles au niveau des sites d'infection, via la production d'IL-17A (Flannigan et al. 2017). De plus, la production d'IL-22 par les cellules Th17 permet de renforcer les défenses de l'organisme contre des pathogènes nécessitant une forte réponse inflammatoire pour leur élimination (Aujla et al. 2008 ; Blaschitz et Raffatellu 2010). Enfin, la production d'IL-21 permet

l'activation des cellules NK et des autres cellules T, ainsi que la différenciation des lymphocytes B vers les phénotypes effecteurs et mémoires (Korn et al. 2007 ; Leonard et Spolski 2005 ; Zotos et al. 2010 ; Z. Liu, Yang, et al. 2009).

Il a été montré que les cellules Th17 sont retrouvées dans plusieurs pathologies issues d'un trouble immunitaire, comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le psoriasis (Gaffen 2009 ; Monteleone, Pallone et Monteleone 2011 ; Tokura, Mori et Hino 2010). Malgré le fait que ces cellules soient associées à une réponse pro-inflammatoire, on les retrouve également dans la prolifération de certaines cellules cancéreuses (Muranski et al. 2008 ; Asadzadeh et al. 2017).



Ensemble des cytokines produites par les cellules Th17 et nécessaires à leur différenciation. Représentation

Figure 6 Différenciation des cellules Th17

des marqueurs présents à la surface de ces cellules. Réalisé avec Servier Art.

1.3.9 Les lymphocytes Th22

La différenciation des cellules T CD4⁺ en Th22 est stimulée par les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) présentes dans le derme (Fujita et al. 2009 ; Duhen et al. 2009). Les mécanismes moléculaires permettant la différenciation des cellules Th22 sont encore mal connus. Néanmoins, la présence de l'IL-6 et du TNF-α (**Figure 7**) dans leur microenvironnement est nécessaire pour amorcer leur différenciation (Duhen et al. 2009). Les signaux envoyés par ces cytokines permettent l'expression du facteur de transcription AhR, jouant un rôle dans la différenciation des cellules Th22 (Trifari et al. 2009). Mentionnons pour le moment que le AhR est un facteur de transcription retrouvé dans le cytoplasme sous forme de complexe et jouant un rôle dans l'élimination de nombreux métabolites endogènes et de polluants environnementaux (Larigot et al. 2018), nous verrons cependant cela plus en détail au chapitre 3. L'activation du AhR est primordiale pour la production de l'IL-22 permettant le maintien et l'expansion clonale des cellules Th22. L'IL-22 peut ensuite se fixer à son récepteur hétérodimérique, composé de deux sous unités (IL22-R1 et IL-10R2) induisant la phosphorylation de STAT3 par la voie JAK/STAT (Nagalakshmi et al. 2004).

On retrouve dans les cellules Th22 l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR4, CCR6 et CCR10 (Trifari et al. 2009). Il est à noter qu'on ne retrouve pas d'expression d'IL-23R, CCL20 et CD161, qui sont des marqueurs spécifiques des cellules Th17. L'expression de CCR4 et CCR10 par les cellules Th22 contribue à l'*homing* tissulaire (Y. Kim et al. 2017 ; Boniface et al. 2005).

Les cellules Th22, comme les cellules Th17, sont capables de produire de l'IL-22 (**Figure 7**), mais contrairement à ces dernières, les cellules Th22 ne produisent pas d'IL-17 (Eyerich et al. 2009). Ces cellules peuvent également sécréter de l'IL-13, de l'IL-26 et du TNF-α (Plank et al. 2017 ; Sugita et al. 2013 ; Cui 2019). Bien que l'IL-22 soit la cytokine sécrétée majoritairement par les cellules Th22, d'autres types cellulaires comme les cellules Th1, Th17, les cellules lymphoïdes innées et les cellules T non conventionnelles peuvent également en produire (Felton et al. 2018 ; Scriba et al. 2008 ; Behrends et al. 2013). L'IL-22 intervient au niveau des plaies de la peau, c'est pourquoi on retrouve les cellules Th22 dans l'épiderme inflammatoire (Cheuk et al. 2014). D'autre part, l'IL-22 possède des propriétés de défense dans les muqueuses, notamment par l'induction de β-défensines, des peptides antimicrobiens (Wozniak et al. 2014 ; A. Li et al. 2015).

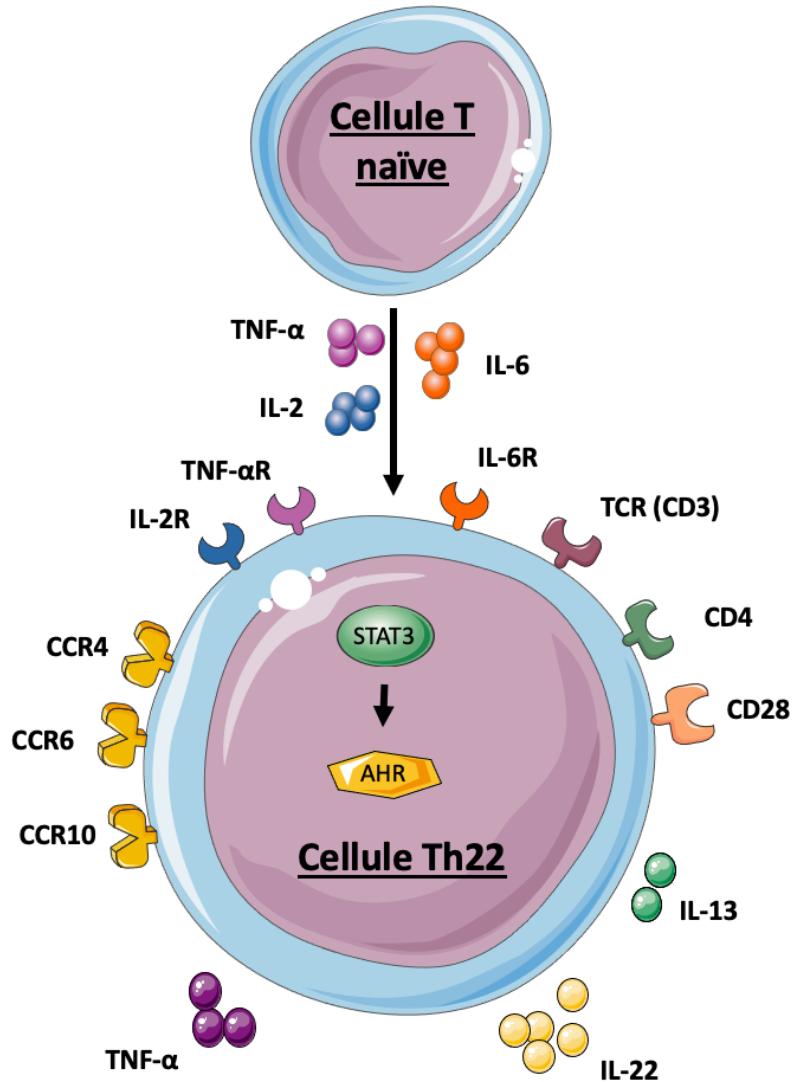


Figure 7 Différenciation des cellules Th22

Ensemble des cytokines produites par les cellules Th22 et nécessaires à leur différenciation. Représentation des marqueurs présents à la surface de ces cellules. Réalisé avec Servier Art.

1.3.10 Les lymphocytes T régulateurs

Les recherches de Nishizuka et Sakakura ont montré que l'ablation du thymus chez des souris trois jours après leur naissance induisait le développement de maladies auto-immunes, mais que la greffe d'un nouveau thymus permettait de prévenir le développement de ces pathologies (Nishizuka et Sakakura 1969). Leurs travaux ont permis de montrer que des cellules provenant du thymus peuvent prévenir le développement de maladies auto-immunes. À contre-courant du paradigme Th1/Th2, une nouvelle population de cellule T CD4⁺ fût séparée de ce groupe, par la présence d'une chaîne α sur le récepteur à L'IL-2 (CD25). Il a aussi été montré, que le transfert de cellules CD4⁺CD25⁺ chez des souris dépourvues de thymus permettait de prévenir le développement de pathologies auto-immunes (Sakaguchi et al. 1995). Cette population, caractérisée par ces marqueurs de surface, a été nommée lymphocytes T régulateurs (Treg) et représente environ 5 % des cellules T CD4⁺ (Baecher-Allan et al. 2001).

Les Treg jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'immunité (Fehervari et Sakaguchi 2004). On distingue plusieurs types cellulaires différents pouvant exercer cette fonction. Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) et T induits (iTreg) sont les populations cellulaires majoritaires que nous décrirons dans cette section.

1.3.10.1 Les lymphocytes T régulateurs naturels

La différenciation des lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) se fait dans le thymus, leur conférant ainsi une reconnaissance spécifique des antigènes du soi (Hsieh et al. 2004).

Ces cellules sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription FoxP3 (*forkhead transcription factor 3*). Une mutation de ce facteur de transcription induit le développement de multiples maladies auto-immunes (d'Hennezel et al. 2009) suggérant que ces cellules jouent un rôle indispensable dans l'immunité. De plus, l'expression de ce facteur de transcription est déterminante dans le rôle suppressif de l'inflammation par les Treg. En effet, il a été montré que l'expression ectopique de FoxP3 dans des cellules CD4⁺CD25⁻ (non Treg) leur confèrent un rôle suppressif (Hori, Nomura et Sakaguchi 2003 ; Fontenot, Gavin et Rudensky 2017 ; M. R. Walker et al. 2003). En outre, les cellules T CD4⁺ activées peuvent également exprimer FoxP3 succinctement sans pour autant acquérir des fonctions suppressives (M. R. Walker et al. 2003 ; Tran, Ramsey et Shevach 2007 ; Allan et al. 2007).

Il a été clairement établi que les nTreg jouent un rôle central dans le maintien de la tolérance immune (M. J. Barnes et Powrie 2009 ; Josefowicz et Rudensky 2009 ; Wing et Sakaguchi 2010). On retrouve dans les cellules Treg une expression constitutive de la molécule CTLA-4, une surexpression des molécules ICOS et ainsi que de PD-1 (Vocanson et al. 2010 ; L. S. Walker 2013 ; Cai et al. 2019 ; Shen et al. 2011). Chez les lymphocytes T régulateurs, le CTLA-4 interagit avec les marqueurs CD80/CD86 présent à la surface des DC (L. S. Walker 2013). Cette interaction entraîne une diminution de ce complexe de co-stimulation et favorise la production d'IDO (*indoléamine 2,3-dioxygenase*) (Hryniwicz et al. 2006). L'augmentation d'IDO provoque le catabolisme du tryptophane, essentiel aux cellules, et produit ainsi de la kynurénine, une molécule toxique pour les cellules (Fallarino et al. 2003). De plus, la production d'IDO induit un blocage de la voie de différenciation en cellules Th17 (Baban et al. 2009). Les cellules Treg expriment également à leur surface des récepteurs aux chimiokines CCR4, CCR6 et CCR8 (Iellem et al. 2001 ; Yamazaki et al. 2008). Enfin, les cellules Treg produisent de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Maynard et Weaver 2008). Toutes ces caractéristiques confèrent aux nTreg de fortes capacités à réguler les autres cellules immunitaires (Barsheshet et al. 2017 ; Workman et al. 2009).

Comme les nTreg sont formées dans le thymus, ces cellules ne nécessitent pas de signaux de différenciation une fois dans le système sanguin périphérique, contrairement aux cellules T régulatrices induites (iTreg).

1.3.10.2 **Les lymphocytes T régulateurs induits**

Les cellules T régulatrices induites (iTreg) sont issues des lymphocytes T CD4⁺ naïfs de la périphérie (Baecher-Allan et al. 2001). Tout comme les cellules nTreg, les cellules iTreg expriment Foxp3, ainsi que CD25 et CCR4 à leur surface.

La différenciation des cellules T CD4⁺ naïves vers le phénotype iTreg est induit par l'exposition de ces cellules à de l'IL-2 et du TGF-β (**Figure 8**) (W. Chen et al. 2003 ; Guo et al. 2013). Le TGF-β intervient également dans la différenciation des cellules Th17 (S. G. Zheng 2013). Les effets de cette molécule sur la différenciation des cellules T CD4⁺ dépendent de sa concentration dans le microenvironnement (Zhu, Yamane et Paul 2010). La stimulation des récepteurs par le TGF-β permet l'expression de Foxp3, responsable de la fonction immunosuppressive des cellules Treg (W. Chen et al. 2003). La sécrétion du TGF-β par les

cellules iTreg permet la mise en place d'une boucle autocrine de stimulation de cette voie de différenciation. Durant la cascade d'activation induite par le TGF- β les protéines Smad2 et Smad3 sont activées pour permettre l'expression de Foxp3 (Lu et al. 2010). En outre, l'activation de Smad3 permet de bloquer l'expression de ROR γ t et ainsi bloquer la différenciation vers le phénotype Th17 (Martinez et al. 2009). Le facteur de transcription STAT5 est phosphorylé après la fixation de l'IL-2 à son récepteur et induit l'expression de Foxp3. De plus, la forme phosphorylée de STAT5 rentre en compétition avec STAT3 pour la liaison sur le promoteur de l'IL-17A et ainsi empêche la différenciation en cellule Th17 (L. Zhou et al. 2008). L'expression de DNMT1 (*DNA (cytosine-5)-MethylTransferase 1*) et de DNMT3 β (*DNA (cytosine-5)-MethylTransferase 3 β*) à la suite d'une activation du TCR permet une méthylation du locus *foxp3*, inhibant sa méthylation (Lal et al. 2009). La voie d'activation du TGF- β permet de bloquer la liaison de DNMT1 au locus Foxp3, permettant la différenciation en cellule iTreg (C. Li, Ebert et Li 2013). La différenciation des cellules iTreg repose donc sur un équilibre de ces différents signaux, étant donné qu'elle est étroitement liée à la différenciation des cellules Th17(Diller et al. 2016).

Les cellules iTreg produisent de l'IL-10, de l'IL-35 et du TGF- β (**Figure 8**), des cytokines connues pour être immunosuppressives (Olson, Sullivan et Burlingham 2013 ; Schmitt et al. 2012 ; S. G. Zheng 2008). À la suite de l'élimination d'un pathogène, ces cellules restreignent la réponse cellulaire, afin d'éviter un emballement de la réponse immunitaire. Par exemple, l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui peut supprimer la réponse des cellules Th1, des cellules NK et des macrophages (Couper, Blount et Riley 2008). Elles jouent donc un rôle dans le maintien de l'homéostasie et la tolérance immunitaire (Fujio, Okamura et Yamamoto 2010 ; Sakaguchi et al. 2006).

Parmi les cellules iTreg, on peut distinguer plusieurs populations de cellules : les cellules Th3, les cellules Tr1 et plus récemment les cellules iT35. Les cellules Th3 ont d'abord été identifiées parmi les cellules T CD4 $^{+}$ des ganglions mésentériques sous une forme de clones unicellulaire produisant du TGF- β 1 (Y. Chen et al. 1994). Des recherches ont montré que des lymphocytes T régulateurs CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ LAP $^{+}$ FoxP3 $^{-}$, correspondant aux iTreg, pouvaient protéger du développement de colites induites par les cellules T chez la souris (Oida et al. 2003). Les cellules CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ CD69 $^{+}$ LAP $^{+}$ FoxP3 $^{-}$, correspondant aux Th3, expriment la chaîne β du récepteur à l'IL-2, produisent de TGF- β 1 et exercent une activité fonctionnelle médiée par le TGF- β 1 (Han et al. 2009). Les cellules Th3秘ètent également de l'IL-10 en plus petite quantité (Y. Chen et al. 1994). L'ensemble de ces caractéristiques confère aux cellules Th3 la capacité de réprimer les réponses Th1 et Th2 (Weiner et al. 2011). Pour les cellules Tr1, celles-ci sont

caractérisées par la coexpression des marqueurs de surface CD49b et du gène d'activation des lymphocytes 3 (LAG3), ainsi que par la production d'IL-10 et la sécrétion de TGF- β et d'IL-2 (Gagliani et al. 2013). Les cellules Tr1 sont capables de supprimer les réponses naïves et mémoires des cellules Th1 et Th2 par leurs mécanismes de production en cytokines (Groux 2003). Enfin les cellules iT35 constituent une population de cellules immunosuppressives n'exprimant pas le marqueur Foxp3 et ne sécrétant pas d'IL-10. (Collison et al. 2007). Leur fonction suppressive est exercée par la sécrétion de l'IL-35 (Collison et al. 2010).

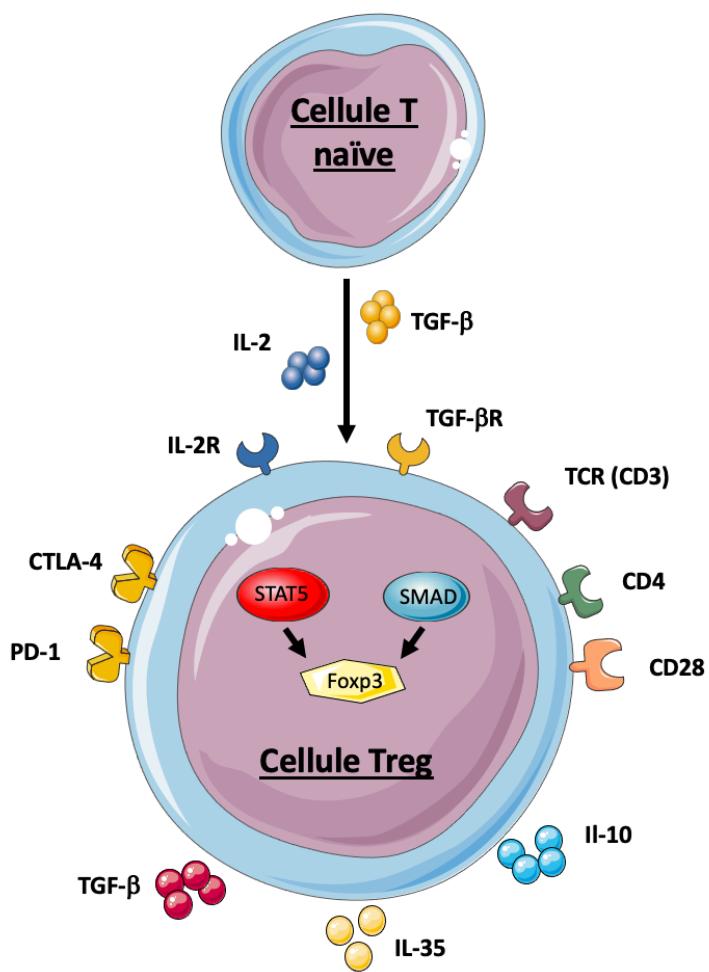


Figure 8 Différenciation des cellules iTreg

Ensemble des cytokines produites par les cellules Treg nécessaires à leur différenciation. Représentation des marqueurs présents à la surface de ces cellules. Réalisé avec Servier Art.

1.4 Plasticité développementale des lymphocytes T CD4⁺

La plasticité développementale des cellules T CD4⁺ est un mécanisme majeur dans le bon déroulement des fonctions effectrices de ces cellules. En effet, nous avons vu que les cellules Th1 et Th2 possèdent des voies de différenciation spécifique, mais il a été montré que ces cellules étaient capables, dans certaines conditions, de modifier leur différenciation. En effet, il a été montré que chez la souris, des cellules Th1 différencierées *in vitro* en présence d'IL-12 et d'anticorps anti-IL-4 pouvaient par la suite se différencier vers un phénotype Th2 si les cellules Th1 étaient restimulées en présence d'IL-4 (Zhu et al. 2004). De même, la différenciation des cellules Th2 *in vitro* en présence d'IL-4 et d'anticorps anti-IL-12 peut être dirigée vers le phénotype Th1 par une nouvelle stimulation en présence d'IL-12 (Murphy et al. 1996). Dans l'organisme, la plasticité entre les cellules Th1 et Th2 peut être observée très tôt, après l'activation des cellules T CD4⁺ naïves puisque la production d'IFN-γ et d'IL-4 peut être faite simultanément (Krawczyk, Shen et Pearce 2007). De plus, *in vitro*, les cellules Th1 et Th2 peuvent perdre leur plasticité après de nombreuses stimulations (Sundrud et al. 2003). En outre, la plasticité développementale de ces cellules se révèle également moins permisable dans un état de différenciation plus avancé, suggérant que la maturation des cellules T CD4⁺ diminue la flexibilité de leur plasticité (Murphy et al. 1996).

Les premières études ayant voulu montrer la plasticité des cellules Th17 ont établi que ces cellules produisaient de l'IL-17, leur cytokine fonctionnelle spécifique, mais également de IFN-γ spécifique aux cellules Th1 (Ivanov et al. 2006). Pour comprendre l'origine de ces cellules (IL-17⁺ IFN-γ⁺), il a été montré que la restimulation *in vitro* de cellules Th17 murines par de l'IL-12 augmente l'expression du facteur de transcription T-bet associé à la production d'IFN-γ, ainsi que la perte d'expression de RORyt et la production d'IL-17 (Y. K. Lee et al. 2009). *In vivo*, le transfert de cellules T CD4⁺ différencierées en cellules Th17 dans un modèle de souris atteint d'un diabète de type 1 permet également d'obtenir dans ces cellules des caractéristiques attribuées aux cellules Th1 comme la production d'IFN-γ (Bending et al. 2009). D'autre part, chez l'homme, des cellules T CD4⁺ différencierées en cellules Th17 pouvaient également être reprogrammées en cellules Th1 après une stimulation par IL-12 (Annunziato et al. 2007). Les cellules Th17 peuvent également se différencier vers le phénotype Th2 par une restimulation en présence d'IL-4, qui serait responsable de leur plasticité dans ce contexte (Raymond et al. 2011 ; Cosmi et al. 2010). De plus, il a été retrouvé, dans le sang de patients asthmatiques, des cellules qui présentent une expression à la fois de GATA3 et RORyt, ainsi que les cytokines IL-17, IL-22, IL-4, IL-5 et IL-13

(Y. H. Wang et al. 2010 ; Cosmi et al. 2010). L'étude de ces cellules dans un modèle murin présentant une pathologie allergique pulmonaire a montré une aggravation des symptômes. En effet, ces cellules sont plus pathogéniques en excrétant une grande quantité de molécules inflammatoires induisant ainsi le recrutement de leucocytes pro-inflammatoires et provocant une exacerbation de l'asthme (Y. H. Wang et al. 2010). Ainsi, on voit que les cellules Th17 sont capables de changer leur différenciation vers les phénotypes Th1 et Th2. En revanche, aucune étude, à ce jour, n'a montré la possibilité de convertir des cellules Th1 et Th2 *in vitro* vers un phénotype Th17 (Lexberg et al. 2008). Les caractéristiques hybrides observées dans ces cellules sembleraient donc prévenir uniquement de cellules dérivées du phénotype Th17. En outre, les conditions nécessaires à la conversion des cellules Th1 et Th2 vers le phénotype Th17 n'ont peut-être pas été encore découvertes.

Les cellules T régulatrices, décrites plus haut (Section 1.3.3), sont divisées en deux sous-populations, les cellules nTreg et les cellules iTreg. Par contre, il a été montré qu'il existait une plus large hétérogénéité parmi les cellules T régulatrices périphériques. Elles sont capables d'exprimer à la fois le Foxp3 et d'autres facteurs de transcription spécifiques aux cellules T effectrices. Ainsi, ces lymphocytes T peuvent posséder des caractéristiques fonctionnelles spécifiques ou bien correspondre à des états intermédiaires dans des voies de différenciation ou de reprogrammation des Treg. En effet, les cellules Treg Foxp3⁺ peuvent perdre l'expression du Foxp3 et leur capacité régulatrice quand leur TCR est stimulé de manière répétitive (Hoffmann et al. 2009). Par exemple, dans un modèle murin de diabète auto-immun, des cellules Treg ayant perdu l'expression de Foxp3 présentaient des spécificités des cellules T effectrices et mémoires (Kitz et Dominguez-Villar 2017 ; X. Zhou et al. 2009). De plus, le transfert de cellules Treg chez des souris déficientes en lymphocytes induit une perte d'expression de Foxp3 pour ces cellules, ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-2 et donc la perte de ces fonctions suppressives (Duarte et al. 2009).

Les cellules Th17 et cellules Treg partagent partiellement une partie de leur programme de différenciation. En effet, la présence de TGF-β, dans le microenvironnement des cellules T CD4⁺ naïves, permet de déclencher la différenciation vers le phénotype T régulateur, mais l'ajout d'autres cytokines comme l'IL-6 et l'IL-21 en plus du TGF-β permet dans ce cas d'inhiber la différenciation vers le phénotype Treg pour favoriser la différenciation Th17. Il a également été montré que plusieurs autres facteurs peuvent réguler la différenciation des cellules T CD4⁺ vers les profils Th17 et Treg, c'est notamment le cas pour l'acide rétinoïque et le facteur de

transcription AhR, qui sera décrit plus en détail dans le chapitre 3 (Mucida et al. 2007 ; Veldhoen et al. 2008 ; Quintana et al. 2008).

CHAPITRE 2 LYMPHOCYTES T ET LEURS RÔLES DANS LES PATHOLOGIES

2.1 Les cancers

2.1.1 Capacité protumorale des cellules Th2

Plusieurs études menées sur les cellules Th2 ont montré leurs capacités à favoriser le développement des cellules cancéreuses, notamment grâce à leur production de cytokines. En effet, la production d'IL-4 et d'IL-13 par les cellules Th2 permet la différenciation des macrophages présents dans l'environnement tumoral vers un phénotype M2, connus pour leur rôle pro-tumoral (Aspord et al. 2007 ; DeNardo et al. 2009 ; Mantovani et al. 2008). Effectivement, une forte infiltration de macrophages est bien souvent associée à un mauvais pronostic dans plusieurs cas de cancers (Fridman et al. 2012 ; Lewis et Pollard 2006). La production d'IL-4 diminue également l'activité anti-tumorale des cellules T CD8 cytotoxiques (Olver et al. 2013). D'autre part, de nombreuses cellules cancéreuses possèdent des récepteurs à l'IL-4 à leur surface, pouvant ainsi promouvoir des mécanismes pro-tumoraux, tels que la résistance à l'apoptose (Z. Li et al. 2008).

2.1.2 Ambivalence des cellules Th17 dans l'environnement tumorale

Le rôle des cellules Th17 dans l'immunomodulation du cancer n'est pas encore clairement établi. En effet, plusieurs études ont montré des résultats contradictoires, mais qui pourrait être lié au type de tumeur étudié et à la composition de son microenvironnement (**Tableau 1**) (Fridman et al. 2012).

Il a été rapporté que les cellules Th17 pouvaient favoriser l'immunosuppression tumorale. Les cellules Th17 infiltrées dans l'environnement tumoral produisent de l'IL-17 qui stimule la production du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), permettant ainsi l'augmentation de la vascularisation tumorale (Berger et al. 2013 ; Chung et al. 2013). Il a été montré que la présence d'IL-17 dans l'environnement tumoral est corrélée avec l'augmentation de la densité des microvaisseaux tumoraux (J. W. Du et al. 2012 ; Numasaki et al. 2003). De plus, la lymphangiogenèse est aussi favorisée par la présence d'IL-17, facilitant ainsi l'invasion métastatique des ganglions lymphatiques (Q. Li et al. 2012). D'autre part, les macrophages

recrutés par la production d'IL-17 augmentent la présence d'IL-6 retrouvée dans le microenvironnement et permettent ainsi d'activer STAT3, favorisant la progression tumorale (Fossiez et al. 1996 ; L. Wang et al. 2009). Dans un modèle de carcinogenèse induite par le 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), la production d'IL-17 favorise également la progression tumorale (L. Wang et al. 2010). Aussi, l'IL-17 permet l'expression de gènes de survie dans les cellules cancéreuses (Fabre et al. 2016). Bien que l'IL-17 joue un rôle dans la tumorigénèse de certains cancers, d'autres cytokines produites par les cellules Th17 semblent également intervenir défavorablement dans la progression de ces pathologies. C'est notamment le cas de l'IL-22, qui favorise la progression tumorale dans le cancer du côlon (Kryczek et al. 2014 ; R. Jiang et al. 2013). En effet, l'absence de l'IL-22BP (*IL-22 Binding Protein*), un récepteur soluble de l'IL-22 permettant sa neutralisation, induit la mise en place d'une inflammation persistante qui contribue à la progression tumorale dans un modèle expérimental de colite (Huber et al. 2012). De plus, la production d'adénosine résultant de l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 par les cellules Th17 permet la mise en place d'un phénomène d'immunosuppression. Cette action suppressive est modulée par l'activation de STAT3 en réponse à la stimulation par l'IL-6 et l'inhibition de Gfi-1 (*Growth factor independence 1*) par le TGF β (Chalmin et al. 2012).

En revanche, beaucoup d'autres études ont au contraire montré des propriétés anti-tumorales des cellules Th17. C'est notamment le cas dans le cancer de la prostate où un infiltrat riche en cellules Th17 est corrélé avec un stade clinique moins avancé (Sfanos et al. 2008). Il est également retrouvé dans le cancer ovarien une infiltration de cellules NK, cellules T CD8 et cellules Th1 qui corrèle avec l'augmentation de l'IL-17 dans l'environnement tumorale et donc un meilleur pronostique (Kryczek, Banerjee, et al. 2009). Les cellules NK et des cellules T CD8 produisent de l'IFN- γ en réponse à l'IL-21 des cellules Th17. La production d'IFN- γ induit le recrutement de cellules Th1 ayant des fonctions anti-tumorales (Nunez et al. 2013 ; Nishimura et al. 2000). Il a été rapporté que l'expression de l'IL-17 par certaines cellules cancéreuses pouvait inhiber la croissance tumorale et la formation de métastases (Tong et al. 2012 ; Kryczek, Wei, et al. 2009 ; Benchetrit et al. 2002).

On retrouve donc un rôle très opposé des cellules Th17 dans certains contextes tumoraux. Certaines cellules Th17 sont caractérisées par des fonctions immuno-suppressives, notamment dans un environnement riche en TGF- β et IL-6. On retrouve dans ces cellules, co-exprimant CD39 et CD73, un phénotype ROR γ t $^+$ Foxp3I low IL-10 $^+$ (Downs-Canner et al. 2017 ; J. Ye, Livergood et Peng 2013). En revanche, d'autres cellules Th17 acquièrent des propriétés anti-tumorales en présence d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-23 et sont caractérisées comme étant ROR γ t $^+$ T-bet $^+$ IFN- γ $^+$

(Bailey et al. 2014). Il existe donc pour les cellules Th17 une plasticité développementale complexe pouvant modifier leur rôle dans les cancers.

2.1.3 Rôle pro-tumoral des cellules Tregs

De par leurs propriétés immunsuppressives, les cellules Treg participent fortement à l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale (**Tableau 1**) (Menetrier-Caux et al. 2012 ; Ladoire, Martin et Ghiringhelli 2011). Une augmentation de l'infiltration des cellules Treg dans l'environnement tumoral est souvent associé à un mauvais pronostique dans beaucoup de cancers (Y. Zhou et al. 2017 ; Shang et al. 2015).

L'hypoxie générée dans l'environnement tumoral permet l'expression du facteur chimioattractant CCL28 qui induit le recrutement de cellules Treg CCR10⁺ et l'établissement d'un environnement suppressif (Ren et al. 2016). De plus, l'hypoxie augmente la production de VEGF par les cellules Treg qui favorisent le développement tumoral (Facciabene et al. 2011). D'autre part, les macrophages associés aux tumeurs produisent du CCL20, permettant le recrutement de cellules Tregs CCR6⁺ (J. Liu et al. 2011). Les cellules Treg recrutées dans l'environnement tumoral produisent des cytokines immunsuppressives, comme le TGF-β, l'IL-10 et l'IL-35 (Stewart et al. 2013 ; Donkor, Sarkar et Li 2012 ; Xue, Yan et Kan 2019). De plus, l'expression du CD39 et CD73 par les iTreg permet également la production d'adénosine immunsuppressive qui inhibe l'action des autres cellules T CD4⁺ (Allard et al. 2017). D'autre part, l'utilisation massive de l'IL-2 du microenvironnement par les cellules iTreg pour leur différenciation contribue également à l'immunosuppression. En effet, l'IL-2 est nécessaire pour l'activation des cellules NK, des cellules T CD8 cytotoxiques et cellules T CD4⁺ pro-inflammatoires dans la réponse antitumorale (Pandian et al. 2007). Néanmoins, dans certains cas de cancer, l'infiltration élevée en cellules Treg peut être associée à un meilleur pronostique, comme dans les cancers colorectaux et les cancers de l'œsophage (Shang et al. 2015). La capacité des cellules Treg à contrôler l'inflammation et la réponse immunitaire antimicrobienne, ainsi que leur capacité à inhiber la prolifération des cellules Th17 peut expliquer leur rôle dans le pronostic favorable de ces cancers (Ladoire, Martin et Ghiringhelli 2011 ; Crome et al. 2010).

2.1.4 Émergence du rôle des cellules Th22 dans les cancers

Les cellules Th22 interviennent principalement dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et immunitaire lors de l'inflammation (Basu et al. 2012). Certains processus inflammatoires peuvent favoriser le développement tumoral. C'est le cas de l'IL-22 qui favorise la croissance tumorale dans de nombreux types de cancers (R. Jiang et al. 2011 ; Khosravi et al. 2018). De plus, chez des patients atteints de cancer gastrique, une augmentation des cellules Th22 corrèle avec l'aggravation du stade de la maladie (T. Liu et al. 2012 ; X. Chen et al. 2018). D'autre part, il a été montré que dans le cancer du côlon, l'IL-22 favorise l'expression de l'oxyde nitrique synthase par les cellules cancéreuses du colon. En effet, la production de nitrite est fortement associée à l'inflammation du colon et à la carcinogenèse (Ziesche et al. 2007). En outre, l'IL-22 peut également stimuler les cellules épithéliales intestinales qui sécrètent de l'IL-10 et contribuent à la mise en place d'un environnement immunosuppresseur (Cella et al. 2009).

Tableau 1 Corrélation entre le sous-type de cellule T CD4⁺ infiltrant et le pronostic clinique.
Adapté de Fridman (Fridman et al. 2012)

Type de cancer	Cellules Th1	Cellules Th2	Cellules Th17	Cellules Th22	Cellules Treg
Mélanome					Aucun Mauvais
Cancers de la tête et du cou			Aucun		Bon
Cancer du sein	Bon Aucun	Bon Aucun			Aucun Mauvais
Cancer de la vessie					Bon
Cancer des ovaires	Bon	Mauvais	Bon		Bon Mauvais
Cancer de l'œsophage	Bon		Bon		
Cancer colorectal	Bon	Aucun	Mauvais		Bon Aucun
Carcinome à cellules rénales	Bon				Mauvais
Adénocarcinome prostatique					
Carcinome pulmonaire	Bon		Mauvais		Mauvais
Cancer du pancréas		Mauvais			Mauvais
Cancer du col utérin					
Carcinome épidermoïde anal	Bon				Aucun
Cancer du cerveau	Bon				Aucun
Carcinome hépatocellulaire	Bon		Mauvais		Mauvais
Cancer de l'estomac		Mauvais	Bon		
Médulloblastome					
Carcinome à cellules de Merkel					
Carcinome à cellules urothéliales					
Lymphome folliculaire et lymphome de Hodgkin		Bon			Bon Aucun Mauvais

2.2 Maladies auto-immunes

2.2.1 Implication des cellules Th1 dans l'auto-immunité

L'implication des cellules Th1 dans l'auto-immunité a d'abord été décrite dans le développement de maladies auto-immunes spécifiques aux organes (Liblau, Singer et McDevitt 1995). Le rôle des cellules Th1 dans la mise en place d'une auto-immunité a été montré à partir de modèles de maladie chez la souris. En effet, chez la souris le transfert adoptif de cellules exprimant le phénotype Th1 induit le développement d'une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC). De plus, on retrouve dans les lésions inflammatoires du SNC la présence en grande quantité d'IFN- γ , une cytokine produite majoritairement par les cellules Th1 (Pettinelli et McFarlin 1981 ; Domingues et al. 2010). En outre, le traitement de souris avec de l'IL-12, qui favorise le développement en cellules Th1, aggrave l'arthrite induite par le collagène, une autre maladie auto-immune (Germann et al. 1996).

Diverses observations épidémiologiques et cliniques ont suggéré que les cellules Th1 joueraient un rôle dans le maintien de la polyarthrite rhumatoïde (PR). Il a notamment été montré chez des femmes atteintes de PR, que la grossesse améliorait les symptômes dans 75 % des cas (Da Silva et Spector 1992). La grossesse étant caractérisée par la production importante de cytokines anti-inflammatoires de type Th2 inhibant ainsi la réponse immunitaire Th1 (Reinhard et al. 1998). De plus, on observe une réapparition des symptômes de la PR environ six mois après l'accouchement dans près de 90 % des cas (Da Silva et Spector 1992 ; Mishan-Eisenberg et al. 2004).

2.2.2 Rôle des cellules Th17 dans les maladies auto-immunes

Il a été montré que les cellules Th1 contribuent au développement de l'EAE murine (Lalor et Segal 2013). Des études réalisées par la suite ont montré que les cellules Th17 pouvaient être de meilleurs candidats dans le développement de cette pathologie (Domingues et al. 2010). L'IL-12 permettant la différenciation en cellules Th1 et l'IL-23 participant à la différenciation des cellules Th17, sont des interleukines hétérodimériques qui partagent la même sous-unité p40 (Lyakh et al. 2008). Lors d'un essai clinique de phase 1 pour le traitement du psoriasis, le succès obtenu après l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-12p40 a été attribué à tort à

l'inhibition des cellules Th1 (Kauffman et al. 2004). En effet, il a été montré dans le modèle EAE, que c'était l'IL-23 et non l'IL-12 qui contribuait à sa pathogénicité (Cua et al. 2003).

Bien avant la découverte des cellules Th17, des études menées sur la sclérose en plaques ont montré une corrélation positive entre la progression de la maladie et la présence d'IL-17, d'IL-6 et de G-CSF (Lock et al. 2002). De plus, les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique expriment des récepteurs à l'IL-17 et IL-22 permettant ainsi à ces cytokines de perturber leurs jonctions (Kebir et al. 2007). Il a été également montré que les cellules Th17 pouvaient migrer à travers les cellules de la barrière hématoencéphalique et ainsi favoriser l'inflammation par le recrutement d'autres cellules T CD4⁺ pro-inflammatoires et en sécrétant des cytokines inflammatoires (Kebir et al. 2007). Enfin, d'autres études ont par la suite montré une corrélation positive de la progression de la sclérose en plaques et la présence de cellules Th17 (Tzartos et al. 2008 ; Matusevicius et al. 1999). C'est pourquoi la différenciation des cellules Th17 est bien souvent associée au développement de ces pathologies auto-immunes (Waite et Skokos 2012).

CHAPITRE 3 LE RÉCEPTEUR AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES

3.1 Historique

Durant leur existence, les organismes vivants sont exposés à une multitude de composés toxiques qui peuvent être retrouvés dans l'air, l'eau ou la nourriture (Kennedy et Tierney 2012). En réponse à ces menaces, des mécanismes de défense de ces organismes ont évolué. Ces mécanismes permettent la détection, la transformation et l'élimination des composés toxiques (Kennedy et Tierney 2012). Notamment, on retrouve un grand nombre d'enzymes participant à ces mécanismes, comme des monooxygénases, des transporteurs de la famille ABC (ATP Binding Cassette) (Deeley, Westlake et Cole 2006). L'action de ces enzymes dépend d'autres récepteurs, comme le PXR (*Pregnane X Receptor*) ou encore le AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) (Larigot et al. 2018).

La première découverte du AhR a été faite par l'équipe du Dr Nebert en 1976, évoquant la possibilité que son activation permet l'expression d'enzymes avec une activité « aryl-hydrolase » (Poland, Glover et Kende 1976). Par la suite, le AhR a été classé comme un facteur de transcription appartenant à la classe 1 de la famille bHLH/PAS (basic-Helix-Loop-Helix/PER-ARNT-SIM) (Kolonko et Greb-Markiewicz 2019). Les membres de la classe 1 ont la particularité de ne pas pouvoir former d'homodimère ou d'hétérodimère entre les membres de cette même classe (Kolonko et Greb-Markiewicz 2019). Ainsi, pour pouvoir effectuer leurs fonctions, ces protéines doivent se dimériser avec un membre de classe 2 comme l'ARNT (*Aryl hydrocarbon receptor Nuclear Translocator*). On retrouve dans les membres de cette famille, plusieurs protéines intervenant dans de multiples voies de signalisation. Par exemple, dans la réponse aux polluants environnementaux, le développement neural, l'hypoxie ou encore le rythme circadien. Dans les années 90, les protéines responsables de la voie de signalisation du AhR ont été caractérisées à la suite de leur clonage (Hoffman et al. 1991 ; Burbach, Poland et Bradfield 1992). La fonction principale du AhR est d'induire la synthèse d'enzymes métaboliques qui permettent l'élimination des xénobiotiques.

Les xénobiotiques sont définis comme étant des molécules étrangères à l'organisme, qui du fait de leur petite taille et/ou de leurs propriétés lipophiles peuvent diffuser de manière passive à travers la membrane plasmique des cellules (Lundgren et DePierre 1990). L'entrée de ces molécules dans le cytoplasme permet leur détection par des récepteurs, tels que le AhR. Ces

récepteurs sont des facteurs de transcriptions qui entraînent l'expression de différentes enzymes, notamment de la famille p450, nécessaires à la transformation et l'élimination des xénobiotiques (Larigot et al. 2018).

3.2 Structure du AhR

Le AhR humain est constitué de 850 acides aminés pour un poids moléculaire de 96 kDa. On retrouve dans ce facteur de transcription trois domaines principaux : le domaine *basic helix-loop-helix* (bHLH), le domaine *Per/Arnt/Sim* (PAS) et le domaine de transactivation, responsable de la liaison à l'ADN, à son ligand, aux protéines Hsp90 ou encore à la formation d'un dimère (**Figure 9**).

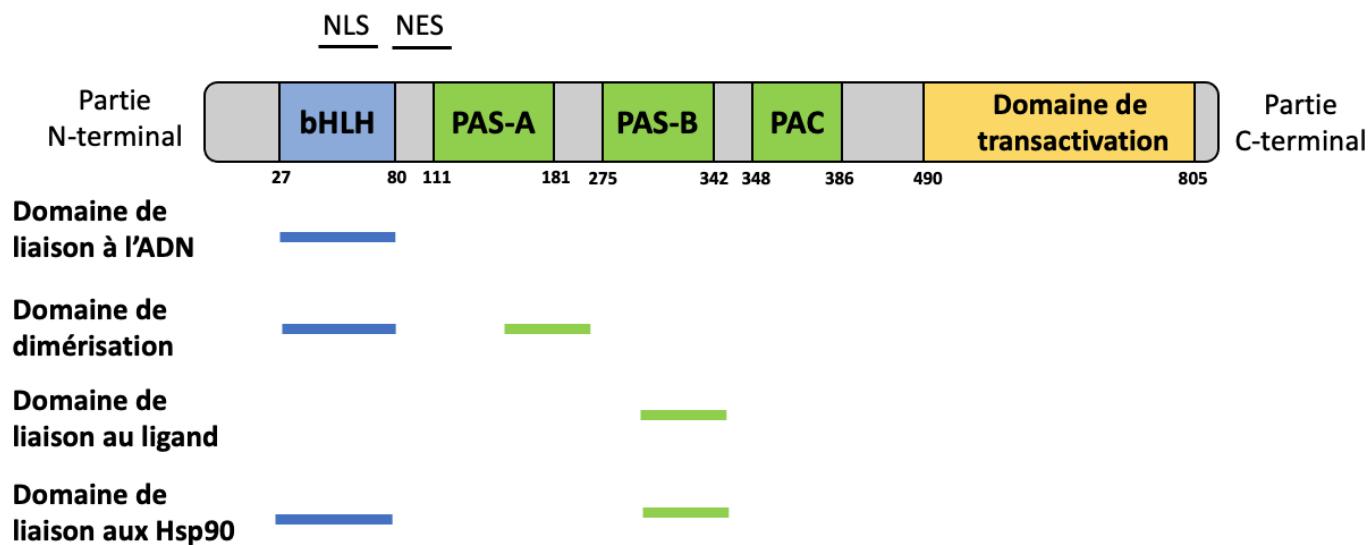


Figure 9 Représentation schématique des domaines du AhR humain

En bleu, le domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix). En vert le domaine PAS (Per/ARNT/Sim) avec ses deux sous-domaines A et B. En jaune, le domaine de transactivation.

3.2.1 Le domaine basic helix-loop-helix (bHLH)

Le domaine bHLH du AhR est retrouvé dans plusieurs autres facteurs de transcription comme Myf5 et c-myc (Macek et al. 2018 ; Conerly et al. 2016). Il est situé sur la partie N-terminale. La partie basique du domaine bHLH joue un rôle dans la liaison à l'ADN. La partie « HLH » du domaine bHLH quant à lui intervient dans l'hétérodimérisation avec la protéine de classe 2 *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), mais également dans l'interaction avec la protéine chaperonne Hsp90 (*Heat shock protein 90*). On retrouve aussi dans la portion N-terminale une séquence NLS (*Nuclear Localization Signal*) et une séquence NES (*Nuclear Export Signal*). Le NLS permet la translocation du AhR au noyau après la reconnaissance d'un ligand, tandis que le NES permet au AhR d'être exporté vers le cytoplasme après avoir rempli sa fonction dans le noyau (Ikuta et al. 1998).

3.2.2 Le domaine Per/Arnt/Sim (PAS)

Le domaine PAS, très bien conservé au cours de l'évolution, est présent dans des protéines contribuant aux mécanismes de détection et d'adaptation aux contraintes environnementales. Le domaine PAS est retrouvé dans la régulation du rythme circadien par l'action des protéines « Per » (*Period*), dans le développement neurologique de la drosophile par la protéine SIM (*Single-minded*) et dans la voie de signalisation du AhR par l'ARNT (**Figure 10**) (Soshilov et Denison 2008). Le domaine PAS est caractérisé par deux séquences similaires : PAS-A et PAS-B.

Le domaine PAS-A du AhR intervient dans la dimérisation avec l'ARNT, exprimant également un domaine PAS. Le domaine PAS-B est, quant à lui, aussi retrouvé dans l'interaction avec les protéines chaperonnes Hsp90 (Fukunaga et al. 1995 ; Reisz-Porszasz et al. 1994).

3.2.3 Le motif PAS Associated C-terminal domain (PAC)

Plus récemment, le domaine PAC (*PAS Associated C-terminal domain*) a été identifié comme élément essentiel au maintien du domaine PAS dans sa conformation active, permettant son interaction avec l'ARNT et les protéines chaperonnes Hsp90 (Hefti et al. 2004). Ce motif est constitué de 40-45 acides animés situés sur la partie C-Términale du domaine PAS.

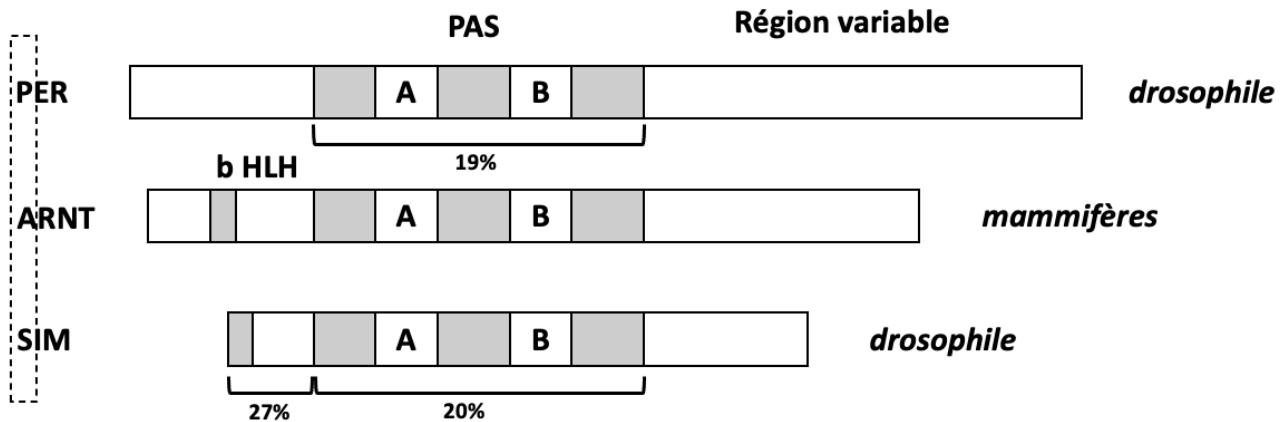


Figure 10 Structure des membres de la famille PAS : Per, ARNT et SIM

Une représentation des domaines protéiques de la famille PAS. Le pourcentage d'homologie de SIM e PER en fonction de l'ARNT sont indiqués (Gu, Hogenesch et Bradfield 2000).

3.2.4 Le domaine de transactivation

Le domaine de transactivation du AhR est situé sur la région C-terminale du facteur de transcription et comprend 3 sous-domaines. Un domaine riche en acides aminés acides, comme le glutamate et l'aspartate. Un domaine riche en glutamine qui permet l'interaction des cofacteurs permettant d'induire le complexe transcriptionnel de l'ARN polymérase II et un domaine riche en proline, sérine et thréonine. On retrouve entre l'homme et la souris environ 58 % d'homologie de séquence entre les TAD du AhR. Le rôle du domaine de transactivation est de permettre le recrutement de co-activateurs régulant la transcription de gènes cibles, tel que CYP1A1 (Ko et al. 1997).

3.3 Expression et régulation du AhR

Le AhR humain est codé par un gène situé sur le chromosome 7. Il a été montré que le traitement de cellules MCF7 *in vitro*, en présence de TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) induit l'activation du facteur de transcription AP-1 (*activating protein 1*) et l'augmentation de l'expression de AhR (Spink et al. 1998). De plus, le AhR peut être régulé par certains mécanismes épigénétiques. En effet, l'activité basale du promoteur du AhR augmente par l'utilisation d'inhibiteurs des HDAC (Histone désacétylases) dans des cellules murines Hepa-1 (Garrison et al. 2000). Des études *in vivo*, ont montré que le AhR était retrouvé de façon ubiquitaire dans les cellules de l'organisme (Yamamoto et al. 2004). L'expression du AhR dans différents tissus dépend de son exposition à des particules environnementales (Tian et al. 2015 ; Y. Z. Jiang et al. 2010). On retrouve aussi chez l'homme une expression importante du AhR dans les poumons, le foie et le placenta (Guerrina et al. 2018 ; Wada et al. 2016 ; Y. Z. Jiang et al. 2010). Une expression faible du AhR est retrouvée dans d'autres tissus où il peut jouer des rôles différents de l'élimination des xénobiotiques, comme pour le système nerveux central où le AhR participe à la prolifération, la différenciation et la survie neuronale (Juricek et Coumoul 2018).

Le AhR est exprimé très tôt lors du développement embryonnaire. Cependant, l'activation de celui-ci, après son expression, est néfaste pour le développement de l'embryon (Gialitakis et al. 2017). En outre, au cours du développement, chez la souris, l'expression du AhR est augmentée dans le neuroépithélium et le cœur, avant d'observer sa diminution après la maturation de ces tissus (Abbott, Birnbaum et Perdew 1995). Cependant, on peut observer une augmentation progressive de l'expression du AhR dans le foie. Le AhR est ensuite exprimé de manière constitutive dans d'autres tissus comme les muscles et la peau (Luo et al. 2019 ; Furue et al. 2014). Son expression est généralement associée à la formation de son hétérodimère, avec l'ARNT (Abbott et Probst 1995), mais on peut retrouver des disparités d'expression entre ces deux protéines étant donné que l'ARNT peut intervenir dans d'autres voies de signalisation (J. V. Schmidt et Bradfield 1996).

D'autre part, il a été rapporté que le AhR participe à la modulation de l'immunité innée et adaptative. En effet, on retrouve son expression dans les cellules NK, les granulocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Shin et al. 2013 ; Masuda et al. 2011 ; N. T. Nguyen et al. 2010). Nous traiterons de ce sujet plus en détail dans la suite de cette thèse.

3.4 Structure du complexe du AhR

Le AhR est présent dans le cytoplasme sous forme de complexe. Ce complexe est constitué du AhR, d'un dimère de protéines chaperonnes appelé HSP90 (*Heat shock proteins* 90), d'une protéine XAP2, aussi appelée Ara9 ou AIP, et d'une protéine co-chaperonne p23 (**Figure 11**).

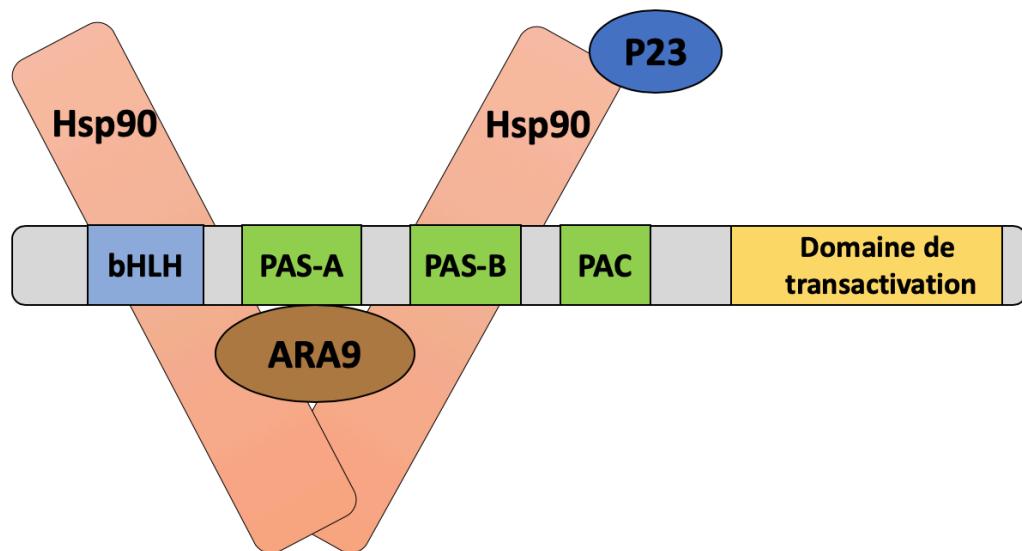


Figure 11 Représentation schématique du complexe cytoplasmique du AhR.

Les deux protéines chaperonnes Hsp90 interagissent par leur domaine central, avec les domaines bHLH et PAS-B du AhR alors que la protéine co-chaperonne p23 interagit avec Hsp90 par son domaine N-terminal. La protéine XAP2 se lie au AhR par sa partie centrale et aux Hsp90 par leur partie C-terminale (d'après (Petrulis & Perdew, 2002)).

On retrouve dans les protéines Hsp90 trois domaines distincts ; une partie N terminale, une partie centrale et une partie C-terminale. La partie centrale des protéines Hsp90 permet l'interaction avec le AhR. Le domaine C-terminal permet la liaison de la protéine ARA9 au complexe (Meyer et Perdew 1999 ; Bell et Poland 2000). La localisation du complexe dans le cytoplasme de la cellule est garantie par la liaison des protéines chaperonnes Hsp90 aux domaines bHLH et PAS-B du AhR. De ce fait, les séquences de localisation nucléaires du AhR

sont inaccessibles et bloquent la translocation au noyau (Ikuta et al. 1998). De plus, la présence des protéines Hsp90 dans le complexe du AhR permet d'augmenter sa stabilité, et le protège ainsi d'une dégradation par le système ubiquitine/protéasome. Enfin, les protéines Hsp90 permettent de favoriser la liaison d'un ligand spécifique du AhR. La liaison d'un ligand au domaine PAS-B du AhR induit la libération d'une des deux protéines chaperonnes Hsp90, exposant ainsi le domaine de localisation nucléaire qui permet la translocation au noyau. La seconde protéine Hsp90 se dissocie au moment de l'hétérodimérisation du AhR avec l'ARNT (Lees et Whitelaw 1999).

La protéine ARA9 (*AhR associated protein 9*), aussi appelé XAP2 (*HBV X-associated protein 2*) et HIP (*AhR interacting protein*), joue un rôle important dans le maintien de la stabilité du AhR en absence de liaison avec un ligand. Elle réduit la possibilité de dégradation par le complexe ubiquitine/protéasome (Kazlauskas, Poellinger et Pongratz 2000). Celle-ci se lie avec AhR par son domaine PAS-A et des protéines Hsp90 par leur domaine central (Meyer et Perdew 1999). La liaison de la protéine ARA9 aux protéines chaperonnes Hsp90 permet également de maintenir le récepteur AhR ancré au cytosquelette de la cellule. Il s'agit d'un autre mécanisme permettant d'éviter la translocation de AhR au noyau en absence de liaison avec un ligand (Traber et al. 2012). De plus, ARA9 agit sur la localisation cellulaire du AhR. En effet, ARA9 perturbe l'interaction entre le NLS et le récepteur responsable de la translocation du AhR vers le noyau, l'importine β (Petrulis et Perdew 2002).

Bien que la protéine p23 fasse partie du complexe, elle ne se lie pas directement au AhR, c'est pourquoi cette protéine est appelée co-chaperonne. Celle-ci se lie à la partie N-terminal d'une des protéines chaperonnes Hsp90. La protéine p23 intervient dans le mécanisme de dissociation d'une des protéines Hsp90 avec le AhR après la liaison d'un ligand (Kekatpure, Dannenberg et Subbaramiah 2020). Plus récemment, il a été montré que p23 pouvait protéger la dégradation du AhR par le protéasome de manière indépendante des protéines chaperonnes Hsp90 (Pappas et al. 2018).

Malgré que le AhR soit majoritairement retrouvé dans le cytoplasme sous forme de complexe, on peut également retrouver une localisation nucléaire du AhR. Il a été rapporté que cette localisation était dépendante de la densité cellulaire. En effet, dans des cellules HaCaT (kératinocytes) peu confluentes on peut observer une localisation nucléaire du AhR, alors que sur les mêmes cellules arrivées à confluence la localisation du AhR est majoritairement cytoplasmique (Ikuta, Kobayashi et Kawajiri 2004). Il a aussi été suggéré que ce mécanisme

résulterait de la phosphorylation de la sérine 68 située dans le domaine NES du AhR qui inhiberait ainsi l'exportation du AhR vers le cytoplasme. Cette phosphorylation serait induite par la p38 MAP Kinase présente durant la prolifération cellulaire (Puga, Ma et Marlowe 2009).

3.5 Interaction AhR-ARNT

L'ARNT, aussi appelé HIF1 β (*Hypoxia Inducible Factor 1 β*), appartient comme le AhR à la famille bHLH/PAS. Il est également exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme. Il joue un rôle dans l'hypoxie et la réponse aux xénobiotiques (Mandl et Depping 2014). L'ARNT peut former un hétérodimère avec HIF1 α pour favoriser l'angiogenèse en régulant la transcription du gène *VEGF* (Terashima et al. 2016). Dans la voie de signalisation du AhR, le AhR après la fixation d'un ligand, se transloque au noyau et s'hétérodimérise avec l'ARNT permettant ainsi la transcription des gènes métabolisant les xénobiotiques. En outre, l'expression de l'ARNT est déterminante dans le développement embryonnaire puisque son inactivation entraîne un défaut de l'angiogenèse (Abbott et Buckalew 2000).

Une seconde isoforme de l'ARNT a été décrite chez les vertébrés, l'ARNT2 (Hirose et al. 1996). Cette isoforme est exprimée uniquement au cerveau et au rein. L'ARNT et l'ARNT2 ont plus de 90 % d'homologies de séquence (Dougherty et Pollenz 2008). Bien que l'affinité de liaison de l'ARNT2 pour le AhR soit similaire à celle de l'ARNT, des études ont montré que cette liaison était dépendante des caractéristiques du ligand du AhR (Hankinson 2008). Aussi, il a été démontré chez des souris ARNT2 $^{-/-}$ un développement embryonnaire normal, bien que ces souris décèdent quelques jours après leur naissance. Il semblerait donc que malgré une forte homologie de séquences pour ces deux isoformes, celles-ci possèdent des fonctions différentes (Keith, Adelman et Simon 2001).

3.6 Voies d'activation du AhR

La nature lipophile de la plupart des ligands du AhR leur permet une diffusion passive à travers la membrane plasmique de la cellule. Il existe deux voies d'activation pour le AhR : la voie canonique et la voie non canonique. La voie canonique a été très largement décrite dans la littérature, alors que la voie non canonique reste encore très peu étudiée.

Dans la voie canonique, une fois dans le cytoplasme, le ligand va être reconnu par le AhR. L'interaction du ligand avec son site de liaison induit un changement conformationnel permettant l'exposition du signal de localisation nucléaire situé sur la région N-terminale. Le complexe du AhR libéré migre ensuite jusqu'au noyau. La liaison de l'ARNT au AHR dissocie la dernière protéine chaperonne Hsp90 de celui-ci. La formation de l'hétérodimère permet de masquer la séquence d'exportation nucléaire du AhR. Le dimère AhR/ARNT peut alors se lier à des séquences XRE situées sur les promoteurs de gènes retrouvés dans la métabolisation des xénobiotiques (**Figure 12**). Il a été également montré que certains gènes « contrôlés » par les séquences XRE ne participent pas au métabolisme des xénobiotiques, mais peuvent être associés à la prolifération et la différenciation cellulaire (Bock et Kohle 2006 ; Tijet et al. 2006). La séquence consensus des domaines XRE est 5'-TNGCGTG-3'. Durant la liaison à ces séquences, l'ARNT reconnaîtra la partie 3' « GTG » alors que le AhR reconnaîtra la partie 5' « TNGC » (Bacsi, Reisz-Porszasz et Hankinson 1995 ; J. V. Schmidt et Bradfield 1996 ; Gu, Hogenesch et Bradfield 2000 ; Hankinson 1995).

La voie non canonique du AhR a été définie par l'attachement du AhR à des gènes dont les promoteurs ne contiennent pas de séquences XRE. En effet, des recherches effectuées sur les microréseaux dans des lignées cellulaires du foie ont montré qu'en absence de ligands exogènes du AhR certains gènes étaient exprimés à la suite d'une liaison du AhR à leurs promoteurs (Dere et al. 2011). On peut également associer à la voie non canonique, l'interaction directe du AhR avec une autre protéine. Par exemple, l'interaction du AhR avec les protéines STAT1 et STAT5 permet de réguler négativement le développement des cellules Th17 (Kimura et al. 2008). Le AhR peut également interagir avec NRF2, un facteur de transcription contribuant à la protection contre le stress oxydatif, permettant la stabilité de ce dernier (J. D. Hayes, Dinkova-Kostova et McMahon 2009). Enfin, il a été montré que le AhR peut interagir avec la sous-unité RelB du facteur de transcription NF-κB, participant à la survie cellulaire, induisant l'expression d'IL-8 dans des cellules tumorales du cancer du sein (Vogel et al. 2011).

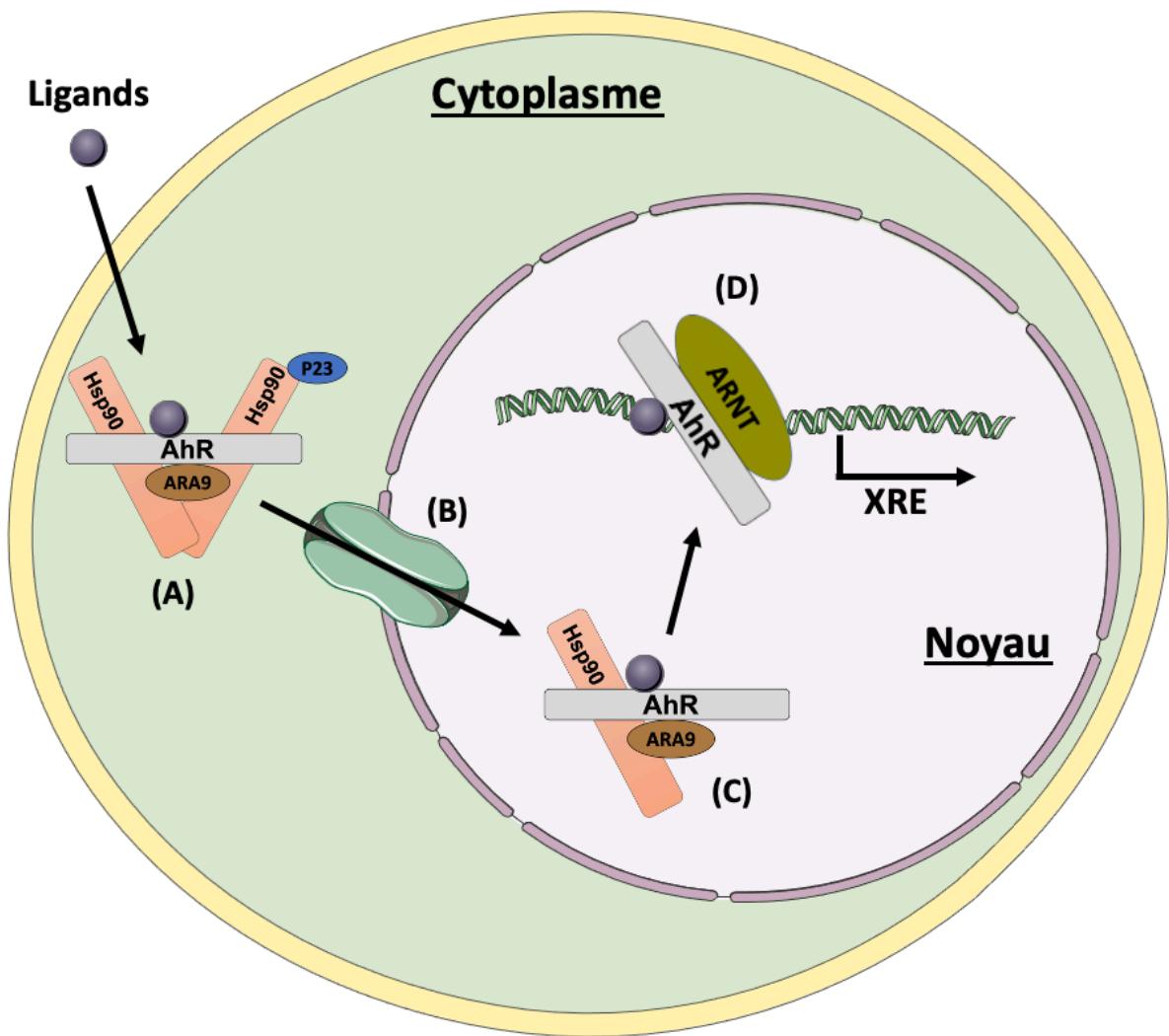


Figure 12 Voie canonique du AhR

(A) Liaison du AhR à son ligand et perte d'une protéine Hsp90. (B) Translocation au noyau du AhR. (C) Dissociation du AhR de son complexe. (D) Formation du dimère AhR/ARNT et liaison aux séquences XRE.

3.7 Processus d'élimination des xénobiotiques

Le rôle du AhR est de permettre le métabolisme d'élimination des xénobiotiques présent dans la cellule. On retrouve une production d'enzymes de phase I, d'enzymes de phase II et des transporteurs de phase III (**Figure 13**). Le rôle des enzymes de phase I est de modifier ou d'introduire des groupements fonctionnels sur les xénobiotiques grâce à des réactions d'oxydation. Cette première étape réalisée par les enzymes de phase I permet de rendre les xénobiotiques hydrosolubles et de faciliter leur conjugaison avec les enzymes de phase II. Parmi les enzymes de phase I les mieux décrites lors du métabolisme des xénobiotiques on retrouve des membres de la famille des cytochromes P450 : CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1. Cette famille de molécule permet la catalyse des HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) en époxydes (Guéguen et al. 2006).

Le CYP1A1 est l'un des acteurs majeurs dans la détoxicification de l'organisme (Nebert et al. 2004). Les locus du gène *Cyp1A1* sont composés d'un très grand nombre de séquences XRE (Whitlock 1999). Cette multitude de séquences XRE permet une forte réponse dose dépendante à des ligands du AhR. Le CYP1A2 est exprimé de manière constitutive dans le foie, mais est également produit en réponse à des agonistes du AhR (Poland et Knutson 1982 ; Nebert et Gonzalez 1987 ; Eaton et al. 1995). Le CYP1A2 joue un rôle dans le métabolisme des amines aromatiques et de la caféine (Bock et al. 1994). Quant au CYP1B1, il intervient dans la bioactivation du BAP dans les tissus extrahépatiques et des tissus stéroïdogènes (Tang et al. 1996). Le CYP1B1 n'est pas seulement contrôlé par l'activation du AhR, d'autres facteurs comme l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) peuvent induire son expression (W. Zheng et Jefcoate 2005).

Une fois que le xénobiotique a été modifié par les enzymes de phase I, celui-ci est pris en charge par les enzymes de phase II. Les acteurs moléculaires majoritairement retrouvés dans ce groupe sont la Gluthation-S-transférase (GST), l'UDP-glucuronyl transférase (UGT) et la Sulfotransférase (SULT). Il a été montré que les enzymes de phase II ne sont pas uniquement régulées dans la voie d'activation du AhR, mais interviennent également dans la cascade d'activation de Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*), contribuant à la protection contre le stress oxydatif (T. Nguyen, Nioi et Pickett 2009).

Enfin, les xénobiotiques rendus solubles par les enzymes de phase I et II sont pris en charges par des transporteurs actifs de phase III, comme le MDR (*multiple drug resistance*),

situés dans la membrane plasmique, afin d'être exportés hors de la cellule. Ces molécules sont ensuite éliminées de l'organisme par les voies naturelles, comme la sueur ou les urines. La capacité des MDR à éliminer les xénobiotiques est tel que leur action pose un vrai problème dans l'efficacité des chimiothérapies anticancéreuses. En effet, ils seraient responsables d'une élimination précoce des composés injectés notamment lors du traitement du cancer ovarien, le cancer du poumon ou le cancer du sein (Saraswathy et Gong 2013 ; Cort et al. 2016).

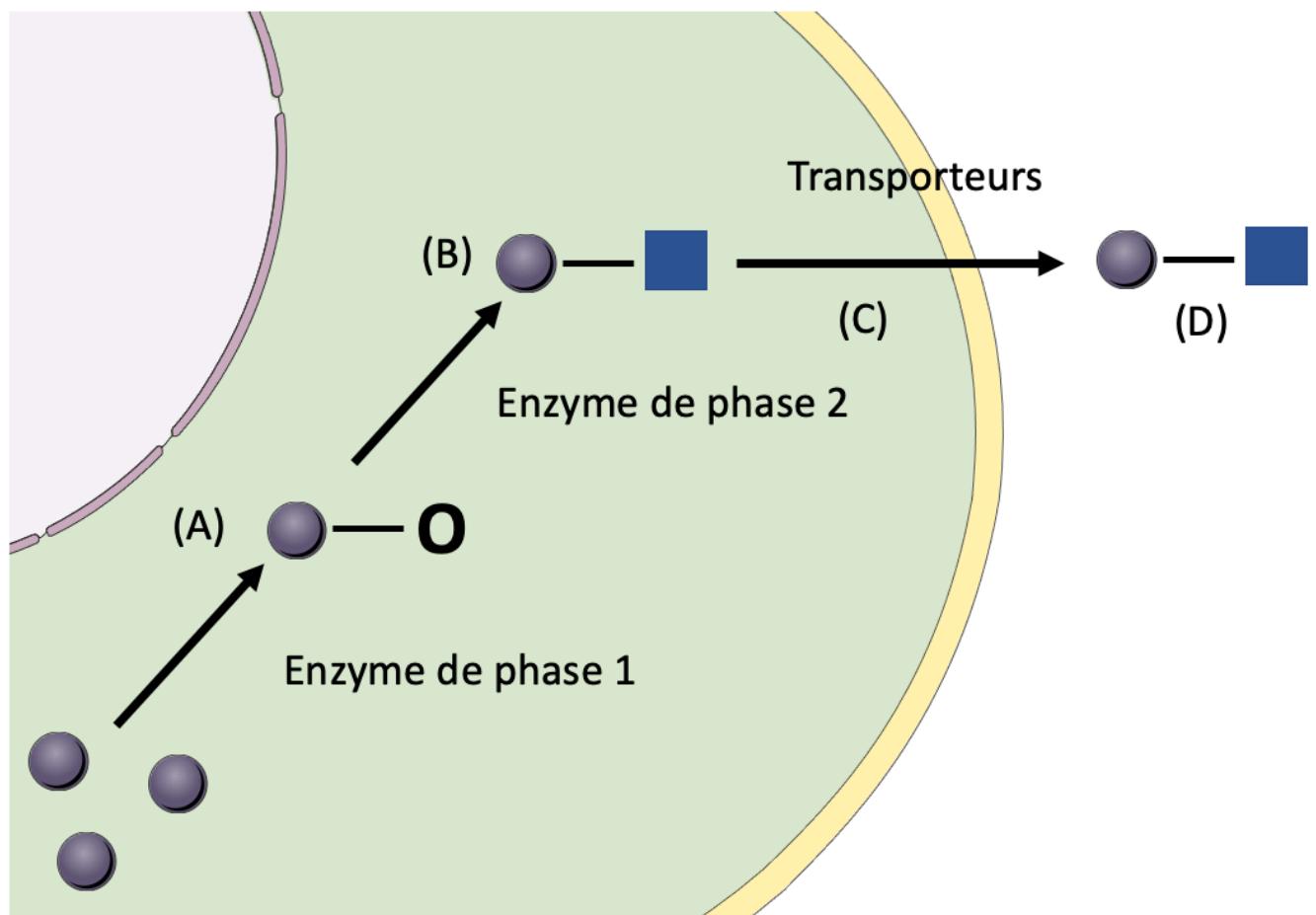


Figure 13 Mode d'élimination des xénobiotiques

(A) Ajout d'un groupement fonctionnel sur un xénobiotique. (B) Solubilisation du Xénobiotique. (C) Transport du xénobiotique soluble hors de la cellule. (D) Élimination du xénobiotique par les voies naturelles.

