



HAL
open science

Implication des facteurs génétiques et environnementaux dans la susceptibilité à l'inflammation du système nerveux central

Rémi Marrocco

► **To cite this version:**

Rémi Marrocco. Implication des facteurs génétiques et environnementaux dans la susceptibilité à l'inflammation du système nerveux central. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30132 . tel-03865169

HAL Id: tel-03865169

<https://theses.hal.science/tel-03865169v1>

Submitted on 22 Nov 2022

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Rémi MARROCCO

Le 8 juillet 2022

**Implication des facteurs génétiques et environnementaux dans la
susceptibilité à l'inflammation du système nerveux central**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Unité de recherche :

INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires

Thèse dirigée par

Abdelhadi SAOUDI

Jury

Mme Cécile Delarasse, Rapporteur

M. Guy Gorochov, Rapporteur

Mme Muriel Darnaudéry, Rapporteur

M. Hudrisier Denis, Examineur

M. Nicolas Cenac, Examineur

M. Abdelhadi SAOUDI, Directeur de thèse

*La seule vraie sagesse est de savoir
qu'on ne sait rien*

Socrate.

Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC) faisant intervenir des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. Mes travaux de thèse ont eu pour objectif d'analyser l'implication de deux facteurs génétiques (Themis1 et Vav1) et d'un facteur environnemental (le stress prénatal).

Themis1 et Vav1 sont deux molécules de signalisation du récepteur T (TCR) qui jouent un rôle important dans la sélection thymique des thymocytes. Le rôle de Vav1 a largement été étudié dans les LT matures, contrairement à Themis1 dont le rôle reste très peu caractérisé. Des analyses génétiques chez l'Homme indiquent que Themis1 et Vav1 sont des gènes de susceptibilité à la SEP, mais les mécanismes impliqués n'ont pas été élucidés. Mon équipe d'accueil a montré chez la souris dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) que le variant naturel Vav1^{R63W} induisait une réduction modérée de l'inflammation du SNC, mais rien n'était connu sur le rôle de Themis1 dans cette pathologie.

Durant ma thèse, j'ai donc analysé l'implication de Themis1 dans la physiopathologie de l'EAE. De plus, puisque Themis1 et Vav1 interagissent et que Themis1 contrôle positivement l'activation de Vav1, j'ai étudié l'impact de la combinaison de la déficience en Themis1 avec le variant Vav1^{R63W} sur la susceptibilité à l'EAE. J'ai montré que la mutation de Themis1 induit une réduction intermédiaire de la sévérité de l'EAE et que cette réduction est augmentée en présence du variant de Vav1. Mes résultats suggèrent que cela est dépendant d'une réduction de l'encéphalitogénicité des LT conventionnels (Tconv) mutés. La réduction de la signalisation du TCR (notamment de la voie NF-κB) du fait de ces mutations entraîne une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires nécessaires à la perturbation de la barrière hémato-encéphalique, et ainsi à l'infiltration du parenchyme cérébral. Ceci résulte chez les souris mutées en une absence d'infiltrat immunitaire dans la moelle épinière. Notre travail souligne ainsi l'intérêt d'analyser la combinaison de plusieurs polymorphismes génétiques ayant un faible poids pour identifier des réseaux moléculaires de susceptibilité à l'auto-immunité qui pourraient expliquer une partie du « missing heritability ».

En dehors des facteurs génétiques, les facteurs environnementaux tels que le tabac, l'ensoleillement (vitamine D), ou le microbiote sont aujourd'hui communément admis comme influant sur la susceptibilité à la SEP. Plusieurs études ont montré que le stress pendant la grossesse (stress prénatal) pouvait avoir des répercussions sur la susceptibilité de la descendance à diverses pathologies psychiatriques, neurologiques ou inflammatoires. Cependant, l'impact du stress prénatal (PS) sur la susceptibilité de la progéniture à l'inflammation du SNC reste très peu étudié.

Dans ce contexte, nous avons utilisé un modèle de PS chronique afin d'étudier les répercussions que cela pourrait avoir sur la susceptibilité de la descendance à développer l'EAE. Nous avons montré que les progénitures provenant des femelles stressées développent une EAE moins sévère en comparaison avec les progénitures issues de femelles non stressées. Nos résultats préliminaires montrent que cette diminution est associée à une réduction de l'infiltrat immunitaire dans la moelle épinière, à une augmentation de la fréquence de LT régulateurs, et à une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires. Nos résultats mettent ainsi en évidence qu'avant même la naissance, des facteurs environnementaux extérieurs modulent la susceptibilité à l'inflammation du SNC, possiblement par l'altération des fonctions des LT CD4.

Summary

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS) involving genetic, epigenetic, and environmental factors. My PhD work aimed at analyzing the involvement of two genetic factors (Themis1 and Vav1) and of an environmental factor (prenatal stress) in susceptibility to CNS inflammation and to decipher the mechanisms involved.

Themis1 and Vav1 are two T receptor (TCR) signaling molecules that play an important role in thymic selection of thymocytes. Genetic analyzes in humans indicate that Themis1 and Vav1 are MS susceptibility genes, but the mechanisms involved have not been elucidated. Although the role of Vav1 has been widely studied in mature T cells, the role of Themis1 remains, however, poorly characterized. Previous work from my team using the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice model of MS showed that the natural variant Vav1^{R63W} induced a moderate reduction of CNS inflammation, but the role of Themis1 in this pathology was still unknown.

During my PhD, I therefore analyzed the involvement of Themis1 in the pathophysiology of EAE. Moreover, since Themis1 and Vav1 interact together and Themis1 positively controls the activation of Vav1, I studied the impact of the combination of Themis1 deficiency with the Vav1^{R63W} variant on EAE susceptibility. I have shown that Themis1 deletion induces an intermediate reduction of EAE severity, and that this reduction is increased in the presence of the Vav1 variant. My results suggest that this is dependent on a reduction in the encephalitogenicity of mutated conventional T cells (Tconv). The reduction in TCR signaling (in particular the NF- κ B pathway) due to these mutations leads to a reduction in the production of pro-inflammatory cytokines necessary for the disruption of the blood-brain barrier, and thus for the infiltration of the cerebral parenchyma, resulting in the absence of immune infiltrate in the spinal cord of mutated mice. Our work therefore underlines the interest of analyzing the combination of several genetic polymorphisms having a low weight to identify molecular networks of susceptibility to autoimmunity which could explain part of the "missing heritability".

Besides genetic factors, environmental factors such as tobacco, sunlight (vitamin D), or the microbiota are now commonly accepted as influencing susceptibility to MS. Several studies have shown that stress during pregnancy (prenatal stress) could have repercussions on the susceptibility of offspring to various psychiatric, neurological, or inflammatory pathologies. However, the impact of prenatal stress (PS) on offspring susceptibility to CNS inflammation remains poorly studied.

In this context, we used a model of chronic PS to study the repercussions that it could have on offspring susceptibility to develop EAE. We have shown that offspring from stressed females develop a less severe EAE compared to offspring from unstressed females. Our preliminary results show that this decreased severity is associated with a reduction in the immune infiltrate in the spinal cord, an increase in the frequency of regulatory T cells, and a reduction in the production of pro-inflammatory cytokines. Our results thus show that even before birth, external environmental factors modulate the susceptibility to CNS inflammation, possibly by altering CD4 T cell function.

Table des matières

<i>Abréviations utilisées</i>	7
<i>Liste des figures</i>	10
<i>Avant-propos</i>	11
<i>Chapitre I - Le développement des Lymphocytes T</i>	13
1. Développement TCR-indépendant	13
2. Développement TCR-dépendant	16
a) La recombinaison V(D)J	16
b) La sélection Beta	17
c) La sélection positive	18
d) Choix de lignage CD4/CD8	19
e) Sélection négative – Mécanisme de tolérance centrale	20
i. Délétion et Anergie.....	20
ii. Développement des LT régulateurs.....	22
f) Tolérance périphérique	24
<i>Chapitre II - Rôle des Lymphocytes T dans la défense de l'organisme et dérives pathologiques</i>	26
1. Un LT c'est bien ; un LT activé, c'est mieux (pas toujours)	26
a) Recherche de l'âme-sœur (peptidique) au sein des OLII	26
b) Les signaux d'activation.....	28
c) Cinétique de l'activation des LT	28
2. Les sous-types de LT	29
a) Les LT CD8, des lymphocytes cytotoxiques (CTL)	29
b) Les LT CD4, des lymphocytes auxiliaires (Th)	30
i. Th1	31
ii. Th2.....	34
iii. Th17.....	35
iv. TFH.....	37
vii. Th9, Th22, Thxx... Faut-il continuer ?	39
c) Stabilité de lignage et plasticité	40
d) Les LT CD4 régulateurs	43
i. Les Treg induits	43
ii. Les fonctions suppressives des Treg	45

Chapitre III – La signalisation du TCR$\alpha\beta$	48
1. Engagement du TCR (interaction cellule-cellule)	48
a) La synapse immunologique.....	48
b) TCR-CD3-CD4 : prérequis à la signalisation du TCR.....	50
2. Signalisation proximale (ZAP-70, LAT, SLP-76)	52
3. Signalisation distale	53
a) La voie calcique.....	53
b) La voie PKC θ -NF κ B.....	55
c) Les voies des MAPK.....	57
d) La voie Akt-mTOR.....	58
4. Vav1	60
a) Description de Vav1.....	60
b) Vav1 dans les voies de signalisations du TCR.....	62
c) Implication de Vav1 dans le développement des LT.....	64
d) Implication de Vav1 dans la fonction des LT.....	65
5. Themis1	66
a) Description de Themis1.....	66
b) Themis1 : une décennie de débat.....	67
c) Partenaires de Themis1 dans la signalisation du TCR.....	70
d) Themis1 dans la fonction des LT.....	71
e) Themis1-KO et Vav1 ^{R63W}	72
Chapitre IV – La Sclérose en plaques	74
1. Présentation	74
2. Physiopathologie de la SEP au travers de l'EAE	75
a) Les modèles d'EAE.....	76
b) Physiopathologie de l'EAE.....	76
c) Implication des différentes sous-populations de LT.....	81
i. Les Th1 dans l'EAE.....	81
ii. Les Th17 dans l'EAE.....	83
iii. Le GM-CSF dans l'EAE.....	84
iv. Les Th2 et Treg dans l'EAE.....	85
v. Les LT CD8 dans l'EAE.....	85

3. Étiologie de la SEP	87
a) Facteurs Génétiques et Épигénétiques	87
b) Facteurs Environnementaux	88
i. Facteurs d’environnement infectieux	88
ii. Facteurs d’environnement non-infectieux	88
iii. Le microbiote.....	89
iv. Le stress prénatal	92
<i>Objectifs de la thèse.....</i>	94
<i>Étude de l’implication des facteurs génétiques Themis1 et Vav1 dans l’inflammation du système nerveux central</i>	96
<i>Discussion – Vav1 & Themis1</i>	123
<i>Étude de l’implication du stress prénatal dans la susceptibilité à développer une inflammation du système nerveux central.....</i>	135
<i>Discussion – Le stress prénatal.....</i>	151
<i>Discussion générale.....</i>	162
<i>Annexes.....</i>	165
<i>Références.....</i>	202
<i>Remerciements.....</i>	223

Abréviations utilisées

Abréviation	Définition
11 β -HSD2 :	11beta-hydroxystéroïde déshydrogénase 2
2D2 :	LT CD4 ayant un TCR spécifique de MOG
ACTH :	Adrenocorticotrop Hormon
ADAP	adhesion and degranulation-promoting adapter protein
ADP :	Adenosin DiPhosphate
AhR :	Aryl hydrocarbon Receptor
AIRE :	AutoImmune Regulator
AKT :	Protein Kinase B
AP-1 :	Acivator Protein 1
APECED :	Autoimmune PolyEndocrinopathy, Candidasis, Ectodermal Dystrophy
ATP :	Adenosin TriPhosphate
Bcl-2 :	B-cell Lymphoma protein 2
BCR :	B Cell Receptor
BHE :	Barrière Hémato-Encéphalique
BN :	Brown Norway
CABIT :	cysteine containing all beta in Themis
CCR _x / CXCR _x :	Chemokine Receptor x
CD :	Cluster de Différenciation
CDC42 :	Cell Division Control protein 42
CDR :	Complementarity Determining Region
CFA :	Complete Freund's Adjuvant
CH :	Calponin Homology
CLP :	Common Lymphoid Progenitor
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMH-p :	CMH-peptide
CNS :	Central Nervous system

CNS 1-2-3 :	Conserved Non-coding Sequence
CPA :	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRAC :	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺
CREB :	C-AMP Response Element Binding protein
CRH :	Corticotropin Releasing Hormon
CSF :	Cerebro-Spinal Fluid
cTEC :	cortical Thymic Epithelial Cell
CTL :	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CTP :	Circulating T cell Progenitor
CTV :	Cell Trace Violet
DAG :	Diacylglycerol
DC :	Dendritic Cell
DH :	Db1 Homology
Dll4 :	Delta-like 4
dLN :	draining Lymph Node
DN (1 à 4) :	Thymocyte Double Negatif
DNA-PK :	DNA-dependant Protein Kinase
DP :	Thymocyte Double Positif
EAE :	Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale
EBV :	Epstein-Barr Virus
EC :	Endothelial Cell
ELP :	Early Lymphoid Progenitor
Erk :	extracellular signal-regulated protein kinases
ETP :	Early Thymic Progenitor
FACS :	Fluorescent Activated Cell Sorting
Flk2 :	Fetali liver kinase 2
Foxp3 :	Forkhead box P3
Gads :	Grb2 related adaptor protein downstream of Shc

GATA-3 :	GATA-binding protein 3
GC :	Glucocorticoid
GF mice :	Germ-Free mice
GFP / YFP :	Green/Yellow Fluorescent Protein
GITR :	Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor
GM-CSF :	Granulocyte/Macrophages Colony Stimulating Factor
Grb2 :	Growth factor receptor-bound protein 2
GWAS :	Genome Wide Association Study
HEV :	High Endothelial venule
HPA :	Hypothalamo-Pituitaire Adrénalien
HSC :	Hematopoietic Stem Cell
ICAM :	InterCellular Adhesion Molecule
ICOS :	Inducible T cell Costimulator
IDO :	indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN γ :	Interferon gamma
Ig :	Immunoglobuline
IKK :	I κ B kinase
ILC2 :	Innate Lymphoid cell 2
ILx-R :	Interleukin x Receptor
IP3 :	Inositol triphosphate
IPEX :	Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked
ISP :	Intermediate Single Positive
ITAM :	Immunoreceptor Tyrosin-based activation motif
ITK :	IL-2 inducible T cell Kinase
iTregs :	induced Tregs
JNK :	c-Jun N-terminal kinases
LAT :	Linker for activation of T cells
LB :	Lymphocyte B
Lck :	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LCR :	Liquide Cephalo Rachidien

LEW :	Lewis
LFA-1 :	Lymphocyte Function-Associated antigen 1
LN :	Lymph Node
LT :	Lymphocyte T
MAIT :	Mucosal Associated Invariant T cell
MAPK :	Mitogen-Activated Protein kinases
MAPKK :	MAPK Kinase
MAPKKK :	MAPKK Kinase
MDSC :	Myeloid Derived Suppressor Cell
ME :	Moelle Epinière
MMP :	Matrix MetalloProteinase
MOG :	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
mTEC :	medullary Thymic Epithelial Cell
MTOC :	Mitrotubule Organizing Center
mTOR :	Mammalian target of rapamycin
NEMO :	NF- κ B essential modulator
NETosis :	Neutrophil Extracellular Trap
NF-AT :	Nuclear Factor of Activated T cells
NF- κ B :	Nuclear factor-kappa B
NK :	Natural Killer
NKT :	Natural Killer T cells
NLS :	nuclear localization sequence
nTregs :	natural Treg
OLII :	Organe Lymphoïde secondaire
PAMP :	pathogen-associated molecular pattern
PC61 :	Anti-CD25 antibody
PD-1 :	Programmed cell-Death protein 1
pDC :	plasmacytoid Dendritic Cell
PDK1 :	3-phosphoinositide Dependent Kinase 1
PH :	Pleckstrin Homology
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP3 :	Phosphatidyl-inositol-triphosphate

PKC :	Protein Kinase C
PLC- γ :	Phospholipase-C gamma
PLP :	ProteoLipid Protein
PRR :	Pattern Recognition Receptor
PRR :	Proline Rich Region
PS :	Prenatal Stress
PSGL-1 :	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
pT α :	Chaîne invariante du TCR
pTregs :	peripheral Tregs
PTX :	Pertussis Toxin
RAG1 :	Recombination Activating Protein 1
ROR γ t :	RAR-related orphan receptor gamma t
RSS :	Recombination Signal Sequence
SCF :	Stem Cell Factor
SEP :	Sclérose en plaques
SH2/3 :	Src homology domain 2
SHP-1 :	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
SLE :	systemic lupus erythematosus
SLP-76 :	SH2 domain containing Leucocytes Phosphoprotein of 76Kd
SMAC :	SupraMolecular Adhesion Complex
Smad :	Mother Against Decapentaplegic homolog
SNC :	Système Nerveux Central
SNP :	Single Nucleotid Polymorphism

SP :	Thymocyte Simple Positif
SpC :	Spinal Cord
SPL :	Spleen
STAT-x :	Signal Transducing Activation of Transcription
T-bet :	T-box expressed in T cell
T1D :	Type-1 Diabetes
Tconv :	Lymphocyte T conventionnel
TCR :	T Cell Receptor
TdT :	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TFH :	T Follicular Helper
TGF- β :	Transforming Growth Factor beta
Th :	T helper
Themis1 :	Thymocyte expressed molecule involved in selection
TLR :	Toll-like Receptor
TNF α :	Tumor Necrosis Factor alpha
TNFRSF :	TNF Receptor Super-Familly
TRA :	Tissu Restricted Antigen
TregP :	Tregs Progenitor
TSP :	Thymus Settling Progenitor
tTregs :	thymic Tregs
Vav1 :	Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1
VCAM-1 :	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLA-4 :	Very-Late Antigen 4
ZAP-70 :	Zeta-chain-associated protein kinase 70

Liste des figures

- Figure 1. De HSC à LT mature, le développement progressif des lymphocytes T
- Figure 2. La randonnée thymique des thymocytes en développement
- Figure 3. Illustration de la recombinaison V(D)J
- Figure 4. Signalisation du TCR et développement des tTregs
- Figure 5. Transmigration du sang vers un tissu (ici un OLII)
- Figure 6. Différenciation en lignages distinct de LT helper
- Figure 7. Vers un nouveau modèle de classification des LT CD4 helper ?
- Figure 8. La plasticité des lignages de LT helper
- Figure 9. Les fonctions suppressives des Tregs
- Figure 10. La synapse immunologique
- Figure 11. La signalisation proximale
- Figure 12. La signalisation du TCR dans son ensemble
- Figure 13. Structure et fonctions de Vav1
- Figure 14. Structure de Themis1
- Figure 15. Rôle ambigu de Themis1 dans la signalisation du TCR
- Figure 16. Les différentes formes de SEP
- Figure 17. La physiopathologie de l'EAE
- Figure 18. Les barrières du SNC
- Figure 19 : Les souris Vav1^{R63W}-Themis1^{Foxp3^{-/-}} développent une EAE moins sévère
- Figure 20 : Vav1 et Themis1 n'induisent pas de gros changement du répertoire V β
- Figure 21 : Le développement du système immunitaire lors de la grossesse
- Figure 22 : Dysbiose du microbiote fécal de la descendance suite au stress prénatal

Avant-propos

Les premières traces de vie sur Terre, remontant à 3,5 milliards d'années, sont principalement composées de bactéries, et d'algues primitives unicellulaires. Tout être vivant ayant peuplé et peuplant aujourd'hui la planète (nous y compris), sont les descendants de ces bactéries. Ces organismes sont restés seuls sur Terre pendant près de 3 milliards d'années, jusqu'à il y a quelques 600 millions d'années, où la vie pluricellulaire vit le jour. C'est au sein de ces premiers êtres « complexes » que l'on découvre, d'ores et déjà, les premières traces de « système immunitaire » (SI). De même que la vie pluricellulaire elle-même, le SI tel que nous le connaissons aujourd'hui (ou que nous tentons de connaître), est issu de ces 600 millions d'années d'évolution, sous la pression de la sélection naturelle.

La présence de composants du SI dans chaque être vivant – plante, invertébré, vertébré – souligne l'importance de ce système pour le maintien de la vie sur Terre. De même, la complexification du SI au cours de l'évolution, avec l'apparition de nouveaux mécanismes, de nouvelles cellules, à mesure que les êtres se complexifient, rend compte de la capacité indispensable de ce système à s'adapter à son environnement. À l'origine pensé comme ayant simplement un rôle de défense de l'organisme, on commence aujourd'hui à comprendre que son rôle est beaucoup plus complexe. Certes primordial pour la défense de l'organisme (infection, cancer), le SI joue aussi un rôle dans l'organogénèse, ou encore dans la régénération tissulaire.

Chez l'Homme, le SI est composé d'un grand nombre de cellules et de gènes aux rôles très divers. Ces cellules ou composants peuvent être regroupés en deux familles : le **système immunitaire inné**, et le **système immunitaire adaptatif**. Les cellules du SI inné (Neutrophile, Monocyte, Macrophage, Cellule dendritique, Natural killer... etc) colonisent la quasi-totalité des tissus de l'organisme, qu'ils patrouillent à la recherche de corps étrangers et de signaux de danger. En cas d'infection, le SI inné est le premier à s'activer (en seulement quelques minutes), et à combattre le pathogène infectieux (bactérie, virus, champignon, parasite). Comportant une vaste variété de mécanismes de défense, le SI inné parvient bien souvent à se débarrasser seul de l'infection.

Le SI adaptatif est quant à lui composé des lymphocytes B (LB), des plasmocytes (cellules à l'origine de la production d'anticorps), et des lymphocytes T (LT), que l'on peut considérer comme les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire. C'est à cette dernière population cellulaire que je me suis principalement intéressé durant ma thèse. On distingue au sein des LT,

les LT CD8, les LT CD4 conventionnels (Tconv) et les LT CD4 régulateurs (Treg), qui seront décrits plus en détail dans les prochains chapitres. De manière générale, les LT CD4 modulent la réponse immunitaire mise en place par les différentes cellules immunitaires en les stimulant ou en les inhibant *via* la production de médiateurs pro- ou anti-inflammatoires.

Le SI repose sur un principe fondamental, qu'est **la discrimination du soi, et du non-soi**. Il est en effet primordial que les mécanismes hautement inflammatoires du système immunitaire soient dirigés contre les pathogènes infectieux (non-soi), et non contre les tissus de l'organisme hôte (soi). Ainsi, des mécanismes très fins de tolérance au soi ont été mis en place au cours de l'évolution, permettant de contrôler et d'éliminer les cellules immunitaires pouvant représenter un risque pour l'organisme. Ces mécanismes sont cependant imparfaits, et il arrive donc que ces cellules **auto-réactives** (ayant la capacité de reconnaître le soi) soient maintenues dans l'organisme. Ce principe est le fondement même des maladies auto-immunes. La Sclérose en Plaques (SEP) est l'une des maladies auto-immunes les plus répandues sur la planète avec 2,8 millions de cas. Chez les patients atteints de la SEP, une activation incontrôlée du SI (et notamment des LT) entraîne la dégradation de la gaine de myéline autour des neurones, causant une baisse de l'influx nerveux et ainsi la perte de la communication neuronale, responsable de troubles neurologiques (moteurs, sensoriels et cognitifs).

Les mécanismes à l'origine de la SEP sont encore mal connus, mais l'on sait aujourd'hui qu'il s'agit d'une maladie multifactorielle, mêlant facteurs de risques génétiques, épigénétiques, et environnementaux.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'implication de deux facteurs génétiques (les gènes VAV1 et THEMIS1) et d'un facteur environnemental (le stress prénatal), dans la susceptibilité et la sensibilité à l'inflammation du système nerveux central, dans un modèle murin de SEP.

Chapitre I - Le développement des Lymphocytes T

1. Développement TCR-indépendant

Les lymphocytes T (LT) débutent leur développement dans la moelle osseuse, avec pour origine la cellule progénitrice commune HSC (Hematopoietic Stem Cell), donnant aussi lieu à l'ensemble des cellules immunitaires (**Figure 1**). Une particularité du développement des LT est que, contrairement aux autres cellules hématopoïétiques, la majorité de leur développement a lieu dans un autre organe que la moelle osseuse : **le thymus**.

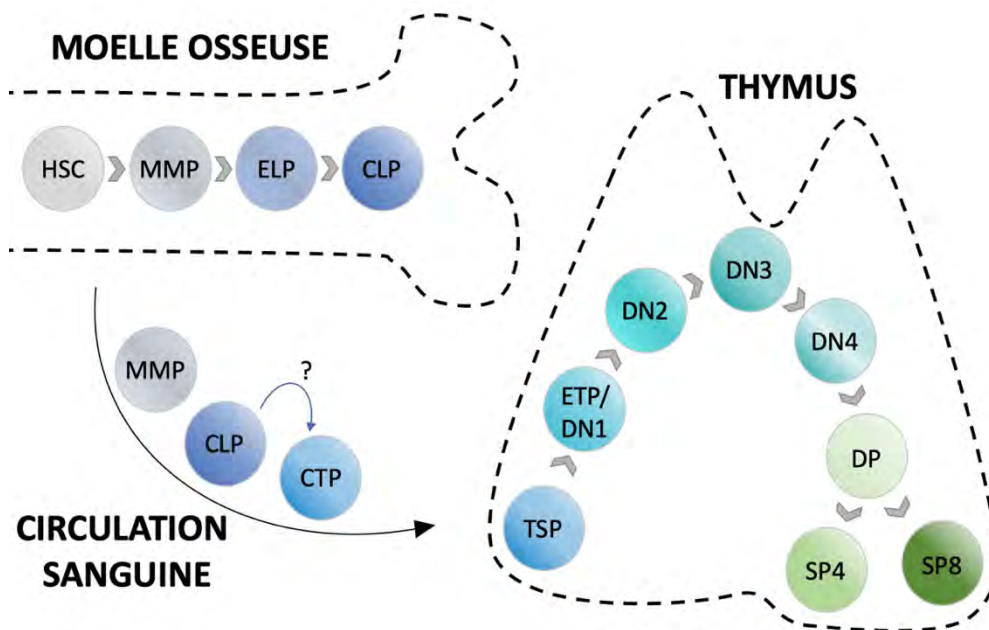


Figure 1 : De HSC à LT mature, le développement progressif des lymphocytes T

Les cellules souches hématopoïétiques prolifèrent et se différencient dans la moelle osseuse. Certaines d'entre elles migrent hors de la moelle et se retrouvent ainsi dans la circulation sanguine. Parmi elles, les MMP, CLP et CTP seraient responsables de l'infiltration intra-thymique (regroupées sous le nom de TSP), à l'origine du précurseur thymique ETP. Celui-ci se différenciera progressivement vers les différents stades de développement, DN (1-4), DP, et SP (4 ou 8).

Le thymus est composé de 2 lobes, au sein desquels on retrouve deux zones distinctes nommées cortex et médulla, séparées l'une de l'autre par la jonction cortico-médullaire (**Figure 2**). Les cellules stromales constituant l'épithélium du thymus ont un rôle primordial dans le développement des **thymocytes** (nom donné aux LT en développement dans le thymus). Ces cellules sont appelées cTEC dans le cortex (cortical Thymic Epithelial Cell), et mTEC dans la médulla (medullary Thymic Epithelial Cell). Les TSP (Thymus Settling Progenitor) infiltrent le thymus à partir de vaisseaux sanguins HEV (High Endothelial Venule), au niveau de la

jonction cortico-médullaire, et se dirigent ensuite vers le cortex grâce aux signaux chimiotactiques délivrés par les cTEC. Ces TSP colonisent les niches présentes au niveau du thymus et donnent lieu au stade le plus précoce de développement intra-thymique : la cellule ETP (Early Thymic Progenitor), aussi appelée DN1 (Double Négative 1) (Zietara et al., 2015). Les thymocytes sont en effet classiquement regroupés en 4 grands sous types, selon leur expression des protéines membranaires CD4 et CD8, jouant le rôle de co-récepteur du TCR. On différencie ainsi les thymocytes précoces « doubles négatifs » (DN ; CD4⁻CD8⁻), des thymocytes intermédiaires « doubles positifs » (DP ; CD4⁺CD8⁺), aux thymocytes avancés « simples positifs » (SP4 (CD4⁺CD8⁻) ou SP8 (CD4⁻CD8⁺)). Les thymocytes transitent d'un stade à un autre au fur et à mesure de leur développement. On peut de la même manière subdiviser le stade DN en différentes sous-unités de stade de développement, nommées DN1 à DN4 (**Figure 1-2**). Ces différents stades sont visualisables par l'expression des protéines membranaires CD25 et CD44. Les DN1 sont donc CD44⁺CD25⁻, les DN2 sont CD44⁺CD25⁺, les DN3 sont CD44⁻CD25⁺, et enfin les DN4 sont CD44⁻CD25⁻. Le thymocyte le plus précoce est le DN1, stade auquel la cellule n'est pas encore pleinement engagée dans le lignage T. Elle a en effet la capacité de se différencier en LT $\alpha\beta$, mais aussi en LT $\gamma\delta$, NK, LB, ainsi qu'en cellule dendritiques (DC) (Bhandoola et al., 2007). Les DN1 vont entrer en contact avec des molécules produites par les cTEC telles que l'IL-7 (Interleukine 7), le SCF (Stem Cell Factor), et le Dll4 (Delta-like protein 4), dont les récepteurs exprimés par les DN1 sont respectivement IL-7R, cKIT, et Notch1 (Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007). L'IL-7 et le SCF permettent ainsi la prolifération des cellules DN1, tandis que l'activation de la voie Notch entrainera un engagement plus profond dans le lignage T, par la restriction des autres lignages. La voie Notch est une voie pléiotrope dont les cibles transcriptionnelles sont tissu- et contexte-dépendantes. L'une des cibles connues de la voie Notch dans ce contexte est le gène CD25 (Maillard et al., 2006). Ainsi, l'expression de CD25 par les cellules DN1 marque leur passage au stade DN2 (CD44⁺CD25⁺). Exprimant le récepteur de chimiokine CXCR4, les DN1 et DN2 migrent vers la zone sous capsulaire du cortex, où les cTEC produisent et sécrètent la chimiokine CXCL12, ligand de CXCR4 (Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007). Bien que les thymocytes DN2 précoces soient plus profondément engagés dans le lignage T que les DN1, ils conservent toujours une certaine capacité à se différencier en NK. Cette capacité sera finalement perdue lors de l'expression de la protéine Bcl11b au stade DN2 tardif (toujours sous la dépendance de la voie Notch), entraînant la répression des gènes nécessaires au développement des NK (L. Li et al., 2010).

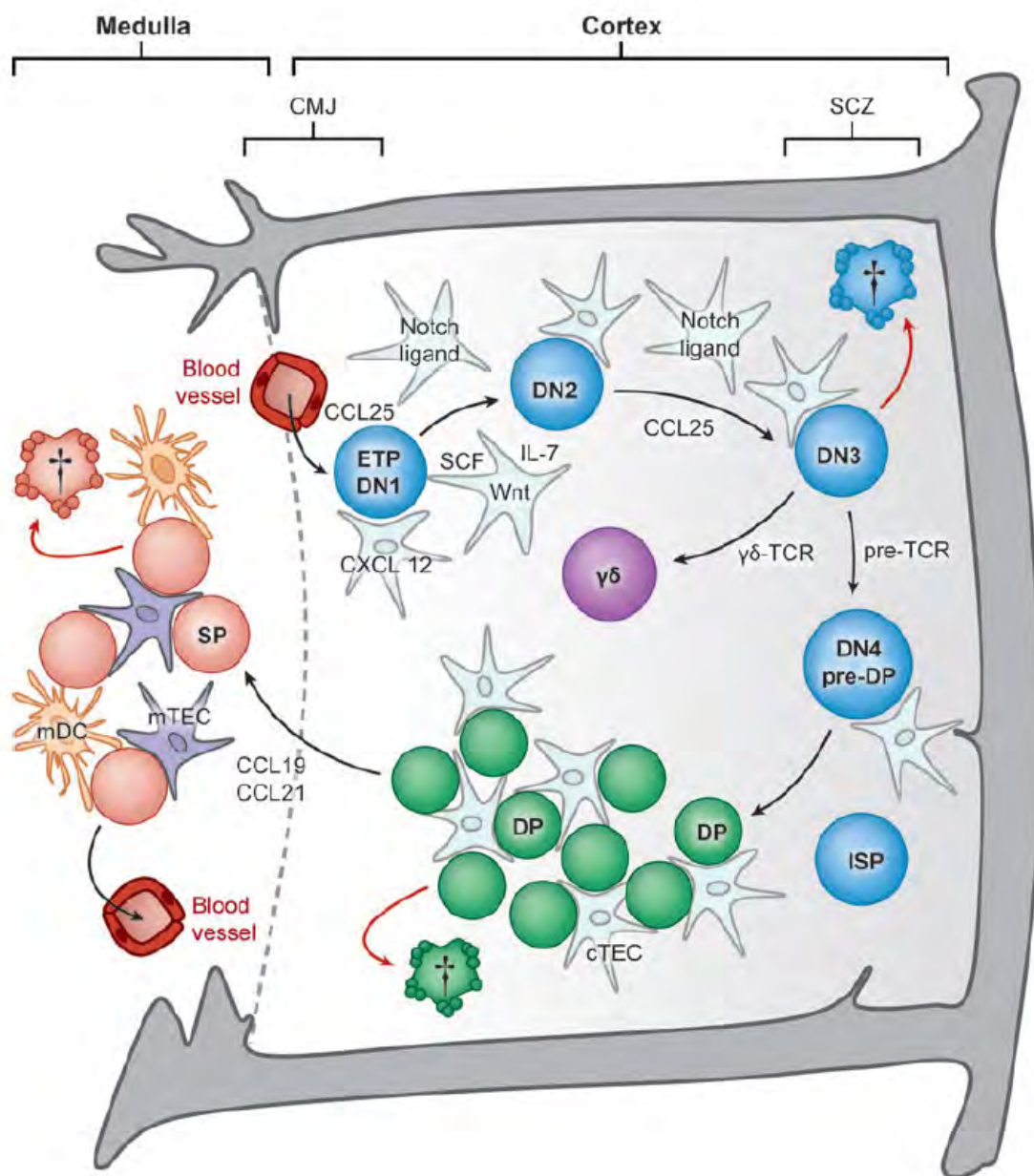


Figure 2 : La randonnée thymique des thymocytes en développement

Suite à son entrée dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire (CMJ), les cellules TSP donnent lieu au premier progéniteur thymique : la cellule ETP/DN1. Sous la dépendance de facteurs solubles sécrétés par le stroma thymique, les DN1 se différencient successivement en DN2 puis DN3. Cette différenciation s'accompagne d'une migration depuis la CMJ vers la zone sous capsulaire (SCZ) du cortex, grâce notamment à CXCL12 et CCL25, ligand de CXCR4 et CCR9 respectivement. Les réarrangements V(D)J des chaînes β , δ , et γ , dicteront le lignage à suivre pour la cellule DN3 : soit $LT\gamma\delta$ (violet), soit $LT\alpha\beta$ (bleu). Après **sélection beta** au stade DN3, le thymocyte se différencie en DN4 puis en DP. Les cellules cTEC testent alors les DP pour leur capacité à reconnaître le CMH avec leur TCR : **sélection positive**. Les DP ainsi sélectionnées se différencient en SP4 ou SP8, migrent vers la médulla grâce à l'expression de CCR7, et sont ensuite testées par les mTEC et les DC, analysant la capacité des thymocytes SP4 et SP8 à reconnaître des peptides du soi. Les thymocytes n'ayant reconnu aucun peptide du soi sortiront du thymus par les vaisseaux sanguins, et migreront en périphérie, tandis que ceux ayant reconnu un peptide du soi seront éliminés par **sélection négative**. (Ciofani et Zúñiga-Pflücker., 2007).

Le stade DN2 s'accompagne par ailleurs de l'expression d'un ensemble de gènes spécifiques au lignage T tels que CD3 ϵ , CD3 γ , pT α , ou encore RAG1/2 (Recombination Activating Protein 1/2) (L. Li et al., 2010; Yui et al., 2010). L'expression de RAG1/2 permet **l'initiation des mécanismes de recombinaison V(D)J** indispensables à la génération du TCR (T Cell Receptor). S'en suit une diminution de l'expression de la protéine CD44, indiquant la transition du stade DN2 au stade DN3 (CD44⁻CD25⁺), thymocyte pleinement engagé dans le lignage T. Cette transition s'accompagne d'une prolifération massive des thymocytes et d'une augmentation de l'expression des gènes précédemment cités (CD3, pT α , RAG1/2). C'est à ce stade qu'ont lieu les réarrangements des chaînes TCR β , TCR γ et TCR δ entraînant *in fine* le choix entre les lignages T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$.

2. Développement TCR-dépendant

a) La recombinaison V(D)J

La recombinaison V(D)J est un processus de recombinaison aléatoire et contrôlé de séquences d'ADN précises, n'ayant lieu qu'au sein des LT et des LB en développement. Ce mécanisme très fin permet la génération d'un répertoire de TCR (ou BCR, pour les LB) extrêmement vaste, atteignant chez l'Homme une diversité théorique de 10^{18} TCR différents (Janeway 8th, 2012). Le TCR est un récepteur hétéro-dimérique constitué d'une chaîne alpha et d'une chaîne beta, toute deux constituées d'une partie variable (α_v et β_v) et d'une partie constante (α_c et β_c). Le nom « V(D)J » correspond aux noms des différentes régions de l'ADN formant la partie variable des chaînes du TCR (V pour « Variable », D pour « Diversity », et J pour « Joining »). Il existe chez l'Homme 52 segments V, 2 segments D et 13 segments J pouvant être aléatoirement recombinaison pour former le domaine variable de la chaîne β . De même, il existe 70 segments V et 61 segments J destinés à former le domaine variable de la chaîne α (Janeway 8th, 2012). Ainsi, l'assemblage aléatoire de ces différents domaines donne lieu à une très grande variabilité d'appariement : c'est la « **diversité combinatoire** ». À cette variabilité s'ajoute une « **diversité jonctionnelle** » dépendante de la protéine TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) qui enlève et ajoute aléatoirement des nucléotides lors de l'appariement des fragment V/D/J (**Figure 3**). Les protéines RAG1/2 exprimées au stade DN2 initient la recombinaison de ces domaines par clivage de l'ADN ayant lieu aux stades DN2 et DN3. En parallèle de ces réarrangements se produit aussi la recombinaison des domaines des chaînes δ et γ . La chaîne β sera ensuite associée à la chaîne α invariante (pT α), afin de former un pré-

TCR, tandis que les chaînes δ et γ s'associeront entre elles pour former un TCR $\gamma\delta$. C'est à ce moment que le choix final entre lignage LT $\alpha\beta$ et LT $\gamma\delta$ aura lieu. Tandis que le pré-TCR associé aux protéines CD3 induira une signalisation intracellulaire faible favorisant le lignage LT $\alpha\beta$, le TCR $\gamma\delta$ induira quant à lui une signalisation forte favorisant le lignage LT $\gamma\delta$ (notion de « sélection agoniste », non détaillée ici) (Stritesky et al., 2012).

Cette signalisation du complexe pré-TCR/CD3 constitue la **sélection beta**, première des 3 étapes de sélection du développement thymiques TCR-dépendant : sélection beta, sélection positive et sélection négative.

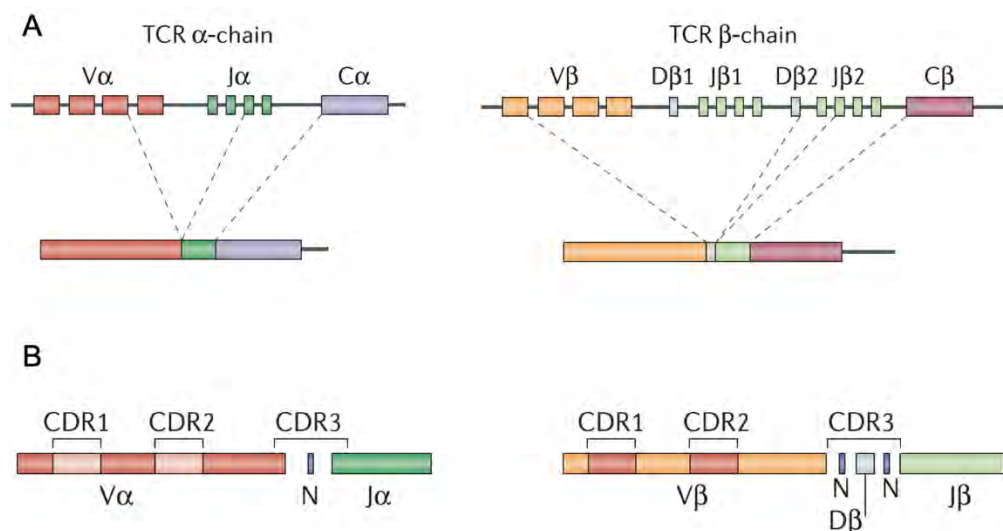


Figure 3 : Illustration de la recombinaison V(D)J

(A) Les domaines V, J et C de la chaîne alpha, et les domaines V, D, J et C de la chaîne beta forment, après recombinaison, les chaînes alpha et beta du TCR. (B) Les domaines variables, impliqués dans la reconnaissance du complexe CMH-peptide (CMHp), sont formés par les domaines V α et J α pour la chaîne alpha, et V β , D β , et J β pour la chaîne beta. On distingue au sein des domaines variables, 3 à 4 régions CDR (Complementarity-Determining Region) de très haute variabilité, étant les domaines de contact entre le TCR et le complexe CMHp. Tandis que les CDR1 et CDR2 reconnaissent la molécule de CMH, le CDR3 quant à lui reconnaît le peptide antigénique présenté par le CMH. Adapté de Turner et al., 2006.

b) La sélection Beta

Une fois la chaîne β associée à la chaîne invariante pT α , le pré-TCR ainsi formé est adressé à la membrane plasmique en association avec les protéines CD3. Cette étape a pour but de vérifier les premiers réarrangements du TCR, en testant sa capacité à induire une signalisation intracellulaire par le biais des protéines CD3. Contrairement à la signalisation « conventionnelle » en aval du TCR, celle du pré-TCR serait indépendante d'un quelconque ligand. Ce serait au contraire la polymérisation de plusieurs pré-TCR qui induirait cette

signalisation (Yamasaki et al., 2006). En plus du pré-TCR, la stimulation du thymocyte DN3 par la voie Notch est indispensable au processus de sélection beta (Maillard et al., 2006). Lorsque ces 2 signaux ont lieu au sein du thymocyte, cela entraîne l'augmentation de signaux de survie anti-apoptotique, une intense prolifération, **une exclusion allélique** (inhibition de l'expression des protéines RAG1/2 entraînant l'arrêt de la recombinaison de la chaîne β) et la différenciation en thymocyte DN4, puis en thymocyte double positif « DP ».

c) La sélection positive

Entre les stades DN4 et DP, les thymocytes passent par un stade transitoire ISP (Intermediate Single Positive) exprimant uniquement la protéine CD8 et durant lequel les cellules prolifèrent (MacDonald et al., 1988). Ces cellules expriment ensuite la protéine CD4 devenant ainsi la population DP, majoritaire au sein du thymus (~85% des cellules composant le thymus). Les DP précoces n'ont encore qu'une chaîne β du TCR, et doivent donc par le biais de la réexpression des enzymes RAG1/2 réaliser le réarrangement des domaines V et J de la chaîne α , afin de terminer la synthèse de leur TCR. Une fois complété, ce TCR nouvellement généré doit être testé pour sa capacité à reconnaître et se lier aux molécules de **CMH** (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). En effet, un LT mature (en périphérie, hors du thymus) devient activé lorsqu'il se lie à une molécule de CMH présentant un peptide (complexe « CMHp ») reconnu par son TCR. Pour cela, le TCR doit à la fois reconnaître le CMH, et le peptide présenté par le CMH. Ce mécanisme d'activation sera plus amplement décrit au Chapitre III, mais il apparaît d'ores et déjà que la reconnaissance TCR-CMH est de première importance pour la fonction des LT. Il existe 2 types de CMH : le CMH de classe I (CMH-I) et le CMH de classe II (CMH-II), respectivement reconnu par les LT CD8 et les LT CD4. Le but de la sélection positive est ainsi de sélectionner les thymocytes DP ayant un TCR capable de reconnaître le CMH-I ou le CMH-II avec une **affinité appropriée**. La notion d'affinité est en effet d'importance capitale lorsque l'on parle de TCR et de LT en développement. Ainsi, ne sont **sélectionnés positivement** que les DP ayant un TCR avec une affinité modérée pour le CMH. Les thymocytes DP ayant un TCR reconnaissant le CMH avec une affinité trop faible (étant donc inutiles car incapable de s'activer en périphérie) mourront par manque de stimulation : c'est la **mort par négligence**. De même, les thymocytes DP ayant un TCR reconnaissant le CMH avec une affinité trop forte (étant donc dangereux pour l'organisme, car ils pourraient s'activer en périphérie indépendamment du peptide présenté, qu'il s'agisse de soi ou de non-

soi) seront délétés par un processus de **sélection négative** (Kurd & Robey, 2016). Le TCR et son affinité pour le CMHp ne sont cependant pas les seuls impliqués à ce stade. Il a en effet été proposé que la molécule de co-inhibition PD1 (exprimée au stade DP après engagement du TCR) induise une réduction de la signalisation du TCR, inhibant ainsi le processus de sélection positive. Ce mécanisme pourrait permettre de finement réguler le répertoire TCR ainsi sélectionné (Keir et al., 2005). Concernant les molécules de CMH, il est important de noter qu'elles sont en quelque sorte des fenêtres cellulaires, présentant à la membrane plasmique les peptides (fragments de protéines) présents au sein des cellules ou dans leur environnement. En condition basale (non-infectieuse) la quasi-totalité des peptides présents dans nos cellules, et donc des peptides présentés par les molécules de CMH, sont des peptides du soi. Il serait cependant à ce stade (DP), totalement contre-productif de sélectionner positivement les thymocytes reconnaissant les molécules de CMH présentant un peptide du soi. Afin d'éviter cela, l'évolution a mis en place un mécanisme existant uniquement dans les cellules du cortex thymique cTEC, responsables de la sélection positive. Une machinerie enzymatique qui leur est propre (thymoprotéasome ; Cathépsine L) leur permet de cliver les protéines du soi en « **peptides privés** » n'existant nulle part ailleurs dans l'organisme, et pouvant alors s'apparenter à du non-soi (Klein et al., 2014). Ces peptides privés seront ainsi présentés par les cTEC aux thymocytes DP en développement, par le biais des molécules de CMH-I et de CMH-II. Les DP ayant un TCR reconnaissant avec une affinité adéquate une molécule de CMH-I deviendront des thymocytes SP8 (futurs LT CD8) tandis que ceux ayant reconnu le CMH-II deviendront des SP4 (futurs LT CD4), c'est le principe de la **restriction au CMH**.

d) Choix de lignage CD4/CD8

Suite à la sélection positive, les thymocytes DP vont légèrement réduire leur expression de la protéine CD8, devenant ainsi TCR⁺CD4⁺CD8^{low}. Cette réduction de la quantité de CD8 à la membrane plasmique des thymocytes DP, induira ou non une diminution de la signalisation du TCR, selon que le TCR est plutôt affiné pour une molécule de CMH-I ou une molécule de CMH-II. En effet, les protéines CD4 et CD8 sont des co-récepteurs du TCR, indispensables à sa signalisation. Chez un thymocyte DP ayant un TCR reconnaissant le CMH-I (en coopération avec le co-récepteur CD8), la diminution de l'expression de la protéine CD8 entraînera une **diminution de la signalisation du TCR**. Inversement, chez un thymocyte DP ayant un TCR reconnaissant le CMH-II (en coopération avec le co-récepteur CD4), la diminution de l'expression de la protéine CD8 n'entraînera **aucune diminution de la signalisation du TCR**.