3.8 Les ligands du AhR

3.8.1 Les ligands exogènes

L'une des sources majeures d'exposition à des ligands exogènes provient de l'alimentation. On peut distinguer pour les ligands exogènes deux groupes, classés selon leurs origines : les ligands synthétiques et les ligands naturels (**Figure 14**) (Denison et Nagy 2003).

La famille des ligands naturels du AhR est composée d'agonistes ou d'antagonistes. Par exemple, les flavonoïdes sont constitués d'un grand nombre de molécules naturelles qui sont des ligands du AhR (Busbee et al. 2013). La quercétine, une molécule retrouvée dans certaines plantes est caractérisée comme agoniste du AhR, alors que le α -naphtoflavone, un dérivé synthétique des flavonoïdes est décrit comme antagoniste du AhR. Également, un membre de la famille des polyphénols, le resvératrol (3,5,4' trihydroxystilbène) a été caractérisé comme étant antagoniste du AhR (Revel et al. 2003). On le retrouve notamment présent dans certaines variétés de raisins. Il est utilisé pour ses propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Kalantari et Das 2010).

Le groupe des ligands synthétiques est constitué d'une grande quantité de polluants environnementaux comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAHs). Les ligands appartenant à la famille des HAHs possèdent généralement une plus forte affinité pour le AhR (de l'ordre du nM) que les ligands de la famille des HAPs (de l'ordre du μ M) (Bohonowych et Denison 2007). D'autre part, l'affinité d'un ligand pour le AhR n'est pas la même en fonction des espèces. Le TCDD présente une affinité pour le AhR 10 fois plus grande chez la souris que chez l'Humain (Flaveny et Perdew 2009). Aussi, chez l'Humain il a été montré que l'exposition au TCDD causait de la chloracné et un défaut cognitif partiel (Caramaschi et al. 1981). Des études réalisées sur des souris humanisées ont montré qu'une altération de la liaison récepteur-ligand corrélait avec une résistance au TCDD, suggérant que la faible affinité du TCDD pour le AhR humain pourrait être responsable d'une résistance à celui-ci en comparaison à d'autres espèces (Moriguchi et al. 2003).

On retrouve pour la famille de ligands HAHs un grand nombre de composés hautement toxique pour l'organisme et l'environnement, comme les dibenzo-p-dioxines polychlorées, les dibenzofuranes et les biphenyles, ainsi que d'autres composés apparentés (Poland et Knutson 1982 ; Safe 1990). Ces ligands ont la spécificité d'être très stables et de s'accumuler dans l'environnement et les graisses animales. L'exposition et l'accumulation des dioxines comme le

TCDD peuvent produire différents effets toxiques et biologiques. Ces molécules sont connues pour favoriser la croissance tumorale, induire une toxicité cardiaque, hépatique et cutanée (R. J. Chen et al. 2014 ; Fujisawa, Tohyama et Yoshioka 2019). Ils sont également la source de nombreux déchets issus de leur métabolisation par les mécanismes de détoxicifications de l'organisme. L'homéostasie endocrinienne et la réponse hormonodépendante des stéroïdes sont également impactées par une exposition à ces polluants (Neubert 1997).

Les membres de la famille des HAPs possèdent généralement une affinité de liaison au AhR moins grande que les HAHS. La plupart des membres de cette famille ont la spécificité structurale d'être aromatiques et planes. Ces molécules provoquent également dans l'organisme un grand nombre d'effets toxiques. Le BaP, qui est l'une des molécules les plus étudiées de cette famille, est classé comme carcinogène par l'OMS (Organisation mondiale de la santé) en raison de son action sur l'expression génomique (Moorthy, Chu et Carlin 2015).

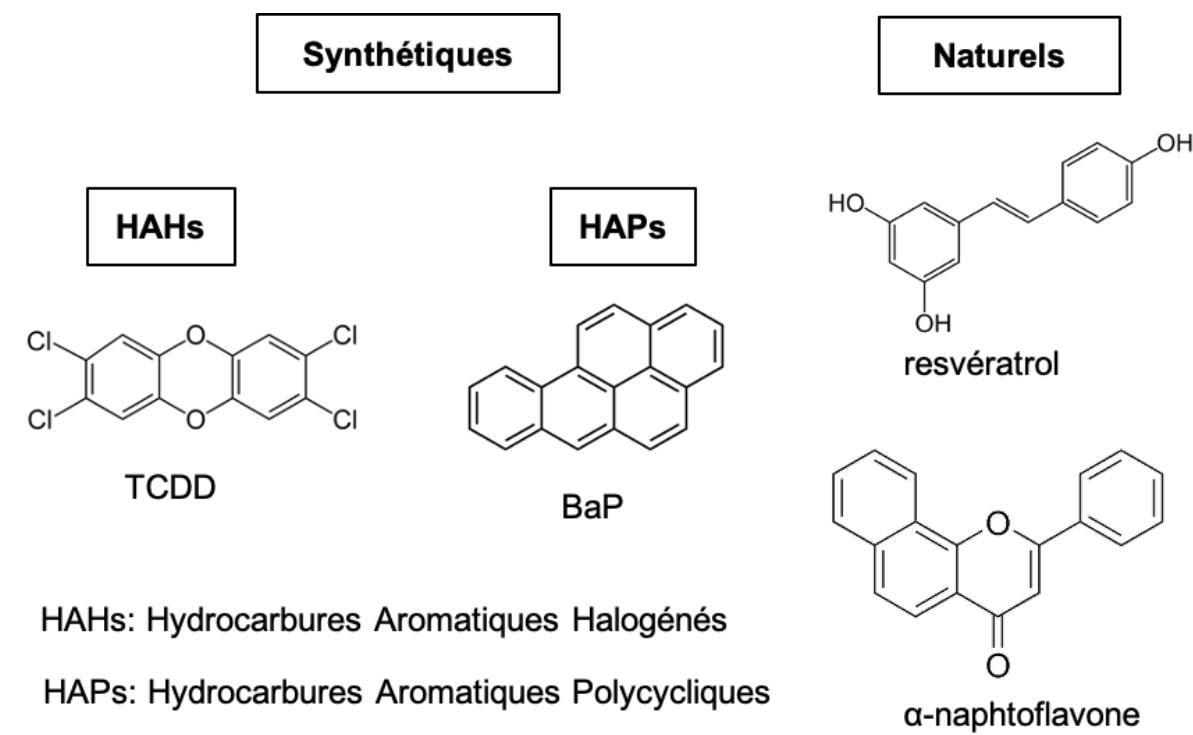


Figure 14 Exemples de ligands exogènes du AhR

3.8.2 Les ligands endogènes

Dans cette classe de ligand du AhR, beaucoup de molécules sont des dérivés du tryptophane (**Figure 15**), des indoles ainsi que des métabolites de l'hème. Le tryptophane, un acide aminé essentiel, peut être métabolisé en une multitude de molécules actives, comme la sérotonine et la kynurénine. La liaison de la kynurénine induit la translocation du AhR vers le noyau et l'expression de gènes cibles (Opitz et al. 2011). L'autre ligand endogène du AhR très étudié dans ce domaine est le FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole) (Rannug et al. 1987). Cette molécule est produite naturellement dans la peau et les yeux par une exposition du tryptophane aux UV (Vazquez et al. 2002). On retrouve sa production majoritairement dans les kératinocytes et est métabolisé par le CYP1A1 avant d'être évacué de l'organisme (Wincent et al. 2009). De par sa nature, le FICZ possède un temps de demi-vie beaucoup plus court (quelques heures) que des ligands comme les HAHS (plusieurs jours), qui sont particulièrement résistants aux mécanismes d'élimination des xénobiotiques (Wheeler et al. 2014). Le temps d'exposition de l'organisme à des ligands comme le FICZ sera donc plus court.

La kynurénine est produite sous l'action de IDO1 (tryptophane dioxygénase). L'acide kynurénique, dont la métabolisation est contrôlée par TDO2 est également un ligand capable de moduler l'activité transcriptomique du AhR. Certaines études ont montré que l'action de la voie de signalisation IDO1/Kynurénine/AhR et l'accumulation du AhR dans le noyau était fréquemment retrouvé dans différents types de tumeurs et possiblement lié à la diminution de la réponse antitumorale (L. Du et al. 2020). En effet, les ligands du AhR produits par les cellules tumorales et les lymphocytes recrutés dans l'environnement tumoral favorisent la différenciation des cellules T régulatrices et réduisent ainsi la réponse T CD8 cytotoxique (Cheong et Sun 2018).

Il a été observé chez des rats atteints de jaunisse congénitale l'expression persistante du gène CYP1A1, dépendant de l'activation du AhR. Cette pathologie est caractérisée par la concentration plasmatique élevée du produit de dégradation de l'hème, la bilirubine. Le traitement de cellules HepG2 par des doses croissantes de bilirubine corrèle avec l'augmentation de l'activité du AhR (Phelan et al. 1998). De plus, l'élimination de la bilirubine est contrôlée par l'UGT1A1 qui intervient dans la voie de réponse aux xénobiotiques (Bock 2011).

Enfin, l'indirubine est un isomère de l'indigo, un métabolite du tryptophane que l'on retrouve dans les urines et le sérum de veaux fœtal. Des tests effectués sur des cellules HepG2 ont révélé que cette molécule est un puissant ligand du AhR, où il a été observé une forte augmentation

d'expression de CYP1A1 et CYP1A2 (Adachi et al. 2001 ; Peter Guengerich et al. 2004). Cependant, certaines études ont suggéré que l'indirubine pouvait agir à la fois comme agoniste et antagoniste de la réponse AhR (Nishiumi et al. 2008). De plus, de fortes doses d'indirubine (de l'ordre du μ M) affectent la localisation du AhR cellulaire et sa dégradation de façon similaire aux dioxines (Prochazkova et al. 2011).

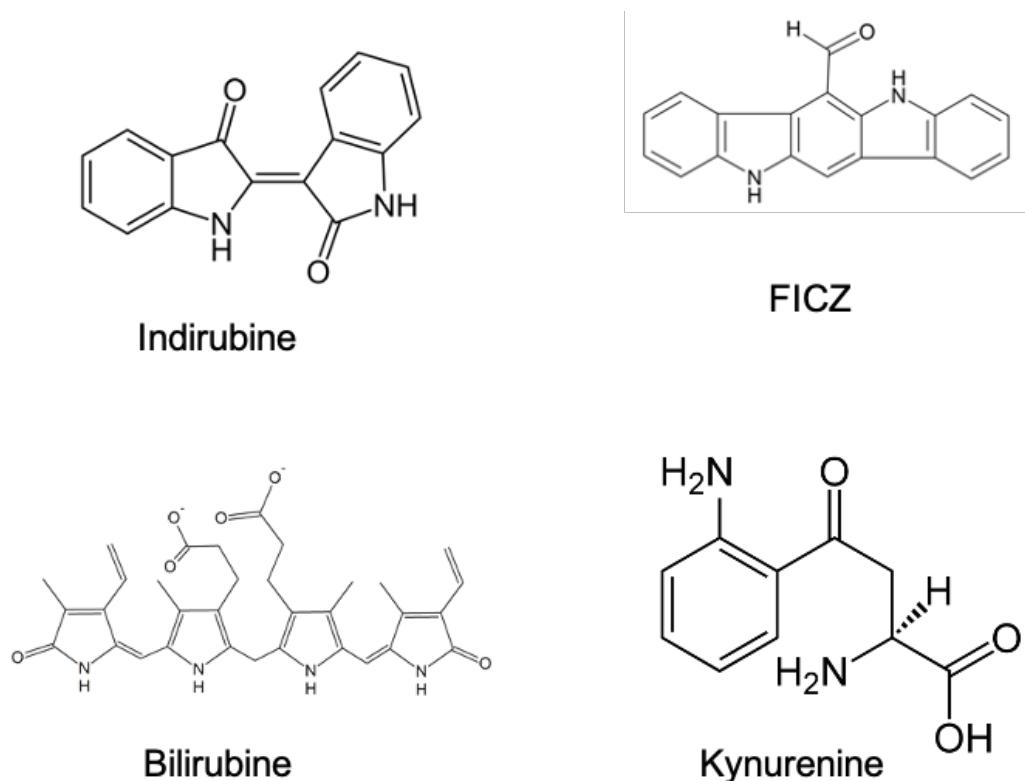


Figure 15 Exemples de ligands endogènes du AhR

3.9 Régulation du AhR

L'activité du AhR peut être régulée de deux façons : i) par l'intervention du protéasome qui induira sa dégradation ou ii) par l'action d'une autre protéine bHLH/PAS : le AhRR (*Aryl hydrocarbon Receptor Repressor*) (**Figure 16**). Réguler la quantité de AhR permet, d'une part, de contrôler l'intensité et la durée de l'activation des gènes transcrits par le dimère AhR/ARNT, mais permet également de rendre disponible l'ARNT qui intervient dans d'autres voies de signalisation, comme l'hypoxie.

À la suite de la liaison du AhR à son ligand, celui-ci est rapidement dégradé. On observe généralement une concentration maximale de AhR importé au noyau environ 1 heure après un traitement au TCDD (Garside et al. 2008). L'utilisation d'inhibiteurs du protéasome a permis de montrer que la décroissance du AhR cellulaire est dépendante du protéasome (Santiago-Josefat et al. 2001). En outre, la libération de la dernière protéine chaperonne Hsp90 permet d'exposer la séquence d'exportation nucléaire du AhR. L'interaction avec l'ARNT stabilise le AhR et sa liaison aux séquences XRE. Des récepteurs d'exportation, comme Xpo1, permettent la sortie du récepteur vers le cytoplasme où celui-ci subit une ubiquitinylation et enfin une dégradation par le protéasome (Davarinos et Pollenz 1999).

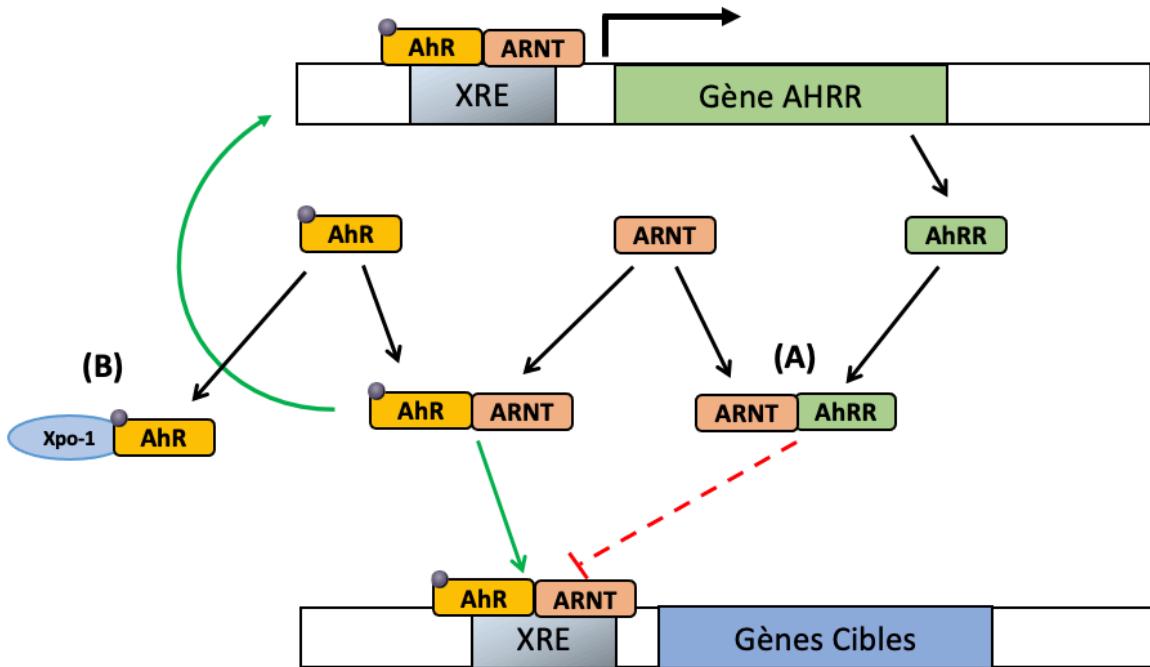


Figure 16 Représentation des voies de régulation du AhR

Les voies de régulation du AhR peuvent passer par deux mécanismes. Le dimère AhR/ARNT se fixe aux séquences XRE pour permettre l'expression de gènes cibles. (A) Des séquences XRE sont présentes en amont du gène du AhRR qui est produit pendant le processus d'activation du AhR et entraîne une autorégulation de celui-ci. (B) La perte de la protéine chaperonne Hsp90 expose le site d'export nucléaire du AhR. L'absence de liaison avec l'ARNT dû à la production de l'AhRR permet à la protéine de transport Xpo-1 de se lier au AhR et de favoriser sa dégradation par le protéasome dans le cytoplasme.

L'autre voie de régulation du AhR fait intervenir le *Aryl hydrocarbon receptor repressor* (AhRR), identifié par l'équipe du Pr Fujii-Kuryama Mimura (Mimura et al. 1999). Le AhR et le AhRR possèdent une forte homologie de séquence dans leurs domaines bHLH et PAS-A, qui interviennent au moment de la dimérisation du AhR avec l'ARNT et la liaison du dimère à l'ADN (Mimura et al. 1999). En revanche, sur le AhRR on ne retrouve pas le domaine PAS-B et la partie C-terminale n'est pas constituée de séquences permettant le recrutement de co-activateurs qui permettent la transactivation (**Figure 17**).

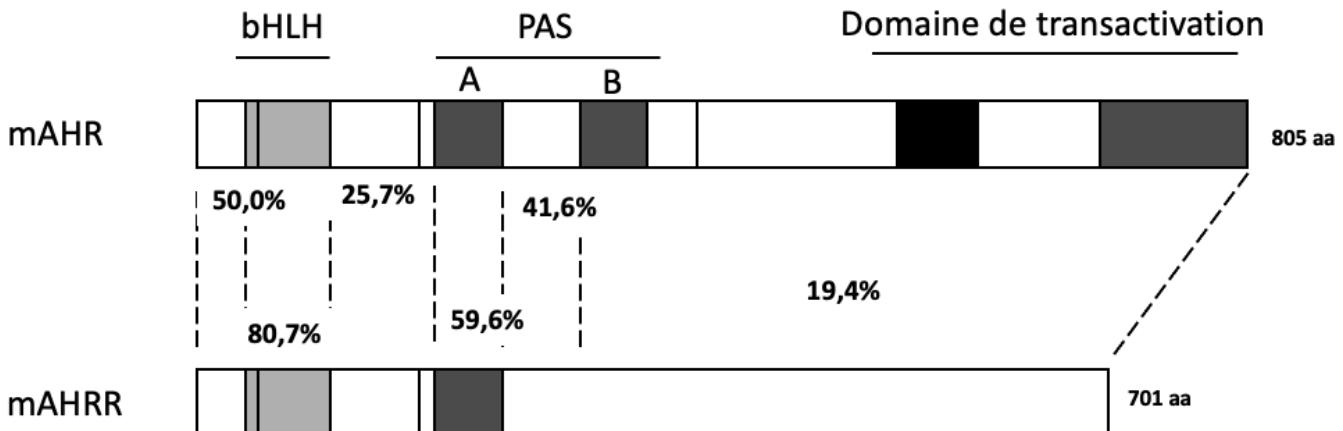


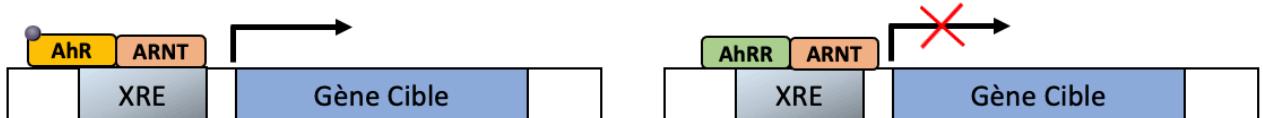
Figure 17 Représentation des différences entre le AhR et le AhRR chez la souris.

Les pourcentages indiqués sur la représentation correspondent aux valeurs d'homologies entre les différents domaines du AhR et du AhRR chez la souris. Le domaine bHLH est très bien conservé entre les deux protéines (80,7 % d'homologie). En revanche, le domaine C-terminal comportant le domaine de transactivation possède une homologie de seulement 19,4 %. Adaptée de (Mimura et al. 1999).

Le dimère AhRR/ARNT possède la capacité de se lier aux séquences XRE sans liaison à un ligand. Cette propriété permet à ce complexe AhRR/ARNT de rentrer en compétition avec le dimère AhR/ARNT et ainsi bloquer l'initiation de la transcription des gènes de la réponse aux xénobiotiques (Karchner et al. 2002). Le complexe AhRR/ARNT peut aussi induire un mécanisme de répression transcriptomique en se liant au dimère AhR/ARNT et bloquant ainsi la liaison des coactivateurs nécessaire à l'initiation de la transcription des gènes cibles (Evans et al. 2008) (**Figure 18**).

On retrouve une expression constitutive de cette protéine dans différents tissus comme les poumons, les reins ou la rate (Tsuchiya et al. 2003). En revanche, il n'existe pas de corrélation entre son expression et celle du AhR. De plus, des études ont montré que les locus d'initiation de la transcription de l'AhRR présentaient des motifs XRE actifs. L'expression du AhRR peut donc être favorisée par la liaison du complexe AhR/ARNT qui agit donc comme un mécanisme d'autorégulation de la réponse aux xénobiotiques du AhR (Haarmann-Stemmann et al. 2007).

(A) Compétition



(B) Transrépression

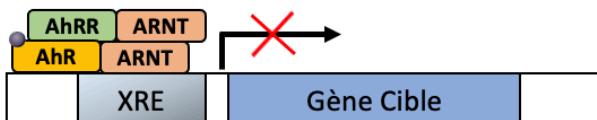


Figure 18 Représentation des mécanismes de répression du AhR par le AhRR

Le complexe AhRR/ARNT agit sur la répression du AhR de deux façons. (A) Le AhRR lié à l'ARNT rentre en compétition avec le AhR et bloque l'accès aux sites XRE. (B) Le AhRR se fixe au dimère AhR/ARNT pour bloquer son potentiel de transcription. Adaptée (Hahn, Allan et Sherr 2009)

3.10 Exposition aux ligands du AhR chez l'Homme

Comme décrit précédemment, les ligands du AhR sont majoritairement issus de la combustion incomplète de matière organique. Les principaux représentants de cette catégorie sont les HAPs. On retrouve également ces molécules produites lors de la distillation du charbon (source pyrogénique) et du pétrole (source pétrogénique), ou dans tout autre procédé de transformation de produit à partir de ces processus (Ifegwu et Anyakora 2015). Ces molécules sont présentes sous forme de mélanges complexes caractérisés en deux phases : une phase gazeuse pour les molécules légères et une phase particulière pour les molécules lourdes. Dans l'environnement les sources d'exposition « naturelles » sont : les feux de forêt, les éruptions volcaniques, les réactions géologiques thermiques. Cependant depuis l'évolution de nos sociétés, la source principale d'exposition est issue des productions humaines comme :

l'industrie, les émissions des moteurs, le chauffage urbain, le tabagisme ou encore cuisson de produits alimentaires (K. H. Kim et al. 2013 ; Oz et Yuzer 2016 ; Rose et al. 2015 ; Zelinkova et Wenzl 2015 ; Skupinska, Misiewicz et Kasprzycka-Guttman 2004). Plusieurs facteurs peuvent influencer la concentration des HAPs dans les mélanges, comme les saisons. En effet, on retrouve en hiver une plus grande concentration des HAPs en raison de l'émission plus importante des chauffages domestiques et l'utilisation excessive des véhicules pour les déplacements (Hansen et al. 2008 ; Ifegwu et Anyakora 2015 ; K. H. Kim et al. 2013).

Dans l'environnement professionnel, plusieurs groupes de populations peuvent être exposés à des ligands du AhR. Les personnes travaillant dans l'industrie sont tout particulièrement exposées à ces produits (Marczynski et al. 2009 ; Deygout et al. 2011 ; M. R. Chen, Tsai et Wang 2008). On retrouve également dans l'agriculture un certain nombre de produits utilisés qui sont des ligands du AhR (Ghisari et al. 2015 ; Takeuchi et al. 2008). Plusieurs pesticides comme l'imidaclopride et l'acide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic (MCPA) ont des effets sur la voie de signalisation du AhR (S. H. Kim et al. 2006 ; Amakura et al. 2016). D'autres pesticides comme l'atrazine peuvent déclencher des pathologies chez certaines espèces (J. Lin et al. 2018 ; C. Zhang et al. 2019). Également, les personnes exerçant le métier de pompier sont considérées comme un groupe d'individus fortement exposés à des ligands du AhR. En effet, lors des différentes interventions réalisées par ces personnes sur des sites d'incendies, la probabilité de rentrer en contact avec des ligands du AhR est accrue. En plus des HAPs, extrêmement toxiques pour l'organisme, des HAHs contenues dans les retardateurs de flammes, présents dans un très grand nombre d'équipements, peuvent également être libérées lors d'incendies (Fent, LaGuardia, et al. 2020). Les pompiers sont alors exposés à ces contaminants par la voie cutanée, l'ingestion et l'inhalation (Fent et al. 2014). Des études ont montré que la plus grande concentration de ces contaminants est retrouvée au niveau du cou et des mollets, correspondant aux jonctions des casques et des bottes de leurs tenues anti-feu (Beitel et al. 2020). De plus, les procédures de nettoyage de ces tenues, réalisées par les pompiers, peuvent également être une source de contamination aux HAP et HAH (Fent et al. 2017).

Enfin, étant donné qu'une multitude de produits provenant de l'industrie peuvent être des ligands du AhR, il est très difficile d'étudier précisément la dangerosité sur l'organisme. Néanmoins, certaines études cherchent de nouveaux moyens d'identifier de potentiels ligands du AhR issus de l'industrie, notamment en utilisant le criblage virtuel, une méthode fréquemment utilisé en chimie médicale et se basant sur les données structurelles des ligands (Larsson et al. 2018).

3.11 Relation entre l'expression du AhR et l'immunité

Durant de longues années, le AhR a principalement été étudié pour son rôle dans la détoxicification de l'organisme en réponse à des xénobiotiques. Les différentes études ont montré qu'il s'agissait de sa fonction première, mais le fait que ce facteur de transcription soit aussi bien conservé durant l'évolution laisse supposer qu'il peut jouer d'autres rôles. De nouveaux outils, comme l'utilisation de modèles de souris KO et les nouvelles méthodes d'études transcriptomiques menant à l'identification de nouveaux gènes cibles, ont permis de découvrir de nouvelles fonctions pour le AhR (Diry et al. 2006).

Chez des souris AhR déficientes, aucune modification majeure du système immunitaire n'a été remarquée (Esser 2009). Cependant, une diminution de la population de lymphocytes a été observée dans la rate de ces souris (Esser 2009). De plus, plusieurs tissus, comme les poumons et l'intestin, ont présenté une plus grande infiltration de lymphocytes que chez les souris de type sauvage (Esser 2009). D'autres modèles de souris AhR *null* ont montré une sensibilité accrue à certains pathogènes, comme la bactérie *Helicobacter hepaticus* (Fernandez-Salguero et al. 1997).

L'expression du AhR est différente en fonction du type cellulaire. Notamment, les cellules dendritiques et les lymphocytes expriment le AhR qui agit sur leur différenciation et donc sur leurs fonctions (Quintana, Yeste et Mascanfroni 2015). Dans certaines pathologies, l'équilibre entre différentes populations de cellules permet de prévenir l'aggravation des symptômes. Par exemple, dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune (EAE) chez la souris, les cellules Th17 jouent un rôle majeur dans l'aggravation de la pathologie, alors que les cellules Treg permettent de contrôler l'inflammation et d'améliorer la survie de l'animale (Oukka 2007 ; Vandenbark et Offner 2008). Des expériences menées chez ces souris ont montré que l'injection de différents ligands du AhR permettait de favoriser les cellules Th17 ou les cellules Treg (Duarte et al. 2013). En effet, l'exposition des souris au TCDD permet de favoriser la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves vers le phénotype Treg en augmentant l'expression de Foxp3 qui améliore le phénotype de la maladie (**Figure 19**). En revanche, l'exposition au FICZ entraîne une différenciation vers le sous-type Th17 par l'augmentation d'expression de RORyt et agrave les symptômes de la maladie (Veldhoen et al. 2008). Plusieurs autres études ont également montré que le TCDD pouvait inhiber la réponse immunitaire en favorisant la voie de différenciation des lymphocytes T régulateurs (Funatake et al. 2005 ; Marshall et al. 2008). Ces expériences ont permis de montrer que la nature du ligand exposé aux lymphocytes T CD4⁺ influence leur

différenciation vers plusieurs sous-types distincts (Quintana et al. 2008). Par conséquent, le AhR joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes de T CD4⁺ et leurs fonctions dans l'évolution d'une pathologie.

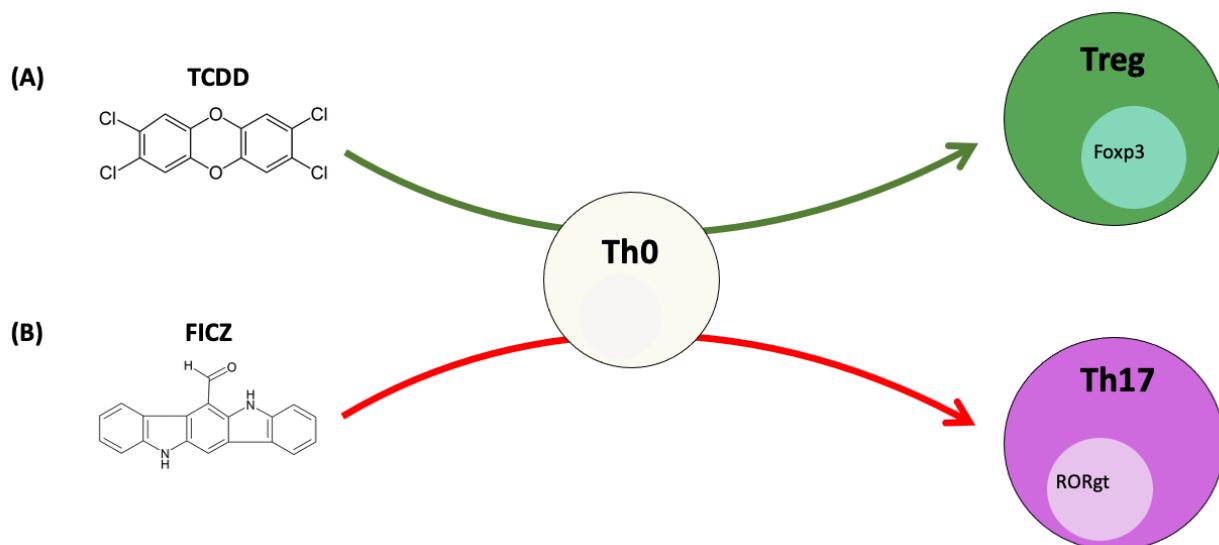


Figure 19 Exposition à des ligands du AhR dans un modèle de souris EAE

Dans le modèle de maladie auto-immune EAE chez la souris la différenciation des cellules T CD4⁺ est modulée par le ligand du AhR exposé. (A) L'exposition au TCDD entraîne une différenciation des cellules Th0 en cellules Treg qui améliore le pronostic de la pathologie. (B) L'exposition au FICZ entraîne une différenciation des cellules Th0 vers le phénotype Th17 qui aggrave la pathologie.

L'activation du AhR via différentes molécules comme le TCDD, l'ITE (2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylic acid methyl ester), la kynurenine ou le Laquimod permet d'augmenter l'expression du marqueur Foxp3 par les cellules T CD4⁺ naïves (Kaye et al. 2016 ; Kerkvliet et al. 2009 ; J. D. Mezrich et al. 2010). Les mécanismes responsables de l'expression de Foxp3 à la suite de l'activation du AhR sont : la transactivation directe, les modifications épigénétiques et des modulations intervenant sur les clusters de différenciation (J. D. Mezrich et al. 2010 ; Singh et al. 2011). Il a été montré, chez des souris AhR^{-/-}, que STAT1 ne pouvait pas s'activer, empêchant ainsi la différenciation en cellules Treg (Kimura et al. 2008). Les effets du AhR observés sur la différenciation peuvent être influencés par le modèle étudié. En effet, dans

certains cas l'inactivation du AhR à l'aide d'un antagoniste permet de favoriser la différenciation et l'accumulation de cellules Treg dans le tractus gastro-intestinal chez des souris (Dant et al. 2017). En outre, il a été suggéré que les xénobiotiques peuvent induire sélectivement la mort des lymphocytes T CD4, expliquant ainsi l'augmentation observée dans la population des cellules Treg (Stockinger, Veldhoen et Hirota 2009). Pris ensemble, ces résultats indiquent que l'activation du AhR joue un rôle dans la différenciation et le maintien fonctionnel des cellules Treg, comme montré dans le modèle EAE (Quintana et al. 2008), la colite (Goettel et al. 2016), l'uvéite (Nugent et al. 2013) et le diabète (Kerkvliet et al. 2009). Bien qu'il ait été montré que les cellules Treg ou Th17 expriment plus fortement le AhR que les cellules Th1 ou Th2, aucune étude n'a clairement défini que cette expression rendrait ces cellules plus sensibles à une activation du AhR (Joller et al. 2014).

La différenciation en lymphocytes iTreg (Tr1) est favorisée par l'IL-27 (**Figure 20**) et maintenue par l'IL-21 (Awasthi et al. 2007 ; Pot et al. 2009). L'IL-27 favorise l'expression de AhR qui interagit avec STAT3 pour permettre la dégradation de HIF-1a conduisant à la stabilisation du métabolisme glycolytique caractéristique des cellules Tr1 (Mascanfroni et al. 2015 ; Apetoh et al. 2010 ; Schmetterer et Pickl 2017). En outre, AhR peut agir avec cMAF pour permettre l'expression de l'IL-10 et l'IL-21 dans les cellules Tr1. De plus, AhR et STAT3 coopèrent pour favoriser l'expression de CD39, une ectonucléotidase qui supprime l'ATP extracellulaire pro-inflammatoire (Takenaka, Robson et Quintana 2016). D'autre part, le rôle que joue AhR dans la différenciation des cellules Tr1 a été montré *in vivo* chez des souris AhR^{-/-} (Wu et al. 2011). D'autres facteurs, comme la mélatonine, peuvent également influencer l'expression du AhR dans les cellules Tr1 (Farez et al. 2015)

Les cellules Th17, caractérisées par la production d'IL-17A et l'expression du facteur de transcription ROR γ t, participent à l'élimination des pathogènes extracellulaires. Comme expliqué précédemment, on retrouve ces cellules dans plusieurs pathologies auto-immunes. Chez les cellules Th17, le AhR est fortement exprimé comme dans les cellules Treg (Ho et Steinman 2008). Il a été montré que les cellules Th17 induites par l'activation du AhR en réponse au FICZ présentaient une augmentation de la production l'IL-22, une cytokine pro-inflammatoire contribuant au développement de certaines pathologies inflammatoires chroniques, comme la maladie de Crohn (L. J. Li et al. 2014). La voie de signalisation permettant la production d'IL-22 par les cellules Th17 est dépendante de l'activation par l'IL-23 produite par les cellules dendritiques et les macrophages. Les cellules Th17 issues de souris AhR^{-/-} ne peuvent pas produire d'IL-22 même avec une activation par l'IL-23 (Veldhoen et al. 2008). L'activation du AhR

joue donc un rôle dans la régulation de l'auto-immunité induite par les cellules Th17. D'autre part, il a été montré que l'IL-2 pouvait inhiber la différenciation en cellules Th17 (Laurence et al. 2007). L'activation du AhR entraîne l'expression de Aiolos, un modificateur épigénétique qui réprime l'expression de l'IL-2 (Quintana et al. 2012). De plus, AhR inhibe l'activation des protéines STAT1 et STAT5 qui sont délétères pour la différenciation des cellules Th17 (Kimura et al. 2008 ; Veldhoen et al. 2009). Ces résultats indiquent que le AhR agit très tôt dans le stade de différenciation des cellules Th17. En effet, d'autres facteurs sont nécessaires pour que les cellules Th17 en devenir développent leurs caractéristiques pro-inflammatoires (Y. Lee et al. 2012 ; Korn et al. 2009). Ainsi, l'action du AhR semble majoritairement liée à des cellules Th17 possiblement engagées dans un mécanisme de plasticité développementale vers un autre phénotype.

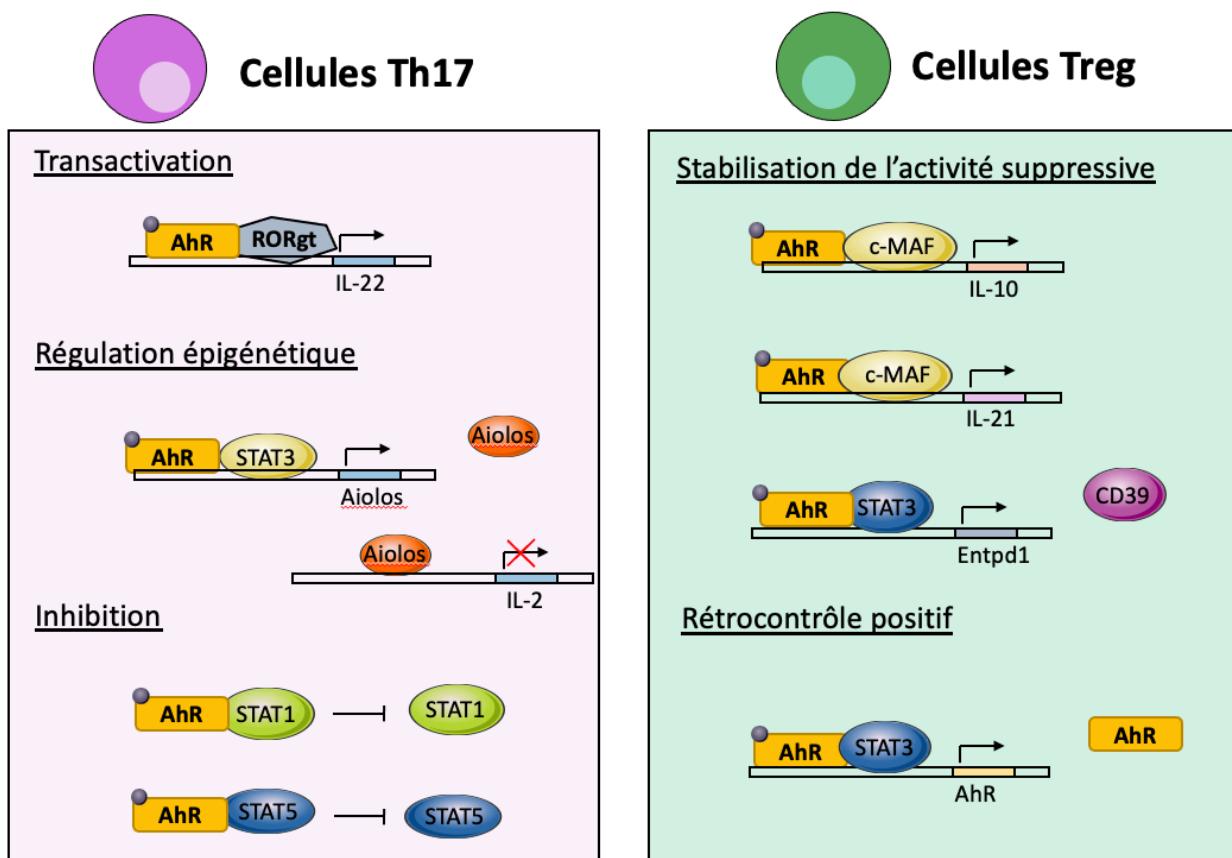


Figure 20 Effet de la signalisation du AhR sur les cellules Th17 et Treg

Chez les cellules Th17, le AhR induit l'expression de l'IL-22 via l'interaction avec ROR γ t. AhR peut inhiber l'activation de STAT1 et STAT5. L'expression de l'IL-2 est inhibée par la production d'Aiolos après la liaison du AhR avec STAT3. Chez les cellules Treg, AhR coopère avec c-Maf pour induire l'expression de l'IL-10 et l'IL-21. L'interaction du AhR avec STAT3 induit l'expression du CD39. Cette interaction favorise également l'expression du AhR. D'après (Gutierrez-Vazquez et Quintana 2018).

Les cellules Th22 sont caractérisées par la production d'IL-22 et l'absence de production d'IL-17. Leur différenciation est induite par l'exposition à l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23. Le facteur de transcription AhR a aussi été décrit comme étant décisif dans la différenciation des cellules Th22 (Basu et al. 2012). En outre, nous avons vu que le AhR contrôlait la production d'IL-22 dans les cellules Th17. L'IL-22 est une cytokine produite majoritairement dans les cellules Th22, donc l'un des facteurs de transcription permettant leur différenciation est le AhR (Basu et al. 2012).

L'activation du AhR a aussi un effet significatif sur les lymphocytes T CD8. En effet, une exposition au TCDD induit une suppression indirecte de la réponse primaire des lymphocytes T CD8 contre le virus de l'influenza (B. P. Lawrence et al. 2006). De plus, les lymphocytes T CD8 issus de souris exposées au TCDD durant leur développement ont une réponse réduite contre le virus de l'influenza. Ces modifications seraient dues en autre à des modifications épigénétiques (Winans et al. 2015). D'autre part, le AhR est plus fortement exprimé dans les cellules T CD8 qui résident dans les tissus par rapport aux autres LT CD8. Par conséquent, le AhR semble jouer un rôle dans la persistance de ces cellules dans la peau, contribuant ainsi à la protection contre les micro-organismes (Zaid et al. 2014).

Les cellules dendritiques sont aussi très impactées par la voie d'activation du AhR. Ces cellules jouant un rôle central dans le contrôle de la réponse des lymphocytes T, la modulation de leur différenciation et fonction par le AhR a donc un fort impact sur leur réponse immunitaire (Quintana, Yeste et Mascanfroni 2015). En effet, l'agoniste du AhR StemRegenin 1 (SR1) favorise l'expansion des progéniteurs de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ humaines (Boitano et al. 2010), mais également leur différenciation en cellules dendritiques myéloïdes ou plasmocytoïde (Thordardottir et al. 2014).

Le AhR peut aussi affecter la présentation d'antigènes par les cellules dendritiques. En effet, l'exposition des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse au TCDD diminue l'expression du CD11c, mais augmente l'expression du CMH-II et du CD86 à la surface de ces cellules, ainsi que leur production d'IL-6 et de TNF- α (Bankoti, Rase, et al. 2010). Les mêmes résultats ont été observés sur des DC issues de la rate traitées au TCDD (Bankoti, Burnett, et al. 2010). En revanche, l'utilisation de l'ITE comme agoniste du AhR sur des cellules dendritiques induit cette fois-ci une diminution d'expression du CMH-II et de ses molécules de co-stimulation, ainsi que la production de cytokines favorisant la différenciation des cellules Th1 et Th17 (Quintana et al. 2010). Le AhR, décrit initialement comme senseur biologique, peut donc moduler la différenciation des cellules T CD4, mais l'impact de son activation à la suite d'une exposition aux xénobiotiques chez l'homme est encore très peu étudié.

CHAPITRE 4 ÉCHECS RÉPÉTÉS D'IMPLANTATION

Comme décrit précédemment, la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ joue un rôle dans la réussite ou l'échec de plusieurs processus biologiques. Par exemple, il a été montré qu'une organisation complexe des réponses pro- et anti-inflammatoires des cellules T CD4⁺ contribue à l'implantation et le maintien de la croissance de l'embryon (Ahmadi et al. 2017 ; Sykes et al. 2012 ; Tsuda et al. 2019). Dans cette partie, nous avons étudié le rôle des cellules T CD4⁺ dans les échecs répétés d'implantation embryonnaire.

4.1 Processus d'implantation

4.1.1 Développement embryonnaire

Après la fécondation de l'ovule par le spermatozoïde, plusieurs mécanismes sont engagés pour induire la reprise de la méiose. Le nouveau zygote (ovule fécondé) rentre dans un processus de divisions successives. Au stade de deux cellules, le zygote est alors appelé blastomère (environ 24 h). Le stade morula est atteint environ quatre jours après la fécondation, à ce stade il est constitué d'une trentaine de blastomères. Le stade blastocyste est ensuite atteint au jour cinq après fécondation.

La formation du blastocyste est possible à la suite d'une compaction cellulaire et l'accumulation d'un liquide intracellulaire, composé de plus d'une centaine de protéines (Tedeschi et al. 2017). À ce stade, le blastocyste est caractérisé par la présence d'une cavité liquidienne appelée, blastocèle. Le blastocyste est entouré par une matrice extracellulaire, la zone pellucide, essentielle à la survie de l'ovocyte (Wassarman et al. 1999) (**Figure 21**). Il se divise ensuite en deux types cellulaires distincts ; i) les cellules internes qui constituent le bouton embryonnaire et formeront l'embryon et ii) les cellules externes appelées trophoblastes, qui seront responsables de l'implantation de l'embryon dans la cavité utérine et formeront le placenta (Knofler et al. 2019).

Pour l'implantation de l'embryon, des mécanismes sont indispensables tels que la sécrétion de protéases, comme la métalloprotéinase-2 (MMP2), et les phénomènes d'hyperpression qui permettent de rompre la membrane pellucide (Ferrer et al. 2012). Dans un traitement de fécondation *in vitro*, la sélection d'un embryon présentant le meilleur potentiel de développement est indispensable pour favoriser les chances d'implantations (Vernon et al. 2011). La sélection de l'embryon s'appuie principalement sur des caractéristiques morphologiques

(aspect, nombre de cellules, etc.), permettant de classer les embryons en 3 grades différents (bon, passable et médiocre). Un embryon de meilleur grade est positivement corrélé avec l'augmentation du taux d'implantation (Y. Y. Zhao, Yu et Zhang 2018).

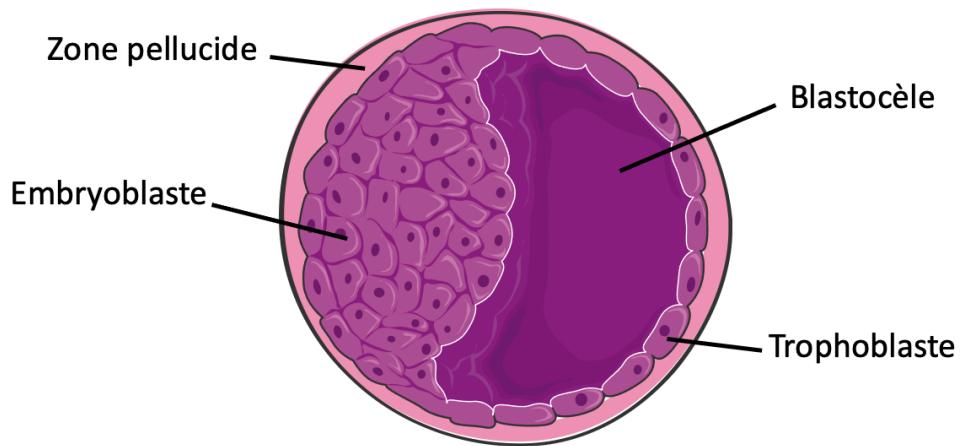


Figure 21 Représentation d'un blastocyste

Le blastocyste est composé : d'un embryoblaste (ensemble de cellules formant le futur embryon), du blastocèle (une cavité remplie de liquide, d'eau et de sels), les cellules trophoblastes (responsables de l'implantation) et la zone pellucide (une matrice extracellulaire glycoprotéique sulfatée qui entoure le blastocyste).

4.1.2 Réceptivité de l'endomètre

Entre le 5^e et le 9^e jour après l'ovulation, l'endomètre présente toutes les caractéristiques nécessaires à l'implantation de l'embryon, cette période est appelée « fenêtre d'implantation ». On retrouve durant ce laps de temps plusieurs modifications morphologiques et biochimiques (Carbillon et al. 2001). Ces modifications sont entre autres initiées par l'embryon qui produit des molécules agissant sur la sécrétion ovarienne, et ce bien avant qu'il soit en contact avec l'endomètre. On retrouve notamment une production d'IL-1, indispensable à la production de LIF (*leukemia inhibiting factor*) et de PAF (*platelet activating factor*) (Polan et al. 1995 ; Psychoyos,

Nikas et Gravanis 1995). Le LIF produit par l'endomètre et l'embryon augmente l'expression de EGF (*epidermal growth factor*) et des gènes d'implantation dans l'endomètre réceptif (Salleh et Giribabu 2014). L'expression de PAF par l'embryon permet l'activation plaquettaire et module les fonctions immunitaires endométriales. De plus, PAF agit de manière autocrine sur la survie de l'embryon (O'Neill 2005).

4.1.3 Implantation embryonnaire

L'implantation embryonnaire peut être séparée en trois étapes : i) le contact initial du blastocyste avec la muqueuse utérine, ii) l'adhésion du blastocyste sur l'endomètre et iii) l'invasion de l'endomètre par les cellules trophoblastes (S. M. Kim et Kim 2017). Pour chacune de ses étapes, un processus de communication entre l'embryon et l'endomètre se fait. Nonobstant, tous les mécanismes intervenant dans le processus d'implantation n'ont pas encore été découverts. Cependant il a été montré que des interactions complexes entre les cellules trophoblastiques, les cellules épithéliales déciduales, les cellules immunitaires et la matrice extracellulaire de l'endomètre contribuent à ce processus (S. M. Kim et Kim 2017). En outre, plusieurs molécules comme les facteurs de croissance, les hormones, les molécules d'adhésion et les protéinases participent à ces interactions cellulaires (S. M. Kim et Kim 2017). Le blastocyste exprime de nombreux récepteurs et facteurs de croissance qui lui permet une meilleure interaction avec l'épithélium utérin, tels que l'IL-1R, l'IL-6R et le TGF- β , (Hardy et Spanos 2002). De plus, les glandes endométriales produisent également des facteurs de croissance, et divers autres métabolites nécessaires à l'implantation de l'embryon (Hempstock et al. 2004).

La libération du blastocyste de la zone pellucide lui permet d'entrer en contact avec la muqueuse utérine. L'implantation d'un embryon se fait généralement dans la partie supérieure et postérieure de la couche fonctionnelle de l'endomètre (S. M. Kim et Kim 2017). Plusieurs mécanismes contribuent à l'apposition de l'embryon sur l'endomètre. C'est notamment la L-selectine, retrouvée à la surface de l'embryon, qui attirera l'embryon vers l'endomètre et permettra son adhésion (Feng et al. 2017). De plus, l'endomètre produit l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) et l'EPF (*Early Pregnancy Factor*) qui agissent sur l'activité ovarienne avant de rentrer en contact avec l'embryon (Morton 1984 ; Theofanakis et al. 2017). Aussi, durant la compaction de la morula les récepteurs du LIF, de l'E-cadhérine et de l'EGF sont exprimés (Eswari, Sai Kumar et Sharma 2013 ; Terada, Minoura et Toyoda 1997 ; Riethmacher, Brinkmann et Birchmeier 1995). Les cadhérines sont des molécules d'adhérence utilisant une voie calcium

dépendant qui permettent l'ancrage de l'embryon à l'endomètre (Alikani 2005). Pendant la phase de contact initial, l'embryon produit de l'IL-1 qui se fixe à ses récepteurs présents sur les cellules épithéliales de l'endomètre, entraînant ainsi la sécrétion de LIF dans l'environnement endométrial (Kimber 2005). De plus, durant la phase précoce de l'implantation on observe une diminution de l'épaisseur des glycoprotéines de surface de l'endomètre, ainsi qu'une augmentation de l'attraction électrostatique entre l'embryon et l'endomètre (Chavez et Anderson 1985).

Dans un premier temps l'adhésion de l'embryon à l'endomètre est facilitée par l'action des microvillosités à la surface des blastocystes et est renforcée par des ponts intégrines (Bloor et al. 2002). Après l'adhésion, les trophoblastes se différencient en syncytiotrophoblaste et cytotrophoblaste. Le cytotrophoblaste est constitué d'une couche irrégulière de cellules mononucléées, caractérisées par une forte activité mitotique (Velicky, Knofler et Pollheimer 2016). En périphérie de ces cellules, on retrouve le syncytiotrophoblaste constitué de cellules multinucléées sans limites cellulaires visibles (syncytium) (Velicky, Knofler et Pollheimer 2016). La capacité invasive du syncytiotrophoblaste dépend de la sécrétion de molécules enzymatiques lytiques et de facteurs qui lui permettent d'induire l'apoptose des cellules épithéliales de la muqueuse utérine (Velicky, Knofler et Pollheimer 2016). Ensuite le syncytiotrophoblaste s'implante dans le stroma sous-jacent pour atteindre les vaisseaux sanguins et permettre la vascularisation de l'embryon (Velicky, Knofler et Pollheimer 2016). En réponse à l'invasion trophoblastique, les cellules stromales de l'endomètre, décidualisées durant la phase de réceptivité optimale, rentrent en apoptose et sont ensuite phagocytées par les cellules du syncytiotrophoblaste pour limiter le relargage de débris cellulaires et favoriser le développement du placenta (Achache et Revel 2006 ; Bevilacqua et al. 2010). La sécrétion de métalloprotéinases matricielles dans l'environnement endométrial le rend plus perméable à l'invasion de l'embryon (Riley et al. 1999). En effet, à la suite de la dégradation de la membrane basale, les cellules trophoblastiques envahissent le tissu conjonctif de l'utérus (Huppertz 2019). Le mécanisme d'implantation de l'embryon est également contrôlé par d'autres facteurs endométriaux qui sont produits par les cellules épithéliales, les macrophages et les leucocytes (Care et al. 2013 ; Johnson, Christmas et Vince 1999).

4.1.4 Rôle du système immunitaire dans le processus d'implantation et de la grossesse

Pour que l'embryon puisse s'implanter, il est nécessaire que l'environnement de l'utérus soit réceptif. Chez l'humain, la réceptivité de l'utérus est à son maximum durant la phase médiobéretoire (jours 19 à 23) du cycle menstruel. Cette période est généralement appelée « fenêtre d'implantation » (WOI) (Mahajan 2015). L'endomètre utérin est caractérisé par deux types cellulaires distincts : les cellules stromales et les cellules de l'épithélium. Durant la WOI, les cellules stromales se transforment en cellules de la décidue, caractérisées par une augmentation de leurs tailles et une forme arrondie (Dunn, Kelly et Critchley 2003).

Le recrutement des cellules immunitaires se fait durant la phase périovulatoire, nécessitant la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire pour faciliter la génération d'un endomètre réceptif (**Figure 22**) (Dekel et al. 2014 ; Gnainsky et al. 2010). En effet, durant cette phase, le blastocyste s'infiltre à travers la paroi épithéliale de l'endomètre pour s'implanter. Un environnement inflammatoire est donc nécessaire pour favoriser la réparation de l'épithélium utérin et l'élimination des débris cellulaires (Dekel et al. 2010). Ainsi, la première phase est généralement associée à une phase pro-inflammatoire, notamment par la production des cytokines IL-6, IL-1 et TNF- α , permettant l'expression de MMP2 nécessaire à l'implantation (Meisser et al. 1999 ; Koga et Mor 2008 ; Yoshinaga 2008). Le rôle particulier de l'inflammation lors de l'implantation embryonnaire a été démontré lors de développement de traitement de fécondation *in vitro*. En effet, lors de la réalisation d'une biopsie endométriale au cours du cycle précédent la fécondation *in vitro* cause une inflammation des tissus et permet de doubler les taux d'implantation et de grossesse clinique (Barash et al. 2003 ; Raziel et al. 2007). De plus, il a été également observé que le tissu cicatriciel provenant de chirurgie de l'endomètre constituait une zone préférentielle pour l'implantation d'un embryon (Dominguez et al. 2005). Ces résultats suggèrent que l'inflammation provenant de lésions locales de l'endomètre facilite la réussite de l'implantation, et que l'inflammation joue un rôle majeur dans ce processus.

La deuxième phase est quand a-t-elle caractérisée comme anti-inflammatoire, notamment par la présence de cytokines, telles que l'IL-4 et IL-10 (Krasnow et al. 1996). Cette phase correspond à une période de croissance et de développement rapide du fœtus qui nécessite une coopération étroite entre le système immunitaire maternel et le fœtus pour garantir la tolérance

(Gaunt et Ramin 2001). Une coopération s'installe donc entre le système immunitaire maternel et le fœtus afin de maintenir son développement et sa protection en cas de détection de pathogènes (Kanellopoulos-Langevin et al. 2003 ; C. G. Walker et al. 2010). Ce mécanisme fait intervenir plusieurs types cellulaires de l'immunité innée et adaptative. Également, plusieurs signaux comme des hormones et des cytokines permettent une modulation du système immunitaire maternel. De plus, durant la grossesse, on retrouve dans la décidue, des macrophages, des cellules NK, des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4⁺ (Aluvihare, Kallikourdis et Betz 2004 ; King, Loke et Chaouat 1997 ; Mor, Straszewski-Chavez et Abrahams 2006 ; Tagliani et Erlebacher 2011). Au cours du premier trimestre de la grossesse, les cellules NK, macrophages et DCs s'infiltrent dans la décidue et s'accumulent autour des cellules trophoblastiques (Shimada et al. 2006). En outre, des études ont montré que la suppression des cellules immunitaires dans l'environnement embryonnaire est délétère pour le développement de l'embryon, limitant la capacité invasive des trophoblastes et induisant des modifications dans la formation de la décidue (Hanna et al. 2006). En effet, l'absence de cellules NK empêche les trophoblastes d'atteindre la vascularité de l'endomètre (Greenwood et al. 2000 ; Hanna et al. 2006). De même que la déplétion des DCs empêche la formation de la décidue (Plaks et al. 2008). En outre, contrairement au rôle que peuvent avoir les DCs dans le processus de rejet de greffe, durant la grossesse, les DCs participent grandement à l'inhibition de la surveillance immunitaire pour maintenir la tolérance de l'embryon (M. K. Collins, Tay et Erlebacher 2009). De plus, les macrophages jouent un rôle dans l'élimination des débris par phagocytose issus de l'invasion de l'embryon et du trophoblaste (Ning, Liu et Lash 2016). Ces cellules sécrètent également un ensemble de cytokines anti-inflammatoires qui permettent le maintien de la tolérance (Mor et Abrahams 2003). Durant la grossesse, le système immunitaire n'est donc pas supprimé pour favoriser la tolérance de l'embryon, mais il est modulé afin de maintenir et de protéger le développement du fœtus (Mor et Cardenas 2010 ; Cardenas et al. 2010).

Enfin, durant la dernière phase, le développement du fœtus se termine et ce dernier est prêt à quitter l'environnement maternel. Lors de cette phase, des cellules immunitaires affluent vers le myomètre pour favoriser le processus pro-inflammatoire, comme l'IL-1 β et l'IL-6, nécessaire aux contractions utérines, pour l'expulsion du nouveau-né et le rejet du placenta (Gomez-Lopez et al. 2014). La grossesse correspond donc à une succession d'environnement pro-inflammatoire et anti-inflammatoire pour assurer son bon déroulement (Mor 2008).

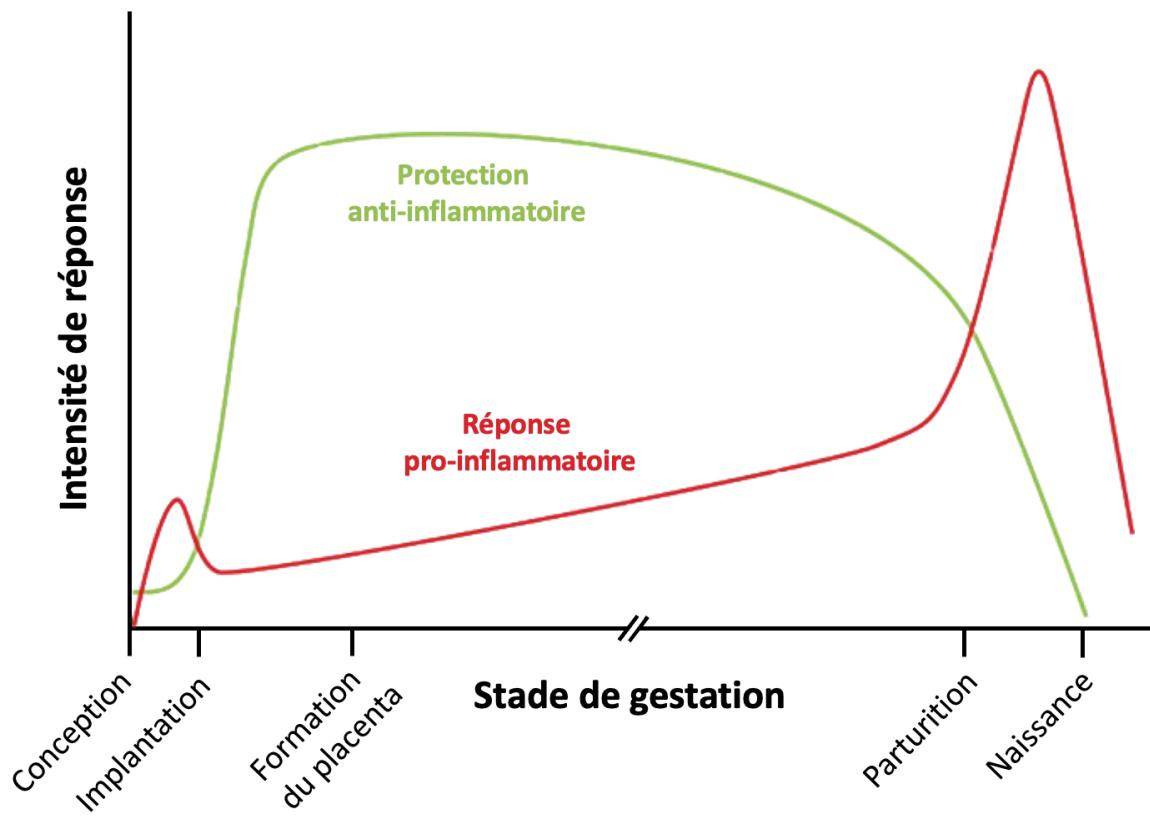


Figure 22 Évolution de la réponse inflammatoire pendant les différents stades de gestations

Durant la phase de pré-implantation, une courte réponse pro-inflammatoire est nécessaire pour permettre l'implantation. Cette réponse pro-inflammatoire est rapidement contrôlée par une forte réponse anti-inflammatoire qui durera durant toute la gestation pour favoriser la tolérance de l'embryon. Au moment de la parturition, la réponse anti-inflammatoire diminue et la réponse pro-inflammatoire augmente afin de permettre l'expulsion du nourrisson.

4.2 Les échecs répétés d'implantation

4.2.1 Description

Les différentes études pour caractériser les échecs d'implantation ou les échecs répétés d'implantation (ERI) ne sont pas encore parvenues à une définition consensuelle. Néanmoins, on peut définir que l'échec de l'implantation survient quand le sac gestationnel intra-utérin n'est pas détecté après environ trois semaines post-transfert d'embryon (Timeva, Shterev et Kyurkchiev 2014). On peut observer précocement un échec d'implantation par l'absence d'hCG plasmatique ou bien un échec d'implantation tardif où le hCG est détectable dans le sang, mais cette production diminue avant l'observation du sac gestationnel, composé de l'embryon en développement (Coughlan et al. 2014). Les échecs d'implantation peuvent survenir à la fois chez les femmes ayant recours à la FIV, mais aussi chez les femmes qui n'utilisent aucun traitement de fertilité pour concevoir un enfant.

Dans le cas des FIV, une patiente est considérée comme étant en échec répété d'implantation (ERI) quand elle a subi trois tentatives de transferts d'embryons (de bonne qualité ou grade) qui ont échoué (Orvieto, Brengauz et Feldman 2015). Mais d'autres études considèrent qu'une patiente est considérée comme étant en ERI après l'échec de trois cycles pratiqués par transfert de deux embryons de bonne qualité (Zeyneloglu et Onalan 2014). Également, les ERI ont été définis comme étant l'échec de grossesse clinique après quatre transferts d'embryons de bonne qualité, avec au moins trois cycles de FIV chez des femmes de moins de 40 ans (Coughlan et al. 2014).

Il est difficile d'établir précisément l'incidence et la prévalence des échecs répétés d'implantation étant donné qu'il existe beaucoup de variations dans sa définition. Il faut cependant tenir compte que les causes de ces échecs d'implantation puissent être dues à des facteurs utérins, paternels ou embryonnaires (Timeva, Shterev et Kyurkchiev 2014). Plusieurs facteurs de risques, comme l'âge de la mère, le tabagisme, l'indice de masse corporelle et le niveau de stress peuvent aussi être déterminants. De même, que le stade de l'embryon transféré doit être pris en compte (Rinehart 2007). Plus récemment, l'environnement immunitaire a été décrit comme un des facteurs majeurs pouvant expliquer l'ERI (Bashiri, Halper et Orvieto 2018 ; Franasiak et Scott 2017).

4.2.2 Mécanismes physiopathologiques

Comme présenté précédemment, l'expression de LIF, souvent utilisé comme marqueur de la réceptivité de l'endomètre, est fortement associé à la réussite de l'implantation (Kimber 2005 ; Seli et al. 2005). C'est pourquoi une faible quantité de LIF est associée à des risques plus élevés

d'échecs d'implantation (Seli et al. 2005). En effet, il a été montré que la production de LIF est diminuée chez les femmes ERI (Hambartsoumian 1998). Il a aussi été suggéré que d'autres molécules, comme les prostaglandines (PG) et les molécules d'adhésion cellulaire (CAM), peuvent également être fortement exprimées dans les échecs d'implantation. En effet, les prostaglandines interviennent dans les processus d'ovulation et d'implantations (Niringiyumukiza, Cai et Xiang 2018). De plus, il a été montré que les enzymes phospholipase A₂ et cyclooxyéganase (COX-2), permettant la synthèse des prostaglandines, sont diminués chez les femmes ERI (Achache et al. 2010). Également, les CAM, et plus particulièrement les intégrines retrouvées dans les interactions cellules-cellules, jouent un rôle majeur dans l'implantation (Merviel et al. 2001). Il a été montré que certaines formes d'intégrines, comme l'intégrine alpha-v beta, étaient moins exprimées chez les femmes présentant un échec du cycle de FIV (Thomas et al. 2003).

Par ailleurs, les cellules immunitaires peuvent également contribuer aux échecs d'implantation. Par exemple, il a été démontré que la réceptivité de l'endomètre peut être établie lors de la mise en place d'un profil inflammatoire dans l'utérus durant la phase lutéale (Dekel et al. 2010). En effet, les cellules NK constituent la lignée cellulaire la plus abondante retrouvée dans l'environnement embryonnaire (Koopman et al. 2003). Contrairement à leur rôle premier qui est de permettre l'élimination de cellules cancéreuses, les NK utérins participent au maintien de l'intégrité de l'embryon (Le Bouteiller 2013). Cependant, il a été montré qu'une plus forte activité des cellules NK circulantes était retrouvée chez les femmes en échecs d'implantation, suggérant que ces cellules induisaient une réponse immunitaire contre l'embryon (H. Yamada et al. 2003). D'autre part, l'équilibre du profil local en cytokines traduit le bon fonctionnement des cellules de l'immunité, et plus particulièrement les cellules T CD4⁺ (Guzeloglu-Kayisli, Kayisli et Taylor 2009). Comme montré précédemment, la grossesse est souvent associée à une modulation de l'état inflammatoire de type « Th1 » (pro-) vers le type « Th2 » (anti-) (Reinhard et al. 1998). En effet, plusieurs études ont montré un déséquilibre en faveur des cellules Th1, notamment par la présence de cytokines pro-inflammatoires comme IFN-γ, dans échecs répétés d'implantations (Ng et al. 2002 ; J. Y. H. Kwak-Kim, Gilman-Sachs et Kim 2005 ; J. Y. Kwak-Kim et al. 2003).

4.2.3 Immunomodulation de l'endomètre par l'utilisation de PBMC

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'implantation est l'une des étapes clés dans la réussite d'une grossesse. La réceptivité de l'endomètre, perturbé par un

dysfonctionnement immunitaire lors d'un échec d'implantation, nécessiterait de retrouver un équilibre inflammatoire pour favoriser la réussite des traitements *in vitro* (Benschop et al. 2012). Pour résoudre ce problème, l'un des traitements proposés est l'utilisation de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) (S. Li et al. 2017). Les PBMCs sont constituées de plusieurs leucocytes mononucléés, comme les lymphocytes, les monocytes et les cellules NK (Kleiveland 2015). Des études ont montré que dans des modèles bovins et murins, les taux de grossesses étaient augmentés par un traitement intra-utérin avec des PBMCs (Ideta, Hayama, et al. 2010 ; Ideta, Sakai, et al. 2010 ; Yu et al. 2014). De plus, ces effets semblent être augmentés en traitant les PBMCs avec de l'hCG (Nakayama et al. 2002a). En effet, l'hCG augmente leur expression de LIF, une cytokine favorisant la réussite de l'implantation (Salleh et Giribabu 2014). Aussi, les PBMC favorisent la propagation et l'invasion des blastocystes murins et l'invasion des cellules JAR, dérivées du choriocarcinome placentaire humain (Nakayama et al. 2002a ; Yu et al. 2015). Il a été également démontré que l'injection de PBMC dans l'utérus avant le transfert d'un embryon lors d'une FIV chez de patientes ERI pouvait améliorer considérablement le taux d'implantation (Yoshioka et al. 2006a). Plusieurs études à ce jour ont montré des résultats prometteurs avec l'utilisation de cette méthode pour traiter les patientes ERI (S. Li et al. 2017 ; Yu et al. 2016 ; Madkour et al. 2016 ; Okitsu et al. 2011).

Pour expliquer l'augmentation du taux d'implantation après un traitement PBMC, plusieurs mécanismes ont été proposés. La présence des PBMC dans la cavité endométriale permettrait la production de plusieurs cytokines pouvant avoir un impact positif sur la réceptivité de l'endomètre, comme l'IL-1 α , IL-1 β et le TNF- α (H. Fujiwara 2009 ; Yu et al. 2014 ; Ideta, Sakai, et al. 2010). De plus, l'hCG active les PBMC *in vitro* et augmente la production de LIF et IL-1 β permettant de favoriser l'implantation (Yu et al. 2015 ; Nakayama et al. 2002a). D'autre part, il a été suggéré que les lymphocytes T présentant un profil « Th2-like » peuvent s'infilttrer dans le stroma endométrial, pouvant ainsi faciliter la mise en place d'un profil inflammatoire plus favorable à l'implantation (Hashii et al. 1998 ; Ginsburg et al. 2005). Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les lymphocytes CD4 $^{+}$ peuvent produire un large éventail de cytokines pouvant augmenter ou inhiber la réponse inflammatoire (Luckheeram et al. 2012). C'est pourquoi il est important de comprendre le rôle que peuvent jouer ces cellules dans l'immunomodulation de l'endomètre.

MISE EN CONTEXTE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

La mise en place de la réponse immunitaire fait intervenir une multitude de types cellulaires qui agissent en coopération pour l'élimination d'un pathogène ou traiter des troubles immunitaires. En particulier, les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire adaptative (Luckheeram et al. 2012). Il faut savoir que la différenciation des cellules T CD4⁺ nécessite plusieurs contacts cellulaires et la présence de cytokines dans le microenvironnement cellulaire (Luckheeram et al. 2012). Cependant, d'autres molécules extérieures à l'organisme, comme les xénobiotiques, peuvent également influencer leur différenciation (Reed et Wetzel 2018 ; Mohinta et al. 2015). On retrouve dans les lymphocytes T CD4⁺ plusieurs sous-types majoritaires, à savoir les cellules Th1, Th2, Th17, Th22 et Treg, qui sont caractérisés par l'ensemble des cytokines qu'elles sécrètent (Luckheeram et al. 2012). La nature des cytokines produites permet d'activer ou d'inhiber une réponse inflammatoire en réponse à une pathologie (J. M. Zhang et An 2007). Le maintien de l'homéostasie de la différenciation des cellules T CD4⁺ est indispensable au système immunitaire pour réagir de manière adéquate (Drescher et al. 2020 ; Diller et al. 2016 ; Eisenstein et Williams 2009). Ainsi, nous avons cherché à comprendre comment la différenciation des cellules T CD4⁺ peut être influencée par la pression du microenvironnement dans un contexte occupationnel et pathologique.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact d'une exposition occupationnelle à des xénobiotiques (ligands exogènes du AhR) sur la différenciation des lymphocytes T CD4⁺. En effet, chez la souris, il a été montré que certains ligands du AhR peuvent moduler la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et avoir un impact significatif sur l'évolution d'une pathologie, comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (Quintana et al. 2008). De plus, certains xénobiotiques, comme le TCDD, ont été classés comme étant potentiellement cancérogènes par l'agence internationale de la recherche sur le cancer (IARC) (Larigot et al. 2018). Cependant, à ce jour, très peu d'études ont montré si une telle exposition à des ligands du AhR pouvait moduler la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ chez l'Homme (Goettel et al. 2016 ; C. H. Nguyen et al. 2017). Ainsi, notre premier objectif était d'étudier la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ chez des individus fortement exposés à des ligands du AhR : les pompiers. Pour cela nous avons

évalué la persistance des xénobiotiques dans l'organisme des pompiers, ainsi que le profil des cellules T CD4⁺ et les cytokines qui composent leur microenvironnement dans la circulation sanguine. Enfin, nous avons exposé *in vitro* des cellules T CD4⁺ humaines à des ligands du AhR pour déterminer leur impact sur la différenciation de ces cellules (**Article 1**).

Dans un second temps, nous avons étudié l'implication de la différenciation des cellules T CD4⁺ dans une situation pathologique, à savoir les échecs d'implantation répétés dans le cadre d'un traitement de fécondation *in vitro*. Plus particulièrement, notre second objectif a été de déterminer le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans le traitement de l'immunomodulation de l'endomètre. Ce traitement indolore, utilisant des PBMC autologues implantés dans la cavité utérine, a montré d'excellents résultats chez des patientes en échec répété d'implantation (Yakin, Oktem et Urman 2019). On retrouve parmi les PBMC plusieurs types cellulaires, dont majoritairement des lymphocytes T CD4⁺. Il a été montré que la réussite de l'implantation repose sur un équilibre provisoire entre un environnement pro- et anti-inflammatoire (Reinhard et al. 1998). De plus, un environnement pro-inflammatoire a été mis en évidence dans plusieurs cas d'échecs d'implantation embryonnaire. Nous supposons donc que la différenciation des cellules T CD4⁺ vers un phénotype anti-inflammatoire (Th2 et Treg) aura un impact significatif sur le succès de ce traitement. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons constitué une cohorte de patientes, scindé en fonction du traitement proposé par la clinique de fertilité : traitement d'insémination (groupe IUI), fécondation *in vitro* chez des patientes avec moins de trois échecs de transfert d'embryons (groupe FIV) et chez des patientes avec au moins trois échecs de transfert d'embryon (groupe ERI). Tout d'abord, nous avons caractérisé les sous-types de lymphocytes T CD4⁺ circulants avant traitement afin d'établir le profil inflammatoire de nos patientes. Par la suite, nous avons évalué l'effet du traitement d'hCG/PHA, utilisé pour activer les PBMC, sur la différenciation des cellules T CD4⁺ et leur production en cytokines, permettant ainsi d'établir leur rôle dans ce traitement cellulaire (**Article 2**).

SECTION 2. ARTICLES SCIENTIFIQUES

PREMIER ARTICLE

Environmental exposition to aromatic hydrocarbon receptor ligands modulate the CD4⁺ T lymphocyte subpopulations profile.

Une exposition environnementale à des ligands du récepteur aux hydrocarbures aromatiques modifie le profil des lymphocytes T CD4⁺.

Auteurs :

Guillaume Ricaud¹, Debbie Lim¹, Jacques Bernier¹

¹Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, 531 boul. Des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Exposure and Health

Cet article a été soumis le 27 juillet 2020.

Contribution des auteurs :

Les échantillons de la cohorte de pompiers et des témoins ont été collectés par Guillaume Ricaud et Debbie Lim. Les expériences de cytométrie en flux sur les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ ont été réalisées par Guillaume Ricaud et Debbie Lim. L'analyse des cytokines présentes dans les sérums a été réalisée par Guillaume Ricaud. La détection des ligands du AhR dans les sérums a été réalisée par Guillaume Ricaud. Les expériences de différenciation des cellules T CD4⁺ *in vitro* ont été faites par Guillaume Ricaud. Le Professeur Jacques Bernier a conçu le projet de recherche et supervisé les travaux de recherche. Jacques Bernier a révisé le manuscrit pour la production de la version finale ici présente.

Résumé du premier article en français

Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques a d'abord été décrit comme un senseur biologique capable de se lier à plusieurs polluants environnementaux, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les hydrocarbures aromatiques halogénés. Récemment, il a été montré que la différenciation des cellules T CD4+ pouvait être influencée par la présence de ligands du AhR dans le microenvironnement cellulaire. Dans cette étude, nous avons évalué l'environnement immunitaire des cellules T CD4+ dans une cohorte de pompiers, un groupe d'individus plus exposés aux ligands du AhR. Nos résultats ont montré que chez les pompiers, la fréquence en cellules Th17 et Treg était augmentée par rapport à notre groupe témoin. De plus, leur microenvironnement présente une augmentation de certaines cytokines contribuant à la différenciation de ces cellules. En outre, la présence d'une plus grande quantité de ligands du AhR dans le sérum a été observée chez les pompiers. Enfin, des traitements *in vitro* de cellules T CD4+ avec des ligands du AhR (BaP et Kynurénine) ont montré une capacité à moduler la différenciation des cellules Treg et Th17.

Environmental exposition to aromatic hydrocarbon receptor ligands modulates the CD4⁺ T lymphocyte subpopulations profile.

Guillaume Ricaud¹, Debbie Lim¹, Jacques Bernier¹

¹Institut National de la Recherche Scientifique-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 boul. Des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), aromatic hydrocarbon receptor (AhR), occupational exposure, T lymphocyte, immune response, inflammation, Firefighter, Th17, Treg, exposure risk.

Correspondance : Jacques Bernier, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 boulevard des Prairies, H7V 1B7, Laval, Québec, Canada. Fax : 450-686-5501, Phone: 450-687-5010, e-mail: jacques.bernier@iaf.inrs.ca

Author Contributions:

JB conceived the study; GR, DL, JB designed the study; GR, DL performed the experiments; GR, DL, JB analyzed, interpreted the data and wrote the paper; JB supervised the study.

Abbreviations:

AhR: aryl hydrocarbon receptor, AhRR: aryl hydrocarbon receptor repressor, ALD: alcohol dehydrogenase, APC: antigen-presenting cell, ARNT: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, BaP: benzo(a)pyrene, BATF: basic leucine zipper transcription factor, ATF-like bHLH-PAS: basic helix-loop helix Per-ARNT-Sim, Bili: bilirubin, CARS: compensatory anti-inflammatory response syndrome, MHC: major histocompatibility complex, CYP450: cytochrome P450, DMBA: 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DRE: dioxin response element, EGFR: epidermal growth factor receptor, FBS: fetal bovine serum, FICZ: 6-formylindolo[3,2-b]carbazole Foxp3: forkhead box P3, GATA-3: GATA 3 binding protein, GST: glutathione s-transferase, GVH: graft versus host, HAH: halogenated aromatic hydrocarbon, PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon, Hsp90: heat shock protein 90, I3C: indole-3-carbinol, IFN- γ : interferon gamma, IL: interleukin, IRF4: interferon regulatory factor 4, Kyn: kynurenine, KMO: kynurenine 3-monooxygenase, LT: T lymphocyte , MODS: multiple organ dysfunction syndrome, NES: nuclear export signal, NF- κ B: nuclear factor-kappa-B, NK: natural killer, NLS: nuclear localization signal, NQO: NADH-quinone oxidoreductase, PBMC: peripheral blood mononuclear cells, ROR γ t: RAR-related orphan receptor gamma, SIRS: systemic inflammatory response syndrome, T-bet: T-box transcription factor, TAD: trans-activating domain, Tc: cytotoxic T cell, TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine, TGF β : transforming growth factor beta, Th: T helper cell, TNF: tumor necrosis factor, Treg: regulatory T cell, UGT: uridine triphosphate glucuronosyl transférase VAF347: (4-(3-chloro-phenyl)-pyrimidin-2-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-amine, XRE: xenobiotic response element.

Abstract

The aromatic hydrocarbon receptor (AhR) had been described as a molecular sensor to which many environmental pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs). Recently, it had been demonstrated that the differentiation of CD4⁺ T cells is influenced by AhR ligands present in the surrounding microenvironment of the cells. In this study, we assessed the immune environment of CD4⁺ T cells in a cohort of firefighters, a group of individuals more exposed to AhR ligands. Our results showed that in firefighters, Th17 and Treg cells were increased compared to our control group. Also, the microenvironment presents an increase in cytokines promoting the differentiation of these cells in firefighters. The presence of a large number of AhR ligands in the firefighters' sera had been observed. Finally, *in vitro* treatments of CD4⁺ T cells with AhR ligands (BaP and Kynurenine) had shown an ability to modulate Treg and Th17 cells' differentiation.

1. Introduction

CD4⁺ T lymphocytes (CD4⁺ cells) play an essential role in the control of the immune response.

They are the critical effectors of a highly regulated immune cell network to ensure an effective response to pathogens. CD4⁺ cells are associated with a pro- or anti-inflammatory response depending on the type of secreted cytokines (Broere et al. 2011). Each cytokine production is related to a given subtype of CD4⁺ T cell, resulting from the differentiation of the naïve T cell (Th0) upon activation after encountering an antigen presented by an antigen-presenting cell (APC). There are five main subtypes of CD4⁺ T cells. First, type 1 CD4⁺ T helper cells (Th1) are involved in immune responses triggered by extracellular pathogens and are therefore associated with a pro-inflammatory response profile (Sallusto 2016). These cells were characterized by a predominant production of interferon-gamma (IFN γ) and a constant expression of the T-bet transcription factor (Iwata et al. 2017). The Th1 response plays an essential role in avoiding diseases such as sclerosis, rheumatoid arthritis and, lupus erythematosus(Schulze-Koops et Kalden 2001 ; Oreja-Guevara et al. 2012 ; Shah et al. 2010). On the other hand, the Th1 response is also essential to avoid transplant rejections. There is a back control in these cells to produce IL-10, an anti-inflammatory cytokine (Trinchieri 2007). Type 2 CD4⁺ T helper cells (Th2) intervene in response to extracellular or parasitic pathogens, such as helminths (Zhu et al. 2006). They secrete IL-4 to trigger the production of immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin E (IgE) by B lymphocytes (B cells) (Zhu et al. 2006). They also secrete IL-5, which induces eosinophilic granulocytes' recruitment, mainly found in allergic reactions (Spencer et Weller 2010). Th2 cells produced IL-10 which function by inhibiting pro-inflammatory cytokines made by macrophages and other T cells (Fang et Zhu 2020). The IL-17 producing CD4⁺ T cells (Th17) are described as pro-inflammatory cells that play a role in controlling extracellular bacteria, especially on the surface of the epithelium (Fossiez et al. 1996). These cells are major scissors in certain autoimmune diseases (Bedoya et al. 2013). Th17 cells mainly produce IL-17 and IL-17F, whose roles are to promote the recruitment of other immune cells (K. Chen et Kolls 2017). Th22 CD4⁺ cells are

characterized by their production of IL-22 and the absence of production of IL-17, IFN γ and IL-4 (Sugita et al. 2013). IL-22 acts on epithelial cells, skin, keratinocytes and fibroblasts (Luci et al. 2009 ; Cella et al. 2009 ; Takatori et al. 2009). Overall, these cells play a role in the innate response by promoting the synthesis of antimicrobial peptides such as β -defensin 2 and β -defensin 3 (Dixon et al. 2016). Regulatory T cells (Tregs) express the Foxp3 transcription factor, which allows their immunoregulatory function on other immune cells (Lu, Barbi et Pan 2017). Tregs cells can be divided into two distinct groups based on their site of production. The first group, consisting of natural regulatory T cells (nTregs), is generated in the thymus, whereas induced regulatory T cells (iTregs) are derived from naive T lymphocytes in blood after stimulation (Adeegbe et Nishikawa 2013 ; Sakaguchi et al. 2008). Tregs play an essential role in maintaining peripheral tolerance and preventing autoimmune diseases (Shao, Yu et Shen 2018). However, it has been shown that in some instances of cancer, tumor cells promote the expansion of Tregs, which leads to a decrease in the antitumor immune response (Nishikawa 2014).

Recent studies have shown that the differentiation of CD4 $^{+}$ T cells can be modulated by a specific receptor called the aryl hydrocarbon receptor (AhR). The AhR is a ligand-dependent transcription factor from the Per-Arnt-Sim (PAS) superfamily of proteins (Stevens, Mezrich et Bradfield 2009). AhR mediates many cellular events in response to halogenated and non-halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), by binding the xenobiotic response elements (XRE) and activating the transcription of target genes (L. P. Nguyen et Bradfield 2008). It is a ubiquitous receptor found in many species, including mammals, reptiles and amphibians (Hahn 2002), and is expressed in various types of cells, which suggests its essential and widespread role. The physiological function of AhR is not yet understood. However, it is known that AhR plays a role in development, vascularization, metabolism and in the immune system (L. P. Nguyen et Bradfield 2008 ; Esser, Rannug et Stockinger 2009). In fact, it has been shown that the differentiation of CD4 $^{+}$ T cells can be modulated via the activation of AhR in a ligand-dependent way (L. Zhou 2016). For example, activation of AhR by its ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) favors the

differentiation of Tregs (Veldhoen et al. 2008 ; Quintana et al. 2008). The AhR expression can also be modulated by cytokines such as IL-6 and TNF α , involved in Th22 differentiation (Sugita et al. 2013). AhR has a wide range of ligands that it can bind; a list that has continued to extend even today. AhR has mostly been studied in the field of toxicology with TCDD as the prototype ligand, mostly due to its capacity to bind AhR with high affinity (Stevens, Mezrich et Bradfield 2009). But this binding capacity is more significant with murine AhR than human AhR (Flavenvy et Perdew 2009). Since its discovery, the role of AhR has long been described as an environmental sensor, by inducing the expression of xenobiotic-metabolizing enzymes, such as cytochromes P450 (Nebert 2017). Indeed, AhR has been shown to bind many different environmental PAHs, including benzo-a-pyrene (BaP) (Hockley et al. 2007) and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) (Jensen et al. 2003). Many PAHs, halogenated or non-halogenated, can be found in large amounts in cigarette smoke, municipal and industrial waste combustion, fossil fuel combustion and forest fires (Simoneit 2002 ; Guillou et al. 2013). They are mostly formed in the incomplete combustion of organic material and can exist in both particle and gas phase (Fent et al. 2014). However, some endogenous molecules have also been identified as AhR ligands, such as bilirubin, indirubin and kynurenone (L. P. Nguyen et Bradfield 2008). Bilirubin and kynurenone have been shown to increase the generation of Tregs, while indirubin possessed anti-inflammatory effects (Joshua D. Mezrich et al. 2010 ; Rocuts et al. 2010). The discovery of TCDD and FICZ's effects on T cell modulation has elicited more research on these two ligands' capacity to modulate an immune response, however very few studies on other ligands on this topic has been made.

Since many PAHs are present in large amounts during incomplete combustions, the groups of people that are the most exposed to these substances are firefighters. In fact, the smoke from fires can emit a wide variety of PAHs depending on the type of organic material burned, which comes in a broad range (Simoneit 2002). A study has shown that despite wearing a full protective ensemble, which included a self-contained breathing apparatus, PAH metabolites could still be found in the firefighters' bodies (Fent et al. 2014). PAHs

were able to penetrate through the gear and come into contact with the skin leading to a cutaneous absorption (Fent et al. 2014). Inhalation exposure to the smoke can also occur if there is a premature removal of the protective gear in the proximity of the fire.

Firefighters are known to have high risks of developing certain types of cancers due to their exposure to known and unknown carcinogens, including PAHs (Youakim 2006 ; Anderson et al. 2017). We suggest that PAHs and endogenous ligands modulate T cell differentiation via AhR activation, which will help control the immune response of a thermal injury and possibly foresee firefighters' risk of developing an immune disorder, which can contribute to their overall health. In this study, we demonstrated that firefighters exposed to an environment with high potential AhR ligand have a change in peripheral T cell subpopulations. The presence of AhR ligand in this cohort was confirmed by biological assay. Furthermore, we showed that the presence of these ligands affected T cell differentiation.

2. Methods

2.1 Firefighters and healthy donors

This study was approved by the ethical committee of CHUM-University Montréal (Montreal, QC, Canada) and INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, QC, Canada). All participants were required to be non-smoking active members of a fire department of Montreal city or healthy non-smoking members of INRS. Blood samples were collected from two groups of 15 firefighters: 10 years or less of experience (n=12) and 20 years or more of experience. n=15) For the control group, 15 healthy non-smoking adult donors were recruited respectively to age matching with firefighters' groups (n=15).

2.2 Chemicals and Reagents

The AhR agonist, VAF347, was purchased from EMD Millipore with ≥99% purity and was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 mg/ml. The other AhR ligands, such as bilirubin, L-kynurenine, and benzo[a]pyrene (BaP) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) with purities of ≥96%. BaP was dissolved in DMSO at 10 mM, kynurenine was dissolved in a 0.5 M HCl solution at 50 mg/ml and bilirubin was dissolved in 1 mM NaOH solution at 20 mg/ml with a few drops of 2 M NaOH solution until the powder was completely dissolved. Indirubin was purchased from Enzo Life Sciences with ≥98% purity and was dissolved in DMSO at 10 mg/ml.

2.3 Luciferase Assay

Human liver carcinoma cell line (HePG2) was cotransfected with a xenobiotic response element (XRE)-driven firefly luciferase reporter gene and a cytomegalovirus (CMV)-driven Renilla luciferase reporter gene for normalization (QIAGEN, Toronto, Ontario) following the manufacturer's instructions. Briefly, 3×10^5 cells were seeded in 24-well plates in complete DMEM medium (Gibco, Mississauga, Ontario) supplemented with 10% FBS, 25mM HEPES (Gibco), 100 U/ml penicillin (Gibco) and 100 µg/ml

streptomycin (Gibco) and incubated overnight. Media was changed the next day to Opti-MEM supplemented with 1% FBS without antibiotics. Cells were transfected with the XRE-luciferase plasmid at 1 µg per well using lipofectamine LTX transfection reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario) for 24 hours. Media was changed to DMEM, supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin), and treated with different range of concentrations of BaP (50 nM to 5 µM), indirubin (0,1 to 10 µM), VAF347 (25 to 75 nM), bilirubin (10 to 50 nM), kynurenine (25 to 100 µM), chemical diluents, serum or purified serum for 18 hours. Cell lysis and addition of Firefly luciferase substrate were done using Dual-Glo Luciferase Assay System kit (Promega, Madison, WI). The luciferase assay was performed using a 1450 MicroBeta Trilux (PerkinElmer, Shelton, CT). The same kit was used to quench Firefly luciferase signal and add Renilla luciferase substrate. The relative luciferase unit is the indicator of Firefly luciferase expression level, normalized on the Renilla luciferase expression level. All experiments were repeated three times.

2.4 Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood of healthy volunteers or firefighters. Whole blood was diluted in PBS 1X in a 1:1 ratio and gently placed on a density medium Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Sweden). The tube was centrifuged at 400 g for 30 minutes. PBMCs were collected from the Ficoll-Paque Plus-plasma interface, placed in a new tube and washed three times with PBS 1X. The PBMCs were counted and blue Trypan exclusion assay was used to measure cell viability. PBMCs used were always above 95% viability.

2.5 Flow Cytometry and Intracellular Transcription Factor and Cytokine Staining

PBMCs were seeded in 24-well plates at a density of 1×10^6 cell/ml and stimulated with 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate, 1 μ g/ml ionomycin and 1 μ g/ml brefeldin A for 5 hours at 37°C with 5% CO₂. After washing once with PBS 1X, cells were transferred into 1.5 ml microcentrifuge tubes at a density range of 5×10^5 to 1×10^6 cells/tube. Non-specific binding was blocked by adding 1 μ g of human IgG. Staining for different cell subsets were as follow; Th1 (2 μ l anti-CD4-FITC, 2 μ l anti-T-bet-PE/Cy7), Th2 (2 μ l anti-CD4-FITC, 3 μ l anti-GATA-3-PE/Cy7), Th17 (2 μ l anti-CD4-PE/Cy7, 3 μ l anti-IL-17-FITC, 2 μ l anti-ROR γ t-PE), Th22 (2 μ l anti-CD4-PE/Cy7, 3 μ l anti-IL-17-FITC, 3 μ l anti-IL-22-PE), Treg (2 μ l anti-CD4-FITC, 3 μ l anti-CD25-PE, 2 μ l anti-Foxp3-PE/Cy7). All antibodies were purchased from eBioscience, BioLegend and BD Biosciences. Briefly, cells were stained with cell-surface antibodies listed above for 30 minutes on ice in the dark and washed before they were fixed and permeabilized using Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) following the manufacturer's instructions. Cells were then stained with intracellular antibodies for 45 minutes at room temperature and washed twice with 1X Permeabilization Buffer from the kit before analysis on FACScan (Becton Dickinson).

2.6 Quantification of cytokines in serum

Cytokine serum profile of firefighters and control groups were analyzed with a quantitative multiplex sandwich ELISA arrays (granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IFN γ , CCL20, transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), TNF- α and TNF- β) (RayBio Human Th1/Th2/Th17 Array Q1; Raybiotech, Norcross GA, USA;). The array was pretreated according to the manufacturer's instructions and incubated with a two-fold diluted serum pools for 2 hours. All sample measurements were performed in duplicate. The array glass slides were washed, incubated with a biotin-conjugated anti-cytokine mix for 2 hours,

washed again, and developed for 2 hours with Cy3-conjugated streptavidin. The signals were scanned with a Scan-array (Perkin Elmer) and analyzed with the Raybiotech analysis tool, a data analysis program based on Microsoft Excel technology specifically designed to analyze Raybiotech Antibody Array. Signals were normalized using internal, positive and negative controls included on the array

2.7 Solid phase extraction

Potential AhR ligands were purified by solid phase separation using hydrophobic columns Oasis Prime HLB (Waters). The sera were loaded onto the columns and washed with methanol. The ligands were eluted in a volume of acetonitrile and concentrated in a rotary evaporator (Büchi Rotavapor).

2.8 Isolation of CD4⁺ T cells and T cell differentiation

CD4⁺ T cells were isolated from whole blood of healthy volunteers using a RosetteSep Human T cell Enrichment kit (Stemcell Technologies) following the manufacturer's instructions. Briefly, 40µl/ml of antibody cocktail was added to whole blood and incubated at room temperature for 20 minutes. Isolation of T cells was performed in the same way as it was described previously for PBMC isolation. After washing cells, they were seeded in anti-CD3 and anti-CD28 coated 24-well plates (5µg/ml anti-CD3, 3µg/ml anti-CD28) at a density of 1x10⁶ cells/well in X-VIVO 15 (Lonza, Switzerland). Flow cytometry was performed as described previously.

2.9 Statistical analysis

A Mann-Witney test was used to evaluate significant differences between groups. Experiments were performed in triplicates or quadruplicates unless specifically indicated otherwise. A value of p < 0.05 was considered significant in all analyses.

3. Results

3.1 Th17, Th22 and Treg cell populations are significantly increased in firefighters

In order to validate our hypothesis, we focused on the firefighters, who by the nature of their trade, have an increased risk of exposure to AhR ligands. A cohort of firefighters was composed of two arm, based on their years of experience. A first group of firefighters with less than 10 years of experience and a second group of firefighters with more than 20 years of experience were maded. All firefighters selected for this study were non-smokers and have no related immune system diseases. A cohort of sex and age-matched healthy donors with the same exclusion factors was used as a control group. Different subpopulations of CD4⁺ T cells were determined by flow cytometry in firefighters and compared to the control group. First, the proportion of Th1 cells (CD4⁺ T-bet⁺) in firefighters compared to the control group was studied. Our results show that, although Th1 cells predominate among CD4⁺ T cell subtypes, no differences were observed between firefighters and the control group (Fig 1A). Similarly, no differences were observed for Th2 cells (CD4⁺ GATA-3⁺) between firefighters and the control group (Fig 1B). Next, the proportion of Th17 cells (CD4⁺ ROR γ t⁺) cells was measured. Our results show that Th17 cells was statistically increased ($p <0.001$) in firefighters compared to the control group, from 1% to 2.5% (Fig 1C). Subsequently, the proportion of Th22 cells (CD4⁺IL-22⁺IL-17⁺) was also measured. A significant statistical increase ($p <0.001$) in the Th22 population in firefighters compared with the control group was also noted (Fig 1D). Finally, we evaluated the proportion of Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) among CD4⁺ cells. Our results show that for this subpopulation there was also a statistically significant increase ($p <0.001$) of these cells in firefighters compared to the control group (Fig 1E). Thus, we had demonstrated a statistically significant increase in Th17, Th22, and Treg populations among CD4⁺ cells in firefighters compared to the control group.

3.2 Firefighters have altered the physiological microenvironment

After showing that some CD4+ cell subpopulations were increased in firefighters, we wanted to validate our results by investigating the concentrations of the main cytokines implicated in the differentiation of CD4+ cells in our serum firemen, reflecting a change in the pressure of the microenvironment. For this experiment, we used a sandwich multiplex ELISA arrays to quantify the number of different cytokines involved in the differentiation of CD4⁺ cells (Fig 2). Our results show that in firefighters with less than 10 years of experience and more than 20 years of experience, the cytokines IL-21 and IL-23, involved in the differentiation of Th17 cells, were significantly increased ($p < 0.01$). On the other hand, the cytokines IL-2 and TGF-β, playing a role in the differentiation of Tregs, were also increased in firefighters than the control group. In a rather unexpected way, although our results show that the IL-12 was found similarly in firefighters and the control group, we see a strong increase ($p < 0.0001$) of IFN-γ in firefighters. Our previous results show that Th1 cells, producing IFN-γ, are not increased in firefighters. Simultaneous results were observed for Th2 cells. The amount of cytokine IL-4 found in firefighters and the control group was similar, whereas the cytokine IL-13, produced by Th2 cells, was significantly increased in firefighters. Taken together, these results in firefighters indicate that some subpopulations of CD4⁺ T cells were altered and a corresponding change in their cytokines confirm these differences between both groups.

3.3 The Correlation between Th17 and Tregs is dependent on the number of years of experience of firefighters

Next, we were interested in determining if a correlation exists between the increase in Th17 cells and Tregs in different firefighter groups. This was an important point for the homeostasis of immunity, in which a balance must be maintained between these cells. Our results show a positive correlation between Th17 cells and Tregs in firefighters with less than 10 years of experience, suggesting maintenance of homeostasis between these two subpopulations of cells (Fig 3A). Interestingly, no correlation between Th17 cells and

Tregs in firefighters with more than 20 years of experience was demonstrated (Fig 3B). These results suggest a perturbation in immune homeostasis.

3.4 Validation of XRE luciferase assay to studies exogenous and endogenous AhR ligand

To verify the action of certain exogenous and endogenous ligands that we had selected based on their capacity to induce AhR activity, we performed a XRE luciferase assay on the HepG2 cell line. The concentration used for each ligand was chosen based on the literature (Y. Zhao et al. 2019 ; Wei et al. 2016 ; Salimi Elizei et al. 2017 ; Phelan et al. 1998) and a dose-response curve, eliminating the concentrations inducing significant cell mortality. For BaP, we could see a dose-dependent increase in AhR activation, with a response from 500 nM comparable to the positive plasmid control (Fig 4A). When the BaP dose was increased to 5 μ M, the response became significant compared to the DMSO control. However, at that concentration, cell death was observed by blue Trypan exclusion assay (data not shown), leading to the removal of this dose from further studies. Next, we tested indirubin and noted a strong activation of AhR, with a 2-fold increase in the positive plasmid control response at a concentration of 0.1 μ M (Fig 4B). AhR activation increased in a dose-dependent manner, with a significant response at 1 and 10 μ M. In the case of bilirubin, an endogenous ligand, we observed a little increase in AhR activation, although it was much lower than the response from the positive plasmid control (Fig 4C). AhR activation from bilirubin was not significant. We also tested another endogenous ligand, kynurenone, and noted that it did not induce any AhR activation (Fig 4D). Finally, we also used a synthetic ligand, the VAF347, to determine its effects on T cell differentiation in the following experiments. As we expected, VAF347 activated AhR as strongly as the positive plasmid control, with a significant response at 75 nM (Fig 4E). Thus, most of our ligands were able to induce the activation of AhR. Bilirubin and kynurenone were still used in the following experiments despite their inability to significantly induce AhR activation due to their known effects in the literature.

3.5 Increase of AhR activity in serum of firefighters group

We showed that firefighters had an increase in Th17, Th22 and Treg cells compared to the control group. Also, the composition of the microenvironment of the cells seems to correlate with our observations. Next, we wanted to verify the presence of potential ligands of AhR in the serum of firefighters that can explain the changes observed in CD4⁺ cells. We used the XRE luciferase assay in the serums of donors from a healthy control group and the two groups of firefighters. We started by determining the kit's detection limit by doing a dose-response curve with BaP (data not shown). At a concentration of 25 nM of BaP, we detected a luciferase response. We used this concentration added to the whole serum to reach the kit detection threshold. We exposed the transfected XRE-luciferase HepG2 cells to 20% of heath inactivated serum from the healthy control group or the firefighter's groups. Compared to the control group, we observed a significant increase of AhR activation with the serum of firefighters with less than 10 years of experience or more than 20 years of experience (Fig 5A). Subsequently, we used the solid phase column separation method to purify the potential exogenous hydrophobic AhR ligands present in the sera of our two groups of firefighters. We then exposed the XRE-luciferase transfected HePG2 cells with 10 µl of purified hydrophobic fraction of sera from two firefighting or control groups. Our results show that the activity of AhR was significantly increased by treating the transfected HepG2 cells with purified hydrophobic fraction sera from the 2 groups of firefighters compared with the control group. Therefore, this result indicates the presence of a significant amount of ligand AhR in the firefighter's sera (Fig 5B). Finally, to confirm the direct interaction of hydrophobic compounds in sera with AhR, we added an AhR antagonist, GNF 351. In the presence of the AhR antagonist and the hydrophobic purified ligands from the serum, we observed a significant decrease in the luciferase activity, confirming the ligand-receptor interaction (Fig 5C).

3.6 Effects of the AhR's ligands on T cell differentiation

Several studies have shown that exposure to AhR ligands can modulate CD4⁺ T cell differentiation, mainly in mice. We treated human CD4⁺ T cells purified from healthy donors with our previously tested ligands. The concentration of each ligand was chosen based on the previous experiment, at levels that activated AhR without cell death (data not shown). At the end of the incubation period, cells were analyzed by flow cytometry for Th1, Th2, Th17, or Treg cells.

Our results show that for naive T cells in Th1-promoting condition, the different treatments with BaP, kynurenine, and indirubin did not affect the differentiation in Th1 cells (Fig 6A). The same outcome was observed with the naive T cells in the Th2-promoting condition: none of the tested ligands affect the differentiation in Th2 cells (Fig 6B). On the other hand, when we analyzed naïve T cell in Th17-promoting condition, we observed that treatment with kynurenine slightly decreased differentiation in Th17 cells after 6 days of culture, but without a significant effect ($p = 0,0779$). For the other ligands, we did not observe any major modification of the differentiation in Th17 cells (Fig. 6C). Finally, in the Treg-promoting condition, we observed that BaP treatment significantly increased the differentiation of naive T cells into Treg cells (Fig 6D). We did not observe any effect on Treg differentiation after treatment for the other ligands, kynurenine and indirubin.

3.7 Differences between the controls group and firefighters group showed by principal component analysis.

To provide a better analysis of our results, we used principal component analysis (PCA) on all of our data. PCA is a method, which allowed the transformation of a large set of potentially inter-related variables into new variables, which was linear composites of the original variables. These data were smaller and, ideally, more manageable. When we have taken all results and integrated them into a PCA model, we observed a significant difference between the control population (square) and firefighter populations (circle; less 10-

year of experiences and triangle; more 20-year experiences) (Fig 7A). However, no significant difference was observed between our two groups of firefighters with the PCA model. Most variables were represented quite far from the origin, so they are considered well represented on the factor map. Note that the pro-inflammatory cytokines IL-12, IL-17, and IL-6 were positively correlated with the anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-5, and IL-10 (Fig 7B).

4. Discussion

In our study, we had observed differences in the subpopulations of CD4+ T cells in a cohort of firefighters compared to unrelated workers. We had shown that the frequency of Th1 and Th2 cells were not modified between our groups, whereas in the firefighters, the Th17 and Treg cells were significantly increased (Fig.1). Furthermore, these modulations in the cells could be explained by the presence of AhR ligand in the firefighters' sera. The results had shown a relatively favorable environment for the differentiation of Th17 and Treg cells (Fig.2). Also, by studying the Th17/Treg balance, we were able to observe that the firefighters with more experience with a loss of this balance in favor of a significant increase in Th17 cells (Fig.3). It is interesting that in this case, the most modified CD4⁺ T lymphocyte populations were those expressing the AhR most strongly (Th17 and Treg).

It is well accepted that AhR activation can influence T cell differentiation in a ligand-dependent manner (Quintana et al. 2008 ; Veldhoen et al. 2008). However, the list of substances capable of affecting T cell differentiation is still incomplete due to the limited amount of studies on other ligands. Indeed, apart from TCDD and FICZ (Quintana et al. 2008) very few studies have demonstrated other ligands' effects on T cells. PAHs can significantly activate AhR, but such studies have mostly been done *in vitro* or *in vivo* in mice (Quintana et al. 2008). We did not use these ligands in our study since in humans, these ligands have shown somewhat inconclusive effects on the differentiation of CD4 T cells. Nevertheless, some studies in human cells have shown that ligands such as phenanthrene are able to modulate Tregs, notably by epigenetic modifications of the Foxp3 gene (J. Liu et al. 2013). In addition, we know that the probability of being exposed to an individual substance in the environment is highly unlikely, for environmental pollutants are mostly found in complex mixtures. Some of the ligands, such as Bap can be found in large quantities in the environment following incomplete organic matter combustion. Depending on the molecules contained in the

Considering a mixture of environmental pollutants that can contain an AhR ligand, some of these will have a different binding affinity to AhR. Importantly some trace of molecules such as TCDD, might activate AhR even at very low concentrations. In particular, these differences in binding affinity have made it possible to explain the antagonistic effects of TCDD and FICZ in the induction of Th17 and Treg cells in the EAE model (Quintana et al. 2008). More recently, another explanation has been proposed. Some AhR ligands are more easily metabolized by the body (Gasiewicz et al. 1983 ; Mukai et Tischkau 2007 ; Wheeler et al. 2014). TCDD has a longer half-life in the body than FICZ. Activation of AhR will therefore take longer with TCDD treatment.

Ehrlich and his colleagues have shown that a shorter activation of AhR induced an increase in the pro-inflammatory Th17 cells (Ehrlich et al. 2018). On the other hand, during a more prolonged activation of the AhR, it is the anti-inflammatory Treg cells that are favored. According to these results, the duality of the inflammatory response in CD4⁺ T lymphocytes is due to the level of activation of AhR. Our *in vitro* results showed that treatment with BaP on naive CD4⁺ T cells induced an increase in the differentiation of these cells into the Treg subtype (Fig. 6). Like TCDD, BaP is a molecule with a fairly long half-life in the body. It, therefore, induces a more prolonged AhR activation than ligands such as kynurenine and indirubin. Like FICZ, which has a short half-life in the body, kynurenine is rapidly degraded. One would have expected to increase the pro-inflammatory subtypes, such FICZ treatment in mice, but we observed a decrease in Th17 cells (Fig. 6). This prolonged activation of AhR would therefore be responsible for the differentiation towards the Treg phenotype. The molecule's ability to enter the organism, either by inhalation or ingestion or cutaneous absorption, is another aspect to consider. For the firefighters, it has been shown that although the firefighter's suits used during the intervention present good protection, a strong possibility of penetration can exist during interventions (Fent et al. 2014 ; Fent, Toennis, et al. 2020). Besides, the protocols for cleaning the firefighter's suits may also favor post-intervention contamination. Thus, it is extremely

challenging to recreate an experimental *in vitro* model using a mixture of substances that reflect our exposure's true extent.

Our results showed that we were able to find the presence in a high quantity of AhR ligands in the firefighters' sera. Precise identification of the ligands present in these sera was not determined in this study, but several studies document the presence of PAH in firefighters (Fent et al. 2014 ; Fent, Toennis, et al. 2020 ; Andersen et al. 2018 ; Ouyang et al. 2012). In a further study, it will be interesting to define better a list of blood responsible for the effect observed on CD4⁺ T cells. Contrary to what one might expect, the amounts of AhR ligands found in firefighters with more experience were not higher than our young firefighters (Fig 5). It seems that the duration of exposure to AhR ligands does not significantly modify the levels found in the sera. PAH tends to bioaccumulate in the soft tissues of a living organism such as fat (Luzardo et al. 2019 ; Ifegwu et Anyakora 2015), which can explain the absence of difference between both groups.

Information on its conformation, the way AhR binds to different ligands, and its ligand-dependent structural changes are currently lacking. Specific ligands promote Treg cell development, such as TCDD, while others promote Th17 cells, like FICZ, which need to be further investigated. Certain metabolites might alter the cell's genome without leading to its death, resulting in an altered gene expression. BaP is also a known carcinogen that promotes the proliferation of certain types of cells (Wei et al. 2016 ; Y. Wang et al. 2018). It is reported that BaP could *in vitro* promote the proliferation of T cells following AhR binding and *in vivo* cause the exacerbation of Th2-type cutaneous allergy (Tajima et al. 2019). Thus, elucidating how AhR is activated and by which molecule, the mechanism of action it will have on the cell, and whether AhR will act directly or indirectly to change gene expression or cellular function will help understand its effects in a ligand-dependent manner.

The importance of the physiological role of AhR suggests the existence of an endogenous ligand, although it has yet to be discovered. Many endogenous proteins have been identified to possess some ability to activate AhR, such as bilirubin, kynurene, indirubin, tryptamine, and low-density lipoprotein (L. P. Nguyen et Bradfield 2008). However, the binding to AhR appears to be many folds lower than most exogenous ligands like TCDD and PAHs (L. P. Nguyen et Bradfield 2008). Most of the endogenous ligands had little or no ability to activate enough AhR (Fig. 4). However, it is possible that an endogenous ligand's low binding affinity to AhR is sufficient to induce a physiological effect. In our study, we tested kynurene and bilirubin as endogenous ligands of AhR. Bilirubin treatment showed no effect on CD4⁺ T cell differentiation. On the other hand, treatment with kynurene made it possible to observe a slight decrease in Th17 cells after treatment. This result is interesting because, in mice, it has been shown that treatment with kynurene increases the Th17 cells, but that overactivity of the enzyme kynurene 3-monooxygenase (KMO) induces a blockage of the pathway of the Th17 cells (Stephens et al. 2013). Quantification of the activity of the enzyme KMO in our study would have allowed us to know if our results obtained in humans with kynurene can be explained by this process.

Interestingly, in firefighters, the IL-12 level and Th1 cells were similar to the control group in contrast to the IFN γ concentration, which increased. These results suggest that the increase of INF γ in the firefighter group is not linked to Th1 cells. Several immune cells express AhR and produce INF γ , such as CD8+ T cells, NK cells, macrophages, and dendritic cells (Trikha et Lee 2020 ; Bogdan et Schleicher 2006). Among these cells, it was established that NK cells respond to an AhR agonist, FIZC, and increase their INF γ production (Shin et al. 2013). In CD8+ T cells, different subpopulations analogous to Th1/Th2/Th17 have been described (Kourilsky et Truffa-Bachi 2001 ; N. Yeh et al. 2010). T CD8+ cell polarisation is also under pressure of AhR ligands but with different dependence and ligand specificity of CD4+ T cells (M. D.

Hayes et al. 2014). Considering the AhR ligand in sera from firefighters, it will be essential to determine other immune cells' state.

In conclusion, this study allowed us to understand better the impact of prolonged exposure to AhR ligands on CD4+ T lymphocytes' differentiation in an occupational context. Since a cross-talk function of AhR with sex hormone receptors was demonstrated (Ohtake et al. 2008), it will be interesting to determine if a gender-specific effect exists.

Disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledge

The authors would like to thank the volunteers who participated in this study as well as nurse Alexandre Arsenault.

References

1. Broere, F., et al., A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity, in Principles of Immunopharmacology. 2011. p. 15-27.
2. Sallusto, F., Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol*, 2016. 34: p. 317-34.
3. Iwata, S., et al., The Transcription Factor T-bet Limits Amplification of Type I IFN Transcriptome and Circuitry in T Helper 1 Cells. *Immunity*, 2017. 46(6): p. 983-991 e4.
4. Schulze-Koops, H. and J.R. Kalden, The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2001. 15(5): p. 677-91.
5. Oreja-Guevara, C., et al., TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. *BMC Neurol*, 2012. 12: p. 95.
6. Shah, K., et al., Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2010. 12(2): p. R53.
7. Trinchieri, G., Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med*, 2007. 204(2): p. 239-43.
8. Zhu, J., et al., GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*, 2006. 16(1): p. 3-10.
9. Spencer, L.A. and P.F. Weller, Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol*, 2010. 88(3): p. 250-6.
10. Fossiez, F., et al., T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 1996. 183(6): p. 2593-603.

11. Bedoya, S.K., et al., Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol*, 2013. 2013: p. 986789.
12. Chen, K. and J.K. Kolls, Interluekin-17A (IL17A). *Gene*, 2017.
13. Sugita, S., et al., Role of IL-22- and TNF-alpha-producing Th22 cells in uveitis patients with Behcet's disease. *J Immunol*, 2013. 190(11): p. 5799-808.
14. Luci, C., et al., Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol*, 2009. 10(1): p. 75-82.
15. Cella, M., et al., A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, 2009. 457(7230): p. 722-5.
16. Takatori, H., et al., Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J Exp Med*, 2009. 206(1): p. 35-41.
17. Dixon, B.R., et al., IL-17a and IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and May Contribute to Epithelial Cell Defense against Helicobacter pylori. *PLoS One*, 2016. 11(2): p. e0148514.
18. Lu, L., J. Barbi, and F. Pan, The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*, 2017. 17(11): p. 703-717.
19. Adeegbe, D.O. and H. Nishikawa, Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol*, 2013. 4: p. 190.
20. Sakaguchi, S., et al., Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008. 133(5): p. 775-87.
21. Shao, S., X. Yu, and L. Shen, Autoimmune thyroid diseases and Th17/Treg lymphocytes. *Life Sci*, 2018. 192: p. 160-165.
22. Nishikawa, H., [Regulatory T cells in cancer immunotherapy]. *Rinsho Ketsueki*, 2014. 55(10): p. 2183-9.
23. Stevens, E.A., J.D. Mezrich, and C.A. Bradfield, The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*, 2009. 127(3): p. 299-311.

24. Nguyen, L.P. and C.A. Bradfield, The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol*, 2008. 21(1): p. 102-16.
25. Hahn, M.E., Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*, 2002. 141(1-2): p. 131-60.
26. Esser, C., A. Rannug, and B. Stockinger, The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol*, 2009. 30(9): p. 447-54.
27. Zhou, L., AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. *Trends Immunol*, 2016. 37(1): p. 17-31.
28. Veldhoen, M., et al., The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, 2008. 453(7191): p. 106-9.
29. Quintana, F.J., et al., Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 2008. 453(7191): p. 65-71.
30. Flavenvy, C.A. and G.H. Perdew, Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. *Mol Cell Pharmacol*, 2009. 1(3): p. 119-123.
31. Nebert, D.W., Aryl hydrocarbon receptor (AHR): "pioneer member" of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of "sensors" of foreign and endogenous signals. *Prog Lipid Res*, 2017. 67: p. 38-57.
32. Hockley, S.L., et al., AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem Res Toxicol*, 2007. 20(12): p. 1797-810.
33. Jensen, B.A., et al., Aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists suppress interleukin-6 expression by bone marrow stromal cells: an immunotoxicology study. *Environ Health*, 2003. 2(1): p. 16.
34. Simoneit, B.R.T., Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Applied Geochemistry*, 2002. 17(3): p. 129-162.

35. Guillou, A., et al., Chemical characterization and stable carbon isotopic composition of particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons issued from combustion of 10 Mediterranean woods. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2013. 13(5): p. 2703-2719.
36. Fent, K.W., et al., Systemic exposure to PAHs and benzene in firefighters suppressing controlled structure fires. *Ann Occup Hyg*, 2014. 58(7): p. 830-45.
37. Mezrich, J.D., et al., An interaction between kynurenone and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2010. 185(6): p. 3190-3198.
38. Rocuts, F., et al., Bilirubin promotes de novo generation of T regulatory cells. *Cell Transplant*, 2010. 19(4): p. 443-51.
39. Youakim, S., Risk of Cancer Among Firefighters: A Quantitative Review of Selected Malignancies. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 2006. 61(5): p. 223-231.
40. Anderson, D.A., et al., Firefighter perceptions of cancer risk: Results of a qualitative study. *Am J Ind Med*, 2017. 60(7): p. 644-650.
41. Liu, J., et al., Epigenetically mediated pathogenic effects of phenanthrene on regulatory T cells. *J Toxicol*, 2013. 2013: p. 967029.
42. Gasiewicz, T.A., et al., Distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J, DBA/2J, and B6D2F1/J mice. *Drug Metab Dispos*, 1983. 11(5): p. 397-403.
43. Mukai, M. and S.A. Tischkau, Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci*, 2007. 95(1): p. 172-81.
44. Wheeler, J.L., et al., Differential consequences of two distinct AhR ligands on innate and adaptive immune responses to influenza A virus. *Toxicol Sci*, 2014. 137(2): p. 324-34.
45. Ehrlich, A.K., et al., TCDD, FICZ, and Other High Affinity AhR Ligands Dose-Dependently Determine the Fate of CD4+ T Cell Differentiation. *Toxicol Sci*, 2018. 161(2): p. 310-320.

46. Wei, Y., et al., Benzo[a]pyrene promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis likely through the Aryl hydrocarbon receptor and ERK-dependent induction of MMP9 and c-myc. *Int J Oncol*, 2016. 49(5): p. 2055-2063.
47. Wang, Y., et al., Benzo(a)pyrene promotes Hep-G2 cell migration and invasion by upregulating phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression. *Oncol Lett*, 2018. 15(6): p. 8325-8332.
48. Stephens, G.L., et al., Kynurenine 3-monooxygenase mediates inhibition of Th17 differentiation via catabolism of endogenous aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur J Immunol*, 2013. 43(7): p. 1727-34.

Figure Legends

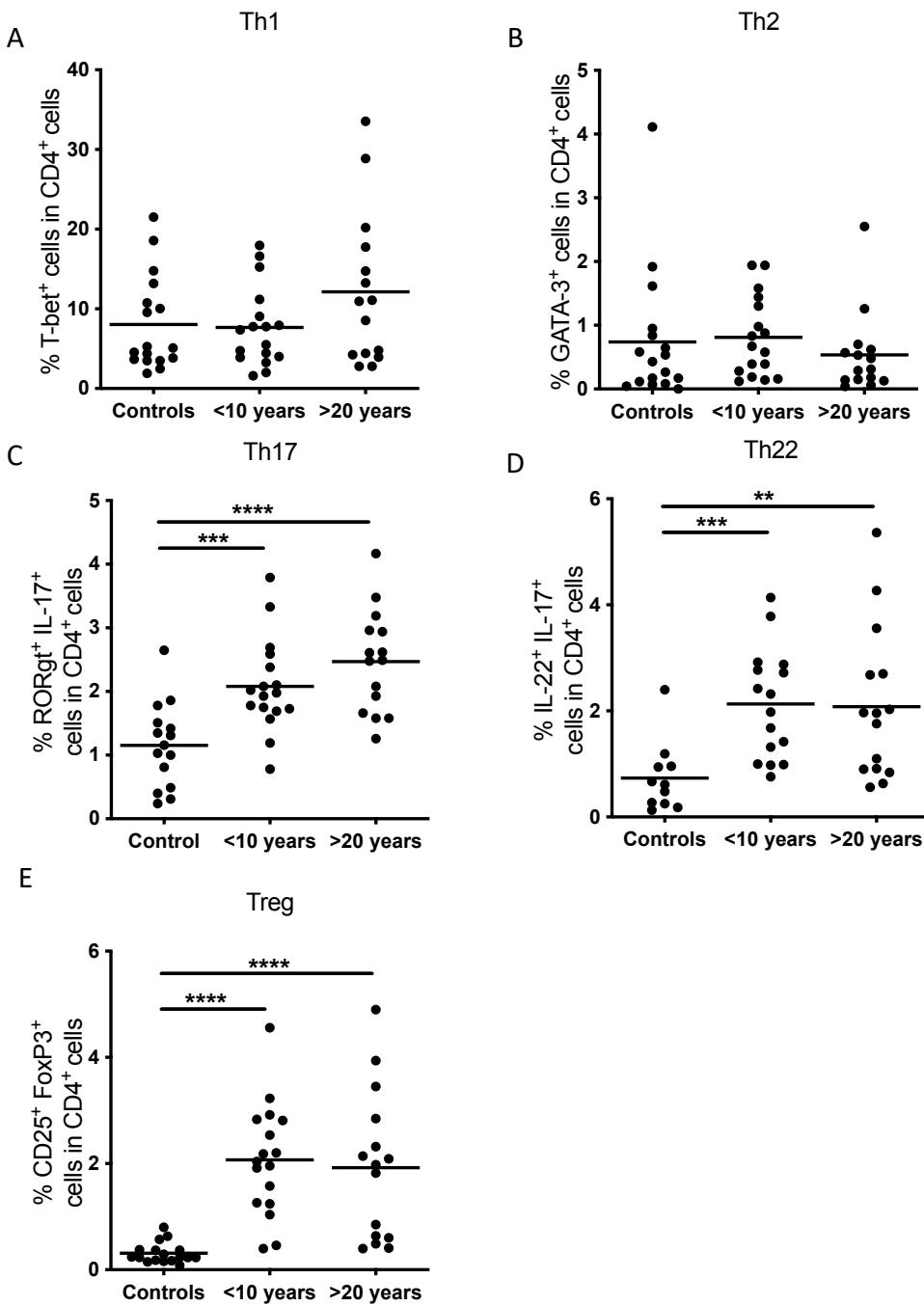


Figure 1. Proportions of T cell subsets in healthy non-smoking control donors and firefighters. T cell subsets analyzed were: A) Th1, B) Th2, C) Th17, D) Th22 and E) Treg cells. Statistical analyses were done with Mann-Whitney test, comparing the groups of firefighters with the control group (**p < 0.01, ****p < 0.0001). controls: n=15, firefighters >20 years: n=15, firefighters <10 years: n=12.

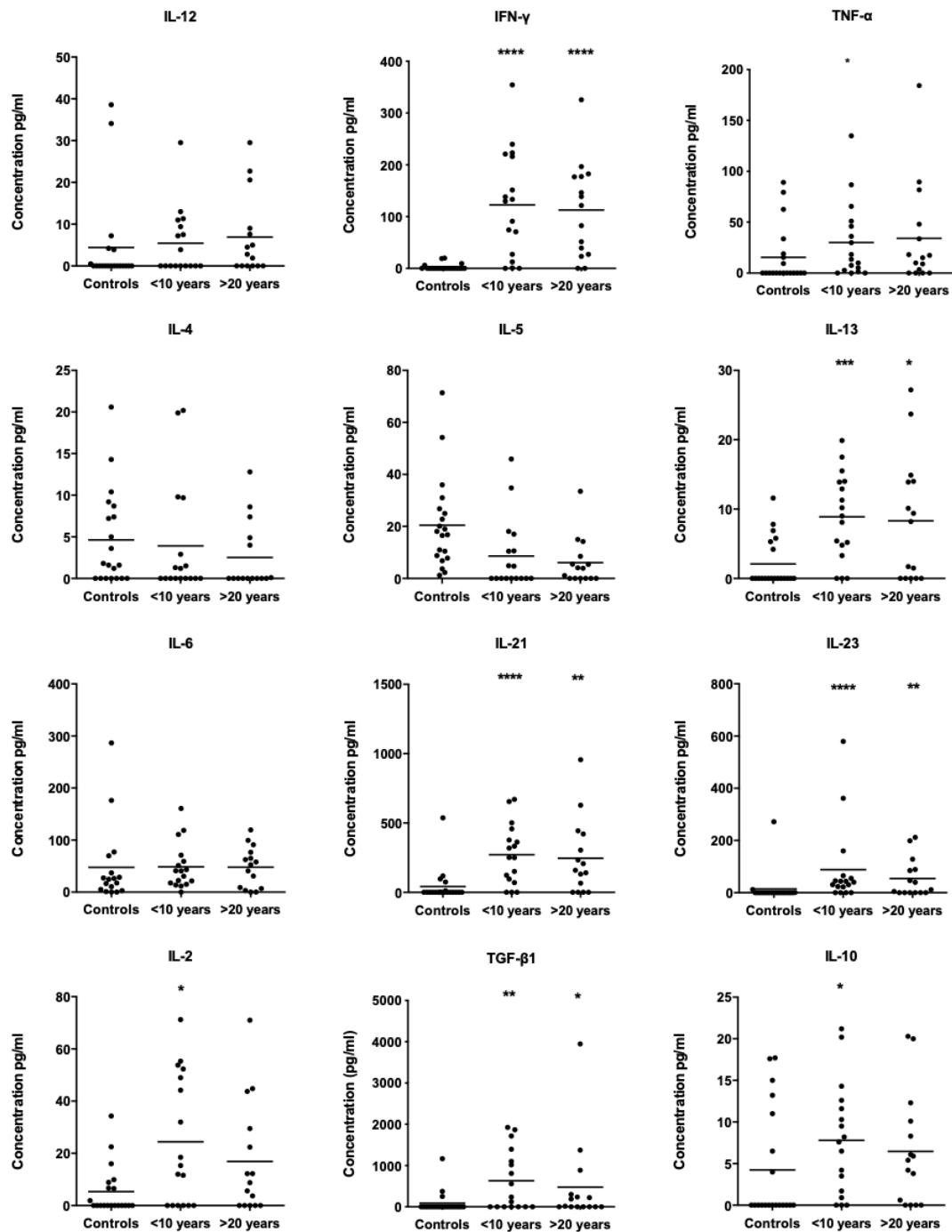
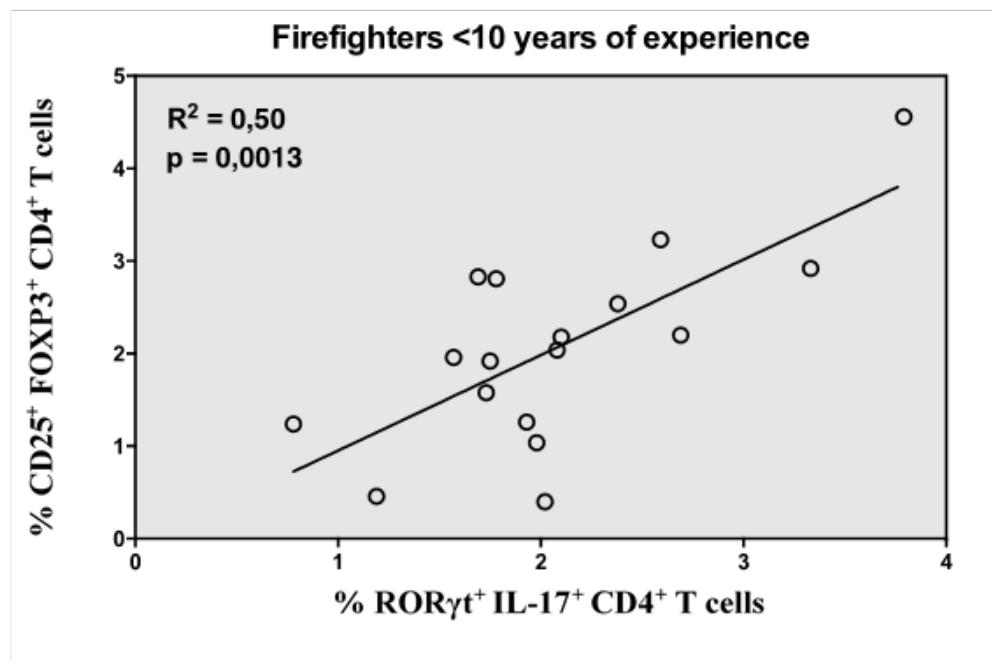


Figure 2. Firefighters' sera composition in cytokines. Serum IFN γ , IL-2, IL-6, IL-5, IL-23, IL-10, IL-13, TNF α , IL-21, TGF β 1 in healthy non-smoking control donors and firefighters. Statistical analyses were done with Mann-Whitney test (*p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001, ****p < 0.0001). controls: n=15, firefighters >20 years: n=15, firefighters <10 years: n=12.

A



B

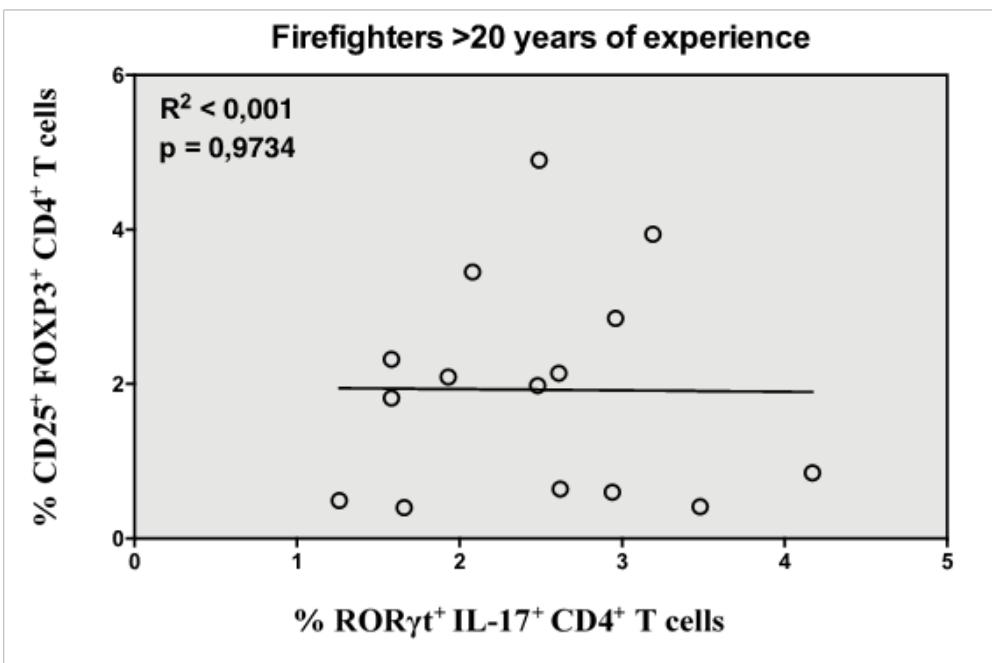


Figure 3. Correlation between Th17 and regulatory T (Treg) cells in firefighters. A) A positive correlation between the frequency of Th17 and Treg cells was found in a group of firefighters with < 10 years of experience ($R=0,50$, $P=0,0013$). B) No statistically significant correlation between Th17 and Treg cells was found in a group of firefighters with > 20 years of experience.

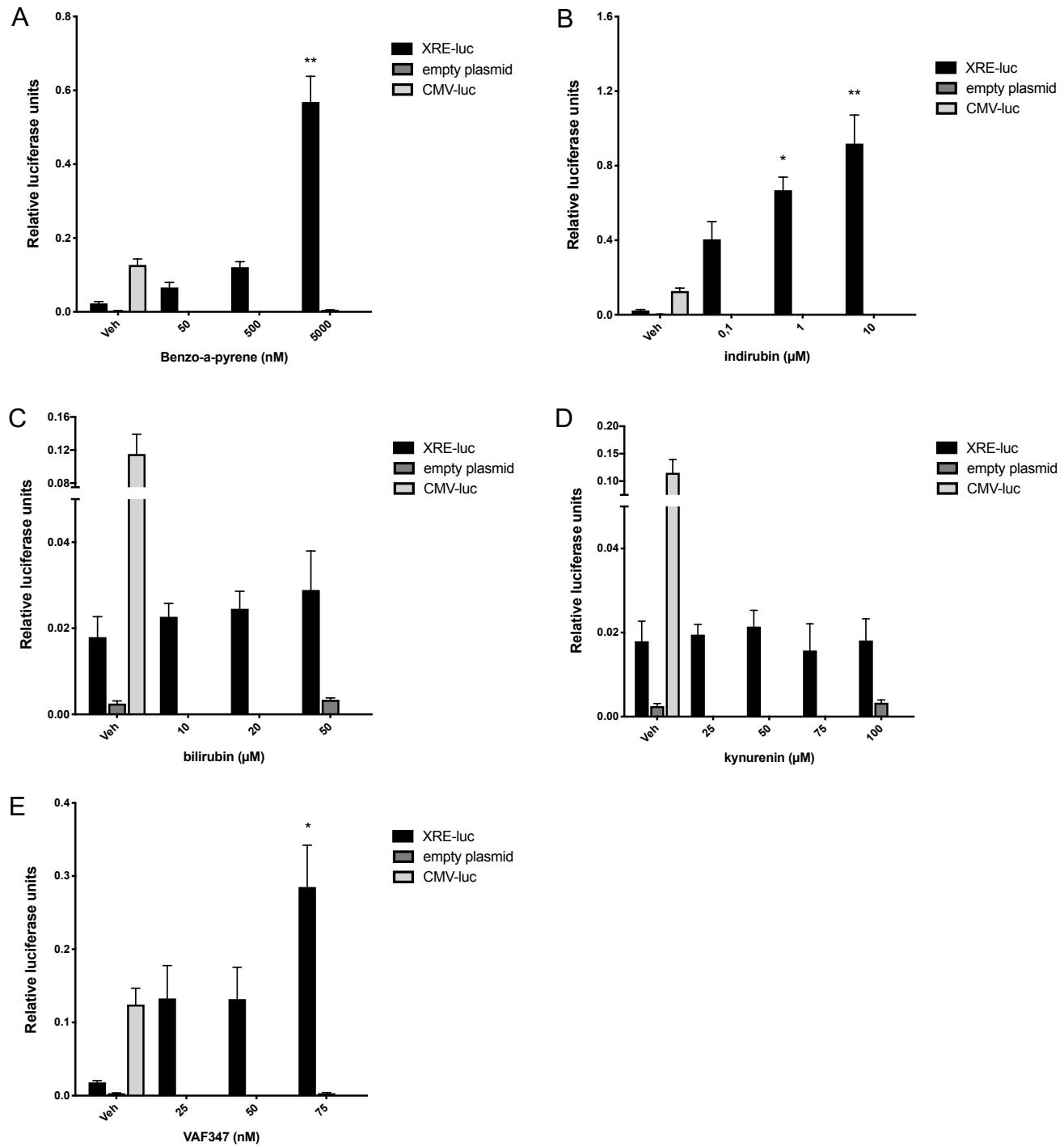


Figure 4. AhR activation by different ligands in XRE-luciferase assay. The ligands used were A) BaP, B) indirubin, C) bilirubin, D) Kynurein and E) VAF347. Firefly luciferase activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity of a co-transfected control (mean \pm SEM of triplicates or quadruplicates). A constitutively expressed CMV-luciferase construct was used as a positive control. ■ XRE-luc, ▨ Empty plasmid, ▨ CMV-luc.

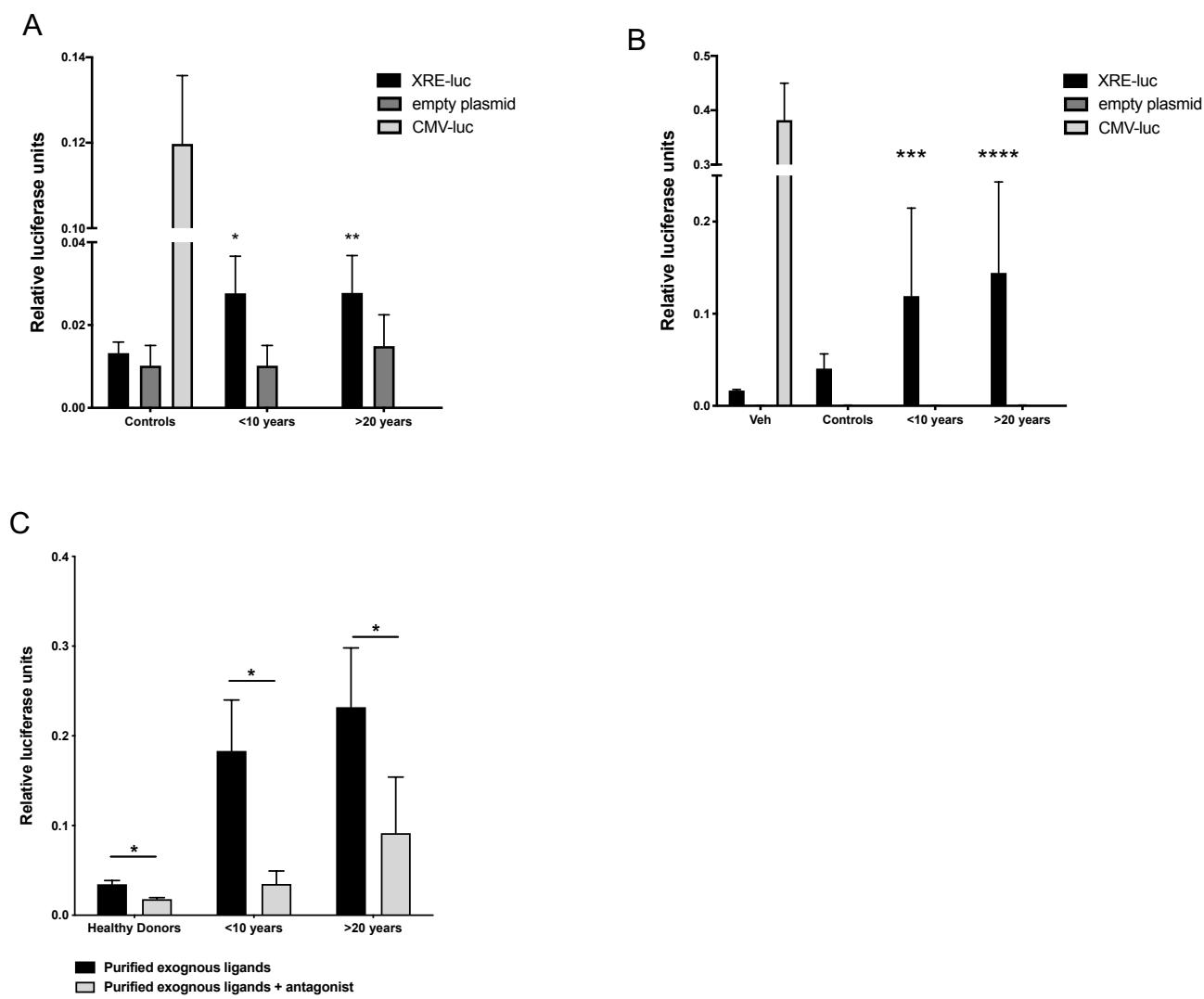
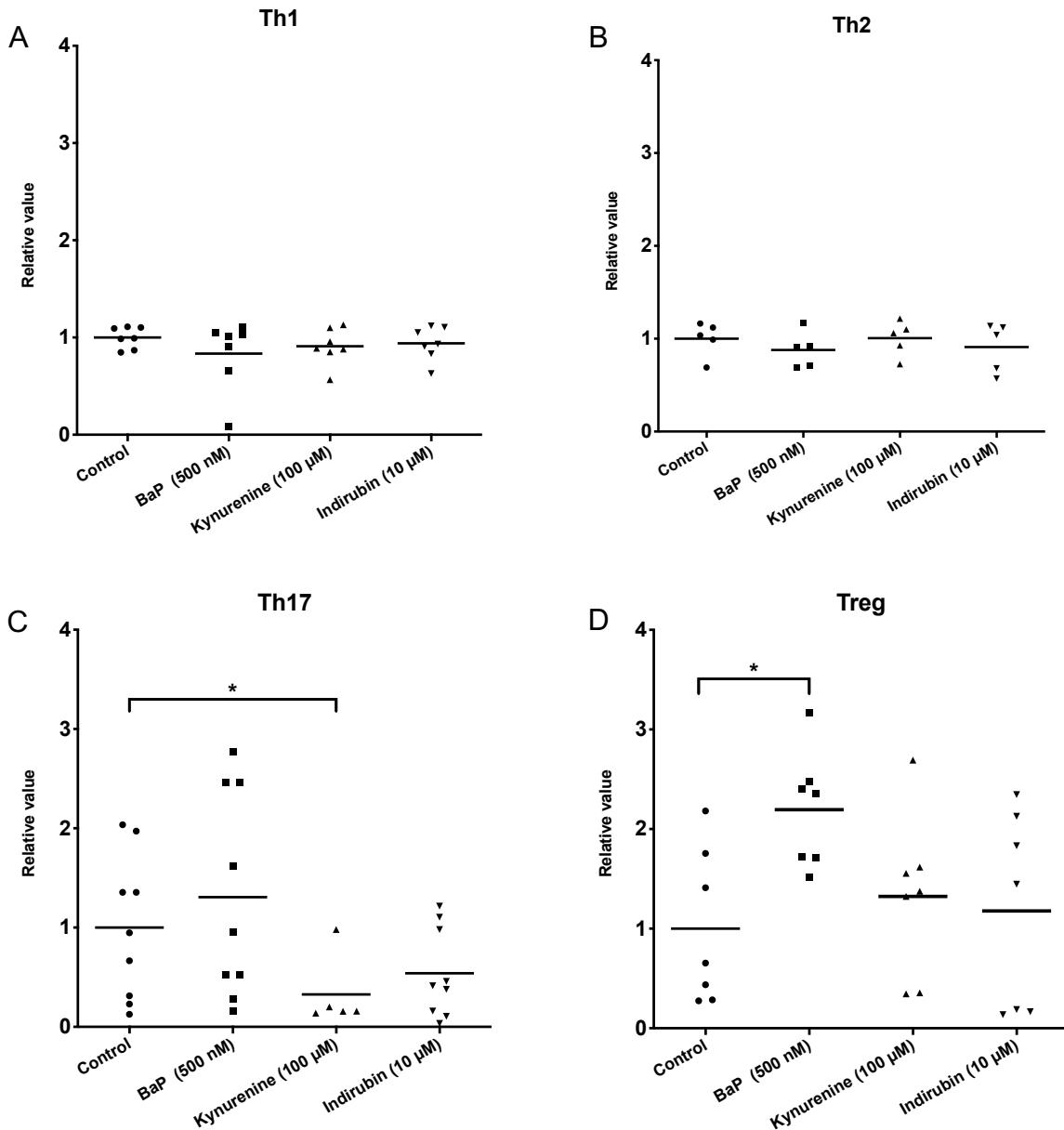


Figure 5. AhR activation by serums in XRE-luciferase assay. A) AhR activation by 25 nm BaP with 20% of serum from the control group, from both groups of firefighters separated by their years of experience. AhR activity in both firefighter groups was compared to the response from the control groups. **p < 0.01, n=15: controls, firefighters >20 years; n=12: firefighters <10 years. B) AhR activation by purified serum from the control group, from both groups of firefighters separated by their years of experience. AhR activity in both firefighter groups was compared to the control groups. ***p < 0.001, ****p < 0.0001 n=15: controls, n=15: firefighters >20 years, n=12: firefighters <10 years. C) Inhibition of AhR luciferase activity by a AhR antagonist III (GNF351). HepG2 cells were treated for 18h with purified serum with or without GNF351. *p < 0.05, n=6: controls, firefighters >20 years; n=6: firefighters <10 years; n=15.