Ainsi, une signalisation du TCR persistante chez les thymocytes DP TCR⁺CD4⁺CD8^{low} induira l'expression des facteurs de transcription ThPOK et GATA3, responsables de l'engagement dans le lignage LT CD4, tandis qu'une diminution de la signalisation engagera le thymocyte dans le lignage LT CD8 (He et al., 2008). Pour pallier cette diminution de la signalisation du TCR (induisant des signaux de survie indispensables), ces thymocytes « futurs SP8 » expriment le récepteur à l'IL-7 dont la stimulation entrainera l'activation de signaux de survie et l'expression du facteur de transcription Runx3, responsable de l'engagement dans le lignage LT CD8 (Park et al., 2010). Les thymocytes SP ainsi formés (CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺) suite à la sélection positive, vont exprimer le marqueur CD69 et le récepteur de chimiokine CCR7, qui leur permettra de migrer depuis le cortex vers la médulla, où les mTEC produisent et sécrètent les chimiokines CCL19 et CCL21, ligands de CCR7 (Petrie & Zúñiga-Pflücker, 2007). C'est au sein de la médulla que l'ensemble des TCR nouvellement générés seront testés pour leur **potentielle auto-spécificité**.

e) Sélection négative – Mécanisme de tolérance centrale

i. Délétion et Anergie

Du fait de la nature aléatoire de la recombinaison V(D)J à l'origine de la formation des TCR, leur spécificité est incontrôlée. Après sélection positive, le TCR d'un thymocyte pourrait aussi bien reconnaître un peptide du soi que du non-soi. Si ces thymocytes auto-spécifiques étaient libérés en périphérie, ils pourraient ainsi réagir contre notre propre organisme et être à l'origine de pathologies auto-immunes. Il est donc primordial de contrôler ces cellules auto-spécifiques : c'est **l'induction de la tolérance centrale**. Cette tolérance peut être induite de trois manières différentes, soit *via* la **délétion** des thymocytes auto-réactifs, soit par une induction **d'anergie** chez ces cellules, soit par la redirection de leur développement vers le lignage des LT régulateurs, appelés **Treg**. Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans ces processus, tous *via* leur rôle de CPA (Cellule Présentatrice d'Antigène) : les mTEC, les DC conventionnelles (cDC), les DC plasmacytoïdes (pDC), et les LB thymiques.

Les thymocytes auto-réactifs peuvent exprimer un TCR spécifique d'un antigène ubiquitaire (auquel cas les CPA du thymus pourront le présenter de manière spontanée *via* leur CMH), mais aussi d'un antigène spécifique d'un tissu donné (TRA). Afin de pouvoir présenter des TRA *via* leur CMH, les mTEC expriment deux facteurs de transcription indispensables à la sélection négative : AIRE (AutoImmune REgulator) et FEZF2 (FEZ family zinc finger protein 2). Ces facteurs permettent ainsi l'expression d'un grand nombre de TRA au niveau du thymus,

rendant possible la délétion des thymocytes auto-réactifs (Anderson et al., 2002; Takaba et al., 2015). La mutation du gène AIRE chez l'Homme entraîne un fort défaut de sélection négative, provoquant un large spectre de manifestations auto-immunes appelé APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy), démontrant l'importance de ce mécanisme dans la prévention de maladies auto-immunes (Björnses et al., 1998). AIRE et Fezf2, et peut-être encore d'autres facteurs, permettent *in fine* aux mTEC d'exprimer pas moins de **85% des gènes du génome murin**, permettant ainsi la détection d'un grand nombre de thymocytes auto-réactifs (Sansom et al., 2014). Il est cependant important de noter que seules les mTEC expriment ces deux gènes, contrairement aux DC, pourtant très importantes dans le processus de sélection négative. En effet, tandis que les mTEC ne sont que peu efficaces à l'induction de l'apoptose chez les thymocytes auto-réactifs, induisant préférentiellement l'anergie, les DC sont quant à elles particulièrement efficaces à l'induction d'apoptose. Cela est probablement dû à leur plus forte expression des molécules de co-stimulation, en partie responsables de la sélection négative (Gao et al., 2002). Les DC parviennent cependant à présenter des TRA sur leur CMH, grâce premièrement à la phagocytose de débris cellulaires issus de mTEC (favorisée par le turnover très important des mTEC), mais aussi grâce à des transferts de membrane entre les mTEC et les DC, ou encore par la sécrétion d'exosomes par les mTEC, contenant des complexes CMHp (Hubert et al., 2011). En plus de cette présentation antigénique de TRA « produits localement » via AIRE et Fezf2, des DC extra-thymiques provenant de la périphérie migrent dans le thymus de manière CCR2-dépendante (cDC) ou CCR9-dépendante (pDC), amenant avec elles des peptides issus de leur tissu d'origine, pouvant être du soi ou provenir de la flore bactérienne commensale (Hadeiba et al., 2012). Ce mécanisme permet ainsi de compléter en partie le répertoire antigénique incomplet (~85%) présenté aux thymocytes en développement. De manière importante, en cas d'activation en périphérie, les DC perdent la capacité de migrer au sein du thymus, évitant ainsi le risque d'induire une tolérance à un pathogène en cas d'infection (Lopes et al., 2015). Il apparaît que les LB thymiques expriment le facteur AIRE, leur conférant la capacité de présenter eux aussi des TRA. Ainsi, toutes les populations citées ici (mTEC, cDC, pDC, et LB) présentent des complexes CMHp contenant des peptides ubiquitaires ou des TRA, et possèdent la capacité d'induire la délétion clonale d'un thymocyte en cas de reconnaissance du CMHp avec leur TCR avec une affinité trop importante.

Pour finir, bien que la sélection négative soit souvent associée à la médulla tandis que la sélection positive est associée au cortex, il faut noter que **la première vague de sélection négative se produit dans le cortex**. Cette sélection négative est AIRE-indépendante, CCR7-

indépendante (preuve qu'elle a lieu dans le cortex, et non dans la médulla), et fait intervenir la présentation par les DC de peptides ubiquitaires. Il a en effet été estimé par microscopie bi-photonique intravitale qu'un thymocyte DP interagissait avec 100 à 400 DC dans le cortex, interaction pouvant mener à la sélection négative de ces thymocytes (Kurd & Robey, 2016; Ladi et al., 2008). Mais comme introduit précédemment, la délétion des thymocytes autoréactifs n'est pas leur seul destin possible. Ils peuvent en effet être redirigés vers le lignage Treg, LT ayant la particularité d'être anti-inflammatoires, contrairement aux LT conventionnels.

ii. Développement des LT régulateurs

En plus des mécanismes de tolérance centrale (anergie, délétion) permettant d'éviter la production de LT auto-spécifiques, l'évolution a mis en place des cellules spécialisées (**les Treg**) ayant la particularité d'être immunosuppressives, pouvant induire **une tolérance périphérique dominante**. Les Treg sont définis principalement par l'expression du facteur de transcription Forkhead box P3 (**Foxp3**), qui est nécessaire à leur développement, à leur stabilité, et à leurs fonctions suppressives. L'importance des Treg et du facteur de transcription Foxp3 est illustrée par les pathologies auto-immunes se développant chez les individus ayant une mutation sur le gène Foxp3 (syndrome IPEX chez l'Homme ; lignée Scurfy chez la souris), menant à un défaut de Treg (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001; Fontenot et al., 2003). Il existe deux grandes familles de Treg, différenciées selon leur origine : les Treg thymiques (tTreg), aussi appelés Treg naturels (nTreg), et les Treg induits en périphérie à partir de LT conventionnels (iTreg) aussi appelés Treg périphériques (pTreg). Dans ce chapitre portant sur le développement thymique, je traiterai uniquement du développement des tTreg. La différenciation des Tconv en iTreg sera traitée dans le chapitre suivant. Le prérequis principal et nécessaire au développement d'un tTreg est l'affinité (ou l'avidité – **BOX 1**) de son TCR pour le complexe CMHp, qui doit être **relativement importante**.

BOX 1 – Affinité et Avidité du TCR

L'**affinité** d'un TCR pour son complexe CMHp associé, correspond à la force d'interaction entre un TCR, et un complexe CMHp. L'**avidité** en revanche, correspond à la somme des affinités entre chaque TCR et CMHp associés à l'interface thymocyte-CPA. Ainsi, l'avidité d'un thymocyte pour un complexe CMHp augmentera à mesure que la densité en CMHp augmentera à la surface d'une CPA, tandis que l'affinité, elle, restera inchangée.

En effet, bien qu'une très forte affinité entre un TCR et le CMHp entraîne la délétion du thymocyte en développement, il apparaît qu'une intensité intermédiaire serait en partie responsable du développement des tTreg (**Figure 4**). De fait, le répertoire TCR des tTreg est enrichi en TCR auto-spécifiques (Romagnoli et al., 2002). C'est d'ailleurs cette particularité de

leur répertoire TCR qui leur confère la capacité de s'activer en périphérie au contact des peptides du soi, empêchant ainsi l'activation de Tconv auto-spécifiques.

a Affinity-based model

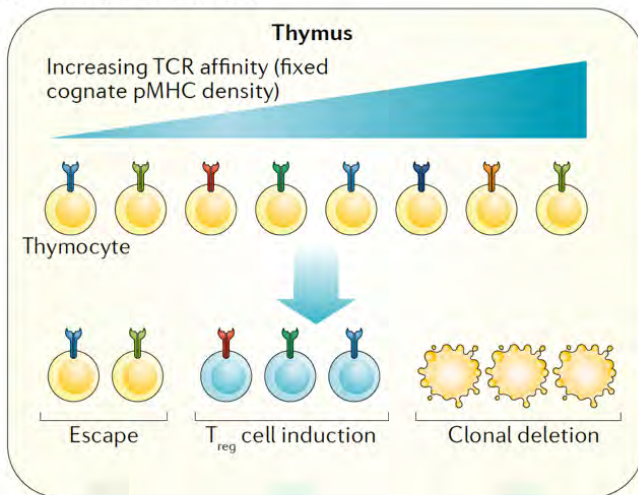


Figure 4 : Modèles basés sur l'affinité/avidité du TCR

Une faible affinité/avidité entre le TCR et le CMHp induira l'échappement à la mort du thymocyte SP4 et son développement en Tconv, une affinité/avidité intermédiaire induira le développement en tTreg, et une affinité/avidité forte induira la sélection négative par délétion clonale. Prendre en compte l'avidité au lieu de l'affinité permet d'intégrer à la fois la notion d'affinité du TCR, et la notion de densité de complexe CMHp, pouvant différer d'un peptide à l'autre, notamment s'il s'agit d'un peptide ubiquitaire ou d'un TRA. Ainsi, malgré une affinité faible, une forte densité en CMHp peut entraîner une stimulation intermédiaire, entraînant le développement en Treg. Inversement, il a été montré qu'une seule molécule de CMH était capable d'induire la délétion d'un thymocyte fortement autoréactif. Issu de [Klein et al., 2018](#).

L'intensité de la signalisation du TCR n'est cependant pas le seul mécanisme à l'origine du développement des tTreg. Il est possible que l'origine du peptide reconnu (ubiquitaire ou TRA), impacte différemment la sélection négative par délétion clonale et l'induction de Treg. En effet, une étude montre que l'expression d'un même peptide induira plutôt la délétion de la population de thymocyte le reconnaissant lorsqu'il est exprimé tel un gène ubiquitaire, tandis que l'expression « TRA-like » (sous la dépendance du gène AIRE) induit non pas la délétion des thymocytes, mais leur différenciation en Treg ([Malhotra et al., 2016](#)). De plus, la perte du gène AIRE induit une diminution du développement des tTreg suggérant que les TRA issus de AIRE sont impliqués dans le développement des tTreg ([Malchow et al., 2016](#)).

Des signaux indépendants de l'interaction TCR-CMHP influencent eux aussi le développement des tTreg, tels que les cytokines IL-2, IL-15, TGF- β , ou encore des molécules membranaires de co-stimulation telles que CD80 et CD86. Il a d'ailleurs été proposé que le développement des tTreg suive un processus en deux étapes. La première consisterait en une (relativement) forte stimulation du TCR par le complexe CMHp, qui entrainerait l'augmentation de CD25 (chaîne α de haute affinité du récepteur à l'IL-2). La seconde impliquerait la stimulation de ce récepteur par l'IL-2 ambiant produit au sein du thymus, entraînant ainsi l'expression de Foxp3 ([Lio & Hsieh, 2008](#)).

En dehors de l'expression de Foxp3, les Treg sont caractérisés par un « paysage épigénétique » très différent de celui des LT conventionnels (**BOX 2**). Ainsi, bien que Foxp3 soit nécessaire au développement et à la fonction des tTreg, il n'en est pas pour autant suffisant pour l'induire.

Il a en effet été montré que Foxp3 s'intègre dans un paysage épigénétique prédéfini avant même qu'il soit exprimé au stade SP4 (Samstein et al., 2012), caractérisé notamment par des régions de déméthylation spécifiques des Treg, ou TSDR (Treg-Specific Demethylated Region), et étant dépendants de la signalisation du TCR (Ohkura et al., 2012).

BOX 2 – L'épigénétique

En induisant le relâchement ou la compaction des molécules d'ADN, les modifications épigénétiques contrôlent positivement ou négativement l'expression génique, que ce soit lors de l'embryogénèse, de l'organogénèse, ou du développement des cellules immunitaires. Les régions de l'ADN condensées sont de fait peu accessibles à la machinerie transcriptionnelle (hétérochromatine – gènes réprimés) alors que les régions où l'ADN est décondensé sont accessibles (euchromatine – gènes activables). Ces modifications consistent en la méthylation et déméthylation de l'ADN au niveau d'îlots CpG (respectivement restrictive et permissive), et en la modification post-traductionnelle (méthylation et acétylation principalement, mais aussi phosphorylation) des protéines d'histones.

En résumé, le développement des tTreg repose sur une stimulation importante d'un TCR auto-spécifique, en coopération avec les molécules de co-stimulation. Cette stimulation forte permet d'une part la mise en place d'un profil épigénétique permissif des gènes Treg-spécifiques, et d'autre part l'expression de CD25, rendant les cellules sensibles à l'IL-2. La stimulation *via* l'IL-2 permettra l'expression de Foxp3 qui, en combinaison avec différents partenaires, participera à l'activation et la répression génique, nécessaire au transcriptome et protéome de tTreg.

f) Tolérance périphérique

Bien que la sélection négative soit un mécanisme très fin permettant la délétion d'un grand nombre de thymocytes auto-réactifs, elle ne permet pas la délétion de leur totalité. Cela est en partie dû au fait que les mTEC n'expriment « que » 85% des gènes de l'organisme, laissant donc un certain pourcentage de potentiels thymocytes auto-spécifiques incontrôlés, et ce malgré l'import de TRA par les DC migrantes. Certains d'entre eux parviennent ainsi à sortir du thymus et se retrouvent en périphérie (devenus alors des **LT matures naïfs**), menaçant l'organisme d'une activation contre ses propres tissus. Il est donc nécessaire d'empêcher l'activation de ces LT auto-spécifiques. Pour cela, différents mécanismes de tolérance périphérique existent, regroupés en mécanismes actifs et passifs.

La tolérance périphérique passive repose sur quatre mécanismes intrinsèques aux LT : l'ignorance, l'anergie, la déviation phénotypique, et enfin l'apoptose. Bien qu'un LT soit autoréactif, il est possible qu'il navigue dans l'organisme toute sa vie sans jamais rencontrer l'antigène pour lequel il est spécifique, d'autant plus si cet antigène se trouve dans des zones dites « immuno-privilegiées » (zones très peu accessibles au système immunitaire, telles que les yeux, les testicules, ou encore le système nerveux central (SNC)). C'est ce qu'on appelle la **tolérance par ignorance**. Le LT autoréactif peut cependant rencontrer un jour l'antigène pour lequel il est spécifique. La plupart du temps, cet antigène sera présenté par une molécule de CMH, en absence de molécule de co-stimulation (pourtant indispensable à l'activation d'un LT. Voir Chapitre II et III). Cette interaction TCR-CMHp en absence de co-stimulation, entraîne l'**anergie** des LT, définie par un état passif et hypo-répondeur à la restimulation.

Dans le cas où un LT recevrait ces 2 signaux (CMHp et co-stimulation), il peut subir la **tolérance par déviation phénotypique**, consistant en l'activation du LT mais avec l'acquisition de fonctions effectrices non pathogéniques (polarisation Th2 plutôt que Th1 par exemple. Voir Chapitre II). Enfin, l'activation d'un LT autoréactif peut se solder par la mort de ce dernier par **AICD (Activation Induced Cell Death)**, dépendante de l'engagement du récepteur de mort Fas par son ligand Fas-L.

Si ces mécanismes ne suffisent pas et qu'un LT autoréactif s'active malgré tout, un autre mécanisme inhibiteur peut être mis en place : *la tolérance périphérique active*. Cette dernière repose sur la population de LT CD4 régulateurs précédemment décrite. Les Treg possèdent un grand nombre de fonctions suppressives leur permettant d'inhiber la réponse inflammatoire en intervenant à différents niveaux. Ces différents mécanismes seront décrits au prochain chapitre, après avoir introduit les mécanismes de l'activation des LT.

Chapitre II - Rôle des Lymphocytes T dans la défense de l'organisme et dérives pathologiques

L'organisme est sujet à différents types de menaces, telles que le développement de tumeurs ou d'infections par des virus, des bactéries, des champignons ou encore des parasites. Afin de pouvoir réagir efficacement contre ces différents types de menaces, l'organisme est doté d'une grande variété de cellules, appartenant par exemple à la grande famille des lymphocytes T. Celle-ci regroupe à la fois les $LT\alpha\beta$ conventionnels tels que les LT CD4 et les LT CD8, mais aussi des LT non conventionnels tels que les $LT\gamma\delta$, les $LT\ CD8\alpha\alpha$, les MAIT (Mucosal Associated Invariant T cell) ou encore les NKT (Natural Killer T cell) pouvant avoir des localisations et des rôles distincts. Durant ma thèse, je me suis principalement intéressé aux $LT\alpha\beta$ conventionnels, et me limiterai donc à la description de ces différentes populations cellulaires.

1. Un LT c'est bien ; un LT activé, c'est mieux (pas toujours)

a) Recherche de l'âme-sœur (peptidique) au sein des OLII

D'abord « LT matures naïfs » après leur sortie du thymus, les LT (CD4 et CD8) vont migrer au sein des organes lymphoïdes secondaires (OLII) tels que les ganglions lymphatiques (LN, lymph node) et la rate, grâce à l'expression des marqueurs CCR7 et CD62L représentant les « codes d'entrée » de ces tissus (**Figure 5**). On y retrouve majoritairement des LT et des LB, cloisonnés à différentes régions au sein de l'OLII (zone-T et zone-B pour les LN), et à moindre mesure des CPA. C'est au sein de ces OLII que les LT peuvent être activés par une DC leur présentant un complexe CMHp. Les DC sont des cellules tissulaires (en opposition aux cellules circulantes telles que les neutrophiles), retrouvées en grande partie au niveau des épithéliums tels que celui de la peau ou de l'intestin. Comme l'indique le nom de « cellules sentinelles » souvent donné aux DC, leur rôle est de scanner leur environnement à la recherche de perturbations de l'homéostasie du tissu, telles que la présence de pathogènes ou de cellules tumorales. En cas de rencontre avec un pathogène, la DC va s'activer, le phagocyter, le digérer à l'aide d'enzymes, et processor des peptides provenant de ce pathogène via les voies d'apprêtage des molécules de CMH-I et -II.

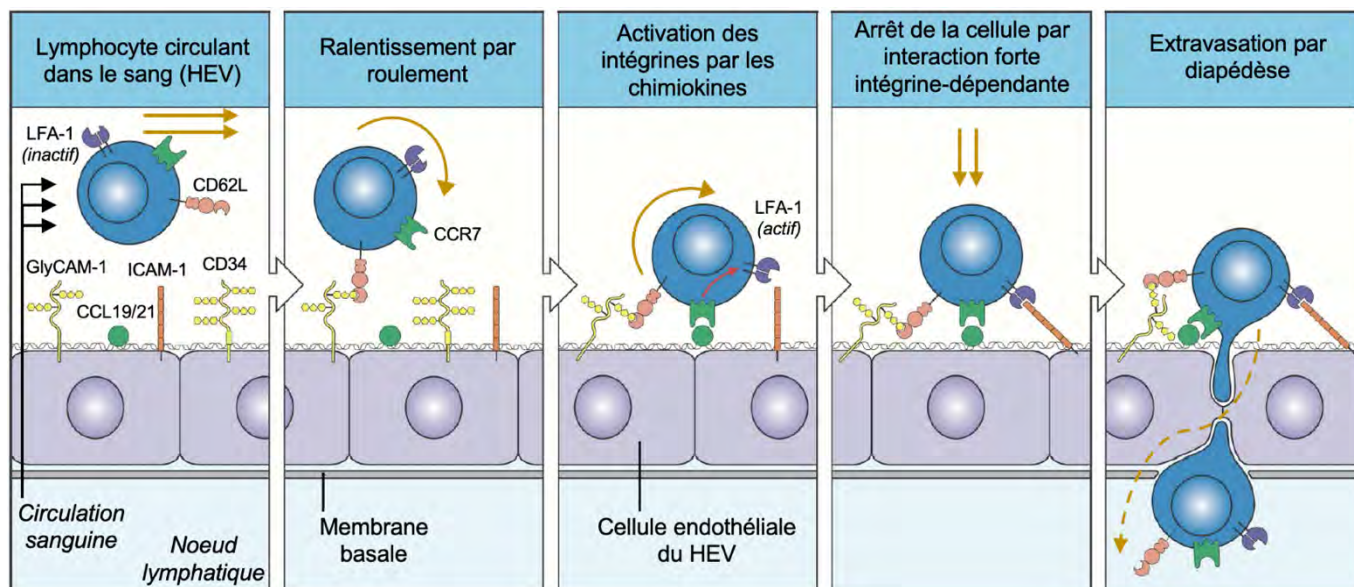


Figure 5 : Transmigration du sang vers un tissu (ici un OLII)

La migration d'une cellule du sang vers un tissu se fait en différentes étapes. Des interactions faibles entre sélectines (ici CD62L sur le LT) et glycoprotéines (CD34 ou GlyCAM) permettent le ralentissement de la cellule dans un mouvement de roulement sur l'endothélium du vaisseau sanguin. Ensuite, l'engagement du récepteur de chimiokine CCR7 par ses ligands CCL19 et CCL21 permet l'activation de l'intégrine LFA-1, entrant alors dans une conformation de haute-affinité pour son ligand. La liaison forte entre LFA-1 et ICAM-1 permet l'arrêt de la cellule. Celle-ci va alors changer de conformation, « ramper » sur l'endothélium avant de le traverser entre deux cellules endothéliales par diapédèse. Adapté de *Janeway 8th, 2012*.

Suite à son activation, la DC va maturer et ainsi exprimer les marqueurs lui permettant de migrer au sein de l'OLII le plus proche (tels que CCR7), augmenter son expression des molécules de CMH-I et -II, et augmenter son expression des molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86. Une fois au sein de l'OLII, la DC migre dans la zone T où elle sera scannée par l'ensemble des LT matures naïfs présents sur place. La très grande variabilité du répertoire TCR des LT implique donc que **la proportion de LT spécifiques d'un peptide donné est très faible**. Ainsi, les LT naviguent d'un ganglion à l'autre *via* les vaisseaux lymphatiques, scannant les DC présentes à la recherche de la DC présentant le complexe CMHp dont ils sont spécifiques, et continuent ainsi de migrer tant qu'ils ne l'ont pas rencontrée. De même, la DC activée et mature ayant migré au sein de l'OLII suite à sa rencontre avec un pathogène, peut attendre un certain temps avant de rencontrer un LT spécifique pour un peptide présenté. Contrairement aux LT, la DC ne migre pas d'un ganglion lymphatique à un autre. Sa localisation est en effet primordiale, puisqu'elle se situe au plus près du tissu où elle a détecté le pathogène. Afin de permettre aux LT de scanner efficacement les CMHp des DC avec leur TCR, ces deux populations expriment des marqueurs d'adhésion cellulaire tels que LFA-1 et CD2 sur les LT, interagissant respectivement avec ICAM-1/2 et CD58 sur les DC. Ces interactions de relativement faible affinité permettent aux LT d'interagir suffisamment

longtemps avec les DC à la recherche d'un CMHp associé. La DC activée rencontrera finalement un ou plusieurs LT dont le TCR reconnaît des complexes CMHp qu'elle présente, initiant ainsi l'activation du LT.

b) Les signaux d'activation

L'engagement du TCR (et de son co-récepteur CD4 ou CD8) par un complexe CMHp constitue **le premier signal** à l'origine de l'activation d'un LT. L'interaction CMHp-TCR entraîne l'activation d'une signalisation complexe en aval du TCR, indispensable à l'activation d'un LT. Cette signalisation, les protéines impliquées (telles que Vav1 et Themis1) et les conséquences qui en découlent seront décrites précisément dans le chapitre suivant. L'un des effets de l'engagement du TCR, sera l'activation de l'intégrine LFA-1, entraînant son changement de conformation. Ce changement lui confère une affinité élevée pour les protéines ICAM-1 et -2, et stabilise ainsi l'interaction LT-DC. Aussi important que soit le TCR et sa signalisation dans l'activation d'un LT, ils n'en sont pas pour autant suffisants. En effet, un LT qui serait stimulé uniquement par son TCR deviendrait alors anergique (cf. Partie I.2.f). Ainsi, **le second signal** indispensable à l'activation d'un LT est porté par les molécules de co-stimulation. L'engagement de CD28 à la surface du LT par CD80 et CD86 exprimées par les DC activées, entraîne une augmentation de l'activation des voies de signalisation au sein des LT, menant à leur survie et prolifération. Cette prolifération est notamment permise par l'augmentation de l'expression de CD25 par les LT en cours d'activation, leur permettant de capter l'IL-2 produit de manière auto- et paracrine. En retour, les LT vont stimuler les DC pour leur permettre de compléter leur maturation, grâce à l'expression de CD40L par les LT, engageant CD40 sur les DC. Cette restimulation des DC entraîne une augmentation de leur expression des molécules de co-stimulation et leur permet de sécréter diverses cytokines responsables de la polarisation des LT, dont la nature dépend de l'origine du pathogène rencontré (Medzhitov & Janeway, 1997; J. Zhu et al., 2010) Cette stimulation par les cytokines constitue **le troisième signal** d'activation d'un LT.

c) Cinétique de l'activation des LT

Du fait de la très faible proportion de LT spécifiques d'un complexe CMHp donné, l'une des premières réactions d'un LT en réponse à son activation par une DC est son **expansion clonale**,

consistant en une intense prolifération durant 4 à 5 jours. Suite à cette prolifération, certains LT commencent à acquérir leurs fonctions effectrices à mesure qu'ils se polarisent sous la dépendance des cytokines produites par les DC, tandis que d'autres développent un phénotype de LT mémoires. On parle alors de **LT effecteurs (Teff)** et de **LT centraux mémoires (T_{CM})**. Les Teff ainsi activés doivent migrer vers le tissu d'origine de la DC afin de moduler la réponse immune. Pour cela, lors de l'interaction LT-DC, la DC va envoyer des **signaux de « homing »** aux LT, leur permettant d'exprimer les récepteurs de chimiokines adéquats. Tandis que les Teff sortiront ainsi de l'OLII pour migrer vers le site infectieux ou tumoral, les T_{CM} resteront au sein de l'OLII. Après avoir migré au sein du tissu infectieux et avoir joué leur rôle, la majorité des Teff mourront. Cependant certains d'entre eux survivent et deviennent des **LT effecteurs mémoires (T_{EM})**, population de LT mémoires circulants, ou encore des **LT résidents mémoires (T_{RM})**, population restant au sein du tissu enflammé. Ainsi, suite à **l'infection primaire**, différentes populations de LT mémoires pré-activés existent, localisée dans les OLII, dans le sang et dans le tissu cible. La capacité de ces cellules à s'activer, proliférer, et acquérir des fonctions effectrices plus rapidement que des LT naïfs, constitue les bases de la mémoire immunologique des LT, responsable d'une meilleure protection de l'organisme en cas d'**infection secondaire**.

2. Les sous-types de LT

a) Les LT CD8, des lymphocytes cytotoxiques (CTL)

Après activation par le CMH-I d'une DC (avec l'aide d'un LT CD4), les LT CD8 se différencient en cellules tueuses **CTL** (Cytotoxique T Lymphocyte). Lorsqu'une cellule est infectée par un virus ou une bactérie intra-cellulaire, les composants de ces pathogènes sont traités comme les composants du soi au sein de la cellule, et sont ainsi présentés par les molécules de CMH-I (**BOX 3**). De même, lorsqu'une cellule devient tumorale suite à l'apparition de

BOX 3 – CMH et cross-présentation

Exprimé par l'ensemble des cellules nucléées de notre organisme, le CMH-I présente des peptides **endogènes**, provenant de l'intérieur de la cellule. Le CMH-II est quant à lui exprimé majoritairement par les CPA (DC, macrophage, LB et TEC dans le thymus), et présente des peptides **exogènes**, ayant été endocytés ou phagocytés par la cellule. Cependant, si des cellules tissulaires sont infectées par un virus, lorsque certaines mourront et permettront à des DC de s'activer en réponse à ce virus, celui-ci sera exogène vis-à-vis de la DC. Elle devrait alors le présenter sur son CMH-II, et ne pourrait donc pas activer un LT CD8. Pour pallier ce défaut, les DC ont la faculté unique de pouvoir réaliser la **cross-présentation**, à savoir présenter des peptides exogènes sur le CMH-I.

mutations sur certains de ses gènes, des peptides issus des protéines ainsi modifiées (nommées « **le soi altéré** ») seront eux aussi présentés par les molécules de CMH-I. De par leur capacité à reconnaître et s'activer en réponse au CMH-I, les CTL ont la capacité de détecter une modification anormale au sein d'une cellule de l'organisme. Lorsqu'une cellule infectée ou tumorale est ainsi reconnue par un CTL, une synapse immunologique (aussi appelée kynapse) se forme entre le CTL et sa cible.

Le CTL recrute ses granules cytotoxiques composées de perforine et de granzyme au niveau de la synapse immunologique, où ils seront ensuite sécrétés. Tandis que les molécules de **perforine** se polymériseront pour former un canal transperçant la membrane plasmique de la cellule cible, les molécules de **granzyme** utiliseront ce canal pour rentrer au sein de la cellule cible et y entraîner l'apoptose par activation de la voie des caspases. La cellule cible activera son suicide par apoptose, empêchant ainsi la prolifération du pathogène intra-cellulaire ou l'expansion de la tumeur. Les CTL sont aussi fortement pro-inflammatoires de par leur production de cytokines telles que l'IFN- γ (Interféron- γ) ou le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), cytokines pléiotropes discutées par la suite. Suite à leur réactivation au sein du tissu infecté/tumoral, et à la cytolysse de plusieurs de leurs cibles, la majorité des CTL meurent à leur tour. Une partie d'entre eux va cependant acquérir un phénotype mémoire (T_{RM}) tout en restant dans le tissu cible pour surveiller l'environnement en cas de potentielle réapparition du danger.

b) Les LT CD4, des lymphocytes auxiliaires (Th)

Bien qu'il semble que les LT CD4 soient eux aussi capables d'être cytotoxiques, cela ne constitue pas leur rôle premier. Ces cellules sont en effet spécialisées dans le contrôle de la réponse immunitaire par la modulation de l'activation des autres cellules immunitaires, telles que les macrophages, les neutrophiles, les CTL ou encore les LB. De par ce rôle, les LT CD4 sont appelés les « LT auxiliaires », ou encore les « T helper » (Th). Ce contrôle passe majoritairement par la production et la sécrétion de cytokines, dont la nature diffère selon les sous-populations de Th, impactant donc différemment les cellules cibles. Ainsi, lorsqu'une DC va s'activer en réponse à un pathogène, celle-ci déterminera le type de réponse immunitaire le plus apte à répondre efficacement pour éradiquer l'infection. Les cytokines produites par les DC mais aussi par les autres cellules du système immunitaire inné, induiront donc la différenciation des LT CD4 en l'un des différents sous-types de Th, tels que les Th1, Th2,

Th17... selon le besoin. On parle aussi de polarisation des LT CD4. (**Figure 6**). Dans cette partie, je vais me focaliser surtout sur les Th1, Th2, Th17 et TFH, populations les mieux étudiées, notamment chez l'Homme.

i. Th1

Différenciation. Afin d'induire la différenciation des LT CD4 en Th1, les DC (et macrophage) produisent et sécrètent de l'IL-12, en réponse par exemple à une infection bactérienne intracellulaire (Heufler et al., 1996). En se fixant sur son récepteur, l'IL-12 active le facteur de transcription STAT-4, entraînant ainsi la production et la sécrétion d'IFN- γ . Par un effet autocrine, l'IFN γ entraîne l'activation de STAT-1, permettant l'expression du facteur de transcription **T-bet** (Hsieh et al., 1993; Thieu et al., 2008). Les NK représentent eux aussi une source potentielle d'IFN- γ (paracrine) pouvant promouvoir la différenciation Th1. T-bet, est le « master regulator » pour l'induction et la maintenance des Th1, induisant et réprimant un grand nombre de gènes (Szabo et al., 2000). En effet, lorsqu'un LT CD4 se différencie en un sous-type de T helper, il active d'un côté les gènes de ce lignage, tandis qu'il réprime épigénétiquement les gènes des autres lignages. Ainsi, T-bet est impliqué dans la répression des gènes exprimés au sein des lignages Th2 ou des Th17. T-bet n'est pas le seul à jouer ce rôle d'activateur et répresseur de l'expression génique. En effet, STAT-4 contrôle lui aussi l'expression de certains gènes, en inhibant indépendamment de T-bet l'expression de l'IL-4 par exemple, cytokine du lignage Th2 (Thieu et al., 2008; Vahedi et al., 2012).

En dehors des cytokines IL-12 et IFN- γ , la différenciation en Th1 est aussi impactée par la « force du signal », ou autrement dit l'intensité de la signalisation en aval du TCR et des molécules de co-stimulation (Constant et al., 1995; VanPanhuyt et al., 2014). En effet, l'engagement du TCR par de faibles concentrations de ligand entraîne plutôt la production d'IL-4, tandis qu'une forte concentration entraîne la production d'IFN- γ (Constant et al., 1995). De même, une interaction plus longue avec une DC exprimant plus fortement les molécules de co-stimulation telles que CD80, entraînera la différenciation en Th1 plutôt qu'en Th2 (VanPanhuyt et al., 2014). Une des explications avancées dans cette étude est la corrélation directe qu'ils observent entre l'intensité de l'engagement du TCR et l'expression du récepteur à l'IL-12 à la surface des LT CD4, augmentant la sensibilité des LT CD4 à l'IL-12. Alternativement, un autre lien peut être fait entre la signalisation du TCR et la différenciation Th1. Il a récemment été montré que le tandem Foxo3/Eomes était lui aussi impliqué dans la différenciation en Th1, en

induisant directement l'expression de l'IFN- γ (Stienne et al., 2016). Ceci suggère que l'augmentation de l'intensité de la signalisation du TCR induirait la différenciation en Th1 via deux voies distinctes mais interdépendantes, l'une faisant intervenir l'IL-12 et STAT-4, l'autre l'axe Foxo3/Eomes. D'autres protéines interviennent dans la différenciation Th1, telles que Runx1, Runx3, ou encore Hlx.

Rôles bénéfiques. Les LT CD4 de type Th1 sont spécialisés dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus et les bactéries intracellulaires (Sullivan et al., 2005), et dans la lutte contre les tumeurs (Sullivan et al., 2005; J. Zhu et al., 2010). Ces cellules sont l'une des sources principales d'IFN- γ , cytokine pléiotrope hautement pro-inflammatoire. L'IFN- γ produit par les Th1 permet entre autres de stimuler l'activité cytotoxique des CTL, d'augmenter les capacités phagocytaires des macrophages et DC, ainsi que leur expression des molécules de CMH-I/-II et de co-stimulations. Cette augmentation des fonctions présentatrices des macrophages par l'IFN- γ est primordiale pour la réactivation des Th1 et LT CD8 lorsqu'ils arrivent au sein du tissu après avoir été activés dans l'OLII. L'IFN- γ permet aussi la commutation isotypique des immunoglobulines (Ig) vers la classe IgG2a, classe pouvant activer la cascade du complément et pouvant opsoniser les pathogènes, améliorant ainsi la phagocytose par les macrophages possédant un récepteur Fc γ R (reconnaissant la partie constante Fc des anticorps). Les Th1 produisent également d'autres cytokines telles que l'IL-2 (facteur de survie et de prolifération pour les LT), le TNF- α (hautement pro-inflammatoire, stimule le système vasculaire, les macrophages, peut induire l'apoptose, régule des gènes impliqués dans le chimiotactisme, l'adhésion cellulaire, la présentation antigénique, le remodelage tissulaire... etc), le GM-CSF (Granulocyte-Macrophages Colony-Stimulating Factor) et la lymphotoxine alpha (LT α). Lorsque ces mécanismes hautement inflammatoires fonctionnent normalement (en lieu et temps voulus, avec une intensité maîtrisée), cela ne pose pas de problème. Au contraire, c'est lorsque la réponse immunitaire devient incontrôlée que cela peut engendrer de graves conséquences.

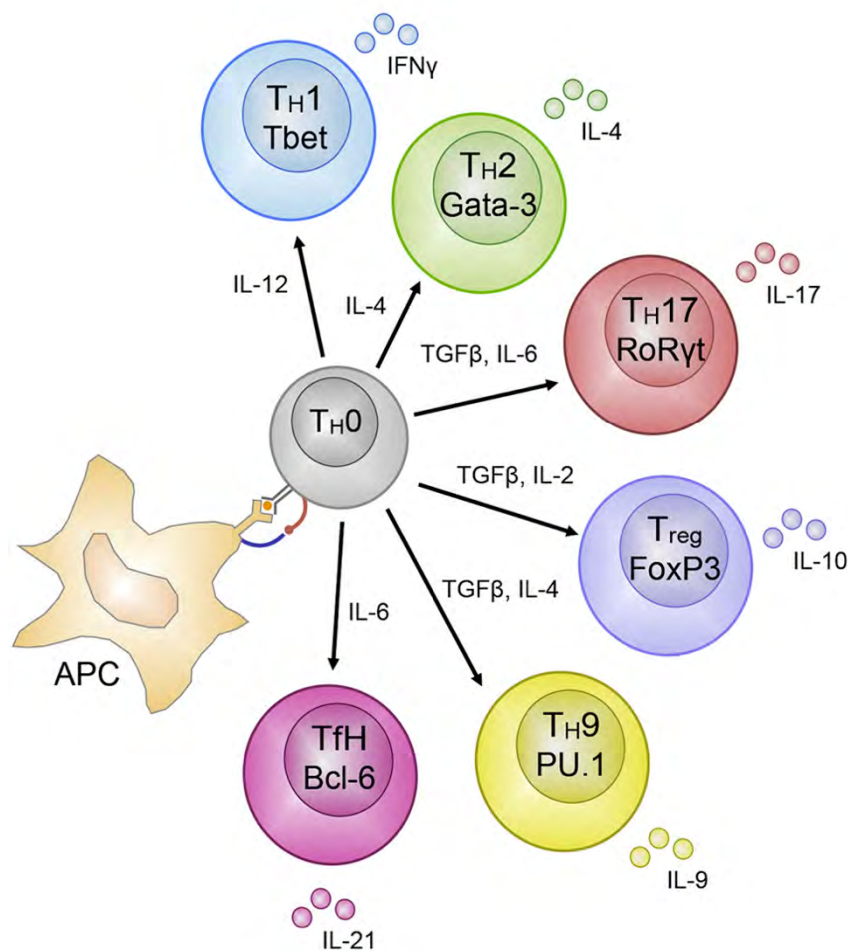


Figure 6 : Différenciation en lignages distincts de T helper

Suite à la reconnaissance d'un complexe CMH-peptide sur une CPA activée, les LT CD4 vont s'activer, proliférer, et se différencier en un sous-type de LT CD4 helper spécialisés. Cette spécialisation dépend grandement de l'environnement cytokinique dans lequel se trouve le LT CD4. Ainsi, l'IL-12 entrainera la différenciation en Th1 ; l'IL-4 en Th2 ; le TGF- β et l'IL-6 en Th17 ; le TGF- β et l'IL-4 en Th9 ; le TGF- β et l'IL-2 en iTreg ; et enfin l'IL-6 en TFH. Tous ces lignages sont associés à l'expression de facteur de transcription surnommés « master regulator » tels que T-bet, GATA-3, ou encore ROR- γ t pour les Th1, Th2 et Th17 respectivement. Enfin, chaque T helper produit une ou plusieurs cytokines spécifiques, telles que l'IFN- γ pour les Th1 ou l'IL-4 pour les Th2. Issu de [Russ et al., 2013](#).

Rôles néfastes. Les Th1 ont longtemps été pensés comme le sous-type majoritaire de LT responsable des maladies auto-immunes. On retrouve en effet une signature de la réponse T de type Th1 dans beaucoup de pathologies auto-immunes telles que le diabète de type 1 (T1D), le psoriasis, ou encore la sclérose en plaques (SEP) ([Belge et al., 2014](#); [Liblau et al., 1995](#)). L'inhibition de la réponse Th1 dans des modèles murins tels que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), étant le modèle le plus répandu pour étudier la SEP, peut mener dans certains cas à l'amélioration de la maladie, montrant l'importance de la réponse Th1 ([Sospedra & Martin, 2005](#); [Szabo et al., 2003](#)). La SEP, l'EAE, et la physiopathologie de cette maladie seront traitées plus précisément dans un prochain chapitre, mais il apparaît que l'IFN- γ , le TNF- α , et le GM-CSF, jouent toutes des rôles clés dans cette maladie.

En dehors des maladies auto-immunes, les Th1 peuvent aussi être délétères dans le cadre de maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn) ou neurodégénératives (Alzheimer) (Browne et al., 2013). Enfin, un autre rôle délétère partiellement attribué aux Th1 est le GvHD (Graft versus Host Disease), ou maladie du greffon. Dans le cadre de transfert de moelle osseuse pour le traitement de leucémie aiguë, les LT du donneur peuvent s'attaquer aux cellules de l'hôte et entraîner des conséquences parfois mortelles pour le patient. Les Th1 ont longtemps été mis en opposition avec les Th2 qui auraient quant à eux un rôle généralement protecteur dans le cadre des maladies auto-immunes (Liblau et al., 1995).

ii. Th2

Différenciation. Les LT CD4 se différencient en Th2 suite à leur stimulation avec de l'IL-4, activant le facteur de transcription STAT-6, responsable de l'expression du master regulator des Th2 : **GATA-3**. La source de l'IL-4 à l'origine de la différenciation en Th2 a longtemps été recherchée, et il semblerait qu'elle provienne des éosinophiles ou des basophiles. GATA-3 et T-bet sont des protéines antagonistes, inhibant les gènes que l'autre promeut. Cet antagonisme est particulièrement important lors de la mise en place d'une réponse immunitaire, afin d'assurer l'efficacité de la réponse mise en place dans un contexte donné. Hormis l'inhibition des gènes de type Th1, GATA-3 stimule l'expression des cytokines IL-4, IL-5, et IL-13. Tout comme pour STAT-4 dans la différenciation des Th1, STAT-6 est aussi impliqué dans l'activation et la répression de l'expression de gènes spécifiques permettant la différenciation en Th2 (Vahedi et al., 2012). L'IL-2 semble aussi jouer un rôle important dans la différenciation des Th2 *via* l'activation de STAT-5 qui collabore avec GATA-3 dans l'induction et la répression génique (J. Zhu et al., 2010). Enfin, comme mentionné précédemment, une intensité faible de la signalisation du TCR peut entraîner indépendamment d'un apport en cytokine l'expression de GATA-3 et de l'IL-4 (Yamane et al., 2005). D'autres protéines telles que IRF4, c-maf, ou encore Setdb1 jouent elles aussi un rôle dans la différenciation des Th2.