The effects of AhR ligands on the differentiation of Th1, Th2, Th17 and Treg cells in conditions promoting the differentiation A) Relative value of Th1 differentiated cells in Th1-promoting condition, treated with AhR ligands. B) Relative value of Th2 differentiated cells in Th2-promoting condition, treated with AhR ligands. C) Relative value of Th17 differentiated cells in Th17-promoting condition, treated with AhR ligands. D) Relative value of Treg differentiated cells in Treg-promoting condition, treated with AhR ligands. P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), n=7: Th1 and Treg cells, n=7: Th2 cells, n=3: Th17 cells.

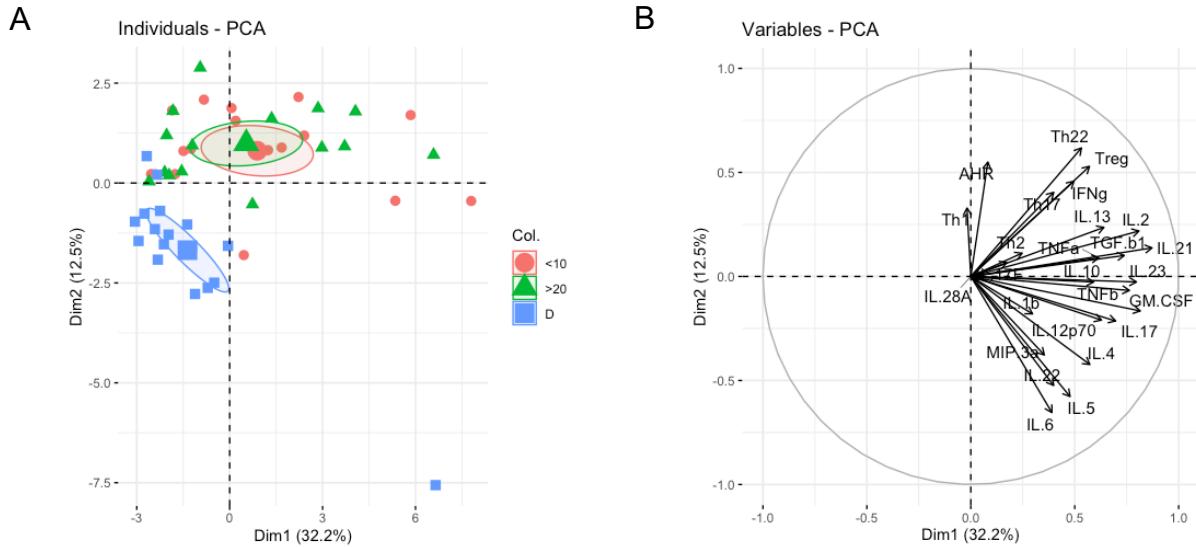


Figure 7. Principal component analysis of differences between the controls group and firefighter groups. Plot of individuals (A) and Variables factor map (B) of the multiple factor analysis applied on T cells subsets, cytokines and AhR activation results. On the plot of individuals (A), firefighters with less than 10 years of experience and more than 20 years are represented respectively by the circle and triangle. Controls are represented by square. n=15: controls, n=15: firefighters >20 years, n=12: firefighters <10 years.

DEUXIÈME ARTICLE

A physiologic explanation on how endometrium immunomodulation by intrauterine administration of activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) could help women with unexplained recurrent implantation failure (RIF).

Une explication physiologique sur la façon dont l'immunomodulation de l'endomètre par l'administration intra-utérine de cellules mononucléées du sang périphérique activées (PBMC) pourrait aider les femmes en échec répété d'implantation inexplicable (RIF).

Auteurs :

Guillaume Ricaud¹, Véronique Blais², Marjorie Disdier², Fabien Joao², Bruno Johnson^{1,2}, Merve Kulbay¹, Moncef Benkhaliha², Cathy Vaillancourt¹, Pierre Miron^{2,3} and Jacques Bernier^{1,3}

¹Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, 531 boul. Des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

²Centre d'aide médicale à la procréation FERTILYS, 1950 rue Maurice-Gauvin, Laval, Québec, H7S 1Z5, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Cet article sera publié dans **Clinical Immunology**

Contribution des auteurs :

Les échantillons de sang ont été récupérés à la clinique Fertily par Véronique Blais et Marjorie Disdier. L'isolement et l'activation des PBMC utilisés pour l'immunomodulation de l'endomètre ont été réalisés par Véronique Blais et Marjorie Disdier. Le marquage et l'analyse des cellules T CD4⁺ par cytométrie en flux ont été réalisés par Guillaume Ricaud. Le dosage des cytokines du surnageant des PBMC activées a été réalisé par Guillaume Ricaud. La compilation des données sur les patientes a été réalisée par Fabien Joao. Tous les tests statistiques ont été faits par Guillaume Ricaud. L'écriture du manuscrit a été faite par Guillaume Ricaud. Jacques Bernier a conçu le projet de recherche et supervisé les travaux de recherche. Jacques Bernier, Merve Kulbay et Fabien Joao ont révisé le manuscrit pour la production de la version finale ici présente.

Résumé du deuxième article en français

L'administration intra-utérine de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) autologues a été récemment proposée comme nouvelle immunothérapie pour les patients atteints d'échecs répétés d'implantation (RIF) inexplicables. Chez ces patientes, l'administration de PBMC activées par la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) à 24 h ou 72 h avant le transfert d'embryon a entraîné une multiplication par trois du taux de grossesse biochimique. Cependant, aucune étude n'a encore évalué comment les PBMC régulent et favorisent la réceptivité de l'endomètre humain. Le jour de l'ovulation, les PBMC ont été isolées et activées avec de la phytohémagglutinine (PHA) et de l'hCG pendant 48 heures dans un milieu de culture conditionné. Les sous-populations de cellules immunitaires CD4+ ont été caractérisées chez 157 patients par cytométrie en flux avant et après l'activation PHA/hCG. Nous avons également étudié leur production de cytokines par cytométrie en flux. Nous avons observé chez les patients RIF, une diminution significative des lymphocytes Th2 et Treg naturels avant activation et une augmentation des cellules Th17 après activation. De plus, le traitement hCG/PHA utilisé dans cette étude augmente les cellules T anti-inflammatoires (cellules Th2 et Treg). L'analyse PCA réalisée sur les sous-types de cellules T CD4+ a révélé un profil cellulaire différent dans le groupe RIF.

Dans cette étude, les populations de PBMC activées par hCG semblent se différencier d'un état pro-inflammatoire vers un état anti-inflammatoire. Ce changement d'état inflammatoire pourrait expliquer comment l'immunomodulation de l'endomètre par les PBMC activées par hCG aide les patientes atteintes de RIF inexplicable.

Role of T cells in intrauterine administration of activated peripheral blood mononuclear cells in recurrent implantation failure.

Guillaume Ricaud¹, Véronique Blais², Marjorie Disdier², Fabien Joao², Bruno Johnson^{1,2}, Moncef Benkhalifa^{2,3}, Cathy Vaillancourt¹, Pierre Miron^{1,2} and Jacques Bernier¹

¹Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 boul. Des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

²Centre d'aide médicale à la procréation FERTILYS, 1950 rue Maurice-Gauvin, Laval, Québec, H7S 1Z5, Canada

³Université Picardie Jules Verne, Médecine et Biologie de la Reproduction et laboratoire PERITOX, CBH-CHU Amiens Picardie, 1 Rond-Point du Professeur Christian Cabrol, Amiens, France, 80054

Corresponding author:

Jacques Bernier, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 boul. Des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. Courriel : Jacques.Bernier@inrs.ca

Funding

This research was supported by Mitacs Accelerate (Grant IT-11313) and Fertily.

Abbreviations

APC: antigen-presenting cell, DC: dendritic cell, FBS: fetal bovine serum, Foxp3: forkhead box P3, GATA-3: GATA binding protein 3, hCG: human chorionic gonadotropin, iTreg: induced regulatory T cell, IUI: intrauterine insemination, IVF: in vitro fertilization, IVF – ET: in vitro fertilization embryo transfer, IFN- γ : interferon gamma, IL: interleukin, LB: B lymphocyte, LT: T lymphocyte, MHC: major histocompatibility complex, NK: natural killer
dNK: decidual natural killer , nTreg: natural regulatory T cell, PBMC: peripheral blood mononuclear cells, PHA: phytohemagglutinin, RIF : recurrent implantation failure, ROR γ t: RAR-related orphan receptor gamma, T-bet: T-box transcription factor, Tc: cytotoxic T cell, TGF β : transforming growth factor beta, Th: T helper cell, Th1 cell: Type 1 T helper cell, Th2 cell: Type 2 T helper cell, Th17 cell: Type 17 T helper cell, Th22 cell: Type 22 T helper cell, TNF: tumor necrosis factor, Treg: regulatory T cell.

Abstract

Over the last few years, intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) has been proposed as new immunotherapy for patients with unexplained recurrent implantation failure (RIF). In these patients, administration of activated PBMC before embryo transfer results in a 2-fold increase in live birth rates(D. N. Yang et al. 2020). In this study we evaluated the role of T cells to promotes human endometrial receptivity. On the day of ovulation, PBMC were isolated from and activated with T cells mitogen, the phytohemagglutinin (PHA) and hCG for 48-h in a conditioned culture medium. Distributions of CD4⁺ T cells were characterized in 157 patients by flow cytometry before and after PHA/hCG activation. Cytokine production was analyzed by cytometric beads array. We observed in RIF patients a significant decrease in Th2 and natural Treg cells before activation with PHA/hCG and an increase of Th17 cells after activation compared to intrauterine sperm insemination (IUI) and in vitro fertilization (IVF) groups. Furthermore, the hCG/PHA treatment increases anti-inflammatory T cells (Th2 and Treg cells) compared to non-treated T cells. Principal component analysis (PCA) performed on CD4 T cell subtypes revealed a different cellular profile in the RIF compared to the IUI and IVF groups. This inflammatory state change could explain how endometrium immunomodulation by hCG-activated PBMC helps patients with unexplained RIF to reach implantation.

Keywords: Endometrium immunomodulation, *In vitro* fertilization, Repeated implantation failure, Peripheral blood mononuclear cells, Th cells.

1. Introduction

Nowadays, infertility affects 10 to 15% of couples in industrialized countries (Chandra, Copen et Stephen 2014 ; Evers 2002). Since the 1980s, we observed a 3-fold increase in the percentage of infertile couples in Canada only (Bushnik et al. 2012). In the last decades, many treatments have been developed in the field of assisted reproductive technology but, based on meta-analysis, only 21 to 30 % of elective single-embryo transfers result in clinical pregnancies (Gleicher, Kushnir et Barad 2019 ; Gelbaya, Tsoumpou et Nardo 2010). A successful pregnancy involves synchronization between a healthy embryo and an endometrial receptivity (Teh, McBain et Rogers 2016). Embryo implantation is the critical step leading to the invasion of the uterine wall and the subsequent clinical validation of the pregnancy by increasing human chorionic gonadotropin (hCG) in the maternal blood. Implantation is mediated by interactions between the embryo and the endometrium (S. M. Kim et Kim 2017) and involves hormones, growth factors, cytokines and adhesion molecules (Guzeloglu-Kayisli, Kayisli et Taylor 2009 ; Pawar et al. 2014). The window of implantation (WOI) occurs between 5 and 10 days post-ovulation and is associated with the expression of cellular products such as cytokines produced by the immune cells (van Mourik, Macklon et Heijnen 2009 ; Robertson et Moldenhauer 2014). In recent years, studies have shown that a successful embryo implantation maybe influenced by the immune cells present at the implantation site (Robertson, Care et Moldenhauer 2018 ; Robertson et Moldenhauer 2014).

Recurrent implantation failure (RIF) can be defined as three successive transfers of healthy embryos into a normal uterus that does not lead to successful implantation and clinical pregnancy (Bashiri, Halper et Orvieto 2018). RIF can be due to the embryo itself, factors decreasing endometrial receptivity or both (Bashiri, Halper et Orvieto 2018). Today, advanced technologies in the field have made it possible to specifically study the implantation process to understand the different aspects of endometrial-embryonic interaction (Hoozemans et al. 2004 ; Zohni, Gat et Librach 2016). New techniques are being studied to

enhance endometrial receptivity. For example, it has been shown that hCG-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) promote the implantation and invasion of mouse blastocyst *in vitro* (Nakayama et al. 2002b). Clinical trials have studied the effects of unstimulated (Okitsu et al. 2011) and hCG-activated PBMC for 48-h on the implantation and clinical pregnancy rates in RIF patients (Yoshioka et al. 2006b). These studies have shown that endometrium immunomodulation by intrauterine administration of PBMC significantly increased implantation and clinical pregnancy rates in RIF patients. Furthermore, a recent meta-analysis confirms an increase in live birth rate by 2-fold(D. N. Yang et al. 2020). Although PBMC in RIF patients seems to modulate endometrial receptivity, the cellular mechanisms responsible for this phenomenon are still unknown.

Various cell populations such as CD4⁺/CD8⁺ T cells (25-60%), monocytes (10-30%), B cells (5-15%) and NK cells (5-10%) are present in PBMC (Kleiveland 2015). CD4⁺ T cells are known to play an important role in the establishment of immunity (Luckheeram et al. 2012). These cells perform various functions, characterized by specific cytokine productions that can induce a pro- or anti-inflammatory response. The aim of this study is to understand the role of CD4⁺ T cells in endometrial immunomodulation in RIF patients.

2. Material and Methods

2.1 Ethic statement and patients

This study was approved by the ethical committee of INRS (Québec, QC, Canada), protocol CER-16-427. One hundred and fifty-seven (157) women were enrolled in this study between April 2017 and November 2018. All women were enrolled and treated at the Fertilys clinic and are part of a larger cohort. Women were divided into three different groups: 66 patients were treated for intrauterine sperm insemination (**IUI group**), 61 patients with less than three previous embryo implantation failures were transferred with a fresh or frozen/thawed embryo (**IVF group**), and 30 patients with three or more embryo implantation failures were transferred with fresh or frozen/thawed embryos (**RIF group**). Women who had known etiologies of RIF, such as chromosomal abnormalities and the presence of antiphospholipid antibodies were excluded from this study.

2.2 *In vitro* fertilization (IVF) procedure

Ovarian stimulation was performed using mainly an GnRH antagonist protocol combining recombinant FSH/LH to GnRH antagonist (Cetrotide; EMD Serono, Ontario, Canada), and less commonly, a micro-dose flare-up protocol using buserelin as the agonist (Suprefact; Sanofi, Québec, Canada). Briefly, ovarian stimulation was initiated on day 3 using FSH-r (Gonal-F; EMD Serono) or human menopausal gonadotropins (Menopur; Ferring, NJ, USA). For the GnRH antagonist protocol, Cetrotide and rLH (Luveris; EMD Serono) were both added when ovarian follicles reached 12-14 mm in diameter until hCG administration. As for the micro-dose flare-up protocol, the GnRH agonist was started the same day of rFSH or hMG, usually on day 3 of the cycle. When at least two dominant ovarian follicle reached 18 mm in diameter, ovulation was triggered using recombinant or human chorionic gonadotropin (hCG: Ovidrel, EMD Serono or Pregnyl, EMD Serono). Thirty-five to 36-h post-hCG administration, oocytes were

recovered by transvaginal oocyte retrieval. Luteal phase was always supported with vaginal progesterone.

2.3 Embryo culture

Cumulus-oocyte complexes were removed using hyaluronidase (CooperSurgical Fertility & Genomic Solutions, Målov, Denmark) diluted in modified human tubal fluid (mHTF) media (CooperSurgical Fertility & Genomic Solutions) supplemented with 10% Serum Substitute Supplement (Fujifilm Irvine Scientific, CA, USA). Cumulus-removed oocytes were firstly incubated in Sage 1-Step medium (CooperSurgical Fertility & Genomic Solutions) at 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂. After 2-h, intracytoplasmic sperm injection was performed. Fertilized oocytes were then incubated at 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂ until fresh embryo transfer or embryo vitrification. Depending on woman's age, one or two embryos were transferred *in utero* three to five days after oocyte retrieval.

2.4 Frozen/thawed embryo transfer

Embryos were thawed the day before or on the same day of transfer using a vitrification warming kit (Kitazato), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, embryos were placed in a thawing medium for 1 min at 37 °C. After thawing, the embryos were kept in the dilution solution (Kitazato) for 3 min at 37 °C. Embryos were finally washed in the washing solution (Kitazato) for 5 min at 37 °C. Frozen/thawed embryos were transferred *in utero* two days after PBMC intrauterine administration. In most frozen/thawed embryo transfer cycles, letrozole 5 mg from day 3 to 7 was used to augment ovulation followed by hCG administration when the dominant follicle reached 18 mm. Luteal phase was also always supported with vaginal progesterone.

2.5 Isolation and administration of PBMC

Thirty milliliters of blood were collected 3 or 5 days prior to embryo transfer and PBMCs were isolated as previously described (Emi et al. 1991 ; Hashii et al. 1998) by Ficoll-Hypaque (Ficoll-PaqueTM PLUS, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). After centrifugation step at 400 g for 30 min, PBMC were washed twice in PBS 1X (Gibco, USA). For immunomodulation, PBMC (1×10^6 cells/ml) was suspended in 6 ml of global total medium supplemented with PHA/hCG and then incubated for 48-h at 37 °C, 5% CO₂. For flow cytometry analysis, 1×10^6 PBMC of freshly isolated were suspended in 1 ml of RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1 µg/ml ionomycin, 0.7 µl/ml GolgiStop (BD Biosciences, USA) and 1µl/ml GolgiPlug (BD Biosciences) for 5-h at 37 °C, 5% CO₂. The remaining of fresh PBMC cells were frozen at -80 °C in FBS supplemented with 10% DMSO. After 2 days, PBMC suspended in global total medium were counted and then washed with new global total medium. The supernatant was frozen at -80 °C. PBMCs (1×10^6 cells) were suspended in 0.4 ml of global total medium and injected in the uterine cavity. The remaining of PBMCs was suspended in 1 ml of RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% FBS, 50 ng/ml PMA, 1µg/ml ionomycin, 0.7 µl/ml GolgiStop and 1µl/ml GolgiPlug and were incubated 5-h at 37°C, 5% CO₂ for flow cytometry experiments.

2.6 Flow Cytometry

After activation of PBMCs with 50 ng/ml PMA, 1 µg/ml ionomycin and 1 µg/ml brefeldin A for 5-h at 37°C, 5% CO₂ and a washing step in PBS 1X, 1×10^6 cells were transferred into a 1.5 ml microcentrifuge tube. Non-specific binding blocking was achieved by adding 1 µg of normal human IgG (R & D Systems,USA). Staining with anti-CD4⁺/FITC (Biolegend, USA), anti-T-bet/BV605 Biolegend, USA), anti-IFN-γ/APC-Cy7 (Biolegend), anti-GATA-3/BV421 (Biolegend, USA), anti-IL-4/BV510 (Biolegend, USA), anti-IL-17/BV711 (Biolegend, USA), anti-AHR/PE Cy7 (Ebioscience, USA), anti-IL-22/PerCP (Biolegend, USA), anti-CD25/APC (Biolegend, USA), anti-Foxp3/PE (Biolegend, USA). Briefly, cells were stained with cell surface antibodies for 30 min on ice in the dark and then washed with PBS before fixation and permeabilization using Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience)

following the manufacturer's instructions. Cells were then stained with intracellular antibodies for 30 min at room temperature and washed twice with 1X permeabilization Buffer from the permeabilization kit (eBioscience) before analysis on Fortessa (Becton Dickinson, USA).

2.7 Cytometric beads array

Cytokines expression was evaluated using the Human T Helper Cytokine Panel (Biolegend, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, the supernatants were diluted with a 1:2 ratio: 25 µl of diluted supernatant were transferred into the 96-well plate, 25 µl of mixed capture beads, 25 µl of detection antibodies cocktail and 25 µl of SA-PE were added into each well. Data were acquired on BD™ FACS Fortessa flow cytometer and analyzed with Biolegend legendplex software.

2.8 Statistical analysis

Demographic and medical history were compared between the PBMC treated group and the control group using Mann-Whitney tests. Clinical pregnancy and implantation rates were compared between the two groups using chi-squared test. CD4 T cell subsets and cytokines were compared between RIF group and two others groups using Mann-Whitney tests.

Statistically significant differences $P < 0.05$ were considered statistically significant for all tests.

CD4 T cell subsets and cytokines were also analysis using PCA model for determining correlations and groups difference for all parameters together. All statistical analysis were performed using GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA) and RStudio (Open-Source Software).

3. Results

3.1 Stimulation of PHA/hCG of PBMC increases both inflammatory and anti-inflammatory T CD4⁺ subpopulation.

In our study, the IUI group, FIV group and RIF group were composed of 66, 61 and 30 women with no significant difference in their age (Table 1). In isolated PBMC, distribution of Th1, Th2, Th17, Th22 and Treg cells populations were evaluated by flow cytometry after 48-h of PHA/hCG stimulation. Analysis of PBMC before *in vitro* stimulation showed that the most abundant CD4⁺ T cells subpopulations were Th1 (11.59%) and Th2 cells (4.49%) (Fig1A and Fig 1B). Following PHA/hCG activation, Th1 cells were slightly, but significantly decreased (-1.04% $p = 0.041$) (Fig. 1A). On the other hand, the proportion of Th2 cells were significantly increased by three times (+10.88%, $p < 0.0001$) following the PHA/hCG exposure (Fig.1B). Th17 cells were also slightly significantly decreased (-0.18%, $p < 0.0001$) in the same condition (Fig.1C). Quite interestingly, the proportion of Th22 cells was significantly increased by 3 times (+2.42%, $p < 0.0001$) (Fig. 1D) and Treg cells, reach a rise of 4 times (+4.07%, $p < 0.0001$) after stimulation (Fig.1E). Thus, PHA/hCG stimulation appears to increase both inflammatory cells (Th22) and anti-inflammatory cells (Th2 and Treg).

3.2 Low frequency of Th2 cells and natural Treg cells in resting PBMC from RIF patients

In resting PBMC, no significant difference was observed in the distribution of Th1 (Fig. 2A), Th17 (Fig. 2C) and Th22 (Fig. 2D) cells populations between the IUI, IVF and RIF groups of women. In contrast, in RIF population, a decrease of Th2 cells (Fig. 2B, $p < 0.0001$) and Treg cells (Fig. 2E, $p < 0.001$) by around 2,5 and 10 fold respectively, were found when compared to the IUI and IVF group of women.

3.3 PBMC stimulation by PHA/hCG in RIF patients cause a decrease in Th2 cells and an increase in Th17 cells after treatment

After PHA/hCG activation, no significant difference was observed in the distribution of Th1 (Fig. 3A), Th2 (Fig. 3D), and Treg (Fig. 3E) cells populations between the IUI, IVF and RIF groups of women. In the RIF group, Th2 cells were significantly decreased ($p < 0.0001$) compared to IUI and IVF groups (Fig. 3B). On the other hand, Th17 cells were increased considerably in the RIF group ($p < 0.01$) compared to IUI and IVF groups (Fig. 3C).

3.4 PBMC stimulation by PHA/hCG increases different cytokines productions between RIF, IVF and IUI groups.

We analyzed the supernatant of each culture of PHA/hCG stimulated PBMC just before intrauterine administration to determined cytokine profile. For IUI, IVF and RIF groups, PHA/hCG activation led, as expected, to an increase of T cells associated cytokines as compared to unstimulated cells (Fig. 4). PBMC stimulation by PHA/hCG does not affect the production of pro-inflammatory cytokines between the three groups of the patient for IL-2 (Fig. 4A), IFN- γ (Fig. 4C), IL17f (Fig. 4E) and IL-22 (Fig. 4K). On the other hand, IL-6 production (Fig. 4B) was increased in the IUI group when compared to IVF ($p < 0.001$) and RIF ($p < 0.001$) groups. For other inflammatory cytokines, IL-17a (Fig. 4D, $p < 0.05$) was increased in the RIF group compared to the IVF group. Interestingly, IL-9 was increased significantly in the RIF group as compared with the other groups (Fig. 4H, $p < 0.01$ for IVF and $p < 0.01$ for IUI) as was IL-21 in the IVF group compared to IUI and RIF groups (Fig. 4F, $p < 0.05$ for IVF and $p < 0.05$ for IUI). Regarding anti-inflammatory cytokines, we found only a small decrease of IL-10 in the IVF group compared to the RIF group (Fig. 4K, $p < 0.05$). All other anti-inflammatories cytokines, IL-4 (Fig. 4J), IL-5 (Fig. 4I) and IL-

13 (Fig. 4L) were not affected. Thus, globally only IL-6 for the IUI group and IL-9 for the RIF group were significantly increased compared to the other groups.

3.5 Differences between RIF patients and other patients shown by PCA on all the data.

To obtain a better analysis of our results, we used principal component analysis (PCA) on all of our data. The PCA method allows treating several potentially linked variables into a new variable defined as the linear component of the original variables. When we integrated our cell subpopulations data for unstimulated cells recovery at day 0, we see that the patient groups IUI and IVF were similar, their point clouds were located in the same regions of the model (Fig 5A). In contrast, the RIF group of women has a different representation of their variables. By using the data of the CD4⁺ T cell subpopulations after PHA/hCG stimulation, as well as the cytokines produced by the cells in the PCA model, we obtained a reduction in the differences observed between our patients (Fig 5B). When we performed a spearman correlation on all the data of T-cell subpopulations and cytokines analyzed, we observed several strong positive correlations among the anti-inflammatory cytokines of the Th2 phenotype (IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13) (Fig 5C and 5D). Moreover, there was a positive correlation between the cytokines IL-17a, IL-17f and IL-22, associated with the Th17 phenotype (Fig 5C and 5D). We do not observed correlations between the T cell subpopulations after PHA/hCG stimulation Fig 5D.

3.6 Administration of activated PBMC by PHA/hCG does not affect IUI and IVF groups

To evaluate the impact of activated *PBMC* by *PHA/hCG* in improving embryo implantation, we have compared IUI and IVF groups. Age, number of previous embryo transfer(s), number of embryos transferred, and previous IUI were not statistically different between the PBMC-treated and control groups

(Table 1S and Table 2S). Implantation and clinical pregnancy rates were not statistically significant either between the PBMC treated vs non-treated in IUI and IVF patients' groups.

4. Discussion

In this study, we showed in PBMC a decrease of anti-inflammatory cells (Th2, Treg) in the RIF group. Stimulation of PBMC with PHA/hCG in the RIF group causes a slight rise of Th2 and normalization of Treg cells. Associated with later change, % Th17 were also predominant in the RIF group. Concerning cytokine produce by PBMC stimulated by PHA/hCG, only IL-9 was different between RIF patients and IUI/IVF patients. The embryo implantation is one of the significant steps in the success of a pregnancy. Although, with the progress made in embryo selection methods and the detection of possible mutations, which may disadvantage the implantation process, the endometrial receptivity remains a problematic element to assess (Katzorke et al. 2016). To explain the role of PBMCs in the implantation process, several possible mechanisms have been suggested. Progesterone is secreted during the luteal phase to prepare the endometrium for implantation of the embryo (Mesen et Young 2015). It has been suggested that PBMCs administered into the uterine cavity move to the endometrial stromal tissue, promoting attachment and embryo invasion (Hiroshi Fujiwara et al. 2009). PBMCs have been shown to stimulate the production of progesterone, in particular, via the action of Th2 cells (Hashii et al. 1998). Our results show that the hCG/PHA treatment promotes Th2 and Treg cells, associated with an anti-inflammatory response. The presence of anti-inflammatory cells is necessary to reduce inflammation after embryo implantation (Tsuda et al. 2019 ; Sykes et al. 2012). The production of leukemia inhibitory factor and endometrial vascular endothelial growth factor is increased by PBMC used for immunomodulation (Yu et al. 2014). It also appears that PBMC treatment increases the invasion capacity of the trophoblast cells and the differentiation of corpus luteum and endometrium (Campesato et al. 2020).

The diagnosis of endometrial receptivity represents a significant challenge. Several tests have been suggested to overcome this challenge. MicroArray technology has been proposed to evaluate the transcriptomic signature of the window of implantation (WOI) (Herington et al. 2016 ; A. Schmidt et al.

2005). It was initially developed as a diagnostic tool for endoplasmic reticulum stress (Hamamura, Liu et Yokota 2008). This technology has made it possible to demonstrate that the WOI was displaced in 25% of RIF patients (Ruiz-Alonso et al. 2013). A personalized embryo transfer to improve reproductive performance can be obtained with this method (Campesato et al. 2020). Although this technology increases the implantation rate in some patients due to a better understanding of the WOI, other factors have a considerable impact on the success of the embryo implantation and its clinical usefulness remains to be proven.

The data in the literature indicates that a pro-inflammatory environment is often found in women who have had RIF (Liang et al. 2015). This pro-inflammatory state present in the endometrium may cause a decline in endometrium receptivity and thus explain the inability of the embryo to implant. Besides, a study showed that the presence of Treg cells increases pregnancy rates in RIF patients (Ahmadi et al. 2017). Our results showed that Treg cells were significantly reduced in the RIF group. In addition, Th2 cells, also anti-inflammatory, are strongly reduced in the RIF group. An anti-inflammatory state is essential for the maintenance of the embryo after implantation (Sykes et al. 2012 ; Tsuda et al. 2019), and a decrease in these cells may explain the reduction in receptivity in the RIF group (Ahmadi et al. 2017).

Moreover, hCG/PHA treatment increases induced Treg cells differentiation to make it similar to patients in IUI and IVF groups. Induced Tregs have a regulatory capacity similar to natural Treg cells (Shevach et Thornton 2014). The treatment therefore promotes anti-inflammatory cell differentiation, helping to reduce post-implantation inflammation and maintain embryo growth.

Pro-inflammatory and anti-inflammatory responses both play a role in the success of pregnancy. A study has shown that in the plasma of RIF patients, a large quantity of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-6, IL-1 β), as well as a decrease in TGf β 1 can be found (Campesato et al. 2020). In our study we did not

observe differences between RIF patients and IUI and IVF groups in the differentiation of Th17 cells, whose cytokines IL-6 and IL-1 β promote differentiation and Th1 cells, which produce IFN- γ . On the other hand, we observed a substantial decrease in Treg cells in RIF patients than the other groups. This decrease could be explained by the TGF β levels found in RIF patients.

In most immunomodulation protocols for RIF patients' treatment, PBMC cells used are either unstimulated or stimulated with hCG (Okitsu et al. 2011 ; Yoshioka et al. 2006b). The quantity of cells used ranges from 1 to 2×10^7 cells (Yoshioka et al. 2006b). Our approach was to use PBMC cells activated by PHA and hCG treatment with a lower number of cells, of the order of 1×10^6 cells. We observed that activating PBMC by this protocol not only induced the T cell subpopulation associated with an anti-inflammatory activity but without effect on pro-inflammatory cells.

Immunomodulation using PBMCs has been shown to increase the live birth rate in RIF patients (Yoshioka et al. 2006b ; D. N. Yang et al. 2020). On the other hand, in patients considered non-RIF, this treatment does not seem to increase the pregnancy success rate (Okitsu et al. 2011 ; S. Li et al. 2017). In this study, we observed that treatment with PBMCs did not increase clinical pregnancy rate in IUI and IVF groups (Table 1S and 2S). Sample sizes of our studied populations are too small to draw any conclusions in that regard.

An increase of IL-9 in the supernatant of PHA/hCG-stimulated PBMC in the RIF group suggests a potential role of this interleukin in successful implantation. The primary source of IL-9 is Th9 lymphocytes, which is differentiated in the presence of TGF β and IL-4 (Goswami et Kaplan 2011). Although the Th9 subpopulation was not analyzed in our study, their increase seems logical since we observe a rise in TGF β (Treg) and IL-4 (Th2) producing cells after PHA/hCG stimulation. Moreover, Th9 and Th2 cells have a similar requirement for several transcription factors, including STAT6, GATA3 and IRF4 (Jabeen et al.

2013). IL-9 is a major cytokine at the mouse fetal-maternal interface (Habbeddine et al. 2014) and plays a vital role in regulating local inflammatory immune responses and promoting allograft tolerance (Wan et al. 2020 ; W. Wang et al. 2020). Another possible function of IL-9 in the implantation process can be associated with their capacity to induce the stimulation of CCL20 production (Habbeddine et al. 2014). In pig model, it was demonstrated that activation of CCL20 and its receptor CCR6 promotes endometrium preparation for implantation (Park et al. 2019). Another important role of CCL20 is their involvement in the recruitment of decidual immune cell subtypes such as dendritic cells and Treg from peripheral tissues (M. R. Du, Wang et Li 2014).

Depending on the studied populations (IUI, IVF or RIF), this study have demonstrated significant differences in PBMC profiles, before and after in vitro activation, both at the levels of cell differentiation and cytokine production, that could help to understand how endometrium immunomodulation by hCG-activated PBMC helps patients with unexplained RIF to reach implantation. The immunomodulation of the endometrium by PBMCs can be used as an immunological therapeutic approach in addition to the other therapies already used (H. Fujiwara et al. 2016). Also, the use of PBMC in these treatments should not lead to an over activation of the uterine immune profile at the risk of becoming harmful for the success of pregnancy. (Leedee et al. 2017). This is why the use of a cell stimulation protocol promoting an anti-inflammatory profile is necessary when the patient has a pro-inflammatory profile. Determining the uterine inflammatory profile would make it possible to apply treatments that are appropriate to the needs of each patient.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Fertilys embryologists and nurses for their implication in this project. Merve Kulbay for the edition.

Disclosure

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Chandra, A., C.E. Copen, and E.H. Stephen, *Infertility service use in the United States: data from the National Survey of Family Growth, 1982-2010*. Natl Health Stat Report, 2014(73): p. 1-21.
2. Evers, J.L., *Female subfertility*. Lancet, 2002. **360**(9327): p. 151-9.
3. Bushnik, T., et al., *Estimating the prevalence of infertility in Canada*. Hum Reprod, 2012. **27**(3): p. 738-46.
4. Gleicher, N., V.A. Kushnir, and D.H. Barad, *Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes*. Hum Reprod Open, 2019. **2019**(3): p. hoz017.
5. Teh, W.T., J. McBain, and P. Rogers, *What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure?* J Assist Reprod Genet, 2016. **33**(11): p. 1419-1430.
6. Kim, S.M. and J.S. Kim, *A Review of Mechanisms of Implantation*. Dev Reprod, 2017. **21**(4): p. 351-359.
7. Guzeloglu-Kayisli, O., U.A. Kayisli, and H.S. Taylor, *The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(1): p. 62-79.
8. Pawar, S., et al., *Minireview: Steroid-regulated paracrine mechanisms controlling implantation*. Mol Endocrinol, 2014. **28**(9): p. 1408-22.
9. van Mourik, M.S., N.S. Macklon, and C.J. Heijnen, *Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(1): p. 4-19.
10. Robertson, S.A. and L.M. Moldenhauer, *Immunological determinants of implantation success*. Int J Dev Biol, 2014. **58**(2-4): p. 205-17.
11. Robertson, S.A., A.S. Care, and L.M. Moldenhauer, *Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy*. J Clin Invest, 2018. **128**(10): p. 4224-4235.
12. Bashiri, A., K.I. Halper, and R. Orvieto, *Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions*. Reprod Biol Endocrinol, 2018. **16**(1): p. 121.
13. Hoozemans, D.A., et al., *Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology*. Reprod Biomed Online, 2004. **9**(6): p. 692-715.

14. Zohni, K.M., I. Gat, and C. Librach, *Recurrent implantation failure: a comprehensive review*. Minerva Ginecol, 2016. **68**(6): p. 653-67.
15. Nakayama, T., et al., *Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: HCG enhances the effects of PBMC*. Human Reproduction, 2002. **17**(1): p. 207-212.
16. Okitsu, O., et al., *Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure*. J Reprod Immunol, 2011. **92**(1-2): p. 82-7.
17. Yoshioka, S., et al., *Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF–embryo transfer*. Human Reproduction, 2006. **21**(12): p. 3290-3294.
18. Kleiveland, C.R., *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015: Cham (CH). p. 161-167.
19. Luckheram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.
20. Emi, N., et al., *Lymphocytes stimulate progesterone production by cultured human granulosa luteal cells*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **165**(5 Pt 1): p. 1469-74.
21. Hashii, K., et al., *Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non-pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation*. Hum Reprod, 1998. **13**(1O): p. 2738-44.
22. Katzorke, N., et al., *Diagnosis of Endometrial-Factor Infertility: Current Approaches and New Avenues for Research*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2016. **76**(6): p. 699-703.
23. Mesen, T.B. and S.L. Young, *Progesterone and the luteal phase: a requisite to reproduction*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015. **42**(1): p. 135-51.
24. Fujiwara, H., et al., *Immune System Cooperatively Supports Endocrine System-Primed Embryo Implantation*. Journal of Mammalian Ova Research, 2009. **26**(3): p. 122-128.
25. Tsuda, S., et al., *New Paradigm in the Role of Regulatory T Cells During Pregnancy*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 573.
26. Sykes, L., et al., *The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 967629.

27. Yu, N., et al., *Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) improves endometrial receptivity in mice with embryonic implantation dysfunction*. Am J Reprod Immunol, 2014. **71**(1): p. 24-33.
28. Campesato, L.F., et al., *Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-Kynurenone*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4011.
29. Herington, J.L., et al., *Gene profiling the window of implantation: Microarray analyses from human and rodent models*. J Reprod Health Med, 2016. **2**(Suppl 2): p. S19-S25.
30. Schmidt, A., et al. *Gene Expression During the Implantation Window: Microarray Analysis of Human Endometrial Samples*. 2005. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
31. Hamamura, K., Y. Liu, and H. Yokota, *Microarray analysis of thapsigargin-induced stress to the endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts*. J Bone Miner Metab, 2008. **26**(3): p. 231-40.
32. Ruiz-Alonso, M., et al., *The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure*. Fertil Steril, 2013. **100**(3): p. 818-24.
33. Liang, P.Y., et al., *The pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile in peripheral blood of women with recurrent implantation failure*. Reprod Biomed Online, 2015. **31**(6): p. 823-6.
34. Ahmadi, M., et al., *Regulatory T cells improve pregnancy rate in RIF patients after additional IVIG treatment*. Syst Biol Reprod Med, 2017. **63**(6): p. 350-359.
35. Shevach, E.M. and A.M. Thornton, *tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences*. Immunol Rev, 2014. **259**(1): p. 88-102.
36. Li, S., et al., *Intrauterine administration of hCG-activated autologous human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) promotes live birth rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure*. J Reprod Immunol, 2017. **119**: p. 15-22.
37. Goswami, R. and M.H. Kaplan, *A brief history of IL-9*. J Immunol, 2011. **186**(6): p. 3283-8.
38. Jabeen, R., et al., *Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network*. J Clin Invest, 2013. **123**(11): p. 4641-53.
39. Habbeddine, M., et al., *Leukocyte population dynamics and detection of IL-9 as a major cytokine at the mouse fetal-maternal interface*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107267.
40. Wan, J., et al., *IL-9 and IL-9-producing cells in tumor immunity*. Cell Commun Signal, 2020. **18**(1): p. 50.

41. Wang, W., et al., *T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 2025.
42. Park, C., et al., *Activation of CCL20 and its receptor CCR6 promotes endometrium preparation for implantation and placenta development during the early pregnancy period in pigs*. Dev Comp Immunol, 2019. **92**: p. 35-42.
43. Du, M.R., S.C. Wang, and D.J. Li, *The integrative roles of chemokines at the maternal-fetal interface in early pregnancy*. Cell Mol Immunol, 2014. **11**(5): p. 438-48.
44. Fujiwara, H., et al., *Dual Positive Regulation of Embryo Implantation by Endocrine and Immune Systems--Step-by-Step Maternal Recognition of the Developing Embryo*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(3): p. 281-9.
45. Ledee, N., et al., *Uterine immune profiling for increasing live birth rate: A one-to-one matched cohort study*. J Reprod Immunol, 2017. **119**: p. 23-30.

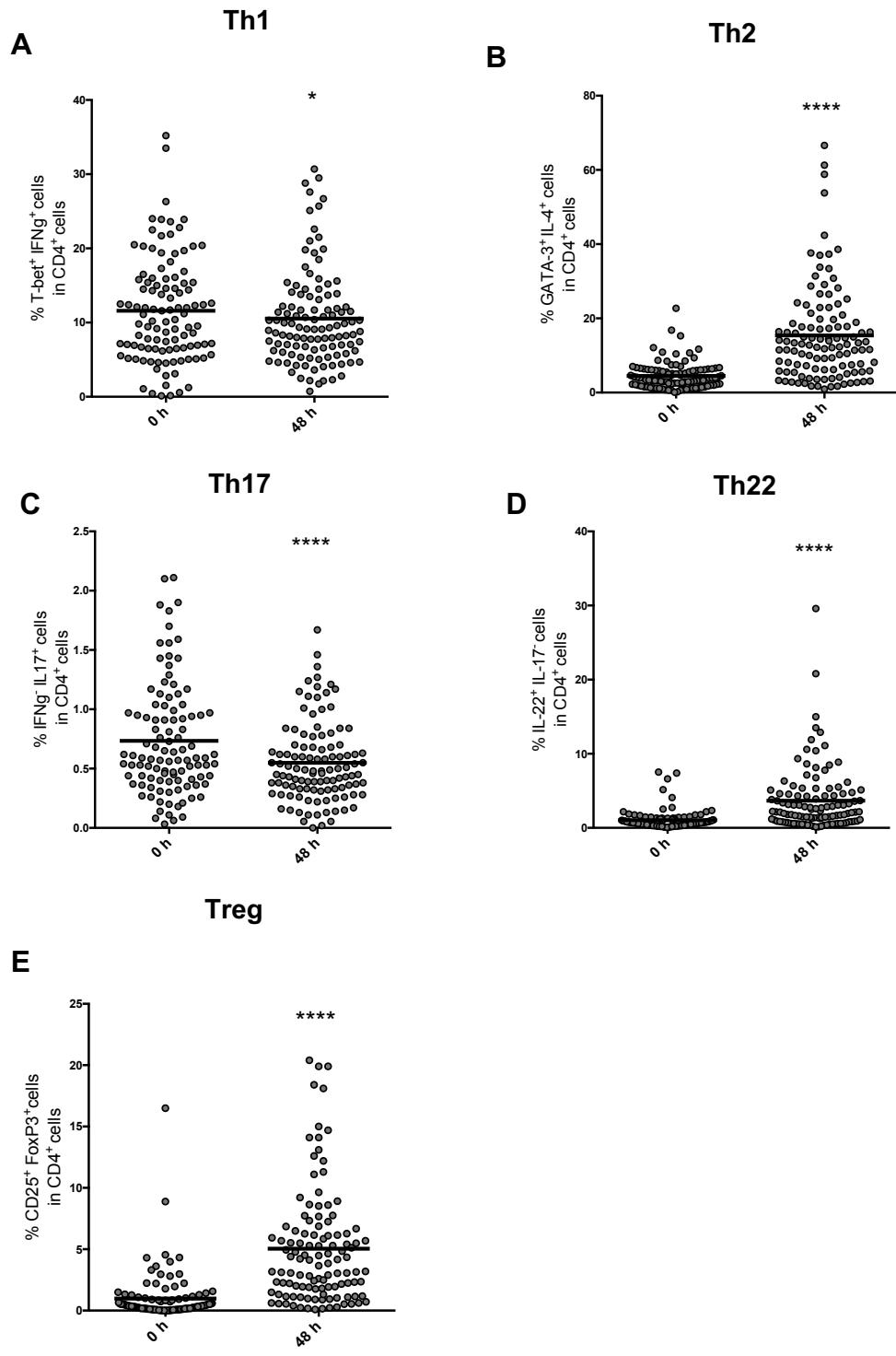


Figure 1: Proportions of lymphocyte subpopulations a) Th1, b) Th2, c) Th17, d) Th22, e) Treg before and after 48h of hCG/PHA activation in our groups of women with reproductive difficulties. Mann-Whitney : p <0.05 (*), p <0.0001 (****), n =157.

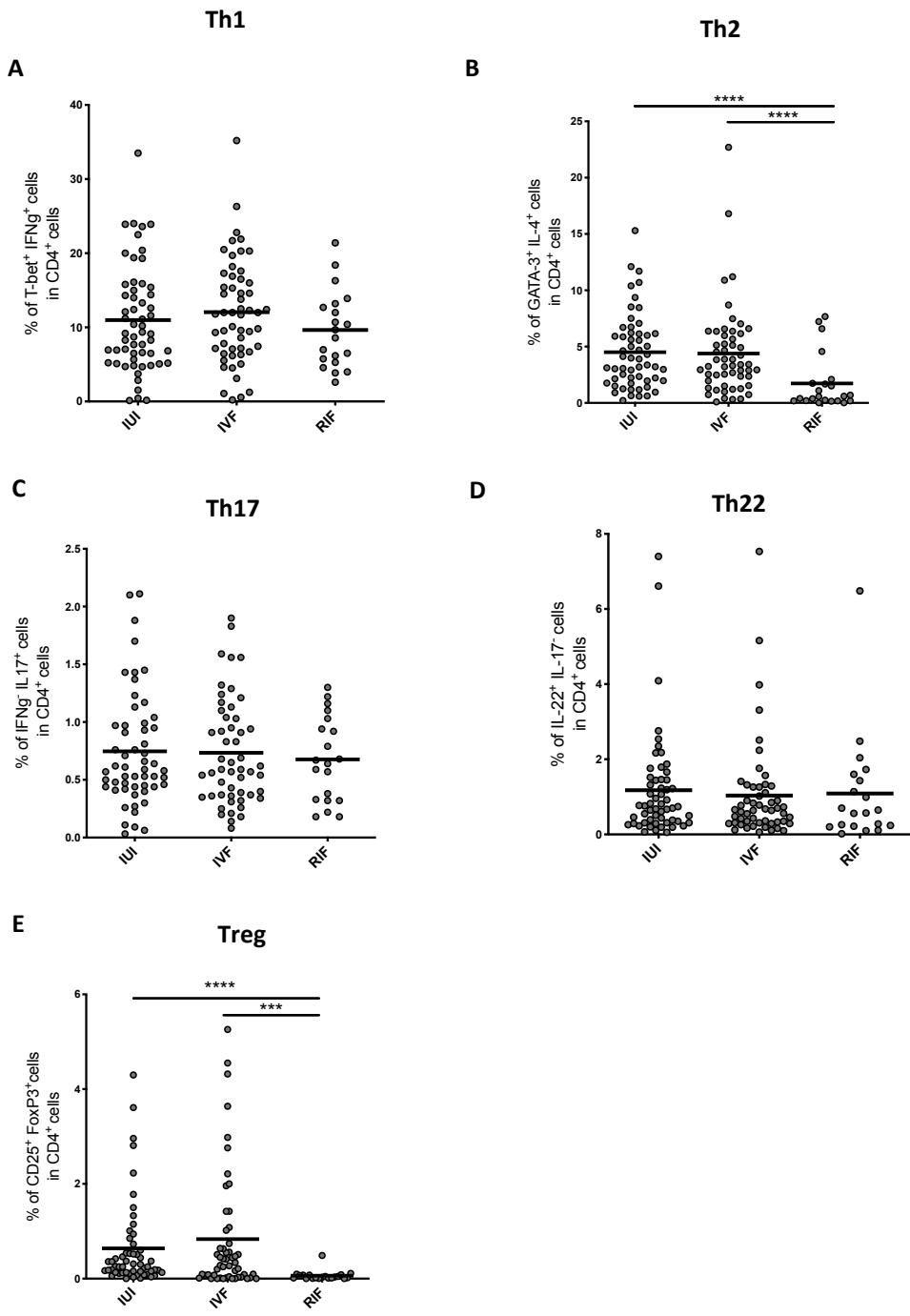


Figure 2: Proportions of lymphocyte subpopulations (A) Th1, (B) Th2, (C) Th17, (D) Th22, (E) Treg circulant in our patients groups of women with reproductive difficulties. Mann-Whitney: p <0.05 (*), p <0.0001 (***)
n = 66: intrauterine insemination (IUI); n = 61: *in vitro* fertilization (IVF); n=30: recurrent implant failure (RIF).

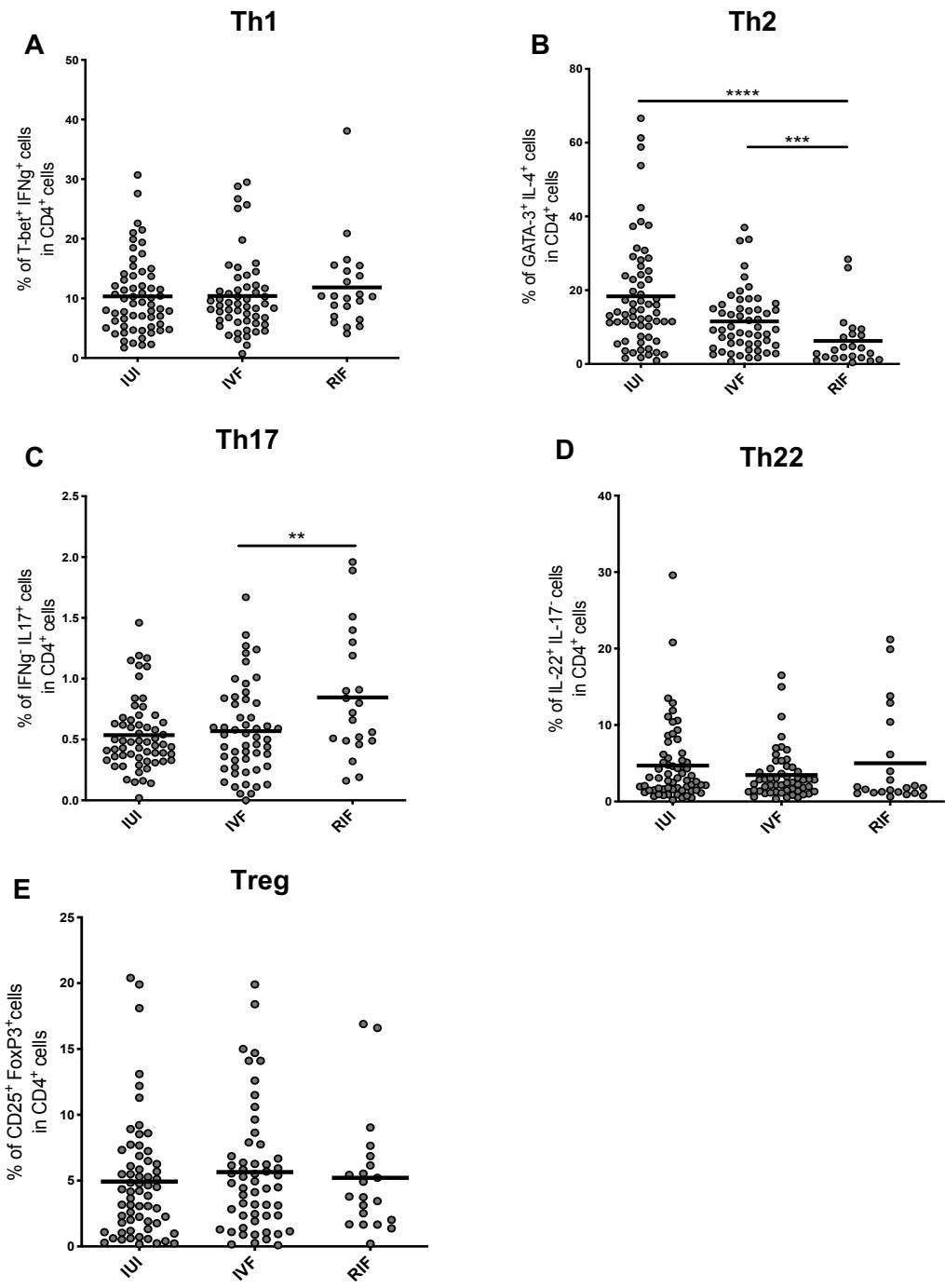


Figure 3: Proportions of lymphocyte subpopulations (A) Th1, (B) Th2, (C) Th17, (D) Th22, (E) Treg after hCG and PHA treatment in our groups of women with reproductive difficulties. Mann-Whitney: p <0.05 (*), p <0.0001 (****), n = 66: intrauterine insemination (IUI); n = 61: *in vitro* fertilization (IVF); n=30: recurrent implant failure (RIF).

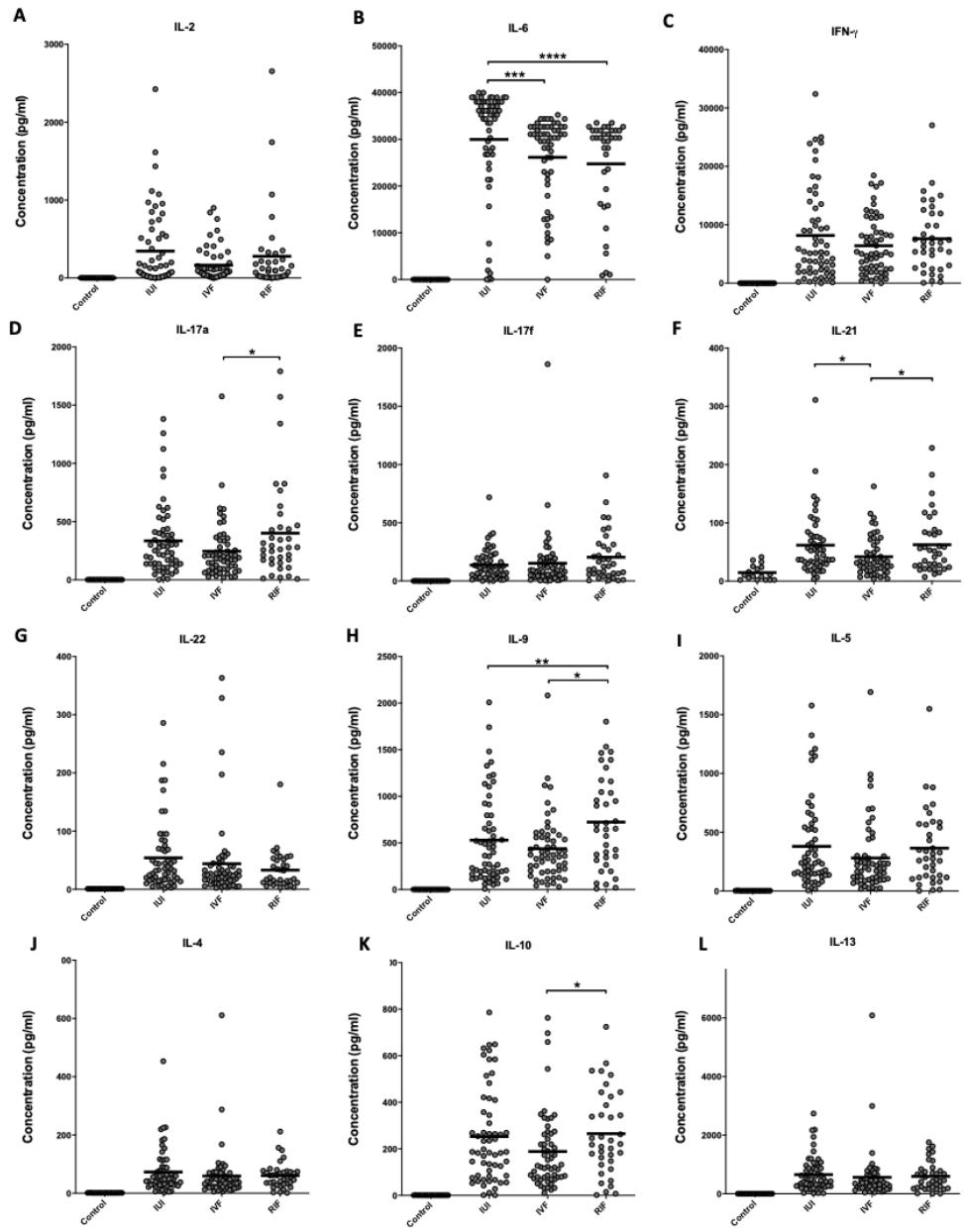


Figure 4: PHA / hCG-treated PBMC induces an increase of CD4 T cells cytokines. The amount of (A) IL-2 secreted, (B) IL-6 secreted, (C) IFN- γ secreted, (D) IL-17a secreted, (E) IL-17f secreted, (F) IL-21 secreted, (G) IL-22 secreted, (H) IL-9 secreted (I) IL-5 secreted, (J) IL-4 secreted, (K) IL-10 secreted (L) IL-13 secreted by PBMC treated with PHA / hCG for 48 hours in IUI group, IVF group and RIF group. Mann-Whitney: p <0.05 (*), p <0.0001 (****), n = 66 for Intrauterine Insemination (IUI); n = 61 for *In vitro* Fertilization (IVF); n=30 for Recurrent Implantation Failure (RIF), n=17 for Control group.

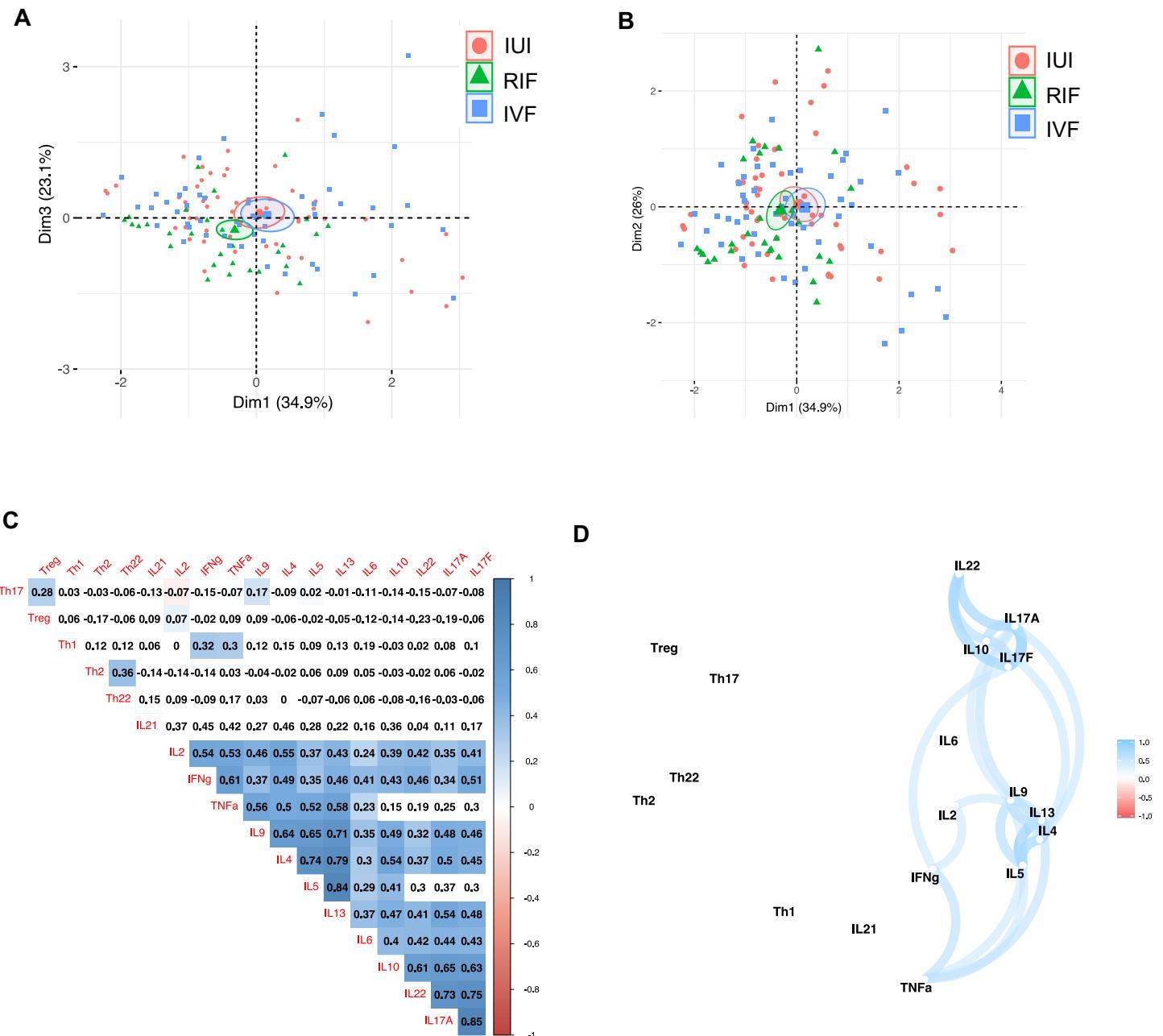


Figure 5: Plot of individuals of the multiple factor analysis (MFA) applied on T cells subsets at **(A)** before hCG/PHA treatment and **(B)** after hCG/PHA treatment. IUI patients, RIF patients and IVF patients are represented respectively by the circle, triangle and square. **(C)** Spearman correlation coefficients of T cells subsets and T cells cytokines at J2. Representation of correlation clusters of T cells subsets and T cells cytokines at day 2.

Table 1

Characteristics and clinical outcomes of IUI patients peripheral blood mononuclear cells (PBMC)-treated and non-treated groups.

	PBMC-treated	Non-treated	
I. Characteristics of the patients			
N	30	36	
Age	33.3 ± 4.4	32.8 ± 4.2	n.s.
No. of previous IUI attempts	1.78 ± 1.37	2.3 ± 1.46	n.s.
II. Clinical outcome			
Clinical pregnancy rate	13.3% (4/30)	5.6% (2/36)	n.s.
Implantation rate	6.7 (2/30)	2.8% (1/36)	n.s.
Live birth delivery rate	6.7 (2/30)	2.8% (1/36)	n.s.

Table 1S

Characteristics and clinical outcomes of IUI patients treated or non-treated with peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

	PBMC-treated	Non-treated	
I. Characteristics of the patients			
N	30	36	
Age	33.3 ± 4.4	32.8 ± 4.2	n.s.
No. of previous IUI attempts	1.78 ± 1.37	2.3 ± 1.46	n.s.
II. Clinical outcome			
Clinical pregnancy rate	13.3% (4/30)	5.6% (2/36)	n.s.
Implantation rate	6.7 (2/30)	2.8% (1/36)	n.s.
Live birth delivery rate	6.7 (2/30)	2.8% (1/36)	n.s.

n.s. ; non significatif.

Table 2S

Characteristics and clinical outcomes of IVF patients treated or non-treated with peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

	PBMC treated	Non-treated	
I. Characteristics of the patients			
N	28	33	
Age	33.3 ± 3.6	32.1 ± 5.0	n.s.
IVF–embryo transfer previous attempts	0.57 ± 0.74	0.68 ± 0.74	n.s.
No. of embryo transferred	1.07 ± 0.262	1.03 ± 0.17	n.s.
II. Clinical outcome			
Clinical pregnancy rate	35.7% (10/28)	51.5% (17/33)	n.s.
Implantation rate	32.1 (9/28)	51.5% (17/33)	n.s.
Live birth delivery rate	23.3% (6/26)	46.9% (15/32)	n.s.

n.s. ; non significatif.

Table 3S

Characteristics and clinical outcomes of RIF patients in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC)-treated group.

	PBMC treated
I. Characteristics of the patients	
N	30
Age	33.8 ± 4.2
IVF–embryo transfer previous attempts	3.93 ± 2.71
No. of embryo transferred	1.07 ± 0.254
II. Clinical outcome	
Clinical pregnancy rate	23.3% (7/30)
Implantation rate	23.3 (7/30)
Live birth delivery rate	3.3% (1/30)

SECTION 3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle majeur dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative et participent à l'activation des cellules de la réponse immunitaire innée (Luckheeram et al. 2012). En effet, ces cellules sont capables de secréter un large panel de cytokines permettant, entre autres, d'aider les cellules B à sécréter des anticorps, de soutenir l'activation des cellules T CD8⁺, d'inciter les macrophages à développer une capacité microbicide efficace et permettre aux granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) de migrer jusqu'aux sites d'infections (Zhu et Paul 2008). Pour remplir efficacement ces différentes fonctions, les cellules T CD4⁺ se différencient, sous la pression du microenvironnement, en plusieurs sous-types distincts ayant des activités pro-inflammatoires, telles que les cellules Th1 ou les Th17, ou anti-inflammatoires comme les cellules Th2 ou les Treg (Zhu, Yamane et Paul 2010 ; Luckheeram et al. 2012). Cependant, une activation anormale des différentes sous populations de T CD4⁺ peut engendrer le développement de pathologies (J. H. Kim, Kim et Lee 2020 ; Wilke et al. 2011). Par exemple, plusieurs pathologies auto-immunes, comme la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde, présentent une activation anormale des cellules Th1 et Th17, qui participe à l'inflammation tissulaire (Dardalhon et al. 2008). Aussi, la prolifération incontrôlée des cellules Th2 a été associée au développement de maladies inflammatoires allergiques (Deo et al. 2010). Enfin, dans certains types de cancers, comme les cancers colorectaux, on retrouve une augmentation des cellules Treg qui induit la suppression de la réponse anti-tumorale (Fridman et al. 2012). Les cellules T CD4 sont également impliquées dans plusieurs processus biologiques, comme le phénomène d'implantation embryonnaire, où une différenciation majoritairement orientée vers les phénotypes Th1 et Th17 peut conduire à l'échec de ce processus (Dekel et al. 2010 ; Franasiak et Scott 2017 ; Sykes et al. 2012). Plusieurs causes peuvent expliquer une perturbation de la différenciation des cellules T CD4. Par exemple, la composition en cytokines du micro-environnement peut être modifiée, facilitant ainsi la différenciation anormale des cellules T CD4 (Chaudhary et Elkord 2016 ; T. Liu et al. 2012). Plus récemment, il a été montré que des molécules extérieures à l'organisme, comme les xénobiotiques, peuvent également perturber cette différenciation cellulaire (Apetoh et al. 2010 ; J. D. Mezrich et al. 2010 ; Quintana et al. 2008).

Dans ce projet de recherche, nous avons voulu mettre en lumière certains aspects de la différenciation des cellules T CD4 sur des sujets peu documentés dans la littérature. L'évolution de ce projet nous a amenés à nous intéresser à deux sujets différents, mais fondamentalement liés par la différenciation des cellules T CD4. Dans la première partie de cette discussion, nous aborderons, en relation avec le premier article, l'impact d'une exposition occupationnelle aux xénobiotiques sur la différenciation des cellules T CD4. La seconde partie de la discussion, quant

à elle, sera consacrée au rôle des sous-types de cellules T CD4 dans les immonumodulations de l'endomètre, utilisés comme traitement chez des patientes en échec répétés d'implantation.

Partie 1 : Les ligands du AhR peuvent impacter la différenciation des lymphocytes T CD4+ dans un contexte occupationnel chez des pompiers.

Au cours des premières années de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la relation entre la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et l'activation du AhR à la suite d'une exposition à des xénobiotiques. Dans un premier temps, nous avons déterminé quels étaient les groupes d'individus pouvant être les plus fortement exposés à des ligands du AhR dans un contexte occupationnel. Aujourd'hui, plusieurs corps de métiers sont en contact avec des xénobiotiques durant leur vie, comme les personnes travaillant dans l'industrie, l'agriculture ou encore les pompiers (X. Huang et al. 2016 ; Brandt-Rauf et al. 1988 ; Bin et al. 2008). Tout d'abord, il est vrai que les personnes travaillant dans l'industrie peuvent être exposées de manière continue aux xénobiotiques (Rota et al. 2014). Cependant, le développement de l'automatisation dans ce secteur et la diminution du temps de carrière passé dans les mêmes usines ont fortement réduit les risques d'exposition aux xénobiotiques (Pollack 2012). C'est pourquoi les personnes travaillant dans ce secteur d'activité au Canada ne représentent pas un bon modèle d'étude. En ce qui concerne les agriculteurs, certaines études ont montré un lien entre l'exposition aux pesticides, comme le prochloraz et l'iprodione, et une activation du AhR (Larsson et al. 2018 ; Long et al. 2003). Nonobstant, chaque agriculteur ayant des utilisations différentes de pesticides, l'exposition aux xénobiotiques ne serait pas uniforme. Cela aurait donc induit un biais trop important sur l'activation du AhR pour notre étude sachant que nous souhaitons regarder son activation globale. En revanche, le nombre de pompiers et la durée passée dans cette profession sont restés relativement les mêmes au cours du dernier siècle, contrairement à l'industrie et au secteur de l'agriculture. De plus, les interventions sont effectuées par l'ensemble des pompiers qui composent la caserne, nous permettant d'avoir une cohorte de personnes exposée de manière plus homogène aux xénobiotiques. Enfin, la grande majorité des ligands du AhR sont issus de la combustion incomplète de matière organique, principalement rencontrée lors des incendies (Stejskalova, Dvorak et Pavek 2011). Les pompiers représentent donc le groupe d'exposition occupationnel aux xénobiotiques idéal pour cette étude. Les voies d'expositions chez les pompiers sont principalement cutanées et pulmonaires (Keir et al. 2017 ; Brandt-Rauf et al. 1988). En effet, malgré l'utilisation d'équipements de protections lors des interventions, c'est notamment au niveau du cou (entre le casque et la tenue de sécurité) et lors du nettoyage des équipements personnels que les pompiers peuvent se contaminer (Fent et al. 2017). De plus, en

l'absence de fumée les équipements de protections respiratoires sont peu utilisés, engendrant ainsi une forte exposition aux xénobiotiques (Brandt-Rauf et al. 1988).

Plusieurs effets sur la santé peuvent être observés suivant qu'il s'agisse d'une exposition courte ou prolongée à des xénobiotiques, les ligands du AhR (Franczak et al. 2006). En effet, une exposition de courte durée à ces ligands peut entraîner des problèmes pulmonaires chez des asthmatiques, ou encore des thromboses chez des personnes atteintes de pathologie cardiaque (Chiba, Chihara et Furue 2012 ; Yi et al. 2018). L'exposition prolongée aux HAP et HAH provoque plusieurs effets chroniques sur la santé. Les HAP peuvent provoquer des troubles de l'immunité, le déclenchement ou l'aggravation de l'asthme, ainsi qu'une augmentation du risque cardio-pulmonaire (Zaccaria et McClure 2013 ; B. Liu et Jia 2016 ; Karimi et al. 2015 ; Alshaarawy, Elbaz et Andrew 2016). Enfin, une exposition prolongée aux HAP peut aussi engendrer de troubles de la reproduction, des accouchements prématurés, ainsi qu'un retard de développement fœtal et une perturbation endocrinienne (Humans 2010b ; Perera et al. 2005 ; Y. Zhang et al. 2016). Plusieurs études menées sur des pompiers ont montré qu'ils étaient plus à risque de développer des maladies inflammatoires chroniques, des cancers et des pathologies génétiques héréditaires (Olshan, Teschke et Baird 1990 ; Guidotti 1993 ; LeMasters et al. 2006). L'exposition à des toxiques lors de la lutte contre les incendies a été jugée comme potentiellement cancérogène par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) (Humans 2010a). C'est pourquoi le rôle de l'activation du AhR dans le développement de ces pathologies a particulièrement été étudié ces dernières années (Moennikes et al. 2004 ; Barouki, Coumoul et Fernandez-Salguero 2007 ; Andersson et al. 2002).