Rôles bénéfiques. Les Th2 sont importants pour l'immunité antiparasitaire. Ces cellules produisent principalement de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. L'IL-4 et l'IL-5 sont impliquées dans l'activation des basophiles et éosinophiles, cellules composées d'une grande quantité de granules à pH respectivement basiques et acides. Ces granulocytes ont un rôle primordial dans la lutte contre les parasites, souvent trop gros pour être phagocyté par les macrophages. L'IL-4 produit par les Th2 induit la commutation isotypique des Ig vers la classe IgE, pouvant être

reconnue et liée par les basophiles et les mastocytes, exprimant son récepteur FcεR. La fixation de l'IgE sur son récepteur entraîne la dégranulation de ces cellules, libérant des molécules hautement inflammatoires telles que l'histamine, ou encore des protéases. Les Th2 peuvent aussi stimuler les éosinophiles *via* leur sécrétion d'IL-5, ayant pour effet de les stimuler et de les faire proliférer. Les Th2 peuvent aussi être bénéfiques dans le cadre de maladies auto-immunes telles que la SEP, que ce soit en antagonisant la réponse Th1, ou en inhibant la réponse immune par la production d'IL-10 (Imam et al., 2007; Liblau et al., 1995).

Rôles néfastes. Le premier rôle pathogénique auquel on pense quand on parle de Th2 est leur rôle prépondérant dans les réponses allergiques. Le recrutement et l'activation des basophiles et éosinophiles, l'aide à la génération d'IgE par les LB entraînant une hypersensibilisation des mastocytes, pouvant alors sécréter de grandes quantités d'histamine, créent ensemble un environnement inflammatoire néfaste, particulièrement au sein des voies respiratoires (asthme allergique) (Wills-Karp, 2004) ou encore au niveau de la peau (dermatite atopique). Bien qu'étant premièrement été décrit comme bénéfique dans le cadre des maladies auto-immunes, les Th2 peuvent eux aussi se montrer pathogéniques, comme c'est le cas dans le SLE (Lupus érythémateux) caractérisé par la production d'auto-anticorps dirigés contre de multiples organes (Ko et al., 2022).

iii. Th17

Différenciation. Les Th17 ont été découverts bien plus tardivement, tandis que le dogme immunologique supposait l'existence d'uniquement deux populations de Th, les Th1 et Th2 (Infante-Duarte et al., 2000; Mosmann & Coffman, 1989). La différenciation en Th17 nécessite la présence d'IL-6 et de TGF-β, et est soutenue par l'IL-1β (Veldhoen et al., 2006). Par l'activation de STAT-3, l'IL-6 entraîne l'expression de l'IL-21 et du master regulator des Th17 : **RORγt** (Ivanov et al., 2006). L'IL-21 permet d'amplifier cette réponse de manière autocrine, en entraînant elle aussi l'activation de STAT-3. De plus, l'IL-21 induit l'expression du récepteur à l'IL-23, dont le signal permet la différenciation terminale des Th17 (Harrington et al., 2005). Lors de leur différenciation, les Th17 acquièrent l'expression du facteur de transcription AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), qui joue un rôle primordial dans l'induction de la production d'IL-22 au sein des Th17, mais aussi au sein des Th22, seul autre sous-type de Th à exprimer AhR. Contrairement aux autres facteurs de transcriptions clés des différents

lignages Th, le facteur AhR est un récepteur xénobiotique, étant activé par différentes molécules étrangères à l'organisme présentes dans l'environnement (Veldhoen et al., 2008). En plus de contrôler la production d'IL-22 par les Th17, AhR entraîne aussi une augmentation de la production d'IL-17. Concernant l'implication de l'intensité de la signalisation du TCR, ceci est plus controversé au sein des Th17. Il a été montré qu'en présence des cytokines polarisantes Th17, une stimulation faible du TCR (et de CD28) était plus efficace pour induire la différenciation en Th17 (Purvis et al., 2010). Inversement, il a aussi été montré que l'augmentation de l'engagement du TCR, là encore en condition polarisante, entraînait une augmentation de la production d'IL-17 (Iezzi et al., 2009). Comme résumé par Bhattacharyya et Feng, dans les deux cas ces observations ont été faites en situations polarisantes qui, contrairement à ce qui a été vu pour les Th1 et Th2, est indispensable à la différenciation en Th17 quelle que soit l'intensité de la signalisation du TCR. Ces derniers supposent ainsi que dans le cas des Th17, le milieu cytokinique jouerait un rôle primaire, tandis que la signalisation du TCR serait secondaire, et contexte-dépendant (Bhattacharyya & Feng, 2020).

Rôles bénéfiques. Ces cellules sont particulièrement importantes dans la mise en place d'une réponse contre les bactéries extracellulaires et les champignons. L'IL-17A et l'IL-17F produit par les Th17, induisent une forte activation vasculaire, permettant une augmentation du débit sanguin et de la perméabilité vasculaire là où elles sont sécrétées. En combinaison avec la sécrétion de chimiokines (telles que CXCL8), elles permettent un très fort recrutement des polynucléaires neutrophiles, population majoritaire dans le sang (chez l'Homme), spécialisées dans la phagocytose et la NETosis (Neutrophil Extracellular Trap). Les Th17 sécrètent aussi deux autres cytokines, l'IL-21 et l'IL-22. Tandis que l'IL-21 est impliqué dans la génération de centre germinatif, l'IL-22 stimule le système immunitaire inné et les épithéliums de la peau, de l'intestin et des poumons, afin de leur faire produire des molécules de défense telles que des peptides antimicrobiens. Les Th17 sont aussi impliqués dans la lutte contre les tumeurs. Cependant, l'immunité anti-tumorale est un domaine complexe, dont l'efficacité dépend grandement du type de tumeur. Il a ainsi été montré que la réponse Th17 pouvait dans certains cas être bénéfique comme dans l'élimination de mélanome (Muranski et al., 2008), tout comme elle pouvait être délétère dans le cadre de carcinome du foie (J. P. Zhang et al., 2009).

Rôles néfastes. La découverte du sous type Th17, a très vite mené à la prise de conscience que les Th1 n'étaient pas les seuls (principaux) T helper responsables des maladies auto-immunes. Le rôle prédominant des Th17 dans ces pathologies est aujourd'hui clairement établi, telles que

dans la SEP (Jadidi-Niaragh & Mirshafiey, 2011), le psoriasis (Belge et al., 2014), la polyarthrite rhumatoïde (RA), ou encore la maladie cœliaque (Faghih et al., 2018). Les pathologies inflammatoires intestinales, telles que la maladie de Crohn, des pathologies inflammatoires des voies respiratoires telles que l'asthme (Alcorn et al., 2009) ou encore le GvHD (Ratajczak et al., 2010), sont elles aussi amplifiées par les réponses de type Th17, se révélant hautement inflammatoires.

iv. TFH

Différenciation. Lors de l'activation d'un LT CD4, une partie des cellules issues de l'expansion clonale pourra se différencier en LT folliculaires (TFH) responsables de l'aide aux LB. Cette différenciation se fait sous la dépendance de l'IL-6, induisant le master regulator **Bcl-6**. L'expression de Bcl-6 lors de la différenciation en TFH s'accompagne de la répression de son antagoniste Blimp-1, et ainsi de l'inhibition « initiale » des autres masters regulators (T-bet, GATA-3, ROR γ t). Lors de leur différenciation, les TFH acquièrent l'expression d'ICOS, PD-1, CD40L, et surtout de CXCR5, toutes nécessaires à leur fonction. ICOS est une molécule de co-stimulation dont le ligand est exprimé par les LB, PD-1 une molécule de co-inhibition, et CXCR5 est le récepteur de la chimiokine CXCL13 produite dans la zone B, permettant ainsi la migration des TFH de la zone T jusqu'à la zone B. CD40L quant à elle permet de stimuler les LB, exprimant le récepteur CD40. En parallèle, les TFH produisent de l'IL-21 agissant de manière autocrine pour favoriser la différenciation en TFH, et de manière paracrine dans l'aide aux LB. Malgré la description des TFH comme un sous-type de Th à part entière, malgré l'inhibition initiale des masters regulators Th1/2/17, des études suggèrent que les TFH pourraient au cours de leur différenciation exprimer ces dits masters regulators, et avec eux des caractéristiques propres aux sous-types de Th en question comme la production de cytokines types (Olatunde et al., 2021). Enfin, il est important de noter que les TFH ne sont pas des cellules uniquement résidentes, restreintes au sein des follicules B des OLII. Différentes populations de TFH circulants (cTFH) sont en effet très étudiées chez l'Homme. Bien qu'elles ne semblent pas exprimer Bcl-6, ces cellules expriment les marqueurs et cytokines typiques des TFH (CXCR5, PD1, ICOS, IL-21) et leur présence corrèle avec la réponse humorale. (Eisenbarth, 2019; Olatunde et al., 2021).

Rôles bénéfiques. En migrant dans la zone B, les TFH ont l'opportunité d'interagir avec un LB activé, et ainsi de participer à la mise en place d'une immunité humorale efficace. Cette

interaction est en effet primordiale pour la formation d'un centre germinatif permettant la maturation des LB, induisant leur commutation isotypique, la maturation d'affinité de leur BCR (B Cell Receptor), et la mise en place de LB et de plasmocytes mémoires. Tout cela est possible grâce à la production d'IL-21 par les TFH, et à leur expression de CD40L. En plus d'induire la commutation isotypique, les TFH peuvent aussi la diriger vers différentes classes d'Ig (Immunoglobuline – Anticorps) *via* leur production de divers types de cytokines (IgG2a/IgG2c *via* l'IFN- γ , IgG1/IgE *via* l'IL-4 et IL-13, IgG3 *via* l'IL-17 et enfin IgA *via* le TGF- β) et ainsi aider à l'adaptation de la réponse selon le contexte inflammatoire (Gensous et al., 2018; Olatunde et al., 2021). Cette maturation des LB est primordiale à la génération d'anticorps de hautes affinités, tels que des anticorps IgG de type neutralisant, primordiaux dans la lutte contre le HIV (Locci et al., 2013).

Rôles néfastes. Les maladies auto-immunes sont souvent associées à une production d'anticorps dirigés contre des molécules du soi, aussi appelés auto-anticorps, impliquant ainsi les LB et les TFH dans la physiopathologie de ces maladies. Le lupus est une des maladies auto-immunes les plus étudiées concernant les TFH. C'est une maladie multi-organes au cours de laquelle de grandes quantités d'anticorps sont dirigées contre des composants nucléaires des cellules. Cette production d'anticorps est dépendante des TFH, pour lesquels on observe lors de la maladie une prolifération anormale, associée à une dérégulation des centres germinatifs (Jacquemin et al., 2015). De la même manière, on retrouve des IgG de haute affinité au sein des articulations lors de polyarthrite rhumatoïde, au niveau des synapses neuromusculaires lors de la myasthénie, ou encore au sein du SNC ou du sérum lors de la sclérose en plaques (Lalive et al., 2006). La présence d'IgG indique qu'il y a eu formation d'un centre germinatif, étant dépendant des TFH. On retrouve par ailleurs lors de ces maladies, des structures lymphoïdes ectopiques appelées follicules, promouvant la fonction des LB et plasmocytes, comme ce peut être le cas au sein du SNC lors de la sclérose en plaques. Les pathologies auto-immunes impliquant anticorps et TFH sont très nombreuses, et comprennent notamment le diabète de type 1, le psoriasis, la dermatite atopique, l'hépatite auto-immune, le syndrome de Sjogren, ou encore la thyroïdite de Hashimoto (Gensous et al., 2018).

vii. Th9, Th22, Thxx... Faut-il continuer ?

Le papier de [Mosmann & Coffman](#) en 1989 a été le premier à décrire l'apparente dichotomie au sein des LT CD4, entre Th1 et Th2. Cette vision a perduré pendant 15-20 ans, jusqu'à ce que la description d'un 3^{ème} type de T helper soit faite : les Th17 ([Harrington et al., 2005](#); [Infante-Duarte et al., 2000](#); [Ivanov et al., 2006](#); [Veldhoen et al., 2006](#)). Depuis, les découvertes de « nouvelles populations » basées sur l'expression d'autres cytokines (IL-9, IL-25, IL-22...) ont mené à la description et caractérisation de nouveaux « lignages » de LT CD4 helpers. La relevance de ces différents nouveaux lignages (et l'appartenance même de ces populations à des lignages distincts) est cependant discutable. En effet, la proximité de ces populations avec les lignages existants (Th9 avec Th2 ; Th22 avec Th17) rend la discrimination de ces populations complexes, et leur relevance physiopathologique ambiguë. Ainsi, poussé d'une part par la complexification de la famille des Th, et d'autre part par l'utilisation de plus en plus fréquente de technologies d'analyses profondes (Single-cell RNA-seq ; ATAC-seq ; CYTOF) qui illustrent les limites de la catégorisation des Th par une simple cytokine et/ou un facteur de transcription, un groupe de chercheurs a récemment proposé une approche différente de la question ([Tuzlak et al., 2021](#)). L'idée est ici de caractériser les Th non pas par les cytokines qu'ils produisent, mais par les immunités qu'ils mettent en place, par les cellules qu'ils aident - une sorte de retour à la définition même de leur nom : « LT helper », à l'image des TFH aidant les LB dans les follicules et des Treg étant régulateur. Comme illustré dans **la figure 7**, on retrouve ainsi l'immunité de type 1, impliquée dans l'aide aux DC, monocytes et macrophages ; l'immunité de type 2, impliquée dans l'aide aux LB, éosinophiles, basophiles et mastocytes ; et enfin l'immunité de type 3, impliquée dans l'aide aux tissus non-immunitaires (barrières épithéliales, cellules stromales). Cette revue n'a pas pour but de changer « réellement » la classification des Th utilisée dans la communauté scientifique, mais plutôt d'amener une réflexion quant à l'approche que nous en avons. D'autant que nous n'avons pas encore abordé la notion de plasticité entre les différents lignages de Th, affinant encore un peu plus les frontières les séparant.

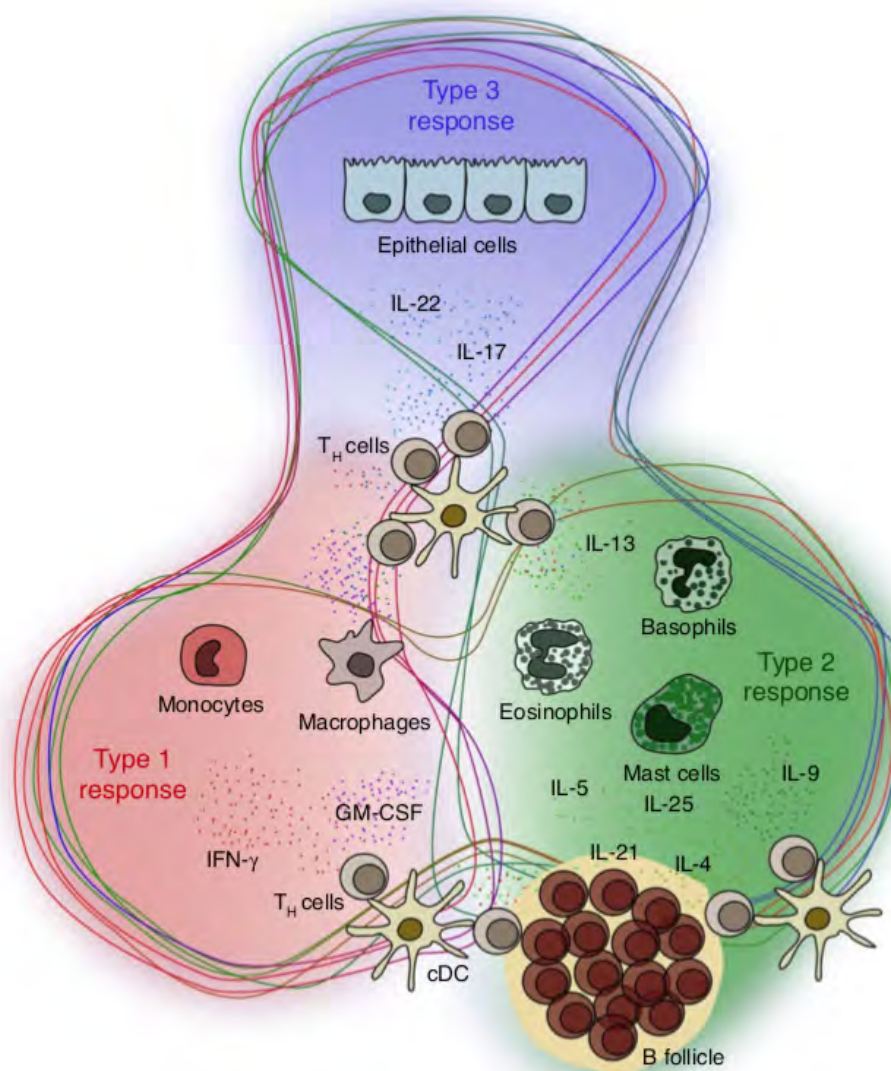


Figure 7 : Vers un nouveau modèle de classification des LT CD4 helper ?

Ce schéma représente une vision alternative du système immunitaire et plus particulièrement de la place des LT CD4 helper au sein de ce système. Ils sont ici classifiés non pas selon les cytokines qu'ils produisent, mais selon les types cellulaires qu'ils vont impacter. Ainsi, les réponses de type 1 entraîneront l'activation des phagocytes tels que les monocytes et les macrophages, les réponses de type 2 impacteront les mastocytes, basophiles, éosinophiles et enfin les LB, et pour finir les réponses de type 3 engageront des cellules principalement non-immunitaires telles que les cellules épithéliales. Ce modèle est basé sur une interconnexion des différentes réponses, et une certaine plasticité entre ces dernières. Issu de [Tuzlak et al., 2021](#).

c) Stabilité de lignage et plasticité

Après avoir décrit ces différents sous-types comme indépendants voire même mutuellement exclusifs, il est important de mentionner qu'une certaine plasticité existe entre les différents

lignages, permettant à un sous-type de T helper de se trans-différencier en un autre sous-type, ou du moins d'acquérir une partie de ses fonctions effectrices (**Figure 8**).

Cette plasticité évolue au cours de la différenciation d'un LT CD4, allant d'un potentiel hautement plastique (LT mature naïf) vers un LT de moins en moins plastique, mais de plus en plus spécialisé/différencié (LT effecteur/mémoire). Si la capacité d'un LT CD4 à être plastique diminue au cours du temps, c'est parce que sa stabilité, elle, augmente. En effet comme mentionné dans les précédents paragraphes, les étapes de différenciation s'accompagnent d'activation et de répression de l'expression génique de manière directe par le biais de facteurs de transcription, mais aussi de manière indirecte via la mise en place d'un paysage épigénétique spécifique du lignage en question.

Ces deux notions – stabilité et plasticité – peuvent paraître opposées et non réconciliables, mais forment finalement un duo efficace, d'où leur préservation au cours de l'évolution. Lors de la mise en place d'une réponse immunitaire pour contrer un danger, si la réponse nécessaire est de type Th1, il est alors primordial d'empêcher le LT CD4 de se différencier en Th2 ou Th17, du moins dans un premier temps. L'environnement inflammatoire au sein de l'organisme va ensuite évoluer, et il pourra être nécessaire que la réponse immunitaire soit à terme modifiée. Ainsi, le LT CD4 différencié en Th1 doit pouvoir s'adapter à ces changements, et de fait adapter sa réponse. La notion de stabilité peut être illustrée par l'incapacité d'un LT CD4 différencié *in vitro* en Th1, de produire de l'IL-4 et ce même sous culture en condition Th2 pendant plusieurs jours (et vice versa) (Grogan et al., 2001). Inversement, il a été montré que des LT CD4 transgéniques possédant un TCR spécifique du LCMV (Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire) différenciés *in vitro* en Th2, puis transférés dans des souris C57Bl/6 formaient une population de LT CD4 mémoires dans la souris receveuse, capable de produire de l'IFN- γ en réponse à l'infection par le LCMV, illustrant ainsi la plasticité de ces cellules (Löhring et al., 2008). De même, le groupe du Dr Stockinger a montré en utilisant des souris « fate-mapping » IL-17^{cre} ; Rosa26^{YFP} (**Box 4**) dans un modèle d'EAE, que la majorité des LT CD4 produisant de l'IFN- γ dans la moelle épinière étaient des « ex-Th17 », montrant qu'une cellule initialement activée et différenciée en Th17, pouvait malgré tout produire une cytokine de type Th1 (Hirota et al., 2011). Bien qu'il ait été montré que cette plasticité puisse être bénéfique, que ce soit en évitant une réponse Th1 excessive qui serait autrement pathogénique (Neumann et al., 2014), en rendant des Th2 capables d'éliminer une

BOX 4 – Système Rosa26

L'expression de la cre-recombinase sous la dépendance du gène IL-17 entraîne l'excision d'un codon stop et ainsi l'expression continue de YFP, rendant visible les cellules qui ont, un jour, exprimé l'IL-17, même si elles ne l'expriment plus à moment donné. On peut ainsi différencier les cellules Th17 des « ex-Th17 ».

d) Les LT CD4 régulateurs

Nous avons vu dans le chapitre précédent le développement des Treg thymiques (tTreg), aussi appelés Treg naturels (nTreg), constituant un lignage à part des Th décrit précédemment. En effet, contrairement aux LT CD4 naïfs encore non différenciés dans les OLII, les nTreg ont été pré-activés dans le thymus et ont déjà mis en place des verrouillages épigénétiques spécifiques. De plus, la nature même de leur répertoire TCR est différente puisqu'enrichie en TCR auto-spécifiques (cf. partie I.e)ii.). Cependant les LT naïfs ne se différencient pas uniquement en LT helper pro-inflammatoires, mais peuvent aussi se différencier en LT régulateurs périphériques (pTreg), alors appelés Treg induits (iTreg).

i. Les Treg induits

Différenciation. Tout comme pour la différenciation en Th1, Th2 ou Th17, la différenciation en iTreg nécessite une stimulation en présence de cytokines particulières : TGF- β et IL-2. Ces cytokines permettent d'une part l'induction du lignage Treg, et d'autre part l'inhibition de la différenciation dans les autres lignages. Ainsi, tandis que le TGF- β inhibe la différenciation en Th1 et Th2, et que l'IL-2 inhibe la différenciation en Th17, les protéines smad2/3 et STAT-5 (respectivement activées par le TGF- β et l'IL-2) vont promouvoir l'expression de Foxp3 en se liant sur leurs sites de liaison présents au niveau des régions régulatrices du gène (Zheng et al., 2010). De plus, ces cytokines instruisent des signaux de survie permettant de contre balancer les signaux pro-apoptotiques induit par Foxp3 une fois exprimé.

Étant issus de LT CD4 conventionnels, les iTreg ont un répertoire TCR majoritairement dirigé contre le non-soi, contrairement à celui des nTreg. Cependant, bien que non enrichi en TCR-auto-spécifiques, la nature du TCR semble là encore avoir un rôle dans la différenciation en iTreg. Des chercheurs ont en effet montré que la population d'iTreg générée suite au transfert adoptif de Tconv dans une souris lymphopénique, avait un répertoire TCR différent des Tconv non différenciés en iTreg (Lathrop et al., 2008). Ceci suggère que l'accessibilité d'un peptide et l'affinité d'un TCR pour ce peptide pourraient impacter la différenciation en iTreg. Dans ce sens, une étude montre qu'un peptide de forte affinité est plus efficace à induire des iTreg, mais uniquement s'il est présent en faible quantité. L'augmentation de la quantité de peptide entraîne une diminution de la différenciation en iTreg (Gottschalk et al., 2010). En effet, une trop forte signalisation du TCR active la voie AKT-PI3K-mTOR et entraîne l'inhibition de la

différenciation en iTreg. Une autre étude montre elle aussi une diminution de l'induction d'iTreg avec l'augmentation de l'engagement du TCR, mais l'explique autrement (Molinero et al., 2011). Bien qu'ils observent également une augmentation de la voie AKT-PI3K-mTOR, celle-ci ne semble pas être responsable. Dans cette étude c'est l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui, en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α , entraîne l'inhibition du lignage Treg. L'inhibition de la voie NF- κ B ou le blocage de l'IFN- γ et du TNF- α , permettent tous deux de restaurer la différenciation en iTreg même sous forte stimulation du TCR. Dans la même idée, il a été montré que la protéine de co-stimulation CD28 était inversement corrélée à la génération d'iTreg, dont l'engagement entraîne l'activation de la voie AKT-PI3K-mTOR. Ainsi, les protéines de co-inhibition CTLA-4, PD-1 et CD5 sont quant à elles positivement corrélées avec l'induction d'iTreg (Josefowicz et al., 2012; M. O. Li & Rudensky, 2016).

Les iTreg et nTreg diffèrent par leur stabilité fonctionnelle. Du fait de leur induction à partir de LT conventionnels matures, les iTreg n'ont pas de verrouillage épigénétique permettant l'expression des gènes anti-inflammatoires ou inhibant l'expression des gènes pro-inflammatoires. De même, les régions géniques régulatrices de l'expression de Foxp3 ne sont pas pleinement hypométhylées, comme elles le sont chez les nTreg (notamment le CNS2 – Conserved Non-coding Sequence). Ainsi, sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires, un iTreg perdra plus rapidement l'expression de Foxp3 et redeviendra un LT effecteur. Il est ainsi primordial de pouvoir différencier iTreg de nTreg, notamment lorsque l'on vise l'utilisation de ces cellules à des fins thérapeutiques (Sakaguchi et al., 2008). Les rôles bénéfiques et néfastes des Treg seront traités dans la partie suivante, après avoir décrit les différents mécanismes inhibiteurs que possèdent ces cellules.

Enfin, le sujet abordé ici touche les Treg induit Foxp3⁺. Il est cependant important de mentionner que d'autres populations de LT CD4 régulateurs induits n'expriment pas Foxp3 ont été décrits, à savoir les **Tr1** et les **Th3**. Tandis que les Tr1 produisent majoritairement de l'IL-10, les Th3 produisent surtout du TGF- β .

ii. Les fonctions suppressives des Treg

Les Treg, qu'ils soient nTreg ou iTreg, disposent de différents mécanismes cellulaires et moléculaires leur permettant d'inhiber les cellules du système immunitaire (Tconv, CD8, LB, NK...), que ce soit de manière contact-dépendant ou à distance (**Figure 9**).

Leur mécanisme le plus connu est **la production de cytokines inhibitrices**, telles que l'IL-10 et le TGF- β principalement, mais aussi l'IL-34 (Bézie et al., 2015) et l'IL-35 (Collison et al., 2007), plus récemment décrites. En se fixant sur leurs récepteurs présents sur les cellules cibles, ces cytokines inhibent leur réponse inflammatoire et les dévient vers une activité de résolution de l'inflammation.

Les Treg peuvent aussi agir plus en amont de la réponse immunitaire, en empêchant l'activation ou la réactivation des Tconv *via la modulation de la fonction des CPA*. La protéine CTLA-4 joue ici un rôle très important. Exprimée par les Treg, elle a une affinité 16 fois supérieure pour CD80 et CD86 que CD28 (Van Der Merwe et al., 1997), et entre ainsi en compétition avec les Tconv pour ce signal nécessaire à leur (ré)activation. La fixation de CTLA-4 sur CD80 entrainerait aussi l'expression de l'enzyme IDO par les DC, catabolisant ainsi le tryptophane en kynurenine, un métabolite inhibant les Tconv (Fallarino et al., 2003). Enfin, il a aussi été montré que les Treg étaient capables grâce à CTLA-4 de trans-endocyter la protéine de co-stimulation CD80 (Qureshi et al., 2011; Wing et al., 2008), privant ainsi complètement les Tconv de ce signal. Dans le même esprit, il a tout récemment été montré que les Treg étaient aussi capables de voler aux DC le complexe CMH-peptide lui-même, de manière antigène-dépendante *via* leur TCR (Akkaya et al., 2019).

Les Treg peuvent aussi entrainer **des perturbations métaboliques**, notamment grâce à leur expression constitutive de CD25, la chaîne de haute affinité du récepteur à l'IL-2. En exprimant fortement son récepteur, les Treg sont capables de diminuer la quantité d'IL-2 disponible dans le milieu, et ainsi de priver les autres LT de ce signal primordial pour leur survie et leur prolifération (Pandiyan et al., 2007). De même, de par leur expression des ectoenzymes CD39 et CD73, les Treg ont la capacité de métaboliser l'ATP présent dans le milieu en ADP puis en adénosine inhibitrice. Cette inhibition fonctionne ainsi à deux niveaux, le premier consistant à éliminer l'ATP (ayant un rôle dans la maturation des DC par exemple), et le deuxième en produisant l'adénosine inhibitrice dont la liaison sur son récepteur A2A entraîne l'inhibition des Tconv (Borsellino et al., 2007; Lappas et al., 2005).

Enfin, les Treg disposent d'un dernier mécanisme un peu plus extrême : **la cytolysse**. Empêcher l'activation d'une cellule en la tuant, est effectivement un moyen d'y arriver. Pour cela, les Treg

expriment suite à leur activation la machinerie cytotolytique traditionnelle, à savoir les molécules de perforine et le granzyme, dont l'expression entraîne par exemple l'augmentation du pourcentage de NK et de LT CD8 en apoptose au sein d'une tumeur (Cao et al., 2007).

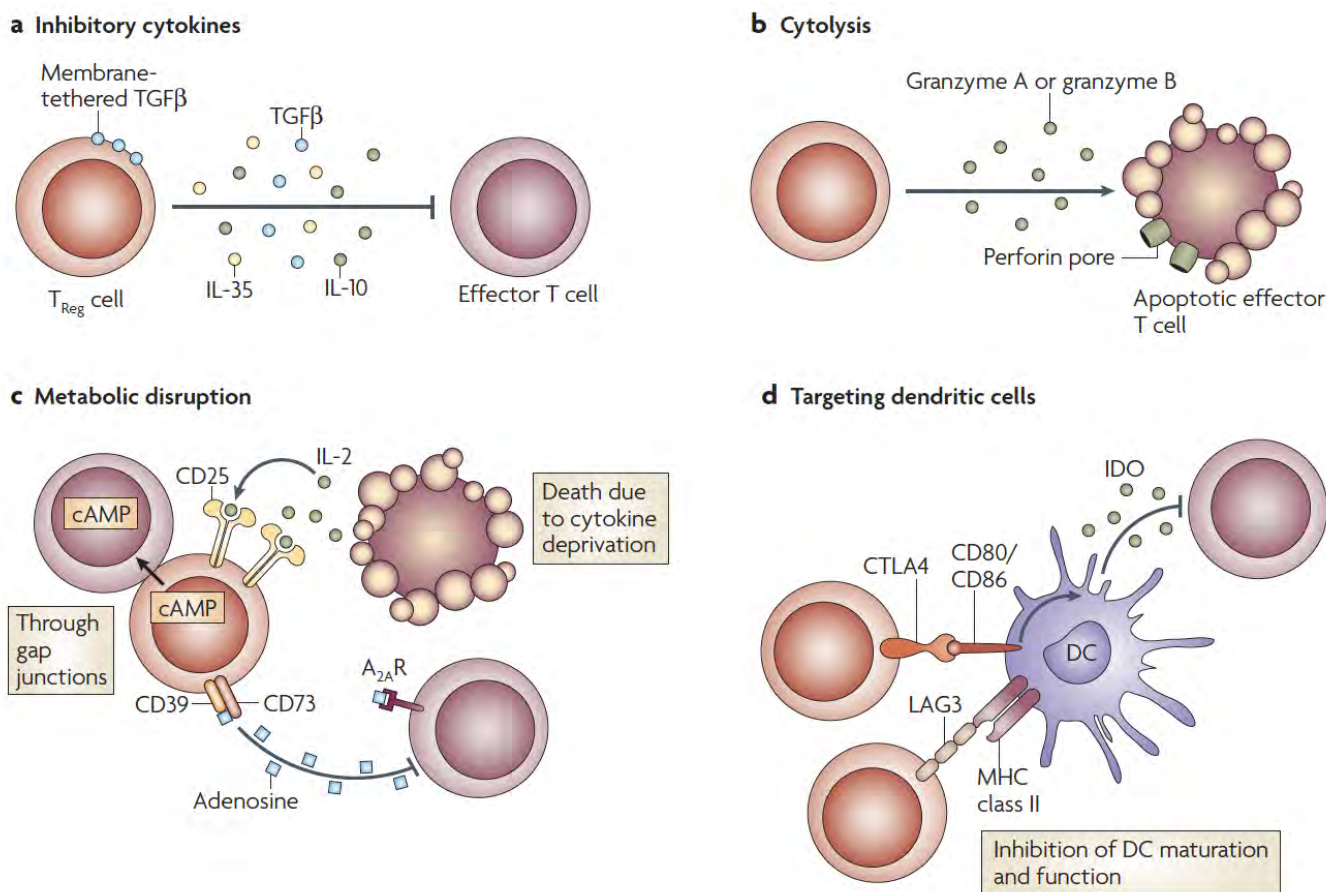


Figure 9 : Les fonctions suppressives des Treg

Les LT CD4 régulateurs, ou Treg, possèdent différentes fonctions suppressives leur permettant de contrôler le système immunitaire, et notamment l'activation des LT conventionnels. **a)** La production de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, l'IL-35 ou encore le TGF-β. **b)** La cytolysse par le biais de l'expression de perforine formant des pores dans la membrane de la cellule cible, et de granzyme rentrant par ces pores et activant l'apoptose par le biais des caspases. **c)** Les perturbations métaboliques telles que la privation en IL-2 via la forte expression de CD25 ou encore la génération d'adénosine inhibitrice par le biais de CD39 et CD73. **d)** L'inhibition de la fonction des CPA, en les privant de leurs molécules de co-stimulation ou en leur faisant produire l'enzyme IDO, responsable de la génération de kynurénine inhibant les Tconv. Issu de Vignali et al., 2008.

Rôles bénéfiques. Grâce aux fonctions suppressives décrites ci-dessus, les Treg sont impliqués dans la tolérance au soi, mais aussi dans la résolution de l'inflammation suite à l'activation du système immunitaire, dans la tolérance materno-fœtale, ou encore dans l'homéostasie intestinale. Pour citer quelques exemples, il a été montré que les Treg ont un effet bénéfique lors de diverses maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type 1, le psoriasis, le SLE, ou encore la SEP (Duffy et al., 2019; Malviya et al., 2020).

Un élément qui influence la capacité des Treg à mener à bien leurs fonctions suppressives est leur polarisation. Sous la dépendance de signaux cytokiniques, les Treg peuvent exprimer les masters regulators des lignages Th1, Th2, Th17 ou TFH. Ainsi, un Treg T-bet⁺ pourra exprimer des récepteurs de chimiokine clé du lignage Th1 tels que CCR5 et CXCR3, ce qui lui permettra de migrer dans les tissus où se trouve les Th1, et ainsi de les inhiber (Koch et al., 2009; Qiu et al., 2020).

En revanche, si cette polarisation est poussée un peu trop loin, les Treg peuvent commencer à acquérir des fonctions pro-inflammatoires, et perdre au passage leurs capacités suppressives. On retrouve ainsi chez les patients atteints de maladies auto-immunes telles que la SEP, des Treg exprimant l'IFN- γ et ayant en partie perdu leurs fonctions suppressives (Dominguez-Villar et al., 2011).

Rôles néfastes. Le principal cas de figure où les Treg sont délétères, est lors de réponses anti-tumorales. En effet, les Treg vont infiltrer la tumeur en nombre, inhiber les fonctions lytiques des CTL et des NK, diminuer l'inflammation locale et ainsi limiter le recrutement de nouvelles cellules, induire le développement de nouvelles cellules inhibitrices telles que les MDSC (myeloid derived suppressor cells), ou encore promouvoir directement la croissance tumorale par le biais de facteurs angiogéniques (Takeuchi & Nishikawa, 2016).

Un second cas de figure est lors de réponses inflammatoires au cours d'une infection par un pathogène, où ils peuvent empêcher la mise en place d'une réponse effectrice efficace. C'est par exemple le cas lors d'une infection par un parasite pouvant sécréter un analogue du TGF- β , induisant ainsi la génération de Treg Foxp3⁺ impliqués dans l'inhibition de la réponse immunitaire contre ce parasite, permettant ainsi l'établissement d'une infection chronique (Grainger et al., 2010).

Chapitre III – La signalisation du TCR $\alpha\beta$

Dans les deux chapitres précédents, nous avons souligné l'importance de la signalisation du TCR et des variations de son intensité. Nous avons vu que ceci a des conséquences majeures que ce soit dans le développement thymique des thymocytes (choix de lignage, survie ou délétion clonale) ou dans leur activation en périphérie dans les OLII et la polarisation qui en découle. Nous verrons ici en quoi consiste cette signalisation, en décrivant les différents acteurs qui la compose.

1. Engagement du TCR (interaction cellule-cellule)

a) La synapse immunologique

L'engagement du TCR nécessite la présentation par une CPA, d'un complexe CMH-peptide qui sera reconnu à la fois par le TCR et par son co-récepteur CD4 ou CD8. Et bien que lorsqu'on parle de signalisation du TCR, on ne mentionne quasiment que cette interaction (\pm molécules de co-stimulation), d'autres interactions sont requises pour stabiliser le contact LT-CPA et permettre l'activation d'un LT, telles que les intégrines LFA-1 et VLA-4, avec leur ligand respectif ICAM-1 et VCAM-1, ou encore la protéine CD2 sur le LT reconnaissant CD48/CD58 sur la CPA (**Figure 10**). L'ensemble de ces protéines forment la synapse immunologique, découpée en 2 zones SMAC « actives » (Supra Molecular Activation Cluster) dénommées cSMAC pour la zone centrale (contenant TCR, co-récepteurs et molécules de co-stimulations) et pSMAC pour la zone périphérique (contenant les molécules d'adhésions de type intégrines). Une 3^{ème} zone SMAC, « passive » quant à elle, consisterait en l'exclusion de très grandes protéines qui pourraient interférer avec le rapprochement des deux cellules. C'est l'initiation de la signalisation du TCR qui permet la formation de cette synapse immunologique, entraînant en retour une augmentation de la stabilité et ainsi la durée de l'interaction ([Valitutti & Espagnolle, 2006](#)).

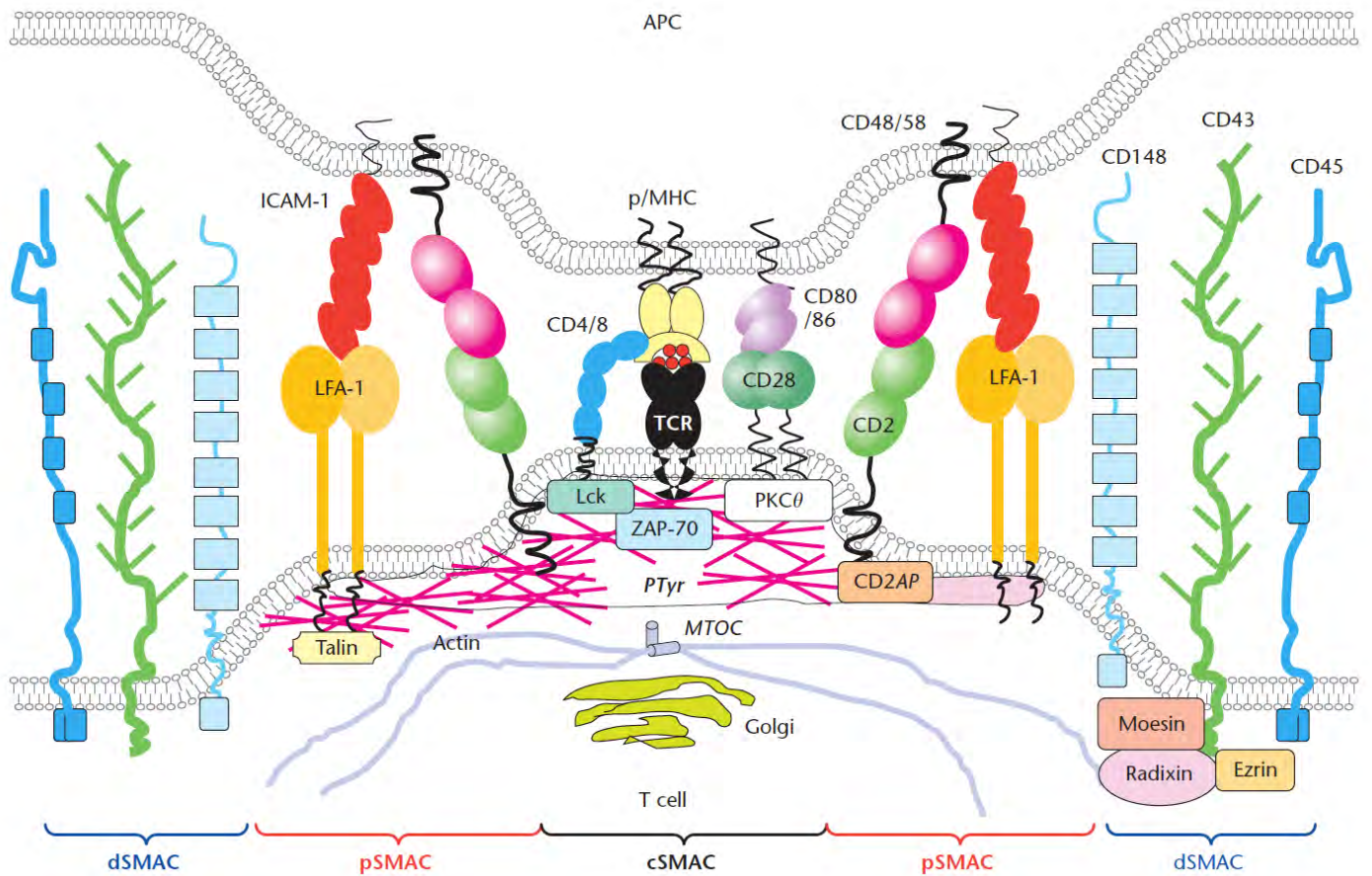


Figure 10 : La synapse immunologique

Suite à l'engagement du TCR d'un LT avec le complexe CMHp d'une CPA, si l'affinité est suffisamment grande pour maintenir le contact assez longtemps, alors une synapse immunologique va commencer à se mettre en place entre les deux cellules. La synapse immunologique est découpée en 3 parties appelées cSMAC, pSMAC et dSMAC, délimitant les régions centrale, périphérique et distale respectivement. On retrouve au sein de la partie centrale des microclusters de TCR, CD4 et CD28, entourés par un anneau d'intégrines telles que LFA-1 formant le pSMAC, et permettant la stabilisation de l'interaction entre la CPA et le LT. Enfin, on retrouve exclues des cSMAC et pSMAC des protéines à grands domaines extracellulaires telles que CD43 ou CD45. Cette structuration de la synapse immunologique est dépendante de la signalisation du TCR, et est mise en place grâce au remodelage du cytosquelette d'actine et de microtubules. Issu de [Valitutti et Espagnolle, 2005](#).

b) TCR-CD3-CD4 : prérequis à la signalisation du TCR

Le TCR est composé de 2 chaînes (alpha et beta) constituées chacune de 2 domaines (variable et constant – cf. chapitre 1). Cependant aucun de ces domaines ne possède une activité enzymatique pouvant initier la signalisation, ni même de résidu pouvant être la cible d'une enzyme. C'est pourquoi le TCR est toujours associé à la protéine **CD3**, et à proximité de son co-récepteur CD4 ou CD8 (on simplifiera par la suite en ne mentionnant plus que CD4). CD3 est une protéine composée de 6 sous-unités (1 chaîne γ , 1 chaîne δ , 2 chaînes ϵ et 2 chaînes ζ) possédant 1 à 3 domaines **ITAM** (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) pour un total de 10 ITAMs, pouvant chacun être phosphorylé sur 2 tyrosines (**Figure 11**). Ce nombre peut paraître anecdotique mais pourrait être en fait primordial dans l'appréciation de l'affinité/avidité du TCR pour son ligand. En effet, il a été démontré que la réduction du nombre d'ITAM entraînait un défaut de sélection négative dans le thymus et ainsi une maladie auto-immune multi-organe létale ([Holst et al., 2008](#)). La protéine CD4 est composée de 4 domaines extracellulaires et dispose d'une petite région intracellulaire, ne possédant ni activité enzymatique, ni résidu pouvant être phosphorylé. En revanche, CD4 interagit constitutivement avec la protéine kinase **Lck**, appartenant à la famille src. Ainsi, lorsque le TCR se lie au complexe CMHp, et que le co-récepteur CD4 reconnaît le domaine $\beta 2$ du CMH-II, il y a un rapprochement physique entre la kinase Lck et les domaines ITAM de CD3. Lck ayant été montré comme déjà active à l'état basal ([Nika et al., 2010](#)), va ainsi pouvoir phosphoryler les domaines ITAM, et ainsi initier la signalisation du TCR. L'activité de Lck est régulée par la phosphorylation de 2 tyrosines, étant Y-394 (activatrice) et Y-505 (inhibitrice, entraînant le repliement de la protéine par interaction de p-Y-505 avec son domaine SH2 (**BOX 5**)). L'augmentation de son activité suite à l'engagement du TCR reste sujet à débat, certains décrivant un pool de Lck activé inchangé entre état basal et TCR engagé ([Nika et al., 2010](#)), d'autres montrant une augmentation de sa fonction après stimulation du TCR ([Philipsen et al., 2017](#)). Le contrôle de la phosphorylation de Lck semble aussi avoir lieu en fonction de réarrangements spatio-temporels. On citera l'exemple de la protéine CD45 qui est exclue de la synapse vers la région dSMAC après engagement du TCR.

BOX 5 – Domaines d'interaction protéique

Plusieurs types de domaines impliqués dans les interactions protéine-protéine reviennent fréquemment lorsque l'on s'intéresse à la signalisation intracellulaire. Voici les principaux d'entre eux, qui seront mentionnés dans le chapitre 3 : **SH2 – phospo-Y** ; **SH3 – PRR** (prolin-rich region) ; **PH** (plecstrin homology) – **phosphoInositol**.

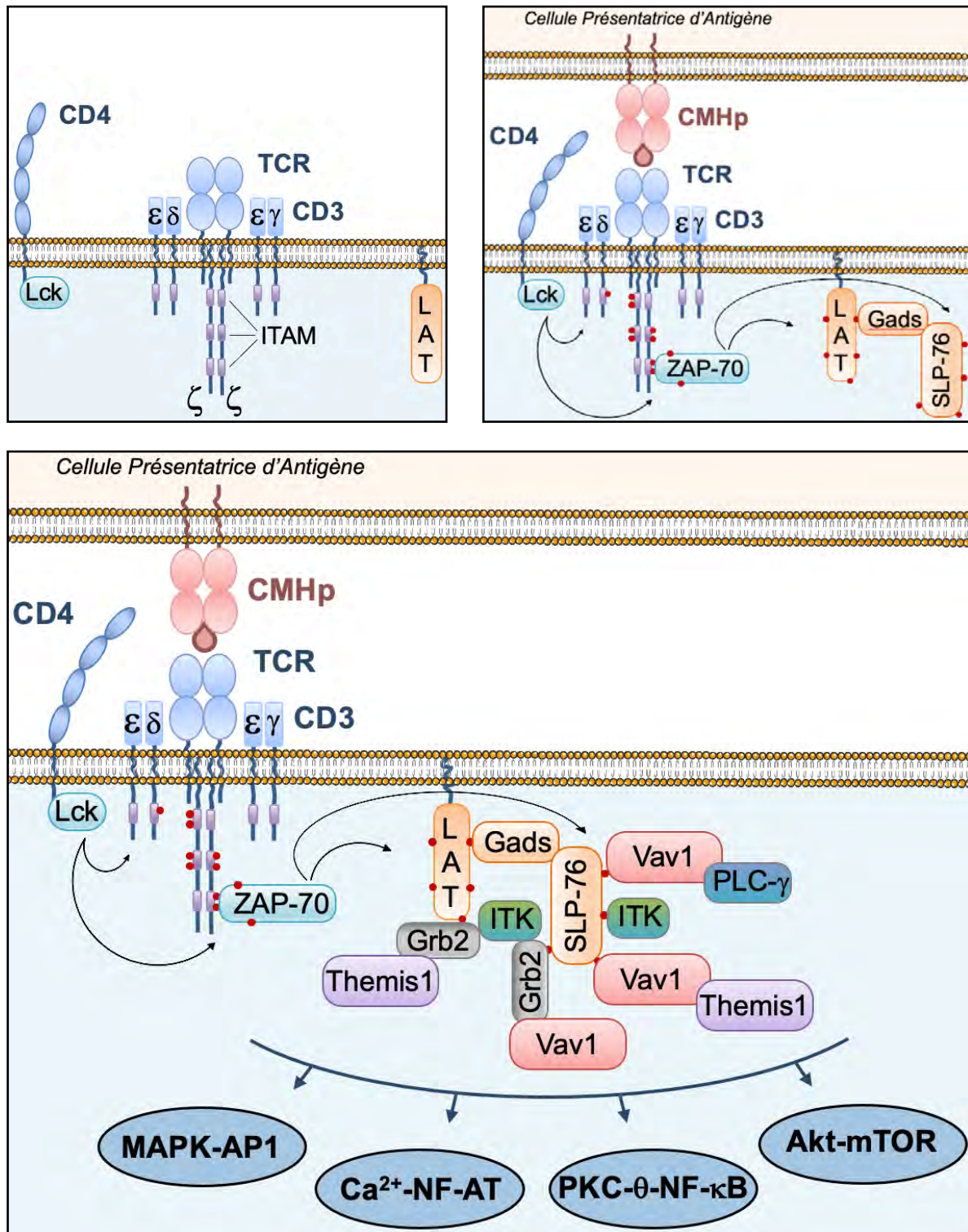


Figure 11 : La signalisation proximale

En haut à gauche : Le TCR et ses protéines associées (CD3 et CD4) en absence de stimulation. **En haut à droite :** Rapprochement de CD4 suite à l'engagement du TCR, permettant la phosphorylation des ITAM par Lck et le recrutement/activation de ZAP-70, entraînant la formation du complexe LAT-Gads-SLP-76. **En bas :** Les complexes LAT-Gads-SLP-76 phosphorylés sur différents résidus permet le recrutement d'un grand nombre de protéines de signalisation, aboutissant à l'activation des quatre grandes voies qui seront décrites par la suite.

CD45 possède en effet deux domaines intra-cellulaires à activité phosphatase, pouvant déphosphoryler les deux tyrosines de Lck, et donc exercer un effet activateur ou répresseur. Cet effet va varier au cours du temps, que ce soit à l'initiation de l'engagement du TCR (pas de synapse immunologique encore formée donc pas d'exclusion de CD45), au milieu de l'engagement du TCR (exclusion de CD45) et après l'engagement du TCR (Rossy et al., 2013; Rudd, 2021).

2. Signalisation proximale (ZAP-70, LAT, SLP-76)

Suite à la phosphorylation des ITAM, la kinase **ZAP-70** (Zeta chain-Associated Protein kinase) est recrutée par interaction de ses 2 domaines SH2 avec un domaine ITAM, puis elle-même phosphorylée par Lck entraînant ainsi son activation. ZAP-70 phosphoryle ensuite deux protéines que l'on peut caractériser de protéines échafaudages, de par leur absence d'activité enzymatique et leur grand nombre de domaines d'interactions protéiques, permettant le regroupement de multiples protéines, favorisant ainsi leurs interactions. On retrouve premièrement **LAT** (Linker for Activation of T cell), une petite protéine de 37kDa possédant un domaine d'ancrage dans la membrane plasmique lui permettant de se situer à proximité du TCR (**Figure 11**). LAT possède 5 tyrosines phosphorylables par ZAP-70 (Paz et al., 2001), permettant notamment le recrutement de protéines à domaine SH2 comme **GADs** (Grb2-related protein Adapter Downstream of Shc), qui de par sa liaison constitutive et de très forte affinité avec le domaine PRR de **SLP-76** (Sh2 domain-containing Leucocyte Phosphoprotein), permettra la formation d'un complexe **LAT-GADs-SLP76** (**Figure 11**). SLP-76 est elle aussi phosphorylée par ZAP-70 sur 2 résidus tyrosines et permet ainsi le recrutement d'autres protéines à domaine SH2 (Rudd, 2021). Le signalosome ainsi formé pourra recruter les premières protéines à fonctions enzymatiques telles que la **PLC- γ** (Phospholipase C gamma), **ITK** (IL-2 inducible T cell Kinase), ou encore **Vav1**, dont les rôles seront discutés ci-après, mais aussi d'autres protéines adaptatrices dont le rôle est uniquement de rapprocher physiquement les acteurs de la signalisation telles que **Grb2** (Growth factor receptor-bound protein 2) ou encore **ADAP** (adhesion and degranulation-promoting adapter protein) (W. Zhang et al., 2000). De la formation de ce complexe multiprotéique proximal, découle l'activation de quatre voies de signalisation distales principales, que sont : la voie calcique (a), la voie PKC θ -NF-kB (b), la voie des MAPK (c), et enfin la voie Akt-mTOR (d) (**Figure 11 et 12**).

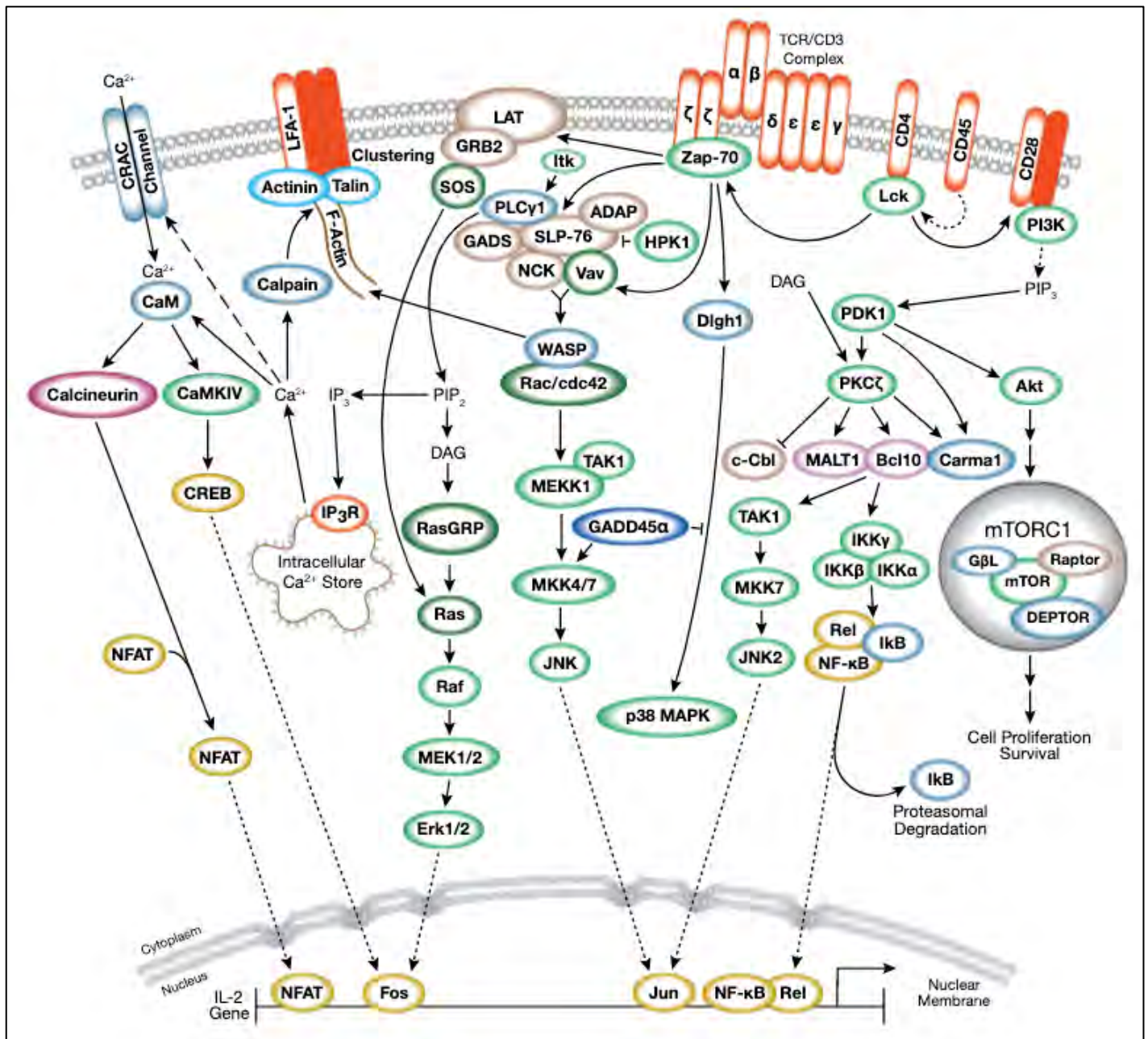
Ces voies sont primordiales pour le développement et pour la fonction des LT, mais au vu de mon projet de thèse, je décrirai seulement leur implication dans la fonction des LT.

3. Signalisation distale

a) La voie calcique

Après son recrutement au sein du signalosome, ITK est phosphorylée par Lck, ce qui entraîne son activation. ITK phosphoryle ensuite la PLC- γ , entraînant l'activation de sa fonction phospholipase lui permettant d'hydrolyser le PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) ancré dans la membrane plasmique en **IP3** soluble (Inositol 1,4,5 triosphosphate) et **DAG** (diacylglycerol) restant ancré dans la membrane. L'IP3 généré par la PLC- γ va entraîner la libération dans le cytosol d'ions calcium Ca^{2+} stockés dans le réticulum endoplasmique (RE), générant une première vague d'augmentation de Ca^{2+} . La diminution de la concentration en Ca^{2+} dans le RE entraîne l'activation et l'ouverture de canaux CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+}) situés dans la membrane plasmique, créant ainsi un influx important de Ca^{2+} extracellulaire dans le cytosol (Muik et al., 2012). Ces deux vagues de Ca^{2+} permettent l'activation de la **calmoduline**, activant ensuite la **calcineurine**, une phosphatase ayant pour cible le facteur de transcription **NF-AT** (Nuclear Factor of Activated T cells). Lorsqu'il est phosphorylé, NF-AT est séquestré dans le cytosol. Sa déphosphorylation par la calcineurine permet donc sa translocation nucléaire, et ainsi la **régulation génique** NF-AT-dépendante, phase « effectrice finale » de la signalisation du TCR.

La voie calcique est souvent associée à la réponse Th2, comme illustré par le défaut de différenciation en Th2 et l'augmentation de la différenciation en Th1 chez les LT CD4 ITK-KO (A. T. Miller et al., 2004). En effet, une stimulation faible du TCR de LT CD4 ITK-KO entraîne l'expression de T-bet et de l'IFN- γ , contrairement à des cellules WT exprimant GATA-3. Cependant, il a aussi été montré que les cellules Itk-KO présentaient un défaut de la production d'IL-17A, et ce malgré une expression de ROR γ t normale. Cela serait dû à la liaison directe de NF-AT sur le promoteur de l'IL-17A (Gomez-Rodriguez et al., 2009), indiquant que la voie calcique n'est pas spécifique à la réponse Th2. De même, les LT matures PLC- γ -KO ont un défaut de prolifération et de production d'IL-2 et d'IFN- γ , associés à une diminution de l'activation de NF-AT, mais aussi de Erk, JNK, AP-1 et NF- κ B, protéines décrites ci-dessous (Fu et al., 2010).



- Receptor
- Kinase
- GTPase/GAP/GEF
- Prot. complex
- Transcription Factor
- Adaptor
- Phosphatase
- Cytoskeletal Protein
- Other
- Cell cycle regulator

Figure 12 : La signalisation du TCR dans son ensemble

L'engagement du TCR et des récepteurs de co-stimulation tels que CD28 entraîne l'activation d'un grand nombre de protéines appartenant à une ou plusieurs voies de signalisation, aboutissant pour la plupart à l'activation de facteurs de transcription qui se transloquent alors dans le noyau pour réguler l'expression génique positivement ou négativement. L'engagement du TCR entraîne aussi l'activation de protéines impliquées dans le remodelage de l'actine et ainsi dans la motilité de la membrane plasmique. (Adapté de Cell-Signaling-Technology, par S. Gosh)

b) La voie PKC θ -NF κ B

Autre que NF-AT, le facteur de transcription **NF- κ B** (Nuclear Factor kappa B) joue lui aussi un rôle primordial dans la régulation génique suite à l'engagement du TCR. Il est composé de l'assemblage de deux sous-unités qui peuvent varier suivant les cas : p50, p52, p65 (RelA), RelB et enfin cRel. Deux voies menant à l'activation de NF- κ B ont été décrites, la voie canonique, et la voie alterne (Weil & Israël, 2006). Les complexes de sous-unités impliqués dans la voie canonique sont **p50-RelA** et **p50-cRel**, tandis que la voie alterne est caractérisée par l'activation de complexes **p52-RelB** (BOX 6).

À l'état basal, les complexes canoniques sont constitutivement réprimés par le **complexe I κ B** (I κ B α , I κ B β , I κ B γ) qui les séquestre dans le cytosol. C'est donc en inhibant le complexe I κ B que divers stimuli dont le TCR, peuvent entraîner l'activation

BOX 6 – Voie non-canonique du NF- κ B

La voie alterne du NF- κ B n'est pas activée en réponse à l'engagement du TCR, mais en réponse à l'engagement de molécules de **co-stimulation**, telles que 4-1BB ou OX40. La liaison de ces récepteurs entraîne l'inhibition de la dégradation de la kinase **NIK** (NF- κ B Inducing Kinase), qui est responsable, avec **IKK α** , du clivage du précurseur **p100** (NF- κ B2) déjà associé à **RelB**, en sa forme **p52** active, pouvant alors se transloquer dans le noyau (S. C. ...).

de RelA et cRel. Nous avons vu que suite à l'engagement du TCR, la PLC- γ est recrutée à la membrane, activée, et génère de l'IP3 et du **DAG**. Ce dernier permet le recrutement de la **PKC θ** (Protein kinase C theta) contenant deux domaines de liaison à DAG (Schulze-Luehrmann & Ghosh, 2006). Il a été montré que suite à l'activation du TCR, la PKC θ s'accumule au niveau des régions cSMAC, avec le TCR, le co-récepteur et les molécules de co-stimulation. Cette proximité permet sa phosphorylation par Lck, entraînant son activation. La PKC θ phosphoryle ensuite CARMA1 permettant la formation du complexe CBM (**CARMA1-Bcl10-MALT1**), dont le rôle est l'activation des protéines **IKK α** et **IKK β** . Ces dernières, dont la fonction est de phosphoryler et ainsi d'inactiver le répresseur d'NF- κ B (I κ B), sont associées à la protéine **NEMO (IKK γ - NF- κ B Essential Modulator)** formant un complexe à elles trois. En ubiquitinant NEMO, le complexe CBM entraîne un changement de conformation du complexe IKK permettant la phosphorylation et ainsi l'activation des protéines IKK α/β par TAK1/TAB. Une fois activées, elles peuvent phosphoryler le complexe I κ B qui sera ensuite dégradé par le protéasome, libérant ainsi le facteur de transcription NF- κ B (Weil & Israël, 2006).

La PKC θ a un rôle primordial dans l'activation et la fonction des LT matures, illustré par une prolifération réduite de 20 fois suite à l'engagement du TCR et de CD28 chez des souris PKC θ -KO. Ceci est associé à un défaut d'activation de NF-kB et AP-1, et une réduction de la production d'IL-2 (Z. Sun et al., 2000). De plus, une étude montre que ces souris développent une EAE moins sévère associée à une réduction de la prolifération et de la production d'IFN- γ , d'IL-17 et de TNF- α (Salek-Ardakani et al., 2005). De manière intéressante, il a été montré que les défauts de prolifération et de différenciation en Th1 observé chez les LT CD4 PKC θ -KO peuvent être compensés en augmentant la stimulation du TCR (Marsland & Kopf, 2008). De même, l'inhibition plus distale de cette voie en surexprimant au sein des LT l'inhibiteur I κ B α a aussi montré une nécessité de cette voie pour la prolifération et la différenciation Th1, sans pour autant impacter la différenciation Th2 (Corn et al., 2003). Il a aussi été montré que la délétion en cRel ou en RelA induisait un défaut de la différenciation en Th17, notamment du fait du défaut d'induction de ROR γ t, dont les séquences promotrices possèdent des sites de liaison pour cRel et RelA (Ruan et al., 2011). Ceci est en accord avec une précédente études démontrant que les souris cRel KO sont résistantes à l'EAE, bien que celle-ci l'explique uniquement par une diminution de la réponse Th1 (les Th17 n'étaient pas encore décrits à cette époque) (Hilliard et al., 2002). De façon intéressante, il semblerait que NF-kB soit malgré tout impliqué dans la différenciation Th2 mais au travers de sa voie non-canonique (Das et al., 2001). Enfin, comme mentionné dans le chapitre précédent, NF-kB a aussi un rôle inhibiteur dans la différenciation des LT CD4 en iTreg (Molinero et al., 2011). Cette étude montre en effet qu'en réponse à une très forte stimulation du TCR, l'activation de la voie NF-kB par le biais de CARMA1, IKK β et I κ B, entraîne la production d'IFN- γ et de TNF- α et inhibe ainsi la différenciation en iTreg. Néanmoins, la voie NF-kB est nécessaire à la fonction suppressive des Treg matures, que ce soit *via* cRel (Grinberg-Bleyer et al., 2017) ou RelA, comme illustré par les syndromes auto-immuns observés chez la souris Foxp3cre-RelA^{flox} (Ronin et al., 2019).

c) Les voies des MAPK

Les voies des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) sont au nombre de trois (la voie **Erk**, la voie **JNK** et la voie **p38**) ayant une « structure » similaire, à savoir un enchaînement de 3 protéines kinases se phosphorylant en cascade (MAPKKK > MAPKK > MAPK), la première d'entre elles étant activée par une GTPase. La finalité des voies des MAPK est la formation des facteurs de transcription **AP-1**. Ces derniers peuvent être homo- ou hétéro-dimériques, constitués des sous-unités c-Fos et/ou c-Jun, ainsi que du facteur ATF (Activating Transcription Factor).

Suite à l'engagement du TCR, différentes protéines convergent vers l'activation de la GTPase **Ras**. Étant une GTPase, Ras doit être activé par une protéine à fonction GEF (GTPase Exchange factor) qui va échanger le GDP associé à Ras avec un GTP, telles que **RasGRP1**, recrutée par DAG (axe ITK-PLC- γ), ou encore **SOS** (Son of Sevenless), protéine recrutée à LAT par l'intermédiaire de Grb2. Une fois activée, Ras peut entraîner la cascade d'activation des MAPK, en activant la MAPKKK **Raf**, qui activera la MAPKK **MEK**, qui elle-même activera la MAPK **Erk**, dont la finalité est la phosphorylation de c-Fos. De même, les GTPases Rho, Rac et CDC42 (activée par la fonction GEF de Vav1) vont entraîner l'activation des cascades MEKK1 > MKK4-7 > **JNK**, et MEKK4 > MKK3-6 > **p38**^{T180/Y182} (Gaud et al., 2018). En plus de cette voie classique, p38 peut être activée par une voie alterne. Dans celle-ci, la protéine adaptatrice Dhlgl1 permet le recrutement de p38 à proximité de ZAP-70 qui phosphorylera la tyrosine-323 de p38. Ce p-Y³²³ entraîne l'autophosphorylation des résidus T180/Y182 par p38, et ainsi son activation. JNK et p38 phosphorylent ensuite c-Jun, et ATF2 qui pourront former un complexe, s'homodimériser (c-Jun uniquement) ou s'associer à c-Fos pour induire et réprimer l'expression génique de diverses cibles (Ashwell, 2006; Shaulian & Karin, 2002).

Il a été montré que Erk2 était impliquée dans la différenciation en Th1 et iTreg. En effet, la délétion de Erk2 entraîne un défaut de la différenciation en Th1, et permet la différenciation en iTreg (C.-F. Chang et al., 2012). Cette observation semble pouvoir être élargie à l'ensemble des MAPK, ayant un effet non pas spécifique sur la différenciation en iTreg mais sur la réponse au TGF- β . Une étude utilisant la double-délétion des MAPKKK MEKK2 et MEKK3 (toutes deux capables individuellement d'activer les 3 familles de MAPK ; Erk, JNK et p38) a en effet montré que les LT CD4 en périphérie démontraient un gros biais vers la différenciation en iTreg

et en Th17 (X. Chang et al., 2011). Cependant, bien que les auteurs indiquent un développement thymique non-impacté, on observe chez ces souris une réduction du nombre de LT CD4 et CD8 en périphérie et une très forte augmentation de la proportion de LT CD4 ayant un phénotype activé (CD44^{hi}CD62L^{low}), suggérant une potentielle prolifération homéostatique pouvant impacter les phénotypes observés. Inversement, il semblerait que Erk1 ait un rôle assez différent, étant nécessaire pour la différenciation en Th2 mais pas en Th1 (Goplen et al., 2012). JNK est très peu exprimée chez un LT CD4 à l'état basal, mais augmente avec un pic à 48h après stimulation, suggérant qu'elle n'est pas nécessaire à l'initiation de l'activation des LT, mais plutôt dans leur polarisation. Dans ce sens, la délétion de JNK entraîne de fortes productions d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13, indiquant un rôle dans l'inhibition de la réponse Th2 (C. Dong et al., 2000). De même, il a été montré que la différenciation en Th1 et non en Th2 nécessitait l'activation de JNK2, et sa déficience entraînait l'incapacité d'un LT CD4 à se différencier entièrement en Th1, du fait de l'absence de production d'IFN- γ en réponse à l'IL-12 (D. D. Yang et al., 1998).

Concernant p38, sa voie alterne est primordiale pour la prolifération et la différenciation des LT CD4, comme le montre les études faites sur des souris Y322F, où la tyrosine 322 a été remplacée par une phénylalanine. Les LT CD4 de ces souris ont un défaut de production d'IFN- γ , d'IL-17 et de TNF- α , associé à une incapacité de maintenir l'expression de T-bet en différenciation Th1 *in vitro*. Ainsi, les souris p38^{Y322F} sont plus sensibles à des infections bactériennes ou à des challenges tumoraux, mais sont inversement résistantes à des modèles auto-immuns tels que le CIA (Collagen-Induced Arthritis) ou encore l'EAE (Dodeller & Schulze-Koops, 2006; Jirmanova et al., 2011).

d) La voie Akt-mTOR

Suite à l'engagement du TCR, la **PI3K** est recrutée à la membrane où elle phosphoryle le PIP2 en PIP3. Ceci permet le recrutement de **PKD1** (3-Phosphoinositide Dependante Kinase) *via* son domaine PH, et ainsi son activation par la kinase Lck. PKD1 a différents substrats et notamment la PKC θ , amplifiant ainsi la signalisation précédemment décrite. D'autre part, PKD1 phosphoryle et active la kinase **Akt**, interagissant elle aussi avec le PIP3. Akt a de nombreuses cibles telles que GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), CREB (cAMP responsive element binding protein-1), BAD (Bcl-2 Agonist of cell Death), FOXO (Forkhead box O) ou encore I κ B (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000), lui conférant des rôles dans la survie et la prolifération.

En inhibant la kinase GSK-3, Akt lève l'inhibition de la GTPase Rheb (Ras homologue enriched in brain), et permet ainsi l'activation du complexe mTORC1, impliqué dans la synthèse protéique. Akt est de plus phosphorylé sur un autre résidu par mTORC2, ce qui augmente son activité. La voie initiant la formation de ce complexe n'est cependant pas connue au sein de la signalisation du TCR (Powell et al., 2012).

L'inhibition des complexes mTORC par la rapamycine (drogue grâce à laquelle ils ont été découverts) entraîne une diminution de la prolifération et une augmentation de l'anergie au sein de Tconv, et entraîne la différenciation de nouveaux iTreg, leur conférant dans l'ensemble un rôle immunosuppresseur. De même, des LT CD4 déficients en mTOR (modèle CD4-cre) ne parviennent pas à se différencier en Th1, Th2 ou Th17 *in vitro*, mais se différencient en iTreg (Pollizzi & Powell, 2015). Cependant la délétion de mTOR entraîne l'inhibition de ses deux complexes, mTORC1 et mTORC2, qui semblent avoir des rôles opposés dans le contrôle de la différenciation des LT CD4. mTORC1 serait en effet impliqué dans la différenciation en Th1 et Th17, tandis que mTORC2 serait impliqué dans la différenciation en Th2 (Delgoffe et al., 2011).

Ce que nous venons de décrire reste une description relativement simplifiée, omettant la réalité de croisement des voies et des multiples rétrocontrôles positifs comme négatifs. Il a par exemple été montré que Erk (voie des MAPK) pouvait phosphoryler Lck sur sa sérine 59, entraînant ainsi une inhibition de sa fonction, tandis que la calcineurine (voie calcique) pourrait déphosphoryler cette sérine, entraînant ainsi une augmentation de la fonction de Lck. La phosphorylation de cette sérine serait aussi impliquée dans la sensibilité de Lck à la déphosphorylation de ses tyrosines par SHP-1, une phosphatase impliquée dans la diminution et la terminaison du signal (Gaud et al., 2018). En termes de croisement de voies, il a aussi été montré que l'activation de la voie alterne de p38 entraînait l'expression génique de NF-AT de manière c-Jun dépendante (Alam et al., 2018), que le complexe CBM pouvait activer mTOR indépendamment d'Akt (Hamilton et al., 2014), ou encore que NF-AT entraînait la transcription de cRel (Grumont et al., 2004). L'interprétation de phénotypes obtenus par délétion ou mutation de protéines de signalisation est donc un exercice délicat, et il convient de garder en tête que la réalité est sûrement bien plus complexe qu'on ne l'imagine. Dans ce contexte, une protéine ayant justement un rôle prépondérant dans la signalisation du TCR, et ce, dans une multitude de voies de signalisation, est la protéine Vav1.

4. Vav1

a) Description de Vav1

Vav1 a été découverte en 1989 du fait de l'activité transformante de sa forme oncogénique, issue de cellules cancéreuses de l'œsophage. Son nom vient de la 6^{ème} lettre de l'alphabet hébraïque « VAV », car il s'agissait alors du 6^{ème} oncogène découvert par ce laboratoire (Katzav et al., 1989). Les protéines de la famille Vav (Vav1, Vav2 et Vav3) sont des protéines à fonction GEF (GTPase Exchange Factor), et possèdent aussi des fonctions adaptatrices, leur conférant ainsi la capacité d'interagir avec un grand nombre de partenaires. Tandis que Vav2 et Vav3 sont ubiquitaires, Vav1 est quant à elle exprimée spécifiquement dans le compartiment hématopoïétique. Bien que nous nous intéressons à Vav1 et à son rôle au sein des LT, et plus particulièrement dans la signalisation du TCR, il est important de noter que Vav1 est aussi impliquée dans la signalisation d'intégrines, de récepteurs de cytokines et chimiokines, de récepteurs à facteurs de croissances, de BCR, de récepteur NK ou encore de FcR (Récepteur à la partie constante Fc des anticorps) (Katzav et al., 1989; Tybulewicz, 2005).

De sa partie N-terminale à sa partie C-terminale, Vav1 est composée des 7 domaines suivants : **CH-Ac-DH-PH-C1-SH3-SH2-SH3 (Figure 13) (Tybulewicz, 2005).**

CH – Calponin Homology. À l'état basal Vav1 est inactif, sous conformation repliée. Ceci est dû à l'interaction de son domaine CH avec son domaine C1, rendant ainsi son domaine DH inaccessible. CH permet aussi l'interaction avec la calmoduline et le cytosquelette d'actine.

DH – DBL Homology. DH est le domaine catalytique de Vav1, responsable de sa fonction GEF. Ce dernier lui permet d'activer les petites GTPases de la famille Rho : Rho, Rac et CDC42.

Ac – Acidic domain. Cette région contient 3 tyrosines phosphorylables dont la Y-174 activatrice, qui une fois phosphorylée par Lck ou ZAP-70 permet l'ouverture de Vav1 par séparation des domaines CH et C1, et ainsi son activation.

C1 – Cystein-rich domain. C1 est un domaine en doigt de zinc impliqué dans la fonction GEF de Vav1, possiblement en interagissant avec ses GTPases cibles. Interagit aussi avec DAG.

PH – Pleckstrin Homology. Le domaine PH permet l'interaction avec des phosphoinositols tels que PIP2 et PIP3, permettant une localisation membranaire de Vav1.

SH2 et SH3 – Src Homology. Ces domaines permettent la liaison aux tyrosines phosphorylées et régions riches en proline (PRR) respectivement.

En plus de ces domaines, il a été décrit que Vav1 possède 2 séquences *NLS* (*Nuclear Localisation Sequence*) permettant la translocation nucléaire des protéines qui la comporte, même si aucun rôle nucléaire de Vav1 n'est avéré à ce jour (Houlard et al., 2002). Enfin, une région *PRR* (*Proline Rich Region*) a été décrite (⁶⁰⁷PPPP⁶¹⁰) mais ne semble pas être impliquée dans une liaison protéique, tandis que la proline 657 (proline isolée) située à l'extrémité d'un des domaines SH3 semble être impliquée dans la liaison de Vav1 avec le domaine SH3 de Grb2, par oligomérisation de leur domaine SH3 respectif (Nishida et al., 2001).

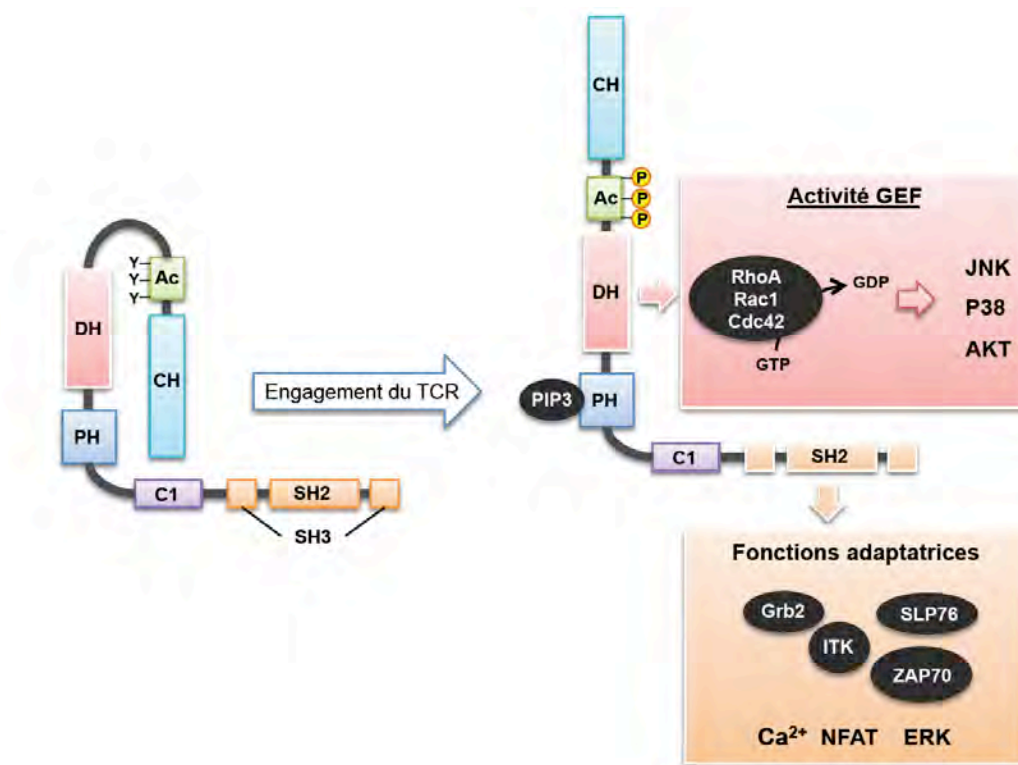


Figure 13 : Structure et fonctions de Vav1

À l'état inactif, l'interaction entre les domaines C1 et CH permet le maintien de la conformation fermée de Vav1. La phosphorylation de Vav1 sur les tyrosines activatrices du domaine Ac entraîne son activation. Vav1 adopte alors une conformation ouverte rendant le domaine DH, porteur de l'activité GEF accessible. L'activité GEF de Vav1 permet l'échange du GDP en GTP sur les GTPases Rho, Rac1 et CDC42. L'activité GEF de Vav1 est ainsi impliquée dans l'activation des voies de signalisation JNK, P38 et Akt. Les capacités adaptatrices de Vav1, permettant son interaction avec SLP-76, LAT, Grb2 et ITK, sont impliquées dans la voie ERK et la voie calcique et permettent l'activation du facteur de transcription NFAT. La localisation membranaire de Vav1 est facilitée par la liaison du PIP3 par le domaine PH. Adapté de Tybulewicz, 2005.

b) Vav1 dans les voies de signalisations du TCR

De par ses différents domaines, Vav1 a la capacité d'interagir avec plusieurs types de protéines différentes, ou encore avec des phospholipides, lui permettant de moduler l'activité des différentes voies de signalisation. L'interactome de Vav1 publié récemment par mon équipe illustre d'ailleurs très bien cela, montrant son association à des protéines kinases, phosphatases, adaptatrices et ligases impliquées dans la remodulation de l'actine, ou encore à des facteurs de transcription (Gaud et al., 2018). Logiquement, la déficience en Vav1 induit un défaut d'activation de diverses protéines et voies de signalisation, telles que PKC θ , Erk, PDK1, Rac, PI3K, Akt, NF-AT ou encore NF-kB (Costello et al., 1999; Reynolds et al., 2002, 2004), mais aussi un défaut de signal « inside-out » activateur d'intégrines, un défaut de clusterisation des TCR à la synapse immunologique, et un défaut de polarisation du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Ardouin et al., 2003; Krawczyk et al., 2002).

Grâce à son interaction avec Grb2 de façon atypique *via* leur domaine SH3 respectifs (Nishida et al., 2001), Vav1 est rapidement recrutée à la membrane plasmique suite à l'engagement du TCR, où elle stabilise le signalosome LAT-SLP76. Il a par ailleurs été montré que Vav1 contribuait au maintien de la phosphorylation de LAT sur diverses tyrosines (Reynolds et al., 2004), bien que cela ne soit pas toujours observé. L'interaction de Grb2 avec LAT et SLP-76 permet le rapprochement de Vav1 et de ZAP-70 dont il a été montré qu'ils interagissent *via* le domaine SH2 de Vav1 et la tyrosine 315 phosphorylée de ZAP-70 (J. Wu et al., 1996), ce qui pourrait faciliter la phosphorylation de Vav1 sur sa tyrosine 174 par la kinase Lck, nécessaire à son activation (Crespo et al., 1997). Une fois activée, Vav1 peut stimuler *via* sa fonction GEF les GTPases Rho, Rac et CDC42, impliquées notamment dans les voies des MAPK, mais aussi dans la modulation de l'actine. CDC42-GTP active par exemple la protéine WASP, primordiale à la régulation de l'actine (Zeng et al., 2003).

L'une des premières observations faites sur le rôle de Vav1 dans la signalisation a été la diminution de l'influx calcique suite à l'engagement du TCR dans les LT et les thymocytes Vav1-KO (Fujikawa et al., 2003; Turner et al., 1997). Il a depuis été montré que Vav1 est nécessaire à l'activation d'ITK, qui exerce un rétrocontrôle positif sur le recrutement de Vav1 (Tybulewicz, 2005). La diminution de l'activité d'ITK en absence de Vav1 entraîne une réduction de la phosphorylation de la PLC- γ , se traduisant par une diminution des seconds

messagers IP3 et DAG, résultant *in fine* en une très forte diminution de l'influx calcique et de l'activation de la MAPK Erk (Costello et al., 1999).

Il a de plus été montré que Vav1 était directement impliquée dans la signalisation en aval de CD28, dans une voie impliquant NF-AT d'une part (Michel et al., 2000), et Rac, IKK α/β , NF-kB et AP-1 d'autre part (Marinari et al., 2002). Il a par la suite été mis en évidence que Vav1 pouvait directement et constitutivement interagir avec IKK α , et ce de manière plus importante en réponse à l'engagement de CD28, permettant ainsi localisation membranaire d'IKK α et une augmentation de son activité (Piccolella et al., 2003). De façon intéressante, la PI3K (activée en grande partie suite à l'engagement de CD28) pourrait exercer un contrôle positif sur la fonction de Vav1 via la phosphorylation de PIP2 en PIP3.

Il a en effet été montré que le domaine PH de Vav1 pouvait lier ces deux lipides, et ainsi moduler négativement (PIP2) ou positivement (PIP3) la fonction GEF de Vav1 (Han et al., 1998). Ainsi, l'activation de la PI3K permettrait à la fois une levée d'inhibition de Vav1 par diminution du taux de PIP2, ainsi que son activation par augmentation du taux de PIP3. Des résultats suggèrent qu'un contrôle inverse existe aussi, où Vav1 augmenterait l'activation de la PI3K au travers de l'activation de Rac1 (Bokoch et al., 1996). Vav1 est ainsi grandement impliquée dans le recrutement de la PKC θ à la synapse immunologique et son activation, que ce soit *via* la PLC- γ produisant du DAG interagissant directement avec la PKC θ , ou *via* l'activation de la PI3K (via Rac) entraînant la production de PIP3, le recrutement de PDK1 et ainsi l'activation de la PKC θ (Reynolds et al., 2004).

En résumé, Vav1 exerce un contrôle positif général sur la signalisation du TCR et de CD28, que ce soit de par sa fonction GEF ou de par ses fonctions adaptatrices. Au vu de certains résultats de recherche, on peut être tenté de dissocier ces deux fonctions et les voies de signalisation impactées par celles-ci, mais il est plus que probable que du fait des innombrables croisements entre les différentes voies, et des rétrocontrôles positifs et négatifs existants, une cible de la fonction GEF de Vav1 impactera probablement directement ou indirectement une protéine dépendante de la fonction adaptatrice de Vav1, et inversement.

Néanmoins, si une dissociation devait être faite (**Figure 13**), il semblerait que la fonction GEF de Vav1 soit impliquée dans l'activation des voies des MAPK JNK et p38, aboutissant à l'activation de c-Jun, ainsi que dans la modulation de l'actine, et l'activation de la voie PI3K. Inversement, sa fonction adaptatrice serait impliquée dans la voie calcique et la voie Erk1/2 *via* la stabilisation du complexe LAT-SLP76-PLC- γ , entraînant l'activation IP3-dépendante de NF-AT, et DAG-dépendante de Erk1/2 (Saveliev et al., 2009).

Finalement, il faut noter que Vav1 exerce aussi un rétrocontrôle négatif de la signalisation du TCR et de CD28 (Helou et al., 2015). Il a été montré que Vav1 pouvait interagir avec la phosphatase SHP-1, protéine décrite notamment pour son rôle dans la terminaison du signal TCR et dans la signalisation des récepteurs de co-inhibition, inhibant par exemple l'activité de la kinase Lck ou de Vav1 elle-même (Kon-Kozlowski et al., 1996; Lorenz, 2009). Ainsi Vav1 favorise le recrutement de SHP-1 au cœur des hubs de signalisation, permettant d'en limiter l'activation. Nous le verrons un peu plus tard mais ceci semble être modulé par un 3^{ème} partenaire, **Themis1**, capable d'interagir avec Vav1 et SHP-1 et impliqué dans leurs activités respectives (Zvezdova et al., 2016).

c) Implication de Vav1 dans le développement des LT

De par son rôle dans la signalisation du TCR, Vav1 est nécessaire au bon développement des LT dans le thymus. En effet, sa délétion induit un blocage au stade DP, dû à un défaut partiel de la sélection positive affectant les LT CD4 et LT CD8 (K. D. Fischer et al., 1995; Turner et al., 1997). Le défaut n'est ici que partiel du fait de la compensation effectuée par Vav2 et Vav3 en absence de Vav1. Vav1 est en temps normal suffisant pour le bon développement des thymocytes et la survie des LT matures, comme le montre l'absence d'impact de la double mutation Vav2-Vav3. En revanche, la mutation de ces deux protéines en plus de Vav1 entraîne une augmentation du blocage avec une forte accumulation des cellules au stade DN, et moins au stade DP, suggérant un rôle de Vav1 dans la sélection β (Fujikawa et al., 2003). Ceci est associé dans ces deux études à un profond défaut de signalisation calcique et de phosphorylation de Erk1/2 dans les thymocytes ou dans les LT CD4 retrouvés en périphérie, là encore faiblement compensé par Vav2 et Vav3 chez les simples mutés Vav1-KO (Fujikawa et al., 2003; Turner et al., 1997). L'analyse de la sélection négative en absence de Vav1 a montré qu'elle était elle aussi défectueuse, suggérant que Vav1 est nécessaire à toutes les étapes du développement TCR-dépendant des thymocytes (Turner et al., 1997). Pour finir, des chercheurs ont étudié l'implication séparée des deux fonctions de Vav1, à savoir sa fonction GEF et sa fonction adaptatrice. Ils ont ainsi généré une forme mutée de Vav1 (Vav1^{AA}) dont la conformation est normale, mais la fonction GEF inactivée (Saveliev et al., 2009). Ils ont ainsi montré que le blocage de développement thymique était moins sévère, mais toujours présent, avec notamment une diminution des nombres de LT CD4 et CD8 matures dans les OLII comparés aux WT, bien que supérieurs comparés aux Vav1-KO. Cette étude montre ainsi que les deux fonctions de

Vav1 sont nécessaires au développement thymique des LT. Il est néanmoins important de garder à l'esprit que leur version mutée de Vav1 présente une diminution de sa quantité protéique (~75%) en comparaison avec la forme WT, et que l'utilisation d'une souris hétérozygote Vav1^{+/-} entraînant une diminution de moitié de la quantité de protéine (mais avec une fonction GEF normale) provoque des phénotypes majoritairement similaires à la souris Vav1^{AA}. Ceci suggère que leurs observations chez la souris Vav1^{AA} ne reflètent pas uniquement un défaut de fonction GEF, mais aussi une réduction partielle des fonctions adaptatrices.

d) Implication de Vav1 dans la fonction des LT

Les quelques LT qui arrivent à se développer dans les souris Vav1-KO présentent un large défaut de prolifération, d'expression de marqueurs d'activation et de production d'IL-2 (K. D. Fischer et al., 1995; Saveliev et al., 2009; Tarakhoysky et al., 1995). Il a de plus été montré que la déficience en Vav1 entraînait un défaut sélectif de la production d'IL-4 associé à une augmentation de la production d'IFN- γ en réponse à une stimulation neutre CD3/CD28, qui serait expliqué par la diminution de l'expression du facteur c-Maf impliqué dans la différenciation Th2 (Tanaka et al., 2005). Bien que la culture en condition Th2 permette d'augmenter la production d'IL-4 par les LT CD4 Vav1-KO, ils en produisent malgré tout moins que les WT, et présentent une fuite vers la différenciation Th1, produisant encore de forts taux d'IFN- γ (Tanaka et al., 2005). De façon intéressante, des observations similaires ont été faites chez l'Homme, chez des patients atteints de CVID (Common Variable Immuno-Deficiency) et étant mutés pour Vav1. L'absence de Vav1 est là aussi associée avec un défaut de production d'IL-4, et bien qu'il n'y ait pas d'augmentation de la production d'IFN- γ , on observe une augmentation de l'expression de T-bet (Capitani et al., 2010). Une autre étude suggère aussi un rôle de Vav1 dans la différenciation en TFH, montrant que Vav1 est activée suite à la stimulation par l'IL-21 (Vogelzang et al., 2008), ce qui corrèle avec le rôle LT-intrinsèque de Vav1 dans la réponse B, notamment dans la commutation isotypique (Gulbranson-Judge et al., 1999). L'étude de trois lignées de rats (DA, BN et LEW) ayant des sensibilités et résistances opposées à des modèles d'allergies et de SEP, a mené à la découverte par mon équipe d'accueil d'une région de 117kb responsable de ces différences. On y retrouve notamment une version mutée de Vav1, où l'arginine 63 est remplacée par un tryptophane (Vav1^{R63W}) (Colacios et al., 2011; Jagodic et al., 2009; Pedros et al., 2013). La réduction de la sévérité de l'EAE apportée par cette région de 117kb est associée à une réduction

de la prolifération et une réduction de la production d'IFN- γ et de TNF- α par les LT CD4 restimulés (Jagodic et al., 2009). De façon intéressante, cette étude montre aussi une association d'un variant de Vav1 chez l'Homme avec la susceptibilité à développer la SEP, associé à une augmentation de l'expression de Vav1 dans les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells – contenant une majorité de lymphocytes T et B) de patients atteints de SEP. Ils mettent aussi en évidence une corrélation entre l'expression de Vav1 et l'expression de l'IFN- γ et de TNF- α chez ces patients. Il a par la suite été montré que le locus de 117kb était associé chez le rat à une augmentation du pourcentage de Treg dans le thymus et dans les OLII, indiquant que Vav1 pourrait jouer un rôle dans le développement de ces cellules (Colacios et al., 2011). Afin de définitivement confirmer l'implication du variant Vav1^{R63W} dans les précédentes observations, mon équipe d'accueil a généré une souris knock-in pour ce variant. Ils ont ainsi montré une diminution de la sévérité de l'EAE associée à une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF- α mais aussi l'IL-17 et le GM-CSF (Kassem et al., 2016). L'analyse du variant de Vav1 a montré qu'il semblait constitutivement actif, mais présent en de plus faible quantité. Ceci se traduit par une fonction GEF normalisée, mais des fonctions adaptatrices réduites (Colacios et al., 2011; Kassem et al., 2016). Au vu de ces différents travaux, il semble clair que Vav1 joue un rôle primordial dans l'activation, la prolifération, mais aussi la polarisation des LT CD4 vers les différents lignages de LT helper. Enfin plusieurs études montrent que Vav1 est impliqué dans la motilité membranaire et cellulaire, permettant la clusterisation du TCR et de CD28, (K. D. Fischer et al., 1998), l'activation des intégrines nécessaires à la formation de conjugués CPA-LT (Krawczyk et al., 2002), la formation de lamellipodes (Colacios et al., 2011) ou encore la migration *in vitro* en réponse à une chimiokine (Garcia-Bernal et al., 2005).