Le AhR est considéré comme un facteur de transcription latent en raison de son activation par des ligands majoritairement exogènes (Rothhammer et Quintana 2019). Il est exprimé de façon similaire ou supérieur aux cellules hépatiques dans de nombreux types de cellules immunitaires, notamment dans les lymphocytes T CD4⁺ (Frericks, Meissner et Esser 2007). En outre, l'observation de tels niveaux d'expressions dans les cellules immunitaires suggère que le AhR jouerait un rôle dans l'immunité (N. Collins et al. 2016 ; Carambia et Herkel 2010). En effet, on peut observer des expressions variables du AhR au sein même des différentes sous populations de lymphocytes T CD4⁺. Il a été montré que les cellules Th17, Th22 et Treg expriment fortement le AhR, alors que les cellules Th1 ou Th2 n'ont pas ou peu d'expression (Stockinger et al. 2014 ; Hanieh 2014). Nous avons pu valider ces résultats en étudiant l'expression du AhR dans les cellules Th1, Th2, Th17, Th22 et Treg (**Annexe 1**). Enfin, la présence de séquences XRE et DRE dans les régions promotrices de gènes régulant la réponse immunitaire soutient l'importance de ce récepteur dans les différents processus immunologiques (Sun et al. 2004).

Dans notre étude, nous avons montré que la différenciation des cellules T CD4⁺ peut être modulée chez des pompiers exposés à des polluants environnementaux. Ce qui corrèle avec plusieurs études chez la souris ayant démontré que l'exposition à des ligands du AhR module la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ (Boule, Winans et Lawrence 2014 ; Quintana et al. 2008). En particulier, nos résultats montrent chez notre cohorte de pompiers une augmentation du nombre de cellules Th17, Th22 et Treg par rapport au groupe témoin. En outre, ces cellules sont les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ exprimant le plus fortement le AhR. En revanche, nous n'avons pas observé de modulation du nombre de cellules Th1 et Th2, exprimant peu ou pas le AhR. Il faut noter qu'aucune étude n'a encore montré que la présence ou l'activation du AhR pouvait inhiber ou non la différenciation des cellules Th1 et Th2.

Les cellules Th17 et Treg contribuent grande au maintien de l'homéostasie immunitaire (Eisenstein et Williams 2009). D'un point de vue pathologique, les cellules Th17 contribuent fortement au développement des maladies auto-immunes (Tabarkiewicz et al. 2015), alors que les cellules Treg favorisent la progression tumorale (Chaudhary et Elkord 2016). Plusieurs études ont montré qu'il existait un équilibre entre les cellules Th17 et Treg permettant d'éviter le développement de pathologies auto-immunes ou de cancers (G. R. Lee 2018), pathologies que les pompiers peuvent développer au cours de leur carrière (Soteriades et al. 2019). Nous avons donc souhaité évaluer la corrélation de ces deux sous populations entre nos deux groupes de pompiers, ayant moins de 10 ans et plus de 20 ans d'expérience. Nous avons observé une corrélation positive entre les Treg et les Th17 chez les pompiers avec moins de 10 ans d'expérience. En revanche, cette corrélation n'était plus présente chez les pompiers avec plus de 20 ans d'expérience qui avaient une plus forte augmentation des cellules Th17 par rapport aux Treg. Ce débordement cellulaire peut favoriser le développement de maladies auto-immunes (G. R. Lee 2018).

La différenciation des cellules T CD4⁺ nécessite la présence de cytokines spécifiques (Luckheeram et al. 2012). Dans plusieurs pathologies inflammatoires auto-immunes, comme le psoriasis, on retrouve un environnement riche en IL-21 et IL-23 permettant de maintenir la prolifération des cellules Th17 (Fitch et al. 2007 ; Y. Wang et al. 2016). À l'inverse, dans plusieurs cas de cancer, comme par exemple le cancer du pancréas, on peut retrouver une forte production de TGF-β favorisant la conversion des cellules T CD4⁺ en cellules Treg (Moo-Young et al. 2009). De ce fait, la composition du microenvironnement riche en cytokines favorisant la différenciation des cellules Th17 et Treg pourrait expliquer la prévalence des pompiers à développer ce type de pathologies. C'est pourquoi nous avons étudié la composition en cytokines retrouvée dans les

sérum de nos pompiers. Nos résultats ont montré qu'une plus grande quantité de cytokines favorisant la différenciation des cellules Th17 et Treg, comme l'IL-2, l'IL-21, l'IL-23 et le TGF- β , est retrouvée dans les sérum de pompiers en comparaison au groupe témoin. En revanche, on n'observe aucune différence significative entre les niveaux de cytokines retrouvés chez les pompiers avec moins de 10 ans et plus de 20 ans d'expérience. Le débordement entre les cellules Th17 et Treg observé précédemment ne semble pas être expliqué par des niveaux croissants de cytokines chez les pompiers. Néanmoins, la capacité du AhR à induire l'expression de cytokines, telles que l'IL-2, l'IL-21, l'IL-23 et TGF- β reste encore peu étudié. Cependant, une étude a montré que les habitants particulièrement touchés par une exposition aux xénobiotiques durant la guerre du Vietnam présentaient une augmentation des niveaux de dioxine, ainsi qu'une augmentation d'expression du AhR et des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-22 (C. H. Nguyen et al. 2017).

D'autre part, il a été démontré que le AhR peut agir sur la différenciation des cellules Th17 et Treg en agissant dans la cascade d'activation de ces cellules. Par exemple, il a été montré dans un modèle de cellules épithéliales prostatiques humaines BPH-1 que l'expression de TGF- β diminuait l'expression et la translocation au noyau du AhR (Starsichova et al. 2012). De plus, une étude récente a montré dans des cellules embryonnaires humaines (911) que le TGF- β était capable de dissocier le complexe AhR-ARNT, inhibant ainsi l'expression de gènes métabolisant les xénobiotiques, comme CYP1A1 (Nakano et al. 2020). En revanche, on observe une diminution d'expression du TGF- β après l'activation du AhR dans des cellules du cancer du cerveau *Sonic hedgehog* (SHH) (Saric et al. 2020). Le lien entre l'expression de TGF- β et AhR reste encore incompris et semble beaucoup dépendre du type cellulaire. Pour d'autres cytokines, comme l'IL-1 β qui intervient dans la différenciation des cellules Th17, il a été montré que l'exposition, dose dépendante, au TCDD stimulait l'expression du gène de l'IL-1 β et une augmentation des taux de la pro-IL-1 β dans des kératinocytes différenciés humains (Henley et al. 2004). Cependant, dans nos résultats, les niveaux d'IL-1 β étaient similaires entre les groupes témoins et les pompiers, suggérant que dans notre étude l'exposition aux xénobiotiques n'avait pas d'effet sur l'expression de l'IL-1 β .

Ainsi, afin d'identifier le lien entre l'activation du AhR et la différenciation des lymphocytes T CD4, nous avons mesuré les niveaux de ligands du AhR retrouvés dans les sérum de pompier. La plupart des ligands exogènes du AhR sont des composés hydrophobes, comme le TCDD et le BAP, alors que les ligands endogènes ont des caractéristiques plutôt hydrophiles, comme la kynurenine et la bilirubine, nous permettant facilement d'identifier la prévalence de ces deux groupes de ligands dans les sérum (Larsson et al. 2018 ; Heath-Pagliuso et al. 1998). Nous

avons ainsi démontré que les pompiers avaient dans leurs sérum une augmentation de la quantité de ligands du AhR par rapport au groupe témoin. De plus, après avoir purifié les ligands exogènes du AhR à l'aide d'une colonne hydrophobe, nous observons également une augmentation de l'activation du AhR chez les pompiers. En revanche, contrairement à quoi nous aurions pu nous attendre, il n'y a pas de différence de niveaux d'activation du AhR par les ligands entre nos pompiers avec moins de 10 ans et plus de 20 ans d'expérience. Nous savons que les temps de demi-vie des ligands du AhR dans l'organisme sont extrêmement variables et d'autant plus entre les espèces. Par exemple, le TCDD a un temps de demi-vie chez la souris d'environ 15 jours contre plus de 2500 jours chez l'homme (Miniero et al. 2001). D'autres hydrocarbures halogénés comme les PCB peuvent avoir des temps de demi-vie supérieurs à 10 ans (Ritter et al. 2011). En revanche, la plupart des hydrocarbures polycycliques, comme le BaP, sont éliminés rapidement chez l'humain. En effet, on retrouve généralement un temps de demi-vie pour le BaP d'environ 48 h dans l'organisme (Madeen et al. 2015). Durant cette étude nous n'avons pas pu répertorier la date de la dernière intervention réalisée par les pompiers. Cette information nous aurait permis d'évaluer si les ligands retrouvés dans le sérum sont des ligands avec une demi-vie courte comme le BaP ou bien avec une demi-vie longue comme le TCDD.

Dans cette étude nous nous sommes concentrés sur la différenciation des cellules T CD4⁺ en réponse à une activation du AhR. En effet, il a été démontré que des ligands du AhR comme le FICZ et le TCDD pouvaient moduler la différenciation des cellules T chez la souris (Duarte et al. 2013). C'est pourquoi nous avons également traité *in vitro* des cellules T CD4⁺ humaines avec du BaP, de la kynurenine et de l'indirubine, des ligands du AhR, afin d'observer leurs effets sur la différenciation de ces cellules (Tajima et al. 2020 ; J. D. Mezrich et al. 2010 ; Y. H. Lin et al. 2019). Nos résultats ont montré que le traitement des cellules T CD4⁺ avec du BaP permettait de favoriser leur différenciation vers le phénotype Treg, alors que le traitement avec la kynurenine favorisait le phénotype Th17. Ces résultats indiquent que comme chez la souris, la nature du ligand du AhR permet de moduler différemment la différenciation des cellules T CD4. Mais, une autre explication a été suggérée par l'équipe du Pr Kerkvliet pour expliquer la variabilité des effets pro et anti-inflammatoires des ligands du AhR. En effet, leurs résultats montrent que l'exposition à des ligands de courte durée de vie, comme le FICZ, induit une différenciation vers le phénotype pro inflammatoire Th17, alors que les ligands avec une durée de vie plus longue, comme le TCDD, favorisent la différenciation du phénotype anti-inflammatoire Treg (Ehrlich et al. 2018). En revanche l'administration de FICZ à une dose permettant d'obtenir une expression de Cyp1a1 équivalente au TCDD a également permis de différencier les cellules T CD4⁺ vers le phénotype Treg (Ehrlich et al. 2018). La durée d'exposition des ligands peut donc également influencer l'effet de l'activation du AhR sur la différenciation des cellules T CD4⁺.

D'autre part, afin de mieux comprendre l'implication du AhR dans le processus de différenciation des cellules T CD4⁺, il serait idéal de réaliser une étude mécanistique sur les voies d'activation qui participent à la différenciation des cellules T CD4⁺ en présence de ligands du AhR. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la présence de cytokines dans le microenvironnement permet la mise en place d'une cascade d'activation, faisant intervenir des facteurs de transcription et des protéines STAT spécifiques à la différenciation de chaque sous-population de cellules T CD4⁺ (Zhu, Yamane et Paul 2010). Il a été montré dans plusieurs études chez des modèles murins que l'action du AhR dans la différenciation des cellules T CD4⁺ passait notamment par une interaction avec les protéines STAT (Duarte et al. 2013). Par exemple, la culture de cellules T CD4⁺ en présence de FICZ augmente la phosphorylation de STAT3, un facteur de transcription permettant la différenciation vers le phénotype Th17 (Duarte et al. 2013). De plus, ils démontrent également que les naphthoflavone, des ligands synthétiques du AhR dérivés du flavone, augmentent la phosphorylation de STAT5, le facteur de transcription participant à la différenciation des cellules Treg (X. Liu et al. 2017). En outre, il a été montré que le AhR pouvait se lier directement aux protéines STAT1 et STAT5 pour moduler leur expression (Kimura et al. 2008). En effet, on observe une régulation à la baisse de ces protéines, permettant de favoriser la différenciation des cellules Th17 en inhibant le phénotype Th1 (Kimura et al. 2008). Enfin, une activation du AhR par le BaP permet à celui-ci de moduler l'expression de SOCS3, un régulateur des protéines STAT retrouvé dans le contrôle de la réponse inflammatoire (Tsai et al. 2020). D'autre part, il a été montré que l'activation du AhR en présence de TCDD permet d'augmenter l'expression d'ARNm du TGF-β dans les cellules T CD4⁺ (Stevens, Mezrich et Bradfield 2009). Ainsi, l'étude des états de phosphorylation des protéines STAT, participant à la différenciation des cellules T CD4⁺, ainsi que la synthèse d'ARNm et les niveaux protéiques des facteurs de transcription permettrait de mieux comprendre le rôle des ligands du AhR dans cette différenciation et pourrait expliquer certains de nos résultats.

Pour étudier cela, nous souhaitons mettre en place une lignée cellulaire exprimant le AhR. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la plupart des études réalisées sur les mécanismes du AhR dans la différenciation des cellules T CD4⁺ a été réalisé chez la souris. Cependant, il existe des différences entre les sous-populations T CD4⁺ humaines ou murines. Par exemple, on retrouve une expression de RORyt dans la différenciation des cellules Th17 humaines, ce qui n'est pas le cas chez la souris (Mestas et Hughes 2004). On retrouve également des différences dans les cytokines produites, par exemple l'IL-10 est produite uniquement par les cellules Th2 chez la souris, alors que chez l'humain les cellules Th1 peuvent également produire cette cytokine (Mestas et Hughes 2004). Il est donc indispensable d'étudier ces mécanismes dans des cellules humaines. Pour ce faire, plusieurs méthodes peuvent être envisagées. Par

exemple, utiliser des cellules T CD4⁺ humaines purifiées du sang périphérique, cependant il existe une trop grande variabilité entre les individus qui ne nous permettrait pas d'obtenir des résultats suffisamment reproductibles. C'est pourquoi nous pourrions utiliser une lignée de lymphocytes T CD4, comme les cellules Jurkat. Cette lignée cellulaire est souvent utilisée pour étudier les voies d'activation dans les lymphocytes T CD4⁺ et est très bien connue au sein de notre laboratoire (Gillis, Scheid et Watson 1980 ; Ito et al. 2004). Néanmoins, plusieurs études ont rapporté que l'utilisation de cellules Jurkat pour étudier les mécanismes de différenciation des cellules T CD4⁺ présente plusieurs obstacles. En effet, les cellules Jurkat sont issues d'une leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T causée par un défaut de maturation de ces cellules (Weiss, Wiskocil et Stobo 1984). Ce défaut de maturation serait en partie imputé à une mutation de TAL1, un régulateur de l'hématopoïèse (Palii et al. 2011). Néanmoins, une étude a montré que l'expression ectopique de miR-146a permettait de rétablir partiellement l'activation des cellules Jurkat (Saki et al. 2014). Aussi, une étude a démontré qu'il était possible d'induire une différenciation des cellules Jurkat vers un phénotype Treg par un traitement au calcitriol, la forme active de la vitamine D (Q. Zhou et al. 2017). D'autre part, ces lignées cellulaires sont issues de cellules T CD4⁺ peu différenciées, comme les cellules T CD4⁺ naïves où on ne retrouve pas ou peu d'expression du AhR (Hayashi et al. 1995 ; Rohlman et al. 2012 ; Gasch et al. 2014). Il a été montré que la durée nécessaire au conditionnement des cellules T CD4⁺ pour leur différenciation est bien souvent de 5 à 7 jours. C'est pourquoi une expression stable du AhR plutôt que transitoire constituerait un plus grand avantage dans cette étude. Dans notre laboratoire nous avons donc commencé à générer une lignée stable de cellules Jurkat exprimant AhR à l'aide d'une construction lentivirale. Cependant, nous n'avons à ce jour aucun clone utilisable pour de futures expériences.

Ainsi, nous avons démontré que les pompiers présentaient une plus grande quantité de ligands exogènes du AhR ainsi qu'une plus forte expression en Th17 et Treg. Celle-ci pouvant démontrer une corrélation entre le rôle du Ahr et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ dans un contexte occupationnel. Comme nous l'avons vu précédemment, une exposition aux ligands exogènes du AhR peut avoir une multitude d'effets néfastes sur l'organisme, qu'il s'agisse d'effet propre à leur nature moléculaire ou à leurs capacités à moduler l'immunité. D'un autre côté, différentes études ont démontré chez des souris que l'absence d'expression du AhR conduit au développement de nombreuses anomalies développementales et fonctionnelles (J. V. Schmidt et al. 1996 ; Lahvis et al. 2000). Les chercheurs ont conclu à partir de ces résultats que la suppression d'activation du AhR par un ou plusieurs ligands endogènes du AhR pouvait expliquer les altérations fonctionnelles observées chez les souris *knock-out* AhR. Récemment, plusieurs études ont démontré l'existence de ligands endogènes du AhR, mais l'identité de la majorité de

ces composés ainsi que leurs rôles spécifiques et conséquences physiologiques dans l'activation du AhR reste à confirmer (Denison et Nagy 2003 ; Oberg et al. 2005 ; Lamas, Natividad et Sokol 2018).

Chez les grands brûlés, nous pouvons retrouver un état pathologique propice à la production de ligands endogènes. En effet, les brûlures sévères engendrent la destruction des tissus entraînant une importante libération de molécules dans l'organisme générant des réponses immunologiques aberrantes (Kravitz 1993). On retrouve chez les grands brûlés une réponse immunitaire en deux phases : dans un premier temps une phase pro-inflammatoire pendant les 7 à 10 premiers jours et puis une phase anti-inflammatoire qui peut durer jusqu'à deux semaines, voire plus dans certains cas (O'Sullivan et O'Connor 1997 ; Mannick, Rodrick et Lederer 2001). Plusieurs études, chez les grands brûlés, ont observé des modifications chez les populations de cellules Th1 et Th2 (Alexander, Chaudry et Schwacha 2002 ; Duan et al. 2008 ; Pileri et al. 2008). En effet, on retrouve dans les premiers jours suivant la brûlure une forte production de cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-1, TNF- α , IL-18, IL-6, IL-8 et IL-12 (F. L. Yeh et al. 1999 ; Y. Yamada, Endo et Inada 1996 ; Orman et al. 2011). Il a aussi été observé une dérégulation métabolique conduisant à une production protéique aberrante (Jeschke 2016). Certaines de ces protéines sont issues de l'hypercatabolisme et peuvent être des ligands endogènes du AhR. C'est notamment le cas de la bilirubine provenant de l'hémolyse (L. P. Nguyen et Bradfield 2008 ; Bock 2011). En effet, lors d'une brûlure sévère on observe chez les patients la présence d'une hémolyse intravasculaire, augmentant le taux sérique de bilirubine suite au catabolisme de l'hème de l'hémoglobine (C. Lawrence et Atac 1992 ; M. Kaplan, Bromiker et Hammerman 2014). Cette production de ligands endogènes du AhR pourrait donc avoir un impact sur la régulation des cellules T CD4 $^{+}$ chez les grands brûlés. De plus, la brûlure s'accompagne la plupart du temps par une exposition à des xénobiotiques, tels que les HAP et HAH. Ces ligands exogènes du AhR peuvent également jouer un rôle dans la modulation des cellules T CD4 $^{+}$ comme nous l'avons démontré chez les pompiers.

Dans notre laboratoire, nous avons également réalisé une étude préliminaire sur des patients grands brûlés afin de déterminer si l'activation du AhR, par des ligands endogènes ou exogènes, peut également jouer un rôle dans la différenciation des lymphocytes T CD4 $^{+}$. Notre cohorte ne comprenait que 8 patients c'est pourquoi nous n'avons pas inclus ces résultats dans l'article traitant des pompiers (Ricaud et al. 2020).

Nos premiers résultats ont montré que l'on retrouvait une augmentation de l'activation du AhR par les ligands retrouvés dans les sérum des grands brûlés par rapport aux sérum de pompiers et des témoins (**Annexe 2**). D'autre part, nous avons montré que la quantité de ligands

exogènes du AhR, séparé à l'aide d'une colonne hydrophobe, était plus basse chez les patients grands brûlés que chez les pompiers. Ainsi, l'activation du AhR chez les grands brûlés serait majoritairement due à des ligands endogènes produits suite aux brûlures et non à l'exposition à des ligands exogènes, suggérant que la modulation du système immunitaire chez les grands brûlés se ferait par les ligands endogènes du AhR contrairement aux pompiers. D'autre part, nous avons souhaité évaluer les différents sous-types de populations immunitaires sur des biopsies de peau de grands brûlés. Cependant, une mauvaise conservation des tissus ne nous a pas permis d'avoir de résultats concluants. Afin de mieux comprendre le rôle des ligands endogène du AhR sur la modulation du système immunitaire, une nouvelle étude devrait être menée sur une plus grande cohorte de patients grands brûlés incluant une prise de sang tous les 2 à 3 jours durant 14 jours post-brûlure. L'évolution des populations de cellules T CD4⁺ et la production de cytokines pro et anti-inflammatoires dans le serum des patients pourront être analysées par cytométrie en flux comme notre étude sur les pompiers.

Partie 2 : La différenciation des lymphocytes T CD4+ joue un rôle dans l'immunomodulation de l'endomètre chez des femmes en échecs répétés d'implantation.

Durant la deuxième partie de ce doctorat, nous avons réalisé un partenariat avec la clinique de fertilité Fertilys pour étudier le rôle de la différenciation des cellules T CD4⁺ dans l'immunomodulation de l'endomètre dans les échecs répétés d'implantation. L'implantation de l'embryon est considérée comme une étape clé de la réussite de la grossesse (Sharma et Kumar 2012). C'est un processus nécessitant une synchronisation développementale impliquant l'interaction du blastocyste éclos avec l'endomètre (Teh, McBain et Rogers 2016). D'un point de vue clinique, l'implantation de l'embryon est considérée comme réussie quand le sac gestationnel est détecté par échographie et que l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) est détectable dans le sang (Richardson et al. 2015). En revanche, l'embryon est défini comme étant en échec d'implantation quand : i) la production de hCG n'est jamais détectée ou ii) la production de hCG est détectable, mais la formation du sac gestationnel n'est pas visible par échographie (Coughlan et al. 2014). D'autre part, il est difficile de classer l'échec d'implantation comme un événement pathologique. En effet, pour des femmes fertiles et en bonne santé, une grossesse spontanée ne réussit que dans 20 à 40 % des cas au premier essai (Jones et al. 2010).

Plusieurs facteurs contribuent à un échec d'implantation : tels que des anomalies génétiques ou métaboliques de l'embryon et la baisse de la réceptivité de l'endomètre (Viotti 2020 ; Menezo, Lichtblau et Elder 2013). Pour favoriser la réussite des traitements, comme les fécondations *in vitro*, plusieurs méthodes ont été développées ; par exemple des tests génétiques et morphologiques, afin de sélectionner les embryons présentant les plus grandes chances de réussites (Xu et al. 2016). En revanche, les causes amenant à une baisse de réceptivité de l'endomètre restent dans certains cas inexpliquées (Bashiri, Halper et Orvieto 2018). Les troubles immunitaires ont été proposés comme pouvant être une cause expliquant la baisse de cette réceptivité (Franasiak et Scott 2017). En effet, l'implantation embryonnaire et le maintien du développement foetal nécessitent un réarrangement de l'immunité maternel (C. G. Walker et al. 2010). Durant cette période, les cellules immunitaires doivent rester actives pour veiller à la défense de l'embryon sans induire de réponse immunologique envers celui-ci (Gobert et Lafaille 2012 ; Ander, Diamond et Coyne 2019). Il a notamment été montré que la grossesse s'accompagne par un changement d'état des cellules T CD4, d'un phénotype Th1 vers le phénotype Th2 (Wegmann et al. 1993). En effet, une prédominance du phénotype Th1 est souvent observée chez les femmes ayant eu des fausses couches récurrentes (Raghupathy 1997). Cependant, on ignore encore si le défaut de différenciation des cellules T CD4⁺ vers le phénotype Th2 au début de la grossesse représente le problème principal ou bien s'il s'agit d'un effet secondaire qui est le résultat d'autres facteurs inexpliqués.

À ce jour, la modulation de l'immunité afin de créer un environnement favorable à l'implantation est au cœur de la recherche en procréation assistée. En effet, il a été montré dans plusieurs études que l'utilisation de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), injectées dans la cavité utérine, permettait d'augmenter les taux de grossesses cliniques chez des femmes en échec répété d'implantation (ERI) (Makrigiannakis et al. 2015 ; S. Li et al. 2017 ; Yu et al. 2016). Les PBMC sont constituées de plusieurs types cellulaires, comme les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules NK et les monocytes. En outre, les lymphocytes T CD4⁺ représentent près de 45 à 55 % des PBMC, ils sont donc très majoritaires (Kleiveland 2015). Comme nous l'avons vu précédemment, la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ vers un phénotype Th1 ou Th2 semble être un des paramètres responsable de la réussite ou l'échec de l'implantation de l'embryon (Wegmann et al. 1993 ; Ng et al. 2002).

C'est pourquoi l'objectif principal de ce second projet de recherche était d'étudier le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans l'immunomodulation de l'endomètre des femmes en échec répété d'implantation embryonnaire. Pour cela, nous avons constitué une cohorte de patientes ayant eu recourt à la procréation assistée à la clinique Fertilys. Cette cohorte comptabilise 147 patientes,

réparties en trois groupes : i) un groupe ayant eu recourt à l'insémination (IUI), ii) un groupe ayant eu recourt à la fécondation *in vitro* avec moins de 3 échecs successifs de transferts d'embryons (FIV) et iii) un groupe avec trois échecs successifs ou plus de transfert d'embryons, correspondant au groupe d'échec d'implantation répété (ERI). En raison des nombreux résultats démontrant l'effet positif d'une immunomodulation de l'endomètre chez des femmes en ERI, toutes les femmes en échecs répétés d'implantation de l'endomètre ont reçu le traitement. En revanche, nos groupes IUI et FIV ont été traités avec les PBMC ou un placebo.

Dans un premier temps, nous avons regardé si l'immunomodulation de l'endomètre pouvait également augmenter les taux d'implantation et de grossesse clinique chez des femmes considérées comme n'étant pas en échecs répétés d'implantation. Nos résultats ont montré que le traitement n'avait pas d'effet sur les patientes des groupes IUI et FIV. Cela supporte l'étude réalisée par Li et ses collaborateurs, où l'immunomodulation de l'endomètre semble être efficace seulement chez les femmes en ERI (S. Li et al. 2017). Un état immunitaire particulier chez des patientes ERI pourrait expliquer ce résultat. En effet, des études menées sur les cytokines retrouvées dans les sérum de femmes ayant des antécédents d'échecs d'implantation ont montré que ces patientes présentent des ratios de cytokines IFN- γ /IL-4 et TNF- α /IL-4 supérieurs par rapport aux femmes ayant eu une réussite de FIV. Ces résultats indiquent qu'il pourrait avoir débalancement en faveur des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 (Kalu et al. 2008 ; Liang et al. 2015). Pour répondre à cette hypothèse, nous avons étudié les différentes sous populations de cellules T CD4 $^{+}$ dans la circulation sanguine de nos différentes patientes avant traitement. Les résultats présentés dans le second article montrent que les femmes ERI possèdent moins de cellules Th2 et Treg dans leur circulation sanguine que les deux autres groupes IUI et FIV. En revanche, les populations de cellules Th1 et Th17 sont identiques entre nos trois groupes. On observe donc uniquement un déséquilibre entre les populations de cellules T CD4 $^{+}$ anti-inflammatoire et pro-inflammatoire chez les patientes ERI. Ces résultats concordent avec le débalancement des cytokines pro- et anti-inflammatoires observé chez les femmes ERI dans l'étude réalisée par Kalu et ses collaborateurs (Kalu et al. 2008). Il faut savoir que pour maintenir l'implantation et le développement de l'embryon, un environnement anti-inflammatoire est nécessaire (Granot, Gnainsky et Dekel 2012), celui-ci médié, entre autres, par les cellules Th2 et Treg (Krasnow et al. 1996 ; Robertson, Care et Moldenhauer 2018). Ainsi, nos résultats suggèrent que le débalancement immunitaire en faveur d'un environnement pro-inflammatoire chez les ERI jouerait un rôle dans l'échec d'implantation. Considérant ces résultats et dans le but de mieux adapté leur protocole, la clinique de fertilité Fertilys envisage la mise au point d'un modèle prédictif pour déterminer quelles patientes seraient plus à risque d'être associé au groupe d'échecs d'implantation. Ainsi, en se basant sur les résultats des sous-types de cellules T CD4 $^{+}$ réalisés

dans notre laboratoire, ainsi que les informations recueillies auprès des patientes (âge, nombre de FIV réalisé, traitements...), la clinique Fertilys pourrait proposer le traitement le mieux adapté pour la réussite de la FIV à chaque patiente.

Dans le procédé d'immunomodulation par utilisation de PBMC nous considérons que les cellules immunitaires vont secréter un ensemble de cytokines et autres molécules pour augmenter la réceptivité de l'endomètre en créant un environnement favorable à l'implantation. Nous avons donc cherché à savoir si la méthode de stimulation des PBMCs pourrait impacter la production de cytokines pouvant par conséquent jouer un rôle dans l'immunomodulation de l'endomètre. Il faut savoir qu'il existe une variabilité dans les méthodes d'utilisation des PBMC dans l'immunomodulation chez des femmes en échecs répétés d'implantation (S. Li et al. 2017 ; Madkour et al. 2016 ; Makrigiannakis et al. 2015 ; Yoshioka et al. 2006a ; Yu et al. 2016). Par exemple, le protocole de l'équipe du Pr Fujiwara utilise 3×10^7 cellules de PBMC cultivées uniquement en milieu de culture supplémenté avec du sérum humain (Okitsu et al. 2011). Une autre étude a montré que les PBMC traités avec l'hCG augmentaient le potentiel d'implantation des embryons (Nakayama et al. 2002a). À la suite de cette publication, des études, comme celles des équipes des Pr Feng, Pr Fujii et Pr Yeng, ont cultivé des PBMC en présence d'hCG avant de les injecter dans la cavité utérine. Dans ces études, la quantité de PBMC utilisée est de l'ordre de 1 à 2×10^7 cellules (S. Li et al. 2017 ; Nakayama et al. 2002a ; Yu et al. 2016). Les résultats de ces études ont montré que la culture de PBMC présence ou absence d'hCG permettaient d'augmenter le taux d'implantation de façon similaire. Dans notre étude, le protocole de stimulation utilise 1×10^6 cellules, un nombre bien inférieur aux études citées précédemment (Nakayama et al. 2002a ; S. Li et al. 2017). Deuxièmement, les cellules PBMC ont été stimulées avec de la phytohémagglutinine (PHA), une lectine présente chez les plantes, en plus de la hCG, permettant d'obtenir une meilleure activation des cellules T CD4. La PHA est particulièrement utilisée dans des traitements contre les virus, pour stimuler l'activation des cellules T CD4⁺ (Pfleger et al. 1978). Nos résultats montrent que les cellules T CD4⁺ stimulées avec de la PHA en plus de l'hCG produisent une quantité de cytokines significativement plus importante que les cellules stimulées uniquement avec l'hCG. De plus, les cellules T CD4⁺ traitées par hCG et PHA sont différencier préférentiellement vers les phénotypes Th2 et Treg, associés à une réponse anti-inflammatoire. En outre, ce traitement n'a pas d'effet sur la population de cellules Th1 qui reste identique avant et après le traitement. Comme expliqué précédemment, l'implantation embryonnaire nécessite la présence d'une réponse pro-inflammatoire dans les premiers temps de l'implantation et une réponse anti-inflammatoire pour maintenir celle-ci (Saito, Miyazaki et Sasaki 2006). En effet, un débordement immunitaire peut conduire à l'échec de l'implantation (Sykes et al. 2012). La diminution de cellules Treg a notamment été suggérée comme cause

pouvant expliquer cet état pathologique (Lashley et al. 2015 ; Robertson, Care et Moldenhauer 2018). Nos résultats ont montré que les femmes en ERI ont une diminution des cellules anti-inflammatoire Th2 et Treg avant traitement. Ainsi, le traitement PHA/hCG des cellules PBMC permet de favoriser la différenciation de ces cellules vers un phénotype anti-inflammatoire. De plus, l'analyse des sous populations de lymphocytes T CD4⁺ après traitement PHA/hCG a montré que les pourcentages de cellules Treg chez les femmes en ERI étaient devenus identiques aux groupes FIV et IUI. En revanche, on observe toujours chez les femmes en ERI un pourcentage de cellules Th2 statistiquement inférieur aux groupes FIV et IUI après traitement des cellules. Ainsi, il semblerait que les cellules Th2 des patientes ERI répondent moins bien au traitement PHA/hCG. Notamment, certaines études ont montré qu'une prédominance Th1 était retrouvée dans les échecs répétés d'implantation (Kalu et al. 2008 ; Franasiak et Scott 2017). Le traitement hCG/PHA utilisé dans notre protocole d'immunomodulation permet de favoriser la différenciation des cellules Th2 et Treg. Mais le fait que les cellules Th2 des patientes ERI ne se différencient pas aussi bien que les autres patientes suggèrent qu'un protocole de stimulation en présence d'IL-4 permettrait de favoriser leur différenciation (L. Chen et al. 2004).

Lors de cette étude, nous avons étudié principalement le rôle que peuvent jouer les lymphocytes T CD4⁺ dans l'immunomodulation de l'endomètre. Il est certain que ces cellules sont connues pour jouer un rôle majeur dans le contrôle de la réponse immunitaire (Luckheeram et al. 2012). Dans le cas des grossesses, un phénotype Th2 est d'ailleurs souvent associé à la réussite de celle-ci, montrant ainsi l'importance de la modulation de la réponse des lymphocytes T CD4⁺ (Krasnow et al. 1996). Mais d'autres types cellulaires peuvent également jouer un rôle dans le façonnement de l'environnement immunitaire de l'endomètre pouvant favoriser l'implantation de l'embryon. En effet, dans l'environnement utérin les cellules NK composent près de 60 % des cellules immunitaires présentes (Hanna et al. 2006). Les macrophages quant à eux représentent 20 à 30 % des leucocytes de la décidue (X. Jiang et al. 2018). Plusieurs laboratoires se sont intéressés à la production, par les macrophages, de *leukemia inhibitory factor* et d'IL-1 β , des molécules favorisant l'implantation de l'embryon (Jasper et al. 2011 ; Winship et al. 2015). Ainsi, cette étude aurait pu être complétée par l'exploration de l'effet du traitement sur les cellules NK et les macrophages dérivés des monocytes. Ces deux types cellulaires (cellules NK et monocytes) représentent respectivement 5 à 10 % et 10 à 20 % des PBMC et sont donc également impactés par le traitement PHA/hCG fait sur les cellules pour l'immunomodulation. En effet, il a été montré que la PHA augmentait la proportion des cellules NK (Sheikhi et al. 2011). Bien que ces cellules soient minoritaires par rapport aux cellules T CD4, leurs effets potentiels ne sont pas à négliger.

D'autre part, les premières études sur l'immunomodulation de l'endomètre ont été initiées suite aux résultats obtenus par l'équipe du Pr Nakayama. En effet, leurs résultats ont montré que la co-culture d'embryons murins et de PBMC stimule la capacité invasive de l'embryon (Nakayama et al. 2002a). À la suite de ces résultats, des études menées sur des cellules JAR, une lignée placentaire humaine dérivée d'un choriocarcinome, ont également montré une augmentation de la capacité invasive de ces cellules après la co-culture avec des cellules PBMC (Yu et al. 2015). De plus, les cellules JAR traitées avec le milieu de culture des PBMC permet d'augmenter l'expression des métalloprotéinases MMP2 et MMP9 intervenant dans la capacité invasive des cellules trophoblastes (Yu et al. 2015). Le traitement au surnageant de PBMC diminue également l'expression des inhibiteurs de métalloprotéinases TIMP1 et TIMP2 (Yu et al. 2015). Pris ensemble, ces résultats suggèrent fortement que l'immunomodulation de l'endomètre pourrait agir sur la fonction invasive des cellules trophoblastes en augmentant l'expression de molécules contribuant au processus d'implantation. Dans notre laboratoire nous avons utilisé des cellules HIPEC, une lignée de cytotrophoblastes extravilleux immortalisés (Pavan et al. 2003). Nous avons cultivé ces cellules en présence de hCG, de surnageants de PBMC ou en co-culture avec des PBMC. Nous avons ensuite mesuré par xCELLigence la prolifération des cellules. Nos premiers résultats ont montré que la prolifération des cellules HIPEC, cultivées en présence des surnageants et des PBMC, est augmentée par rapport aux cellules témoins (**Annexe 3**). En outre, le surnageant de PBMC semble maintenir une prolifération plus importante entre 24 h et 48 h de traitement. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats et permettre d'étudier l'action de ces traitements sur les mécanismes responsables de la capacité invasive des trophoblastes, notamment l'expression des métalloprotéinases MMP2 et MMP9. À terme, un protocole de culture d'embryon dans un milieu composé d'un cocktail de cytokines spécifiques pourrait être envisagé comme co-traitement à l'immunomodulation de l'endomètre.

Pour conclure, le traitement par les PBMC s'est révélé efficace chez des femmes qui présentent une baisse de la réceptivité de l'endomètre. En revanche, nous ignorons précisément quels seront les effets de l'immunomodulation de l'endomètre sur l'embryon. En effet, des études ont montré que des quantités élevées d'IL-3, d'IL-4 et de TGF- α favorisait le processus d'implantation alors que l'augmentation de l'IL-2 ou de TNF α conduisait à la perte précoce de l'embryon (Tezabwala, Johnson et Rees 1989 ; Athanassakis et al. 1987). Le contrôle des sous-types différenciés dans notre protocole d'immunomodulation représente donc un nouveau défi. Nous utilisons à ce jour une différenciation généralisée des PBMC. Cependant, plusieurs équipes utilisant les lymphocytes T CD4, comme outil de thérapie cellulaire, ont développé des méthodes de sélection et de différenciation des cellules T CD4. En effet, dans le traitement de certaines maladies auto-immunes, les lymphocytes T régulateurs naturels sont purifiés en se basant sur la

présence ou l'absence de marqueurs spécifiques à leur surface ($CD4^+CD25^+CD127^-$) (Boursier, Siri et de Boysson 2012). Par exemple, ce type de sélection est déjà utilisé pour le traitement de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique (Brun et al. 2009). L'utilisation d'un milieu de culture conditionné favorisant la différenciation d'un sous-type de cellules T $CD4^+$ spécifique semble être la prochaine étape dans le développement de protocole pour la procréation assistée.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ est un processus majeur dans la réponse immunitaire adaptative. En effet, les cellules T CD4⁺ différencierées peuvent, par l'ensemble de leurs cytokines, promouvoir une réponse inflammatoire, permettant entre autres de combattre efficacement les pathogènes ayant pénétré dans l'organisme, ou contrôler la réponse immunitaire, évitant ainsi les dommages tissulaires (Spellberg et Edwards 2001 ; Lei et al. 2015). Ces réactions anti- et pro-inflammatoires reposent sur un fragile équilibre entre ces cellules immunitaires, mais permettent également de maintenir l'homéostasie (Stockinger, Bourgeois et Kassiotis 2006).

Les troubles de l'immunité sont responsables du développement d'un grand nombre de pathologies, comme les allergies, l'asthme ou les maladies auto-immunes. En effet, on retrouve dans les allergies et l'asthme une implication des cytokines issues des cellules Th2 dans le développement de ces pathologies (P. J. Barnes 2001 ; Georas et al. 2005). D'autre part, les cellules T CD4⁺ peuvent également favoriser le développement de pathologies, comme les cancers, sans pour autant en être la cause (Verma et al. 2019). En effet, on retrouve dans ces pathologies une production des cytokines, comme le TGF-β par les cellules tumorales, favorisant la différenciation des cellules T régulatrices qui inhibera l'action des cellules T CD8 (Winkler et al. 2015 ; Z. Liu, Kim, et al. 2009). En plus des différents signaux autologues de l'organisme pouvant influencer la différenciation des cellules T CD4⁺, certains éléments extérieurs, comme les xénobiotiques, peuvent également impacter cette différenciation comme nous l'avons démontré ici.

En effet, dans un premier temps nous avons constaté dans un modèle d'exposition occupationnel aux xénobiotiques, la présence d'une modulation des lymphocytes T CD4⁺ chez des pompiers, notamment pour les sous-populations de cellules Th17, Th22 et Treg. On retrouve au sein du sérum de ces individus une composition en cytokines favorisant particulièrement la différenciation des cellules Th17 et Treg. De plus, nous avons démontré la présence d'une forte quantité de ligands du AhR dans le sérum de ces pompiers. Il a été montré dans plusieurs études que les pompiers représentaient un groupe d'individus plus à risque de développer des pathologies comme les maladies auto-immunes et les cancers. Il a été établi que dans les cas de cancers chez les pompiers le potentiel carcinogène de certains xénobiotiques rencontrés lors des interventions peut être à l'origine du développement de ces pathologies (Stec et al. 2018 ; Golka et Weistenhofer 2008 ; Petit et al. 2019). En revanche, le rôle que peuvent jouer les xénobiotiques, et notamment les ligands du AhR, sur l'immunité dans le développement des cancers, est encore

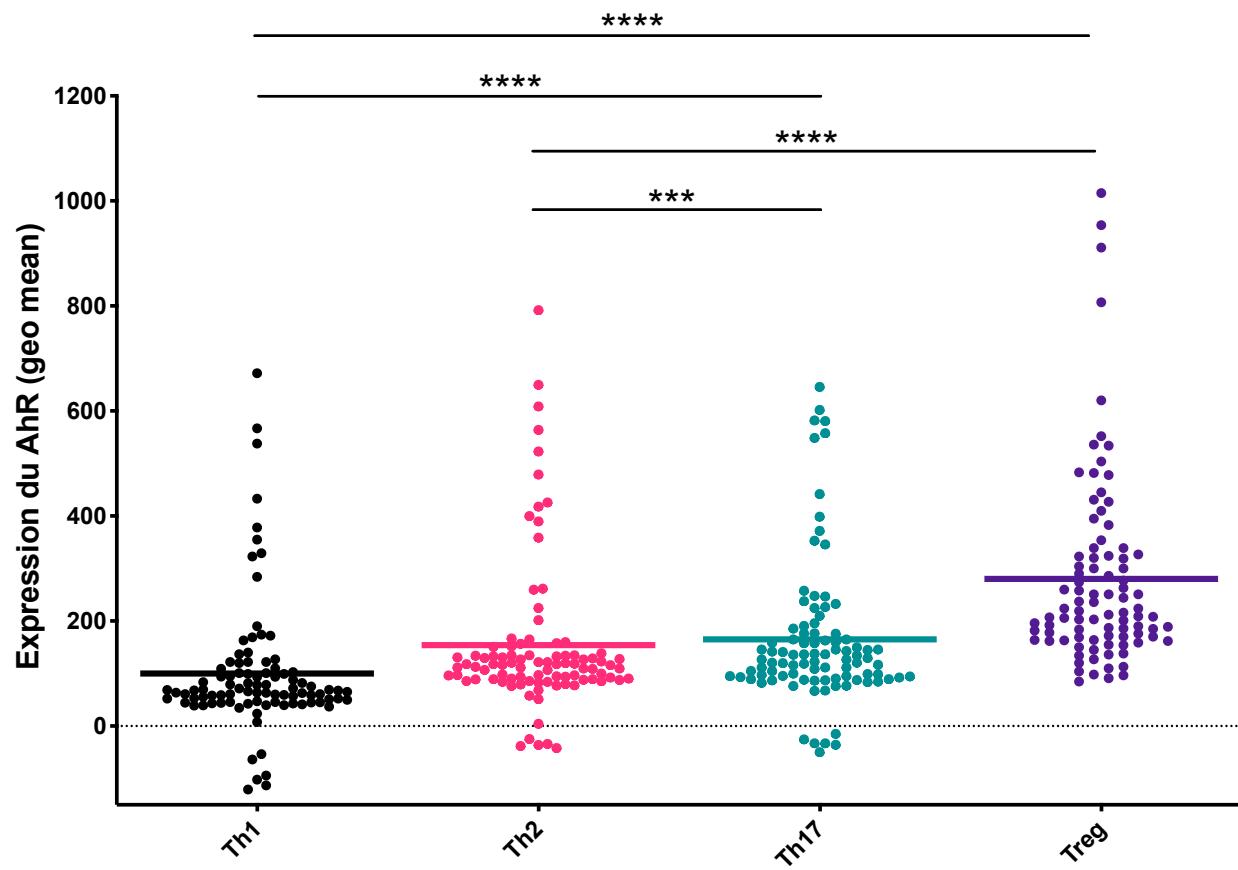
très peu étudié. En outre, nous avons montré dans un modèle *in vitro* humain que certains ligands du AhR, comme le BaP et la kynurenine, pouvaient influencer la différenciation des lymphocytes en Th17 et Treg.

Pour conclure, l'exposition aux ligands du AhR participe à la différenciation des cellules T CD4⁺ (Ehrlich et al. 2018). Plusieurs groupes de personnes, comme les pompiers, sont exposés quotidiennement à ces ligands et peuvent présenter une prédominance à développer certains types de pathologies, comme les maladies auto-immunes (Gold et al. 2007). La mesure de la persistance des xénobiotiques et le suivi du profil immunitaire pourraient permettre à terme de prévenir le développement de ces pathologies.

Dans un tout autre contexte, les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle majeur dans l'implantation embryonnaire (Robertson, Care et Moldenhauer 2018 ; Krasnow et al. 1996). Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'implication des cellules T CD4⁺ dans l'immunomodulation de l'endomètre, une technique utilisée pour favoriser la réceptivité de l'endomètre chez des femmes en échecs répétés d'implantation (ERI) (Yakin, Oktem et Urman 2019). En effet, l'injection de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) dans la cavité utérine, avant le transfert d'embryon, permet d'augmenter le taux de grossesses cliniques chez les femmes ERI. Plusieurs protocoles ont été proposés pour la culture des PBMC, utilisant majoritairement l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) pour l'activation des cellules (S. Li et al. 2017 ; Madkour et al. 2016 ; Okitsu et al. 2011 ; Yu et al. 2014). Dans notre étude les PBMC ont été cultivés en présence de l'hCG et de Phytohemagglutinin (PHA), un activateur des lymphocytes T (Ceuppens et al. 1988). Notre cohorte de patientes était constituée de trois groupes : i) un groupe traité par insémination avec ou sans immunomodulation (IUI), ii) un groupe traité par FIV avec ou sans immunomodulation (FIV) et iii) un groupe de femmes ERI, toutes traitées par immunomodulation. Nos résultats ont montré que, que le traitement d'immunomodulation n'a pas d'effet sur les taux de grossesses cliniques sur les groupes IUI et FIV contrairement à l'effet bénéfique observé chez des femmes ERI (Madkour et al. 2016). D'autre part, l'effet positif de l'immunomodulation sur les femmes ERI pourrait s'expliquer par un état immunitaire particulier chez ces patientes. En effet, nos résultats ont montré que les femmes en ERI présentaient une diminution du nombre de cellules Th2 et Treg dans leur circulation sanguine, pouvant avoir un impact négatif sur la mise en place d'un état anti-inflammatoire nécessaire au maintien de la grossesse (Mor et al. 2011). En outre, le traitement PHA/hCG utilisé dans notre protocole permet de favoriser la différenciation des cellules T CD4⁺ vers les phénotypes anti-inflammatoires Th2 et Treg. En outre, le phénotype pro-inflammatoire Th1 n'est

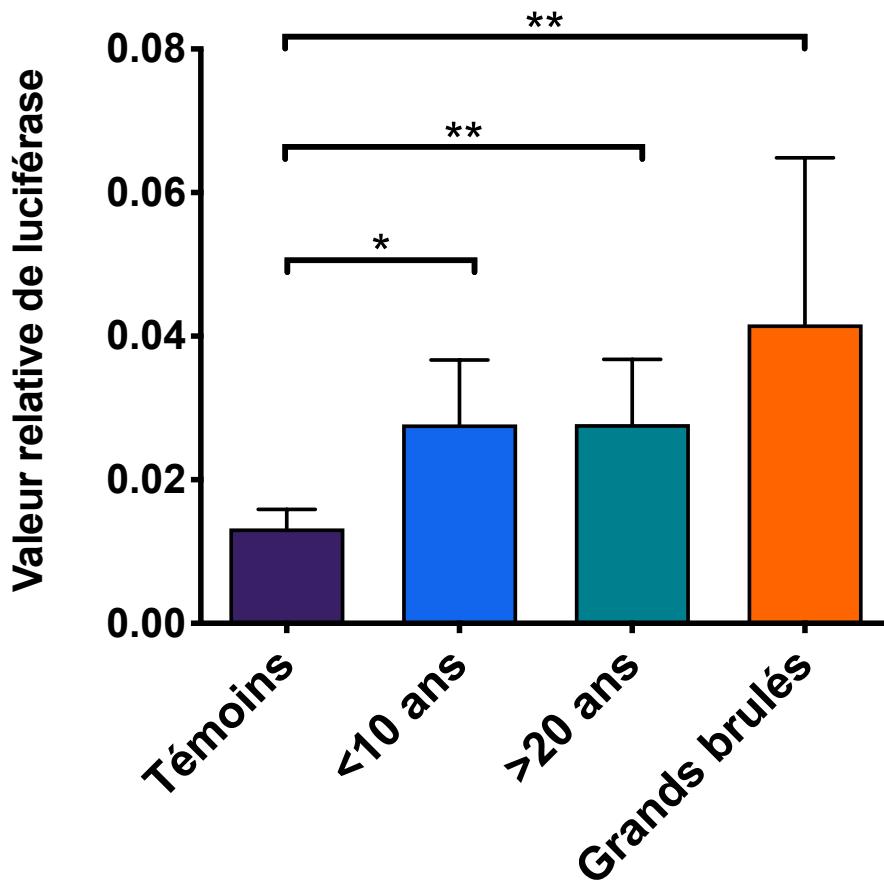
pas impacté par le traitement PHA/hCG, permettant ainsi de garantir un équilibre entre les cellules immunitaires contribuant dans l'implantation de l'embryon (Mor et al. 2011). À terme, cette étude contribuera à l'élaboration d'un modèle prédictif de l'état immunitaire des patientes voulant être traitées par FIV, afin d'offrir le traitement le plus adapté pour augmenter les chances de réussite et ainsi limiter le nombre d'interventions.

SECTION 4. FIGURES ANNEXES



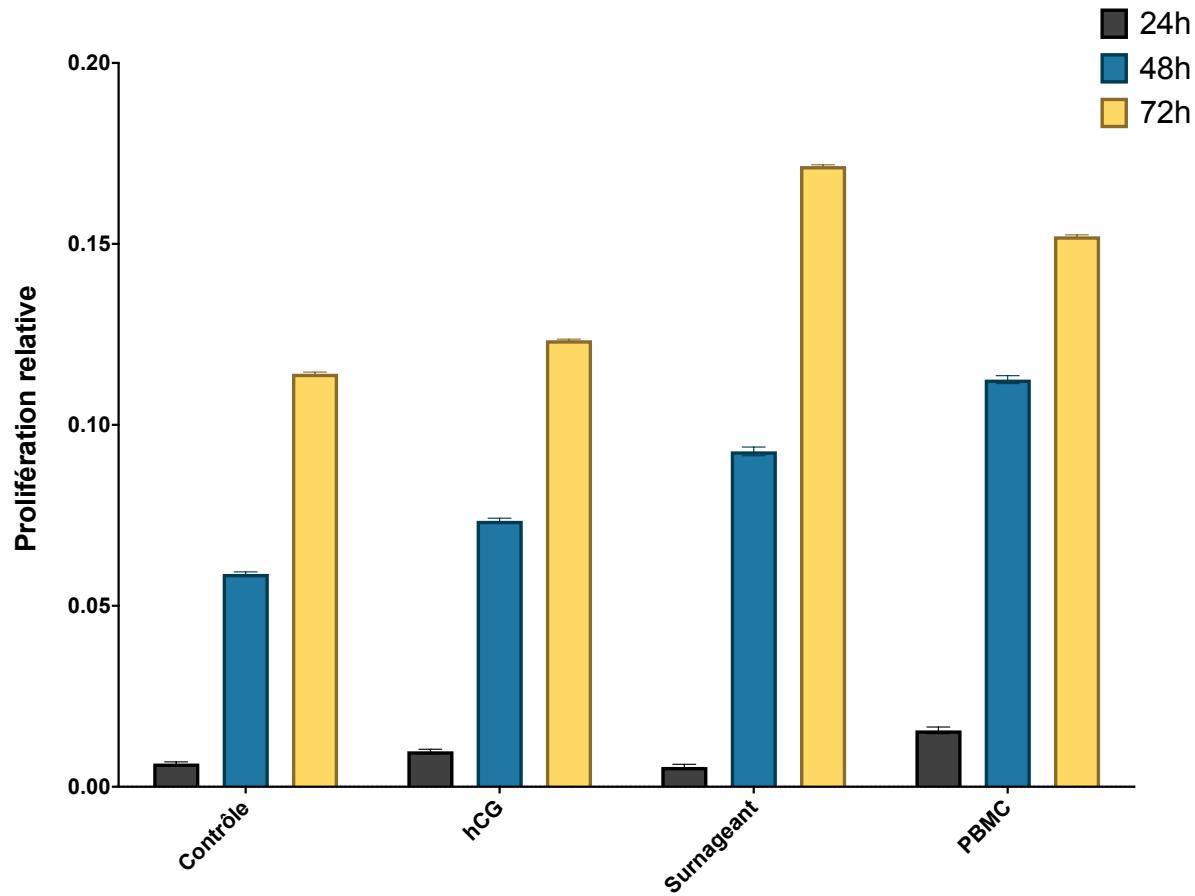
Annexe 1 Expression du AhR chez les sous-types de cellules T CD4

Expression du AhR chez les cellules Th1, Th2, Th17 et Treg par cytométrie en flux. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Th1 : n=93, Th2 : n=93, Th17 : n=93, Treg : n=92. Test statistique Mann-Whitney.



Annexe 2 Activation du AhR par des sérum s de pompiers et de grands brûlés

Activation du AhR par 25 nmol de BaP avec 20 % de sérum s du groupe témoin, des deux groupes de pompiers et du groupe de grands brûlés. L'activité du AhR des pompiers et des grands brûlés est comparée au groupe de témoin. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Témoins: n=4, pompiers <10 ans d'expérience: n=12, pompiers >20 ans d'expérience: n=15, grands brûlés: n=10. Test statistique Mann-Whitney.



Annexe 3 Prolifération des cellules HIPEC

Les cellules HIPEC ont été placées dans une plaque 96 trous constituée d'électrode en or pour mesurer le passage du courant électrique proportionnel au nombre de cellules. Les cellules ont été traitées avec 10 UI de hCG, 10 ul de surnageant décongelé de PBMC ou 5×10^3 PBMC décongelées. Il s'agit d'une expérience constituée de 4 répliques techniques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, B. D., L. S. Birnbaum et G. H. Perdew. 1995. « Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. » *Dev Dyn* 204 (2): 133-143. doi: 10.1002/aja.1002040204.
- Abbott, B. D. et A. R. Buckalew. 2000. « Placental defects in ARNT-knockout conceptus correlate with localized decreases in VEGF-R2, Ang-1, and Tie-2. » *Dev Dyn* 219 (4): 526-538. doi: 10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1080>3.0.CO;2-N.
- Abbott, B. D. et M. R. Probst. 1995. « Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: II. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in the C57BL/6N mouse embryo. » *Dev Dyn* 204 (2): 144-155. doi: 10.1002/aja.1002040205.
- Achache, H. et A. Revel. 2006. « Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. » *Hum Reprod Update* 12 (6): 731-746. doi: 10.1093/humupd/dml004.
- Achache, H., A. Tsafrir, D. Prus, R. Reich et A. Revel. 2010. « Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. » *Fertil Steril* 94 (4): 1271-1278. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.07.1668.
- Acharya, K. R. et S. J. Ackerman. 2014. « Eosinophil granule proteins: form and function. » *J Biol Chem* 289 (25): 17406-17415. doi: 10.1074/jbc.R113.546218.
- Adachi, J., Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C. A. Miller, 3rd, T. Kato, K. Saeki et T. Matsuda. 2001. « Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. » *J Biol Chem* 276 (34): 31475-31478. doi: 10.1074/jbc.C100238200.
- Adeegbe, D. O. et H. Nishikawa. 2013. « Natural and induced T regulatory cells in cancer. » *Front Immunol* 4: 190. doi: 10.3389/fimmu.2013.00190.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy et K. M. Murphy. 2002. « T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. » *Nat Immunol* 3 (6): 549-557. doi: 10.1038/ni794.
- Ahmadi, M., S. Abdolmohammadi-Vahid, M. Ghaebi, L. Aghebati-Maleki, S. Dolati, L. Farzadi, A. Ghasemzadeh, K. Hamdi, V. Younesi, M. Nouri et M. Yousefi. 2017. « Regulatory T cells improve pregnancy rate in RIF patients after additional IVIG treatment. » *Syst Biol Reprod Med* 63 (6): 350-359. doi: 10.1080/19396368.2017.1390007.

Ahn, S. H., A. K. Edwards, S. S. Singh, S. L. Young, B. A. Lessey et C. Tayade. 2015. « IL-17A Contributes to the Pathogenesis of Endometriosis by Triggering Proinflammatory Cytokines and Angiogenic Growth Factors. » *J Immunol* 195 (6): 2591-2600. doi: 10.4049/jimmunol.1501138.

Alexander, M., I. H. Chaudry et M. G. Schwacha. 2002. « Relationships between burn size, immunosuppression, and macrophage hyperactivity in a murine model of thermal injury. » *Cell Immunol* 220 (1): 63-69. doi: 10.1016/s0008-8749(03)00024-8.

Alikani, M. 2005. « Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. » *Hum Reprod* 20 (12): 3369-3375. doi: 10.1093/humrep/dei242.

Allan, S. E., S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo et M. K. Leving. 2007. « Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. » *Int Immunol* 19 (4): 345-354. doi: 10.1093/intimm/dxm014.

Allard, B., M. S. Longhi, S. C. Robson et J. Stagg. 2017. « The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. » *Immunol Rev* 276 (1): 121-144. doi: 10.1111/imr.12528.

Alshaarawy, O., H. A. Elbaz et M. E. Andrew. 2016. « The association of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon biomarkers and cardiovascular disease in the US population. » *Environ Int* 89-90: 174-178. doi: 10.1016/j.envint.2016.02.006.

Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis et A. G. Betz. 2004. « Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. » *Nat Immunol* 5 (3): 266-271. doi: 10.1038/ni1037.

Amakura, Y., T. Tsutsumi, M. Yoshimura, M. Nakamura, H. Handa, R. Matsuda, R. Teshima et T. Watanabe. 2016. « Detection of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation by Some Chemicals in Food Using a Reporter Gene Assay. » *Foods* 5 (1). doi: 10.3390/foods5010015.

Ander, S. E., M. S. Diamond et C. B. Coyne. 2019. « Immune responses at the maternal-fetal interface. » *Sci Immunol* 4 (31). doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114.

Andersen, M. H. G., A. T. Saber, J. E. Pedersen, P. B. Pedersen, P. A. Clausen, M. Lohr, A. Kermanizadeh, S. Loft, N. E. Ebbehøj, A. M. Hansen, I. Kalevi Koponen, E. C. Norskov, U. Vogel et P. Møller. 2018. « Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, lung function, systemic inflammation, and genotoxicity in peripheral blood mononuclear

cells from firefighters before and after a work shift. » *Environ Mol Mutagen* 59 (6): 539-548. doi: 10.1002/em.22193.

Anderson, D. A., T. R. Harrison, F. Yang, J. Wendorf Muhamad et S. E. Morgan. 2017. « Firefighter perceptions of cancer risk: Results of a qualitative study. » *Am J Ind Med* 60 (7): 644-650. doi: 10.1002/ajim.22726.

Andersson, P., J. McGuire, C. Rubio, K. Gradin, M. L. Whitelaw, S. Pettersson, A. Hanberg et L. Poellinger. 2002. « A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (15): 9990-9995. doi: 10.1073/pnas.152706299.

Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi et S. Romagnani. 2007. « Phenotypic and functional features of human Th17 cells. » *J Exp Med* 204 (8): 1849-1861. doi: 10.1084/jem.20070663.

Antczak-Marczak, M. et P. Kuna. 1997. « [The effect of heparin on release of histamine from basophils under the influence of MCAF/MCP-I in patients with bronchial asthma]. » *Pneumonol Alergol Pol* 65 (9-10): 581-587. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9489430>.

Apetoh, L., F. J. Quintana, C. Pot, N. Joller, S. Xiao, D. Kumar, E. J. Burns, D. H. Sherr, H. L. Weiner et V. K. Kuchroo. 2010. « The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. » *Nat Immunol* 11 (9): 854-861. doi: 10.1038/ni.1912.

Ara, A., K. A. Ahmed et J. Xiang. 2018. « Multiple effects of CD40-CD40L axis in immunity against infection and cancer. » *Immunotargets Ther* 7: 55-61. doi: 10.2147/ITT.S163614.

Arase, H., N. Arase et T. Saito. 1996. « Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. » *J Exp Med* 183 (5): 2391-2396. doi: 10.1084/jem.183.5.2391.

Asadzadeh, Z., H. Mohammadi, E. Safarzadeh, M. Hemmatzadeh, A. Mahdian-Shakib, F. Jadidi-Niaragh, G. Azizi et B. Baradaran. 2017. « The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. » *Cell Immunol* 322: 15-25. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.10.015.

Aspord, C., A. Pedroza-Gonzalez, M. Gallegos, S. Tindle, E. C. Burton, D. Su, F. Marches, J. Banchereau et A. K. Palucka. 2007. « Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. » *J Exp Med* 204 (5): 1037-1047. doi: 10.1084/jem.20061120.

Athanassakis, I., R. C. Bleackley, V. Paetkau, L. Guilbert, P. J. Barr et T. G. Wegmann. 1987. « The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. » *J Immunol* 138 (1): 37-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3491160>.

Au-Yeung, B. B., G. A. Smith, J. L. Mueller, C. S. Heyn, R. G. Jaszcak, A. Weiss et J. Zikherman. 2017. « IL-2 Modulates the TCR Signaling Threshold for CD8 but Not CD4 T Cell Proliferation on a Single-Cell Level. » *J Immunol* 198 (6): 2445-2456. doi: 10.4049/jimmunol.1601453.

Aujla, S. J., Y. R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D. J. Askew, D. A. Pociask, T. A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, S. Husain, J. L. Kreindler, P. J. Dubin, J. M. Pilewski, M. M. Myerburg, C. A. Mason, Y. Iwakura et J. K. Kolls. 2008. « IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. » *Nat Med* 14 (3): 275-281. doi: 10.1038/nm1710.

Awasthi, A., Y. Carrier, J. P. Peron, E. Bettelli, M. Kamanaka, R. A. Flavell, V. K. Kuchroo, M. Oukka et H. L. Weiner. 2007. « A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. » *Nat Immunol* 8 (12): 1380-1389. doi: 10.1038/ni1541.

Azuma, T., S. Yao, G. Zhu, A. S. Flies, S. J. Flies et L. Chen. 2008. « B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. » *Blood* 111 (7): 3635-3643. doi: 10.1182/blood-2007-11-123141.

Baban, B., P. R. Chandler, M. D. Sharma, J. Pihkala, P. A. Koni, D. H. Munn et A. L. Mellor. 2009. « IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. » *J Immunol* 183 (4): 2475-2483. doi: 10.4049/jimmunol.0900986.

Bacsi, S. G., S. Reisz-Porszasz et O. Hankinson. 1995. « Orientation of the heterodimeric aryl hydrocarbon (dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence. » *Mol Pharmacol* 47 (3): 432-438. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7700240>.

Badoual, C., S. Hans, N. Merillon, C. Van Ryswick, P. Ravel, N. Benhamouda, E. Levionnois, M. Nizard, A. Si-Mohamed, N. Besnier, A. Gey, R. Rotem-Yehudar, H. Pere, T. Tran, C. L. Guerin, A. Chauvat, E. Dransart, C. Alanio, S. Albert, B. Barry, F. Sandoval, F. Quintin-Colonna, P. Bruneval, W. H. Fridman, F. M. Lemoine, S. Oudard, L. Johannes, D. Olive, D. Brasnu et E. Tartour. 2013. « PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. » *Cancer Res* 73 (1): 128-138. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2606.

Baecker-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman et D. A. Hafler. 2001. « CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. » *J Immunol* 167 (3): 1245-1253. doi: 10.4049/jimmunol.167.3.1245.

Bailey, S. R., M. H. Nelson, R. A. Himes, Z. Li, S. Mehrotra et C. M. Paulos. 2014. « Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. » *Front Immunol* 5: 276. doi: 10.3389/fimmu.2014.00276.

Bankoti, J., A. Burnett, S. Navarro, A. K. Miller, B. Rase et D. M. Shepherd. 2010. « Effects of TCDD on the fate of naive dendritic cells. » *Toxicol Sci* 115 (2): 422-434. doi: 10.1093/toxsci/kfq063.

Bankoti, J., B. Rase, T. Simones et D. M. Shepherd. 2010. « Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. » *Toxicol Appl Pharmacol* 246 (1-2): 18-28. doi: 10.1016/j.taap.2010.03.013.

Barash, A., N. Dekel, S. Fieldust, I. Segal, E. Schechtman et I. Granot. 2003. « Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. » *Fertil Steril* 79 (6): 1317-1322. doi: 10.1016/s0015-0282(03)00345-5.

Barnes, M. J. et F. Powrie. 2009. « Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. » *Immunity* 31 (3): 401-411. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.011.

Barnes, P. J. 2001. « Th2 cytokines and asthma: an introduction. » *Respir Res* 2 (2): 64-65. doi: 10.1186/rr39.

Barouki, R., X. Coumoul et P. M. Fernandez-Salguero. 2007. « The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. » *FEBS Lett* 581 (19): 3608-3615. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.046.

Barsheshet, Y., G. Wildbaum, E. Levy, A. Vitenshtein, C. Akinseye, J. Griggs, S. A. Lira et N. Karin. 2017. « CCR8(+)FOXP3(+) Treg cells as master drivers of immune regulation. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (23): 6086-6091. doi: 10.1073/pnas.1621280114.

Bashiri, A., K. I. Halper et R. Orvieto. 2018. « Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. » *Reprod Biol Endocrinol* 16 (1): 121. doi: 10.1186/s12958-018-0414-2.

Basu, R., D. B. O'Quinn, D. J. Silberger, T. R. Schoeb, L. Fouser, W. Ouyang, R. D. Hatton et C. T. Weaver. 2012. « Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against

enteropathogenic bacteria. » *Immunity* 37 (6): 1061-1075. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.024.

Bedoya, S. K., B. Lam, K. Lau et J. Larkin, 3rd. 2013. « Th17 cells in immunity and autoimmunity. » *Clin Dev Immunol* 2013: 986789. doi: 10.1155/2013/986789.

Behrends, J., J. C. Renauld, S. Ehlers et C. Holscher. 2013. « IL-22 is mainly produced by IFNgamma-secreting cells but is dispensable for host protection against Mycobacterium tuberculosis infection. » *PLoS One* 8 (2): e57379. doi: 10.1371/journal.pone.0057379.

Beitel, S. C., L. M. Flahr, C. Hoppe-Jones, J. L. Burgess, S. R. Littau, J. Gulotta, P. Moore, D. Wallentine et S. A. Snyder. 2020. « Assessment of the toxicity of firefighter exposures using the PAH CALUX bioassay. » *Environ Int* 135: 105207. doi: 10.1016/j.envint.2019.105207.

Belikan, P., U. Buhler, C. Wolf, G. K. Pramanik, R. Gollan, F. Zipp et V. Siffrin. 2018. « CCR7 on CD4(+) T Cells Plays a Crucial Role in the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. » *J Immunol* 200 (8): 2554-2562. doi: 10.4049/jimmunol.1701419.

Bell, D. R. et A. Poland. 2000. « Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. » *J Biol Chem* 275 (46): 36407-36414. doi: 10.1074/jbc.M004236200.

Benchetrit, F., A. Ciree, V. Vives, G. Warnier, A. Gey, C. Sautes-Fridman, F. Fossiez, N. Haicheur, W. H. Fridman et E. Tartour. 2002. « Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. » *Blood* 99 (6): 2114-2121. doi: 10.1182/blood.v99.6.2114.

Bending, D., H. De la Pena, M. Veldhoen, J. M. Phillips, C. Uyttenhove, B. Stockinger et A. Cooke. 2009. « Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. » *J Clin Invest* 119 (3): 565-572. doi: 10.1172/JCI37865.

Benschop, L., S. Seshadri, K. A. Toulis, K. Vincent, T. Child, I. E. Granne et D. G. Goulis. 2012. « Immune therapies for women with history of failed implantation undergoing IVF treatment. » *Cochrane Database of Systematic Reviews* (1). doi: 10.1002/14651858.CD009602.

Berger, H., F. Vegran, M. Chikh, F. Gilardi, S. Ladoire, H. Bugaut, G. Mignot, F. Chalmin, M. Bruchard, V. Derangere, A. Chevriaux, C. Rebe, B. Ryffel, C. Pot, A. Hichami, B. Desvergne, F. Ghiringhelli et L. Apetoh. 2013. « SOCS3 transactivation by PPARgamma prevents IL-17-driven cancer growth. » *Cancer Res* 73 (12): 3578-3590. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4018.

- Bettelli, E., T. Korn et V. K. Kuchroo. 2007. « Th17: the third member of the effector T cell trilogy. » *Curr Opin Immunol* 19 (6): 652-657. doi: 10.1016/j.co.2007.07.020.
- Bevilacqua, E., M. S. Hoshida, A. Amarante-Paffaro, A. Albieri-Borges et S. Zago Gomes. 2010. « Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. » *Int J Dev Biol* 54 (2-3): 495-505. doi: 10.1387/ijdb.082761eb.
- Beyersdorf, N., T. Kerkau et T. Hunig. 2015. « CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. » *Immunotargets Ther* 4: 111-122. doi: 10.2147/ITT.S61647.
- Biller, H., B. Bade, H. Matthys, W. Luttmann et J. C. Virchow. 2001. « Interferon-gamma secretion of peripheral blood CD8+ T lymphocytes in patients with bronchial asthma: in vitro stimulus determines cytokine production. » *Clin Exp Immunol* 126 (2): 199-205. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01666.x.
- Bin, P., S. Leng, J. Cheng, Y. Dai, C. Huang, Z. Pan, Y. Niu, H. Duan, H. Li, Q. Liu, W. Chen et Y. Zheng. 2008. « Association of aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms and urinary 1-hydroxypyrene in polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. » *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 (7): 1702-1708. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2812.
- Birge, R. B. et D. S. Ucker. 2008. « Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. » *Cell Death Differ* 15 (7): 1096-1102. doi: 10.1038/cdd.2008.58.
- Blaschitz, C. et M. Raffatellu. 2010. « Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. » *J Clin Immunol* 30 (2): 196-203. doi: 10.1007/s10875-010-9368-7.
- Bloor, D. J., A. D. Metcalfe, A. Rutherford, D. R. Brison et S. J. Kimber. 2002. « Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. » *Mol Hum Reprod* 8 (3): 237-245. doi: 10.1093/molehr/8.3.237.
- Bock, K. W. 2011. « Regulation of bilirubin clearance by ligand-activated transcription factors of the endo- and xenobiotic metabolism system. » *Front Pharmacol* 2: 82. doi: 10.3389/fphar.2011.00082.
- Bock, K. W. et C. Kohle. 2006. « Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. » *Biochem Pharmacol* 72 (4): 393-404. doi: 10.1016/j.bcp.2006.01.017.
- Bock, K. W., D. Schrenk, A. Forster, E. U. Griese, K. Morike, D. Brockmeier et M. Eichelbaum. 1994. « The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and

UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes. » *Pharmacogenetics* 4 (4): 209-218. doi: 10.1097/00008571-199408000-00005.

Bogdan, C. et U. Schleicher. 2006. « Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy? » *Trends Immunol* 27 (6): 282-290. doi: 10.1016/j.it.2006.04.004.