5. Themis1

a) Description de Themis1

$\alpha\beta$

En 2009, plusieurs études indépendantes ont pour la première fois identifié Themis1 (Thymocyte Expressed Molecule Involved in Selection) pour son implication dans le développement thymique des LT chez la souris (Fu et al., 2009; Johnson et al., 2009; Kakugawa et al., 2009; Lesourne et al., 2009; Patrick et al., 2009). Themis1 fait partie d'une famille composée de trois membres dont l'expression est spécifique à certains types cellulaires. Themis1 est ainsi exprimé dans les LT et les NKT, Themis2 dans les DC, les macrophages et

les LB, et enfin Themis3 est exprimé dans les cellules intestinales. Concernant l'expression de Themis1 au sein des LT, celle-ci varie très fortement au cours de leur développement. Themis1 commence à être exprimé au stade DN3, atteint son pic d'expression au stade DP puis est très fortement diminué aux stades SP4 et SP8. Les LT CD4 et CD8 expriment toujours Themis1 en périphérie, mais à de bien plus faibles niveaux que dans le thymus (Fu et al., 2009; Lesourne et al., 2009). De façon intéressante, Themis1 est 2 fois plus exprimé dans les LT CD8, et un peu plus faiblement exprimé au sein des Treg en comparaison aux Tconv, suggérant une implication en partie différente de Themis1 au sein de ces trois populations (Duguet et al., 2017; Garreau et al., 2017).

Themis1 est composé de deux domaines CABIT (Cystein All containing β in Themis), d'une région PRR, et d'une séquence NLS au sein d'un de ses domaines CABIT (Figure 14). Ces domaines CABIT décrits pour la première fois avec la découverte de Themis1 ne possèdent aucune fonction enzymatique. Ils forment une structure globulaire composée de 12 feuillets β au sein desquels on retrouve une cystéine très fortement conservée (Johnson et al., 2009), et sont impliqués dans la liaison de Themis1 avec les phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Choi, et al., 2017a). Le domaine PRR de Themis1 lui permet d'interagir constitutivement avec l'adaptateur Grb2 (Lesourne et al., 2012).

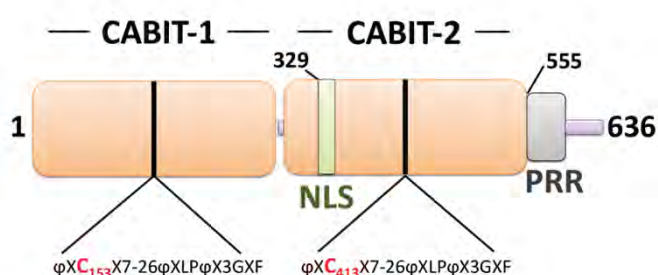


Figure 14 : Structure de Themis1

Themis1 est composé de deux domaines globulaires appelés domaine CABIT contenant chacun une cystéine centrale conservée incluse dans une séquence également très conservée. Themis1 contient dans sa région N-terminale une région riche en proline (PRR) ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire (NLS) située dans le domaine CABIT2. Adapté de Johnson et al., 2009.

b) Themis1 : une décennie de débat

Bien que toutes les équipes ayant découvert Themis1 et étudié son rôle sont en accord sur le fait que Themis1 est indéniablement nécessaire au développement thymique, les raisons mécanistiques expliquant ce phénomène sont fortement débattues (Choi, et al., 2017b; Gascoigne & Acuto, 2015; Mélique et al., 2022). Tous observent un défaut de développement thymique avec un blocage au stade DP, un impact plus sévère sur les SP4 que les SP8 dans le

thymus, et ainsi plus sévère sur les LT CD4 que les LT CD8 en périphérie. Tous s'accordent sur la nécessité de Themis1 pour les étapes de sélections positive et négative, du fait du rôle de Themis1 dans la signalisation du TCR. Mais le désaccord concerne justement le rôle de Themis1 dans cette signalisation. Le laboratoire du Dr NJ Gascoigne suggère que Themis1 est un **régulateur négatif** de la signalisation du TCR (Fu et al., 2013; Mehta et al., 2018; Paster et al., 2015), tandis que les laboratoires des Dr P. Love et R. Lesourne proposent que Themis1 est un **régulateur positif** de cette signalisation (Choi, et al., 2017a; Lesourne et al., 2012; Zvezdova et al., 2016). Ces conclusions opposées viennent en grandes parties d'observations divergentes concernant l'état d'activation de la signalisation du TCR en absence de Themis1. À l'origine, seule l'équipe du Dr Gascoigne observa un effet sur la signalisation dans les thymocytes (Fu et al., 2009), et en l'occurrence une **diminution** de p-Erk et du flux calcique suggérant ainsi un effet positif de Themis1, alors que les Dr Lesourne et Love de leur côté n'observaient aucun impact de la déficience en Themis1 (Lesourne et al., 2009). Même plus tard, en analysant dans des cellules Jurkat l'impact de l'inhibition de l'expression de Themis1 par des shRNA, Gascoigne montra encore une diminution de la signalisation du TCR, illustrée par une diminution de p-Erk et de l'activation d'AP-1 (Brockmeyer et al., 2011). Ce n'est qu'après, en 2013, que le groupe du Dr Gascoigne montra une augmentation de la signalisation (p-Erk et voie calcique) en absence de Themis1, suggérant pour la première fois un rôle de régulateur négatif (Fu et al., 2013). Bien que ce débat soit encore aujourd'hui non résolu, il apparait qu'une différence majeure entre les études menant à ces observations opposées soit la nature de la stimulation. Les études ayant eu recours à une stimulation polyclonale à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-CD4 ont quasi toujours montré une diminution de la signalisation en absence de Themis1 (Brockmeyer et al., 2011; Fu et al., 2009; Lesourne et al., 2012; Okada et al., 2014; Zvezdova et al., 2016). Seule exception dans les travaux de 2016 de Zvezdova et collaborateur, où les Dr Love et Lesourne montrent qu'une faible dose d'anti-CD3/CD4 (et non une forte dose) peut effectivement entraîner une augmentation de p-Erk en absence de Themis1. D'un autre côté, c'est l'utilisation de stimulation basée sur des complexes CMHp, utilisant des peptides de différentes affinités, qui a permis de montrer un rôle négatif de Themis1 lorsque les peptides étaient de faible affinité (Fu et al., 2013; Paster et al., 2015). Afin d'éviter tout biais de stimulation, la souris rapportrice Nur77-GFP permet d'évaluer l'intensité de la signalisation du TCR *ex vivo*. En effet, l'expression de Nur77 est proportionnelle à l'intensité de la signalisation. Il a ainsi été montré que les thymocytes DP avaient une signalisation du TCR plus faible en absence de Themis1, et plus forte chez des souris Themis1-Tg où l'expression de

Themis1 est 3 fois supérieure, allant dans le sens d'un rôle positif de Themis1 (Zvezdova et al., 2016).

Et le désaccord pourrait s'arrêter là, mais non ! Les deux côtés observent une association de Themis1 avec la phosphatase SHP-1 (un inhibiteur bien connu de la signalisation du TCR), et les deux groupes expliquent leurs observations de par cette interaction. Ainsi, selon le Dr Gascoigne, **Themis1 stimule l'activité de SHP-1**, entraînant l'inhibition de la signalisation du TCR (Mehta et al., 2018), tandis que selon les Dr Love et Lesourne **Themis1 inhibe l'activité de SHP-1**, et l'empêche ainsi de déphosphoryler ses cibles (Choi et al., 2017a). Cependant le groupe du Dr Gascoigne ne montre aucun mécanisme expérimentalement, indiquant comment Themis1 pourrait favoriser l'activité de SHP-1. De leur côté, les Dr Love et Lesourne démontrent que l'inhibition est médiée par les domaines CABIT de Themis1 pouvant se lier au domaine catalytique de SHP-1. Ils montrent aussi que Themis1 favorise l'oxydation de la cystéine du domaine catalytique de SHP-1, ce qui entraîne son inactivation (Lesourne et al., 2012 ; Choi et al., 2017a). Enfin, ils interprètent aussi le rôle ambigu que peut jouer Themis1 au travers de son inhibition de la phosphatase SHP-2, étant elle aussi la cible de Themis1. En effet, la phosphatase SHP-2 exerce une régulation positive de Erk quand seul le TCR est engagé, mais une régulation négative en réponse à l'engagement du TCR et de PD-1. Ainsi en inhibant SHP-2 dans une stimulation centrée sur le TCR, Themis1 aurait un rôle de régulateur négatif, ce qui pourrait expliquer une partie des observations précédentes (Figure 15).

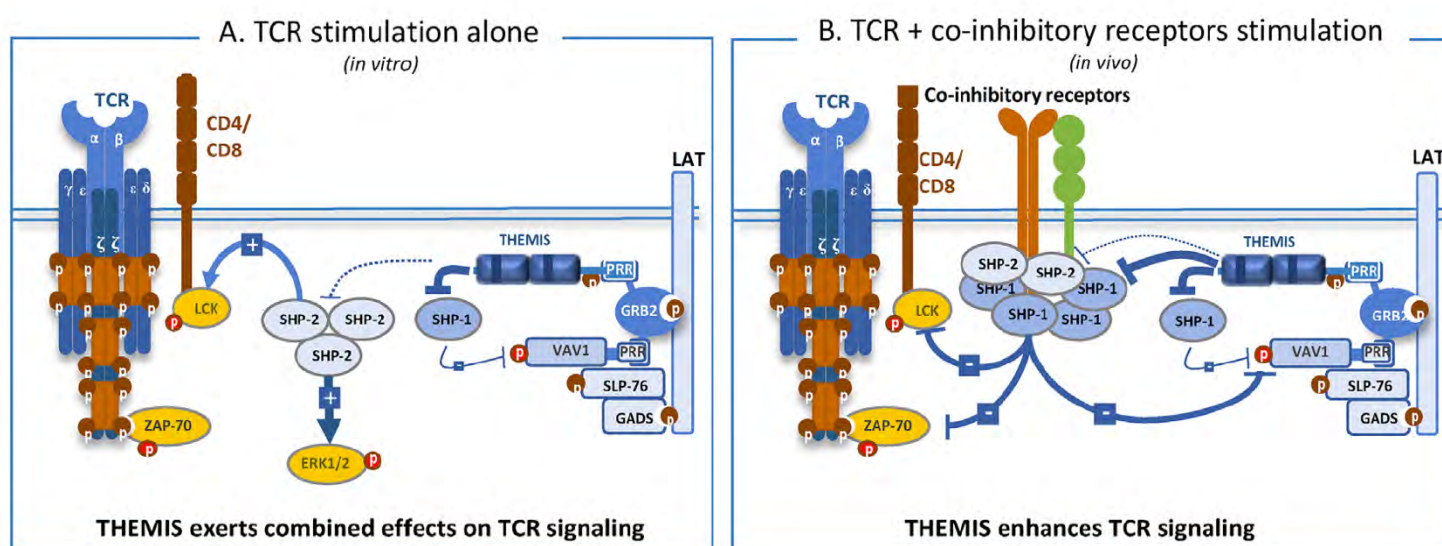


Figure 15 : Rôle ambiguë de Themis1 dans la signalisation du TCR

Themis1 aurait un impact opposé sur la signalisation du TCR selon que le LT est stimulé uniquement par son TCR/co-récepteur (A), ou par son TCR/co-récepteur ainsi que par des récepteurs de co-inhibition (B). Dans le premier cas, SHP-2 et son rôle positif sont dominants sur SHP-1 et son rôle négatif. Leur inhibition par Themis1 entraîne donc une relative inhibition de la signalisation. Dans le second cas, le rôle négatif des phosphatases est dominant, leur inhibition par Themis1 permet donc une levée d'inhibition, et ainsi l'augmentation de la signalisation du TCR. Issu de Melique et al., 2022.

Finalement, la dernière étude du Dr Gascoigne rejoint partiellement les Dr Love et Lesourne. Dans cette étude, ils étudient le rôle de Themis1 dans les LT CD8 périphériques matures suite à sa délétion conditionnelle en fin de développement thymique afin d'éviter les blocages de développement des LT présents dans le KO total. Ils montrent alors que les phénotypes observés sur les LT CD8 dans cette étude sont **dépendants de l'inhibition de SHP-1 par Themis1** (Brzostek et al., 2020). Cette étude sera plus amplement détaillée dans la partie d) sur le rôle de Themis1 dans les LT matures.

c) Partenaires de Themis1 dans la signalisation du TCR

Malgré les désaccords concernant le rôle de Themis1 comme régulateur positif ou négatif de la signalisation TCR, ses interactions avec les différents acteurs de la signalisation commencent à être mieux comprises aujourd'hui, notamment grâce à l'interactome de Themis1 analysé par spectrométrie de masse (Zvezdova et al., 2016). Themis1 interagit constitutivement avec Grb2 et Vav1 (Lesourne et al., 2012). L'interaction avec Grb2 est dépendante du domaine PRR de Themis1 qui se lie à un des deux domaines SH3 de Grb2 (Lesourne et al., 2012 ; Paster et al., 2013). Cette interaction est nécessaire au recrutement de Themis1 à LAT où elle est phosphorylée sur deux tyrosines par Lck (Paster et al., 2013). Cette phosphorylation est par ailleurs nécessaire à la fonction de Themis1, possiblement en stabilisant son interaction avec Grb2. De plus, l'interaction de Themis1 avec Grb2 est aussi primordiale pour le maintien de la quantité protéique de Themis1. En effet, Themis1 est poly-ubiquitinylé ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome, sauf s'il est dé-ubiquitinylé par USP9X (Garreau et al., 2017). Themis1 se lie avec USP9X *via* son domaine CABIT, et permet son recrutement à LAT de par son association avec Grb2. La phosphorylation d'USP9X à LAT entraîne l'augmentation de sa fonction, permettant ainsi la dé-ubiquitinylation de Themis1 et ainsi l'inhibition de sa dégradation. De façon importante, Themis1 semble exercer un contrôle similaire sur Grb2, comme le montre la diminution de 50% de la quantité de Grb2 en absence de Themis1 (Zvezdova et al., 2016). Cette observation suggère par ailleurs un rôle de régulateur positif de Themis1 dans la signalisation, au vu du rôle incontestablement positif de Grb2. Bien que Grb2 ne soit pas nécessaire à l'interaction Themis1-SHP1, il la favorise en se liant à SHP-1 *via* un de ses deux domaines SH3 et *via* son domaine SH2 qui reconnaît une tyrosine de SHP-1 (phosphorylée par Lck suite à l'engagement du TCR). Grb2 jouerait donc le rôle de pont entre Themis1 et SHP-1. Autre que Grb2, Themis1 interagit constitutivement avec Vav1 dont il

favorise la phosphorylation et ainsi l'activation (Zvezdova et al., 2016). Au vu des interactions 2 à 2 entre les protéines Themis1, Vav1, Grb2 et SHP-1, et au vu des différents domaines utilisés dans ces interactions, il est envisageable que des complexes tri- ou quadri-moléculaires se forment suite à l'engagement du TCR, et participent ainsi à la modulation de la signalisation.

d) Themis1 dans la fonction des LT

L'ensemble des études citées jusqu'ici - à l'image de la grande majorité des études réalisées à ce jour sur Themis1 - avait pour but d'élucider les mécanismes impliqués dans le rôle de Themis1 au sein des thymocytes, et plus spécifiquement dans la sélection positive et négative. Très peu de choses sont connues sur le rôle de Themis1 dans les LT périphériques matures. De plus, bien que les études précédentes décrivent parfois des observations sur les LT CD4 et CD8, ces observations sont susceptibles d'être impactées par le défaut de développement thymique. Ceci, au travers d'un répertoire TCR anormal, de modulation épigénétique imparfaite, ou encore d'une prolifération homéostatique du fait de la lymphopénie. Tout cela empêche l'étude du rôle de Themis1 spécifiquement dans les LT matures, et nécessite l'utilisation de modèles de délétion conditionnelle. Brièvement, les observations qui ont pu être faites dans les études précédentes ont montré un défaut de prolifération des LT CD4 et LT CD8, un défaut de production d'IL-2, et un défaut d'expression de CD69 en réponse à la stimulation du TCR (Brockmeyer et al., 2011; Fu et al., 2009).

Une analyse par spectrométrie de masse de mon équipe d'accueil a mis en évidence que les Treg présentent naturellement une diminution de l'expression de Themis1 par rapport aux LT effecteurs. L'utilisation d'une souris transgénique présentant une surexpression de Themis1 a permis de montrer que les Treg qui surexpriment Themis1 présentent une augmentation des fonctions suppressives *in vitro*, et un meilleur contrôle de l'inflammation du colon dans un modèle de colite expérimentale, induit par l'injection de Tconv CD45RB^{high} dans des souris RAG2-KO (Duguet et al., 2017).

Une étude récente utilisant un modèle de délétion conditionnelle de Themis1 ($LATE^{Lck}$ -cre), a pu mettre en évidence le rôle de Themis1 dans la fonction des LT CD8 périphériques (Brzostek et al., 2020). Cette délétion entraîne une légère diminution du nombre de LT CD8 en périphérie, sans effet sur le nombre de CD4, indiquant que Themis1 pourrait être nécessaire au maintien des LT CD8 en condition basale. Ce besoin plus important de Themis1 au sein des LT CD8 corrèle à l'expression plus élevée de Themis1 dans cette population en comparaison avec les LT CD4 (Garreau et al., 2017). Ainsi, les LT CD8 Themis1-KO prolifèrent moins efficacement

en réponse à une stimulation faible du TCR, expriment moins les marqueurs d'activation CD44 et CD122, et produisent également moins d'IFN- γ . De manière intéressante, la réduction de la prolifération est aussi observée en réponse à la stimulation par les cytokines homéostatiques IL-7 et IL-18, mais aussi en réponse à la stimulation par l'IL-7 et l'IL-12, cytokine inductrice de la réponse Th1. L'ajout d'IL-2 fait proliférer les Themis1-KO efficacement, et compense ainsi quasi totalement le défaut de signalisation, qui reste visible seulement lors de stimulation avec de très faibles doses de peptides engageant le TCR. (Brzostek et al., 2020).

Enfin, une étude à laquelle j'ai participé, et qui vient d'être acceptée pour publication, étudiait le rôle de Themis1 au sein des LT CD4 matures et son implication dans leur encéphalitogénicité. Nous avons ainsi montré que la délétion de Themis1 dans les LT CD4 entraîne une diminution de la sévérité de l'EAE, associée à une réduction majeure de leur production d'IFN- γ , et dans une moindre mesure de TNF- α et GM-CSF, ainsi qu'une réduction de l'expression de T-bet. Ceci est en accord avec la récente observation que l'expression de Themis1 est spécifiquement augmentée au sein des LT CD4 de type Th1 (Yang et al., in press).

Finalement, plusieurs études GWAS suggèrent un rôle de Themis1 dans diverses pathologies humaines telles que la maladie cœliaque (Bondar et al., 2014), les maladies inflammatoires de l'intestin (Jostins et al., 2012; Liu et al., 2015), le psoriasis (Kim et al., 2015), ou encore la sclérose en plaques (Davies et al., 2016; Patsopoulos et al., 2019; Sawcer et al., 2011).

e) Themis1-KO et Vav1^{R63W}

Comme mentionné précédemment, mon équipe d'accueil a étudié par le passé les susceptibilités opposées des rats DA, BN et LEW aux maladies allergiques et auto-immunes. Des études de dissection génique ont mis en évidence que le rat BN exprimait une version mutée de Vav1, le variant Vav1^{R63W} (Jagodic et al., 2009 ; Colacios et al., 2011).

En parallèle de ces études une mutation spontanée est apparue chez le rat BN, entraînant le développement spontané d'une inflammation intestinale. Des études génétiques ont permis de détecter l'insertion anormale de 4 nucléotides dans le gène de Themis1 générant un codon STOP, et ainsi la perte d'expression de la protéine. De façon intéressante ces animaux présentent un défaut de développement thymique comme observé chez la souris, mais la délétion de Themis1 est ici aussi associée à un défaut de fonctions suppressives des Treg, responsables de l'inflammation intestinale (Chabod et al., 2012). De façon surprenante, la déficience en Themis1 chez le rat LEW n'induisait pas de pathologie intestinale spontanée et

n'affectait pas les fonctions suppressives des Treg. La dissection génétique entre les rats BN-Themis1-KO et LEW-Themis1-KO a mis en évidence que les différences phénotypiques étaient associées au locus de 117kb, contenant notamment le variant R63W de Vav1 (Pedros et al., 2015). Le remplacement de ce locus chez le rat BN déficient pour Themis1 par le locus provenant du rat LEW a permis de prévenir le développement de l'inflammation intestinale et de restaurer les fonctions suppressives des Treg, suggérant que c'est l'association du variant Vav1^{R63W} avec la délétion en Themis1 qui est responsable du défaut de fonctions des Treg (Pedros et al., 2015). Des études sont actuellement en cours dans notre laboratoire afin de confirmer ces observations chez la souris. Pour cela, la souris Vav1^{R63W} a été croisée avec la souris Themis1^{fl/fl}-LATECD2cre, générant ainsi la souris Vav1^{R63W}-Themis1^{ckO}. C'est par ailleurs avec ce modèle murin que j'ai étudié au cours de ma thèse, le rôle de Vav1 et Themis1 au sein des Tconv, et leur implication dans la susceptibilité à l'inflammation du SNC.

Chapitre IV – La Sclérose en plaques

1. Présentation

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique de nature auto-immune qui affecte le cerveau et la moelle épinière (ME), formant à eux deux le système nerveux central (SNC). C'est la plus fréquente des maladies neurologiques invalidantes et la première cause non-traumatique de paralysie, avec près de 2,8 millions de personnes touchées à travers le monde. Elle se déclare généralement entre 20 et 40 ans, le plus souvent chez les femmes (représentant 3/4 des cas). L'inflammation du SNC entraîne une perte de la gaine de myéline entourant les axones des neurones (démýélinisation) responsable d'une baisse de l'influx nerveux, et à terme de dégénérescence axonale. Ceci cause les symptômes de la SEP tels que les handicaps moteurs et les perturbations des fonctions sensorielles et cognitives.

La SEP est une maladie évolutive existant sous différentes formes définies par le mode d'évolution des symptômes. La plus courante est la forme « récurrente-rémittente » (ou « relapsing-remitting ») représentant 85% des cas. Dans cette forme le patient va avoir des phases dites de « poussées aiguës » de la maladie, c'est-à-dire une apparition/augmentation des symptômes, qui seront suivies par des phases de rémissions lors desquelles le patient va récupérer ses fonctions perdues (**Figure 16A**). L'alternance de ces phases dure généralement plusieurs années, et la rémission peut à terme devenir incomplète, signifiant que le patient ne retrouve pas la totalité des fonctions perdues.

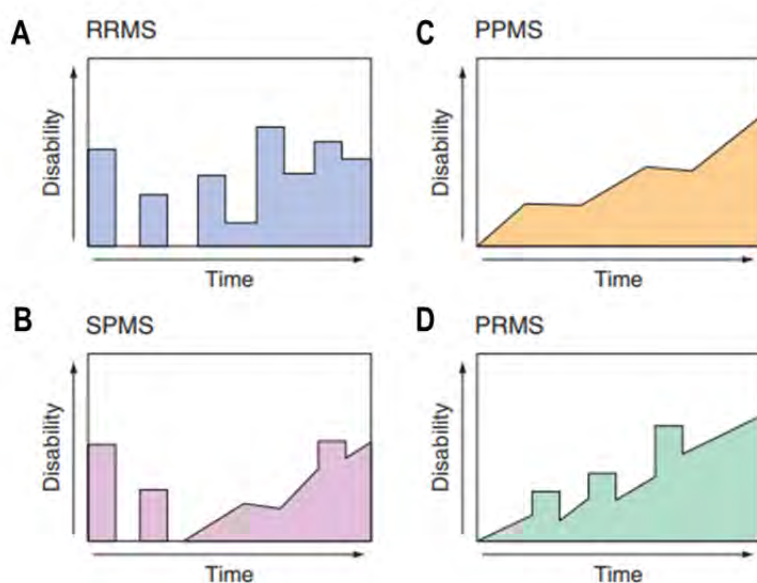


Figure 16 : Les différentes formes de SEP

Illustration des différentes formes que peut prendre la SEP. Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS), Secondary-Progressive MS (SPMS), Primary-Progressive MS (PPMS) et finalement Progressive-Relapsing MS (PRMS). Issu de [Hauser et Goodin., 2009](#)

Au bout de plusieurs années, la SEP évolue chez la majorité des patients vers une forme progressive, caractérisée par une aggravation continue des symptômes mais sans phase de rémission (**Figure 16B**). Ces patients restent néanmoins susceptibles de développer en plus de l'aggravation continue, des phases de poussées aiguës. Bien que ces formes soient majoritaires, il existe encore deux autres formes de SEP. Dans certains cas, les patients développent une forme progressive de la maladie dénuée de poussée aiguë sans avoir développé au préalable de forme récurrente-rémittente. On parle alors de forme primaire-progressive (**Figure 16C**). Finalement, une minorité de patients développent une forme mixte « récurrente-progressive », similaire à une forme primaire progressive, mais comportant en plus des phases de poussées aiguës de symptômes (**Figure 16D**). Les nombreux traitements existants à ce jour ne permettent que de diminuer la progression de la maladie, mais ne permettent pas de la guérir. Il est ainsi primordial de continuer à étudier la physiopathologie de la SEP au travers de ses différents acteurs, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2. Physiopathologie de la SEP au travers de l'EAE

La SEP est caractérisée par une inflammation du SNC marquée par l'infiltration de diverses cellules immunitaires telles que les LT CD4, LT CD8, LB ou encore monocytes au sein du parenchyme, par la prolifération de cellules résidentes comme la microglie, ou encore la présence d'anticorps polyclonaux dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), mais l'origine de cette inflammation est encore mal connue ([Dendrou et al., 2015](#)).

Les modèles animaux d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) ont permis de considérablement augmenter notre compréhension de cette maladie. Ces modèles ont pu voir le jour grâce à une étude pionnière dans le domaine datant de presque 90 ans, montrant que la vaccination de singes avec des extraits de cerveau entraînait des symptômes très similaires à la SEP ([Rivers et al., 1933](#)). Cette étude a ainsi ouvert la voie à de nombreux modèles expérimentaux d'immunisation reproduisant dans une certaine mesure les observations faites chez l'Homme ([Ben-Nun et al., 2014](#)). La physiopathologie de la SEP telle que nous la décrivons provient certes des observations cliniques faites chez les patients, mais aussi en très grande partie de ces modèles.

a) Les modèles d'EAE

Les modèles utilisés aujourd'hui ne reposent plus sur l'immunisation avec des extraits d'organes (hors exceptions), mais avec une simple protéine recombinante, voire un unique peptide issu de cette protéine. On retrouve ainsi des modèles d'EAE basés sur l'immunisation de rongeurs avec la protéine PLP (Proteolipid Protein), la protéine MBP (Myelin Basic Protein) ou encore la protéine MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein), toutes entrant dans la constitution de la gaine de myéline. Bien qu'étant une protéine très minoritaire en comparaison avec la PLP ou la MBP, la protéine MOG est très immunogénique et est particulièrement impliquée dans la réponse T responsable de l'EAE (Sospedra & Martin, 2005). Il a en effet été montré que l'immunisation de souris n'exprimant pas le gène de la MOG avec des extraits de myéline induisait une diminution drastique de la sévérité de la maladie (Delarasse et al., 2003). De même, l'immunisation de souris WT avec des extraits de ME issue de souris MOG-KO induit une EAE moins sévère qu'avec une ME de souris WT, illustrant l'importance de cette protéine comme cible de la réponse immunitaire (Smith et al., 2005). On immunise ainsi les animaux avec une de ces protéines (ou un de leur peptide) mélangées avec un adjuvant étant le plus souvent du CFA (Complete Freud's Adjuvant – de l'huile contenant des extraits de *Mycobacterium tuberculosis*). Dans l'ensemble des cas précédemment cités, c'est la réponse immunitaire de la souris immunisée qui entraîne l'EAE et ses symptômes, on parle donc d'**EAE active**. Il est aussi possible d'induire l'EAE en récupérant les cellules encéphalitogéniques d'une souris immunisée, et en les injectant à une souris receveuse après réactivation *in vitro*. On parlera alors d'**EAE passive**. Le choix entre immunisation active ou passive, ou immunisation avec protéine totale ou peptide seul dépend de la question posée. L'immunisation avec la protéine MOG par exemple entraîne le développement d'une EAE dépendante des LB et de la formation de centres germinatifs, tandis que l'immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ est majoritairement indépendante des LB mais dépendant de la réponse T (Ben-Nun et al., 2014).

b) Physiopathologie de l'EAE

Durant les premiers jours suivant l'immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅, des DC activées par le CFA, vont endocyter le peptide, maturer, et migrer vers les ganglions lymphatiques drainant le site d'immunisation (dLN) où elles présenteront leur complexe CMHp aux LT.

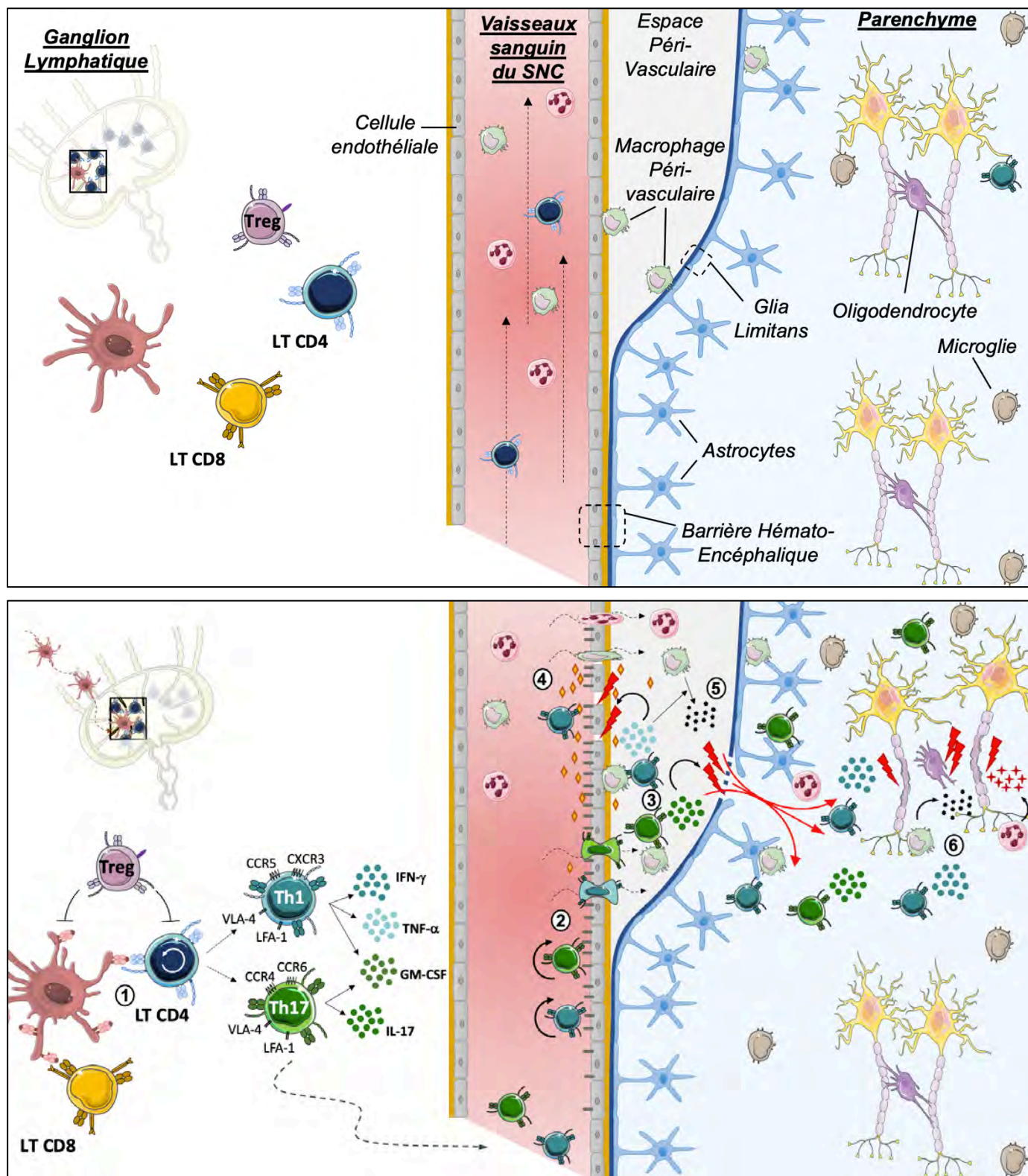


Figure 17 : La physiopathologie de l'EAE

Haut. En condition basale, les LT passent d'un LN à un autre ou circulent dans les vaisseaux sanguins, sans adhérer à la paroi. L'intégrité de la BHE est préservée. **Bas 1)** Une DC présente un peptide de la myéline à un LT CD4 autoréactif qui s'active et se différencie en Th1 ou Th17. **2)** Les cytokines inflammatoires ont activé l'endothélium, permettant aux LT d'y adhérer, puis de pénétrer dans l'espace péri-vasculaire entre 2 cellules endothéliales. **3)** Les LT sont réactivés par une CPA et produisent des cytokines pro-inflammatoires, entraînant la production de chimiokines et perturbant les jonctions de la BHE. **4)** Les chimiokines produites permettent le recrutement de neutrophiles et de monocytes. **5)** Stimulés par les cytokines pro-inflammatoires, les monocytes produisent des MMP qui perméabilisent la glia limitans. **6)** La BHE étant perméabilisée, les cellules inflammatoires pénètrent le parenchyme et entraînent des dégâts tissulaires, notamment via la production de ROS.

Les LT vont alors s'activer, proliférer, et se différencier en T helper exprimant les protéines de migration (récepteurs de chimiokines, intégrines) nécessaires à leur migration dans le SNC (**Figure 17**). Cette étape de migration dans le SNC est cruciale à l'établissement de l'EAE et dépend de la capacité des LT à traverser la barrière hémato-encéphalique (**BHE – BOX 7**).

BOX 7. Parenchyme, Sang, et Liquide Céphalo-Rachidien

Bien que l'on retrouve quelques LT mémoires à l'état basal dans le liquide-céphalo-rachidien (LCR) entourant le cerveau et la ME, ces deux organes ou plutôt leurs parenchymes, sont des tissus **immunoprivilégiés**, dénués d'infiltration immunitaire. Cette protection est due à la présence de barrières étanches séparant le parenchyme du LCR (autour) et du sang (à l'intérieur).

La **BHE**, barrière séparant le parenchyme du sang, est composée des **cellules endothéliales** (EC) du vaisseau sanguin reliées entre elles par des jonctions serrées, de la membrane basale des EC, de **péricytes**, et de **glia limitans** (protrusions astrocytaires et membrane basale issue du parenchyme). L'agencement des constituants de la BHE changent en fonction de la localisation. Au niveau des artérioles les composants de la BHE sont fortement compactés puis fusionnés au niveau du capillaire, mais au niveau des **veinules post-capillaires**, les EC et la glia limitans se séparent, formant un **espace péri-vasculaire**. Enfin, la barrière séparant le parenchyme du LCR est quant à elle composée de la pie-mère, d'une couche de collagène sous la pie-mère et finalement de la glia limitans ([Engelhardt et al., 2017](#)).

Il a été proposé que l'initiation de l'EAE suive un modèle de migration en 2 temps. Le 1^{er} passerait par la migration de Tconv CCR6⁺ au niveau du plexus choroïde (structure produisant le LCR au niveau des ventricules) où le ligand de CCR6 (CCL20) est constitutivement sécrété ([Reboldi et al., 2009](#)). Cette migration est d'autant plus facilitée que l'endothélium des vaisseaux sanguins du plexus choroïde est fenestré, permettant l'extravasation des cellules (**Figure 18**). Les Tconv activés migreraient ensuite au travers de la barrière épithéliale du plexus choroïde par un mécanisme non-décrit et se retrouveraient dans le LCR. Ceci constituerait le moyen d'accès des LT mémoires au LCR, qui sont ensuite en condition basale drainés jusqu'aux ganglions cervicaux. Dans le contexte de l'EAE, les Tconv pourraient se disséminer dans le LCR où ils seraient réactivés par des CPA locales (macrophages ou DC), stimulant leur production cytokinique et entraînant ainsi l'activation des endothéliums des vaisseaux sanguins, et notamment des **veinules post-capillaires** (**Box 7 – Figure 18C**).

Dans un 2^{ème} temps, les Tconv activés présents dans la circulation sanguine sont alors capables d'adhérer aux cellules endothéliales pré-activées qui ont augmenté leur expression de molécules d'adhésions (E/P-Sélectine, VCAM-1, ICAM-1/2). Celles-ci permettent aux Tconv de ralentir par roulement (via PSGL-1), d'adhérer fermement à l'endothélium (via VLA-4 et LFA-1) et de réaliser la **diapédèse** au travers des EC. Les Tconv se trouvent alors dans l'espace péri-vasculaire, entre les cellules endothéliales et la glia limitans, où ils vont s'accumuler.

La façon dont les Tconv parviennent à traverser la glia limitans est encore mal connue mais semble dépendante de la réactivation locale des Tconv par une CPA (macrophage péri-vasculaire, DC), de leur production de cytokines, du recrutement de cellules myéloïdes (monocyte) et de la production de métalloprotéases matricielles (MMP) par ces dernières (Agrawal et al., 2006; Song et al., 2015). De façon importante, la perturbation de la glia limitans est nécessaire à l'apparition des symptômes au cours de l'EAE. L'accumulation de Tconv activés dans l'espace péri-vasculaire seul est en effet associée à une absence de symptômes (Toft-Hansen et al., 2006; Tran et al., 1998).

La perturbation de la BHE et la production de chimiokines, vont permettre le recrutement de nouvelles cellules pro-inflammatoires, et ainsi entraîner une augmentation de l'inflammation et l'initiation de dégâts tissulaires, notamment la démyélinisation (Dendrou et al., 2015). Cette infiltration des LT dans le SNC corrèle donc avec l'apparition des premiers symptômes aux alentours du 8^{ème} jours post-immunisation (J8). Les LT vont alors proliférer localement, produire des chimiokines entraînant le recrutement de nouvelles cellules immunitaires et amplifier ainsi l'inflammation jusqu'au **pic** de la maladie aux alentours de J14 post-immunisation. L'inflammation va ensuite graduellement diminuer grâce à diverses populations immuno-régulatrices (Treg, microglie), qui, suivant l'intensité des dégâts tissulaires, entraîneront une réduction du score clinique plus ou moins importante : c'est la phase de **rémission**. Celle-ci peut être complète (plus de signe clinique), ou incomplète et ainsi déboucher sur une forme **chronique** d'EAE. Les LT, et plus particulièrement les LT CD4 ont ainsi un rôle primordial dans ce modèle, et la nature de leur différenciation, des facteurs qu'ils expriment et des cytokines qu'ils produisent peuvent considérablement modifier l'issue de la maladie.

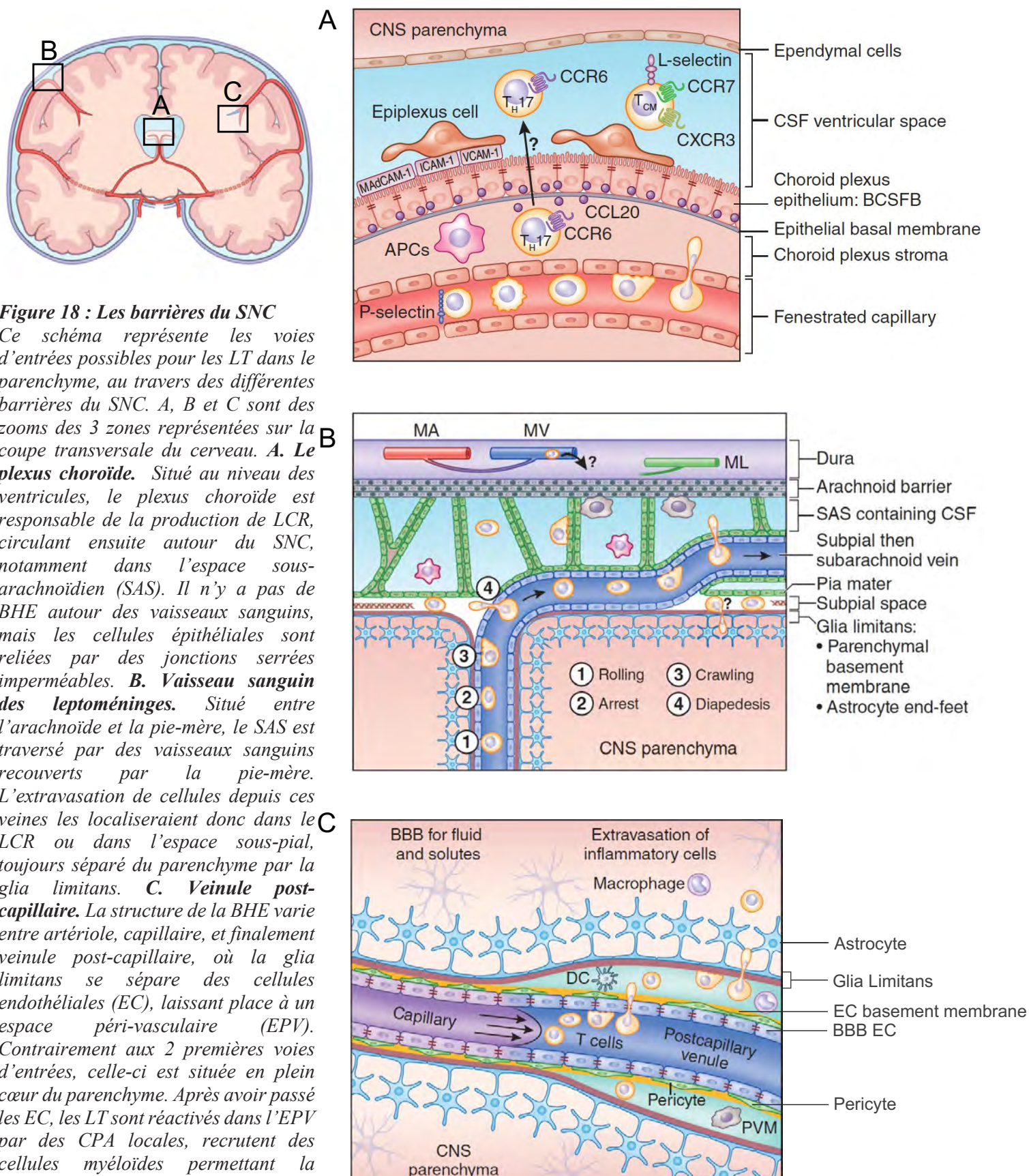


Figure 18 : Les barrières du SNC

Ce schéma représente les voies d'entrées possibles pour les LT dans le parenchyme, au travers des différentes barrières du SNC. A, B et C sont des zooms des 3 zones représentées sur la coupe transversale du cerveau. **A. Le plexus choroïde.** Situé au niveau des ventricules, le plexus choroïde est responsable de la production de LCR, circulant ensuite autour du SNC, notamment dans l'espace sous-arachnoïdien (SAS). Il n'y a pas de BHE autour des vaisseaux sanguins, mais les cellules épithéliales sont reliées par des jonctions serrées imperméables. **B. Vaisseau sanguin des leptoméninges.** Situé entre l'arachnoïde et la pie-mère, le SAS est traversé par des vaisseaux sanguins recouverts par la pie-mère. L'extravasation de cellules depuis ces veines les localiserait donc dans le LCR ou dans l'espace sous-pial, toujours séparé du parenchyme par la glia limitans. **C. Veinule post-capillaire.** La structure de la BHE varie entre artériole, capillaire, et finalement veinule post-capillaire, où la glia limitans se sépare des cellules endothéliales (EC), laissant place à un espace péri-vasculaire (EPV). Contrairement aux 2 premières voies d'entrées, celle-ci est située en plein cœur du parenchyme. Après avoir passé les EC, les LT sont réactivés dans l'EPV par des CPA locales, recrutent des cellules myéloïdes permettant la perméabilisation de la glia limitans, et l'entrée des cellules dans le parenchyme (Figure 17). Adapté de Engelhardt., 2017.

c) Implication des différentes sous-populations de LT

Nous l'avons vu dans le chapitre II, les LT CD4 peuvent se différencier en Th1, Th2, Th17 ou encore en iTreg, et les contributions relatives de ces différentes cellules ont été largement étudiées au sein des modèles d'EAE. Historiquement, l'IFN- γ a été l'une des premières cytokines associées au développement de l'EAE, *via* son rôle au sein de la réponse Th1. Son implication a cependant été fortement remise en cause ces dernières années, particulièrement suite à la découverte de l'IL-23, du lignage Th17, et du rôle hautement pathogénique de l'IL-17 et du GM-CSF.

i. Les Th1 dans l'EAE

L'IFN- γ , une cytokine bipolaire.

Dans un contexte où les IFN de type I montraient un effet bénéfique en traitement chez les patient SEP, plusieurs études ont montré que les cellules de patients présentaient un défaut de production d'IFN- γ (Neighbour et al., 1981 ; Vervliet et al., 1983). Ceci motiva la mise en place d'une étude pilote de traitement de 18 patients avec différentes doses d'IFN- γ . Cependant cela entraîna une aggravation de la maladie chez 7 d'entre eux indépendamment de la dose, associée à une activation du système immunitaire (Panitch et al., 1987), suggérant que l'IFN- γ est impliqué dans la physiopathologie de la SEP. On observa plus tard l'accumulation de cette cytokine dans le SNC, le LCR, ou encore au sein de PBMC de patients (Olsson, 1992). Une autre étude clinique réalisée cette fois-ci avec des anticorps bloquant l'IFN- γ a par la suite montré une amélioration des symptômes chez des patients en phase SPMS, confirmant le rôle pathogénique de l'IFN- γ (Skurkovich et al., 2001). De plus, les premières expériences de transfert adoptif ont permis de montrer que les Th1 avaient la capacité d'induire l'EAE, contrairement aux Th2 (Baron et al., 1993). Mais la grande surprise fut cependant la découverte que les souris IFN γ -KO développent une EAE « plus sévère » que les souris WT (Ferber et al., 1996), de même que chez les souris p35-KO ou IL12Rb2-KO, souris dépourvues respectivement de la cytokine IL-12 ou de son récepteur (Becher et al., 2002; G.-X. Zhang et al., 2003). Il semblerait cependant que l'EAE ne soit pas simplement plus sévère, mais plutôt « différente ». En effet, l'EAE classique est caractérisée par une atteinte majeure de la ME entraînant des symptômes moteurs, avec une relativement faible infiltration dans le cerveau (Lees et al., 2008; Pierson et al., 2012; Simmons et al., 2013). Or l'IFN- γ semble avoir des effets opposés entre le cerveau et la ME, étant protecteur pour le premier, mais néfaste pour le

deuxième (Goverman, 2009; Wagner et al., 2020). Ainsi, l'absence d'IFN- γ ou de son récepteur entraîne une augmentation de l'infiltration immunitaire dans le cerveau, et de ce fait le développement d'une **forme atypique** de l'EAE caractérisée par une atteinte cognitive (ataxie, dystonie...) (Ni et al., 2014). Ceci pourrait être expliqué par les effets différents de l'IFN- γ sur la BHE du cerveau et la BHE de la ME, ce qui est illustré chez les souris IFN γ R-KO où l'expression du récepteur a été restauré spécifiquement dans les cellules endothéliales, entraînant une diminution de l'inflammation dans le cerveau mais pas de la ME (Ni et al., 2014). L'inflammation dans le cerveau des souris IFN γ R-KO est par ailleurs associée à une augmentation de l'infiltration en neutrophiles CXCR2⁺ du fait de l'augmentation locale de CXCL2, tandis que l'IFN- γ induit chez les souris WT une infiltration de monocytes CCR2⁺ dans la ME en réponse au CCL2 (Stoolman et al., 2014).

Impact direct de l'IFN- γ

L'IFN- γ exerce ses effets en se liant sur son récepteur exprimé par des cellules immunitaires et non-immunitaires. Elle entraîne l'augmentation de l'expression des molécules de CMH-I, de CMH-II, et des molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques, les macrophages périphériques et péri-vasculaires, la microglie ou encore les astrocytes, stimulant ainsi leur capacité à réactiver les LT CD4 et CD8 (Ottum et al., 2015). L'IFN- γ entraîne aussi la production de chimiokines par les cellules résidentes et infiltrantes telles que CCL2, CCL5, CXCL9, ou CXCL10, responsables du recrutement de monocytes CCR2⁺ et de lymphocytes CCR5⁺ CXCR3⁺. Il a aussi été montré que l'IFN- γ entraîne le relâchement des jonctions serrées de la BHE et y induit l'expression de molécules d'adhésion (Sonar et al., 2017). La difficulté d'interprétation des effets de l'IFN- γ est aussi due aux effets opposés qu'elle exerce en fonction de la dose. Par exemple, une dose forte entraîne la mort des oligodendrocytes, et la différenciation de la microglie en cellules pro-inflammatoires pathogéniques produisant notamment du NOS (Nitric Oxygen Species), tandis qu'une faible dose stimule les capacités anti-oxydantes des oligodendrocytes et différencie la microglie en cellules anti-inflammatoires inductrices d'iTreg (Ottum et al., 2015). L'IFN- γ participe ainsi à l'attraction de cellules, à leur migration au travers de la BHE, à leur réactivation localement et enfin à leur pathogénicité.

Le TNF- α

Dans le même genre, le TNF- α est une cytokine hautement pro-inflammatoire, mais au rôle ambigu elle aussi. Elle induit l'expression de molécules d'adhésions par les astrocytes et les cellules endothéliales, induit l'expression de chimiokines par la microglie, synergise avec l'IFN- γ pour induire l'expression des molécules de CMH par les oligodendrocytes et les astrocytes, et peut directement induire la mort par apoptose des oligodendrocytes. Il a aussi été montré que le TNF- α serait impliqué dans l'induction de l'expression de MMP-2/9 par les monocytes, nécessaire à la perturbation de la glia limitans (Agrawal et al., 2006). De plus, il a été montré qu'une élévation des taux de TNF- α et d'IFN- γ précédait les phases de poussées de la maladie chez les patients (Becher et al., 2016; Ding et al., 2015). Cependant, le traitement de patient avec un inhibiteur de TNF- α a entraîné une augmentation de la maladie (Arnason et al., 1999), indiquant que tout comme l'IFN- γ , le TNF- α aurait des rôles pro- et anti-inflammatoires, probablement dépendant de la cible, de la dose et de la localisation.

Pour finir sur les Th1, des études ont montré que la déficience en T-bet entraînait une résistance à l'EAE, associée avec une absence de production d'IFN- γ et une augmentation de la production d'IL-10 ou encore de cytokines Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-5 (Bettelli et al., 2004; Nath et al., 2006). Une étude plus récente n'a cependant pas montré de résultats similaires, avec seulement un développement retardé de la pathologie chez les souris T-bet-KO (R. A. O'Connor et al., 2013). Cette étude confirme en revanche le rôle important de T-bet de façon intrinsèque au sein des LT CD4. Ils montrent en effet une incapacité des LT CD4 T-bet KO à transférer l'EAE dans un modèle d'EAE passive où ils ont été polarisés en condition Th1, et ce malgré le fait qu'ils produisent de l'IL-17. Ceci est en revanche associé à une réduction de leur production d'IFN- γ et de GM-CSF. De manière intéressante, si ces cellules sont polarisées en condition Th17, elles redeviennent capables d'induire l'EAE aussi efficacement que les WT, possiblement du fait d'une migration à différents endroits selon la pré-différenciation.

ii. Les Th17 dans l'EAE

L'IL-12, nécessaire à la différenciation Th1, est un dimère formé par les sous-unités **p40** et p35. En 1998, une étude démontre la résistance à l'EAE des souris p40-KO, ce qui est expliqué par un défaut de polarisation Th1, défini alors comme le lignage pathogénique (Segal et al., 1998). Ce n'est que plus tard avec la découverte que la délétion de p35 n'induit pas de protection contre l'EAE, que cette hypothèse a été remise en question. De plus, la découverte que la

délétion de p19 (se dimérisant avec **p40** pour former l'IL-23) était responsable d'une drastique réduction de la sévérité de la maladie, amena à envisager le rôle d'une nouvelle population (Cua et al., 2003). Ceci fut confirmé avec la découverte de la population Th17, du facteur de transcription ROR γ t, et de la nécessité de l'IL-23 pour finaliser la différenciation en Th17 (Komiyama et al., 2006). Contrairement aux Th1 étant pathogéniques au sein de la ME, il a été montré que les Th17 induisaient une forte inflammation au niveau du cerveau (Stromnes et al., 2008). Le rôle pathogénique des Th17 peut être expliqué par différents effets médiés par l'IL-17 notamment. L'IL-17 induit une augmentation de la perméabilité de la BHE (Kebir et al., 2007), possiblement en augmentant la production de ROS par les cellules endothéliales de la BHE ce qui entraîne une perturbation des jonctions serrées (Huppert et al., 2010). L'IL-17 induit aussi l'expression de chimiokines comme le CXCL2 par les astrocytes entraînant le recrutement massif de neutrophiles (Simmons et al., 2014). Les Th17 sont aussi responsables de la formation de structures particulières dans le SNC, des « follicules lymphoïdes ectopiques » (aussi appelés organes lymphoïdes tertiaires – OLIII), structure typique retrouvée au sein des méninges des patients SEP en SPMS, où LT et LB se regroupent et entraînent parfois la formation de centres germinatifs (Peters et al., 2011). De façon intéressante, l'induction d'une EAE passive par injection de Th17 auto-spécifiques suffit à entraîner la formation de ces follicules ectopiques, et ce de manière IL-17-dépendante, en remodelant les fibroblastes des méninges (Pikor et al., 2015).

De façon importante, une étude vient très récemment de montrer que le rôle des Th17 dans l'EAE pourrait aussi (voire surtout) impliquer une interaction de ces cellules avec le microbiote intestinal, et que la diminution de l'EAE dans les souris IL17-KO ne serait pas due à une absence d'encéphalitogénicité de ces cellules, mais serait plutôt due à une dysbiose intestinale (Regen et al., 2021). Ceci sera plus amplement discuté dans une prochaine partie dédiée au microbiote (Partie IV.3.b.iii).

iii. Le GM-CSF dans l'EAE

Poussée par les observations qu'une partie des souris IL17-KO ainsi que IL17-IFN γ -double-KO développent malgré tout l'EAE, la communauté scientifique a recherché la ou les cytokines qui pourraient induire l'EAE dans ces conditions (Simmons et al., 2014). Le GM-CSF n'est pas restreint à un lignage mais est au contraire exprimé par les Th1 et les Th17, et est nécessaire à leur encéphalitogénicité (Codarri et al., 2011; Ponomarev et al., 2007). En effet, les souris GM-CSF-KO sont presque totalement résistantes à l'EAE (McQualter et al., 2001). Le récepteur au

GM-CSF n'étant pas exprimé par les lymphocytes, mais l'étant fortement par les cellules myéloïdes, c'est par elles qu'il joue son rôle hautement pro-inflammatoire. Il entraîne ainsi le recrutement, la prolifération et la maturation des cellules myéloïdes telles que neutrophiles et monocytes, stimule la microglie et les DC résidentes, générant ainsi un environnement fortement inflammatoire, notamment via la production de ROS (Reactive Oxygen Species) par ces cellules (Spath et al., 2017; Wagner et al., 2020).

iv. Les Th2 et Treg dans l'EAE

Bien qu'il ait été montré que les Th2 étaient capables d'induire l'EAE lors de transfert adoptif, induisant une EAE plus faible que des Th1 ou Th17 (Jäger et al., 2009), les Th2 sont plutôt associés à un rôle protecteur lors de l'EAE. Il a en effet été montré que traiter les souris avec de l'anti-IL-4 pouvait induire une augmentation de la sévérité de l'EAE (Brocke et al., 1996). De plus, il a été montré que le transfert de Th2 prévenait le développement de l'EAE, mais pouvait aussi induire la rémission d'une EAE déjà initiée (Kuchroo et al., 1995). Finalement, le traitement de souris avec de l'IL-4 améliore la rémission de l'EAE, et est associé avec une réduction de l'inflammation et une remyélinisation au sein du SNC.

Concernant les Treg, de nombreuses études ont montré leurs rôles bénéfiques dans l'EAE, que ce soit dans l'inhibition de l'induction de l'EAE ou dans la phase de rémission. Dans ce sens, la déplétion des Treg entraîne une aggravation de la maladie, tandis que le transfert de Treg l'inhibe. Outre l'inhibition de la réponse inflammatoire, les Treg sont aussi impliqués dans la réparation tissulaire *via* la production de facteurs de croissance, ou encore *via* la polarisation des macrophages vers un phénotype « M2 » pro-résolutif, phagocytant les débris cellulaires dans le SNC et inhibant la réponse immunitaire par production d'IL-10 (Y. Dong & Yong, 2019; Duffy et al., 2019; Malviya et al., 2020).

v. Les LT CD8 dans l'EAE

Bien que cette population semble fortement impliquée dans la SEP (cellules infiltrantes majoritaires localisées au niveau des lésions) (Hauser et al., 1986), les LT CD8 semblent ne jouer qu'un rôle mineur dans les différents modèles d'EAE étant basés sur l'induction d'une réponse immune des LT CD4 ou le transfert de LT CD4 déjà activés. Les premières évidences pointaient par ailleurs vers un rôle protecteur des LT CD8, étant les médiateurs de la tolérance

orale induite par l'apport de MBP ou encore de la protection contre l'EAE suite à une première immunisation (Jiang et al., 1992; Miller et al., 1992). Il a cependant été montré par la suite que les LT CD8 n'étaient pas seulement suppresseurs mais pouvaient aussi induire l'EAE suite au transfert de LT CD8 ayant un TCR spécifique de composant de la myéline (MBP), mais entraînant une pathologie différente de l'EAE classique médiée par les LT CD4 (Infiltration immunitaire et dommages tissulaires localisés principalement dans le cerveau) (Huseby et al., 2001). De plus, même lors de l'immunisation par le peptide MOG₃₅₋₅₅, les LT CD8 sont activés grâce à l'apprêtage d'une version modifiée de ce peptide sur le CMH-I : MOG₃₇₋₄₆ (Ford & Evavold, 2005), dont la restimulation entraîne la production d'IFN- γ . Cette étude montre aussi que le transfert de ces LT CD8 spécifiques de MOG induit l'EAE chez les souris receveuses. Ceci a cependant été contredit par une plus récente étude indiquant que le transfert de LT CD8 spécifiques de MOG ne permettait pas d'induire l'EAE. À l'inverse, le transfert de ces LT CD8 induit une réduction de la sévérité de l'EAE (York et al., 2010). Ceci serait dépendant de l'expression de la perforine par ces LT CD8, leur permettant de lyser les LT CD4 et CPA responsables de l'inflammation.

De même, il a plus récemment été montré qu'il y avait suite à l'immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅, l'expansion de différents clones de LT CD8 ne reconnaissant pas MOG mais des peptides variés ayant été déterminés par screening de librairie (Saligrama et al., 2019). La co-immunisation avec un ou plusieurs de ces peptides que ce soit avant, en même temps, ou après l'induction de l'EAE, aboutit à une forte réduction de la sévérité de l'EAE. Les auteurs caractérisent ainsi une population particulière de LT CD8⁺CD44⁺CD122⁺Ly49⁺, capable d'inhiber la prolifération *in vitro* des LT CD4 MOG-spécifiques dans un mécanisme dépendant de la perforine. Il ressort ainsi de ces différentes études un rôle complexe des LT CD8, pouvant être impacté par la nature du CMH-I qu'ils rencontrent et la nature des peptides qu'ils reconnaissent.

Ainsi, à l'image des LT CD4 pouvant être pathogéniques ou protecteurs, les LT CD8 peuvent eux aussi avoir des rôles opposés. Dans ce sens, des études d'associations génétiques ont montré que des allèles du CMH-I étaient positivement associés à la SEP tandis que d'autres étaient négativement associés à la SEP, suggérant une modulation différente de la réponse T CD8, ayant des conséquences physiopathologiques (Mars et al., 2011).

3. Étiologie de la SEP

L'étiologie de la SEP est encore mal connue mais différents travaux ont montré que cette maladie est complexe mêlant différents facteurs de risques, qu'ils soient génétiques, épigénétiques ou environnementaux.

a) Facteurs Génétiques et Épigénétiques

La connaissance des facteurs génétiques impliqués dans la SEP a grandement évolué grâce aux études génomiques de cohorte par GWAS. Un ensemble de GWAS ont à ce jour été réalisées sur des patients SEP, utilisant des cohortes plus grandes à chaque fois, et avec une meilleure profondeur et précision d'analyse (Hafler et al., 2007; Patsopoulos et al., 2019; Sawcer et al., 2011). Ces GWAS ont ainsi contribué à la vision de la SEP comme étant une maladie auto-immune, de par la très grande majorité de gènes impliqués dans le système immunitaire. Les gènes les plus associés avec la SEP sont par ailleurs les gènes du HLA, surreprésentés dans ces études, et étant primordiaux pour la réponse T. Les autres gènes concernent des cytokines, des récepteurs de cytokines ou chimiokines, des molécules de co-stimulations, ou encore des molécules de signalisation comme Vav1 et Themis1. Cependant, bien que ces études aient permis d'améliorer la compréhension de l'étiologie de la SEP, les facteurs génétiques ne permettent d'expliquer que 39 à 48% de l'héritabilité (Patsopoulos et al., 2019), définissant ainsi un pourcentage important de « missing heritability » (Zuk et al., 2012), qui serait en partie expliqué par les interactions géniques, étant occultées dans les GWAS.

Les modifications épigénétiques permettent la modulation de l'expression génique sans altération de la séquence d'ADN codant pour les différents gènes. Il a par exemple été montré que les LT CD4 issus du sang de patients SEP pouvaient avoir des modifications épigénétiques différentes en comparaison aux LT CD4 de donneurs sains, notamment au niveau des gènes du HLA (Graves et al., 2014). Une autre étude a mis en évidence des modifications épigénétiques au sein des oligodendrocytes de patients, qui pourraient avoir des effets sur leur maturation (Pedre et al., 2011). Ces modifications peuvent être héritées, mais aussi acquise *in utero* ou au cours de la vie, notamment sous l'influence du vieillissement ou de facteurs environnementaux (Huynh & Casaccia, 2013; Z. Zhu et al., 2019)

b) Facteurs Environnementaux

La limite de l'implication de la génétique dans l'étiologie de la SEP est parfaitement illustrée par l'étude de jumeaux monozygotes. En effet bien qu'ils aient en commun 100% de leur génome, la probabilité de l'un de développer la SEP si le deuxième l'a déjà développée a été estimée à ~18% (O'Gorman et al., 2012). Certes bien supérieur aux ~3% de risque observés entre frères et sœurs non-jumeaux, cela montre bien l'importance de facteurs extérieurs à la génétique.

i. Facteurs d'environnement infectieux

Des études épidémiologiques ont montré une corrélation entre l'infections par le virus EBV et le développement de la SEP. De plus, on observe chez les patients SEP des anticorps dirigés contre l'EBV, et on retrouve ce virus dans le cerveau au niveau de certaines lésions chez les patients. Malgré cela, étant donné que 90-95% de la population mondiale a été infectée par l'EBV, montrer un lien de causalité entre l'infection par l'EBV et le développement de la SEP est délicat. Une récente étude de suivi de plus de 10 millions de personnes sur 20 ans, dont ~5% étaient EBV-négatif à l'initiation de l'étude a finalement permis de montrer qu'au sein des plus de 900 nouveaux cas de SEP, ceux-ci étaient à 97% précédés de l'infection par l'EBV, contre seulement 57% de néo-infection EBV chez les personnes n'ayant pas développé la SEP durant l'étude (Bjornevik et al., 2022). Finalement, une autre étude très récente révèle l'existence de « mimétisme moléculaire » entre l'antigène EBNA1 de l'EBV et la protéine GlialCAM exprimée par les astrocytes et les oligodendrocytes, pouvant tous deux être reconnus par un même clone d'anticorps retrouvé chez 20-25% des patients SEP (Lanz et al., 2022). Cette cross-réactivité des anticorps entre un peptide viral et un peptide glial pourrait être en partie responsable du lien entre l'EBV et la SEP.

ii. Facteurs d'environnement non-infectieux

Il est aujourd'hui admis que le comportement humain, ou même l'endroit où nous vivons ont un impact sur notre susceptibilité à développer la SEP. Il a ainsi été montré une augmentation du risque chez les personnes qui fument du tabac, qui travaillent de nuit, qui sont obèses à l'adolescence ou encore étant sujets à la respiration de solvants organiques. Un autre facteur est l'exposition au soleil, et dépendant d'elle le taux de vitamine D, étant inversement corrélé au développement de la SEP. De même, il semble que la consommation de café ou d'alcool soit

associée à une réduction de risque de développer la SEP, bien que ces dernières observations requièrent de plus larges études pour être confirmées (Olsson et al., 2016).

iii. Le microbiote

La communication entre le cerveau et l'intestin au travers du « Gut-Brain-Axis » est énormément étudiée ces dernières années, avec un intérêt particulier sur le rôle du microbiote intestinal dans cette communication.

L'une des observations les plus frappantes est que la simple absence de microbiote intestinal dans les souris « germ-free » entraîne leur résistance quasi complète à l'EAE (Berer et al., 2011; Lee et al., 2011). Ceci est associé à une réduction de la réponse Th1 et Th17 et une augmentation du nombre de Treg. La reconstitution de ces souris avec des bactéries segmentées filamenteuses connues pour induire une réponse Th17 (Ivanov et al., 2009), suffit à les rendre susceptibles à l'EAE à nouveau, illustrant le lien fort entre microbiote intestinal et inflammation du SNC (Lee et al., 2011). Des résultats similaires ont été observés en réduisant le microbiote intestinal par administration d'un mélange d'antibiotiques avant l'immunisation des souris (Ochoa-Repáraz et al., 2009). Mais les bactéries ne sont pas toutes néfastes, il a en effet été montré que l'administration de certaines souches de *Lactobacilles* permettent non seulement de prévenir de l'EAE, mais aussi d'inhiber une EAE déjà induite, en réduisant la production d'IFN- γ , d'IL-17 et de TNF- α et en induisant la différenciation de Treg et la production d'IL-10 et de TGF- β (Lavasani et al., 2010). De même, il a été montré que donner oralement un métabolite bactérien (Polysaccharide A) issu de la bactérie *Bacteroides fragilis*, protège de l'EAE en préventif mais aussi en curatif (Ochoa-Repáraz et al., 2010). De façon intéressante, dans ces deux études les effets bénéfiques des probiotiques sont dépendants de la capacité de la souris à produire de l'IL-10, puisqu'aucune amélioration n'est observée chez les souris IL-10-KO (Lavasani et al., 2010; Ochoa-Repáraz et al., 2010). Ces résultats ont amené des interrogations quant aux mécanismes liant le microbiote et l'activation du système immunitaire dans le contexte de l'EAE. Il a ainsi été montré que suite à l'immunisation (ou suite au transfert de LT CD4 encéphalitogéniques), a lieu une augmentation de la **perméabilité intestinale** et ce dès J7, et augmentant jusqu'à J14, associée à une inflammation des plaques de Peyer et de la lamina propria (Nouri et al., 2014), suggérant que lors de l'EAE, l'inflammation intestinale pourrait précéder l'inflammation du SNC. Dans ce contexte, mon équipe d'accueil a montré que l'administration d'une souche d'*Escherichia Coli* (Nissle1917 - ECN) avant l'immunisation induisait une réduction de la sévérité de l'EAE associée à une protection de l'intégrité de la barrière intestinale, maintenant

une perméabilité normale (Secher et al., 2017). Ceci suggère ainsi un lien entre la perméabilité intestinale et la sévérité de l'inflammation dans le SNC. Il a récemment été montré dans un modèle d'EAE induit par transfert adoptif de 2D2 (LT CD4 ayant un TCR transgénique spécifique du peptide MOG) préalablement différenciés en Th17, que ces cellules migrent d'abord dans le colon dès J4 où elles prolifèrent fortement, avant de migrer pour une partie d'entre elles dans le SNC à partir de J8 (Duc et al., 2019). Bien que cette migration dans le colon ne soit pas antigène spécifique puisque observée avec des OT-II (LT CD4 ayant un TCR transgénique spécifique du peptide OVA), elle est néanmoins spécifique des Th17 qui migrent bien plus efficacement que les Th1. De façon importante, l'inhibition de cette migration par traitement avec un anticorps anti- $\alpha 4\beta 7$ (intégrine reconnaissant MadCAM dans l'intestin) induit une réduction de la sévérité de l'EAE (Duc et al., 2019). Finalement, le traitement de ces souris avec un antibiotique induit une réduction de la sévérité de l'EAE similaire à l'anti- $\alpha 4\beta 7$, et le co-traitement n'induit pas de diminution supérieure de l'EAE, indiquant que l'effet bénéfique de l'anti- $\alpha 4\beta 7$ est dépendant de la présence de microbiote. Dans ce sens, les auteurs ont montré que l'injection des 2D2 Th17 est associée à une dysbiose, avec notamment une réduction des *Lactobacilles*, confirmant le lien entre Th17, microbiote, et inflammation du SNC.

Comme mentionnée précédemment, une très récente étude vient bousculer un peu la vision actuelle du rôle des Th17 dans l'EAE. Cette étude suggère que la protection contre l'EAE observée chez les souris IL17-KO ne serait pas due à un défaut d'encéphalitogénicité des LT, mais à la dysbiose du microbiote intestinal du fait de l'absence d'IL-17 produit localement (Regen et al., 2021). Bien que la restauration de l'EAE ne soit que très partielle lorsque les souris IL17-KO reçoivent le microbiote de souris WT (contredisant donc assez fortement leur hypothèse), les auteurs montrent que l'induction de l'expression de l'IL-17 spécifiquement dans les cellules épithéliales de l'intestin suffit à restaurer le microbiote et rendre les souris susceptibles à l'EAE, malgré l'incapacité des LT à produire l'IL-17. Outre la question du rôle de l'IL-17 dans le SNC, cette étude illustre encore une fois l'interdépendance entre le microbiote, la réponse immunitaire et l'inflammation du SNC.

Toutes ces observations chez la souris sont d'autant plus pertinentes que différentes études ont fait des observations similaires chez l'Homme. Une altération de la perméabilité intestinale a par exemple été décrite chez les patients SEP (Buscarinu et al., 2017), ainsi qu'une différence de microbiote entre les patients SEP et des contrôles sains (J. Chen et al., 2016; Jangi et al.,

2016). De façon intéressante la restauration du microbiote des souris germ-free avec le microbiote de patients SEP induit (après immunisation) une EAE plus sévère que lorsqu'elles sont reconstituées avec du microbiote de contrôles sains. Ceci est associé à un impact opposé sur les réponses Th1 et Treg, suggérant que la différence de microbiotes chez les patients SEP contribue à la maladie en modulant la fonction des LT CD4 (Cekanaviciute et al., 2017). Il a aussi été observé chez l'Homme une corrélation entre l'accumulation de Th17 au niveau de l'intestin, la dysbiose du microbiote fécal, et l'activité de la SEP (Cosorich et al., 2017). De plus, une bactérie qui se trouve fortement représentée chez les patients RRMS NEDA (no evidence of disease activity) mais quasi absente chez les patients RRMS EDA, une souche de *Prevotella* (Cosorich et al., 2017), a la capacité de réduire la sévérité de l'EAE lorsqu'elle est administrée à des souris, avant ou après immunisation (Mangalam et al., 2017). Ceci est associé à l'augmentation d'une population de DC tolérogéniques CD103⁺ responsable de l'induction de Treg et d'une réduction des réponses Th1 et Th17. De façon intéressante, les souris ayant reçu la bactérie présentent un maintien de l'intégrité de la barrière intestinale mais aussi de la BHE, caractérisé par la réduction de leur perméabilité (Mangalam et al., 2017). Finalement, les effets bénéfiques observés dans cette étude pourraient être dûs à d'autres bactéries, puisque les auteurs montrent que l'administration de leur souche de *Prevotella* induit aussi une restauration partielle du microbiote, avec par exemple une augmentation des *Lactobacilles*.

Pour finir, l'interaction entre le microbiote et le système immunitaire ne se limitant pas à la réponse T, des différences ont aussi été observées concernant la réponse humorale. Les patients SEP ont en effet un plus faible pourcentage des bactéries leur microbiote intestinal liées par des IgA. Cette diminution est par ailleurs inversement corrélée avec la sévérité de la maladie. De plus, ceci est associé chez les patients SEP à une plus forte concentration d'IgG sérique reconnaissant les bactéries du microbiote fécal (Sterlin et al., 2021). L'augmentation systémique de la réponse IgG pourrait être due à une augmentation de la translocation bactérienne au travers de la barrière intestinale du fait de la réduction des IgA, ou encore secondaire à l'augmentation de la perméabilité intestinale facilitant la translocation de bactéries. Ainsi, l'augmentation des IgG circulantes chez les patients SEP semble être en partie due à une réponse systémique contre le microbiote intestinal, et pourrait avoir un rôle physiopathologique.

Ainsi, tout évènement pouvant modifier le microbiote risque aussi de modifier la susceptibilité à diverses maladies, et notamment à la SEP. La colonisation de l'intestin par le microbiote suit quatre phases. La 1^{ère} a lieu par transfert vertical le jour de la naissance, où les bactéries

vaginales et fécales de la mère sont transmises à l'enfant. La phase d'allaitement constitue la 2^{ème}, où les composants nutritionnels du lait maternel mais aussi les bactéries qu'il contient vont contribuer à faire évoluer le microbiote de l'enfant. La 3^{ème} phase a lieu avec le sevrage et l'introduction de nourriture solide, et enfin la période post-sevrage constitue la 4^{ème} et dernière phase. Il apparait ainsi un rôle primordial du microbiote de la mère dans l'initiation de la mise en place du microbiote de l'enfant. Par conséquent une modification du microbiote de la mère, comme observé lors de stress prénatal, pourrait avoir une influence sur la susceptibilité à développer diverses maladies comme la SEP (Jašarević et al., 2017).

iv. Le stress prénatal

Le stress prénatal (PS) apparait depuis plusieurs années comme un paramètre pouvant impacter la susceptibilité de la descendance à développer divers troubles et maladies lors de l'enfance ou une fois devenue adulte, qu'ils soient de nature neuro-développementaux (Beverdors et al., 2005), psychiatriques (Khashan et al., 2008), comportementaux (O'Connor et al., 2003), mais aussi immunitaires. Les effets du stress peuvent être directs au travers des molécules de stress telles que les glucocorticoïdes pouvant passer la barrière placentaire (**BOX 8**), mais ils peuvent aussi être indirects, médiés par le microbiote et sa modification.

BOX 8. Le circuit du stress

La survenue d'un évènement stressant entraîne l'activation de l'**axe HPA** (Hypothalamo-Pituitaire-Adrénalien). L'activation du noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus entraîne sa libération de **CRH** (corticotropin-releasing hormon), qui va agir à proximité sur l'hypophyse et entraîner la libération d'**ACTH** (Adrenocorticotropie hormon). En passant par la circulation sanguine, l'ACTH va stimuler la libération par les glandes surrénales de **glucocorticoïdes (GC)**, tels que la corticostérone chez la souris ou le cortisol chez l'Homme, ayant des effets systémiques, notamment d'inhibition du système immunitaire.

La nature lipophile des GC leur permet de traverser la barrière placentaire et ainsi d'atteindre le fœtus, mais ceci est en grande partie inhibé par l'enzyme placentaire **11 β -HSD2** qui convertit le cortisol en cortisone beaucoup moins actif. La concentration d'HSD2 augmente au fur et à mesure de la grossesse, mais chute juste avant le terme, et chute d'autant plus en réponse à un stress chronique. C'est justement à ce moment que le fœtus commence à exprimer ubiquitairement les récepteurs aux GC, et serait donc particulièrement sensible à leurs effets (Douros et al., 2017).

Il a en effet été montré que le PS induit une dysbiose du microbiote intestinal de la descendance chez l'Homme (Aatsinki et al., 2020; Zijlmans et al., 2015), mais aussi au sein de modèles animaux tels que le singe (Bailey et al., 2004), le rat (Golubeva et al., 2015), ou encore la souris (Jašarević et al., 2017). Il a été montré que ces modifications du microbiote de la descendance sont au moins partiellement dues à la modification des microbiotes vaginal et fécal de la mère

suite à la survenue de stress (Jašarević et al., 2017). De façon intéressante, le contrôle de cette transmission verticale par césarienne suivi de transfert de microbiote vaginal suffit à induire une partie des phénotypes observés chez les souris PS (Jašarević et al., 2018) confirmant l'importance du microbiote dans les effets du PS.

Outre l'effet sur le microbiote intestinal (bien que ce soit très probablement lié), le PS a été corrélé avec différentes maladies inflammatoires chez l'Homme, telles que des pathologies gastro-intestinales et allergiques (Zijlmans et al., 2015), l'eczéma atopique, l'asthme (De Marco et al., 2012) ou encore des infections entraînant l'hospitalisation (Nielsen et al., 2011). Ceci pourrait être expliqué par un biais de la réponse immunitaire vers la réponse Th2, comme cela a été montré par stimulation des PBMC de femmes ayant subi un stress prénatal. Ces dernières présentaient une augmentation de la production d'IL-4 et IL-10 et une légère diminution de la production d'IFN- γ (Entringer et al., 2008). Il a de plus été observé chez l'enfant une diminution de la production d'anticorps en réponse à un vaccin, une réduction de la production d'IFN- γ , et une augmentation de l'IL-4 par les LT après restimulation post-vaccin (T. G. O'Connor et al., 2013). Bien que ces études chez l'Homme ne constituent que des associations sans preuve de causalité, il semble effectivement y avoir un lien entre PS et immunité chez la descendance.

Cette augmentation de la réponse Th2 en réponse au stress prénatal a par ailleurs été observée chez la souris suite à un PS, étant associée ici à l'augmentation de l'asthme allergique (Pincus-knackstedt et al., 2006). Ceci semblerait être dû à un biais intrinsèque des DC du poumon. En effet, l'activation de LT CD4 naïfs *in vitro* en présence de DC pulmonaires induit leur polarisation vers le lignage Th2 plutôt que Th1.

Malgré l'ensemble de ces résultats, très peu d'études se sont intéressées à l'impact que le PS pourrait avoir sur des maladies auto-immunes et sur l'inflammation du SNC. Une récente étude suggère cependant que le PS induirait une augmentation de la sévérité de l'EAE, et ce de façon indépendante du système immunitaire, mais dépendante d'un défaut intrinsèque du SNC, et plus particulièrement de la maturation des oligodendrocytes dans la ME (Paladini et al., 2020). Ces résultats contrastent cependant avec l'augmentation de la réponse Th2 et la diminution de l'IFN- γ observées dans les précédentes études, qui pourraient induire au contraire une réduction de la sévérité de l'EAE.

Dans ce contexte, l'étude de l'impact du stress prénatal sur le système immunitaire et sur la susceptibilité des souris à l'inflammation du SNC a constitué un second projet de recherche que nous avons développé au cours de ma thèse.

Objectifs de la thèse

Afin de mieux comprendre l'étiologie de la sclérose en plaques, mes travaux de thèse ont porté sur deux grands axes principaux, étant premièrement l'étude de l'implication de facteurs génétiques (Vav1 et Themis1), et parallèlement, l'étude d'un facteur environnemental (le stress prénatal).

Des études génétiques et notamment des GWAS ont permis l'identification de nombreux gènes associés au développement de la sclérose en plaques, la plupart intervenant dans le système immunitaire. Cependant la fonction de ces gènes et leur rôle dans cette pathologie sont pour beaucoup d'entre eux encore méconnus. De plus, bien que le nombre de gènes identifiés ne cesse d'augmenter et soit aujourd'hui supérieur à 200, ces derniers n'expliquent que ~38% de l'héritabilité de la SEP (Patsopoulos et al., 2019). Une possible explication pour ce manque serait les interactions inter-géniques, n'étant pas prises en compte dans les analyses génétiques.

Themis1 et Vav1 sont deux protéines de la signalisation du TCR, ayant toutes deux été génétiquement associés à la SEP (Sawcer et al., 2011 ; Jagodic et al., 2009). Le rôle de Vav1 a d'ores et déjà été largement étudié au sein des LT (Gaud et al., 2018), ou encore dans l'EAE (Kassem et al., 2016), étude dans laquelle mon équipe a montré que la variant naturel Vav1^{R63W} induit une réduction de la maladie. Le rôle de Themis1 dans les LT matures et lors de l'EAE est en revanche très mal connu voire jamais étudié. Il a cependant été décrit que Themis1 et Vav1 interagissent ensemble suite à l'engagement du TCR, et que Themis1 contrôle positivement la phosphorylation de Vav1 (Zvezdova et al., 2016). De plus, il a été montré que l'interaction Themis1-Vav1 est impactée par la mutation de Vav1, et que le variant de Vav1 est dépendant de Themis1 pour être recruté à LAT, suggérant une relation épistatique entre ces deux gènes.

Au vu de ces données, le premier objectif de ma thèse aura été de déterminer l'implication de Themis1 au sein des LT lors de l'EAE, mais aussi d'étudier l'implication de la communication Themis1-Vav1 dans l'encéphalitogénicité des LT.

En parallèle de ce projet, nous avons initié une seconde étude portant sur l'analyse de la possible implication d'un stress survenue lors de la gestation sur le développement de l'EAE.

La période prénatale est une période sensible au cours de laquelle l'exposition intra-utérine à des facteurs environnementaux peut impacter le développement du fœtus, engendrant un effet durable qui est associé au développement de troubles neurologiques chez la progéniture (Kashan et al., 2008). Il a de plus été montré que le stress pendant la grossesse pouvait induire chez la descendance adulte une dysbiose du microbiote intestinal associée à une augmentation du risque de développer des maladies inflammatoires comme l'allergie (Zijlmans et al., 2015 ; Aatsinki et al., 2020). Toutefois, un lien entre l'immunité compromise causée par le stress prénatal, la dysbiose, et la susceptibilité de la progéniture aux maladies inflammatoires du SNC n'a pas encore été établi.

Dans ce contexte, nous avons analysé l'impact d'un stress prénatal sur le système immunitaire à l'état basal et lors d'une pathologie auto-immune dirigée contre le SNC, en utilisant un modèle murin de sclérose en plaques.

Étude de l'implication des facteurs génétiques Themis1 et Vav1 dans l'inflammation du système nerveux central

-

Themis1 and Vav1 signaling hub controls T cell pathogenicity in a mouse model of central nervous system inflammation through RelA signaling axis

Remi Marrocco¹, Isabelle Bernard¹, Emeline Joulia¹, Anne S. Dejean¹, Paul E. Love², Renaud

Lesourne¹, Abdelhadi Saoudi^{1*}

¹Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), Université de Toulouse, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France.

²Section on Hematopoiesis and Lymphocyte Biology, Eunice Kennedy Shriver, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

***Corresponding author:**

Abdelhadi Saoudi, mail : abdelhadi.saoudi@inserm.fr, <https://orcid.org/0000-0001-7015-8178>

Address: Infinity, INSERM U1291, CHU Purpan, BP 3028, 31024, Toulouse Cedex 3, France

Abstract

Themis1 and *Vav1* are two TCR signaling molecules which interact following TCR engagement. In this study, we investigate the importance of potential signaling cross-talk between *Themis1* and *Vav1* for the susceptibility to develop Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by using a natural variant of *Vav1* (*Vav1*^{R63W}) together with a T cell-conditional deletion of *Themis1*. We showed that, when taken separately, both mutations triggered a mild reduction of EAE severity, whereas this reduction was much stronger when both genes were mutated simultaneously. Functional studies revealed that this effect was independent on Tregs and unrelated to the impact of *Themis1* on thymic selection. Rather, it resulted from decreased production of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-17, TNF- α and GM-CSF), together with reduced T cell infiltration in the CNS. The signaling pathway analysis revealed that *Themis1*-deficient CD4 T cells harboring the mutated *Vav1* exhibit a selective defect of the phosphorylation of the NF- κ B member, RelA, which was not observed in CD4 T cells with a single mutation. These data suggest that *Themis1* is required for *Vav1*^{R63W} variant to enhance TCR signaling events leading specifically to RelA activation indicating that *Themis1* and *Vav1* act in a cooperative manner to generate optimal TCR signals.

Introduction

A critical component of the immunological response to self and foreign antigens is the activation of CD4 T lymphocytes through the binding of their $\alpha\beta$ T-cell receptors (TCRs) to peptide-loaded major histocompatibility complex (pMHC) II molecules on the surfaces of antigen-presenting cells. This provides antigen specificity and initiates the required steps for CD4 T-cell activation and differentiation into CD4 T cell subtypes with specific and adapted immune function. The recognition of the peptide-MHC complex by TCRs triggers the activation of a complex network of intracellular signaling pathways. The quality (the type of signaling pathways which are activated), the duration and the “strength” of these signals determine the outcome of T cell response and is therefore critical for 1) the discrimination between self and non-self-antigens, 2) the generation and expansion of the appropriate T cell subtypes, 3) the control of pathological disorders. Understanding the molecular mechanisms by which TCR signaling hubs control effector CD4 T cell fate is thus of great interest for understanding the deregulation of the immune response in pathological conditions.

We previously identified *Themis1* (THymocyte-Expressed Molecule Important for Selection) as a T-cell signaling protein essential for the full development of CD4⁺ and CD8⁺

T cells in the thymus (Chabod et al., 2012; Lesourne et al., 2009). *Themis1* is recruited to TCR signaling complexes via the cytosolic adaptor Grb2, which binds to the transmembrane adaptor LAT following TCR engagement (Paster et al., 2013). *Themis1* interacts constitutively with the tyrosine phosphatase SHP-1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1) (Zvezdova et al., 2016), which exerts well-characterized inhibitory functions on TCR signaling (Kosugi et al., 2001; Lorenz, 2009). It remains controversial whether *Themis1* negatively regulates TCR signals through SHP-1 recruitment close to TCR-signaling clusters (Fu et al., 2013; Mehta et al., 2018) or, on the contrary, if it enhances TCR signals by blocking SHP-1 phosphatase activity (Brzostek et al., 2020; Choi, Warzecha, et al., 2017; Lesourne et al., 2012). *Themis1* expression is highly variable in peripheral T-cell subsets, ranging from relatively high level in CD8⁺ T cells to intermediate and low levels in CD4⁺ T cells and regulatory T cells (Tregs), respectively (Duguet et al., 2017; Garreau et al., 2017). The expression level of *Themis1* is also subjected to inter-individual variations, as revealed by the identification of single nucleotide polymorphisms in cohorts of patients suffering of auto-immune diseases (Davies et al., 2016; Patsopoulos et al., 2019). By inducing a post-thymic deletion of the T-cell lineage signaling protein *Themis1*, we recently showed that *Themis1* enhances the encephalitogenicity of CD4⁺ T cells by favoring their migration into the central nervous system and promoting Th1 response (C. Yang et al., 2022). We previously reported that disruption of the *Themis1* gene in BN but not LEW rats led to the spontaneous development of inflammatory bowel disease (IBD) (Chabod et al., 2012; Pedros et al., 2015). Genetic dissection revealed that this phenotype was only observed in rats that combined *Themis1* deficiency with the presence of a *Vav1*^{R63W} variant. We showed that the R63W mutation leads to a reduced stability of *Vav1* (four-fold reduction of the protein quantity), which reduced the adaptor function of the protein but preserved its GEF activity (Colacios et al., 2011; Kassem et al., 2016). We previously showed that this variant triggers a reduced T cells encephalitogenicity due to reduced cytokines production (Kassem et al., 2016). Several studies revealed a cross talk between these two signaling molecules. First, the analysis of *Themis1* and *Vav1* signalosome revealed that these molecules are privileged binding partners in T cells (Gaud, Roncagalli, et al., 2018; Zvezdova et al., 2016). Second, recent studies have highlighted that *Themis1* acts as a biological repressor of the tyrosine phosphatase SHP-1 (Brzostek et al., 2020; Choi, Warzecha, et al., 2017) and positively regulates *Vav1* activity (Zvezdova et al., 2016). Third, *Vav1* has been described as a direct target of SHP-1 (Mesecke et al., 2011; Stebbins et al., 2003). Finally, we described an epistasis interaction between *Vav1* and *Themis1* responsible for spontaneous gut inflammation (Pedros et al., 2015). Based on these observations, we hypothesize *Themis1* and *Vav1* act in a

cooperative manner to generate optimal TCR signals in CD4 T cells and consequently could impact susceptibility to autoimmune diseases.

To test this hypothesis, we analyzed the importance of potential signaling cross-talk between *Themis1* and *Vav1* for the susceptibility to develop Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by using a conditional knock-out (cKO) mouse model that expresses *Themis1* in thymocytes but not in peripheral T cells (C. Yang et al., 2022) that were crossed with *Vav1*^{R63W} knock-in (KI) mice (Kassem et al., 2016) to generate double mutant mice (KI-cKO). We showed that EAE severity was strongly reduced in KI-cKO mice as compared to mice with single mutation (KI or CKO). KI-cKO mice failed to develop cellular infiltrates in the CNS while their CD4 T cells became primed and accumulated in secondary lymphoid organs but had severely diminished IFN- γ , IL-17, TNF- α and GM-CSF production. The signaling pathway analysis revealed a specific defect in RelA activation suggesting that *Themis1* is required for *Vav1*^{R63W} variant to enhance TCR signaling indicating that *Themis1* and *Vav1* act in a cooperative manner to generate optimal TCR signals pivotal for the effector function of encephalitogenic CD4 T cells.

Results

T cell-conditional deletion of Themis1 combined with the natural variant of Vav1 (Vav1^{R63W}) leads to reduction of susceptibility to CNS inflammation

To assess the importance of potential signaling cross-talk between *Themis1* and *Vav1* in the susceptibility to EAE, we used mice harboring a conditional disruption of *Themis1* in peripheral T cells but not in thymocytes (*lateCD2-Cre Themis1*^{flox/flox} mice; named hereafter cKO mice) (fig. S1A) (C. Yang et al., 2022). In contrast to germline *Themis1* knockout mice (*Themis1*^{-/-}) (Lesourne et al., 2009), cKO mice exhibited normal proportions and numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the thymus (fig. S1, B and C). They also exhibited normal numbers of CD4⁺ T cells and a slightly reduced number of CD8⁺ T cells in lymph nodes (fig. S1D) and the spleen (fig. S1E). cKO mice were crossed with *Vav1*^{R63W} knock-in (KI) mice to generate KI-cKO mice to analyze the effect of the combination of these mutations on CNS inflammation. As previously described (Kassem et al., 2016), KI mice exhibited a slight defect in thymic T cell development, affecting both the CD4⁺ and CD8⁺ T cell compartments (fig. S1C). The KI-cKO mice exhibited similar proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the thymus (fig. S1C) and the same numbers of CD4⁺ T cells in peripheral lymphoid organs as were observed in KI mice (fig. S1, D and E) but had reduced numbers of CD8⁺ T cells, similar to those in the cKO mice (fig. S1, D and E).