Bohonowych, J. E. et M. S. Denison. 2007. « Persistent binding of ligands to the aryl hydrocarbon receptor. » *Toxicol Sci* 98 (1): 99-109. doi: 10.1093/toxsci/kfm085.

Boitano, A. E., J. Wang, R. Romeo, L. C. Bouchez, A. E. Parker, S. E. Sutton, J. R. Walker, C. A. Flaveny, G. H. Perdew, M. S. Denison, P. G. Schultz et M. P. Cooke. 2010. « Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. » *Science* 329 (5997): 1345-1348. doi: 10.1126/science.1191536.

Boniface, K., F. X. Bernard, M. Garcia, A. L. Gurney, J. C. Lecron et F. Morel. 2005. « IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. » *J Immunol* 174 (6): 3695-3702. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3695.

Borriello, F., R. Iannone et G. Marone. 2017. « Histamine Release from Mast Cells and Basophils. » *Handb Exp Pharmacol* 241: 121-139. doi: 10.1007/164_2017_18.

Bosnjak, B., B. Stelzmueller, K. J. Erb et M. M. Epstein. 2011. « Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses. » *Respir Res* 12: 114. doi: 10.1186/1465-9921-12-114.

Boule, L. A., B. Winans et B. P. Lawrence. 2014. « Effects of developmental activation of the AhR on CD4+ T-cell responses to influenza virus infection in adult mice. » *Environ Health Perspect* 122 (11): 1201-1208. doi: 10.1289/ehp.1408110.

Boursier, G., A. Siri et H. de Boysson. 2012. « [Use of regulatory T cells in cellular therapies in autoimmune diseases]. » *Med Sci (Paris)* 28 (8-9): 757-763. doi: 10.1051/medsci/2012288018.

Brandt-Rauf, P. W., L. F. Fallon, Jr., T. Tarantini, C. Idema et L. Andrews. 1988. « Health hazards of fire fighters: exposure assessment. » *Br J Ind Med* 45 (9): 606-612. doi: 10.1136/oem.45.9.606.

Broere, Femke, Sergei G. Apasov, Michail V. Sitkovsky et Willem van Eden. 2011. « A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. » In *Principles of Immunopharmacology*, 15-27.

- Bruchard, M., C. Rebe, V. Derangere, D. Togbe, B. Ryffel, R. Boidot, E. Humblin, A. Hamman, F. Chalmin, H. Berger, A. Chevriaux, E. Limagne, L. Apetoh, F. Vegran et F. Ghiringhelli. 2015. « The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. » *Nat Immunol* 16 (8): 859-870. doi: 10.1038/ni.3202.
- Brun, V., H. Bastian, V. Neveu et A. Foussat. 2009. « Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. » *Int Immunopharmacol* 9 (5): 609-613. doi: 10.1016/j.intimp.2009.01.032.
- Burbach, K. M., A. Poland et C. A. Bradfield. 1992. « Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (17): 8185-8189. doi: 10.1073/pnas.89.17.8185.
- Busbee, P. B., M. Rouse, M. Nagarkatti et P. S. Nagarkatti. 2013. « Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. » *Nutr Rev* 71 (6): 353-369. doi: 10.1111/nure.12024.
- Bushnik, T., J. L. Cook, A. A. Yuzpe, S. Tough et J. Collins. 2012. « Estimating the prevalence of infertility in Canada. » *Hum Reprod* 27 (3): 738-746. doi: 10.1093/humrep/der465.
- Cai, J., D. Wang, G. Zhang et X. Guo. 2019. « The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. » *Oncotargets Ther* 12: 8437-8445. doi: 10.2147/OTT.S221340.
- Campesato, L. F., S. Budhu, J. Tchaicha, C. H. Weng, M. Gigoux, I. J. Cohen, D. Redmond, L. Mangarin, S. Pourpe, C. Liu, R. Zappasodi, D. Zamaran, J. Cavanaugh, A. C. Castro, M. G. Manfredi, K. McGovern, T. Merghoub et J. D. Wolchok. 2020. « Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-Kynurenine. » *Nat Commun* 11 (1): 4011. doi: 10.1038/s41467-020-17750-z.
- Capron, M. 1989. « Eosinophils: receptors and mediators in hypersensitivity. » *Clin Exp Allergy* 19 Suppl 1: 3-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2713741>.
- Caramaschi, F., G. del Corno, C. Favaretti, S. E. Giambelluca, E. Montesarchio et G. M. Fara. 1981. « Chloracne following environmental contamination by TCDD in Seveso, Italy. » *Int J Epidemiol* 10 (2): 135-143. doi: 10.1093/ije/10.2.135.
- Carambia, A. et J. Herkel. 2010. « CD4 T cells in hepatic immune tolerance. » *J Autoimmun* 34 (1): 23-28. doi: 10.1016/j.jaut.2009.08.006.

Carbillon, L., N. Perrot, M. Uzan et S. Uzan. 2001. « Doppler ultrasonography and implantation: a critical review. » *Fetal Diagn Ther* 16 (6): 327-332. doi: 10.1159/000053936.

Cardenas, I., R. E. Means, P. Aldo, K. Koga, S. M. Lang, C. J. Booth, A. Manzur, E. Oyarzun, R. Romero et G. Mor. 2010. « Viral infection of the placenta leads to fetal inflammation and sensitization to bacterial products predisposing to preterm labor. » *J Immunol* 185 (2): 1248-1257. doi: 10.4049/jimmunol.1000289.

Care, A. S., K. R. Diener, M. J. Jasper, H. M. Brown, W. V. Ingman et S. A. Robertson. 2013. « Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice. » *J Clin Invest* 123 (8): 3472-3487. doi: 10.1172/JCI60561.

Carow, B. et M. E. Rottenberg. 2014. « SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. » *Front Immunol* 5: 58. doi: 10.3389/fimmu.2014.00058.

Carreras, J., A. Lopez-Guillermo, G. Roncador, N. Villamor, L. Colomo, A. Martinez, R. Hamoudi, W. J. Howat, E. Montserrat et E. Campo. 2009. « High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. » *J Clin Oncol* 27 (9): 1470-1476. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0513.

Castro, G., X. Liu, K. Ngo, A. De Leon-Tabaldo, S. Zhao, R. Luna-Roman, J. Yu, T. Cao, R. Kuhn, P. Wilkinson, K. Herman, M. I. Nelen, J. Blevitt, X. Xue, A. Fourie et W. P. Fung-Leung. 2017. « RORgammat and RORalpha signature genes in human Th17 cells. » *PLoS One* 12 (8): e0181868. doi: 10.1371/journal.pone.0181868.

Cella, M., A. Fuchs, W. Vermi, F. Facchetti, K. Otero, J. K. Lennerz, J. M. Doherty, J. C. Mills et M. Colonna. 2009. « A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. » *Nature* 457 (7230): 722-725. doi: 10.1038/nature07537.

Ceuppens, J. L., M. L. Baroja, K. Lorre, J. Van Damme et A. Billiau. 1988. « Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. » *J Immunol* 141 (11): 3868-3874. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3263438>.

Chalmin, F., G. Mignot, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Vegran, A. Hichami, S. Ladoire, V. Derangere, J. Vincent, D. Masson, S. C. Robson, G. Eberl, J. R. Pallandre, C. Borg, B. Ryffel, L. Apetoh, C. Rebe et F. Ghiringhelli. 2012. « Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. » *Immunity* 36 (3): 362-373. doi: 10.1016/j.jimmuni.2011.12.019.

Chandra, A., C. E. Copen et E. H. Stephen. 2014. « Infertility service use in the United States: data from the National Survey of Family Growth, 1982-2010. » *Natl Health Stat Report* (73): 1-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467919>.

Chaplin, D. D. 2010. « Overview of the immune response. » *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2): S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.

Chaudhary, B. et E. Elkord. 2016. « Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. » *Vaccines (Basel)* 4 (3). doi: 10.3390/vaccines4030028.

Chavez, D. J. et T. L. Anderson. 1985. « The glycocalyx of the mouse uterine luminal epithelium during estrus, early pregnancy, the peri-implantation period, and delayed implantation. I. Acquisition of Ricinus communis I binding sites during pregnancy. » *Biol Reprod* 32 (5): 1135-1142. doi: 10.1095/biolreprod32.5.1135.

Chen, J. et X. Liu. 2009. « The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications. » *Cell Immunol* 254 (2): 85-90. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.09.001.

Chen, K. et J. K. Kolls. 2017. « Interluekin-17A (IL17A). » *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2017.01.016.

Chen, L., K. A. Grabowski, J. P. Xin, J. Coleman, Z. Huang, B. Espiritu, S. Alkan, H. B. Xie, Y. Zhu, F. A. White, J. Clancy, Jr. et H. Huang. 2004. « IL-4 induces differentiation and expansion of Th2 cytokine-producing eosinophils. » *J Immunol* 172 (4): 2059-2066. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.2059.

Chen, M. R., P. J. Tsai et Y. F. Wang. 2008. « Assessing inhalatory and dermal exposures and their resultant health-risks for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contained in oil mists in a fastener manufacturing industry. » *Environ Int* 34 (7): 971-975. doi: 10.1016/j.envint.2008.02.008.

Chen, R. J., S. H. Siao, C. H. Hsu, C. Y. Chang, L. W. Chang, C. H. Wu, P. Lin et Y. J. Wang. 2014. « TCDD promotes lung tumors via attenuation of apoptosis through activation of the Akt and ERK1/2 signaling pathways. » *PLoS One* 9 (6): e99586. doi: 10.1371/journal.pone.0099586.

Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady et S. M. Wahl. 2003. « Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. » *J Exp Med* 198 (12): 1875-1886. doi: 10.1084/jem.20030152.

Chen, X., Y. Wang, J. Wang, J. Wen, X. Jia, X. Wang et H. Zhang. 2018. « Accumulation of T-helper 22 cells, interleukin-22 and myeloid-derived suppressor cells promotes gastric cancer progression in elderly patients. » *Oncol Lett* 16 (1): 253-261. doi: 10.3892/ol.2018.8612.

Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler et H. L. Weiner. 1994. « Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. » *Science* 265 (5176): 1237-1240. doi: 10.1126/science.7520605.

Chen, Z., A. Laurence, Y. Kanno, M. Pacher-Zavisin, B. M. Zhu, C. Tato, A. Yoshimura, L. Hennighausen et J. J. O'Shea. 2006. « Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (21): 8137-8142. doi: 10.1073/pnas.0600666103.

Cheong, J. E. et L. Sun. 2018. « Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities. » *Trends Pharmacol Sci* 39 (3): 307-325. doi: 10.1016/j.tips.2017.11.007.

Cheuk, S., M. Wiken, L. Blomqvist, S. Nylen, T. Talme, M. Stahle et L. Eidsmo. 2014. « Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. » *J Immunol* 192 (7): 3111-3120. doi: 10.4049/jimmunol.1302313.

Chiba, T., J. Chihara et M. Furue. 2012. « Role of the Arylhydrocarbon Receptor (AhR) in the Pathology of Asthma and COPD. » *J Allergy (Cairo)* 2012: 372384. doi: 10.1155/2012/372384.

Chung, A. S., X. Wu, G. Zhuang, H. Ngu, I. Kasman, J. Zhang, J. M. Vernes, Z. Jiang, Y. G. Meng, F. V. Peale, W. Ouyang et N. Ferrara. 2013. « An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. » *Nat Med* 19 (9): 1114-1123. doi: 10.1038/nm.3291.

Collins, M. K., C. S. Tay et A. Erlebacher. 2009. « Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. » *J Clin Invest* 119 (7): 2062-2073. doi: 10.1172/JCI38714.

Collins, N., X. Jiang, A. Zaid, B. L. Macleod, J. Li, C. O. Park, A. Haque, S. Bedoui, W. R. Heath, S. N. Mueller, T. S. Kupper, T. Gebhardt et F. R. Carbone. 2016. « Skin CD4(+) memory T cells exhibit combined cluster-mediated retention and equilibration with the circulation. » *Nat Commun* 7: 11514. doi: 10.1038/ncomms11514.

Collison, L. W., V. Chaturvedi, A. L. Henderson, P. R. Giacomin, C. Guy, J. Bankoti, D. Finkelstein, K. Forbes, C. J. Workman, S. A. Brown, J. E. Rehg, M. L. Jones, H. T. Ni, D. Artis, M. J.

Turk et D. A. Vignali. 2010. « IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. » *Nat Immunol* 11 (12): 1093-1101. doi: 10.1038/ni.1952.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg et D. A. Vignali. 2007. « The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. » *Nature* 450 (7169): 566-569. doi: 10.1038/nature06306.

Conerly, M. L., Z. Yao, J. W. Zhong, M. Groudine et S. J. Tapscott. 2016. « Distinct Activities of Myf5 and MyoD Indicate Separate Roles in Skeletal Muscle Lineage Specification and Differentiation. » *Dev Cell* 36 (4): 375-385. doi: 10.1016/j.devcel.2016.01.021.

Cook, K. D., S. N. Waggoner et J. K. Whitmire. 2014. « NK cells and their ability to modulate T cells during virus infections. » *Crit Rev Immunol* 34 (5): 359-388. doi: 10.1615/critrevimmunol.2014010604.

Coquet, J. M., S. Chakravarti, M. J. Smyth et D. I. Godfrey. 2008. « Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. » *J Immunol* 180 (11): 7097-7101. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7097.

Cort, A., T. Ozben, L. Saso, C. De Luca et L. Korkina. 2016. « Redox Control of Multidrug Resistance and Its Possible Modulation by Antioxidants. » *Oxid Med Cell Longev* 2016: 4251912. doi: 10.1155/2016/4251912.

Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone, E. Cardilicchia, F. Frosali, V. Querci, R. Angeli, A. Matucci, M. Fambrini, F. Liotta, P. Parronchi, E. Maggi, S. Romagnani et F. Annunziato. 2010. « Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. » *J Allergy Clin Immunol* 125 (1): 222-230 e221-224. doi: 10.1016/j.jaci.2009.10.012.

Cote-Sierra, J., G. Foucras, L. Guo, L. Chiodetti, H. A. Young, J. Hu-Li, J. Zhu et W. E. Paul. 2004. « Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (11): 3880-3885. doi: 10.1073/pnas.0400339101.

Coughlan, C., W. Ledger, Q. Wang, F. Liu, A. Demirol, T. Gurgan, R. Cutting, K. Ong, H. Sallam et T. C. Li. 2014. « Recurrent implantation failure: definition and management. » *Reprod Biomed Online* 28 (1): 14-38. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.011.

Couper, K. N., D. G. Blount et E. M. Riley. 2008. « IL-10: the master regulator of immunity to infection. » *J Immunol* 180 (9): 5771-5777. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.

Crome, S. Q., B. Clive, A. Y. Wang, C. Y. Kang, V. Chow, J. Yu, A. Lai, A. Ghahary, R. Broady et M. K. Levings. 2010. « Inflammatory effects of ex vivo human Th17 cells are suppressed by regulatory T cells. » *J Immunol* 185 (6): 3199-3208. doi: 10.4049/jimmunol.1000557.

Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein et J. D. Sedgwick. 2003. « Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. » *Nature* 421 (6924): 744-748. doi: 10.1038/nature01355.

Cui, G. 2019. « TH9, TH17, and TH22 Cell Subsets and Their Main Cytokine Products in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. » *Front Oncol* 9: 1002. doi: 10.3389/fonc.2019.01002.

Curtis, M. M. et S. S. Way. 2009. « Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. » *Immunology* 126 (2): 177-185. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x.

Cyster, J. G. et C. D. C. Allen. 2019. « B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. » *Cell* 177 (3): 524-540. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.016.

d'Hennezel, E., M. Ben-Shoshan, H. D. Ochs, T. R. Torgerson, L. J. Russell, C. Lejtenyi, F. J. Noya, N. Jabado, B. Mazer et C. A. Piccirillo. 2009. « FOXP3 forkhead domain mutation and regulatory T cells in the IPEX syndrome. » *N Engl J Med* 361 (17): 1710-1713. doi: 10.1056/NEJM0907093.

Da Silva, J. A. et T. D. Spector. 1992. « The role of pregnancy in the course and aetiology of rheumatoid arthritis. » *Clin Rheumatol* 11 (2): 189-194. doi: 10.1007/BF02207955.

Dant, T. A., K. L. Lin, D. W. Bruce, S. A. Montgomery, O. V. Kolupaev, H. Bommiasamy, L. M. Bixby, J. T. Woosley, K. P. McKinnon, F. J. Gonzalez, B. R. Blazar, B. G. Vincent, J. M. Coghill et J. S. Serody. 2017. « T-cell expression of AhR inhibits the maintenance of pTreg cells in the gastrointestinal tract in acute GVHD. » *Blood* 130 (3): 348-359. doi: 10.1182/blood-2016-08-734244.

Dardalhon, V., T. Korn, V. K. Kuchroo et A. C. Anderson. 2008. « Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. » *J Autoimmun* 31 (3): 252-256. doi: 10.1016/j.jaut.2008.04.017.

Darnell, J. E., Jr. 1997. « STATs and gene regulation. » *Science* 277 (5332): 1630-1635. doi: 10.1126/science.277.5332.1630.

- Davarinos, N. A. et R. S. Pollenz. 1999. « Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytosolic proteasome following nuclear export. » *J Biol Chem* 274 (40): 28708-28715. doi: 10.1074/jbc.274.40.28708.
- De Fanis, U., F. Mori, R. J. Kurnat, W. K. Lee, M. Bova, N. F. Adkinson et V. Casolaro. 2007. « GATA3 up-regulation associated with surface expression of CD294/CRTH2: a unique feature of human Th cells. » *Blood* 109 (10): 4343-4350. doi: 10.1182/blood-2006-05-025940.
- Deeley, R. G., C. Westlake et S. P. Cole. 2006. « Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. » *Physiol Rev* 86 (3): 849-899. doi: 10.1152/physrev.00035.2005.
- Dekel, N., Y. Gnainsky, I. Granot et G. Mor. 2010. « Inflammation and implantation. » *Am J Reprod Immunol* 63 (1): 17-21. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00792.x.
- Dekel, N., Y. Gnainsky, I. Granot, K. Racicot et G. Mor. 2014. « The role of inflammation for a successful implantation. » *Am J Reprod Immunol* 72 (2): 141-147. doi: 10.1111/aji.12266.
- Del Prete, G. 1992. « Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. » *Allergy* 47 (5): 450-455. doi: 10.1111/j.1398-9995.1992.tb00662.x.
- DeNardo, D. G., J. B. Barreto, P. Andreu, L. Vasquez, D. Tawfik, N. Kolhatkar et L. M. Coussens. 2009. « CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumour properties of macrophages. » *Cancer Cell* 16 (2): 91-102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.018.
- Denison, M. S. et S. R. Nagy. 2003. « Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. » *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 309-334. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828.
- Deo, S. S., K. J. Mistry, A. M. Kakade et P. V. Niphadkar. 2010. « Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. » *Lung India* 27 (2): 66-71. doi: 10.4103/0970-2113.63609.
- Dere, E., R. Lo, T. Celius, J. Matthews et T. R. Zacharewski. 2011. « Integration of genome-wide computation DRE search, AhR ChIP-chip and gene expression analyses of TCDD-elicited responses in the mouse liver. » *BMC Genomics* 12: 365. doi: 10.1186/1471-2164-12-365.

- Desbarats, J., T. Wade, W. F. Wade et M. K. Newell. 1999. « Dichotomy between naive and memory CD4(+) T cell responses to Fas engagement. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (14): 8104-8109. doi: 10.1073/pnas.96.14.8104.
- Deygout, F., D. Carre, G. Auburtin et B. Lombardi. 2011. « Personal exposure to PAHs in the refinery during truck loading of bitumen. » *J Occup Environ Hyg* 8 (10): D97-D100. doi: 10.1080/15459624.2011.613293.
- Diller, M. L., R. R. Kudchadkar, K. A. Delman, D. H. Lawson et M. L. Ford. 2016. « Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells. » *Mediators Inflamm* 2016: 6309219. doi: 10.1155/2016/6309219.
- Diry, M., C. Tomkiewicz, C. Koehle, X. Coumoul, K. W. Bock, R. Barouki et C. Transy. 2006. « Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. » *Oncogene* 25 (40): 5570-5574. doi: 10.1038/sj.onc.1209553.
- Dixon, B. R., J. N. Radin, M. B. Piazuelo, D. C. Contreras et H. M. Algood. 2016. « IL-17a and IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and May Contribute to Epithelial Cell Defense against Helicobacter pylori. » *PLoS One* 11 (2): e0148514. doi: 10.1371/journal.pone.0148514.
- Domingues, H. S., M. Mues, H. Lassmann, H. Wekerle et G. Krishnamoorthy. 2010. « Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. » *PLoS One* 5 (11): e15531. doi: 10.1371/journal.pone.0015531.
- Dominguez, F., M. Yanez-Mo, F. Sanchez-Madrid et C. Simon. 2005. « Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? » *FASEB J* 19 (9): 1056-1060. doi: 10.1096/fj.05-3781hyp.
- Dong, C. 2008. « TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. » *Nat Rev Immunol* 8 (5): 337-348. doi: 10.1038/nri2295.
- Donkor, M. K., A. Sarkar et M. O. Li. 2012. « Tgf-beta1 produced by activated CD4(+) T Cells Antagonizes T Cell Surveillance of Tumor Development. » *Oncimmunology* 1 (2): 162-171. doi: 10.4161/onci.1.2.18481.
- Dougherty, E. J. et R. S. Pollenz. 2008. « Analysis of Ah receptor-ARNT and Ah receptor-ARNT2 complexes in vitro and in cell culture. » *Toxicol Sci* 103 (1): 191-206. doi: 10.1093/toxsci/kfm300.

Downs-Canner, S., S. Berkey, G. M. Delgoffe, R. P. Edwards, T. Curiel, K. Odunsi, D. L. Bartlett et N. Obermajer. 2017. « Suppressive IL-17A(+)Foxp3(+) and ex-Th17 IL-17A(neg)Foxp3(+) Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. » *Nat Commun* 8: 14649. doi: 10.1038/ncomms14649.

Drescher, H. K., L. M. Bartsch, S. Weiskirchen et R. Weiskirchen. 2020. « Intrahepatic TH17/TReg Cells in Homeostasis and Disease-It's All About the Balance. » *Front Pharmacol* 11: 588436. doi: 10.3389/fphar.2020.588436.

Du, J. W., K. Y. Xu, L. Y. Fang et X. L. Qi. 2012. « Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. » *Mol Med Rep* 6 (5): 1099-1102. doi: 10.3892/mmr.2012.1036.

Du, L., Z. Xing, B. Tao, T. Li, D. Yang, W. Li, Y. Zheng, C. Kuang et Q. Yang. 2020. « Both IDO1 and TDO contribute to the malignancy of gliomas via the Kyn-AhR-AQP4 signaling pathway. » *Signal Transduct Target Ther* 5 (1): 10. doi: 10.1038/s41392-019-0103-4.

Du, M. R., S. C. Wang et D. J. Li. 2014. « The integrative roles of chemokines at the maternal-fetal interface in early pregnancy. » *Cell Mol Immunol* 11 (5): 438-448. doi: 10.1038/cmi.2014.68.

Duan, X., D. Yarmush, A. Leeder, M. L. Yarmush et R. N. Mitchell. 2008. « Burn-induced immunosuppression: attenuated T cell signaling independent of IFN-gamma- and nitric oxide-mediated pathways. » *J Leukoc Biol* 83 (2): 305-313. doi: 10.1189/jlb.0407228.

Duarte, J. H., P. Di Meglio, K. Hirota, H. Ahlfors et B. Stockinger. 2013. « Differential influences of the aryl hydrocarbon receptor on Th17 mediated responses in vitro and in vivo. » *PLoS One* 8 (11): e79819. doi: 10.1371/journal.pone.0079819.

Duarte, J. H., S. Zelenay, M. L. Bergman, A. C. Martins et J. Demengeot. 2009. « Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. » *Eur J Immunol* 39 (4): 948-955. doi: 10.1002/eji.200839196.

Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia et F. Sallusto. 2009. « Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. » *Nat Immunol* 10 (8): 857-863. doi: 10.1038/ni.1767.

Dunn, C. L., R. W. Kelly et H. O. Critchley. 2003. « Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. » *Reprod Biomed Online* 7 (2): 151-161. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61745-2.

Dustin, M. L. 2014. « The immunological synapse. » *Cancer Immunol Res* 2 (11): 1023-1033. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0161.

Eaton, D. L., E. P. Gallagher, T. K. Bammler et K. L. Kunze. 1995. « Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. » *Pharmacogenetics* 5 (5): 259-274. doi: 10.1097/00008571-199510000-00001.

Ehrlich, A. K., J. M. Pennington, W. H. Bisson, S. K. Kolluri et N. I. Kerkvliet. 2018. « TCDD, FICZ, and Other High Affinity AhR Ligands Dose-Dependently Determine the Fate of CD4+ T Cell Differentiation. » *Toxicol Sci* 161 (2): 310-320. doi: 10.1093/toxsci/kfx215.

Eisenstein, E. M. et C. B. Williams. 2009. « The T(reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. » *Pediatr Res* 65 (5 Pt 2): 26R-31R. doi: 10.1203/PDR.0b013e31819e76c7.

Ekkens, M. J., D. J. Shedlock, E. Jung, A. Troy, E. L. Pearce, H. Shen et E. J. Pearce. 2007. « Th1 and Th2 cells help CD8 T-cell responses. » *Infect Immun* 75 (5): 2291-2296. doi: 10.1128/IAI.01328-06.

Emi, N., H. Kanzaki, M. Yoshida, K. Takakura, M. Kariya, N. Okamoto, K. Imai et T. Mori. 1991. « Lymphocytes stimulate progesterone production by cultured human granulosa luteal cells. » *Am J Obstet Gynecol* 165 (5 Pt 1): 1469-1474. doi: 10.1016/0002-9378(91)90393-6.

Esser, C. 2009. « The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. » *Biochem Pharmacol* 77 (4): 597-607. doi: 10.1016/j.bcp.2008.10.002.

Esser, C., A. Rannug et B. Stockinger. 2009. « The aryl hydrocarbon receptor in immunity. » *Trends Immunol* 30 (9): 447-454. doi: 10.1016/j.it.2009.06.005.

Eswari, S., G. Sai Kumar et G. T. Sharma. 2013. « Expression of mRNA encoding leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor (LIFR β) in buffalo preimplantation embryos produced in vitro: markers of successful embryo implantation. » *Zygote* 21 (2): 203-213. doi: 10.1017/S0967199412000172.

Evans, B. R., S. I. Karchner, L. L. Allan, R. S. Pollenz, R. L. Tanguay, M. J. Jenny, D. H. Sherr et M. E. Hahn. 2008. « Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. » *Mol Pharmacol* 73 (2): 387-398. doi: 10.1124/mol.107.040204.

Evers, J. L. 2002. « Female subfertility. » *Lancet* 360 (9327): 151-159. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09417-5.

Eyerich, S., K. Eyerich, D. Pennino, T. Carbone, F. Nasorri, S. Pallotta, F. Cianfarani, T. Odorisio, C. Traidl-Hoffmann, H. Behrendt, S. R. Durham, C. B. Schmidt-Weber et A. Cavani. 2009. « Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. » *J Clin Invest* 119 (12): 3573-3585. doi: 10.1172/JCI40202.

Fabre, J., J. Giustiniani, C. Garbar, F. Antonicelli, Y. Merrouche, A. Bensussan, M. Bagot et R. Al-Dacak. 2016. « Targeting the Tumor Microenvironment: The Protumor Effects of IL-17 Related to Cancer Type. » *Int J Mol Sci* 17 (9). doi: 10.3390/ijms17091433.

Facciabene, A., X. Peng, I. S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L. P. Wang, P. A. Gimotty, C. B. Gilks, P. Lal, L. Zhang et G. Coukos. 2011. « Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. » *Nature* 475 (7355): 226-230. doi: 10.1038/nature10169.

Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre et P. Puccetti. 2003. « Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. » *Nat Immunol* 4 (12): 1206-1212. doi: 10.1038/ni1003.

Fang, D., K. Cui, G. Hu, R. K. Gurram, C. Zhong, A. J. Oler, R. Yagi, M. Zhao, S. Sharma, P. Liu, B. Sun, K. Zhao et J. Zhu. 2018. « Bcl11b, a novel GATA3-interacting protein, suppresses Th1 while limiting Th2 cell differentiation. » *J Exp Med* 215 (5): 1449-1462. doi: 10.1084/jem.20171127.

Fang, D. et J. Zhu. 2020. « Molecular switches for regulating the differentiation of inflammatory and IL-10-producing anti-inflammatory T-helper cells. » *Cell Mol Life Sci* 77 (2): 289-303. doi: 10.1007/s00018-019-03277-0.

Farez, M. F., I. D. Mascanfroni, S. P. Mendez-Huergo, A. Yeste, G. Murugaiyan, L. P. Garo, M. E. Balbuena Aguirre, B. Patel, M. C. Ysraelit, C. Zhu, V. K. Kuchroo, G. A. Rabinovich, F. J. Quintana et J. Correale. 2015. « Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. » *Cell* 162 (6): 1338-1352. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.025.

Fehervari, Z. et S. Sakaguchi. 2004. « CD4+ Tregs and immune control. » *J Clin Invest* 114 (9): 1209-1217. doi: 10.1172/JCI23395.

Felton, J. M., R. Duffin, C. T. Robb, S. Crittenden, S. M. Anderton, S. E. M. Howie, M. K. B. Whyte, A. G. Rossi et C. Yao. 2018. « Facilitation of IL-22 production from innate lymphoid cells by prostaglandin E2 prevents experimental lung neutrophilic inflammation. » *Thorax* 73 (11): 1081-1084. doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-211097.

Feng, Y., X. Ma, L. Deng, B. Yao, Y. Xiong, Y. Wu, L. Wang, Q. Ma et F. Ma. 2017. « Role of selectins and their ligands in human implantation stage. » *Glycobiology* 27 (5): 385-391. doi: 10.1093/glycob/cwx009.

Fent, K. W., B. Alexander, J. Roberts, S. Robertson, C. Toennis, D. Sammons, S. Bertke, S. Kerber, D. Smith et G. Horn. 2017. « Contamination of firefighter personal protective equipment and skin and the effectiveness of decontamination procedures. » *J Occup Environ Hyg* 14 (10): 801-814. doi: 10.1080/15459624.2017.1334904.

Fent, K. W., J. Eisenberg, J. Snawder, D. Sammons, J. D. Pleil, M. A. Stiegel, C. Mueller, G. P. Horn et J. Dalton. 2014. « Systemic exposure to PAHs and benzene in firefighters suppressing controlled structure fires. » *Ann Occup Hyg* 58 (7): 830-845. doi: 10.1093/annhyg/meu036.

Fent, K. W., M. LaGuardia, D. Luellen, S. McCormick, A. Mayer, I. C. Chen, S. Kerber, D. Smith et G. P. Horn. 2020. « Flame retardants, dioxins, and furans in air and on firefighters' protective ensembles during controlled residential firefighting. » *Environ Int* 140: 105756. doi: 10.1016/j.envint.2020.105756.

Fent, K. W., C. Toennis, D. Sammons, S. Robertson, S. Bertke, A. M. Calafat, J. D. Pleil, M. A. G. Wallace, S. Kerber, D. Smith et G. P. Horn. 2020. « Firefighters' absorption of PAHs and VOCs during controlled residential fires by job assignment and fire attack tactic. » *J Expo Sci Environ Epidemiol* 30 (2): 338-349. doi: 10.1038/s41370-019-0145-2.

Fernandez-Salguero, P. M., J. M. Ward, J. P. Sundberg et F. J. Gonzalez. 1997. « Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. » *Vet Pathol* 34 (6): 605-614. doi: 10.1177/030098589703400609.

Ferrer, M., H. Rodriguez, L. Zara, Y. Yu, W. Xu et R. Oko. 2012. « MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. » *Cell Tissue Res* 349 (3): 881-895. doi: 10.1007/s00441-012-1429-1.

Fitch, E., E. Harper, I. Skorcheva, S. E. Kurtz et A. Blauvelt. 2007. « Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. » *Curr Rheumatol Rep* 9 (6): 461-467. doi: 10.1007/s11926-007-0075-1.

Flannigan, K. L., V. L. Ngo, D. Geem, A. Harusato, S. A. Hirota, C. A. Parkos, N. W. Lukacs, A. Nusrat, V. Gaboriau-Routhiau, N. Cerf-Bensussan, A. T. Gewirtz et T. L. Denning. 2017. « IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. » *Mucosal Immunol* 10 (3): 673-684. doi: 10.1038/mi.2016.80.

Flavenvy, C. A. et G. H. Perdew. 2009. « Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. » *Mol Cell Pharmacol* 1 (3): 119-123. doi: 10.4255/mcpharmacol.09.15.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin et A. Y. Rudensky. 2017. « Pillars Article: Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. » *Nat Immunol*. 2003. 4: 330-336. » *J Immunol* 198 (3): 986-992. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115587>.

Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau et S. Lebecque. 1996. « T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. » *J Exp Med* 183 (6): 2593-2603. doi: 10.1084/jem.183.6.2593.

Franasiak, J. M. et R. T. Scott. 2017. « Contribution of immunology to implantation failure of euploid embryos. » *Fertil Steril* 107 (6): 1279-1283. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.019.

Franczak, A., A. Nynca, K. E. Valdez, K. M. Mizinga et B. K. Petroff. 2006. « Effects of acute and chronic exposure to the aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the transition to reproductive senescence in female Sprague-Dawley rats. » *Biol Reprod* 74 (1): 125-130. doi: 10.1095/biolreprod.105.044396.

Frericks, M., M. Meissner et C. Esser. 2007. « Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. » *Toxicol Appl Pharmacol* 220 (3): 320-332. doi: 10.1016/j.taap.2007.01.014.

Fridman, W. H., F. Pages, C. Sautes-Fridman et J. Galon. 2012. « The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. » *Nat Rev Cancer* 12 (4): 298-306. doi: 10.1038/nrc3245.

Fujio, K., T. Okamura et K. Yamamoto. 2010. « The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. » *Adv Immunol* 105: 99-130. doi: 10.1016/S0065-2776(10)05004-2.

Fujisawa, N., C. Tohyama et W. Yoshioka. 2019. « Cardiotoxicity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure through lactation in mice. » *J Toxicol Sci* 44 (7): 505-513. doi: 10.2131/jts.44.505.

Fujita, H., K. E. Nogales, T. Kikuchi, J. Gonzalez, J. A. Carucci et J. G. Krueger. 2009. « Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (51): 21795-21800. doi: 10.1073/pnas.0911472106.

Fujiwara, H. 2009. « Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period? » *Mol Hum Reprod* 15 (6): 335-343. doi: 10.1093/molehr/gap027.

Fujiwara, H., Y. Araki, K. Imakawa, S. Saito, T. Daikoku, M. Shigeta, H. Kanzaki et T. Mori. 2016. « Dual Positive Regulation of Embryo Implantation by Endocrine and Immune Systems--Step-by-Step Maternal Recognition of the Developing Embryo. » *Am J Reprod Immunol* 75 (3): 281-289. doi: 10.1111/aji.12478.

Fujiwara, Hiroshi, Atsushi Ideta, Yoshihiko Araki, Yumi Takao, Yukiyasu Sato, Noboru Tsunoda, Yoshito Aoyagi et Ikuo Konishi. 2009. « Immune System Cooperatively Supports Endocrine System-Primed Embryo Implantation. » *Journal of Mammalian Ova Research* 26 (3): 122-128. doi: 10.1274/jmor.26.122.

Fukunaga, B. N., M. R. Probst, S. Reisz-Porszasz et O. Hankinson. 1995. « Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. » *J Biol Chem* 270 (49): 29270-29278. doi: 10.1074/jbc.270.49.29270.

Funatake, C. J., N. B. Marshall, L. B. Steppan, D. V. Mourich et N. I. Kerkvliet. 2005. « Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+ CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. » *J Immunol* 175 (7): 4184-4188. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4184.

Furue, M., M. Takahara, T. Nakahara et H. Uchi. 2014. « Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. » *Arch Dermatol Res* 306 (9): 769-779. doi: 10.1007/s00403-014-1481-7.

Gaffen, S. L. 2009. « The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. » *Curr Rheumatol Rep* 11 (5): 365-370. doi: 10.1007/s11926-009-0052-y.

Gagliani, N., C. F. Magnani, S. Huber, M. E. Gianolini, M. Pala, P. Licona-Limon, B. Guo, D. R. Herbert, A. Bulfone, F. Trentini, C. Di Serio, R. Bacchetta, M. Andreani, L. Brockmann, S. Gregori, R. A. Flavell et M. G. Roncarolo. 2013. « Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. » *Nat Med* 19 (6): 739-746. doi: 10.1038/nm.3179.

Gao, Y., S. A. Nish, R. Jiang, L. Hou, P. Licona-Limon, J. S. Weinstein, H. Zhao et R. Medzhitov. 2013. « Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. » *Immunity* 39 (4): 722-732. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.028.

Garley, M. et E. Jablonska. 2018. « Heterogeneity Among Neutrophils. » *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 66 (1): 21-30. doi: 10.1007/s00005-017-0476-4.

Garrison, P. M., J. M. Rogers, W. R. Brackney et M. S. Denison. 2000. « Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter. » *Arch Biochem Biophys* 374 (2): 161-171. doi: 10.1006/abbi.1999.1620.

Garside, H., A. Stewart, N. Brown, E. L. Cooke, M. Graham et M. Sullivan. 2008. « Quantitative analysis of aryl hydrocarbon receptor activation using fluorescence-based cell imaging--a high-throughput mechanism-based assay for drug discovery. » *Xenobiotica* 38 (1): 1-20. doi: 10.1080/00498250701668600.

Gasch, M., T. Goroll, M. Bauer, D. Hinz, N. Schutze, T. Polte, D. Kesper, J. C. Simon, J. Hackermuller, I. Lehmann et G. Herberth. 2014. « Generation of IL-8 and IL-9 producing CD4(+) T cells is affected by Th17 polarizing conditions and AHR ligands. » *Mediators Inflamm* 2014: 182549. doi: 10.1155/2014/182549.

Gasiewicz, T. A., L. E. Geiger, G. Rucci et R. A. Neal. 1983. « Distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J, DBA/2J, and B6D2F1/J mice. » *Drug Metab Dispos* 11 (5): 397-403. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6138222>.

Gaudino, S. J. et P. Kumar. 2019. « Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. » *Front Immunol* 10: 360. doi: 10.3389/fimmu.2019.00360.

Gaunt, G. et K. Ramin. 2001. « Immunological tolerance of the human fetus. » *Am J Perinatol* 18 (6): 299-312. doi: 10.1055/s-2001-17861.

Gelbaya, T. A., I. Tsoumpou et L. G. Nardo. 2010. « The likelihood of live birth and multiple birth after single versus double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis. » *Fertil Steril* 94 (3): 936-945. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.003.

Georas, S. N., J. Guo, U. De Fanis et V. Casolaro. 2005. « T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. » *Eur Respir J* 26 (6): 1119-1137. doi: 10.1183/09031936.05.00006005.

Germann, T., H. Hess, J. Szeliga et E. Rude. 1996. « Characterization of the adjuvant effect of IL-12 and efficacy of IL-12 inhibitors in type II collagen-induced arthritis. » *Ann N Y Acad Sci* 795: 227-240. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb52672.x.

Ghebeh, H., A. Tulbah, S. Mohammed, N. Elkum, S. M. Bin Amer, T. Al-Tweigeri et S. Dermime. 2007. « Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. » *Int J Cancer* 121 (4): 751-758. doi: 10.1002/ijc.22703.

Ghisari, M., M. Long, A. Tabbo et E. C. Bonefeld-Jorgensen. 2015. « Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture. » *Toxicol Appl Pharmacol* 284 (3): 292-303. doi: 10.1016/j.taap.2015.02.004.

Gialitakis, M., M. Tolaini, Y. Li, M. Pardo, L. Yu, A. Toribio, J. S. Choudhary, K. Niakan, V. Papayannopoulos et B. Stockinger. 2017. « Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Interferes with Early Embryonic Development. » *Stem Cell Reports* 9 (5): 1377-1386. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.025.

Gillis, S., M. Scheid et J. Watson. 1980. « Biochemical and biologic characterization of lymphocyte regulatory molecules. III. The isolation and phenotypic characterization of Interleukin-2 producing T cell lymphomas. » *J Immunol* 125 (6): 2570-2578. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6968790>.

Ginsburg, E. S., L. Xiao, A. R. Gargiulo, F. T. Kung, J. A. Politch, D. J. Schust et J. A. Hill. 2005. « T-helper 2 and 3 type immunity to trophoblast in successful in vitro fertilization-embryo transfer. » *Fertil Steril* 83 (6): 1659-1664. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.12.038.

Gleicher, N., V. A. Kushnir et D. H. Barad. 2019. « Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes. » *Hum Reprod Open* 2019 (3): hoz017. doi: 10.1093/hropen/hoz017.

Gnainsky, Y., I. Granot, P. B. Aldo, A. Barash, Y. Or, E. Schechtman, G. Mor et N. Dekel. 2010. « Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. » *Fertil Steril* 94 (6): 2030-2036. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.02.022.

Gobert, M. et J. J. Lafaille. 2012. « Maternal-fetal immune tolerance, block by block. » *Cell* 150 (1): 7-9. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.020.

Goettel, J. A., R. Gandhi, J. E. Kenison, A. Yeste, G. Murugaiyan, S. Sambanthamoorthy, A. E. Griffith, B. Patel, D. S. Shouval, H. L. Weiner, S. B. Snapper et F. J. Quintana. 2016. « AHR Activation Is Protective against Colitis Driven by T Cells in Humanized Mice. » *Cell Rep* 17 (5): 1318-1329. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.082.

Gold, L. S., M. H. Ward, M. Dosemeci et A. J. De Roos. 2007. « Systemic autoimmune disease mortality and occupational exposures. » *Arthritis Rheum* 56 (10): 3189-3201. doi: 10.1002/art.22880.

Golka, K. et W. Weistenhofer. 2008. « Fire fighters, combustion products, and urothelial cancer. » *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11 (1): 32-44. doi: 10.1080/10937400701600396.

Golubovskaya, V. et L. Wu. 2016. « Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. » *Cancers (Basel)* 8 (3). doi: 10.3390/cancers8030036.

Gomez-Lopez, N., D. StLouis, M. A. Lehr, E. N. Sanchez-Rodriguez et M. Arenas-Hernandez. 2014. « Immune cells in term and preterm labor. » *Cell Mol Immunol* 11 (6): 571-581. doi: 10.1038/cmi.2014.46.

Goswami, R. et M. H. Kaplan. 2011. « A brief history of IL-9. » *J Immunol* 186 (6): 3283-3288. doi: 10.4049/jimmunol.1003049.

Granot, I., Y. Gnainsky et N. Dekel. 2012. « Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. » *Reproduction* 144 (6): 661-668. doi: 10.1530/REP-12-0217.

Greenwood, J. D., K. Minhas, J. P. di Santo, M. Makita, Y. Kiso et B. A. Croy. 2000. « Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. » *Placenta* 21 (7): 693-702. doi: 10.1053/plac.2000.0556.

Groux, H. 2003. « Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. » *Transplantation* 75 (9 Suppl): 8S-12S. doi: 10.1097/01.TP.0000067944.90241.BD.

Gu, Y. Z., J. B. Hogenesch et C. A. Bradfield. 2000. « The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. » *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 519-561. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519.

Guéguen, Y., K. Mouzat, L. Ferrari, E. Tissandie, J. M. A. Lobaccaro, A. M. Batt, F. Paquet, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon et M. Souidi. 2006. « Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. » *Annales de Biologie Clinique* 64 (6): 535-548. doi: 10.1684/abc.2006.0015.

Guerrina, N., H. Traboulsi, D. H. Eidelman et C. J. Baglole. 2018. « The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Maintenance of Lung Health. » *Int J Mol Sci* 19 (12). doi: 10.3390/ijms19123882.

Guidotti, T. L. 1993. « Mortality of urban firefighters in Alberta, 1927-1987. » *Am J Ind Med* 23 (6): 921-940. doi: 10.1002/ajim.4700230608.

Guillon, A., K. Le Ménach, P. M. Flaud, N. Marchand, H. Budzinski et E. Villenave. 2013. « Chemical characterization and stable carbon isotopic composition of particulate Polycyclic

Aromatic Hydrocarbons issued from combustion of 10 Mediterranean woods. » *Atmospheric Chemistry and Physics* 13 (5): 2703-2719. doi: 10.5194/acp-13-2703-2013.

Guo, Z., M. Khattar, P. M. Schroder, Y. Miyahara, G. Wang, X. He, W. Chen et S. M. Stepkowski. 2013. « A dynamic dual role of IL-2 signaling in the two-step differentiation process of adaptive regulatory T cells. » *J Immunol* 190 (7): 3153-3162. doi: 10.4049/jimmunol.1200751.

Gutierrez-Vazquez, C. et F. J. Quintana. 2018. « Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. » *Immunity* 48 (1): 19-33. doi: 10.1016/j.jimmuni.2017.12.012.

Guzeloglu-Kayisli, O., U. A. Kayisli et H. S. Taylor. 2009. « The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. » *Semin Reprod Med* 27 (1): 62-79. doi: 10.1055/s-0028-1108011.

Haarmann-Stemmann, T., H. Bothe, A. Kohli, U. Sydlik, J. Abel et E. Fritsche. 2007. « Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines. » *Drug Metab Dispos* 35 (12): 2262-2269. doi: 10.1124/dmd.107.016253.

Habbeddine, M., P. Verbeke, S. Karaz, P. Bobe et C. Kanellopoulos-Langevin. 2014. « Leukocyte population dynamics and detection of IL-9 as a major cytokine at the mouse fetal-maternal interface. » *PLoS One* 9 (9): e107267. doi: 10.1371/journal.pone.0107267.

Hahn, M. E. 2002. « Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. » *Chem Biol Interact* 141 (1-2): 131-160. doi: 10.1016/s0009-2797(02)00070-4.

Hahn, M. E., L. L. Allan et D. H. Sherr. 2009. « Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. » *Biochem Pharmacol* 77 (4): 485-497. doi: 10.1016/j.bcp.2008.09.016.

Hamamura, K., Y. Liu et H. Yokota. 2008. « Microarray analysis of thapsigargin-induced stress to the endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts. » *J Bone Miner Metab* 26 (3): 231-240. doi: 10.1007/s00774-007-0825-1.

Hambartsoumian, E. 1998. « Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. » *Am J Reprod Immunol* 39 (2): 137-143. doi: 10.1111/j.1600-0897.1998.tb00345.x.

- Han, Y., Q. Guo, M. Zhang, Z. Chen et X. Cao. 2009. « CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. » *J Immunol* 182 (1): 111-120. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.111.
- Hanieh, H. 2014. « Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends. » *Biomed Res Int* 2014: 520763. doi: 10.1155/2014/520763.
- Hankinson, O. 1995. « The aryl hydrocarbon receptor complex. » *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 307-340. doi: 10.1146/annurev.pa.35.040195.001515.
- _____. 2008. « Why does ARNT2 behave differently from ARNT? » *Toxicol Sci* 103 (1): 1-3. doi: 10.1093/toxsci/kfn032.
- Hanna, J., D. Goldman-Wohl, Y. Hamani, I. Avraham, C. Greenfield, S. Natanson-Yaron, D. Prus, L. Cohen-Daniel, T. I. Arnon, I. Manaster, R. Gazit, V. Yutkin, D. Benharroch, A. Porgador, E. Keshet, S. Yagel et O. Mandelboim. 2006. « Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. » *Nat Med* 12 (9): 1065-1074. doi: 10.1038/nm1452.
- Hansen, A. M., L. Mathiesen, M. Pedersen et L. E. Knudsen. 2008. « Urinary 1-hydroxyppyprene (1-HP) in environmental and occupational studies--a review. » *Int J Hyg Environ Health* 211 (5-6): 471-503. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.09.012.
- Hardy, K. et S. Spanos. 2002. « Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. » *J Endocrinol* 172 (2): 221-236. doi: 10.1677/joe.0.1720221.
- Hartenstein, B., S. Teurich, J. Hess, J. Schenkel, M. Schorpp-Kistner et P. Angel. 2002. « Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. » *EMBO J* 21 (23): 6321-6329. doi: 10.1093/emboj/cdf648.
- Hashii, K., H. Fujiwara, S. Yoshioka, N. Kataoka, S. Yamada, T. Hirano, T. Mori, S. Fujii et M. Maeda. 1998. « Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non-pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation. » *Hum Reprod* 13 (10): 2738-2744. doi: 10.1093/humrep/13.10.2738.
- Hayashi, S., J. Okabe-Kado, Y. Honma et K. Kawajiri. 1995. « Expression of Ah receptor (TCDD receptor) during human monocytic differentiation. » *Carcinogenesis* 16 (6): 1403-1409. doi: 10.1093/carcin/16.6.1403.

- Hayes, J. D., A. T. Dinkova-Kostova et M. McMahon. 2009. « Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. » *Toxicol Sci* 111 (2): 199-201. doi: 10.1093/toxsci/kfp168.
- Hayes, M. D., V. Ovcinnikovs, A. G. Smith, I. Kimber et R. J. Dearman. 2014. « The aryl hydrocarbon receptor: differential contribution to T helper 17 and T cytotoxic 17 cell development. » *PLoS One* 9 (9): e106955. doi: 10.1371/journal.pone.0106955.
- Heath-Pagliuso, S., W. J. Rogers, K. Tullis, S. D. Seidel, P. H. Cenijn, A. Brouwer et M. S. Denison. 1998. « Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. » *Biochemistry* 37 (33): 11508-11515. doi: 10.1021/bi980087p.
- Hefti, M. H., K. J. Francoijns, S. C. de Vries, R. Dixon et J. Vervoort. 2004. « The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. » *Eur J Biochem* 271 (6): 1198-1208. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04023.x.
- Hempstock, J., T. Cindrova-Davies, E. Jauniaux et G. J. Burton. 2004. « Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. » *Reprod Biol Endocrinol* 2: 58. doi: 10.1186/1477-7827-2-58.
- Henley, D. V., C. J. Bellone, D. A. Williams, T. S. Ruh et M. F. Ruh. 2004. « Aryl hydrocarbon receptor-mediated posttranscriptional regulation of IL-1 β . » *Arch Biochem Biophys* 422 (1): 42-51. doi: 10.1016/j.abb.2003.11.022.
- Herington, J. L., Y. Guo, J. Reese et B. C. Paria. 2016. « Gene profiling the window of implantation: Microarray analyses from human and rodent models. » *J Reprod Health Med* 2 (Suppl 2): S19-S25. doi: 10.1016/j.jrhm.2016.11.006.
- Hirose, K., M. Morita, M. Ema, J. Mimura, H. Hamada, H. Fujii, Y. Saijo, O. Gotoh, K. Sogawa et Y. Fujii-Kuriyama. 1996. « cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). » *Mol Cell Biol* 16 (4): 1706-1713. doi: 10.1128/mcb.16.4.1706.
- Ho, P. P. et L. Steinman. 2008. « The aryl hydrocarbon receptor: a regulator of Th17 and Treg cell development in disease. » *Cell Res* 18 (6): 605-608. doi: 10.1038/cr.2008.63.
- Hockley, S. L., V. M. Arlt, D. Brewer, R. Te Poele, P. Workman, I. Giddings et D. H. Phillips. 2007. « AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. » *Chem Res Toxicol* 20 (12): 1797-1810. doi: 10.1021/tx700252n.

Hoffman, E. C., H. Reyes, F. F. Chu, F. Sander, L. H. Conley, B. A. Brooks et O. Hankinson. 1991. « Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. » *Science* 252 (5008): 954-958. doi: 10.1126/science.1852076.

Hoffmann, P., T. J. Boeld, R. Eder, J. Huehn, S. Floess, G. Wieczorek, S. Olek, W. Dietmaier, R. Andreesen et M. Edinger. 2009. « Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. » *Eur J Immunol* 39 (4): 1088-1097. doi: 10.1002/eji.200838904.

Hoozemans, D. A., R. Schats, C. B. Lambalk, R. Homburg et P. G. Hompes. 2004. « Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. » *Reprod Biomed Online* 9 (6): 692-715. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61781-6.

Hori, S., T. Nomura et S. Sakaguchi. 2003. « Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. » *Science* 299 (5609): 1057-1061. doi: 10.1126/science.1079490.

Hryniwicz, A., A. Boasso, Y. Edghill-Smith, M. Vaccari, D. Fuchs, D. Venzon, J. Nacsá, M. R. Betts, W. P. Tsai, J. M. Heraud, B. Beer, D. Blanset, C. Chouquet, I. Lowy, G. M. Shearer et G. Franchini. 2006. « CTLA-4 blockade decreases TGF-beta, IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac251-infected macaques. » *Blood* 108 (12): 3834-3842. doi: 10.1182/blood-2006-04-010637.

Hsieh, C. S., Y. Liang, A. J. Tyznik, S. G. Self, D. Liggitt et A. Y. Rudensky. 2004. « Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. » *Immunity* 21 (2): 267-277. doi: 10.1016/j.jimmuni.2004.07.009.

Huang, H., S. Hao, F. Li, Z. Ye, J. Yang et J. Xiang. 2007. « CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. » *Immunology* 120 (2): 148-159. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02452.x.

Huang, X., C. Zhang, R. Hu, Y. Li, Y. Yin, Z. Chen, J. Cai et F. Cui. 2016. « Association between occupational exposures to pesticides with heterogeneous chemical structures and farmer health in China. » *Sci Rep* 6: 25190. doi: 10.1038/srep25190.

Huber, S., N. Gagliani, L. A. Zenewicz, F. J. Huber, L. Bosurgi, B. Hu, M. Hedl, W. Zhang, W. O'Connor, Jr., A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, C. J. Booth, J. H. Cho, W. Ouyang, C. Abraham et R. A. Flavell. 2012. « IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. » *Nature* 491 (7423): 259-263. doi: 10.1038/nature11535.

Hugues, S. 2010. « Dynamics of dendritic cell-T cell interactions: a role in T cell outcome. » *Semin Immunopathol* 32 (3): 227-238. doi: 10.1007/s00281-010-0211-2.

Humans, Iarc Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to. 2010a. « Painting, firefighting, and shiftwork. » *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 98: 9-764. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21381544>.

———. 2010b. « Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. » *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 92: 1-853. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21141735>.

Hume, D. A., K. M. Irvine et C. Pridans. 2019. « The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. » *Trends Immunol* 40 (2): 98-112. doi: 10.1016/j.it.2018.11.007.

Hunter, M., Y. Wang, T. Eubank, C. Baran, P. Nana-Sinkam et C. Marsh. 2009. « Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease. » *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 4079-4102. doi: 10.2741/3514.

Huppertz, B. 2019. « Traditional and New Routes of Trophoblast Invasion and Their Implications for Pregnancy Diseases. » *Int J Mol Sci* 21 (1). doi: 10.3390/ijms21010289.

Hwang, E. S., S. J. Szabo, P. L. Schwartzberg et L. H. Glimcher. 2005. « T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. » *Science* 307 (5708): 430-433. doi: 10.1126/science.1103336.

Ideta, A., K. Hayama, Y. Nakamura, T. Sakurai, K. Tsuchiya, S. Tanaka, T. Yamaguchi, H. Fujiwara, K. Imakawa et Y. Aoyagi. 2010. « Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells enhances early development of the pre-implantation bovine embryo. » *Mol Reprod Dev* 77 (11): 954-962. doi: 10.1002/mrd.21243.

Ideta, A., S. Sakai, Y. Nakamura, M. Urakawa, K. Hayama, K. Tsuchiya, H. Fujiwara et Y. Aoyagi. 2010. « Administration of peripheral blood mononuclear cells into the uterine horn to improve pregnancy rate following bovine embryo transfer. » *Anim Reprod Sci* 117 (1-2): 18-23. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.04.004.

Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia et D. D'Ambrosio. 2001. « Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. » *J Exp Med* 194 (6): 847-853. doi: 10.1084/jem.194.6.847.

Ifegwu, O. C. et C. Anyakora. 2015. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Part I. Exposure. » *Adv Clin Chem* 72: 277-304. doi: 10.1016/bs.acc.2015.08.001.

Ikuta, T., H. Eguchi, T. Tachibana, Y. Yoneda et K. Kawajiri. 1998. « Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. » *J Biol Chem* 273 (5): 2895-2904. doi: 10.1074/jbc.273.5.2895.

Ikuta, T., Y. Kobayashi et K. Kawajiri. 2004. « Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. » *J Biol Chem* 279 (18): 19209-19216. doi: 10.1074/jbc.M310492200.

Ito, T., S. Tsukumo, N. Suzuki, H. Motohashi, M. Yamamoto, Y. Fujii-Kuriyama, J. Mimura, T. M. Lin, R. E. Peterson, C. Tohyama et K. Nohara. 2004. « A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest. » *J Biol Chem* 279 (24): 25204-25210. doi: 10.1074/jbc.M402143200.

Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua et D. R. Littman. 2006. « The orphan nuclear receptor ROR γ T directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 $+$ T helper cells. » *Cell* 126 (6): 1121-1133. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035.

Iwata, S., Y. Mikami, H. W. Sun, S. R. Brooks, D. Jankovic, K. Hirahara, A. Onodera, H. Y. Shih, T. Kawabe, K. Jiang, T. Nakayama, A. Sher, J. J. O'Shea, F. P. Davis et Y. Kanno. 2017. « The Transcription Factor T-bet Limits Amplification of Type I IFN Transcriptome and Circuitry in T Helper 1 Cells. » *Immunity* 46 (6): 983-991 e984. doi: 10.1016/j.immuni.2017.05.005.

Jabeen, R., R. Goswami, O. Awe, A. Kulkarni, E. T. Nguyen, A. Attenasio, D. Walsh, M. R. Olson, M. H. Kim, R. S. Tepper, J. Sun, C. H. Kim, E. J. Taparowsky, B. Zhou et M. H. Kaplan. 2013. « Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. » *J Clin Invest* 123 (11): 4641-4653. doi: 10.1172/JCI69489.

Jasper, M. J., A. S. Care, B. Sullivan, W. V. Ingman, J. D. Aplin et S. A. Robertson. 2011. « Macrophage-derived LIF and IL1B regulate alpha(1,2)fucosyltransferase 2 (Fut2) expression in mouse uterine epithelial cells during early pregnancy. » *Biol Reprod* 84 (1): 179-188. doi: 10.1095/biolreprod.110.085399.

Jenkins, M. K., A. Khoruts, E. Ingulli, D. L. Mueller, S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, A. Itano et K. A. Pape. 2001. « In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. » *Annu Rev Immunol* 19: 23-45. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.23.

Jensen, B. A., R. J. Leeman, J. J. Schlezinger et D. H. Sherr. 2003. « Aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists suppress interleukin-6 expression by bone marrow stromal cells: an immunotoxicology study. » *Environ Health* 2 (1): 16. doi: 10.1186/1476-069X-2-16.

Jeschke, M. G. 2016. « Postburn Hypermetabolism: Past, Present, and Future. » *J Burn Care Res* 37 (2): 86-96. doi: 10.1097/BCR.0000000000000265.

Jiang, R., Z. Tan, L. Deng, Y. Chen, Y. Xia, Y. Gao, X. Wang et B. Sun. 2011. « Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. » *Hepatology* 54 (3): 900-909. doi: 10.1002/hep.24486.

Jiang, R., H. Wang, L. Deng, J. Hou, R. Shi, M. Yao, Y. Gao, A. Yao, X. Wang, L. Yu et B. Sun. 2013. « IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. » *BMC Cancer* 13: 59. doi: 10.1186/1471-2407-13-59.

Jiang, X., M. R. Du, M. Li et H. Wang. 2018. « Three macrophage subsets are identified in the uterus during early human pregnancy. » *Cell Mol Immunol* 15 (12): 1027-1037. doi: 10.1038/s41423-018-0008-0.

Jiang, Y. Z., K. Wang, R. Fang et J. Zheng. 2010. « Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues. » *J Histochem Cytochem* 58 (8): 679-685. doi: 10.1369/jhc.2010.955955.

Johnson, P. M., S. E. Christmas et G. S. Vince. 1999. « Immunological aspects of implantation and implantation failure. » *Hum Reprod* 14 Suppl 2: 26-36. doi: 10.1093/humrep/14.suppl_2.26.

Joller, N., E. Lozano, P. R. Burkett, B. Patel, S. Xiao, C. Zhu, J. Xia, T. G. Tan, E. Sefik, V. Yajnik, A. H. Sharpe, F. J. Quintana, D. Mathis, C. Benoist, D. A. Hafler et V. K. Kuchroo. 2014. « Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. » *Immunity* 40 (4): 569-581. doi: 10.1016/j.jimmuni.2014.02.012.

Jones, H. W., Jr., S. Oehninger, S. Bocca, L. Stadtmauer et J. Mayer. 2010. « Reproductive efficiency of human oocytes fertilized in vitro. » *Facts Views Vis Obgyn* 2 (3): 169-171. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25013707>.

Josefowicz, S. Z. et A. Rudensky. 2009. « Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. » *Immunity* 30 (5): 616-625. doi: 10.1016/j.jimmuni.2009.04.009.

Juricek, L. et X. Coumoul. 2018. « The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. » *Int J Mol Sci* 19 (9). doi: 10.3390/ijms19092504.

Kakita, T., M. Sasada, T. Moriguchi, T. Nishimura, K. Yamamoto et H. Uchino. 1989. « Lysis of human leukemic cells by monocyte-derived macrophages activated with interferon-gamma and interleukin-2. » *Jpn J Cancer Res* 80 (1): 59-64. doi: 10.1111/j.1349-7006.1989.tb02245.x.

Kalantari, H. et D. K. Das. 2010. « Physiological effects of resveratrol. » *Biofactors* 36 (5): 401-406. doi: 10.1002/biof.100.

Kalu, E., S. Bhaskaran, M. Y. Thum, R. Vishwanatha, C. Croucher, E. Sherriff, B. Ford et A. S. Bansal. 2008. « Serial estimation of Th1:Th2 cytokines profile in women undergoing in-vitro fertilization-embryo transfer. » *Am J Reprod Immunol* 59 (3): 206-211. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00565.x.

Kanellopoulos-Langevin, C., S. M. Caucheteux, P. Verbeke et D. M. Ojcius. 2003. « Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. » *Reprod Biol Endocrinol* 1: 121. doi: 10.1186/1477-7827-1-121.

Kaplan, M., R. Bromiker et C. Hammerman. 2014. « Hyperbilirubinemia, hemolysis, and increased bilirubin neurotoxicity. » *Semin Perinatol* 38 (7): 429-437. doi: 10.1053/j.semperi.2014.08.006.

Kaplan, M. H., Y. L. Sun, T. Hoey et M. J. Grusby. 1996. « Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. » *Nature* 382 (6587): 174-177. doi: 10.1038/382174a0.

Kaplan, Mark H. 1996. « Stat6 Is Required for Mediating Responses to IL-4 and for the Development of Th2 Cells. » *Immunity*.

Karchner, S. I., D. G. Franks, W. H. Powell et M. E. Hahn. 2002. « Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. » *J Biol Chem* 277 (9): 6949-6959. doi: 10.1074/jbc.M110779200.

Karimi, P., K. O. Peters, K. Bidad et P. T. Strickland. 2015. « Polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. » *Eur J Epidemiol* 30 (2): 91-101. doi: 10.1007/s10654-015-9988-6.

Katzorke, N., F. Vilella, M. Ruiz, J. S. Krussel et C. Simon. 2016. « Diagnosis of Endometrial-Factor Infertility: Current Approaches and New Avenues for Research. » *Geburtshilfe Frauenheilkd* 76 (6): 699-703. doi: 10.1055/s-0042-103752.

Kauffman, C. L., N. Aria, E. Toichi, T. S. McCormick, K. D. Cooper, A. B. Gottlieb, D. E. Everitt, B. Frederick, Y. Zhu, M. A. Graham, C. E. Pendley et M. A. Mascelli. 2004. « A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. » *J Invest Dermatol* 123 (6): 1037-1044. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23448.x.

Kaye, J., V. Piryatinsky, T. Birnberg, T. Hingaly, E. Raymond, R. Kashi, E. Amit-Romach, I. S. Caballero, F. Towfic, M. A. Ator, E. Rubinstein, D. Laifenfeld, A. Orbach, D. Shinar, Y. Marantz, I. Grossman, V. Knappertz, M. R. Hayden et R. Laufer. 2016. « Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (41): E6145-E6152. doi: 10.1073/pnas.1607843113.

Kazlauskas, A., L. Poellinger et I. Pongratz. 2000. « The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. » *J Biol Chem* 275 (52): 41317-41324. doi: 10.1074/jbc.M007765200.

Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher et A. Prat. 2007. « Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. » *Nat Med* 13 (10): 1173-1175. doi: 10.1038/nm1651.

Keir, J. L. A., U. S. Akhtar, D. M. J. Matschke, T. L. Kirkham, H. M. Chan, P. Ayotte, P. A. White et J. M. Blais. 2017. « Elevated Exposures to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Other Organic Mutagens in Ottawa Firefighters Participating in Emergency, On-Shift Fire Suppression. » *Environ Sci Technol* 51 (21): 12745-12755. doi: 10.1021/acs.est.7b02850.

Keith, B., D. M. Adelman et M. C. Simon. 2001. « Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (12): 6692-6697. doi: 10.1073/pnas.121494298.

Kekatpure, V. D., A. J. Dannenberg et K. Subbaramaiah. 2020. « Withdrawal: HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. » *J Biol Chem* 295 (1): 297. doi: 10.1074/jbc.W119.012142.

Kennedy, Christopher J. et Keith B. Tierney. 2012. « Xenobiotic Protectionxenobioticprotection/Resistance Mechanisms in Organisms. » In *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*, sous la dir. de Robert A. Meyers, 12293-12314. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0851-3_51.

Kerkvliet, N. I., L. B. Steppan, W. Vorachek, S. Oda, D. Farrer, C. P. Wong, D. Pham et D. V. Mourich. 2009. « Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3+ T cells in pancreatic lymph nodes. » *Immunotherapy* 1 (4): 539-547. doi: 10.2217/imt.09.24.

Khosravi, N., M. S. Caetano, A. M. Cumpian, N. Unver, C. De la Garza Ramos, O. Noble, S. Daliri, B. J. Hernandez, B. A. Gutierrez, S. E. Evans, S. Hanash, A. M. Alekseev, Y. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, H. Kadara, J. Chen, E. J. Ostrin et S. J. Moghaddam. 2018. « IL22 Promotes Kras-Mutant Lung Cancer by Induction of a Protumor Immune Response and Protection of Stemness Properties. » *Cancer Immunol Res* 6 (7): 788-797. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0655.

Kim, J. H., B. S. Kim et S. K. Lee. 2020. « Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy. » *Immune Netw* 20 (1): e4. doi: 10.4110/in.2020.20.e4.

Kim, J. S. et M. S. Jordan. 2013. « Diversity of IL-17-producing T lymphocytes. » *Cell Mol Life Sci* 70 (13): 2271-2290. doi: 10.1007/s00018-012-1163-6.

Kim, K. H., S. A. Jahan, E. Kabir et R. J. Brown. 2013. « A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. » *Environ Int* 60: 71-80. doi: 10.1016/j.envint.2013.07.019.

Kim, S. H., E. C. Henry, D. K. Kim, Y. H. Kim, K. J. Shin, M. S. Han, T. G. Lee, J. K. Kang, T. A. Gasiewicz, S. H. Ryu et P. G. Suh. 2006. « Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. » *Mol Pharmacol* 69 (6): 1871-1878. doi: 10.1124/mol.105.021832.

Kim, S. M. et J. S. Kim. 2017. « A Review of Mechanisms of Implantation. » *Dev Reprod* 21 (4): 351-359. doi: 10.12717/DR.2017.21.4.351.

Kim, Y., J. Lee, J. Kim, C. W. Choi, Y. I. Hwang, J. S. Kang et W. J. Lee. 2017. « The pathogenic role of interleukin-22 and its receptor during UVB-induced skin inflammation. » *PLoS One* 12 (5): e0178567. doi: 10.1371/journal.pone.0178567.

Kimber, S. J. 2005. « Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. » *Reproduction* 130 (2): 131-145. doi: 10.1530/rep.1.00304.

Kimura, A., T. Naka, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama et T. Kishimoto. 2008. « Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (28): 9721-9726. doi: 10.1073/pnas.0804231105.

Kindt T, Goldsby R, Osborne B, Fridman C. 2008. « Immunologie : Le cours de Janis Kuby avec questions de révision, 6ème Edition. » *Dunod* ().

King, A., Y. W. Loke et G. Chaouat. 1997. « NK cells and reproduction. » *Immunol Today* 18 (2): 64-66. doi: 10.1016/s0167-5699(97)01001-3.

Kitz, A. et M. Dominguez-Villar. 2017. « Molecular mechanisms underlying Th1-like Treg generation and function. » *Cell Mol Life Sci* 74 (22): 4059-4075. doi: 10.1007/s00018-017-2569-y.

Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen et K. A. Hogquist. 2014. « Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). » *Nat Rev Immunol* 14 (6): 377-391. doi: 10.1038/nri3667.

Kleiveland, Charlotte R. 2015. « Peripheral Blood Mononuclear Cells. » In *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, sous la dir. de Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka et Harry Wichers, 161-167. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15.

Knofler, M., S. Haider, L. Saleh, J. Pollheimer, Tkjb Gamage et J. James. 2019. « Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. » *Cell Mol Life Sci* 76 (18): 3479-3496. doi: 10.1007/s00018-019-03104-6.

Ko, H. P., S. T. Okino, Q. Ma et J. P. Whitlock, Jr. 1997. « Transactivation domains facilitate promoter occupancy for the dioxin-inducible CYP1A1 gene in vivo. » *Mol Cell Biol* 17 (7): 3497-3507. doi: 10.1128/mcb.17.7.3497.

Koga, K. et G. Mor. 2008. « Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. » *Reprod Sci* 15 (3): 231-242. doi: 10.1177/1933719108316391.

Kolonko, M. et B. Greb-Markiewicz. 2019. « bHLH-PAS Proteins: Their Structure and Intrinsic Disorder. » *Int J Mol Sci* 20 (15). doi: 10.3390/ijms20153653.

Koopman, L. A., H. D. Kopcow, B. Rybalov, J. E. Boyson, J. S. Orange, F. Schatz, R. Masch, C. J. Lockwood, A. D. Schachter, P. J. Park et J. L. Strominger. 2003. « Human decidual

natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. » *J Exp Med* 198 (8): 1201-1212. doi: 10.1084/jem.20030305.

Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka et V. K. Kuchroo. 2007. « IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. » *Nature* 448 (7152): 484-487. doi: 10.1038/nature05970.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka et V. K. Kuchroo. 2009. « IL-17 and Th17 Cells. » *Annu Rev Immunol* 27: 485-517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.

Kourilsky, P. et P. Truffa-Bachi. 2001. « Cytokine fields and the polarization of the immune response. » *Trends Immunol* 22 (9): 502-509. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02012-9.

Kovalszki, A. et P. F. Weller. 2016. « Eosinophilia. » *Prim Care* 43 (4): 607-617. doi: 10.1016/j.pop.2016.07.010.

Kozuka, T., M. Sugita, S. Shetzline, A. M. Gewirtz et Y. Nakata. 2011. « c-Myb and GATA-3 cooperatively regulate IL-13 expression via conserved GATA-3 response element and recruit mixed lineage leukemia (MLL) for histone modification of the IL-13 locus. » *J Immunol* 187 (11): 5974-5982. doi: 10.4049/jimmunol.1100550.

Krasnow, J. S., D. J. Tollerud, G. Naus et J. A. DeLoia. 1996. « Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy. » *Hum Reprod* 11 (8): 1747-1754. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019480.

Kravitz, M. 1993. « Immune consequences of burn injury. » *AACN Clin Issues Crit Care Nurs* 4 (2): 399-413. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8489886>.

Krawczyk, C. M., H. Shen et E. J. Pearce. 2007. « Functional plasticity in memory T helper cell responses. » *J Immunol* 178 (7): 4080-4088. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4080.

Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T. H. Welling, A. Chang, G. Coukos, R. Liu et W. Zou. 2009. « Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. » *Blood* 114 (6): 1141-1149. doi: 10.1182/blood-2009-03-208249.