As previously reported, *Vav1*^{R63W} leads to an increased frequency of Treg (Kassem et al., 2016) independently of the genetic background (WT vs. cKO). In contrast, we observed that *Themis1*-deficiency had no effect on the frequency or the absolute numbers of Treg in the thymus (fig. S1C), the lymph nodes (fig. S1D), or the spleen (fig. S1E), suggesting that *Themis1* is dispensable for of Treg homeostasis.

In order to assess the importance of potential signaling cross-talk between *Themis1* and *Vav1* during neuroinflammation, WT, KI, cKO and KI-cKO mice were immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG₃₅₋₅₅) emulsified in CFA along with pertussis toxin injections. As expected, the WT control mice develop classical disease characterized by a progressive ascendant paralysis while KI and cKO mice develop less severe EAE as shown by the reduction of both cumulative and maximal scores (Fig. 1A). KI-cKO mice develop milder disease as compared to KI or cKO mice as depicted by the delay of the day of EAE onset and reduced severity of disease progression (Fig. 1A) suggesting that *Themis1* and *Vav1* implicate different pathways of regulation. In KI, cKO and KI-cKO mice, the impact of *Themis1* and *Vav1* mutations concerns both Tconv and Tregs. To exclude a possible implication of Treg in the reduced EAE severity, we compared EAE development between the 4 genotypes after the depletion of Treg using anti-CD25 depleting mAbs (Fig. S2). After the CD25⁺ Treg depletion, the difference in the disease severity was maintained between the four groups, demonstrating that CD25⁺ Treg are not required for the reduced EAE severity observed in KI, cKO and KI-cKO mice (Fig. 1B, Fig. S2). Although the CD2-driven Cre transgene begins to be expressed at relatively late stage of T cell development (Vacchio et al., 2014), we could not definitively exclude that the effect of *Themis1* on EAE development in cKO and KI-cKO mice could be the consequence of an altered selection of the TCR repertoire in the thymus. To evaluate this possibility, we conditionally disrupted *Themis1* gene in peripheral CD4⁺ T cells by administrating tamoxifen to *Themis1*^{flox/flox} mice expressing the CD4-Cre^{ERT2}-driven transgene (Aghajani et al., 2012) and analyzed the development of EAE in these models (CKO^{ERT2} and KI-cKO^{ERT2}). We first showed that tamoxifen administration induces long term *Themis1* gene deletion specifically in CD4 T cells, (Fig. S3) that was maintained during our experimental protocol. In agreement with the results obtained in CD2-Cre driven transgenic model, we showed that EAE severity was strongly reduced in mice KI-cKO^{ERT2} whereas this reduction was less strong in cKO^{ERT2} and KI mice (Fig. 1C). These data show that the reduced EAE severity is not the consequence of a defect in the development of T cells in the thymus but rather operates in peripheral CD4 T cells as demonstrated by the targeted deletion of *Themis1* in mature CD4 T cells independently of *Themis1* deletion in CD8 T cells.

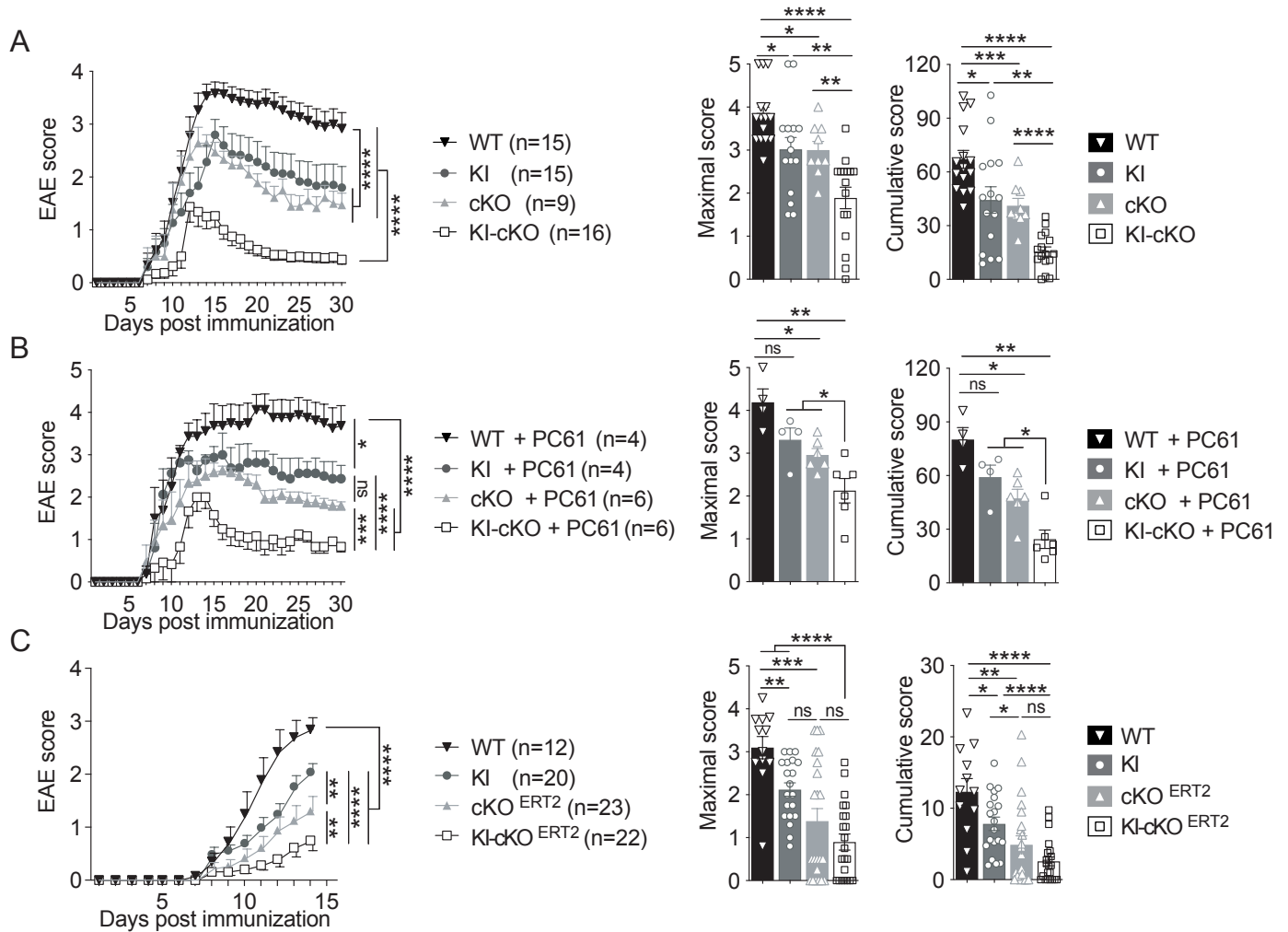


Figure 1. *Vav1* and *Themis1* mutations reduce EAE severity

A) WT, KI, cKO and KI-cKO mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified in CFA and clinical scores were evaluated daily. The data were expressed as mean of daily scores (left graphs), as mean of maximal scores (middle panels) or as mean of cumulative scores that represent the sum of daily clinical score of each mice (right panel). The data are a pool of two independent experiments B) CD25⁺ Treg were depleted by treating mice from the four genotypes with PC61 antibody and immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide 7 days later. C) WT, KI, cKO^{ERT2} and KI-cKO^{ERT2} mice were treated with tamoxifen orally for 3 consecutive days and then immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide two weeks later. The data are a pool of 3 independent experiments. Error bars represent SEM. Clinical curves differences are analyzed by two-way ANOVA. Maximal and cumulative scores histograms are analyzed by Mann-Whitney (*<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

MOG-specific CD4⁺ T cells from KI-cKO mice exhibit a defective infiltration into the CNS.

Peripheral activation and subsequent migration of autoreactive CD4⁺ T cells into the CNS is a critical step in the pathogenesis of EAE and MS (Dendrou et al., 2015). 14 days after EAE induction, cells isolated from the spinal cord and the draining lymph nodes were analyzed (Fig. 2, Fig. S4). We observed a significant reduction in the number of infiltrating CD4⁺ T cells in the spinal cord (Fig. 2A) of KI-cKO mice as compared to KI and cKO mice. The CD4 T cells that infiltrate the CNS in WT, KI, cKO and KI-cKO mice exhibit similar activation status as depicted by the expression of CD44, CD62L, CD69, CD25, KLRG1 and KI67 (Fig. 2B). To determine whether this reduction could be extended to encephalitogenic T-cells, we used MOG-specific tetramers to stain autoreactive CD4 T cells lymphocytes isolated from spinal cord. We showed that MOG-specific CD4⁺ T cells were significantly decreased in spinal cord (Fig. 2C) of KI-cKO mice as compared to KI and cKO mice. Interestingly, this was associated with an accumulation of MOG-specific CD4⁺ T cells in the draining lymph nodes (Fig. 2D). Upon *in vitro* restimulation of dLN with MOG₃₅₋₅₅, we showed that CD4 T cells differ by their production of effector cytokines analyzed by intracytoplasmic staining (Fig. 2E). Indeed, KI-cKO CD4 T cells produce significantly lower levels of IFN- γ associated with reduced expression of T-bet (Fig. S4) as compared to KI, cKO and WT mice. We did not detect any differences for TNF- α , IL-17 and GM-CSF (Fig. 2E). Together, these data show that the T cell-conditional deletion of *Themis1* combined with the natural variant of *Vav1* reduce EAE susceptibility by impacting infiltration of encephalitogenic CD4 T cells to the CNS and this was associated with an accumulation of MOG specific CD4 T cells in lymph node and their reduced ability to produce IFN- γ .

KI-cKO MOG-specific CD4⁺ T cells exhibit reduced effector functions during the priming

To investigate the mechanisms by which *Themis1* and *Vav1* modulate susceptibility to CNS inflammation, we tested whether T cell-conditional deletion of *Themis1* combined with the natural variant of *Vav1* could modulate the effector function of MOG-specific CD4⁺ T cells during the priming. Draining lymph node were collected on day 7 after MOG₃₅₋₅₅ immunization and CD4 T cells were analyzed for the expression of molecules involved in T cell activation and migration.

Étude de l'implication des facteurs génétiques Themis1 et Vav1 dans l'inflammation du système nerveux central

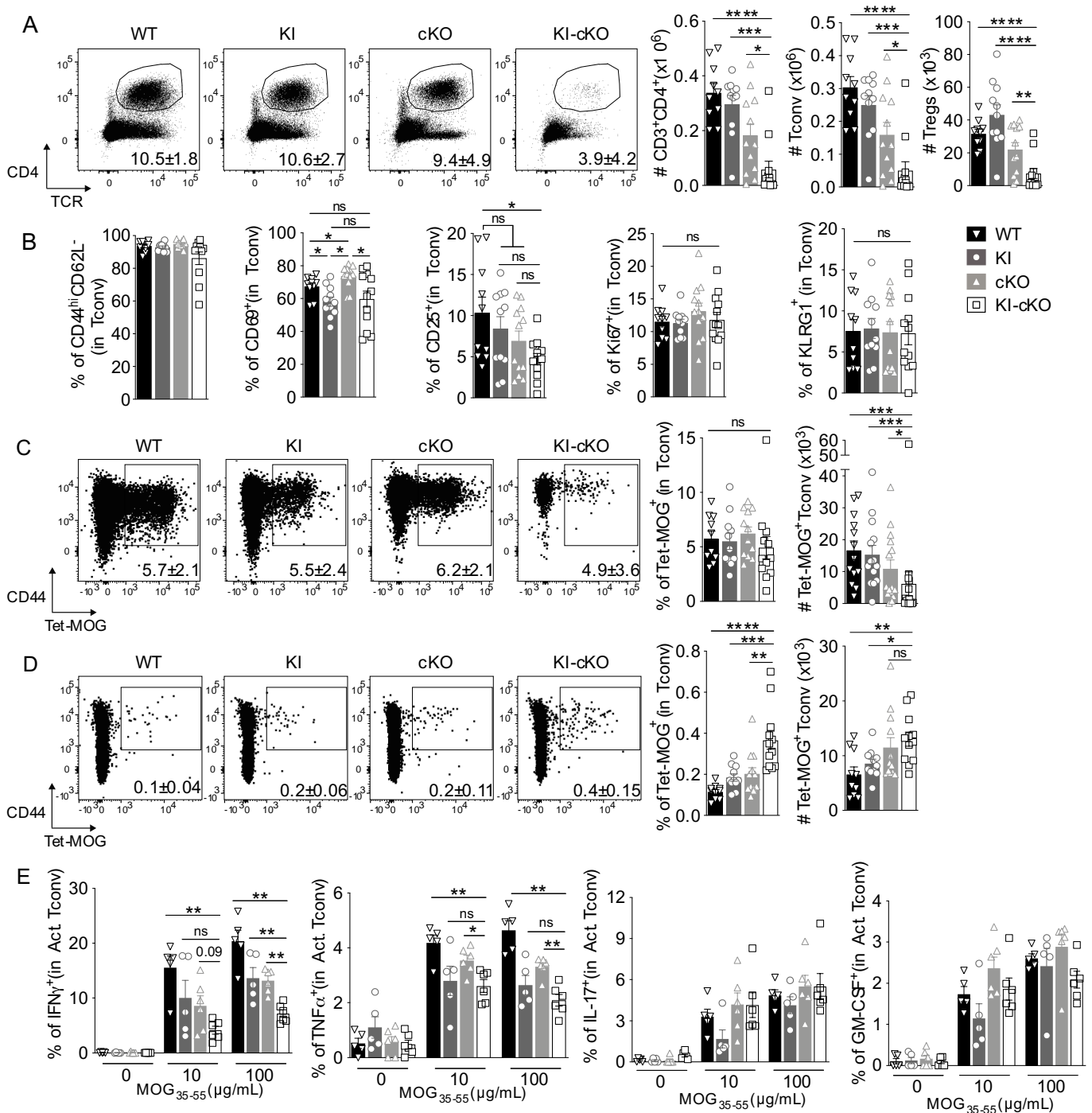


Figure 2. KI-cKO MOG-specific CD4 T cells do not infiltrate the CNS.

Spinal cord (A-C) and draining lymph nodes (D, E) were collected from WT, KI, cKO and KI-cKO mice 14 days after MOG₃₅₋₅₅ immunization. (A) Representative dot plot of TCR and CD4 expression in total cells from the four genotypes and histograms represent the absolute numbers of CD4 T cell subsets. (B) Expression of activation markers within Tconv. (C, D) Representative dot plot of MOG₃₅₋₅₅ tetramers staining of Tconv from the four genotypes and histograms represent the percentage and absolute numbers of Tet-MOG⁺ Tconv from the SpC (C) or dLN (D). (E) Cytokine production analyzed by ICS following MOG₃₅₋₅₅ restimulation of the dLN for 48h. Data are a pool of two independent experiment (A,D) or are representative of two independent experiments (E). Error bars represent SEM. Histograms are analyzed by Mann-Whitney (*<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

The results obtained did not reveal significant difference concerning the expression of CD69, CD25, KI67, CD49d, CCR5, CXCR3, CCR2 and CCR6 (Fig. 3A, Fig. S5). Contrary to the results obtained on day 14 post-immunization, we did not observe an increased frequency or absolute numbers of MOG-specific CD4⁺ T cells in KI-cKO mice as compared to KI or cKO mice (Fig. 3B), suggesting that those differences arise over time, possibly due to a migration defect of the MOG-specific KI-cKO T cells into the CNS. Upon *in vitro* stimulation with MOG₃₅₋₅₅ for 48 h, we showed that CD4 T cells from the four genotypes proliferate equally (Fig. S6) but differ by their production of effector cytokine analyzed in the supernatants (Fig. 3C) or by intracytoplasmic staining (Fig. 3D). Indeed, KI-cKO CD4 T cells produce significantly lower levels of IFN- γ , TNF- α , IL-17 and GM-CSF (Fig. 3C) as compared to KI, cKO and WT mice. In addition, intracytoplasmic staining after MOG₃₅₋₅₅-activation revealed a consistent reduction of the frequency of IFN- γ producing cells by KI-cKO CD4 T cells as compared to WT, KI, cKO CD4 T cells (Fig. 3D). There are also trends of reduction of TNF- α and IL-17 (Fig. 3D).

To analyze if the defect of T cell migration to the CNS in KI-cKO mice could be restored by WT CD4 T cells able to produce inflammatory mediators responsible for BBB alteration, we performed cotransfer experiments. We used WT CD4 T cells and KI-CKO CD4 T cells bearing CD45.1 and CD45.2 congenic marker respectively, and cotransferred them in RAG2-KO mice before immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide (Fig. 4A). At day 14 post immunization, we showed that KI-cKO CD4 T cells expand as WT CD4 T cells in draining LN (Fig. 4B). In addition, KI-cKO CD4 T cells migrate as efficiently as WT CD4 cells in spinal cord (Fig 4C) although they express low percentage of IFN- γ and GM-CSF (Fig. 4D) suggesting that this defect of cytokine production is intrinsic to the KI-cKO CD4 T cells. Taken together, these data demonstrate that the reduced susceptibility of KI-CKO mice to EAE is associated to altered inflammatory cytokine production and defect of migration of MOG-specific T cells from the periphery to the CNS, possibly due to defective capacity to disrupt the BBB.

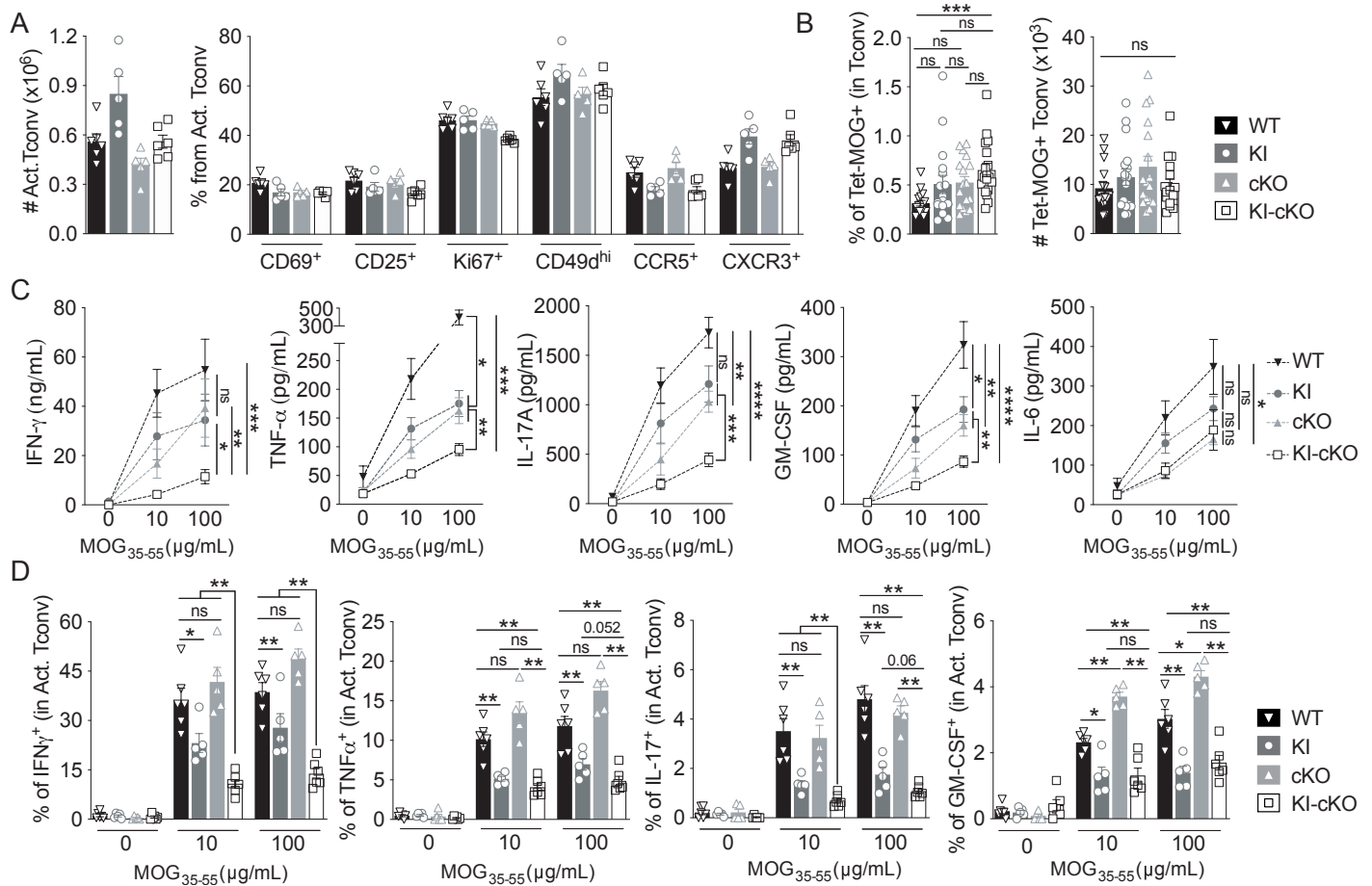


Figure 3. KI-cKO Tconv exhibit reduced effector functions during the priming

Draining lymph nodes from WT, KI, cKO and KI-cKO mice were analyzed at 7 days after MOG₃₅₋₅₅ immunization. (A) Absolute number of CD44⁺CD62L⁻ Tconv and their expression of activation, proliferation, and migration markers. (B) Percentage and absolute number of Tet-MOG⁺ Tconv. (C, D) Cytokine production was analyzed in the supernatant (C) or intracellularly by ICS (D) after restimulation of dLN with increasing doses of MOG₃₅₋₅₅ for 24h. (C) Supernatants were analyzed for cytokine production by ELISA (IFN- γ) or by CBA. (D) Cytokine production was analyzed by FACS, gated on CD44^{high} Tconv. Data are representative of two independent experiment (A, D) or are the pool of two independent experiment (B, C). ELISA and CBA are analyzed by two-way ANOVA. Error bars represent SEM. Histograms are analyzed by Mann-Whitney (*<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

Themis1-deficient CD4 T cells harboring the mutated *Vav1* exhibit a selective defect of TCR signals, which was not observed in CD4 T cells with a single mutation. These data suggest *Themis1* is required for *Vav1*^{R63W} variant to enhance TCR signaling events leading specifically to RelA activation, indicating that *Themis1* and *Vav1* act in a cooperative manner to generate optimal TCR signals.

Discussion

NGS analysis has revealed that a proportion of individuals might carry mutations in one or more genes controlling susceptibility to inflammatory diseases (Avidan et al., 2014). This observation prompted the hypothesis whereby the additive effects of genetic variants encoding proteins belonging to the same pathway and controlling susceptibility to CNS inflammation may impact disease severity. To test this hypothesis, we analyzed EAE susceptibility upon MOG₃₅₋₅₅ immunization in mice harboring mutations both in *Themis1* and *Vav1*, two signaling molecules belonging to the same signaling pathways.

We compared *Themis1* deficient mice harboring the *Vav1*^{R63W} variant (KI-cKO) and mice harboring a single mutation (KI and cKO). The cumulative introduction of single mutations in these signaling molecules reduced the severity of clinical and biological EAE features following immunization. Indeed, when taken separately, both mutations triggered a mild reduction of EAE severity, whereas this reduction was much stronger when both genes were mutated simultaneously. Functional studies revealed that this effect resulted from decreased production of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-17, TNF- α and GM-CSF), together with reduced T cell infiltration in the CNS and selective defect of the phosphorylation of the NF- κ B member, RelA. These data suggest that *Themis1* positively regulate TCR signaling pathways leading to RelA activation, indicating that *Themis1* and *Vav1*^{R63W} cooperatively generate optimal TCR signal transduction. Our study shows that *Themis1* deficiency associated with *Vav1*^{R63W} variant significantly reduced the ability of CD4 T cells to differentiate into encephalitogenic CD4 T cells producing IFN- γ , IL-17, TNF- α , and GM-CSF. This is particularly relevant as several studies have established that those cytokines are the main effector cytokines in the pathophysiology of both EAE and multiple sclerosis (Becher et al., 2016; Codarri et al., 2011; Goverman, 2009; Korn et al., 2009; Ottum et al., 2015). The reduced EAE severity in KI-cKO mice results from a defect of MOG-specific T cell infiltration into the CNS associated with their accumulation in draining lymph nodes.

Étude de l'implication des facteurs génétiques *Themis1* et *Vav1* dans
l'inflammation du système nerveux central

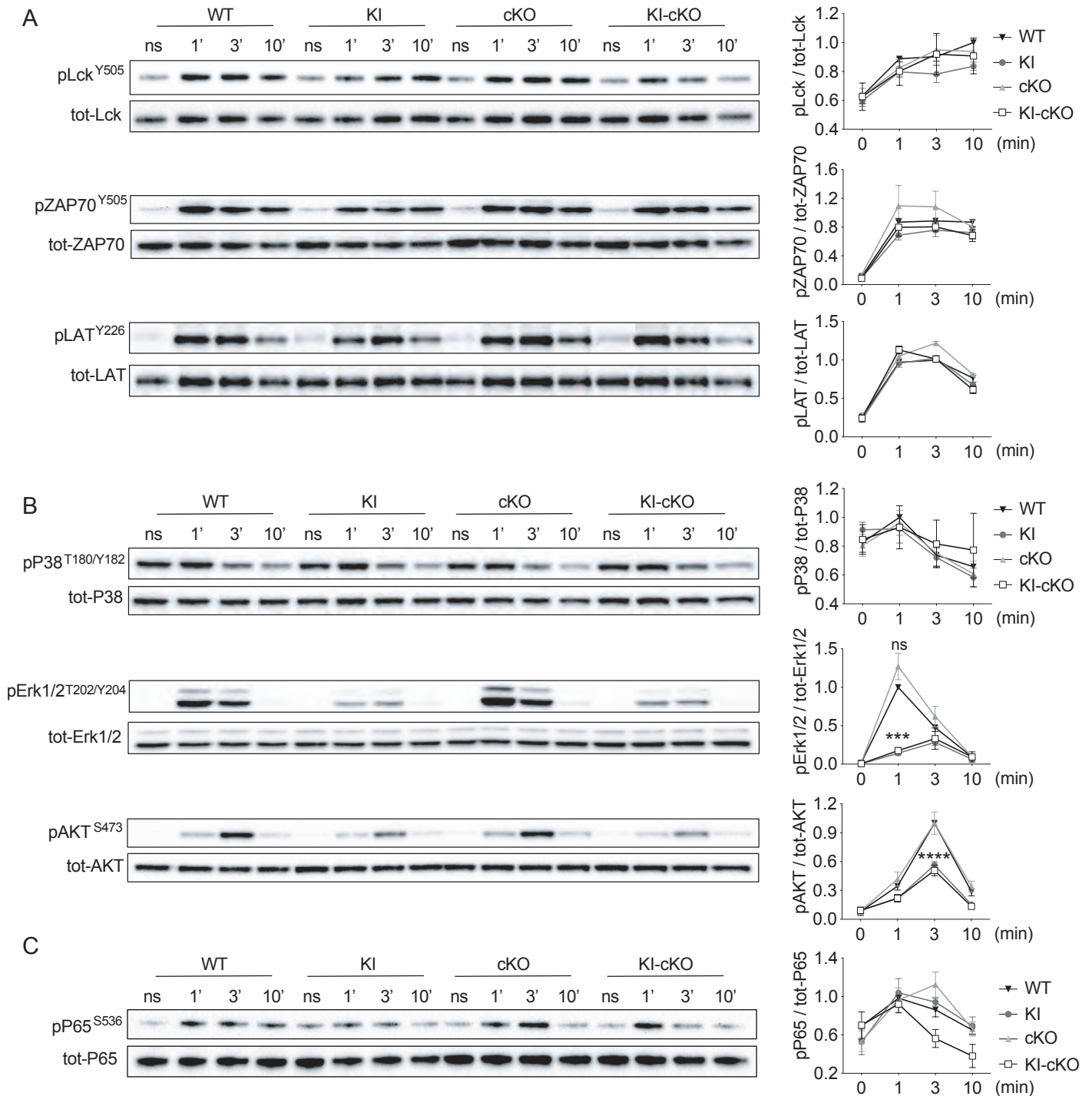


Figure 5. *Themis1* deletion in *Vav1*^{R63W} CD4 T cells induces a selective signaling defect

CD4 T cells were enriched from a pool of lymph nodes and spleen from naive mice of the four genotypes, and stimulated for the indicated time with pre-formed anti-CD3/anti-CD4 antibodies complexes. Phosphorylation of diverse signaling protein was assessed by western blot and normalized by the total amount of the protein. (A) Analysis of proximal signaling proteins. (B) Analysis of distal signaling proteins. (C) Analysis of NF- κ B canonical component RelA (P65). Results represent a pool of 4 to 5 independent experiments. Error bars represent SEM. Data are analyzed by two-way ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

This could be related to their inability to produce inflammatory cytokines that form an inflammatory milieu responsible for damages of the endothelium or glia limitans that enable immune cells to transmigrate across the BBB into the CNS (Engelhardt et al., 2017; McFarland & Martin, 2007; Wagner et al., 2020). In agreement, by using mixed adoptive transfer experiments, we showed that the defect in T cell migration of KI-cKO CD4 T cells could be restored in the presence of proinflammatory cytokine milieu produced by WT CD4 T cells, indicating that KI-cKO Tconv do not exhibit a general intrinsic incapacity to migrate to the CNS. In these experimental context, KI-cKO CD4 T cells still produce low levels of inflammatory cytokine IFN- γ indicating that the defect of cytokine expression was intrinsic to effector KI-cKO CD4 T cells. These data highlight the importance of *Themis1* and *Vav1* in CNS inflammation by controlling directly the production of inflammatory cytokines by effector CD4 T cells that favor their migration into the CNS. In this regard, several studies showed that the prototypic inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-17 impact BBB permeability (Huppert et al., 2010; Kebir et al., 2007; Sonar et al., 2017; Sonar & Lal, 2018) and play an important role for the recruitment of inflammatory myeloid cells to the CNS and the activation of resident cells (Ding et al., 2015; Ottum et al., 2015; Song et al., 2015; Stoolman et al., 2014).

The differentiation of naïve CD4 T cells into functionally polarized T helper cell subsets depends notably on the strength of TCR-dependent signaling pathways upon antigen recognition (Yamane & Paul, 2013). In general, stronger TCR signaling leads to sustained Erk activation and favors Th1/Th17 differentiation (Jorritsma et al., 2003; Yamane et al., 2005; Yamane & Paul, 2013). In lines with our previous studies, we showed that *Vav1*^{R63W} led to a reduction of TCR signaling as revealed by a specific decrease of Erk and Akt activities. Of note, the association of *Themis1* deficiency with *Vav1*^{R63W} did not modify the phosphorylation defect of Erk or Akt observed in KI CD4 T cells but specifically decreased RelA phosphorylation. These data are in agreement with the well-known role of these molecules in EAE and CD4 T cells differentiation. Indeed, it was shown that Erk inhibitors could attenuate EAE by suppressing autoantigen-specific Th17 and Th1 responses (Brereton et al., 2009). Moreover, the genetic ablation of Erk2 impedes Th1 differentiation while enhancing the development of Foxp3⁺-induced Treg (C.-F. Chang et al., 2012). Concerning RelA, it has been shown that this transcription factor favors Th1 differentiation (Balasubramani, Shibata, et al., 2010; Oh & Ghosh, 2013) through its binding to IFN- γ locus that depends on TCR signaling and IL-12 induced Stat4 and T-bet activation (Balasubramani, Shibata, et al., 2010). RelA is also involved

in IL-17 production by activating the *Rorg* gene that is required for initiating Th17 differentiation (Ruan et al., 2011).

The investigation of the modulatory effect of *Themis1* on TCR signaling has been particularly challenging and has led to equivocal results (Brockmeyer et al., 2011; Fu et al., 2013; Lesourne et al., 2009, 2012). It was first proposed that *Themis1* could act as an attenuator of TCR signaling, by preventing the transmission of strong signaling responses induced by low affinity thymic self-antigen that would trigger inappropriate signals leading to negative selection (Fu et al., 2013). Contrasting with this interpretation, recent studies showed that *Themis1* enhances TCR signaling in thymocytes (Choi, Warzecha, et al., 2017) and cytokine-induced maintenance of peripheral CD8⁺ T cells (Brzostek et al., 2020) by blocking the catalytic activity of the inhibitory phosphatase SHP-1, which dephosphorylates and inactivates several key proximal effector proteins, including *Vav1* (Lorenz, 2009; J. Zhang et al., 2000). Our present study is consistent with a model wherein *Themis1* acts as an enhancer rather than an attenuator of TCR signaling in effector CD4 T cells. Indeed, the combination of *Themis1* deficiency with the *Vav1*^{R63W} variant strongly impairs TCR signaling as revealed by the reduced phosphorylation RelA. Of note, *Themis1* deficiency leads to decreased phosphorylation of RelA together with impaired effector function of T cells only in the *Vav1*^{R63W} background, but not in the WT background, suggesting *Themis1* is needed to reach the signaling threshold required for T effector functions responses when *Vav1* expression is low. However, it remains unclear why this effect seems to be restricted to the mutated form of *Vav1* in CD4 T cells given that *Themis1* also enhances the phosphorylation of the wild-type form of *Vav1* in thymocytes (Zvezdova et al., 2016). The expression level of *Themis1* is lower in peripheral CD4 T cells than in DP thymocytes (Duguet et al., 2017) and we could speculate that this difference of expression could translate into a milder effect of *Themis1* on *Vav1* phosphorylation in peripheral CD4 T cells when “normal” level of *Vav1* is expressed. The induction of *Vav1* phosphorylation might be more significantly impacted by *Themis1* deficiency in *Vav1*^{R63W} CD4 T cells due to the reduced expression level of *Vav1* in those cells (Colacios et al., 2011; Kassem et al., 2016) which might readjust the ratio *Themis1*/*Vav1* in favor of *Themis1*. Alternatively, *Themis1* through SHP-1 inhibition might also act on *Vav1* downstream signaling proteins such as PLC- γ which activation is enhanced by *Vav1* (Costello et al., 1999) and have been shown to be dephosphorylated by SHP-1 (Matalon et al., 2016). Thus, decreased *Vav1*-dependant pathways due to *Vav1* variant would be more susceptible to SHP-1 inhibition in the absence of *Themis1*.

The decreased phosphorylation of RelA in KI-cKO mice is in agreement with several other publications showing that Vav1 operates upstream of the NF- κ B pathway and that Vav1 contributes to enhance RelA activity in T cells (Costello et al., 1999; Marinari et al., 2002; Tybulewicz, 2005). In addition, we previously established that Themis1 selectively enhances Vav1 activity in thymocytes. Collectively, we inferred from those data that Themis1 operates through Vav1 or downstream Vav1-dependant pathways to positively regulate RelA activity. However, we could not exclude that Themis1 might also operate on additional proteins which may contribute to enhance RelA activity together with Vav1. We believe that this is unlikely for three reasons. First, we did not detect any significant effect of Themis1 deficiency on RelA phosphorylation in the context of the Vav1 WT isoform, suggesting that Themis1 does not enhance RelA activity independently of Vav1 effector function. Second, we previously used mass spectrometry to characterize Themis1 interactome in T cells and identified Vav1 as one of Themis1 preferential-binding proteins among 11 interactors (Zvezdova et al., 2016). Third, although the other interactors were relatively well characterized, Vav1 was the only effector protein which has reported positive effect on the NF- κ B pathway (Costello et al., 1999).

Antigen recognition and T cell activation by the TCR is one of the most well-defined pathways of the immune system, having been dissected in mice and humans with loss of-function alleles in many of the critical components. It is however not known how inherited defects in TCR signaling translate into immunopathology in some instances but not others. Our study offers a possible explanation, by highlighting the importance to associate polymorphisms observed in different signaling molecules belonging to the same hub instead of focusing on individual molecules. Indeed, we show that the disruption of both Vav1 and Themis1 signaling affects effector T cell functions while the disruption of one single molecule has only a moderate effect. Since effector T cells play a crucial role in maintaining immune system homeostasis, the Themis1/Vav1 signaling hub could thus represent a checkpoint control for effector T cell functions and play an important role in controlling immune responses against self-antigen, cancer and infectious diseases. We believe that this might be physiologically relevant since Vav1 risk allele is associated with increased mRNA expression levels in PBMCs from healthy donors and multiple sclerosis patients, which is positively correlated to IFN- γ and TNF- α expression (Jagodovic et al., 2009), while SHP-1 expression is on the contrary downregulated in PBMC of MS patient (Kumagai et al., 2012).

Materials and Methods

Mice

Germ-line *Themis1*^{-/-} deficient mice (*Themis1*^{-/-}) {Lesourne, 2009 #633} were generated by Dr. Paul E. Love (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The *Vav1*^{R63W} knock-in (KI) mice (international strain designation C57BL/6-*Vav1*tm2Mal) were generated in collaboration with Dr B. Malissen {Kassem, 2016 #681}. *Themis1*-T^{-/-} conditional knock-out mice (cKO) were generated in collaboration with Dr P. Love (Yang et al., 2022). The *Vav1*^{R63W} mice were crossed with *Themis1*-T^{-/-} mice to generate *Vav1*^{R63W}*Themis1*-T^{-/-} mice (KI-cKO). *Themis1*^{loxp/loxp} mice were also bred with CD4CreERT2 mice, which contain tamoxifen-inducible Cre under the control of the *Cd4* promoter (<https://www.jax.org/strain/022356>). *Rag2*^{-/-} mice were provided by the INSERM animal facility (US-006). All experiments were conducted with sex- and age-matched mice between 8 and 12 weeks old housed under specific pathogen-free conditions at the INSERM animal facility (US-006; accreditation number A-31 55508 delivered by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice). All experimental protocols were approved by a Ministry-approved ethics committee (CEEA-122) and follow the French and European regulations on the care and protection of Laboratory Animals (EC Directive 2010/63).

Experimental auto-immune encephalomyelitis induction and clinical investigation

The MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) peptide was purchased from COVALAB with a purity grade >95%. 8-12 weeks old mice were immunized subcutaneously at the base of the tail with 200µL of an emulsion of 0,5mg/mL of MOG₃₅₋₅₅ peptide in CFA containing 0,5mg/mL of Mycobacterium tuberculosis (Strain H37, Difco Franklin Lakes NJ). Mice were injected intravenously with 200 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA.) at days 0 and 2 post-immunization. Clinical scores were recorded daily as follow: 0, no signs of disease; 1, loss of tone in the tail; 2, hind limb paresis; 3, hind limb paralysis; 4, tetraplegia; 5, moribund.

For Treg depletion experiment, mice were treated with 500µg of PC61 antibody i.p. and immunized 7 days later with the protocol mentioned above. For co-transfer experiment, CD4⁺CD25⁻ T cells were enriched from LN and spleen of the indicated mice using the Dynabeads negative selection kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with the addition of a PC61 antibody. A total of 40.10⁶ CD4⁺CD25⁻ T cells were injected i.v. in RAG2-KO mice which were immunized the same day with the protocol mentioned above. For EAE induction in CD4creERT2 mice, each mouse received 5 mg of tamoxifen by oral gavage for 3

days, and were then immunized 12 to 14 days later. Tamoxifen was dissolved in 10% ethanol and 90% Miglyol-812 (Caelo). The emulsion concentration was increased to 1mg/mL of MOG₃₅₋₅₅ peptide and 2mg/mL of CFA, and PTX quantity remained 200ng per injections.

Antibodies for flow cytometry

The monoclonal antibodies (mAbs) used for flow cytometry were as follows: anti-TCR $\alpha\beta$ (H57-597), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD8 α (53-6.7), anti-CD44 (IM7), anti-CD25 (PC61), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CCR2 (SA203G11), anti-CCR5 (HM-CCR5), anti-CCR6 (29-2L17), anti-CXCR3 (CXCR3-173), anti-CD11a (M17-4), anti-CD49d (R1-2), anti-KLRG1 (2F1/KLRG1) anti-Foxp3 (FJK-165), anti-Ki67 (B56) anti-IL-17A (TC11-18H10.1), anti-TNF- α (MP6-XT-22), anti-GM-CSF (MP1-22E9), anti-IFN- γ (XMG1.2) and anti-T-bet (4B10). The fluorescently conjugated antibodies were purchased from e-Biosciences, BD Biosciences, and Biolegend

Isolation and functional characterization of mononuclear cells

Mice were anesthetized with Ketamine and perfused with cold PBS. Brain and spinal cord were collected separately, homogenized and digested with collagenase D (2.5 mg/ml, Roche Diagnostics), Dnase I (10 μ g/ml) and TLCK (1 μ g/ml, Roche, Basel, Switzerland) for 30 to 60 min at 37 °C. Digestion was stopped by adding cold media and by putting the tubes on ice. Cells were then filtered through a 70 μ m cell strainer. After sedimentation, supernatant was collected, resuspended in 30% Percoll and centrifuged for 30min at 1590g to allow separation of cells and myelin fat. The pellet was then washed and resuspended in culture medium. Isolated cells were counted using a cell counter (Beckman Coulter) and then restimulated overnight with MOG₃₅₋₅₅ peptide (100 μ g/mL) at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere or directly stained in order to analyze the presence of different cell populations by flow cytometry. Similarly, cells from the dLN cells were stained directly or stimulated with different concentrations of MOG₃₅₋₅₅ (0, 10 and 100 μ g) for 24 or 48 hours to investigate the cytokine expression using intracytoplasmic staining. For intracellular cytokine staining, cells were treated with monensin (Golgiplug 1 μ g/ml, BD Biosciences) for 4h after the MOG restimulation. After staining of surface markers (TCR, CD4 and CD44), cells were fixed and permeabilized with Cytotfix/Cytoperm and Perm/Wash buffer (e-Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Cells were then incubated with antibodies recognizing cytokines for 20 min and washed with Perm/Wash buffer before analysis. For tetramer staining, cells from the brain, spinal cord and LNs were incubated for 1.5 hours at room temperature with I-Ab MOG₃₅₋₅₅

tetramer (PE or BV421-coupled, NIH), and then stained for surface markers by flow cytometry analysis. Data were collected on an LSR-Fortessa, a FortessaX20 or a Symphony A5 flow cytometers (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (TreeStar).

The supernatants were assayed for cytokines production by CBA (IL-17, TNF- α , GM-CSF, IL-6, IL-1b, IL-10, IL-27) (Biolegend, LEGENDplex) or by ELISA for IFN- γ . 96 well plates were coated for 2 h at 37°C with anti-IFN- γ in carbonate buffer 0.05 MpH 9.6. Culture supernatants or standards were incubated 2 h at 37°C. The plates were then incubated for 1h30 min with a secondary biotinylated antibody specific for each IFN- γ , followed by 40 min incubation with streptavidin-phosphatase alkaline at 37°C. Finally, plates were revealed by phosphatase alkaline substrate and absorbance was measured at 450/540 nm.

Western blotting

Purified total CD4 T cells (8 million) were stimulated for the indicated time in RPMI with pre-formed complex of biotin anti-CD3 (30 μ g/mL) and biotin anti-CD4 antibodies (30 μ g/mL), linked with streptavidin (15 μ g/mL). The stimulation was stopped by adding cold media and the cells were then immediately centrifuged, resuspended in ice-cold lysis buffer [10 mM tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton, 2 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail tablet (Roche)] and incubated for 15-30 min on ice. Total lysates were cleared by centrifugation at 13,000g for 15 min at 4°C and harvested and SDS containing loading buffer (NuPAGE 4X) was added to the lysate. Samples were heated for 10min at 70°C to allow denaturation of the proteins, resolved on SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in 5% bovine serum albumin or non-fat dry milk in TBS, 0.1% Tween-20 for 1 hour at room temperature before overnight incubation at 4°C with the primary antibodies: anti-pVav1-Y174 (ab75225), anti-pLck-Y505 (2751s), anti-pZAP70-Y319 (2717s), anti-pLAT-Y226 (558363), anti-pP38-T180/Y182 (4511s), anti-pErk1/2-T202/Y204 (4370s), anti-pAkt-S473 (4060s), and anti-pP65-S536 (3033s). The membranes were then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour at room temperature. After washing, the membranes were incubated with enhanced chemiluminescence ECL substrate (Amersham), and luminescence was captured with a Bio-Rad XRS+ imager. Images were analyzed, and band intensities were quantitated with Bio-Rad ImageLab software. After revelation of phospho-proteins, membranes were washed in H₂O, stripped with Restore buffer (Thermofisher Scientific) for 15min, washed and re-blocked for 1h. Membrane were then incubated overnight with the primary antibodies directed against total proteins: anti-Vav1 (sc7206), anti-Lck (sc13), anti-ZAP70 (3165s), anti-LAT (mp05), anti-P38 (9218s), anti-

Erk1/2 (9107s), anti-Akt (9272s), and anti-P65 (8242s), and followed the protocol as described above. Antibodies were purchased from Abcam, Cell Signaling Technology, BD Biosciences or Millipore.

Data analysis

Data are presented as means \pm SEM. The GraphPad InStat statistical package was used for statistical analyses (GraphPad Software, Inc.). Results were compared by Mann-Whitney and repeat measures two-way ANOVA with Bonferroni post-test analysis. Results were considered statistically significant when $P < 0.05$ and are indicated in the figures as follows: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Acknowledgements:

We sincerely thank Anne Astier, Daniel Dunia, Loic Dupré and Roland Liblau for their helpful discussions and suggestions. We acknowledge the technical assistance provided by the personnel of Inserm US006 Anexplo/creffre animal facility. Flow cytometry experiments have been done at the Infinity-INSERM core facility connected to 'Toulouse Réseau Imagerie' network. We thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi, Valérie Duplan and Anne-Laure Iscache for technical assistance and for cell sorting.

Funding:

This work was supported by INSERM, ARSEP, ARC and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE15-0005-01). AS is supported by Centre National de la Recherche Scientifique and MB by the Région Occitanie.

Author Contributions:

A.S. R.M., and R.L. conceived the project; P.L. generated the animal models, R.M., I.B., E. J., A.D., R.L. and A.S. designed, performed the research and analyzed and interpreted the data; R.M., and A.S. prepared the figures and wrote the manuscript.