Kryczek, I., Y. Lin, N. Nagarsheth, D. Peng, L. Zhao, E. Zhao, L. Vatan, W. Szeliga, Y. Dou, S. Owens, W. Zgodzinski, M. Majewski, G. Wallner, J. Fang, E. Huang et W. Zou. 2014. « IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. » *Immunity* 40 (5): 772-784. doi: 10.1016/j.jimmuni.2014.03.010.

Kryczek, I., S. Wei, W. Szeliga, L. Vatan et W. Zou. 2009. « Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. » *Blood* 114 (2): 357-359. doi: 10.1182/blood-2008-09-177360.

Kumar, H., T. Kawai et S. Akira. 2011. « Pathogen recognition by the innate immune system. » *Int Rev Immunol* 30 (1): 16-34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976.

Kwak-Kim, J. Y., H. S. Chung-Bang, S. C. Ng, E. I. Ntrivalas, C. P. Mangubat, K. D. Beaman, A. E. Beer et A. Gilman-Sachs. 2003. « Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. » *Hum Reprod* 18 (4): 767-773. doi: 10.1093/humrep/deg156.

Kwak-Kim, J. Y. H., A. Gilman-Sachs et C. E. Kim. 2005. « T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. » *Chem Immunol Allergy* 88: 64-79. doi: 10.1159/000087821.

Ladoire, S., F. Martin et F. Ghiringhelli. 2011. « Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. » *Cancer Immunol Immunother* 60 (7): 909-918. doi: 10.1007/s00262-011-1046-y.

Lahvis, G. P., S. L. Lindell, R. S. Thomas, R. S. McCuskey, C. Murphy, E. Glover, M. Bentz, J. Southard et C. A. Bradfield. 2000. « Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (19): 10442-10447. doi: 10.1073/pnas.190256997.

Lai, G., N. Zhang, W. van der Touw, Y. Ding, W. Ju, E. P. Bottinger, S. P. Reid, D. E. Levy et J. S. Bromberg. 2009. « Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. » *J Immunol* 182 (1): 259-273. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.259.

Lalor, S. J. et B. M. Segal. 2013. « Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis is CXCR3 independent. » *Eur J Immunol* 43 (11): 2866-2874. doi: 10.1002/eji.201343499.

Lamas, B., J. M. Natividad et H. Sokol. 2018. « Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. » *Mucosal Immunol* 11 (4): 1024-1038. doi: 10.1038/s41385-018-0019-2.

Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein et D. J. Cua. 2005. « IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. » *J Exp Med* 201 (2): 233-240. doi: 10.1084/jem.20041257.

Larigot, L., L. Juricek, J. Dairou et X. Coumoul. 2018. « AhR signaling pathways and regulatory functions. » *Biochim Open* 7: 1-9. doi: 10.1016/j.biopen.2018.05.001.

Larsson, M., D. Fracalvieri, C. D. Andersson, L. Bonati, A. Linusson et P. L. Andersson. 2018. « Identification of potential aryl hydrocarbon receptor ligands by virtual screening of industrial chemicals. » *Environ Sci Pollut Res Int* 25 (3): 2436-2449. doi: 10.1007/s11356-017-0437-9.

Lashley, L. E., C. van der Keur, E. van Beelen, R. Schaap, L. A. van der Westerlaken, S. A. Scherjon et F. H. Claas. 2015. « Stronger T-Cell Alloreactivity and Diminished Suppressive Capacity of Peripheral Regulatory T Cells in Infertile Women Undergoing In Vitro Fertilization. » *Am J Reprod Immunol* 74 (3): 268-278. doi: 10.1111/aji.12398.

Laurence, A., C. M. Tato, T. S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R. B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E. M. Shevach et J. O'Shea J. 2007. « Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. » *Immunity* 26 (3): 371-381. doi: 10.1016/j.jimmuni.2007.02.009.

Lawrence, B. P., A. D. Roberts, J. J. Neumiller, J. A. Cundiff et D. L. Woodland. 2006. « Aryl hydrocarbon receptor activation impairs the priming but not the recall of influenza virus-specific CD8+ T cells in the lung. » *J Immunol* 177 (9): 5819-5828. doi: 10.4049/jimmunol.177.9.5819.

Lawrence, C. et B. Atac. 1992. « Hematologic changes in massive burn injury. » *Crit Care Med* 20 (9): 1284-1288. doi: 10.1097/00003246-199209000-00015.

Lazarevic, V., X. Chen, J. H. Shim, E. S. Hwang, E. Jang, A. N. Bolm, M. Oukka, V. K. Kuchroo et L. H. Glimcher. 2011. « T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. » *Nat Immunol* 12 (1): 96-104. doi: 10.1038/ni.1969.

Le Bouteiller, P. 2013. « Human decidual NK cells: unique and tightly regulated effector functions in healthy and pathogen-infected pregnancies. » *Front Immunol* 4: 404. doi: 10.3389/fimmu.2013.00404.

LeBien, T. W. et T. F. Tedder. 2008. « B lymphocytes: how they develop and function. » *Blood* 112 (5): 1570-1580. doi: 10.1182/blood-2008-02-078071.

Ledee, N., L. Prat-Ellenberger, L. Chevrier, R. Balet, C. Simon, C. Lenoble, E. E. Irani, D. Bouret, G. Cassuto, D. Vitoux, K. Vezmar, A. Bensussan, G. Chaouat et M. Petitbarat. 2017. «

Uterine immune profiling for increasing live birth rate: A one-to-one matched cohort study.
» *J Reprod Immunol* 119: 23-30. doi: 10.1016/j.jri.2016.11.007.

Lee, G. R. 2018. « The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. » *Int J Mol Sci* 19 (3). doi: 10.3390/ijms19030730.

Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F. J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. A. Hafler, R. A. Sobel, A. Regev et V. K. Kuchroo. 2012. « Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. » *Nat Immunol* 13 (10): 991-999. doi: 10.1038/ni.2416.

Lee, Y. K., H. Turner, C. L. Maynard, J. R. Oliver, D. Chen, C. O. Elson et C. T. Weaver. 2009. « Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. » *Immunity* 30 (1): 92-107. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.005.

Lees, M. J. et M. L. Whitelaw. 1999. « Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. » *Mol Cell Biol* 19 (8): 5811-5822. doi: 10.1128/mcb.19.8.5811.

Lei, H., K. Schmidt-Bleek, A. Dienelt, P. Reinke et H. D. Volk. 2015. « Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. » *Front Pharmacol* 6: 184. doi: 10.3389/fphar.2015.00184.

LeMasters, G. K., A. M. Genaidy, P. Succop, J. Deddens, T. Sobeih, H. Barriera-Viruet, K. Dunning et J. Lockey. 2006. « Cancer risk among firefighters: a review and meta-analysis of 32 studies. » *J Occup Environ Med* 48 (11): 1189-1202. doi: 10.1097/01.jom.0000246229.68697.90.

Leonard, W. J. et R. Spolski. 2005. « Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. » *Nat Rev Immunol* 5 (9): 688-698. doi: 10.1038/nri1688.

Lewis, C. E. et J. W. Pollard. 2006. « Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. » *Cancer Res* 66 (2): 605-612. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4005.

Lexberg, M. H., A. Taubner, A. Forster, I. Albrecht, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch et H. D. Chang. 2008. « Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. » *Eur J Immunol* 38 (10): 2654-2664. doi: 10.1002/eji.200838541.

- Li, A., Y. Gan, R. Wang, Y. Liu, T. Ma, M. Huang et X. Cui. 2015. « IL-22 Up-Regulates beta-Defensin-2 Expression in Human Alveolar Epithelium via STAT3 but Not NF-kappaB Signaling Pathway. » *Inflammation* 38 (3): 1191-1200. doi: 10.1007/s10753-014-0083-z.
- Li, C., P. J. Ebert et Q. J. Li. 2013. « T cell receptor (TCR) and transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation. » *J Biol Chem* 288 (26): 19127-19139. doi: 10.1074/jbc.M113.453357.
- Li, L. J., C. Gong, M. H. Zhao et B. S. Feng. 2014. « Role of interleukin-22 in inflammatory bowel disease. » *World J Gastroenterol* 20 (48): 18177-18188. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18177.
- Li, Q., Y. Han, G. Fei, Z. Guo, T. Ren et Z. Liu. 2012. « IL-17 promoted metastasis of non-small-cell lung cancer cells. » *Immunol Lett* 148 (2): 144-150. doi: 10.1016/j.imlet.2012.10.011.
- Li, S., J. Wang, Y. Cheng, D. Zhou, T. Yin, W. Xu, N. Yu et J. Yang. 2017. « Intrauterine administration of hCG-activated autologous human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) promotes live birth rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. » *J Reprod Immunol* 119: 15-22. doi: 10.1016/j.jri.2016.11.006.
- Li, W. X. 2008. « Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. » *Trends Cell Biol* 18 (11): 545-551. doi: 10.1016/j.tcb.2008.08.008.
- Li, Z., J. Jiang, Z. Wang, J. Zhang, M. Xiao, C. Wang, Y. Lu et Z. Qin. 2008. « Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. » *Cancer Res* 68 (21): 8687-8694. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0449.
- Li, Z., Y. Zhang et B. Sun. 2011. « Current understanding of Th2 cell differentiation and function. » *Protein Cell* 2 (8): 604-611. doi: 10.1007/s13238-011-1083-5.
- Liang, P. Y., L. H. Diao, C. Y. Huang, R. C. Lian, X. Chen, G. G. Li, J. Zhao, Y. Y. Li, X. B. He et Y. Zeng. 2015. « The pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile in peripheral blood of women with recurrent implantation failure. » *Reprod Biomed Online* 31 (6): 823-826. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.08.009.
- Liblau, R. S., S. M. Singer et H. O. McDevitt. 1995. « Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. » *Immunol Today* 16 (1): 34-38. doi: 10.1016/0167-5699(95)80068-9.

Lin, J., H. S. Zhao, L. Qin, X. N. Li, C. Zhang, J. Xia et J. L. Li. 2018. « Atrazine Triggers Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Quail (*Coturnix C. coturnix*) Cerebrum via Activating Xenobiotic-Sensing Nuclear Receptors and Modulating Cytochrome P450 Systems. » *J Agric Food Chem* 66 (25): 6402-6413. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01413.

Lin, Y. H., H. Luck, S. Khan, P. H. H. Schneeberger, S. Tsai, X. Clemente-Casares, H. Lei, Y. L. Leu, Y. T. Chan, H. Y. Chen, S. H. Yang, B. Coburn, S. Winer et D. A. Winer. 2019. « Aryl hydrocarbon receptor agonist indigo protects against obesity-related insulin resistance through modulation of intestinal and metabolic tissue immunity. » *Int J Obes (Lond)* 43 (12): 2407-2421. doi: 10.1038/s41366-019-0340-1.

Liu, B. et C. Jia. 2016. « Effects of profession on urinary PAH metabolite levels in the US population. » *Int Arch Occup Environ Health* 89 (1): 123-135. doi: 10.1007/s00420-015-1057-7.

Liu, J., L. Zhang, L. C. Winterroth, M. Garcia, S. Weiman, J. W. Wong, J. B. Sunwoo et K. C. Nadeau. 2013. « Epigenetically mediated pathogenic effects of phenanthrene on regulatory T cells. » *J Toxicol* 2013: 967029. doi: 10.1155/2013/967029.

Liu, J., N. Zhang, Q. Li, W. Zhang, F. Ke, Q. Leng, H. Wang, J. Chen et H. Wang. 2011. « Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice. » *PLoS One* 6 (4): e19495. doi: 10.1371/journal.pone.0019495.

Liu, T., L. Peng, P. Yu, Y. Zhao, Y. Shi, X. Mao, W. Chen, P. Cheng, T. Wang, N. Chen, J. Zhang, X. Liu, N. Li, G. Guo, W. Tong, Y. Zhuang et Q. Zou. 2012. « Increased circulating Th22 and Th17 cells are associated with tumor progression and patient survival in human gastric cancer. » *J Clin Immunol* 32 (6): 1332-1339. doi: 10.1007/s10875-012-9718-8.

Liu, X., H. Hu, H. Fan, D. Zuo, Z. Shou, Y. Liao, Z. Nan et Q. Tang. 2017. « The role of STAT3 and AhR in the differentiation of CD4+ T cells into Th17 and Treg cells. » *Medicine (Baltimore)* 96 (17): e6615. doi: 10.1097/MD.0000000000006615.

Liu, Z., J. H. Kim, L. D. Falo, Jr. et Z. You. 2009. « Tumor regulatory T cells potently abrogate antitumor immunity. » *J Immunol* 182 (10): 6160-6167. doi: 10.4049/jimmunol.0802664.

Liu, Z., L. Yang, Y. Cui, X. Wang, C. Guo, Z. Huang, Q. Kan, Z. Liu et Y. Liu. 2009. « IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease. » *Inflamm Bowel Dis* 15 (8): 1133-1144. doi: 10.1002/ibd.20923.

Lock, C., G. Hermans, R. Pedotti, A. Brendolan, E. Schadt, H. Garren, A. Langer-Gould, S. Strober, B. Cannella, J. Allard, P. Klonowski, A. Austin, N. Lad, N. Kaminski, S. J. Galli, J. R. Oksenberg, C. S. Raine, R. Heller et L. Steinman. 2002. « Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. » *Nat Med* 8 (5): 500-508. doi: 10.1038/nm0502-500.

Lohr, J., B. Knoechel, S. Jiang, A. H. Sharpe et A. K. Abbas. 2003. « The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. » *Nat Immunol* 4 (7): 664-669. doi: 10.1038/ni939.

Long, M., P. Laier, A. M. Vinggaard, H. R. Andersen, J. Lynggaard et E. C. Bonefeld-Jorgensen. 2003. « Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. » *Toxicology* 194 (1-2): 77-93. doi: 10.1016/j.tox.2003.08.001.

Lu, L., J. Barbi et F. Pan. 2017. « The regulation of immune tolerance by FOXP3. » *Nat Rev Immunol* 17 (11): 703-717. doi: 10.1038/nri.2017.75.

Lu, L., J. Wang, F. Zhang, Y. Chai, D. Brand, X. Wang, D. A. Horwitz, W. Shi et S. G. Zheng. 2010. « Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. » *J Immunol* 184 (8): 4295-4306. doi: 10.4049/jimmunol.0903418.

Luci, C., A. Reynders, Ivanov, II, C. Cognet, L. Chiche, L. Chasson, J. Hardwigsen, E. Anguiano, J. Banchereau, D. Chaussabel, M. Dalod, D. R. Littman, E. Vivier et E. Tomasello. 2009. « Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. » *Nat Immunol* 10 (1): 75-82. doi: 10.1038/ni.1681.

Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma et B. Xia. 2012. « CD4(+)T cells: differentiation and functions. » *Clin Dev Immunol* 2012: 925135. doi: 10.1155/2012/925135.

Lugo-Villarino, G., R. Maldonado-Lopez, R. Possemato, C. Penaranda et L. H. Glimcher. 2003. « T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (13): 7749-7754. doi: 10.1073/pnas.1332767100.

Lundgren, B. et J. W. DePierre. 1990. « The metabolism of xenobiotics and its relationship to toxicity/genotoxicity: studies with human lymphocytes. » *Acta Physiol Scand Suppl* 592: 49-59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2267943>.

Luo, Y., H. Q. Xie, Y. Chen, Y. Xia, R. Sha, Y. Liu, Y. Ma, T. Xu, L. Xu, K. Wah-Keung Tsim et B. Zhao. 2019. « Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on

acetylcholinesterase during myogenic differentiation of contractile rat primary skeletal muscle cells. » *Chem Biol Interact* 308: 164-169. doi: 10.1016/j.cbi.2019.05.018.

Luzardo, O. P., M. Badea, M. Zumbado, L. Rogozea, L. Floroian, A. Ilea, M. Moga, G. Sechel, L. D. Boada et L. A. Henriquez-Hernandez. 2019. « Body burden of organohalogenated pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in Romanian population: Influence of age, gender, body mass index, and habitat. » *Sci Total Environ* 656: 709-716. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.404.

Lyakh, L., G. Trinchieri, L. Provezza, G. Carra et F. Gerosa. 2008. « Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. » *Immunol Rev* 226: 112-131. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00700.x.

Macek, P., M. J. Cliff, K. J. Embrey, G. A. Holdgate, J. W. M. Nissink, S. Panova, J. P. Walther et R. A. Davies. 2018. « Myc phosphorylation in its basic helix-loop-helix region destabilizes transient alpha-helical structures, disrupting Max and DNA binding. » *J Biol Chem* 293 (24): 9301-9310. doi: 10.1074/jbc.RA118.002709.

Madeen, E., R. A. Corley, S. Crowell, K. Turteltaub, T. Ognibene, M. Malfatti, T. J. McQuistan, M. Garrard, D. Sudakin et D. E. Williams. 2015. « Human in Vivo Pharmacokinetics of [(14)C]Dibenzo[def,p]chrysene by Accelerator Mass Spectrometry Following Oral Microdosing. » *Chem Res Toxicol* 28 (1): 126-134. doi: 10.1021/tx5003996.

Madkour, A., N. Bouamoud, N. Louanjli, I. Kaarouch, H. Copin, M. Benkhalifa et O. Sefrioui. 2016. « Intrauterine insemination of cultured peripheral blood mononuclear cells prior to embryo transfer improves clinical outcome for patients with repeated implantation failures. » *Zygote* 24 (1): 58-69. doi: 10.1017/S0967199414000719.

Mahajan, N. 2015. « Endometrial receptivity array: Clinical application. » *J Hum Reprod Sci* 8 (3): 121-129. doi: 10.4103/0974-1208.165153.

Mahapatro, D. et R. C. Mahapatro. 1984. « Cutaneous basophil hypersensitivity. » *Am J Dermopathol* 6 (5): 483-489. doi: 10.1097/00000372-198410000-00012.

Makrigiannakis, A., M. BenKhalifa, T. Vrekoussis, S. Mahjub, S. N. Kalantaridou et T. Gurgan. 2015. « Repeated implantation failure: a new potential treatment option. » *Eur J Clin Invest* 45 (4): 380-384. doi: 10.1111/eci.12417.

Mandl, M. et R. Depping. 2014. « Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1beta): is it a rare exception? » *Mol Med* 20: 215-220. doi: 10.2119/molmed.2014.00032.

Mannick, J. A., M. L. Rodrick et J. A. Lederer. 2001. « The immunologic response to injury. » *J Am Coll Surg* 193 (3): 237-244. doi: 10.1016/s1072-7515(01)01011-0.

Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica et F. Balkwill. 2008. « Cancer-related inflammation. » *Nature* 454 (7203): 436-444. doi: 10.1038/nature07205.

Marczynski, B., B. Pesch, M. Wilhelm, B. Rossbach, R. Preuss, J. U. Hahn, S. Rabstein, M. Raulf-Heimsoth, A. Seidel, H. P. Rihs, A. Adams, M. Scherenberg, A. Erkes, B. Engelhardt, K. Straif, H. U. Kafferlein, J. Angerer et T. Bruning. 2009. « Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage by industry: a nationwide study in Germany. » *Arch Toxicol* 83 (10): 947-957. doi: 10.1007/s00204-009-0444-9.

Marshall, N. B., W. R. Vorachek, L. B. Steppan, D. V. Mourich et N. I. Kerkvliet. 2008. « Functional characterization and gene expression analysis of CD4+ CD25+ regulatory T cells generated in mice treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. » *J Immunol* 181 (4): 2382-2391. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2382.

Martinez, G. J., Z. Zhang, Y. Chung, J. M. Reynolds, X. Lin, A. M. Jetten, X. H. Feng et C. Dong. 2009. « Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. » *J Biol Chem* 284 (51): 35283-35286. doi: 10.1074/jbc.C109.078238.

Mascanfroni, I. D., M. C. Takenaka, A. Yeste, B. Patel, Y. Wu, J. E. Kenison, S. Siddiqui, A. S. Basso, L. E. Otterbein, D. M. Pardoll, F. Pan, A. Priel, C. B. Clish, S. C. Robson et F. J. Quintana. 2015. « Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1-alpha. » *Nat Med* 21 (6): 638-646. doi: 10.1038/nm.3868.

Masuda, K., A. Kimura, H. Hanieh, N. T. Nguyen, T. Nakahama, I. Chinen, Y. Otoyo, T. Murotani, A. Yamatodani et T. Kishimoto. 2011. « Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages. » *Int Immunol* 23 (10): 637-645. doi: 10.1093/intimm/dxr072.

Matusevicius, D., P. Kivisakk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson et H. Link. 1999. « Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. » *Mult Scler* 5 (2): 101-104. doi: 10.1177/135245859900500206.

Maynard, C. L. et C. T. Weaver. 2008. « Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. » *Immunol Rev* 226: 219-233. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00711.x.

Meissner, A., D. Chardonnens, A. Campana et P. Bischof. 1999. « Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming

growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. » *Mol Hum Reprod* 5 (3): 252-260. doi: 10.1093/molehr/5.3.252.

Menetrier-Caux, C., J. Faget, C. Biota, M. Gobert, J. Y. Blay et C. Caux. 2012. « Innate immune recognition of breast tumor cells mediates CCL22 secretion favoring Treg recruitment within tumor environment. » *Oncoimmunology* 1 (5): 759-761. doi: 10.4161/onci.19680.

Menezo, Y., I. Lichtblau et K. Elder. 2013. « New insights into human pre-implantation metabolism in vivo and in vitro. » *J Assist Reprod Genet* 30 (3): 293-303. doi: 10.1007/s10815-013-9953-9.

Merviel, P., J. C. Challier, L. Carbillon, J. M. Foidart et S. Uzan. 2001. « The role of integrins in human embryo implantation. » *Fetal Diagn Ther* 16 (6): 364-371. doi: 10.1159/000053942.

Mesen, T. B. et S. L. Young. 2015. « Progesterone and the luteal phase: a requisite to reproduction. » *Obstet Gynecol Clin North Am* 42 (1): 135-151. doi: 10.1016/j.ogc.2014.10.003.

Mestas, J. et C. C. Hughes. 2004. « Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. » *J Immunol* 172 (5): 2731-2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731.

Meyer, B. K. et G. H. Perdew. 1999. « Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. » *Biochemistry* 38 (28): 8907-8917. doi: 10.1021/bi982223w.

Mezrich, J. D., J. H. Fechner, X. Zhang, B. P. Johnson, W. J. Burlingham et C. A. Bradfield. 2010. « An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. » *J Immunol* 185 (6): 3190-3198. doi: 10.4049/jimmunol.0903670.

Mezrich, Joshua D., John H. Fechner, Xiaoji Zhang, Brian P. Johnson, William J. Burlingham et Christopher A. Bradfield. 2010. « An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. » *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 185 (6): 3190-3198. doi: 10.4049/jimmunol.0903670.

Mimura, J., M. Ema, K. Sogawa et Y. Fujii-Kuriyama. 1999. « Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. » *Genes Dev* 13 (1): 20-25. doi: 10.1101/gad.13.1.20.

Miniero, R., E. De Felip, F. Ferri et A. di Domenico. 2001. « An overview of TCDD half-life in mammals and its correlation to body weight. » *Chemosphere* 43 (4-7): 839-844. doi: 10.1016/s0045-6535(00)00442-2.

Mishan-Eisenberg, G., Z. Borovsky, M. C. Weber, R. Gazit, M. L. Tykocinski et J. Rachmilewitz. 2004. « Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14. » *J Immunol* 173 (9): 5524-5530. doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5524.

Moennikes, O., S. Loeppen, A. Buchmann, P. Andersson, C. Ittrich, L. Poellinger et M. Schwarz. 2004. « A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. » *Cancer Res* 64 (14): 4707-4710. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0875.

Mogensen, T. H. 2009. « Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. » *Clin Microbiol Rev* 22 (2): 240-273, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00046-08.

Mohinta, S., A. K. Kannan, K. Gowda, S. G. Amin, G. H. Perdew et A. August. 2015. « Differential regulation of Th17 and T regulatory cell differentiation by aryl hydrocarbon receptor dependent xenobiotic response element dependent and independent pathways. » *Toxicol Sci* 145 (2): 233-243. doi: 10.1093/toxsci/kfv046.

Monteleone, I., F. Pallone et G. Monteleone. 2011. « Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation. » *BMC Med* 9: 122. doi: 10.1186/1741-7015-9-122.

Moo-Young, T. A., J. W. Larson, B. A. Belt, M. C. Tan, W. G. Hawkins, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure et D. C. Linehan. 2009. « Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. » *J Immunother* 32 (1): 12-21. doi: 10.1097/CJI.0b013e318189f13c.

Moorthy, B., C. Chu et D. J. Carlin. 2015. « Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. » *Toxicol Sci* 145 (1): 5-15. doi: 10.1093/toxsci/kfv040.

Mor, G. 2008. « Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. » *Ann N Y Acad Sci* 1127: 121-128. doi: 10.1196/annals.1434.006.

Mor, G. et V. M. Abrahams. 2003. « Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. » *Reprod Biol Endocrinol* 1: 119. doi: 10.1186/1477-7827-1-119.

Mor, G. et I. Cardenas. 2010. « The immune system in pregnancy: a unique complexity. » *Am J Reprod Immunol* 63 (6): 425-433. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x.

Mor, G., I. Cardenas, V. Abrahams et S. Guller. 2011. « Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. » *Ann N Y Acad Sci* 1221: 80-87. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x.

Mor, G., S. L. Straszewski-Chavez et V. M. Abrahams. 2006. « Macrophage-trophoblast interactions. » *Methods Mol Med* 122: 149-163. doi: 10.1385/1-59259-989-3:149.

Moriguchi, T., H. Motohashi, T. Hosoya, O. Nakajima, S. Takahashi, S. Ohsako, Y. Aoki, N. Nishimura, C. Tohyama, Y. Fujii-Kuriyama et M. Yamamoto. 2003. « Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AHR)-humanized mouse. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (10): 5652-5657. doi: 10.1073/pnas.1037886100.

Morimoto, Y., Y. Bian, P. Gao, Y. Yashiro-Ohtani, X. Y. Zhou, S. Ono, H. Nakahara, M. Kogo, T. Hamaoka et H. Fujiwara. 2005. « Induction of surface CCR4 and its functionality in mouse Th2 cells is regulated differently during Th2 development. » *J Leukoc Biol* 78 (3): 753-761. doi: 10.1189/jlb.0305139.

Morton, H. 1984. « Early pregnancy factor (EPF): a link between fertilization and immunomodulation. » *Aust J Biol Sci* 37 (5-6): 393-407. doi: 10.1071/bi9840393.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin et R. L. Coffman. 1986. « Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. » *J Immunol* 136 (7): 2348-2357. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419430>.

Mosmann, T. R. et R. L. Coffman. 1989. « TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. » *Annu Rev Immunol* 7: 145-173. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045.

Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg et H. Cheroutre. 2007. « Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. » *Science* 317 (5835): 256-260. doi: 10.1126/science.1145697.

Mukai, M. et S. A. Tischkau. 2007. « Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor. » *Toxicol Sci* 95 (1): 172-181. doi: 10.1093/toxsci/kfl126.

Muranski, P., A. Boni, P. A. Antony, L. Cassard, K. R. Irvine, A. Kaiser, C. M. Paulos, D. C. Palmer, C. E. Touloukian, K. Ptak, L. Gattinoni, C. Wrzesinski, C. S. Hinrichs, K. W. Kerstann, L. Feigenbaum, C. C. Chan et N. P. Restifo. 2008. « Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. » *Blood* 112 (2): 362-373. doi: 10.1182/blood-2007-11-120998.

Murphy, E., K. Shibuya, N. Hosken, P. Openshaw, V. Maino, K. Davis, K. Murphy et A. O'Garra. 1996. « Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. » *J Exp Med* 183 (3): 901-913. doi: 10.1084/jem.183.3.901.

Nagalakshmi, M. L., A. Rascle, S. Zurawski, S. Menon et R. de Waal Malefyt. 2004. « Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. » *Int Immunopharmacol* 4 (5): 679-691. doi: 10.1016/j.intimp.2004.01.008.

Nagelkerken, L. 1998. « Role of Th1 and Th2 cells in autoimmune demyelinating disease. » *Braz J Med Biol Res* 31 (1): 55-60. doi: 10.1590/s0100-879x1998000100007.

Nakano, N., N. Sakata, Y. Katsu, D. Nochise, E. Sato, Y. Takahashi, S. Yamaguchi, Y. Haga, S. Ikeno, M. Motizuki, K. Sano, K. Yamasaki, K. Miyazawa et S. Itoh. 2020. « Dissociation of the AhR/ARNT complex by TGF-beta/Smad signaling represses CYP1A1 gene expression and inhibits benzo[a]pyrene-mediated cytotoxicity. » *J Biol Chem* 295 (27): 9033-9051. doi: 10.1074/jbc.RA120.013596.

Nakayama, T., H. Fujiwara, M. Maeda, T. Inoue, S. Yoshioka, T. Mori et S. Fujii. 2002a. « Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: HCG enhances the effects of PBMC. » *Hum Reprod* 17 (1): 207-212. doi: 10.1093/humrep/17.1.207.

———. 2002b. « Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: HCG enhances the effects of PBMC. » *Human Reproduction* 17 (1): 207-212. doi: DOI 10.1093/humrep/17.1.207.

Nakayamada, S., Y. Kanno, H. Takahashi, D. Jankovic, K. T. Lu, T. A. Johnson, H. W. Sun, G. Vahedi, O. Hakim, R. Handon, P. L. Schwartzberg, G. L. Hager et J. J. O'Shea. 2011. « Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. » *Immunity* 35 (6): 919-931. doi: 10.1016/j.jimmuni.2011.11.012.

Nebert, D. W. 2017. « Aryl hydrocarbon receptor (AHR): "pioneer member" of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of "sensors" of foreign and endogenous signals. » *Prog Lipid Res* 67: 38-57. doi: 10.1016/j.plipres.2017.06.001.

Nebert, D. W., T. P. Dalton, A. B. Okey et F. J. Gonzalez. 2004. « Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. » *J Biol Chem* 279 (23): 23847-23850. doi: 10.1074/jbc.R400004200.

Nebert, D. W. et F. J. Gonzalez. 1987. « P450 genes: structure, evolution, and regulation. » *Annu Rev Biochem* 56: 945-993. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.004501.

- Neubert, D. 1997. « Vulnerability of the endocrine system to xenobiotic influence. » *Regul Toxicol Pharmacol* 26 (1 Pt 1): 9-29. doi: 10.1006/rtpb.1997.1149.
- Ng, S. C., A. Gilman-Sachs, P. Thaker, K. D. Beaman, A. E. Beer et J. Kwak-Kim. 2002. « Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. » *Am J Reprod Immunol* 48 (2): 77-86. doi: 10.1034/j.1600-0897.2002.01105.x.
- Nguyen, A. V. et A. M. Soulika. 2019. « The Dynamics of the Skin's Immune System. » *Int J Mol Sci* 20 (8). doi: 10.3390/ijms20081811.
- Nguyen, C. H., T. Nakahama, T. T. Dang, H. H. Chu, L. Van Hoang, T. Kishimoto et N. T. Nguyen. 2017. « Expression of aryl hydrocarbon receptor, inflammatory cytokines, and incidence of rheumatoid arthritis in Vietnamese dioxin-exposed people. » *J Immunotoxicol* 14 (1): 196-203. doi: 10.1080/1547691X.2017.1377323.
- Nguyen, L. P. et C. A. Bradfield. 2008. « The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. » *Chem Res Toxicol* 21 (1): 102-116. doi: 10.1021/tx7001965.
- Nguyen, N. T., A. Kimura, T. Nakahama, I. Chinen, K. Masuda, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama et T. Kishimoto. 2010. « Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenone-dependent mechanism. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (46): 19961-19966. doi: 10.1073/pnas.1014465107.
- Nguyen, T., P. Nioi et C. B. Pickett. 2009. « The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. » *J Biol Chem* 284 (20): 13291-13295. doi: 10.1074/jbc.R900010200.
- Nicholson, L. B. 2016. « The immune system. » *Essays Biochem* 60 (3): 275-301. doi: 10.1042/EBC20160017.
- Ning, F., H. Liu et G. E. Lash. 2016. « The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. » *Am J Reprod Immunol* 75 (3): 298-309. doi: 10.1111/aji.12477.
- Niringiyumukiza, J. D., H. Cai et W. Xiang. 2018. « Prostaglandin E2 involvement in mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early implantation. » *Reprod Biol Endocrinol* 16 (1): 43. doi: 10.1186/s12958-018-0359-5.
- Nishikawa, H. 2014. « [Regulatory T cells in cancer immunotherapy]. » *Rinsho Ketsueki* 55 (10): 2183-2189. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25297785>.

Nishimura, T., M. Nakui, M. Sato, K. Iwakabe, H. Kitamura, M. Sekimoto, A. Ohta, T. Koda et S. Nishimura. 2000. « The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. » *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl: S52-61. doi: 10.1007/pl00014051.

Nishiumi, S., N. Yamamoto, R. Kodoi, I. Fukuda, K. Yoshida et H. Ashida. 2008. « Antagonistic and agonistic effects of indigoids on the transformation of an aryl hydrocarbon receptor. » *Arch Biochem Biophys* 470 (2): 187-199. doi: 10.1016/j.abb.2007.11.021.

Nishizuka, Y. et T. Sakakura. 1969. « Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. » *Science* 166 (3906): 753-755. doi: 10.1126/science.166.3906.753.

Nugent, L. F., G. Shi, B. P. Vistica, O. Ogbeifun, S. J. Hinshaw et I. Gery. 2013. « ITE, a novel endogenous nontoxic aryl hydrocarbon receptor ligand, efficiently suppresses EAU and T-cell-mediated immunity. » *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54 (12): 7463-7469. doi: 10.1167/iovs.12-11479.

Numasaki, M., J. Fukushi, M. Ono, S. K. Narula, P. J. Zavodny, T. Kudo, P. D. Robbins, H. Tahara et M. T. Lotze. 2003. « Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. » *Blood* 101 (7): 2620-2627. doi: 10.1182/blood-2002-05-1461.

Nunez, S., J. J. Saez, D. Fernandez, F. Flores-Santibanez, K. Alvarez, G. Tejon, P. Ruiz, P. Maldonado, Y. Hidalgo, V. Manriquez, M. R. Bono, M. Rosemblatt et D. Sauma. 2013. « T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. » *Immunology* 139 (1): 61-71. doi: 10.1111/imm.12055.

O'Neill, C. 2005. « The role of paf in embryo physiology. » *Hum Reprod Update* 11 (3): 215-228. doi: 10.1093/humupd/dmi003.

O'Shea, J. J. et P. J. Murray. 2008. « Cytokine signaling modules in inflammatory responses. » *Immunity* 28 (4): 477-487. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.002.

O'Sullivan, S. T. et T. P. O'Connor. 1997. « Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction. » *Br J Plast Surg* 50 (8): 615-623. doi: 10.1016/s0007-1226(97)90507-5.

Oberg, M., L. Bergander, H. Hakansson, U. Rannug et A. Rannug. 2005. « Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. » *Toxicol Sci* 85 (2): 935-943. doi: 10.1093/toxsci/kfi154.

Oestreich, K. J., A. C. Huang et A. S. Weinmann. 2011. « The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. » *J Exp Med* 208 (5): 1001-1013. doi: 10.1084/jem.20102144.

Ohaegbulam, K. C., A. Assal, E. Lazar-Molnar, Y. Yao et X. Zang. 2015. « Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. » *Trends Mol Med* 21 (1): 24-33. doi: 10.1016/j.molmed.2014.10.009.

Otake, F., A. Baba, Y. Fujii-Kuriyama et S. Kato. 2008. « Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. » *Biochem Biophys Res Commun* 370 (4): 541-546. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.054.

Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa et H. L. Weiner. 2003. « CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. » *J Immunol* 170 (5): 2516-2522. doi: 10.4049/jimmunol.170.5.2516.

Okitsu, O., M. Kiyokawa, T. Oda, K. Miyake, Y. Sato et H. Fujiwara. 2011. « Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. » *J Reprod Immunol* 92 (1-2): 82-87. doi: 10.1016/j.jri.2011.07.001.

Olshan, A. F., K. Teschke et P. A. Baird. 1990. « Birth defects among offspring of firemen. » *Am J Epidemiol* 131 (2): 312-321. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115500.

Olson, B. M., J. A. Sullivan et W. J. Burlingham. 2013. « Interleukin 35: a key mediator of suppression and the propagation of infectious tolerance. » *Front Immunol* 4: 315. doi: 10.3389/fimmu.2013.00315.

Olver, S., S. H. Apte, A. Baz, A. Kelso et N. Kienzle. 2013. « Interleukin-4-induced loss of CD8 expression and cytolytic function in effector CD8 T cells persists long term in vivo. » *Immunology* 139 (2): 187-196. doi: 10.1111/imm.12068.

Opitz, C. A., U. M. Litzenburger, F. Sahm, M. Ott, I. Tritschler, S. Trump, T. Schumacher, L. Jestaedt, D. Schrenk, M. Weller, M. Jugold, G. J. Guillemin, C. L. Miller, C. Lutz, B. Radlwimmer, I. Lehmann, A. von Deimling, W. Wick et M. Platten. 2011. « An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. » *Nature* 478 (7368): 197-203. doi: 10.1038/nature10491.

- Oreja-Guevara, C., J. Ramos-Cejudo, L. S. Aroeira, B. Chamorro et E. Diez-Tejedor. 2012. « TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. » *BMC Neurol* 12: 95. doi: 10.1186/1471-2377-12-95.
- Orman, M. A., T. T. Nguyen, M. G. Ierapetritou, F. Berthiaume et I. P. Androulakis. 2011. « Comparison of the cytokine and chemokine dynamics of the early inflammatory response in models of burn injury and infection. » *Cytokine* 55 (3): 362-371. doi: 10.1016/j.cyto.2011.05.010.
- Orvieto, R., M. Brengauz et B. Feldman. 2015. « A novel approach to normal responder patient with repeated implantation failures--a case report. » *Gynecol Endocrinol* 31 (6): 435-437. doi: 10.3109/09513590.2015.1005595.
- Oukka, M. 2007. « Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. » *Ann Rheum Dis* 66 Suppl 3: iii87-90. doi: 10.1136/ard.2007.078527.
- Ouyang, B., C. S. Baxter, H. M. Lam, S. Yeramaneni, L. Levin, E. Haynes et S. M. Ho. 2012. « Hypomethylation of dual specificity phosphatase 22 promoter correlates with duration of service in firefighters and is inducible by low-dose benzo[a]pyrene. » *J Occup Environ Med* 54 (7): 774-780. doi: 10.1097/JOM.0b013e31825296bc.
- Owen, D. L. et M. A. Farrar. 2017. « STAT5 and CD4 (+) T Cell Immunity. » *F1000Res* 6: 32. doi: 10.12688/f1000research.9838.1.
- Oz, F. et M. O. Yuzer. 2016. « The effects of cooking on wire and stone barbecue at different cooking levels on the formation of heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in beef steak. » *Food Chem* 203: 59-66. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.041.
- Pai, S. Y., M. L. Truitt et I. C. Ho. 2004. « GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (7): 1993-1998. doi: 10.1073/pnas.0308697100.
- Palii, C. G., C. Perez-Iratxeta, Z. Yao, Y. Cao, F. Dai, J. Davison, H. Atkins, D. Allan, F. J. Dilworth, R. Gentleman, S. J. Tapscott et M. Brand. 2011. « Differential genomic targeting of the transcription factor TAL1 in alternate hematopoietic lineages. » *EMBO J* 30 (3): 494-509. doi: 10.1038/emboj.2010.342.
- Pan, J., M. Zhang, J. Wang, Q. Wang, D. Xia, W. Sun, L. Zhang, H. Yu, Y. Liu et X. Cao. 2004. « Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. » *Immunol Lett* 94 (1-2): 141-151. doi: 10.1016/j.imlet.2004.05.003.

- Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed et M. J. Lenardo. 2007. « CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. » *Nat Immunol* 8 (12): 1353-1362. doi: 10.1038/ni1536.
- Paparo, S. R. 2019. « Rheumatoid arthritis and the Th1 chemokine MIG. » *Clin Ter* 170 (6): e472-e477. doi: 10.7417/CT.2019.2178.
- Pappas, B., Y. Yang, Y. Wang, K. Kim, H. J. Chung, M. Cheung, K. Ngo, A. Shinn et W. K. Chan. 2018. « p23 protects the human aryl hydrocarbon receptor from degradation via a heat shock protein 90-independent mechanism. » *Biochem Pharmacol* 152: 34-44. doi: 10.1016/j.bcp.2018.03.015.
- Park, C., H. Bae, F. W. Bazer, G. Song et W. Lim. 2019. « Activation of CCL20 and its receptor CCR6 promotes endometrium preparation for implantation and placenta development during the early pregnancy period in pigs. » *Dev Comp Immunol* 92: 35-42. doi: 10.1016/j.dci.2018.11.005.
- Parker, D. C. 1993. « T cell-dependent B cell activation. » *Annu Rev Immunol* 11: 331-360. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.001555.
- Parry, R. V., J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth, A. R. Lanfranco, I. Braunstein, S. V. Kobayashi, P. S. Linsley, C. B. Thompson et J. L. Riley. 2005. « CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. » *Mol Cell Biol* 25 (21): 9543-9553. doi: 10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005.
- Pavan, L., A. Tarrade, A. Hermouet, C. Delouis, M. Titeux, M. Vidaud, P. Therond, D. Evain-Brion et T. Fournier. 2003. « Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process. » *Carcinogenesis* 24 (8): 1325-1336. doi: 10.1093/carcin/bgg074.
- Pawar, S., A. M. Hantak, I. C. Bagchi et M. K. Bagchi. 2014. « Minireview: Steroid-regulated paracrine mechanisms controlling implantation. » *Mol Endocrinol* 28 (9): 1408-1422. doi: 10.1210/me.2014-1074.
- Pennock, N. D., J. T. White, E. W. Cross, E. E. Cheney, B. A. Tamburini et R. M. Kedl. 2013. « T cell responses: naive to memory and everything in between. » *Adv Physiol Educ* 37 (4): 273-283. doi: 10.1152/advan.00066.2013.
- Perera, F., D. Tang, R. Whyatt, S. A. Lederman et W. Jedrychowski. 2005. « DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and

China. » *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14 (3): 709-714. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0457.

Peter Guengerich, F., M. V. Martin, W. A. McCormick, L. P. Nguyen, E. Glover et C. A. Bradfield. 2004. « Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo. » *Arch Biochem Biophys* 423 (2): 309-316. doi: 10.1016/j.abb.2004.01.002.

Petit, P., A. Maitre, R. Persoons et D. J. Bicout. 2019. « Lung cancer risk assessment for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in various industries. » *Environ Int* 124: 109-120. doi: 10.1016/j.envint.2018.12.058.

Petri, B. et M. J. Sanz. 2018. « Neutrophil chemotaxis. » *Cell Tissue Res* 371 (3): 425-436. doi: 10.1007/s00441-017-2776-8.

Petrulis, J. R. et G. H. Perdew. 2002. « The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. » *Chem Biol Interact* 141 (1-2): 25-40. doi: 10.1016/s0009-2797(02)00064-9.

Pettinelli, C. B. et D. E. McFarlin. 1981. « Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. » *J Immunol* 127 (4): 1420-1423. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6168690>.

Pflegel, P., A. M. Murach, H. J. Hofmann et G. Wagner. 1978. « [Polarographic and UV spectroscopic studies of benzo condensed 2-benzylidenecycloalkanones]. » *Pharmazie* 33 (9): 583-585. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/733871>.

Phelan, D., G. M. Winter, W. J. Rogers, J. C. Lam et M. S. Denison. 1998. « Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. » *Arch Biochem Biophys* 357 (1): 155-163. doi: 10.1006/abbi.1998.0814.

Pileri, D., A. Accardo Palombo, L. D'Amelio, N. D'Arpa, G. Amato, A. Masellis, V. Cataldo, R. Mogavero, B. Napoli, C. Lombardo et C. Conte. 2008. « Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome. » *Ann Burns Fire Disasters* 21 (4): 182-185. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21991134>.

Plaks, V., T. Birnberg, T. Berkutzki, S. Sela, A. BenYashar, V. Kalchenko, G. Mor, E. Keshet, N. Dekel, M. Neeman et S. Jung. 2008. « Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. » *J Clin Invest* 118 (12): 3954-3965. doi: 10.1172/JCI36682.

Plank, M. W., G. E. Kaiko, S. Maltby, J. Weaver, H. L. Tay, W. Shen, M. S. Wilson, S. K. Durum et P. S. Foster. 2017. « Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. » *J Immunol* 198 (5): 2182-2190. doi: 10.4049/jimmunol.1601480.

Polan, M. L., C. Simon, A. Frances, B. Y. Lee et L. E. Prichard. 1995. « Role of embryonic factors in human implantation. » *Hum Reprod* 10 Suppl 2: 22-29. doi: 10.1093/humrep/10.suppl_2.22.

Poland, A., E. Glover et A. S. Kende. 1976. « Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. » *J Biol Chem* 251 (16): 4936-4946. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/956169>.

Poland, A. et J. C. Knutson. 1982. « 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. » *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22: 517-554. doi: 10.1146/annurev.pa.22.040182.002505.

Pollack, Lisa. 2012. « The return of the US manufacturer. ». <https://ftalphaville.ft.com/2012/04/04/947201/the-return-of-the-us-manufacturer/>.

Pot, C., H. Jin, A. Awasthi, S. M. Liu, C. Y. Lai, R. Madan, A. H. Sharpe, C. L. Karp, S. C. Miaw, I. C. Ho et V. K. Kuchroo. 2009. « Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. » *J Immunol* 183 (2): 797-801. doi: 10.4049/jimmunol.0901233.

Prochazkova, J., A. Kozubik, M. Machala et J. Vondracek. 2011. « Differential effects of indirubin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signalling in liver progenitor cells. » *Toxicology* 279 (1-3): 146-154. doi: 10.1016/j.tox.2010.10.003.

Psychoyos, A., G. Nikas et A. Gravanis. 1995. « The role of prostaglandins in blastocyst implantation. » *Hum Reprod* 10 Suppl 2: 30-42. doi: 10.1093/humrep/10.suppl_2.30.

Puel, A., S. Cypowyj, J. Bustamante, J. F. Wright, L. Liu, H. K. Lim, M. Migaud, L. Israel, M. Chrabieh, M. Audry, M. Gumbleton, A. Toulon, C. Bodemer, J. El-Baghdadi, M. Whitters, T. Paradis, J. Brooks, M. Collins, N. M. Wolfman, S. Al-Muhsen, M. Galicchio, L. Abel, C. Picard et J. L. Casanova. 2011. « Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. » *Science* 332 (6025): 65-68. doi: 10.1126/science.1200439.

Puga, A., C. Ma et J. L. Marlowe. 2009. « The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. » *Biochem Pharmacol* 77 (4): 713-722. doi: 10.1016/j.bcp.2008.08.031.

Qin, H., L. Wang, T. Feng, C. O. Elson, S. A. Niyongere, S. J. Lee, S. L. Reynolds, C. T. Weaver, K. Roarty, R. Serra, E. N. Benveniste et Y. Cong. 2009. « TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. » *J Immunol* 183 (1): 97-105. doi: 10.4049/jimmunol.0801986.

Quintana, F. J., A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka et H. L. Weiner. 2008. « Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. » *Nature* 453 (7191): 65-71. doi: 10.1038/nature06880.

Quintana, F. J., H. Jin, E. J. Burns, M. Nadeau, A. Yeste, D. Kumar, M. Rangachari, C. Zhu, S. Xiao, J. Seavitt, K. Georgopoulos et V. K. Kuchroo. 2012. « Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing IL2 expression. » *Nat Immunol* 13 (8): 770-777. doi: 10.1038/ni.2363.

Quintana, F. J., G. Murugaiyan, M. F. Farez, M. Mitsdoerffer, A. M. Tukpah, E. J. Burns et H. L. Weiner. 2010. « An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (48): 20768-20773. doi: 10.1073/pnas.1009201107.

Quintana, F. J., A. Yeste et I. D. Mascanfroni. 2015. « Role and therapeutic value of dendritic cells in central nervous system autoimmunity. » *Cell Death Differ* 22 (2): 215-224. doi: 10.1038/cdd.2014.125.

Raetz, C. R. et C. Whitfield. 2002. « Lipopolysaccharide endotoxins. » *Annu Rev Biochem* 71: 635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

Raghupathy, R. 1997. « Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. » *Immunol Today* 18 (10): 478-482. doi: 10.1016/s0167-5699(97)01127-4.

Rannug, A., U. Rannug, H. S. Rosenkranz, L. Winqvist, R. Westerholm, E. Agurell et A. K. Grafstrom. 1987. « Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. » *J Biol Chem* 262 (32): 15422-15427. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2824460>.

Ratajczak, W., P. Niedzwiedzka-Rystwej, B. Tokarz-Deptula et W. Deptula. 2018. « Immunological memory cells. » *Cent Eur J Immunol* 43 (2): 194-203. doi: 10.5114/ceji.2018.77390.

Raymond, M., V. Q. Van, K. Wakahara, M. Rubio et M. Sarfati. 2011. « Lung dendritic cells induce T(H)17 cells that produce T(H)2 cytokines, express GATA-3, and promote airway inflammation. » *J Allergy Clin Immunol* 128 (1): 192-201 e196. doi: 10.1016/j.jaci.2011.04.029.

Raziel, A., M. Schachter, D. Strassburger, O. Bern, R. Ron-El et S. Friedler. 2007. « Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure. » *Fertil Steril* 87 (1): 198-201. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.062.

Reed, J. et S. A. Wetzel. 2018. « CD4(+) T Cell Differentiation and Activation. » *Methods Mol Biol* 1803: 335-351. doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4_20.

Reinhard, G., A. Noll, H. Schlebusch, P. Mallmann et A. V. Ruecker. 1998. « Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. » *Biochem Biophys Res Commun* 245 (3): 933-938. doi: 10.1006/bbrc.1998.8549.

Reisz-Porszasz, S., M. R. Probst, B. N. Fukunaga et O. Hankinson. 1994. « Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). » *Mol Cell Biol* 14 (9): 6075-6086. doi: 10.1128/mcb.14.9.6075.

Ren, L., Y. Yu, L. Wang, Z. Zhu, R. Lu et Z. Yao. 2016. « Hypoxia-induced CCL28 promotes recruitment of regulatory T cells and tumor growth in liver cancer. » *Oncotarget* 7 (46): 75763-75773. doi: 10.18632/oncotarget.12409.

Renauld, J. C. 2003. « Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. » *Nat Rev Immunol* 3 (8): 667-676. doi: 10.1038/nri1153.

Rengarajan, J., K. A. Mowen, K. D. McBride, E. D. Smith, H. Singh et L. H. Glimcher. 2002. « Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. » *J Exp Med* 195 (8): 1003-1012. doi: 10.1084/jem.20011128.

Revel, A., H. Raanani, E. Younglai, J. Xu, I. Rogers, R. Han, J. F. Savouret et R. F. Casper. 2003. « Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. » *J Appl Toxicol* 23 (4): 255-261. doi: 10.1002/jat.916.

Richardson, A., I. Gallos, S. Dobson, B. K. Campbell, A. Coomarasamy et N. Raine-Fenning. 2015. « Accuracy of first-trimester ultrasound in diagnosis of intrauterine pregnancy prior to visualization of the yolk sac: a systematic review and meta-analysis. » *Ultrasound Obstet Gynecol* 46 (2): 142-149. doi: 10.1002/uog.14725.

- Riethmacher, D., V. Brinkmann et C. Birchmeier. 1995. « A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (3): 855-859. doi: 10.1073/pnas.92.3.855.
- Riley, S. C., R. Leask, T. Chard, N. C. Wathen, A. A. Calder et D. C. Howe. 1999. « Secretion of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into the intrauterine compartments during early pregnancy. » *Mol Hum Reprod* 5 (4): 376-381. doi: 10.1093/molehr/5.4.376.
- Rinehart, J. 2007. « Recurrent implantation failure: definition. » *J Assist Reprod Genet* 24 (7): 284-287. doi: 10.1007/s10815-007-9147-4.
- Ritter, R., M. Scheringer, M. MacLeod, C. Moeckel, K. C. Jones et K. Hungerbuhler. 2011. « Intrinsic human elimination half-lives of polychlorinated biphenyls derived from the temporal evolution of cross-sectional biomonitoring data from the United Kingdom. » *Environ Health Perspect* 119 (2): 225-231. doi: 10.1289/ehp.1002211.
- Robertson, S. A., A. S. Care et L. M. Moldenhauer. 2018. « Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. » *J Clin Invest* 128 (10): 4224-4235. doi: 10.1172/JCI122182.
- Robertson, S. A. et L. M. Moldenhauer. 2014. « Immunological determinants of implantation success. » *Int J Dev Biol* 58 (2-4): 205-217. doi: 10.1387/ijdb.140096sr.
- Rocuts, F., X. Zhang, J. Yan, Y. Yue, M. Thomas, F. H. Bach, E. Czismadia et H. Wang. 2010. « Bilirubin promotes de novo generation of T regulatory cells. » *Cell Transplant* 19 (4): 443-451. doi: 10.3727/096368909X484680.
- Rohlman, D., D. Pham, Z. Yu, L. B. Steppan et N. I. Kerkvliet. 2012. « Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Perturbations in Gene Expression during Early Stages of CD4(+) T-cell Differentiation. » *Front Immunol* 3: 223. doi: 10.3389/fimmu.2012.00223.
- Rosales, C. et E. Uribe-Querol. 2017. « Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. » *Biomed Res Int* 2017: 9042851. doi: 10.1155/2017/9042851.
- Rose, M., J. Holland, A. Dowding, S. R. Petch, S. White, A. Fernandes et D. Mortimer. 2015. « Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. » *Food Chem Toxicol* 78: 1-9. doi: 10.1016/j.fct.2014.12.018.

Rota, M., C. Bosetti, S. Boccia, P. Boffetta et C. La Vecchia. 2014. « Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers: an updated systematic review and a meta-analysis to 2014. » *Arch Toxicol* 88 (8): 1479-1490. doi: 10.1007/s00204-014-1296-5.

Rothhammer, V. et F. J. Quintana. 2019. « The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. » *Nat Rev Immunol* 19 (3): 184-197. doi: 10.1038/s41577-019-0125-8.

Ruiz-Alonso, M., D. Blesa, P. Diaz-Gimeno, E. Gomez, M. Fernandez-Sanchez, F. Carranza, J. Carrera, F. Vilella, A. Pellicer et C. Simon. 2013. « The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. » *Fertil Steril* 100 (3): 818-824. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.004.

Safe, S. 1990. « Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). » *Crit Rev Toxicol* 21 (1): 51-88. doi: 10.3109/10408449009089873.

Saito, Shigeru, Satomi Miyazaki et Yasushi Sasaki. 2006. « Th1/Th2 Balance of the Implantation Site in Humans. » In *Immunology of Pregnancy*, sous la dir. de Gil Mor, 37-48. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-34944-8_4.

Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi et T. Nomura. 2006. « Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. » *Immunol Rev* 212: 8-27. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh et M. Toda. 1995. « Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. » *J Immunol* 155 (3): 1151-1164. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636184>.

Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura et M. Ono. 2008. « Regulatory T cells and immune tolerance. » *Cell* 133 (5): 775-787. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009.

Saki, N., S. Abroun, M. Soleimani, Y. Mortazavi, S. Kaviani et E. Arefian. 2014. « The roles of miR-146a in the differentiation of Jurkat T-lymphoblasts. » *Hematology* 19 (3): 141-147. doi: 10.1179/1607845413Y.0000000105.

- Salimi Elizei, S., M. S. Poormasjedi-Meibod, X. Wang, M. Kheirandish et A. Ghahary. 2017. « Kynurenic acid downregulates IL-17/IL-23 axis in vitro. » *Mol Cell Biochem* 431 (1-2): 55-65. doi: 10.1007/s11010-017-2975-3.
- Salleh, N. et N. Giribabu. 2014. « Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. » *ScientificWorldJournal* 2014: 201514. doi: 10.1155/2014/201514.
- Sallusto, F. 2016. « Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. » *Annu Rev Immunol* 34: 317-334. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112056.
- Sallusto, F. et A. Lanzavecchia. 2002. « The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. » *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S127-132. doi: 10.1186/ar567.
- Sangiliano, B., N. M. Perez, D. F. Moreira et J. E. Belizario. 2014. « Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control. » *Mediators Inflamm* 2014: 821043. doi: 10.1155/2014/821043.
- Sansom, D. M. 2000. « CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? » *Immunology* 101 (2): 169-177. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x.
- Santiago-Josefat, B., E. Pozo-Guisado, S. Mulero-Navarro et P. M. Fernandez-Salguero. 2001. « Proteasome inhibition induces nuclear translocation and transcriptional activation of the dioxin receptor in mouse embryo primary fibroblasts in the absence of xenobiotics. » *Mol Cell Biol* 21 (5): 1700-1709. doi: 10.1128/MCB.21.5.1700-1709.2001.
- Saraswathy, M. et S. Gong. 2013. « Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. » *Biotechnol Adv* 31 (8): 1397-1407. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.06.004.
- Saric, N., M. Selby, V. Ramaswamy, M. Kool, B. Stockinger, C. Hogstrand, D. Williamson, S. Marino, M. D. Taylor, S. C. Clifford et M. A. Basson. 2020. « The AHR pathway represses TGFbeta-SMAD3 signalling and has a potent tumour suppressive role in SHH medulloblastoma. » *Sci Rep* 10 (1): 148. doi: 10.1038/s41598-019-56876-z.
- Sasaki, A., H. Yasukawa, T. Shouda, T. Kitamura, I. Dikic et A. Yoshimura. 2000. « CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. » *J Biol Chem* 275 (38): 29338-29347. doi: 10.1074/jbc.M003456200.
- Schmetterer, K. G. et W. F. Pickl. 2017. « The IL-10/STAT3 axis: Contributions to immune tolerance by thymus and peripherally derived regulatory T-cells. » *Eur J Immunol* 47 (8): 1256-1265. doi: 10.1002/eji.201646710.

Schmidt, A., P. Groth, B. Haendler, H. Hess-Stumpp, J. Krätzschmar, H. Seidel, M. Thaele et B. Weiss. 2005. Gene Expression During the Implantation Window: Microarray Analysis of Human Endometrial Samples. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Schmidt, J. V. et C. A. Bradfield. 1996. « Ah receptor signaling pathways. » *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55-89. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.55.

Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon et C. A. Bradfield. 1996. « Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (13): 6731-6736. doi: 10.1073/pnas.93.13.6731.

Schmitt, E. G., D. Haribhai, J. B. Williams, P. Aggarwal, S. Jia, L. M. Charbonnier, K. Yan, R. Lorier, A. Turner, J. Ziegelbauer, P. Georgiev, P. Simpson, N. H. Salzman, M. J. Hessner, U. Broeckel, T. A. Chatila et C. B. Williams. 2012. « IL-10 produced by induced regulatory T cells (iTregs) controls colitis and pathogenic ex-iTregs during immunotherapy. » *J Immunol* 189 (12): 5638-5648. doi: 10.4049/jimmunol.1200936.

Schulze-Koops, H. et J. R. Kalden. 2001. « The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. » *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15 (5): 677-691. doi: 10.1053/berh.2001.0187.

Schwenger, G. T., R. Fournier, C. C. Kok, V. A. Mordvinov, D. Yeoman et C. J. Sanderson. 2001. « GATA-3 has dual regulatory functions in human interleukin-5 transcription. » *J Biol Chem* 276 (51): 48502-48509. doi: 10.1074/jbc.M107836200.

Scriba, T. J., B. Kalsdorf, D. A. Abrahams, F. Isaacs, J. Hofmeister, G. Black, H. Y. Hassan, R. J. Wilkinson, G. Walzl, S. J. Gelderbloem, H. Mahomed, G. D. Hussey et W. A. Hanekom. 2008. « Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. » *J Immunol* 180 (3): 1962-1970. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1962.

Sebina, I. et M. Pepper. 2018. « Humoral immune responses to infection: common mechanisms and unique strategies to combat pathogen immune evasion tactics. » *Curr Opin Immunol* 51: 46-54. doi: 10.1016/j.co.2018.02.001.

Seif, F., M. Khoshmirsafo, H. Aazami, M. Mohsenzadegan, G. Sedighi et M. Bahar. 2017. « The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. » *Cell Commun Signal* 15 (1): 23. doi: 10.1186/s12964-017-0177-y.

Seli, E., U. A. Kayisli, H. Cakmak, O. Bukulmez, I. Bildirici, O. Guzeloglu-Kayisli et A. Arici. 2005. « Removal of hydrosalpinges increases endometrial leukaemia inhibitory factor (LIF)

expression at the time of the implantation window. » *Hum Reprod* 20 (11): 3012-3017. doi: 10.1093/humrep/dei188.

Sfanos, K. S., T. C. Bruno, C. H. Maris, L. Xu, C. J. Thoburn, A. M. DeMarzo, A. K. Meeker, W. B. Isaacs et C. G. Drake. 2008. « Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. » *Clin Cancer Res* 14 (11): 3254-3261. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5164.

Shah, K., W. W. Lee, S. H. Lee, S. H. Kim, S. W. Kang, J. Craft et I. Kang. 2010. « Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. » *Arthritis Res Ther* 12 (2): R53. doi: 10.1186/ar2964.

Shang, B., Y. Liu, S. J. Jiang et Y. Liu. 2015. « Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. » *Sci Rep* 5: 15179. doi: 10.1038/srep15179.

Shao, S., X. Yu et L. Shen. 2018. « Autoimmune thyroid diseases and Th17/Treg lymphocytes. » *Life Sci* 192: 160-165. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.026.

Sharma, A. et P. Kumar. 2012. « Understanding implantation window, a crucial phenomenon. » *J Hum Reprod Sci* 5 (1): 2-6. doi: 10.4103/0974-1208.97777.

Sheikhi, A., K. Saadati, R. Salmani, N. Yahaghi, A. Sheikhi et D. R. Siemens. 2011. « In vitro modulation of natural killer activity of human peripheral blood mononuclear cells against prostate tumor cell line. » *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33 (4): 700-708. doi: 10.3109/08923973.2011.561437.

Shen, T., J. Zheng, H. Liang, C. Xu, X. Chen, T. Zhang, Q. Xu et F. Lu. 2011. « Characteristics and PD-1 expression of peripheral CD4+CD127loCD25hiFoxP3+ Treg cells in chronic HCV infected-patients. » *Virol J* 8: 279. doi: 10.1186/1743-422X-8-279.

Shevach, E. M. et A. M. Thornton. 2014. « tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. » *Immunol Rev* 259 (1): 88-102. doi: 10.1111/imr.12160.

Shimada, S., R. Nishida, M. Takeda, K. Iwabuchi, R. Kishi, K. Onoe, H. Minakami et H. Yamada. 2006. « Natural killer, natural killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage. » *Am J Reprod Immunol* 56 (3): 193-200. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00417.x.

- Shin, J. H., L. Zhang, O. Murillo-Sauca, J. Kim, H. E. Kohrt, J. D. Bui et J. B. Sunwoo. 2013. « Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (30): 12391-12396. doi: 10.1073/pnas.1302856110.
- Simoneit, Bernd R. T. 2002. « Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. » *Applied Geochemistry* 17 (3): 129-162. doi: [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(01\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(01)00061-0).
- Singh, N. P., U. P. Singh, B. Singh, R. L. Price, M. Nagarkatti et P. S. Nagarkatti. 2011. « Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. » *PLoS One* 6 (8): e23522. doi: 10.1371/journal.pone.0023522.
- Skupinska, K., I. Misiewicz et T. Kasprzycka-Guttman. 2004. « Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. » *Acta Pol Pharm* 61 (3): 233-240. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15481250>.
- Smith, K. M., L. Pottage, E. R. Thomas, A. J. Leishman, T. N. Doig, D. Xu, F. Y. Liew et P. Garside. 2000. « Th1 and Th2 CD4+ T cells provide help for B cell clonal expansion and antibody synthesis in a similar manner in vivo. » *J Immunol* 165 (6): 3136-3144. doi: 10.4049/jimmunol.165.6.3136.
- Sokol, C. L., N. Q. Chu, S. Yu, S. A. Nish, T. M. Laufer et R. Medzhitov. 2009. « Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. » *Nat Immunol* 10 (7): 713-720. doi: 10.1038/ni.1738.
- Soshilov, A. et M. S. Denison. 2008. « Role of the Per/Arnt/Sim domains in ligand-dependent transformation of the aryl hydrocarbon receptor. » *J Biol Chem* 283 (47): 32995-33005. doi: 10.1074/jbc.M802414200.
- Soteriades, E. S., J. Kim, C. A. Christophi et S. N. Kales. 2019. « Cancer Incidence and Mortality in Firefighters: A State-of-the-Art Review and Meta-Analysis. » *Asian Pac J Cancer Prev* 20 (11): 3221-3231. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.11.3221.
- Spellberg, B. et J. E. Edwards, Jr. 2001. « Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. » *Clin Infect Dis* 32 (1): 76-102. doi: 10.1086/317537.
- Spencer, L. A. et P. F. Weller. 2010. « Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. » *Immunol Cell Biol* 88 (3): 250-256. doi: 10.1038/icb.2009.115.

Spink, B. C., M. J. Fasco, J. F. Gierthy et D. C. Spink. 1998. « 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate upregulates the Ah receptor and differentially alters CYP1B1 and CYP1A1 expression in MCF-7 breast cancer cells. » *J Cell Biochem* 70 (3): 289-296. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9706865>.

St Paul, M. et P. S. Ohashi. 2020. « The Roles of CD8(+) T Cell Subsets in Antitumor Immunity. » *Trends Cell Biol* 30 (9): 695-704. doi: 10.1016/j.tcb.2020.06.003.

Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman et R. D. Schreiber. 1998. « How cells respond to interferons. » *Annu Rev Biochem* 67: 227-264. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227.

Starr, T. K., S. C. Jameson et K. A. Hogquist. 2003. « Positive and negative selection of T cells. » *Annu Rev Immunol* 21: 139-176. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107.

Starsichova, A., E. Hruba, E. Slabakova, Z. Pernicova, J. Prochazkova, K. Pencikova, V. Seda, M. Kabatkova, J. Vondracek, A. Kozubik, M. Machala et K. Soucek. 2012. « TGF-beta1 signaling plays a dominant role in the crosstalk between TGF-beta1 and the aryl hydrocarbon receptor ligand in prostate epithelial cells. » *Cell Signal* 24 (8): 1665-1676. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.04.008.

Stec, A. A., K. E. Dickens, M. Salden, F. E. Hewitt, D. P. Watts, P. E. Houldsworth et F. L. Martin. 2018. « Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Elevated Cancer Incidence in Firefighters. » *Sci Rep* 8 (1): 2476. doi: 10.1038/s41598-018-20616-6.

Steinke, J. W. et L. Borish. 2001. « Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. » *Respir Res* 2 (2): 66-70. doi: 10.1186/rr40.

Stejskalova, L., Z. Dvorak et P. Pavek. 2011. « Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. » *Curr Drug Metab* 12 (2): 198-212. doi: 10.2174/138920011795016818.

Stephens, G. L., Q. Wang, B. Swerdlow, G. Bhat, R. Kolbeck et M. Fung. 2013. « Kynurenone 3-monooxygenase mediates inhibition of Th17 differentiation via catabolism of endogenous aryl hydrocarbon receptor ligands. » *Eur J Immunol* 43 (7): 1727-1734. Research Support, Non-U.S. Gov't. doi: 10.1002/eji.201242779.

Stevens, E. A., J. D. Mezrich et C. A. Bradfield. 2009. « The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. » *Immunology* 127 (3): 299-311. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03054.x.

- Stewart, C. A., H. Metheny, N. Iida, L. Smith, M. Hanson, F. Steinhagen, R. M. Leighty, A. Roers, C. L. Karp, W. Muller et G. Trinchieri. 2013. « Interferon-dependent IL-10 production by Tregs limits tumor Th17 inflammation. » *J Clin Invest* 123 (11): 4859-4874. doi: 10.1172/JCI65180.
- Stockinger, B., C. Bourgeois et G. Kassiotis. 2006. « CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. » *Immunol Rev* 211: 39-48. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00381.x.
- Stockinger, B., P. Di Meglio, M. Gialitakis et J. H. Duarte. 2014. « The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. » *Annu Rev Immunol* 32: 403-432. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120245.
- Stockinger, B., M. Veldhoen et K. Hirota. 2009. « Modulation of Th17 development and function by activation of the aryl hydrocarbon receptor—the role of endogenous ligands. » *Eur J Immunol* 39 (3): 652-654. doi: 10.1002/eji.200839134.
- Stritesky, G. L., N. Yeh et M. H. Kaplan. 2008. « IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. » *J Immunol* 181 (9): 5948-5955. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.5948.
- Sugita, S., Y. Kawazoe, A. Imai, T. Kawaguchi, S. Horie, H. Keino, M. Takahashi et M. Mochizuki. 2013. « Role of IL-22- and TNF-alpha-producing Th22 cells in uveitis patients with Behcet's disease. » *J Immunol* 190 (11): 5799-5808. doi: 10.4049/jimmunol.1202677.
- Sun, Y. V., D. R. Boverhof, L. D. Burgoon, M. R. Fielden et T. R. Zacharewski. 2004. « Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. » *Nucleic Acids Res* 32 (15): 4512-4523. doi: 10.1093/nar/gkh782.
- Sundrud, M. S., S. M. Grill, D. Ni, K. Nagata, S. S. Alkan, A. Subramaniam et D. Unutmaz. 2003. « Genetic reprogramming of primary human T cells reveals functional plasticity in Th cell differentiation. » *J Immunol* 171 (7): 3542-3549. doi: 10.4049/jimmunol.171.7.3542.
- Suto, A., D. Kashiwakuma, S. Kagami, K. Hirose, N. Watanabe, K. Yokote, Y. Saito, T. Nakayama, M. J. Grusby, I. Iwamoto et H. Nakajima. 2008. « Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. » *J Exp Med* 205 (6): 1369-1379. doi: 10.1084/jem.20072057.
- Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber et J. S. Remington. 1988. « Interferon-gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii. » *Science* 240 (4851): 516-518. doi: 10.1126/science.3128869.

Sykes, L., D. A. MacIntyre, X. J. Yap, T. G. Teoh et P. R. Bennett. 2012. « The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. » *Mediators Inflamm* 2012: 967629. doi: 10.1155/2012/967629.

Szulc-Dabrowska, L., M. Gierynska, D. Depczynska, A. Schollenberger et F. N. Toka. 2015. « [Th17 lymphocytes in bacterial infections]. » *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 69: 398-417. doi: 10.5604/17322693.1147868.

Tabarkiewicz, J., K. Pogoda, A. Karczmarczyk, P. Pozarowski et K. Giannopoulos. 2015. « The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. » *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 63 (6): 435-449. doi: 10.1007/s00005-015-0344-z.

Tagliani, E. et A. Erlebacher. 2011. « Dendritic cell function at the maternal-fetal interface. » *Expert Rev Clin Immunol* 7 (5): 593-602. doi: 10.1586/eci.11.52.

Tajima, H., R. Tajiki-Nishino, Y. Watanabe et T. Fukuyama. 2019. « Direct activation of aryl hydrocarbon receptor by benzo[a]pyrene elicits T-helper 2-driven proinflammatory responses in a mouse model of allergic dermatitis. » *J Appl Toxicol* 39 (7): 936-944. doi: 10.1002/jat.3782.

Tajima, H., R. Tajiki-Nishino, Y. Watanabe, K. Kurata et T. Fukuyama. 2020. « Activation of aryl hydrocarbon receptor by benzo[a]pyrene increases interleukin 33 expression and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. » *J Appl Toxicol* 40 (11): 1545-1553. doi: 10.1002/jat.4017.

Takatori, H., Y. Kanno, W. T. Watford, C. M. Tato, G. Weiss, Ivanov, II, D. R. Littman et J. J. O'Shea. 2009. « Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. » *J Exp Med* 206 (1): 35-41. doi: 10.1084/jem.20072713.

Takeda, K., T. Tanaka, W. Shi, M. Matsumoto, M. Minami, S. Kashiwamura, K. Nakanishi, N. Yoshida, T. Kishimoto et S. Akira. 1996. « Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. » *Nature* 380 (6575): 627-630. doi: 10.1038/380627a0.

Takenaka, M. C., S. Robson et F. J. Quintana. 2016. « Regulation of the T Cell Response by CD39. » *Trends Immunol* 37 (7): 427-439. doi: 10.1016/j.it.2016.04.009.

Takeuchi, S., M. Iida, H. Yabushita, T. Matsuda et H. Kojima. 2008. « In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. » *Chemosphere* 74 (1): 155-165. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.08.015.

Tang, Y. M., Y. Y. Wo, J. Stewart, A. L. Hawkins, C. A. Griffin, T. R. Sutter et W. F. Greenlee. 1996. « Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. » *J Biol Chem* 271 (45): 28324-28330. doi: 10.1074/jbc.271.45.28324.

Taube, J. M., R. A. Anders, G. D. Young, H. Xu, R. Sharma, T. L. McMiller, S. Chen, A. P. Klein, D. M. Pardoll, S. L. Topalian et L. Chen. 2012. « Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. » *Sci Transl Med* 4 (127): 127ra137. doi: 10.1126/scitranslmed.3003689.

Tedeschi, G., E. Albani, E. M. Borroni, V. Parini, A. M. Bruculeri, E. Maffioli, A. Negri, S. Nonnis, M. Maccarrone et P. E. Levi-Setti. 2017. « Proteomic profile of maternal-aged blastocoel fluid suggests a novel role for ubiquitin system in blastocyst quality. » *J Assist Reprod Genet* 34 (2): 225-238. doi: 10.1007/s10815-016-0842-x.

Teh, W. T., J. McBain et P. Rogers. 2016. « What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? » *J Assist Reprod Genet* 33 (11): 1419-1430. doi: 10.1007/s10815-016-0773-6.

Terada, A., H. Minoura et N. Toyoda. 1997. « Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. » *J Assist Reprod Genet* 14 (7): 404-411. doi: 10.1007/BF02766149.

Terashima, J., S. Sampei, M. Iidzuka, A. Ohsakama, C. Tachikawa, J. Satoh, K. Kudo, W. Habano et S. Ozawa. 2016. « VEGF expression is regulated by HIF-1alpha and ARNT in 3D KYSE-70, esophageal cancer cell spheroids. » *Cell Biol Int* 40 (11): 1187-1194. doi: 10.1002/cbin.10656.

Tezabwala, B. U., P. M. Johnson et R. C. Rees. 1989. « Inhibition of pregnancy viability in mice following IL-2 administration. » *Immunology* 67 (1): 115-119. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2786842>.

Theodore J. Yun, Edward A. Clark. 1998. « Cooperation, Mechanisms of Cellular. » *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, 1998.

Theofanakis, C., P. Drakakis, A. Besharat et D. Loutradis. 2017. « Human Chorionic Gonadotropin: The Pregnancy Hormone and More. » *Int J Mol Sci* 18 (5). doi: 10.3390/ijms18051059.

Thery, C. et S. Amigorena. 2001. « The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. » *Curr Opin Immunol* 13 (1): 45-51. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00180-1.

Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld et J. N. Ihle. 1996. « Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. » *Nature* 382 (6587): 171-174. doi: 10.1038/382171a0.

Thomas, K., A. Thomson, S. Wood, C. Kingsland, G. Vince et I. Lewis-Jones. 2003. « Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome. » *Fertil Steril* 80 (3): 502-507. doi: 10.1016/s0015-0282(03)00792-1.

Thompson, R. H., H. Dong, C. M. Lohse, B. C. Leibovich, M. L. Blute, J. C. Cheville et E. D. Kwon. 2007. « PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. » *Clin Cancer Res* 13 (6): 1757-1761. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2599.

Thordardottir, S., B. N. Hangalapura, T. Hutten, M. Cossu, J. Spanholtz, N. Schaap, T. R. Radstake, R. van der Voort et H. Dolstra. 2014. « The aryl hydrocarbon receptor antagonist StemRegenin 1 promotes human plasmacytoid and myeloid dendritic cell development from CD34+ hematopoietic progenitor cells. » *Stem Cells Dev* 23 (9): 955-967. doi: 10.1089/scd.2013.0521.

Tian, J., Y. Feng, H. Fu, H. Q. Xie, J. X. Jiang et B. Zhao. 2015. « The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals. » *Environ Sci Technol* 49 (16): 9518-9531. doi: 10.1021/acs.est.5b00385.

Tijet, N., P. C. Boutros, I. D. Moffat, A. B. Okey, J. Tuomisto et R. Pohjanvirta. 2006. « Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. » *Mol Pharmacol* 69 (1): 140-153. doi: 10.1124/mol.105.018705.

Timeva, T., A. Shterev et S. Kyurkchiev. 2014. « Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. » *J Reprod Infertil* 15 (4): 173-183. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473625>.

Tokura, Y., T. Mori et R. Hino. 2010. « Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases. » *J UOEH* 32 (4): 317-328. doi: 10.7888/juoeh.32.317.

Tong, Z., X. O. Yang, H. Yan, W. Liu, X. Niu, Y. Shi, W. Fang, B. Xiong, Y. Wan et C. Dong. 2012. « A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. » *PLoS One* 7 (4): e34959. doi: 10.1371/journal.pone.0034959.

Traber, G. L., C. C. Chen, Y. Y. Huang, M. Spoor, J. Roos, M. A. Frens, D. Straumann et C. Grimm. 2012. « Albino mice as an animal model for infantile nystagmus syndrome. » *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53 (9): 5737-5747. doi: 10.1167/iovs.12-10137.

Tran, D. Q., H. Ramsey et E. M. Shevach. 2007. « Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. » *Blood* 110 (8): 2983-2990. doi: 10.1182/blood-2007-06-094656.

Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin et H. Spits. 2009. « Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. » *Nat Immunol* 10 (8): 864-871. doi: 10.1038/ni.1770.

Trikha, P. et D. A. Lee. 2020. « The role of AhR in transcriptional regulation of immune cell development and function. » *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1873 (1): 188335. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188335.

Trinchieri, G. 2007. « Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. » *J Exp Med* 204 (2): 239-243. doi: 10.1084/jem.20070104.

Trinchieri, G., S. Pflanz et R. A. Kastlein. 2003. « The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. » *Immunity* 19 (5): 641-644. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00296-6.

Tsai, C. H., Y. Lee, C. H. Li, Y. W. Cheng et J. J. Kang. 2020. « Down-regulation of aryl hydrocarbon receptor intensifies carcinogen-induced retinal lesion via SOCS3-STAT3 signaling. » *Cell Biol Toxicol* 36 (3): 223-242. doi: 10.1007/s10565-019-09499-z.

Tsuchiya, Y., M. Nakajima, S. Itoh, M. Iwanari et T. Yokoi. 2003. « Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines. » *Toxicol Sci* 72 (2): 253-259. doi: 10.1093/toxsci/kfg022.

Tsuda, S., A. Nakashima, T. Shima et S. Saito. 2019. « New Paradigm in the Role of Regulatory T Cells During Pregnancy. » *Front Immunol* 10: 573. doi: 10.3389/fimmu.2019.00573.

Turvey, S. E. et D. H. Broide. 2010. « Innate immunity. » *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2): S24-32. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.016.

Tzartos, J. S., M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri et L. Fugger. 2008. « Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is

associated with active disease in multiple sclerosis. » *Am J Pathol* 172 (1): 146-155. doi: 10.2353/ajpath.2008.070690.

Usui, T., R. Nishikomori, A. Kitani et W. Strober. 2003. « GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. » *Immunity* 18 (3): 415-428. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00057-8.

van der Merwe, P. A., D. L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley et S. J. Davis. 1997. « CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. » *J Exp Med* 185 (3): 393-403. doi: 10.1084/jem.185.3.393.

van Mourik, M. S., N. S. Macklon et C. J. Heijnen. 2009. « Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. » *J Leukoc Biol* 85 (1): 4-19. doi: 10.1189/jlb.0708395.

Vandenbark, A. A. et H. Offner. 2008. « Critical evaluation of regulatory T cells in autoimmunity: are the most potent regulatory specificities being ignored? » *Immunology* 125 (1): 1-13. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02900.x.

Vazquez, S., J. A. Aquilina, J. F. Jamie, M. M. Sheil et R. J. Truscott. 2002. « Novel protein modification by kynurenone in human lenses. » *J Biol Chem* 277 (7): 4867-4873. doi: 10.1074/jbc.M107529200.

Veldhoen, M., K. Hirota, J. Christensen, A. O'Garra et B. Stockinger. 2009. « Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. » *J Exp Med* 206 (1): 43-49. doi: 10.1084/jem.20081438.

Veldhoen, M., K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J. C. Renaud et B. Stockinger. 2008. « The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. » *Nature* 453 (7191): 106-109. doi: 10.1038/nature06881.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley et B. Stockinger. 2006. « TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. » *Immunity* 24 (2): 179-189. doi: 10.1016/j.jimmuni.2006.01.001.

Velicky, P., M. Knofler et J. Pollheimer. 2016. « Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control. » *Cell Adh Migr* 10 (1-2): 154-162. doi: 10.1080/19336918.2015.1089376.

- Verma, A., R. Mathur, A. Farooque, V. Kaul, S. Gupta et B. S. Dwarakanath. 2019. « T-Regulatory Cells In Tumor Progression And Therapy. » *Cancer Manag Res* 11: 10731-10747. doi: 10.2147/CMAR.S228887.
- Vernon, M., J. E. Stern, G. D. Ball, D. Wninger, J. Mayer et C. Racowsky. 2011. « Utility of the national embryo morphology data collection by the Society for Assisted Reproductive Technologies (SART): correlation between day-3 morphology grade and live-birth outcome. » *Fertil Steril* 95 (8): 2761-2763. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.02.008.
- Viotti, M. 2020. « Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. » *Genes (Basel)* 11 (6). doi: 10.3390/genes11060602.
- Vocanson, M., A. Rozieres, A. Hennino, G. Poyet, V. Gaillard, S. Renaudineau, A. Achachi, J. Benetiere, D. Kaiserlian, B. Dubois et J. F. Nicolas. 2010. « Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. » *J Allergy Clin Immunol* 126 (2): 280-289, 289 e281-287. doi: 10.1016/j.jaci.2010.05.022.
- Vogel, C. F., W. Li, D. Wu, J. K. Miller, C. Sweeney, G. Lazennec, Y. Fujisawa et F. Matsumura. 2011. « Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF-kappaB subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression. » *Arch Biochem Biophys* 512 (1): 78-86. doi: 10.1016/j.abb.2011.05.011.
- Vos, Q., A. Lees, Z. Q. Wu, C. M. Snapper et J. J. Mond. 2000. « B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. » *Immunol Rev* 176: 154-170. doi: 10.1034/j.1600-065x.2000.00607.x.
- Wada, T., H. Sunaga, K. Miyata, H. Shirasaki, Y. Uchiyama et S. Shimba. 2016. « Aryl Hydrocarbon Receptor Plays Protective Roles against High Fat Diet (HFD)-induced Hepatic Steatosis and the Subsequent Lipotoxicity via Direct Transcriptional Regulation of Socs3 Gene Expression. » *J Biol Chem* 291 (13): 7004-7016. doi: 10.1074/jbc.M115.693655.
- Waite, J. C. et D. Skokos. 2012. « Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. » *Int J Inflam* 2012: 819467. doi: 10.1155/2012/819467.
- Walker, C. G., S. Meier, M. D. Littlejohn, K. Lehnert, J. R. Roche et M. D. Mitchell. 2010. « Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. » *BMC Genomics* 11: 474. doi: 10.1186/1471-2164-11-474.

- Walker, L. S. 2013. « Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. » *J Autoimmun* 45: 49-57. doi: 10.1016/j.jaut.2013.06.006.
- Walker, L. S. et M. von Herrath. 2016. « CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes. » *Clin Exp Immunol* 183 (1): 16-29. doi: 10.1111/cei.12672.
- Walker, M. R., D. J. Kasprowicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner et S. F. Ziegler. 2003. « Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. » *J Clin Invest* 112 (9): 1437-1443. doi: 10.1172/JCI19441.
- Wan, J., Y. Wu, X. Ji, L. Huang, W. Cai, Z. Su, S. Wang et H. Xu. 2020. « IL-9 and IL-9-producing cells in tumor immunity. » *Cell Commun Signal* 18 (1): 50. doi: 10.1186/s12964-020-00538-5.
- Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D. M. Pardoll, D. Zeng et H. Yu. 2009. « IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. » *J Exp Med* 206 (7): 1457-1464. doi: 10.1084/jem.20090207.
- Wang, L., T. Yi, W. Zhang, D. M. Pardoll et H. Yu. 2010. « IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. » *Cancer Res* 70 (24): 10112-10120. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0775.
- Wang, W., N. Sung, A. Gilman-Sachs et J. Kwak-Kim. 2020. « T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. » *Front Immunol* 11: 2025. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025.
- Wang, Y. H., K. S. Voo, B. Liu, C. Y. Chen, B. Uygungil, W. Spoede, J. A. Bernstein, D. P. Huston et Y. J. Liu. 2010. « A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. » *J Exp Med* 207 (11): 2479-2491. doi: 10.1084/jem.20101376.
- Wang, Y., T. Pan, L. Li, H. Wang, D. Zhang et H. Yang. 2018. « Benzo(a)pyrene promotes Hep-G2 cell migration and invasion by upregulating phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression. » *Oncol Lett* 15 (6): 8325-8332. doi: 10.3892/ol.2018.8379.
- Wang, Y., L. L. Wang, H. Y. Yang, F. F. Wang, X. X. Zhang et Y. P. Bai. 2016. « Interleukin-21 is associated with the severity of psoriasis vulgaris through promoting CD4+ T cells to differentiate into Th17 cells. » *Am J Transl Res* 8 (7): 3188-3196. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27508040>.

Wassarman, P., J. Chen, N. Cohen, E. Litscher, C. Liu, H. Qi et Z. Williams. 1999. « Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. » *J Exp Zool* 285 (3): 251-258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497324>.

Webb, L. M. et E. D. Tait Wojno. 2017. « The role of rare innate immune cells in Type 2 immune activation against parasitic helminths. » *Parasitology* 144 (10): 1288-1301. doi: 10.1017/S0031182017000488.

Wegmann, T. G., H. Lin, L. Guilbert et T. R. Mosmann. 1993. « Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? » *Immunol Today* 14 (7): 353-356. doi: 10.1016/0167-5699(93)90235-D.

Wei, Y., L. Zhao, W. He, J. Yang, C. Geng, Y. Chen, T. Liu, H. Chen et Y. Li. 2016. « Benzo[a]pyrene promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis likely through the Aryl hydrocarbon receptor and ERK-dependent induction of MMP9 and c-myc. » *Int J Oncol* 49 (5): 2055-2063. doi: 10.3892/ijo.2016.3674.

Weiner, H. L., A. P. da Cunha, F. Quintana et H. Wu. 2011. « Oral tolerance. » *Immunol Rev* 241 (1): 241-259. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x.

Weiss, A., R. L. Wiskocil et J. D. Stobo. 1984. « The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. » *J Immunol* 133 (1): 123-128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327821>.

Wheeler, J. L., K. C. Martin, E. Ressegue et B. P. Lawrence. 2014. « Differential consequences of two distinct AhR ligands on innate and adaptive immune responses to influenza A virus. » *Toxicol Sci* 137 (2): 324-334. doi: 10.1093/toxsci/kft255.

Whitlock, J. P., Jr. 1999. « Induction of cytochrome P4501A1. » *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 103-125. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103.

Wilke, C. M., K. Bishop, D. Fox et W. Zou. 2011. « Deciphering the role of Th17 cells in human disease. » *Trends Immunol* 32 (12): 603-611. doi: 10.1016/j.it.2011.08.003.

Willermain, F., J. T. Rosenbaum, B. Bodaghi, H. L. Rosenzweig, S. Childers, T. Behrend, G. Wildner et A. D. Dick. 2012. « Interplay between innate and adaptive immunity in the development of non-infectious uveitis. » *Prog Retin Eye Res* 31 (2): 182-194. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.004.

- Winans, B., A. Nagari, M. Chae, C. M. Post, C. I. Ko, A. Puga, W. L. Kraus et B. P. Lawrence. 2015. « Linking the aryl hydrocarbon receptor with altered DNA methylation patterns and developmentally induced aberrant antiviral CD8+ T cell responses. » *J Immunol* 194 (9): 4446-4457. doi: 10.4049/jimmunol.1402044.
- Wincent, E., N. Amini, S. Luecke, H. Glatt, J. Bergman, C. Crescenzi, A. Rannug et U. Rannug. 2009. « The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. » *J Biol Chem* 284 (5): 2690-2696. doi: 10.1074/jbc.M808321200.
- Wing, K. et S. Sakaguchi. 2010. « Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. » *Nat Immunol* 11 (1): 7-13. doi: 10.1038/ni.1818.
- Winkler, I., B. Wilczynska, A. Bojarska-Junak, M. Gogacz, A. Adamiak, K. Postawski, D. Darmochwal-Kolarz, T. Rechberger et J. Tabarkiewicz. 2015. « Regulatory T lymphocytes and transforming growth factor beta in epithelial ovarian tumors-prognostic significance. » *J Ovarian Res* 8: 39. doi: 10.1186/s13048-015-0164-0.
- Winship, A., J. Correia, J. G. Zhang, N. A. Nicola et E. Dimitriadis. 2015. « Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Inhibition during Mid-Gestation Impairs Trophoblast Invasion and Spiral Artery Remodelling during Pregnancy in Mice. » *PLoS One* 10 (10): e0129110. doi: 10.1371/journal.pone.0129110.
- Workman, C. J., A. L. Szymczak-Workman, L. W. Collison, M. R. Pillai et D. A. Vignali. 2009. « The development and function of regulatory T cells. » *Cell Mol Life Sci* 66 (16): 2603-2622. doi: 10.1007/s00018-009-0026-2.
- Wozniak, K. L., C. R. Hole, J. Yano, P. L. Fidel et F. L. Wormley. 2014. « Characterization of IL-22 and antimicrobial peptide production in mice protected against pulmonary Cryptococcus neoformans infection. » *Microbiology* 160 (Pt 7): 1440-1452. doi: 10.1099/mic.0.073445-0.
- Wu, H. Y., F. J. Quintana, A. P. da Cunha, B. T. Dake, T. Koeglsperger, S. C. Starossm et H. L. Weiner. 2011. « In vivo induction of Tr1 cells via mucosal dendritic cells and AHR signaling. » *PLoS One* 6 (8): e23618. doi: 10.1371/journal.pone.0023618.
- Xu, J., R. Fang, L. Chen, D. Chen, J. P. Xiao, W. Yang, H. Wang, X. Song, T. Ma, S. Bo, C. Shi, J. Ren, L. Huang, L. Y. Cai, B. Yao, X. S. Xie et S. Lu. 2016. « Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (42): 11907-11912. doi: 10.1073/pnas.1613294113.

Xue, W., D. Yan et Q. Kan. 2019. « Interleukin-35 as an Emerging Player in Tumor Microenvironment. » *J Cancer* 10 (9): 2074-2082. doi: 10.7150/jca.29170.

Yakin, K., O. Oktem et B. Urman. 2019. « Intrauterine administration of peripheral mononuclear cells in recurrent implantation failure: a systematic review and meta-analysis. » *Sci Rep* 9 (1): 3897. doi: 10.1038/s41598-019-40521-w.

Yamada, H., M. Morikawa, E. H. Kato, S. Shimada, G. Kobashi et H. Minakami. 2003. « Pre-conceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. » *Am J Reprod Immunol* 50 (4): 351-354. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.00095.x.

Yamada, Y., S. Endo et K. Inada. 1996. « Plasma cytokine levels in patients with severe burn injury--with reference to the relationship between infection and prognosis. » *Burns* 22 (8): 587-593. doi: 10.1016/s0305-4179(96)00052-6.

Yamamoto, J., K. Ihara, H. Nakayama, S. Hikino, K. Satoh, N. Kubo, T. Iida, Y. Fujii et T. Hara. 2004. « Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. » *Life Sci* 74 (8): 1039-1049. doi: 10.1016/j.lfs.2003.07.022.

Yamazaki, T., X. O. Yang, Y. Chung, A. Fukunaga, R. Nurieva, B. Pappu, N. Martin-Orozco, H. S. Kang, L. Ma, A. D. Panopoulos, S. Craig, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian et C. Dong. 2008. « CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. » *J Immunol* 181 (12): 8391-8401. doi: 10.4049/jimmunol.181.12.8391.

Yang, D. N., J. H. Wu, L. Geng, L. J. Cao, Q. J. Zhang, J. Q. Luo, A. Kallen, Z. H. Hou, W. P. Qian, Y. Shi et X. Xia. 2020. « Efficacy of intrauterine perfusion of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for infertile women before embryo transfer: meta-analysis. » *J Obstet Gynaecol* 40 (7): 961-968. doi: 10.1080/01443615.2019.1673711.

Yang, J., L. Zhang, C. Yu, X. F. Yang et H. Wang. 2014. « Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. » *Biomark Res* 2 (1): 1. doi: 10.1186/2050-7771-2-1.

Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten et C. Dong. 2008. « T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. » *Immunity* 28 (1): 29-39. doi: 10.1016/j.jimmuni.2007.11.016.

Ye, J., R. S. Livergood et G. Peng. 2013. « The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. » *Am J Pathol* 182 (1): 10-20. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.041.

Ye, L. L., X. S. Wei, M. Zhang, Y. R. Niu et Q. Zhou. 2018. « The Significance of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in CD8(+) Regulatory T Cells and CD8(+) Effector T Cells. » *Front Immunol* 9: 583. doi: 10.3389/fimmu.2018.00583.

Yeh, F. L., W. L. Lin, H. D. Shen et R. H. Fang. 1999. « Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. » *Burns* 25 (2): 131-136. doi: 10.1016/s0305-4179(98)00150-8.

Yeh, N., N. L. Glosson, N. Wang, L. Guindon, C. McKinley, H. Hamada, Q. Li, R. W. Dutton, P. Shrikant, B. Zhou, R. R. Brutkiewicz, J. S. Blum et M. H. Kaplan. 2010. « Tc17 cells are capable of mediating immunity to vaccinia virus by acquisition of a cytotoxic phenotype. » *J Immunol* 185 (4): 2089-2098. doi: 10.4049/jimmunol.1000818.

Yi, T., J. Wang, K. Zhu, Y. Tang, S. Huang, X. Shui, Y. Ding, C. Chen et W. Lei. 2018. « Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. » *Biomed Res Int* 2018: 6058784. doi: 10.1155/2018/6058784.

Yoshimoto, T. 2018. « The Hunt for the Source of Primary Interleukin-4: How We Discovered That Natural Killer T Cells and Basophils Determine T Helper Type 2 Cell Differentiation In Vivo. » *Front Immunol* 9: 716. doi: 10.3389/fimmu.2018.00716.

Yoshinaga, K. 2008. « Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. » *Semin Cell Dev Biol* 19 (2): 161-169. doi: 10.1016/j.semcd.2007.10.006.

Yoshioka, S., H. Fujiwara, T. Nakayama, K. Kosaka, T. Mori et S. Fujii. 2006a. « Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. » *Hum Reprod* 21 (12): 3290-3294. doi: 10.1093/humrep/del312.

_____. 2006b. « Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. » *Human Reproduction* 21 (12): 3290-3294. doi: 10.1093/humrep/del312.

Youakim, Sami. 2006. « Risk of Cancer Among Firefighters: A Quantitative Review of Selected Malignancies. » *Archives of Environmental & Occupational Health* 61 (5): 223-231. doi: 10.3200/AEOH.61.5.223-231.

Yu, N., W. Yan, T. Yin, Y. Wang, Y. Guo, D. Zhou, M. Xu, J. Ding et J. Yang. 2015. « HCG-Activated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Promote Trophoblast Cell Invasion. » *PLoS One* 10 (6): e0125589. doi: 10.1371/journal.pone.0125589.

Yu, N., J. Yang, Y. Guo, J. Fang, T. Yin, J. Luo, X. Li, W. Li, Q. Zhao, Y. Zou et W. Xu. 2014. « Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) improves endometrial receptivity in mice with embryonic implantation dysfunction. » *Am J Reprod Immunol* 71 (1): 24-33. doi: 10.1111/aji.12150.

Yu, N., B. Zhang, M. Xu, S. Wang, R. Liu, J. Wu, J. Yang et L. Feng. 2016. « Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activated by HCG improves the implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure: a prospective randomized study. » *Am J Reprod Immunol* 76 (3): 212-216. doi: 10.1111/aji.12542.

Zaccaria, K. J. et P. R. McClure. 2013. « Using immunotoxicity information to improve cancer risk assessment for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. » *Int J Toxicol* 32 (4): 236-250. doi: 10.1177/1091581813492829.

Zaid, A., L. K. Mackay, A. Rahimpour, A. Braun, M. Veldhoen, F. R. Carbone, J. H. Manton, W. R. Heath et S. N. Mueller. 2014. « Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (14): 5307-5312. doi: 10.1073/pnas.1322292111.

Zelante, T., J. Fric, A. Y. Wong et P. Ricciardi-Castagnoli. 2012. « Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. » *Front Immunol* 3: 161. doi: 10.3389/fimmu.2012.00161.

Zelinkova, Z. et T. Wenzl. 2015. « The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food - A Review. » *Polycycl Aromat Compd* 35 (2-4): 248-284. doi: 10.1080/10406638.2014.918550.

Zeyneloglu, H. B. et G. Onalan. 2014. « Remedies for recurrent implantation failure. » *Semin Reprod Med* 32 (4): 297-305. doi: 10.1055/s-0034-1375182.

Zhang, C., H. Li, L. Qin, J. Ge, Z. Qi, M. Talukder, Y. H. Li et J. L. Li. 2019. « Nuclear receptor AHR-mediated xenobiotic detoxification pathway involves in atrazine-induced nephrotoxicity in quail (*Coturnix C. coturnix*). » *Environ Pollut* 253: 889-898. doi: 10.1016/j.envpol.2019.07.058.

Zhang, H., P. Dutta, J. Liu, N. Sabri, Y. Song, W. X. Li et J. Li. 2019. « Tumour cell-intrinsic CTLA4 regulates PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. » *J Cell Mol Med* 23 (1): 535-542. doi: 10.1111/jcmm.13956.

Zhang, J. M. et J. An. 2007. « Cytokines, inflammation, and pain. » *Int Anesthesiol Clin* 45 (2): 27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.

Zhang, N. et M. J. Bevan. 2011. « CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. » *Immunity* 35 (2): 161-168. doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.

Zhang, Y., S. Dong, H. Wang, S. Tao et R. Kiyama. 2016. « Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. » *Environ Pollut* 213: 809-824. doi: 10.1016/j.envpol.2016.03.050.

Zhang, Y. Q., R. J. Joost van Neerven, S. W. Van Gool, L. Coorevits, M. de Boer et J. L. Ceuppens. 1997. « B7-CD28 interaction is a late acting co-stimulatory signal for human T cell responses. » *Int Immunol* 9 (8): 1095-1102. doi: 10.1093/intimm/9.8.1095.

Zhao, F., B. Hoechst, J. Gamrekelashvili, L. A. Ormandy, T. Voigtlander, H. Wedemeyer, K. Ylaya, X. W. Wang, S. M. Hewitt, M. P. Manns, F. Korangy et T. F. Greten. 2012. « Human CCR4+ CCR6+ Th17 cells suppress autologous CD8+ T cell responses. » *J Immunol* 188 (12): 6055-6062. doi: 10.4049/jimmunol.1102918.

Zhao, Y., P. Han, L. Liu, X. Wang, P. Xu, H. Wang, T. Yu, Y. Sun, L. Li, T. Sun, X. Liu, H. Zhou, J. Qiu, L. Wang, J. Peng, S. Xu et M. Hou. 2019. « Indirubin modulates CD4(+) T-cell homeostasis via PD1/PTEN/AKT signalling pathway in immune thrombocytopenia. » *J Cell Mol Med* 23 (3): 1885-1898. doi: 10.1111/jcmm.14089.

Zhao, Y. Y., Y. Yu et X. W. Zhang. 2018. « Overall Blastocyst Quality, Trophectoderm Grade, and Inner Cell Mass Grade Predict Pregnancy Outcome in Euploid Blastocyst Transfer Cycles. » *Chin Med J (Engl)* 131 (11): 1261-1267. doi: 10.4103/0366-6999.232808.

Zheng, S. G. 2008. « The Critical Role of TGF-beta1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. » *Int J Clin Exp Med* 1 (3): 192-202.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079658>.

_____. 2013. « Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? » *Am J Clin Exp Immunol* 2 (1): 94-106.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885327>.

Zheng, W. 1997. « The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. » *Cell Immunol*. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80240-8.

Zheng, W. et C. R. Jefcoate. 2005. « Steroidogenic factor-1 interacts with cAMP response element-binding protein to mediate cAMP stimulation of CYP1B1 via a far upstream enhancer. » *Mol Pharmacol* 67 (2): 499-512. doi: 10.1124/mol.104.005504.

- Zhou, L. 2016. « AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. » *Trends Immunol* 37 (1): 17-31. doi: 10.1016/j.it.2015.11.007.
- Zhou, L., M. M. Chong et D. R. Littman. 2009. « Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. » *Immunity* 30 (5): 646-655. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.001.
- Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard et D. R. Littman. 2007. « IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. » *Nat Immunol* 8 (9): 967-974. doi: 10.1038/ni1488.
- Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler et D. R. Littman. 2008. « TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. » *Nature* 453 (7192): 236-240. doi: 10.1038/nature06878.
- Zhou, Q., S. Qin, J. Zhang, L. Zhon, Z. Pen et T. Xing. 2017. « 1,25(OH)2D3 induces regulatory T cell differentiation by influencing the VDR/PLC-gamma1/TGF-beta1/pathway. » *Mol Immunol* 91: 156-164. doi: 10.1016/j.molimm.2017.09.006.
- Zhou, X., S. L. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal et J. A. Bluestone. 2009. « Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. » *Nat Immunol* 10 (9): 1000-1007. doi: 10.1038/ni.1774.
- Zhou, Y., N. Shao, N. Aierken, C. Xie, R. Ye, X. Qian, Z. Hu, J. Zhang et Y. Lin. 2017. « Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: a meta-analysis. » *J Cancer* 8 (19): 4098-4105. doi: 10.7150/jca.21030.
- Zhu, J., J. Cote-Sierra, L. Guo et W. E. Paul. 2003. « Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. » *Immunity* 19 (5): 739-748. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00292-9.
- Zhu, J., L. Guo, C. J. Watson, J. Hu-Li et W. E. Paul. 2001. « Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. » *J Immunol* 166 (12): 7276-7281. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7276.
- Zhu, J., B. Min, J. Hu-Li, C. J. Watson, A. Grinberg, Q. Wang, N. Killeen, J. F. Urban, Jr., L. Guo et W. E. Paul. 2004. « Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. » *Nat Immunol* 5 (11): 1157-1165. doi: 10.1038/ni1128.

Zhu, J. et W. E. Paul. 2008. « CD4 T cells: fates, functions, and faults. » *Blood* 112 (5): 1557-1569. doi: 10.1182/blood-2008-05-078154.

Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo et W. E. Paul. 2006. « GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. » *Cell Res* 16 (1): 3-10. doi: 10.1038/sj.cr.7310002.

Zhu, J., H. Yamane et W. E. Paul. 2010. « Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). » *Annu Rev Immunol* 28: 445-489. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.

Zhuang, Y., Z. Huang, J. Nishida, M. Brown, L. Zhang et H. Huang. 2009. « A continuous T-bet expression is required to silence the interleukin-4-producing potential in T helper type 1 cells. » *Immunology* 128 (1): 34-42. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03049.x.

Ziesche, E., M. Bachmann, H. Kleinert, J. Pfeilschifter et H. Muhl. 2007. « The interleukin-22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells. » *J Biol Chem* 282 (22): 16006-16015. doi: 10.1074/jbc.M611040200.

Zohni, K. M., I. Gat et C. Librach. 2016. « Recurrent implantation failure: a comprehensive review. » *Minerva Ginecol* 68 (6): 653-667. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982235>.

Zotos, D., J. M. Coquet, Y. Zhang, A. Light, K. D'Costa, A. Kallies, L. M. Corcoran, D. I. Godfrey, K. M. Toellner, M. J. Smyth, S. L. Nutt et D. M. Tarlinton. 2010. « IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. » *J Exp Med* 207 (2): 365-378. doi: 10.1084/jem.20091777.

ARTICLE ANNEXE

Intrauterine administration of activated peripheral blood mononuclear cells in intrauterine insemination: a prospective double-blind randomized clinical trial.

Auteurs :

Joao F.,¹ Lamoureux J.,¹ Ricaud G.,² Disdier M.,¹ Blais V.,¹ Adam C.,¹ Ates S.,¹ Xiao C.W.,¹ Duval, C.,¹ Bernier J.,² Benkhalifa M.^{1,3} & Miron P.^{1,2}

¹ Centre d'aide médicale à la procréation FERTILYS, 1950 Rue Maurice-Gauvin #103, Laval, Québec, Canada, H7S 1Z5

² Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand Frappier, 531 Boul des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

³ Université Picardie Jules Verne, Médecine et Biologie de la Reproduction et laboratoire PERITOX, CBH-CHU Amiens Picardie, 1 Rond-Point du Professeur Christian Cabrol, Amiens, France, 80054

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Cet article sera soumis au **Journal of reproductive immunology**

Contribution des auteurs : L'article a été rédigé par Fabien Joao et Julie Lamoureux. Guillaume Ricaud a réalisé tous les tests biologiques. Marjorie Disdier et Véronique Blais ont réalisé les immunomodulations. Jacques Bernier, Moncef Benkhalifa et Pierre Miron ont révisé l'article.

Intrauterine administration of activated peripheral blood mononuclear cells in intrauterine insemination: a prospective double-blind randomized clinical trial

Joao F.,¹ Lamoureux J.,¹ Ricaud G.,² Disdier M.,¹ Blais V.,¹ Adam C.,¹ Ates S.,¹ Xiao C.W.,¹ Duval, C.,¹ Bernier J.,² Benkhalifa M.^{1,3} & Miron P.^{1,2}

¹ Centre d'aide médicale à la procréation FERTILYS, 1950 Rue Maurice-Gauvin #103, Laval, Québec, Canada, H7S 1Z5

² Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand Frappier, 531 Boul des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

³ Université Picardie Jules Verne, Médecine et Biologie de la Reproduction et laboratoire PERITOX, CBH-CHU Amiens Picardie, 1 Rond-Point du Professeur Christian Cabrol, Amiens, France, 80054

Corresponding author:

Fabien Joao, M.Sc

fabien.joao@fertilys.org

1950 Rue Maurice-Gauvin #103, Laval, QC, Canada H7S 1Z5

Author's email addresses:

Julie Lamoureux, DMD, M.Sc: Drjuliel@comcast.net

Guillaume Ricaud, M.Sc: Guillaume.ricaud@iaf.inrs.ca

Marjorie Disdier, B.Sc: Marjorie.disdier@fertilys.org

Véronique Blais, M.Sc: Veronique.blais@fertilys.org

Cécile Adam, PhD: Adamcecile24@gmail.com

Senem Ates, MD, FRCSC: senem.ates@fertilys.org

Chen Wei Xiao, MD, FRCSC: cheng-wei.xiao@fertilys.org

Duval Cyntia, PhD: Cyntia.duval@fertilys.org

Jacques Bernier, PhD: Jacques.bernier@iaf.inrs.ca

Moncef Benkhalifa, PhD: Moncef.benkhalifa@fertilys.org

Pierre Miron, MD, PhD, FRCSC: Pierre.miron@fertilys.org

ABSTRACT

Intrauterine administration of activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) increases the implantation, clinical pregnancy, and live births rates in patients with repeated implantation failures (RIF). However, no study has yet evaluated their effect in a context of IUI¹. This prospective double-blind randomized study includes 213 patients performing an IUI cycle at the Fertilys clinic (Laval, Quebec, Canada), recruited between March 2017 and November 2019. On the day of IUI (day 0, D0), peripheric blood was collected and a portion was used to assess distribution of CD4 T lymphocyte populations (n=73). PBMC were isolated and stimulated with phytohemagglutinin (PHA) and human chorionic gonadotrophic hormone (hCG) for 48 hours. On day 2 (D2), expression levels of 13 cytokines (n=58) and distribution of CD4 T lymphocyte populations (n=73) were evaluated. Demographic and clinical characteristics were not significantly different between the PBMC (n=108) and the control groups (n=105). Although there is a 6% (Odd Ratio=1.7) increase in biochemical pregnancy rate in the group that received endometrial immunomodulation with PBMC, the difference did not reach statistical significance. Otherwise, significantly higher levels of IL-2, IL-13, IL-17a, IL-17f ($p<0.05$) and TNF α ($p=0.005$) were found in patients whose IUI has led to pregnancy. Biochemical and clinical pregnancy prediction models ($p=0.005$ and $p=0.004$) controlling for TNF α levels increased the odds ratio when PBMC were administered. Although endometrium immunomodulation by PBMC did not reach a statistically significant increase in IUI pregnancy rates, measuring secreted TNF α after hCG activation could help better estimate the probabilities of pregnancy specific to each patient.

Keywords: immunomodulation, PBMC, intrauterine insemination, cytokines, assisted reproductive technology, lymphocytes.

¹ Intrauterine insemination

1. INTRODUCTION

During each menstrual cycle, the endometrium undergoes morphological and functional changes to accommodate the future embryo. This differentiation is mainly regulated by two types of hormones, estrogen and progesterone. If this regulation is disturbed, the normal development of the endometrium could be affected and could have a negative impact on the implantation of the embryo.

In addition to the endocrine system, the immune system is also shown to be involved in the cyclic differentiation of the endometrium and embryo implantation process. In mice, it has been shown that certain populations of immune cells seem to be associated with endometrial cell differentiation and embryo implantation (Takabatake *et al.* 1997a and b.; Fujita *et al.* 1998 and Kosaka *et al.* 2003). In 2002, Nakayama *et al.* have demonstrated the involvement of PBMC, peripheral blood mononuclear cells composed of lymphocytes, monocytes and dendritic cells, in the development and invasion of mouse blastocysts *in vitro* (Nakayama *et al.*, 2002). It has also been shown that supplementation with hCG increases the effects of PBMC on the observed parameters (Nakayama *et al.* 2002). In addition, hCG appears to stimulate the production of certain chemokines (Kosaka *et al.* 2002) and could participate in embryo implantation by inducing functional changes in PBMC (Fujiwara *et al.*, 2006).

In 2006, Yoshioka *et al.* have developed a new approach to human embryo transfer using PBMC (Yoshioka *et al.* 2006). Patients with at least 4 implantation failures were enrolled in the study and intrauterine administration of PBMC was performed 3 days before embryo transfer. PBMC were obtained on the day of egg retrieval and then cultured for 2 days in the presence of hCG before being administered in the patient's uterus. When blastocysts were transferred on day 5, the study showed a significant increase in implantation rate, clinical pregnancy, and live births in the PBMC group (Yoshioka *et al.* 2006).

More recent studies seem to confirm the relevance of the use of PBMC in patients with RIF. When the embryo is transferred on day 3 or 5, clinical pregnancy and live birth rates are significantly higher in patients treated with PBMC (Okitsu *et al.* 2011; Madkour *et al.* 2015;

Makrigiannakis *et al.* 2015; Yu *et al.* 2016; Li *et al.* 2017 and Nobijari *et al.* 2019). However, no study has evaluated the potential of endometrium immunomodulation in a context of intrauterine inseminations (IUI). The growing interest of the scientific community and the promising success rates of this new approach have led the fertility center Fertilys to propose a double-blind randomized clinical trial in collaboration with the Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier on the endometrium immunomodulation by PBMC in IUI cycles. The main objective of this study was to investigate the clinical effectiveness of the intrauterine administration of activated PBMC on IUI pregnancy rates. The secondary objective was to establish pregnancy prediction models based on demographic, clinical and immunological characteristics.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Patients

All patients aged 18 and over performing IUI with their partner's sperm and agreeing to participate were included in this study. Two hundred seventeen patients aged 22 to 46 years were enrolled and individually randomized using block randomization (block size = 4) in two parallel groups. However, only 213 patients received IUI treatment at the Fertilys clinic in Laval, Quebec, Canada, between March 2017 and November 2019; four cycles were canceled during treatment and IUI was not performed for these patients (Figure 1).

2.2 IUI cycle

Patients were given 5mg/day of Letrozole between the 3rd and the 7th day of their cycle. In a few instances, human menopausal gonadotropins (Menopur, Ferring, Canada) were given to the patient in addition to Letrozole, starting on the 5th day of the cycle until the day of ovulation triggering. In all patients, ovulation was triggered by a subcutaneous injection of 250 µg of recombinant hCG (Ovidrel, Merck, Darmstadt, Germany). When gonadotropins were given, patients were prescribed 200 mg/day of progesterone (Endometrin, Ferring, Canada) 48 hours after hCG trigger until the next menstrual period or until the first viability ultrasound, between the 6th and 10th week of gestation. On the day of IUI, the male partners

produced sperm samples by masturbation. After allowing the samples to liquefy for 10 minutes at 37°C, sperm concentration and motility were evaluated using a Makler® counting chamber. Sperm samples were then placed on a solution containing ready-to-use 80% and 45% SpermFilter gradients (Gynotec B.V., The Netherlands) and centrifuged for 20 minutes at 300g. Pellets were resuspended in SpermWash (Gynotec B.V., The Netherlands) and then centrifuged for 5 minutes at 300g. Final sperm concentration and motility were again evaluated using a Makler® counting chamber. Spermatozoa were then inseminated into the patient's uterine cavity using a Minispace catheter (Laboratoire CCD, Paris, France).

2.3 Preparation and intrauterine administration of PBMC

The day of IUI, PBMC were isolated using a lymphocyte separation medium composed of an iso-osmotic poly-sucrose and sodium diatrizoate solution (Corning, NY, USA). After a centrifugation at 400g for 30 minutes at room temperature (RT), PBMC were washed in Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 1X (DPBS 1X, Corning, USA) and centrifugated again at 400g for 7 min at RT. Concentration was adjusted at 1.10^6 cells/mL by adding global fertilization medium (LifeGlobal, Belgium) supplemented with 10% serum substitute supplement (Irvine Scientific, USA), PHA 1% (LifeTechnologies, USA) and 30 IU of hCG (EMD Millipore, USA). PBMC were then cultured for 48 hours and incubated at 37°C. The cells were finally prepared at a concentration of 1.10^6 cells/400 µL in Sperm Wash (Gynotec B.V., The Netherlands) and administered *in utero* (PBMC group) using a Minispace catheter (Laboratoire CCD, Paris, France) while only Sperm Wash was used for the control group. Lab technicians generated the random allocation sequence; doctors performing the IUI and patients were unaware of the treatment allocation, making this study double-blinded.

2.4 PBMC populations

Changes in PBMC populations were analyzed at cell seeding (D0) and after 48 hours of culture (D2). Percentages of variations in the Th1, Th2, Th17, Th22 and T_{reg} cells populations were determined at D0 and D2 by flow cytometry.

PBMC were cultured at 1.10^6 cells/mL and activated with 50 ng/mL of Phorbol 12-myristate 13-acetate, 1 µg/mL of ionomycin and 1 µg/mL of brefeldin A for 5 hours at 37°C, 5% CO₂. After a wash in DPBS 1X, non-specific binding was blocked by adding 1 µg of human IgG and PBMC were stained with the following surface antibodies for 30 minutes at 4°C in the dark: 0,5 µL of anti CD4/FITC (Biolegend) and 0,5 µL of anti CD25/APC (Biolegend). PBMC were then fixed and permeabilized using the FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) according to manufacturer's instructions. Cells were then stained for 30 minutes at RT with the following intracellular antibodies: 0,5 µL of anti T-bet/BV605 (Biolegend), 0,5 µL of anti IFNγ/APC-Cy7 (Biolegend), 0,5 µL of anti GATA-3/BV421 (Biolegend), 0,5 µL of anti IL-4/BV510 (Biolegend), 0,5 µL of anti IL-17/BV711 (Biolegend), 0,5 µL of anti AHR/PE Cy7 (eBioscience), 0,5 µL of anti IL-22/PerCP (Biolegend) and 0,5 µL of anti FoxP3/PE (Biolegend). After two wash in DPBS 1X, PBMC were analyzed by flow cytometry on a BD™ FACS Fortessa flow cytometer.

2.5 Cytokines expression

All PBMC culture media were frozen at -80°C at D2. Cytokines expression was analyzed using the Human T Helper Cytokine Panel (Biolegend, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. Data were obtained by flow cytometry on a BD™ FACS Fortessa flow cytometer.

2.6 Ethics

This study was performed according to the ethical guidelines regarding studies in which human gametes or embryos are used as materials; these ethical guidelines are issued by the Canadian Institutes of Health Research, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Social Sciences and Humanities Research Council of Canada under the governance of the Assisted Human Reproduction Act, S.C. 2004. This study was approved by the Institut National de la Recherche Scientifique's ethics committee on human research (#CER-16-427) in Laval, Québec, Canada. For this study, an informed and signed consent was obtained from each patient.

2.7 Variables

Biochemical and clinical pregnancy rates were the primary outcomes. Biochemical pregnancy was defined as a β hCG blood test value > 20 IU/L, 3 weeks following IUI. Clinical pregnancy was confirmed by observing foetal viability by ultrasound 6 to 8 weeks of gestation. Predictive variables were separated into demographic and medical history and immunological markers. These included age, duration of infertility, number of previous IUI, number of motile sperm inseminated, distribution of PBMC populations at D0 and D2 and cytokine expression levels. PBMC populations and cytokine expression were analyzed in 58-60 patients. It is important to note that pregnancy rates and demographic and clinical variables were not significantly different between patients with or without cytokine analysis (data not shown).

2.8 Statistics

Descriptive statistics for all variables (mean, medians, standard deviations and interquartile ranges) were computed and distributions were assessed. Any significant difference in baseline (clinical and demographic) variables between treatment and control groups were noted for statistical control purposes. For all bivariate associations, pregnant/non-pregnant patients and distribution of CD4+ T cells at D0/D2 were analyzed using independent Student *t* test when data distribution was normal and Kruskal-Wallis rank test when distributions deviated significantly from normal. Biochemical and clinical pregnancy rates were overall compared between the control and PBMC groups using chi-square test. Stepwise logistic regression models were performed using independent variables that had a bivariate association with the outcome at the $p<0.2$ level to build a predictive model for biochemical and clinical pregnancy. The logistic regression approach used here was a multistep backward deletion approach. Variables were entered together and removed one by one, starting with the highest *p*-value. Only variables with a *p*-value <0.05 were kept in the models. Data is presented as mean \pm standard deviation (SD). Data was analyzed with the

statistical software Stata 15.1 (StataCorp LLC, TX, USA). For all tests, $p<0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

One hundred and five patients were recruited in the PBMC group and 108 in the control group between March 2017 and November 2019. Although already randomized, 4 patients were not included in this study because their IUI cycle was canceled before completion. Table 1 shows the comparison for clinical variables between the groups. Age of patients and number of sperm inseminated were not statistically different between the groups (Table 1). However, duration of infertility was significantly lower ($H_{1df} = 6.275, p<0.05$) and number of previous IUI was significantly higher ($H_{1df} = 4.634, p<0.05$) in the PBMC group (Table 1). Although we observed a clinically interesting 6% and 4% increase in biochemical and clinical pregnancy rates in the PBMC group, these differences were not statistically significant for biochemical ($\chi^2_{1df} = 1.776, p=0.183$) and clinical pregnancy rate ($\chi^2_{1df} = 1.098, p=0.295$). The power of the test *a posteriori* for this bivariate comparison in biochemical pregnancy was small ($\beta = 26\%$ at $\alpha=0.05$) with a total sample size of 213. To obtain a power of 80% with a difference of 6% and a level of significance of $p<0.05$, the total sample size should have been 962. The *a posteriori* power for the comparison in clinical pregnancy was even less ($\beta = 18\%$ at $\alpha=0.05$).

Differences in CD4+ T cells populations at D0 and D2 were evaluated by flow cytometry. In both groups combined, on D2, Th2 ($H_{1df} = 45.652, p<0.0001$), Th22 ($H_{1df} = 40.573, p<0.0001$) and T_{reg} ($H_{1df} = 52.226, p<0.0001$) cells populations were significantly higher while Th17 cell population was significantly lower ($H_{1df} = 6.633, p=0.01$), compared to D0 (Table II). There was however no significant change in Th1 cell population.

Using a human T helper cytokine panel based on fluorescence-encoded beads, thirteen cytokines were quantified in PBMC culture medium at D2. Their concentrations were compared between patients whose IUI has led to pregnancy and non-pregnant patients,

whether they were in treatment or control groups. IL-4, IL-5, IL-6, IL9, IL-10, IL21, IL21 and IFN γ were not statistically different at D2 between pregnant and non-pregnant patients (Supplemental tables I and II). However, IL-2 ($H_{1df} = 5.877, p < 0.05$), IL-13 ($H_{1df} = 4.034, p < 0.05$), IL-17a ($H_{1df} = 4.260, p < 0.05$), IL-17f ($H_{1df} = 5.480, p < 0.05$) and TNF α ($H_{1df} = 7.988, p = 0.005$) were significantly higher in patients whose IUI has led to biochemical pregnancy (Figure 2). Higher levels of IL-13 ($H_{1df} = 4.483, p < 0.05$) and TNF α ($H_{1df} = 7.866, p = 0.005$) were still observed in patients whose IUI has led to clinical pregnancy (Figure 2).

Pregnancy prediction models were built using backward deletion logistic regression. In these models, clinical, cellular cytokines and group variables were introduced. Fifty-eight subjects had cytokines quantified and were used for the computation of this model. It should be noted that the pregnancy rates were not significantly different between those with and without cytokine analysis. In this model, the only variable statistically significant was TNF α for predicting biochemical ($\chi^2_{1df} = 16.231, p < 0.0001$) and clinical ($\chi^2_{1df} = 30.687, p < 0.0001$) pregnancy. Although the group variable was not statistically significant in the models, we included the interaction term to generate marginal probability prediction for each group at various levels of TNF α concentration. These overall models significantly predicted biochemical ($\chi^2_{2df} = 30.657, p < 0.0001$) and clinical ($\chi^2_{2df} = 31.791, p < 0.0001$) pregnancy. Marginal pregnancy probabilities are illustrated in figure 3A for biochemically and 3B for clinically pregnant patients (detailed logistic regression values are shown in supplemental tables III and IV). The higher the TNF α levels, the higher the probability of pregnancy: TNF α values of 12 000 pg/mL show the highest probabilities of biochemical and clinical pregnancies, regardless of the group (Figure 3). It is interesting to note that, at this TNF α levels, there was a non-significant higher probability of pregnancy in the group treated with PBMC, compared to the control group.

4. DISCUSSION

The use of PBMC for endometrial immunomodulation in RIF patients has been studied the past 15 years (Yoshioka *et al.* 2006; Okitsu *et al.* 2011; Madkour *et al.* 2015; Makrigiannakis *et al.* 2015; Yu *et al.* 2016; Li *et al.* 2017 and Nobijari *et al.* 2019). However, the use of PBMC in IUI cycles has never been studied to our knowledge. In this study, we found that intrauterine administration of PBMC showed a higher biochemical pregnancy rate by 6%, compared to the control group, in patients undergoing IUI treatment. This 1.7-fold increase, although clinically relevant, was not statistically different from the control group. The same trend is observed in the literature regarding administration of PBMC in the context of fresh or frozen/thawed embryo transfers. Intrauterine administration of PBMC seems to increase pregnancy rates following embryo transfer, but this increase is never significantly different from the control group in patients with less than 2 RIF (Okitsu *et al.* 2011; Li *et al.* 2017 and Nobijari *et al.* 2019). This could possibly be explained by the clinical profiles of IUI and RIF patients, which can sometimes be quite different. RIF has been associated with advanced maternal age, impaired endometrial function, anatomical abnormalities such as hydrosalpinx, thrombophilia, severe male factors and immunological factors (Bashiri *et al.* 2018). Clinical indications for IUI patients are often unexplained fertility, mild-to-moderate male factor infertility, mild endometriosis and generally, but not exclusively, for patients under the age of 40 (Kandavel and Cheong 2018). Patients undergoing IUI treatments have, in most cases, a milder clinical profile, indicating that administration of PBMC may not be helpful for them. However, it is possible that some of these IUI patients suffer from unexplained pathologies which could reduce their probability of pregnancy. Some immunological factors and the endometrial response to exogenous ovarian stimulation, for example, will not be detected until the patient has experienced treatment failures, but may generally be treated once assessed (Simon and Laufer 2012). It is our belief that this subset of patient population would benefit from a meta-analysis.

Early embryo implantation is characterized by high levels of proinflammatory Th1 cells and cytokines and lower levels of anti-inflammatory Th2 cells (Saito *et al.* 2007). Pregnancy is however associated with a Th2-dominant profile, indicating a shift in the Th1/Th2 ratio

following embryo implantation (Franasiak and Scott 2017), T_{reg} cells being essential to ensure implantation and the progression of pregnancy (Robertson *et al.* 2018). Here, we demonstrated that hCG and PHA activation of PBMC induced a shift in the immunological profile of these cells by increasing the proportion of Th2, Th22 and T_{reg} and decreasing the pro-inflammatory cells populations, Th1 and Th17. Although Th22 cells are generally associated with a pro-inflammatory state, Plank *et al.* (2017) have demonstrated that Th22 cells, another subset of T helper cells that produce IL-22, shown plasticity toward Th1 and Th2 cells *in vitro*. Under Th1 culture conditions, Th2 cells increased IFN γ production, a proinflammatory cytokine, while under Th2 culture condition, they increased IL-13 production, an anti-inflammatory cytokine (Plank *et al.* 2017). Here, we have shown that IL-2, IL-13, IL-17a, IL-17f ($p<0.05$) and TNF α ($p<0.01$) levels were significantly higher in patients whose IUI has led to biochemical pregnancy than non-pregnant patients. Moreover, IL-13 and TNF α were significantly higher in media from PBMC that led to clinical pregnancy. Significant pregnancy prediction models have shown that the highest the expression of TNF α , the higher the probability of pregnancy in IUI treatment. It has already been established *in vitro* and *in vivo* that TNF α is secreted by endometrial cells throughout the menstrual cycle, TNF α mRNA levels being the highest in the secretory phase, during the embryo implantation window, and consistent with serum levels of estradiol and progesterone (Hunt *et al.* 1994; Tabibzadeh *et al.* 1999 and von Wolff *et al.* 1999). It should not be forgotten, however, that the expression levels of cytokines are different in the uterine environment and in the blood, although they are detectable in both cases (Gargiulo *et al.* 2004). In 2006, Thum *et al.* have shown that systemic TNF α levels measured the day of egg retrieval were not significantly different between pregnant and non pregnant patients (Thum *et al.* 2006). However, the TNF α levels measured by Thum *et al.* (2006) were much lower (mean of 53.5 pg/mL in pregnant patients and 63.0 pg/mL in non-pregnant patients) than the ones measured here (13111,7 pg/mL in biochemically pregnant patients and 5706,5 pg/mL in non pregnant patients). This difference might be explained by the fact that, in this study, secreted cytokines levels were measured in PBMC media after 48 hours of culture while Thum *et al.* evaluated systemic TNF α levels. The PBMC activation step could therefore be essential to establish a significant pregnancy prediction model based on secreted TNF α .

Administration of hCG/PHA-activated PBMC two days after IUI seems to increase biochemical pregnancy rate without reaching statistical significance. According to the G*Power software (Institute for Digital Research & Education, CA, USA), this 6% difference between the groups could *a priori* be significant at the 5% level of significance if we were to increase our sample size to 775 patients. This study was then underpowered for what we consider to be a clinically relevant increase in the probability of pregnancy. Nevertheless, with 213 patients, we were still able to establish significant biochemical and clinical pregnancy prediction models using secreted TNF α levels. Larger studies are needed to confirm the results found here, but TNF α -based pregnancy prediction models are an interesting avenue to follow which could lead to new ways to explore infertility in a context of IUI. Altogether, this study supports the clinical potential of lymphocyte phenotyping and evaluation of PBMC's TNF α levels after 48 hours of culture with hCG and PHA to help clinicians estimate the probabilities of pregnancy in IUI patients. In the future, these parameters could even be incorporated into other IUI pregnancy prediction models (Merviel *et al.* 2010 and Arvis *et al.* 2017) to increase the accuracy of these models.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Fertilys embryologists and nurses for their implication in this project. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors have no conflict of interest to declare.

1. REFERENCES

- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., Chen, H., 2013. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. Int. J. Environ. Res. Public Health. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093834>
- Arvis, P., Guivarc'h-Leveque, A., Jaffre, F., Bidet, M., Lehert, P., 2017. Predicting pregnancy after intra-uterine insemination (IUI): a new model incorporating prior evidence. Fertil. Steril. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.1023>
- Bashiri, A., Halper, K.I., Orvieto, R., 2018. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. Reprod. Biol. Endocrinol. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0414-2>

De Groote, D., Zangerle, P.F., Gevaert, Y., Fassotte, M.F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F., Pirenne, J., Gathy, R., Lopez, M., Dehart, I., Igot, D., Baudrihaye, M., Delacroix, D., Franchimont, P., 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine*. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(92\)90062-V](https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90062-V)

Franasiak, J.M., Scott, R.T., 2017. Contribution of immunology to implantation failure of euploid embryos. *Fertil. Steril.* <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.04.019>

Fujita, K., Nakayama, T., Takabatake, K., Higuchi, T., Fujita, J., Maeda, M., Fujiwara, H., Mori, T., 1998. Administration of thymocytes derived from nonpregnant mice induces an endometrial receptive stage and leukaemia inhibitory factor expression in the uterus. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/13.10.2888>

Fujiwara, H., 2006. Immune cells contribute to systemic cross-talk between the embryo and mother during early pregnancy in cooperation with the endocrine system. *Reprod. Med. Biol.* <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2006.00119.x>

Gargiulo, A.R., Fichorova, R.N., Politch, J.A., Hill, J.A., Anderson, D.J., 2004. Detection of implantation-related cytokines in cervicovaginal secretions and peripheral blood of fertile women during ovulatory menstrual cycles. *Fertil. Steril.* <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.03.039>

Hunt, J.S., Roby, K.F., 1994. Implantation factors, in: *Clinical Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1097/00003081-199409000-00017>

Kandavel, V., Cheong, Y., 2018. Does intra-uterine insemination have a place in modern ART practice? *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.08.003>

Kosaka, K., Fujiwara, H., Tatsumi, K., Yoshioka, S., Sato, Y., Egawa, H., Higuchi, T., Nakayama, T., Ueda, M., Maeda, M., Fujii, S., 2002. Human chorionic gonadotropin (HCG) activates monocytes to produce interleukin-8 via a different pathway from luteinizing hormone/HCG receptor system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020341>

Kosaka, K., Fujiwara, H., Tatsumi, K., Yoshioka, S., Higuchi, T., Sato, Y., Nakayama, T., Fujii, S., 2003. Human peripheral blood mononuclear cells enhance cell-cell interaction between human endometrial epithelial cells and BeWo-cell spheroids. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/deg002>

Li, S., Wang, J., Cheng, Y., Zhou, D., Yin, T., Xu, W., Yu, N., Yang, J., 2017. Intrauterine administration of hCG-activated autologous human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) promotes live birth rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. *J. Reprod. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.11.006>

Madkour, A., Bouamoud, N., Louanjli, N., Kaarouch, I., Copin, H., Benkhalifa, M., Sefrioui, O., 2016. Intrauterine insemination of cultured peripheral blood mononuclear cells prior to embryo transfer improves clinical outcome for patients with repeated implantation failures. *Zygote*. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000719>

Makrigiannakis, A., Benkhalifa, M., Vrekoussis, T., Mahjub, S., Kalantaridou, S.N., Gurgan, T., 2015. Repeated implantation failure: A new potential treatment option. *Eur. J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1111/eci.12417>

Merviel, P., Heraud, M.H., Grenier, N., Lourdel, E., Sanguinet, P., Copin, H., 2010. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): An analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil. Steril.* <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.058>

Nakayama, T., Fujiwara, H., Maeda, M., Inoue, T., Yoshioka, S., Mori, T., Fujii, S., 2002. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in early pregnancy promote embryo invasion in vitro: HCG enhances the effects of PBMC. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/17.1.207>

Nobijari, F.F., Arefi, S.S., Moini, A., Taheripanah, R., Fazeli, E., Kharazi, H., Hosseini, S.Z., Hosseini, A., Valojerdi, M.R., Copin, H., Benkhalifa, M., 2019. Endometrium immunomodulation by intrauterine insemination administration of treated peripheral blood mononuclear cell prior frozen/thawed embryos in patients with repeated implantation failure. *Zygote*. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000145>

Okitsu, O., Kiyokawa, M., Oda, T., Miyake, K., Sato, Y., Fujiwara, H., 2011. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. *J. Reprod. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.07.001>

Plank, M.W., Kaiko, G.E., Maltby, S., Weaver, J., Tay, H.L., Shen, W., Wilson, M.S., Durum, S.K., Foster, P.S., 2017. Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601480>

Robertson, S.A., Care, A.S., Moldenhauer, L.M., 2018. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI122182>

Saito, S., Miyazaki, S., Sasaki, Y., 2007. Th1/Th2 Balance of the Implantation Site in Humans, in: Immunology of Pregnancy. https://doi.org/10.1007/0-387-34944-8_4

Simon, A., Laufer, N., 2012. Repeated implantation failure: Clinical approach. *Fertil. Steril.* <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.010>

Tabibzadeh, S., Satyaswaroop, P.G., Von Wolff, M., Strowitzki, T., 1999. Regulation of TNF- α mRNA expression in endometrial cells by TNF- α and by oestrogen withdrawal. *Mol. Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/molehr/5.12.1141>

Takabatake, K., Fujiwara, H., Goto, Y., Nakayama, T., Higuchi, T., Maeda, M., Mori, T., 1997a. Intravenous administration of splenocytes in early pregnancy changes the implantation window in mice. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/12.3.583>

Takabatake, K., Fujiwara, H., Goto, Y., Nakayama, T., Higuchi, T., Fujita, J., Maeda, M., Mori, T., 1997b. Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/12.10.2102>

Thum, M.Y., Abdalla, H.I., Bhaskaran, S., Harden, E.L., Ford, B., Sumar, N., Shehata, H., Bansal, A., 2007. The relationship of systemic TNF- α and IFN- γ with IVF treatment outcome and peripheral blood NK cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00465.x>

Von Wolff, M., Classen-Linke, I., Heid, D., Krusche, C.A., Beier-Hellwig, K., Karl, C., Beier, H.M., 1999. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) in human endometrium and uterine secretion: An evaluation by immunohistochemistry, ELISA and semiquantitative RT-PCR. *Mol. Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/molehr/5.2.146>

Yoshioka, S., Fujiwara, H., Nakayama, T., Kosaka, K., Mori, T., Fujii, S., 2006. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/del312>

Yu, N., Zhang, B., Xu, M., Wang, S., Liu, R., Wu, J., Yang, J., Feng, L., 2016. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) activated by HCG

improves the implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure: a prospective randomized study. Am. J. Reprod. Immunol.

2. TABLES

Table 1. Difference in clinical parameters and pregnancy rates between the control and PBMC group. Values are mean \pm SD. * $p < 0.05$; ns: no significance. PBMC: Peripheral blood mononuclear cells. H : Kruskal-Wallis H statistic value. t : Student t statistic value. χ^2 : Chi square statistic value. df : degrees of freedom.

Parameter	Control (n=108)	PBMC (n=105)	Test value	p-value
Age (years)	33,04 \pm 4,39	32,64 \pm 4,62	$t_{211df} = -0,706$	0,481 (ns)
Duration of infertility (months)	31,32 \pm 24,00	25,16 \pm 17,54	$H_{1df} = 6,275$	0,012 (*)
Number of previous IUI	1,44 \pm 1,59	1,85 \pm 1,61	$H_{1df} = 4,634$	0,031 (*)
Motile sperm inseminated (10^6)	24,36 \pm 28,48	28,54 \pm 27,74	$H_{1df} = 1,474$	0,225 (ns)
Biochemical pregnancy rate (%)	9,26%	15,24%	$\chi^2_{1df} = 1,776$	0,183 (ns)
Clinical pregnancy rate (%)	6,48%	10,48%	$\chi^2_{1df} = 1,098$	0,295 (ns)

Table II. Distribution of CD4 T cells populations at cell seeding and after 48 hours of culture in a medium supplemented with PHA and hCG. Values are mean \pm SD. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; ns: no significance. H : Kruskal-Wallis H statistic value. df : degrees of freedom. Values are presented as a percentage of total CD4 T cells.

Cell type	D0 (n=56)	D2 (n=60)	Test value	p-value
Th1 (%)	11,13 \pm 7,07	10,43 \pm 6,32	$H_{1df} = 0,273$	0,602 (ns)
Th2 (%)	4,41 \pm 3,29	18,53 \pm 15,03	$H_{1df} = 45,652$	< 0,0001 (****)
Th17 (%)	0,75 \pm 0,49	0,53 \pm 0,30	$H_{1df} = 6,633$	0,01 (*)
Th22 (%)	1,17 \pm 1,40	4,75 \pm 5,16	$H_{1df} = 40,573$	< 0,0001 (****)
Treg (%)	0,94 \pm 2,33	4,81 \pm 4,48	$H_{1df} = 52,226$	< 0,0001 (****)

3. LEGENDS

Figure 1. CONSORT 2010 flow diagram of the study. PBMC : Peripheral blood mononuclear cells.

Figure 2. Concentration of IL-2, IL-13, IL-17a, IL-17f and TNF α secreted by PBMC in patients whose IUI has led to pregnancy and non-pregnant patients. Concentration of these cytokines were measured in PBMC after 48 hours of culture in a medium supplemented with PHA and hCG. Values are mean \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p = 0.002$.

Figure 3. Biochemical (A) and clinical (B) pregnancy probabilities at increasing levels of TNF α in the control and PBMC groups. Significant logistic regression models were established using a multistep backward deletion approach for TNF α and the group variable to predict (A) biochemical and (B) clinical pregnancy. PBMC: Peripheral blood mononuclear cells. Data are mean probability \pm Standard Error.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental table I. Cytokines concentration in patients whose IUI has led to biochemical pregnancy compared to non-pregnant patients. H : Kruskal-Wallis H statistic value. df : degrees of freedom. Values are mean \pm SD. ns: no significance.

Cytokine	Pregnant (n=5)	Not pregnant (n=53)	Test value	p-value
IL-2 (pg/mL)	676,66 \pm 157,17	283,80 \pm 455,60	H _{1df} = 5,877	0,015 (*)
IL-4 (pg/mL)	141,22 \pm 79,33	65,62 \pm 60,30	H _{1df} = 1,259	0,262 (ns)
IL-5 (pg/mL)	574,31 \pm 227,87	359,92 \pm 350,82	H _{1df} = 1,023	0,312 (ns)
IL-6 (pg/mL)	11462,16 \pm 0,00	10236,67 \pm 3318,13	H _{1df} = 0,734	0,392 (ns)
IL-9 (pg/mL)	858,55 \pm 301,30	490,02 \pm 449,90	H _{1df} = 1,957	0,162 (ns)
IL-10 (pg/mL)	409,69 \pm 112,91	234,76 \pm 195,34	H _{1df} = 2,627	0,105 (ns)
IL-13 (pg/mL)	1334,65 \pm 466,00	580,26 \pm 498,91	H _{1df} = 4,034	0,045 (*)
IL-17a (pg/mL)	621,19 \pm 183,16	305,58 \pm 280,56	H _{1df} = 4,260	0,039 (*)
IL-17f (pg/mL)	238,49 \pm 49,06	122,79 \pm 130,29	H _{1df} = 5,480	0,019 (*)
IL-21 (pg/mL)	61,03 \pm 17,43	292,85 \pm 1595,21	H _{1df} = 0,403	0,525 (ns)
IL-22 (pg/mL)	54,84 \pm 10,15	51,73 \pm 61,90	H _{1df} = 1,660	0,198 (ns)
IFNg (pg/mL)	6887,22 \pm 1236,33	5666,25 \pm 4165,62	H _{1df} = 0,510	0,475 (ns)
TNF α (pg/mL)	13111,74 \pm 1680,22	5706,52 \pm 4680,67	H _{1df} = 7,988	0,002 (**)

Supplemental table II. Cytokines concentration in patients whose IUI has led to clinical pregnancy compared to non-pregnant patients. H : Kruskal-Wallis H statistic value. df : degrees of freedom. Values are mean \pm SD. ns: no significance.

Cytokine	Pregnant (n=4)	Not pregnant (n=54)	Test value	p-value
IL-2 (pg/mL)	566,79 \pm 145,09	299,22 \pm 465,28	H _{1df} = 3,504	0,061 (ns)
IL-4 (pg/mL)	164,77 \pm 97,79	65,27 \pm 59,78	H _{1df} = 1,661	0,197 (ns)
IL-5 (pg/mL)	667,36 \pm 268,53	357,00 \pm 348,15	H _{1df} = 1,583	0,208 (ns)
IL-6 (pg/mL)	11462,16 \pm 0,00	10259,36 \pm 3290,91	H _{1df} = 0,576	0,448 (ns)
IL-9 (pg/mL)	973,17 \pm 359,74	488,35 \pm 445,80	H _{1df} = 2,261	0,133 (ns)
IL-10 (pg/mL)	391,49 \pm 143,86	239,35 \pm 196,40	H _{1df} = 1,507	0,220 (ns)
IL-13 (pg/mL)	1539,80 \pm 540,17	579,04 \pm 494,26	H _{1df} = 4,483	0,034 (*)
IL-17a (pg/mL)	603,33 \pm 235,33	312,75 \pm 282,85	H _{1df} = 2,449	0,118 (ns)
IL-17f (pg/mL)	199,29 \pm 38,08	127,84 \pm 134,28	H _{1df} = 3,168	0,075 (ns)
IL-21 (pg/mL)	66,88 \pm 21,19	288,12 \pm 1580,47	H _{1df} = 0,539	0,463 (ns)
IL-22 (pg/mL)	47,34 \pm 8,82	52,34 \pm 61,48	H _{1df} = 0,738	0,390 (ns)
IFNg (pg/mL)	7295,87 \pm 1506,39	5658,59 \pm 4126,52	H _{1df} = 0,509	0,476 (ns)
TNF α (pg/mL)	14345,42 \pm 1472,64	5752,27 \pm 4648,48	H _{1df} = 7,886	0,005 (**)

Supplemental table III. Logistic regression values of biochemical pregnancy probabilities at increasing levels of TNF α . PBMC: Peripheral blood mononuclear cells. z : Logistic regression z-statistic.

TNF α concentration (pg/mL)	Probability of pregnancy	Standard error	Control group			PBMC group		
			z	P> z	95% confidence interval	Probability of pregnancy	Standard error	z
2000	0,0043349	0,00659926	0,62	0,533	0,0093504 - 0,180602	0,015669	0,0202948	0,77
4000	0,0082618	0,0115057	0,72	0,473	0,0142889 - 0,308124	0,0294259	0,0319986	0,92
6000	0,0156185	0,0186069	0,84	0,401	0,0208503 - 0,0520873	0,054591	0,0489863	1,11
8000	0,0293324	0,0295777	0,99	0,321	0,02863388 - 0,0873035	0,0990803	0,0729665	1,36
10000	0,054422	0,0464864	1,17	0,242	0,0366544 - 0,1454983	0,1731849	0,1068887	1,62
12000	0,089788	0,0730552	1,35	0,176	0,0443976 - 0,2419735	0,2851703	0,1536279	1,86

Supplemental table IV. Logistic regression values of clinical pregnancy probabilities at increasing levels of TNF α . PBMC: Peripheral blood mononuclear cells. z : Logistic regression z-statistic.

TNF α concentration (pg/mL)	Probability of pregnancy	Standard error	Control group			PBMC group		
			z	P> z	95% confidence interval	Probability of pregnancy	Standard error	z
2000	0,0019296	0,0040635	0,47	0,635	0,0060347 - 0,009894	0,004118	0,0079945	0,52
4000	0,0042156	0,0076343	0,55	0,581	0,0107473 - 0,0191785	0,0089731	0,0148555	0,6
6000	0,0091847	0,0140109	0,66	0,512	0,0182762 - 0,0366455	0,0194405	0,0268818	0,72
8000	0,0198939	0,0249746	0,8	0,426	0,0290554 - 0,0688433	0,0416059	0,0470757	0,88
10000	0,0425539	0,0430823	0,99	0,323	0,0418858 - 0,1269936	0,0868062	0,0795162	1,09
12000	0,0886889	0,0724203	1,22	0,221	0,0532523 - 0,23063	0,1722844	0,1295935	1,33