Reference

See at the end of the manuscript

Supplementary Materials

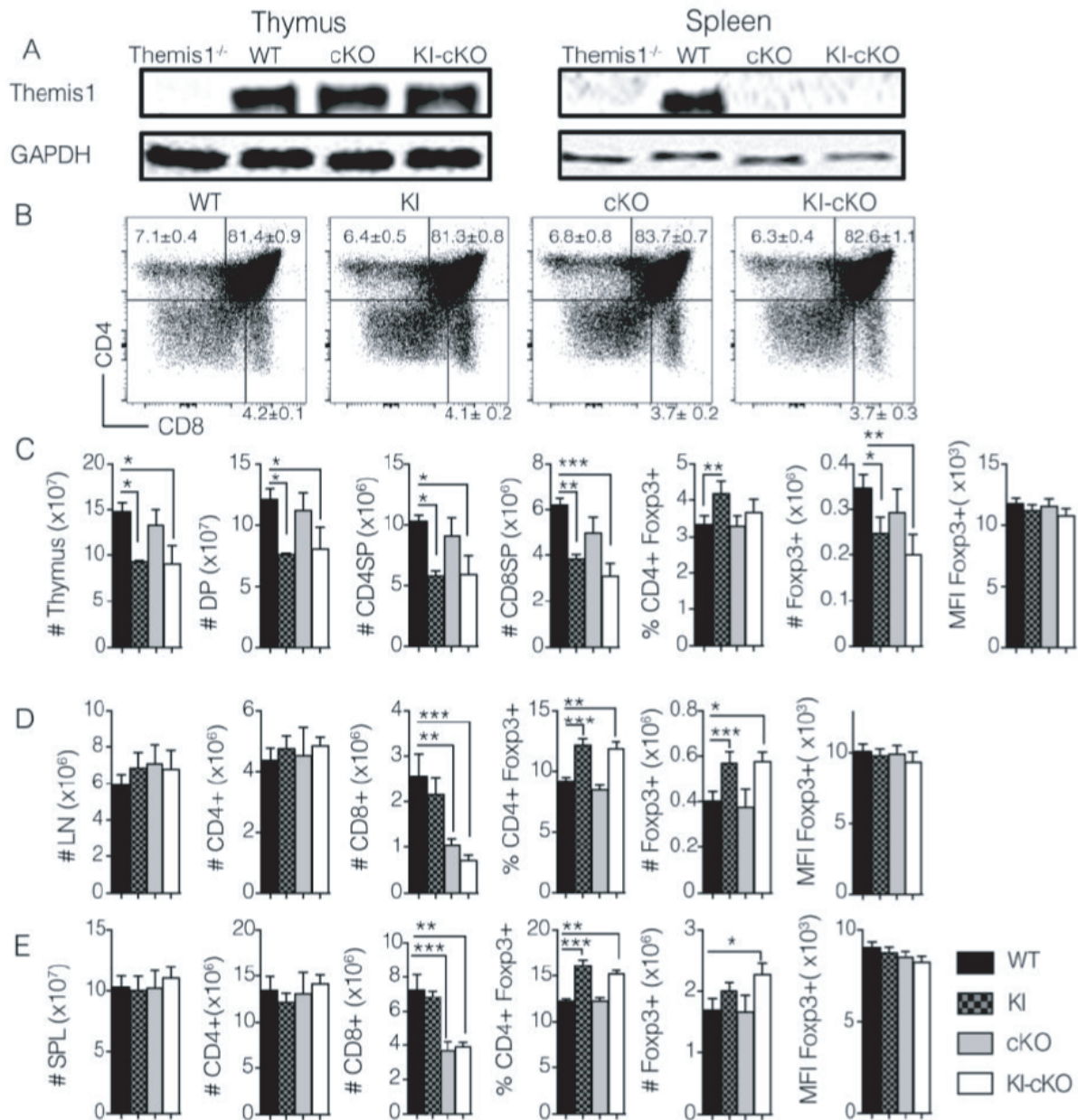


Fig. S1. KI-cKO mice exhibit normal T cell development and are not lymphopenic

Analysis of the thymus, spleen and lymph nodes of 6 weeks old WT, KI, cKO and KI-cKO mice. (A) Total thymocytes (left) or splenocytes (right) were lysed and analyzed by western blot for expression of Themis1. (B) Representative dot plot of CD4 and CD8 expression gated on total thymocytes. (C-D) Graph represent the absolute numbers and frequency of the indicated populations from the thymus (C), the lymph nodes (D) and the spleen (E). Error bars represent SEM. Histograms are analyzed by Mann-Whitney (*<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

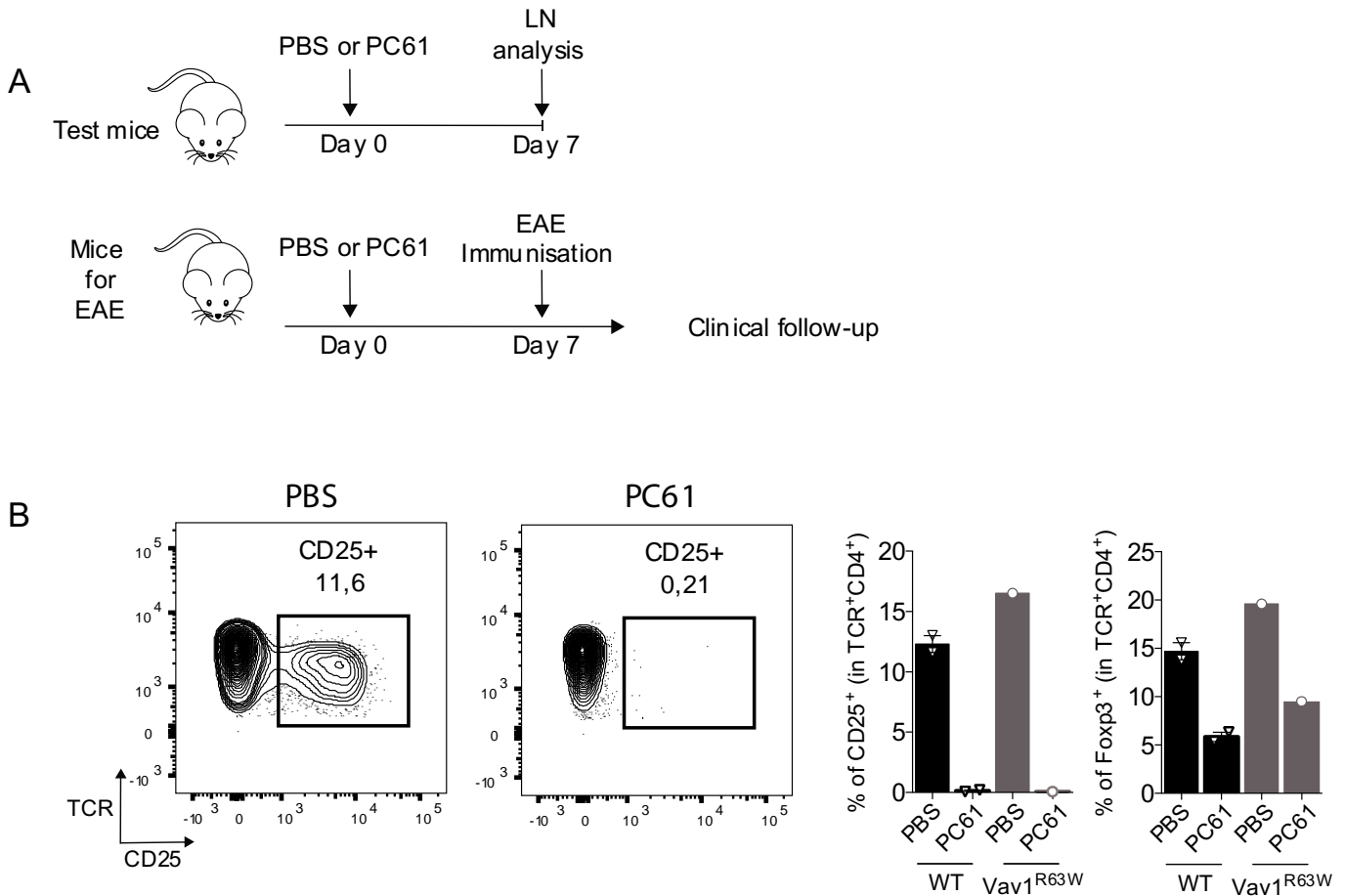


Fig. S2. PC61 treatment totally deplete CD25⁺ Treg from the dLN

WT and KI mice were injected with PBS or PC61 antibody to test the depletion efficiency within lymph nodes 7 days after injection. (A) Scheme of the experimental set-up of the depletion test and the depletion prior immunization. (B) Representative dot plot of TCR and CD25 expression within CD4 T cells of WT mice from the indicated group, and quantification of CD25⁺ cells and Foxp3⁺ cells among CD4 T cells. Error bars represent SEM.

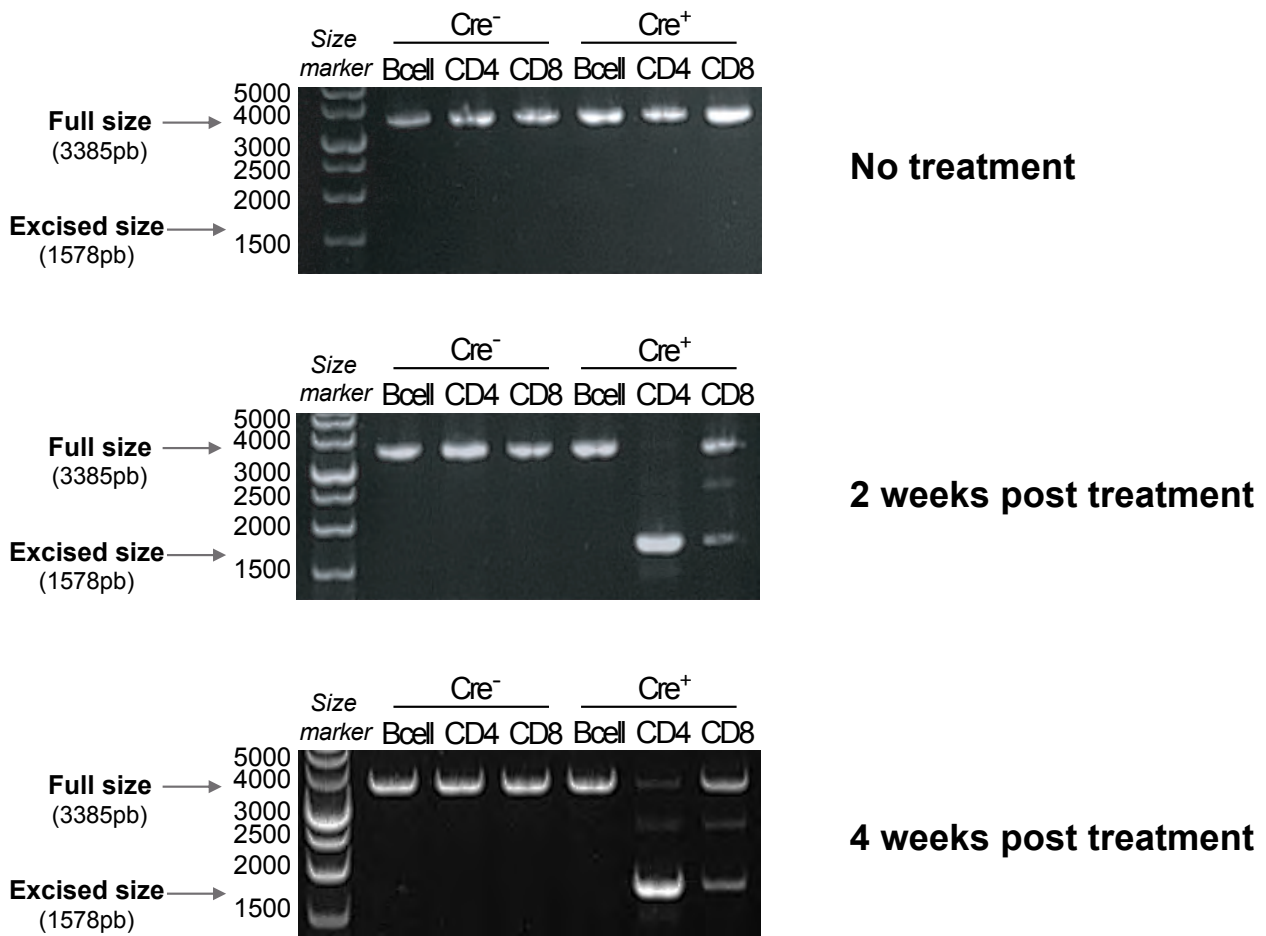


Fig. S3. Specific deletion of Themis1 in CD4 T cells following tamoxifen administration

Different immune populations were sorted from WT and cKO^{ERT2} mice before (top) or after (middle and bottom) treatment with tamoxifen by oral gavage. DNA was then extracted from the indicated population and subjected to PCR using primer pair framing the two loxp site within Themis1 gene. 3,4kpb PCR product correspond to WT unexcised Themis1 genes. 1,6kpb PCR product correspond to Exon4-excised Themis1 genes.

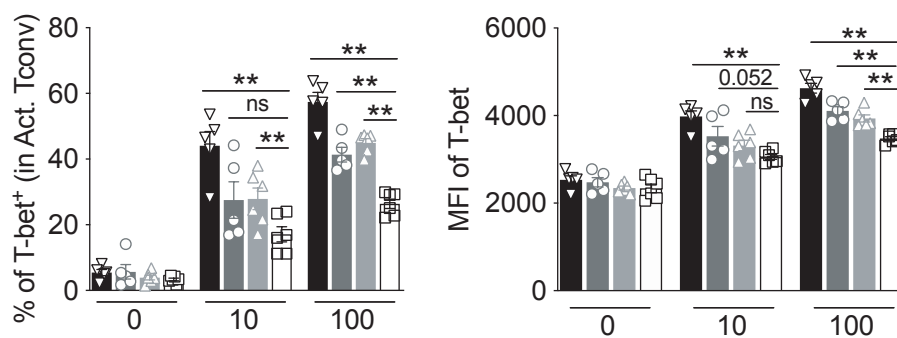


Fig. S4. Reduced T-bet expression by conventional T cells at day 14 of EAE

Draining lymph nodes were harvested from WT, KI, cKO and KI-cKO mice 14 days after MOG₃₅₋₅₅ immunization. Analysis of T-bet within activated CD44⁺ CD62L⁻ Tconv by FACS following MOG₃₅₋₅₅ restimulation of the dLN for 48h. Error bars represent SEM. Histograms are analyzed by Mann-Whitney (**p<0.01)

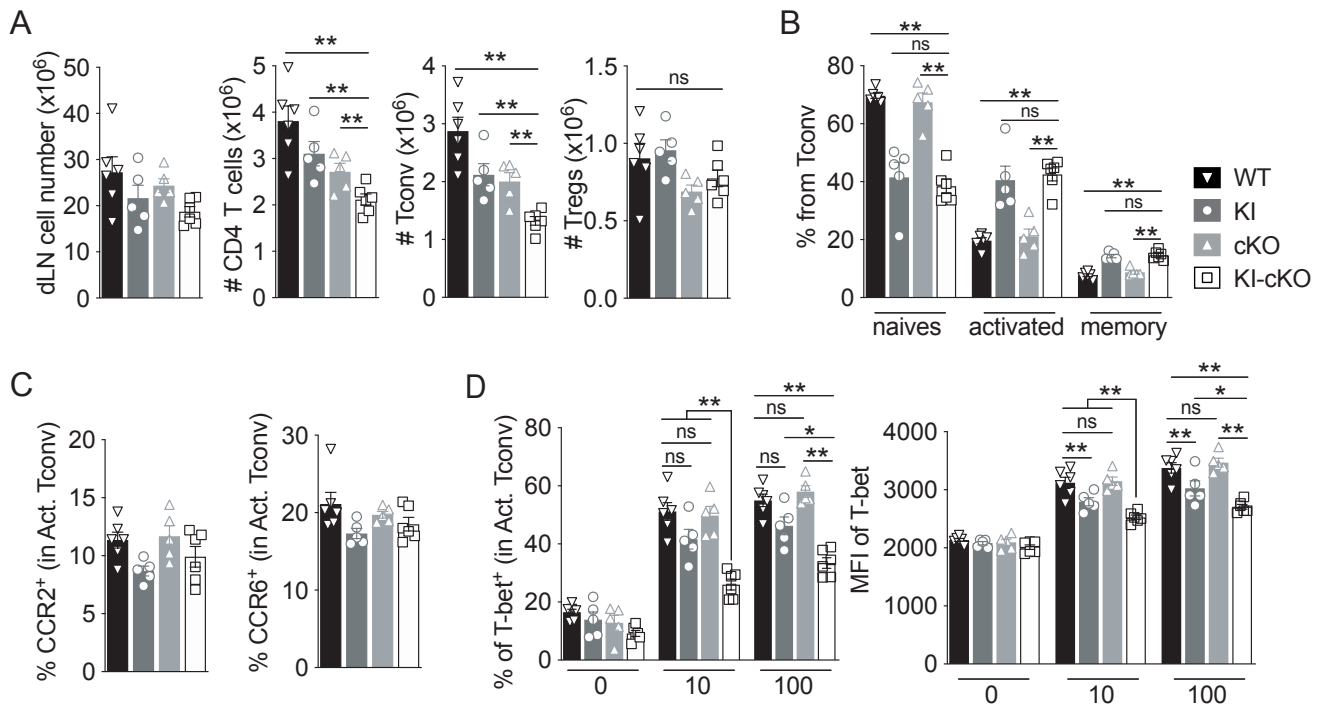


Fig. S5. Characterization of Tconv activation during the priming phase

Draining lymph nodes were analyzed from WT, KI, cKO and KI-cKO mice 7 days after MOG₃₅₋₅₅ immunization. (A) Absolute number of the indicated population (B) Percentage of naive, activated and memory cells within Tconv, based on CD44 and CD62L expression. (C) Expression of chemokine receptor by activated Tconv. (D) Analysis of T-bet within activated CD44⁺ CD62L⁻ Tconv by FACS following MOG₃₅₋₅₅ restimulation of the dLN for 48h. Data are representative of three independent experiments. Error bars represent SEM. Histograms are analyzed by Mann-Whitney (*<0.05, **p<0.01).

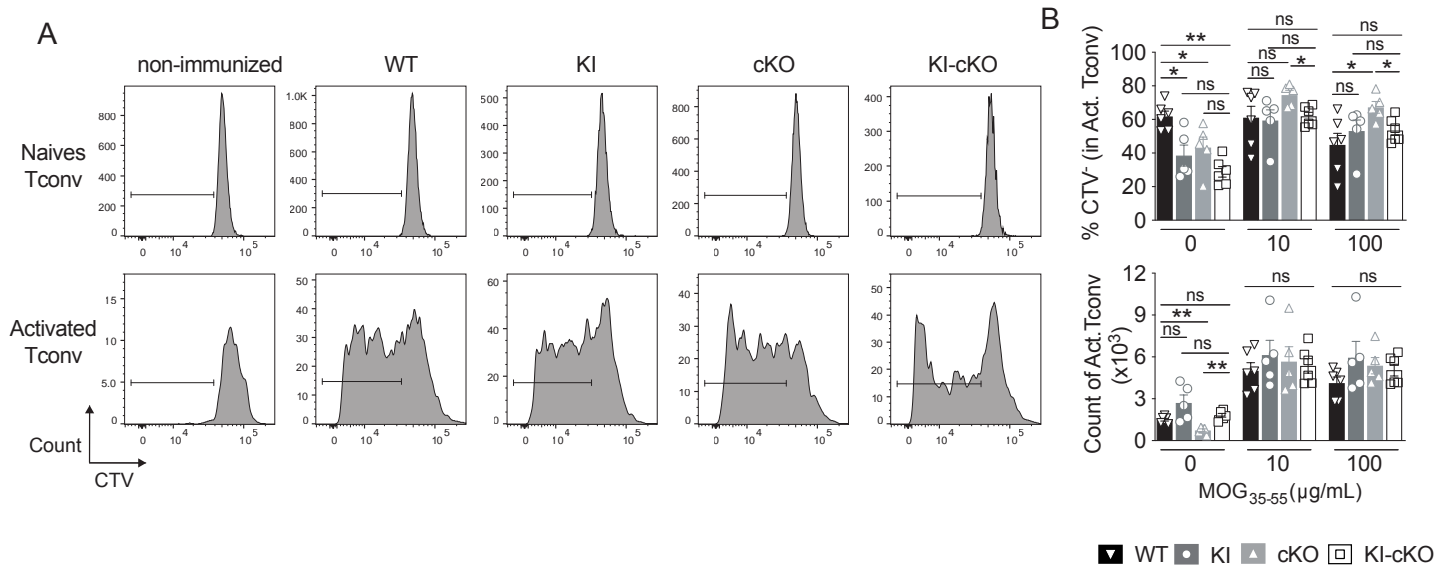


Fig. S6. KI-cKO Tconv proliferate normally following MOG₃₅₋₅₅ restimulation

Draining lymph nodes were harvested from WT, KI, cKO and KI-cKO mice 7 days after MOG₃₅₋₅₅ immunization. Total dLN were stained with CTV for 10min at 37°C prior to restimulation for 48h with increasing doses of MOG₃₅₋₅₅. (A) Representative dot plot of CTV dilution within naive (top) or activated (bottom) Tconv, 48h after MOG₃₅₋₅₅ restimulation. (B) Quantification of CTV⁻ cells within activated Tconv (top) and absolute number of activated Tconv recovered from each well at the end of the cell culture. Error bars represent SEM. Histograms are analyzed by Mann-Whitney (*<0.05, **p<0.01).

Discussion – Vav1 & Themis1

La sclérose en plaques est une maladie résultant de l'activation incontrôlée du système immunitaire, et notamment de la réponse T. L'étude des mécanismes régissant l'activation et la fonction des LT en conditions inflammatoires est ainsi primordiale pour la compréhension de la physiopathologie de cette maladie. Des résultats antérieurs de mon équipe d'accueil montrent que la protéine de signalisation Vav1 est impliquée dans la sévérité de l'EAE, au travers de son rôle dans la fonction des Tconv (Kassem et al., 2016). D'autres travaux ont montré que Vav1 interagit directement avec Themis1, qui contrôle positivement sa fonction (Zvezdova et al., 2016). Finalement, des analyses d'associations génétiques indiquent que les gènes Vav1 et Themis1 sont impliqués dans la susceptibilité à développer la SEP chez l'Homme (Jagodic et al., 2009 ; Sawcer et al., 2011). Ainsi, l'objectif de mes travaux de thèse était d'évaluer l'implication directe de Themis1 dans la susceptibilité à l'EAE et d'en comprendre les mécanismes impliqués, mais aussi d'étudier le rôle du complexe de signalisation Themis1-Vav1, afin de déterminer si leur coopération pouvait avoir des conséquences physiopathologiques. Au cours de ma thèse, j'ai montré que les protéines de signalisation Vav1 et Themis1 sont toutes deux impliquées séparément dans la sévérité de l'EAE, et que leur coopération est nécessaire à la mise en place de l'inflammation du SNC.

Analyse de la contribution des Treg et des LT CD8 dans la réduction de la sévérité de l'EAE chez les souris mutées pour Vav1 et Themis1.

Lors de ma thèse, j'ai montré que les souris Vav1^{R63W}-Themis1-cKO (KI-cKO) développent une EAE nettement moins sévère que les souris mutées pour un seul de ces deux gènes (KI, cKO), ayant elles-mêmes une EAE plus faible que les souris sauvages (WT), confirmant ainsi l'implication de ces deux gènes dans la physiopathologie de l'EAE. Du fait de la présence de ces mutations dans les LT CD4 conventionnels et régulateurs, nous avons cherché à discriminer l'implication de ces deux populations, d'autant plus que le pourcentage de Treg est plus important chez les souris KI et KI-cKO et que ces cellules sont connues pour avoir un rôle protecteur durant l'EAE (Duffy et al., 2019 ; Dong et Yong, 2019). Aucun marqueur n'est connu à ce jour comme étant exprimé spécifiquement par les Treg et étant accessible à un anticorps déplétant. J'ai donc utilisé un anticorps dirigé contre la protéine CD25, étant exprimée par ~80% des Treg, et j'ai ainsi montré que la déplétion des Tregs CD25⁺ avant l'EAE

n'impactait pas les différences entre les 4 génotypes (WT, KI, cKO et KI-cKO). Bien que 100% des cellules CD25⁺ sont bel et bien déplétées, mes résultats montrent cependant que la diminution réelle de la population Foxp3⁺ n'est que de ~50-70%, ne permettant donc pas de totalement exclure l'implication des Treg. Cependant, mes expériences antérieures sur les souris Foxp3-cre confirment néanmoins ce résultat. En effet, je travaillais initialement sur un modèle murin Foxp3-cre^{YFP}-Themis1^{fl/fl} que nous avons généré et croisé avec les souris Vav1^{R63W}. J'ai alors montré que les souris KI ayant une délétion de Themis1 dans les Treg Foxp3⁺ (Vav1^{R63W}-Themis1^{FOXP3-/-}) développaient une EAE moins sévère que les souris Vav1^{R63W} (**Figure 19A**). J'ai cependant montré par transfert adoptif de Treg totaux YFP⁺ ou Tconv totaux YFP⁻ que cela n'était pas dû aux fonctions suppressives des Treg double-mutés (étant par ailleurs défectueux), mais à un défaut intrinsèque d'encéphalitogénicité des Tconv (**Figure 19B**), résultant possiblement d'une fuite de l'expression de la Cre-recombinase comme décrit dans la littérature ([Bittner-Eddy et al., 2019](#)). En effet, bien que seules les cellules Foxp3⁺ co-exprimaient aussi le traceur YFP associé génétiquement à la Cre, nous avons par la suite observé une délétion partielle de Themis1 dans les LB, les LT CD8, les Tconv, dans le thymus ou même dans des tissus non-immunitaires (**Figure 19D**). Nous avons alors émis l'hypothèse que cette fuite stochastique de l'expression de la Cre au sein des Tconv était responsable de la réduction intrinsèque de leur encéphalitogénicité. L'ensemble de ces résultats suggère donc que la réduction de la sévérité de l'EAE chez les souris KI-cKO est due à la perturbation du hub Themis1-Vav1 au sein des Tconv, et non des Treg. Ces résultats sont de plus en accord avec les publications antérieures de l'équipe montrant que les Treg double-mutés ont un défaut de fonctions suppressives ([Chabod et al., 2012](#); [Pedros et al., 2015](#)). Étant donné que nous avons récemment généré une nouvelle lignée de souris en croisant les souris KI-cKO avec des souris Foxp3-Thy1.1, il serait intéressant de définitivement confirmer ces résultats en induisant l'EAE chez des souris traitées avec un anticorps anti-Thy1.1, qui permettrait alors la déplétion de la totalité des Treg indépendamment de l'expression de CD25 ([Campisi et al., 2016](#); [Scott-Browne et al., 2007](#)).

Finalement, l'utilisation du modèle murin de délétion inductible CD4cre^{ERT2} m'a permis de montrer que la délétion de Themis1 au sein des LT CD8 n'était pas nécessaire à la réduction de l'EAE observée chez les souris cKO et KI-cKO. De plus, la comparaison de souris cKO et cKO^{ERT2} immunisées avec un protocole équivalent montre que ces souris développent l'EAE avec une sévérité quasi identique que ce soit en termes de cinétique clinique, de score maximal ou de score cumulé (résultats non montrés). Néanmoins, au vu du rôle de Themis1 dans

l'activation, la prolifération, et la production d'IFN- γ (Brzostek et al., 2020), et au vu de la réduction de leur nombre à l'état basal, il reste probable que la délétion de Themis1 au sein des LT CD8 soit de relevance physiopathologique dans le cadre de la SEP où les LT CD8 semblent avoir un rôle plus important que dans le modèle murin (Hauser et al., 1986 ; Neumann et al., 2002).

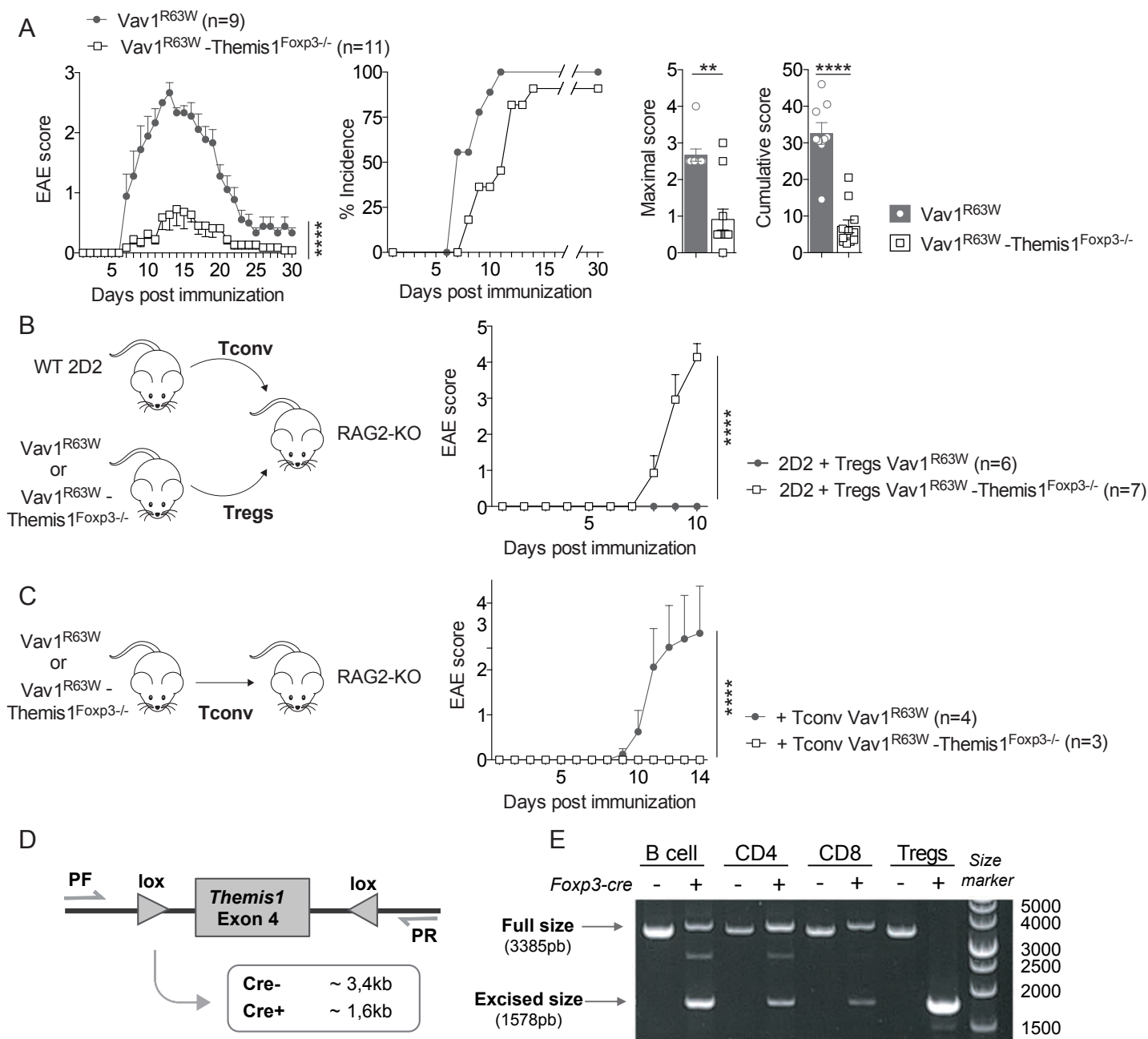


Figure 19 : Les souris Vav1^{R63W}-Themis1^{Foxp3-/-} développent une EAE moins sévère

A) Les souris simple- et double-mutées ont été immunisées avec le peptide MOG₃₅₋₅₅. B-C) Des souris RAG2-KO ont reçu des transferts adoptifs de Tconv et Treg (B) ou seulement de Tconv (C) avant d'être immunisées avec le peptide MOG₃₅₋₅₅. D) Design de la paire de primers utilisée en (E) pour analyser la délétion de Themis1. E) Différentes populations cellulaires ont été triées par FACS, puis lysées pour extraire l'ADN et analyser par PCR la délétion génétique de Themis1.

Analyse de la contribution de la sélection thymique dans la réduction de la sévérité de l'EAE chez les souris mutées pour Vav1 et pour Themis1.

De par leurs rôles dans la signalisation du TCR, Vav1 et Themis1 sont impliqués dans le développement des lymphocytes T au niveau du thymus (Fisher et al., 1995 ; Lesourne et al., 2009), et participent ainsi à la sélection du répertoire TCR. Bien qu'il ait été montré que les thymocytes ayant un TCR spécifique de la protéine MOG ne subissaient pas de sélection négative (Delarasse et al., 2003; Fazilleau et al., 2006), suggérant qu'une diminution de la signalisation par le biais des mutations Vav1 ou Themis1 n'aurait pas d'impact à ce niveau-là, une modification du répertoire sélectionné reste envisageable. L'utilisation du modèle murin CD4cre^{ERT2} précédemment décrit a permis d'exclure l'implication de la délétion de Themis1 dans le thymus dans la réduction de la sévérité de l'EAE chez les souris cKO et KI-cKO. L'implication du variant de Vav1 ne peut en revanche pas être testée de manière similaire. Il a par ailleurs été montré que le variant R63W induisait une modification du répertoire TCR responsable d'une augmentation de la sévérité de la maladie dans un modèle de myasthénie (Bernard et al., 2018). J'ai donc analysé le taux d'utilisation des différents domaines V β au sein des Tconv des 4 génotypes de souris (Figure 20).

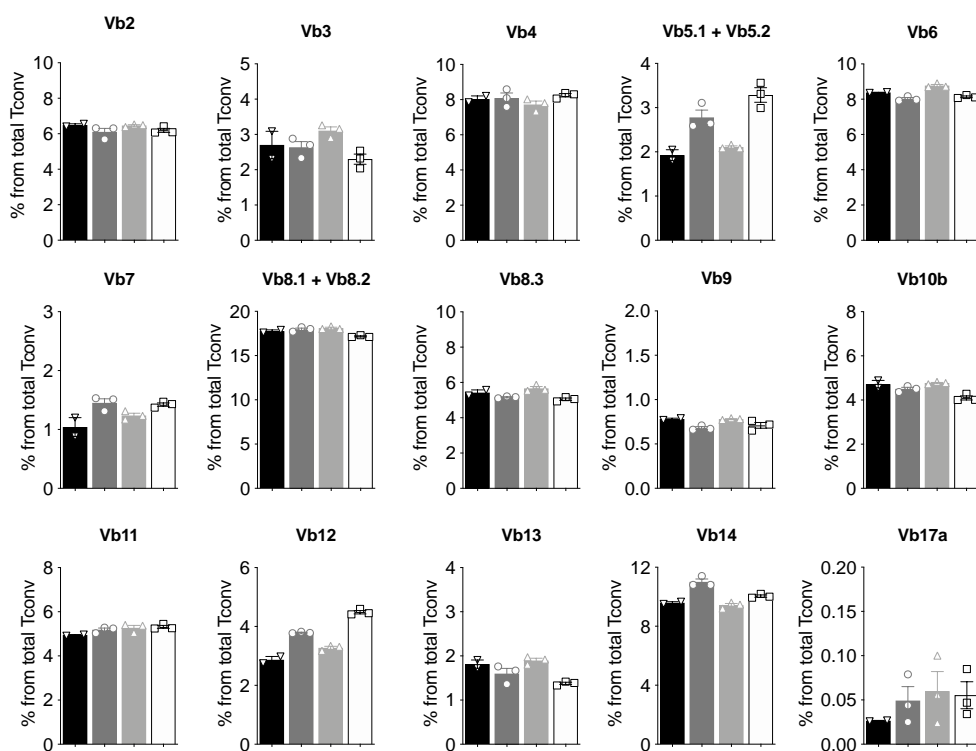


Figure 20 : Vav1 et Themis1 n'induisent pas de gros changement du répertoire V β . Les ganglions lymphatiques de souris simple- et double-mutées ont été marqués par barcoding et poolés 4 par 4 avant d'être marqués avec des anticorps spécifiques des différents V β et analysés par FACS.

En accord avec la littérature (Bernard et al., 2018), nous avons observé une modification du pourcentage d'utilisation des domaines V β 5.1/5.2 et V β 12 chez les souris KI. En revanche, nous n'avons observé aucun impact du variant de Vav1 (que ce soit en présence ou en absence de Themis1) sur le pourcentage de Tconv exprimant les domaines V β 8.1/8.2, dont V β 8.2 a été décrit comme un réarrangement murin public présent dans les LT infiltrant le SNC suite à l'immunisation avec le peptide MOG (Fazilleau et al., 2006). Bien que nous ne puissions pas conclure du fait que les régions CDR3 n'aient pas été séquencées, cela constitue une première indication que le répertoire TCR des Tconv n'est pas drastiquement impacté. De plus, nous n'avons observé aucune différence dans l'analyse du pourcentage et nombre absolu de Tconv Tet-MOG⁺ dans les dLN 7 jours après l'immunisation, indiquant que des Tconv ayant un TCR spécifique du peptide MOG se développent bel et bien dans les 4 groupes de souris. Finalement, la comparaison de souris KI avec KI-cKO, ou encore KI avec KI-cKO^{ERT2} permet de normaliser l'impact de Vav1 sur le développement thymique et d'analyser alors l'impact de la double mutation sur les LT en périphérie. Collectivement, l'ensemble de ces résultats suggèrent que la réduction de la sévérité de l'EAE chez les souris mutées est due aux rôles de ces mutations dans la fonction des Tconv plutôt que dans leur développement et la génération de leur répertoire TCR.

La réduction de la sévérité de l'EAE chez les souris mutées pour Vav1 et Themis1 est probablement la conséquence d'un défaut de l'encéphalitogénicité des LT conventionnels

La réduction de la sévérité de l'EAE chez les souris KI-cKO est associée à une très forte réduction de l'infiltration cellulaire au niveau du SNC, concernant d'une part les Tconv, mais aussi les Treg, les LT CD8, ou encore les neutrophiles et monocytes (résultats non montrés). Or, lors de l'initiation de l'EAE, ce sont les LT CD4 qui migrent en premier lieu et permettent ensuite le recrutement d'autres cellules au travers d'une BHE perméabilisée. Pour cela, les LT CD4 doivent après avoir migré vers le SNC, être réactivés par des CPA locales et produire des cytokines qui entraîneront l'activation de l'endothélium vasculaire cérébral, le relâchement des jonctions serrées, le relargage de chimiokines recrutant d'autres cellules inflammatoires, et *in fine* la perturbation de la glia limitans permettant à l'infiltrat immunitaire de pénétrer le parenchyme (Engelhardt, 2017). La réduction généralisée des infiltrats immunitaires chez les souris KI-cKO suggère donc que l'initiation de la réponse immune anti-MOG pourrait être défectueuse dans ces souris. En accord avec cette hypothèse, j'ai montré que lors de la phase

de priming dans les dLN, les Tconv KI-cKO produisaient moins d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-17 et de GM-CSF que les Tconv WT ou simple-mutés. Parmi ces cytokines, les 3 premières ont été décrites pour leur rôle dans la perturbation de la BHE (Kebir et al., 2007; Sonar et al., 2017; Song et al., 2015). Ainsi, une réduction de la production de cytokines pourrait premièrement entraîner une absence d'activation de l'endothélium vasculaire, et ainsi une incapacité des Tconv à ralentir et s'arrêter au niveau de l'endothélium malgré leur expression d'intégrine telles que VLA-4 et LFA-1. Deuxièmement, elle pourrait diminuer la capacité des Tconv à traverser par diapédèse la première épaisseur de la BHE constituées par les cellules endothéliales (EC), processus étant facilité par le relâchement des jonctions serrées entre les EC. Enfin, si malgré tout, les cellules passent les EC et se retrouvent dans l'espace péri-vasculaire où elles s'accumulent et résident pendant plusieurs jours, une faible production de cytokines pourrait entraîner un trop faible recrutement de monocytes (indirectement *via* un défaut d'induction de chimiokines). Ceci pourrait également entraîner une réactivation insuffisante des monocytes pour induire leur production de MMP nécessaires à la dissociation de la glia limitans (Agrawal et al., 2006). Cette hypothèse est soutenue par le fait que les Tconv KI-cKO expriment normalement les récepteurs de chimiokines communément associés à la migration vers le SNC tels que CCR2, CCR5, CCR6 et CXCR3, mais aussi les sous-unités d'intégrines CD49d et CD11a nécessaires à la formation des intégrines VLA-4 et LFA-1 respectivement. De plus, la co-injection de Tconv WT avec des Tconv KI-cKO permet à ces derniers de migrer aussi efficacement que les WT dans le SNC, suggérant que lorsqu'une source extérieure de cytokines pro-inflammatoires est présente, ces cellules sont alors capables de migrer. Afin de confirmer l'incapacité des Tconv KI-cKO à perméabiliser la BHE, il serait intéressant de réaliser un test de perméabilité à l'aide du bleu Evans chez les souris KI-cKO suite à l'immunisation. Injectée en i.v., cette molécule est normalement trop grosse pour diffuser dans le parenchyme. Sa présence au niveau du SNC est donc un signe de perturbation de la BHE.

Ces précédents résultats suggèrent donc que les processus de perturbation de la BHE et de migration vers le parenchyme sont probablement impactés au sein des souris KI-cKO. De plus, le faible infiltrat retrouvé malgré tout chez certaines souris est par ailleurs plus faiblement inflammatoire, au vu de la réduction de la prolifération (Ki67) et de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80) par les monocytes, les DC et la microglie (résultats non montrés). Ceci pourrait être dû au GM-CSF notamment, ayant été montré comme non-nécessaire à l'induction de l'EAE (Duncker et al., 2018) mais permettant le recrutement, l'activation et la différenciation des cellules myéloïdes recrutées (Croxford et al., 2015; Duncker et al., 2018).

Enfin, en accord avec l'étude réalisée par le Dr Yang à laquelle j'ai participé (Yang et al., in press), j'ai observé une diminution de l'expression de T-bet chez les Tconv cKO et KI-cKO, facteur de transcription clé dans la différenciation en Th1 et la production d'IFN- γ , étant la cytokine la plus largement et la plus fréquemment réduite au sein des Tconv KI-cKO. Cette étude montre par ailleurs une augmentation de l'expression de Themis1 lors de la différenciation en Th1, appuyant le rôle de cette protéine dans le développement d'une réponse Th1. La diminution d'expression de T-bet est par ailleurs accentuée chez les souris cumulant la déficience en Themis1 et le variant de Vav1, suggérant que le rôle de Themis1 dans le lignage Th1 pourrait être dépendant de son interaction avec Vav1. Dans ce sens, il a été montré précédemment par mon équipe d'accueil que Vav1 impactait elle aussi individuellement la capacité des Tconv à produire ces cytokines pro-inflammatoires au cours de l'EAE (Kassem et al., 2016). Cette réduction de l'encéphalitogénicité observée chez les souris KI, KO et KI-cKO semble par ailleurs être récessive plutôt que dominante, du fait qu'aucune augmentation de la production de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 n'ait été observée chez les souris KI (Kassem et al., 2016), chez les KO (Yang et al., in press), ou chez les KI-cKO. De plus, lors de l'expérience de co-transfert, l'injection de Tconv KI-cKO n'a réduit ni l'infiltrat immunitaire ni la production en cytokines par le compartiment WT co-injecté, suggérant que ces cellules n'ont pas acquis de fonctions inhibitrices protectrices avec leurs mutations.

Il apparaît ainsi que Themis1 et Vav1 sont toutes deux impliquées dans l'encéphalitogénicité des Tconv au travers de leur contrôle sur la production de cytokines pro-inflammatoires. La perturbation d'un seul de ces deux composants entraîne une réduction intermédiaire de l'encéphalitogénicité des Tconv (Kassem et al., 2016 ; Yang et al., 2022), tandis que la perturbation du hub de signalisation Themis1-Vav1 entier entraîne une forte réduction du potentiel inflammatoire des Tconv. Par la suite, réaliser des expériences d'EAE passive par transferts adoptifs de Tconv issus des 4 génotypes permettrait non seulement de confirmer l'implication directe des Tconv (injection de LT CD4 Thy1.1⁺), mais aussi d'analyser si le prétraitement de ces cellules lors de la phases de restimulation *in vitro* avec différents cocktails cytokiniques (pro-Th1, pro-Th17) pourrait rétablir le potentiel encéphalitogénique des Tconv KI-cKO, ou si au contraire le défaut intrinsèque est trop profond pour être rétabli.

Les Tconv KI-cKO ont un défaut de signalisation du TCR

La production de cytokines par les LT est étroitement liée à la signalisation du TCR lors de leur stimulation. Il est ainsi probable que la réduction de production de cytokines observée chez les

Tconv KI-cKO soit une conséquence d'une altération de la signalisation du TCR. En effet comme discuté précédemment, Vav1 et Themis1 sont deux molécules de la signalisation du TCR. Vav1 est impliquée dans la stabilisation d'interactions protéiques par le biais de sa fonction adaptatrice et dans l'activation directe de voies de signalisation *via* sa fonction GEF (Tybulewicz, 2005). Themis1 quant à elle semble indirectement impliquée de par son rôle modulateur de la signalisation du TCR au travers de l'inhibition des phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Choi et al., 2017 ; Melique et al., 2022).

Dans ce sens, nous avons observé une réduction de la phosphorylation des kinases Erk1/2 et Akt chez les souris KI, en accord avec des résultats précédents de l'équipe (Kassem et al., 2016). Nous n'avons cependant observé aucun impact de la délétion de Themis1 sur la signalisation du TCR lorsque cette délétion avait lieu chez des souris ayant une forme non-mutée de Vav1. Ceci peut être expliqué par le type de stimulation utilisée dans notre étude (étant centrée sur le TCR *via* des anticorps anti-CD3 et anti-CD4) et ainsi par le rôle ambigu de Themis1 au sein de la signalisation du TCR au travers de l'inhibition de SHP-1 et SHP-2. En effet bien que SHP-1 soit largement décrite pour son rôle inhibiteur, SHP-2 a été décrite pour son rôle de régulateur positif des kinases Erk1/2 suite à l'engagement du TCR seul (Frearson & Alexander, 1998; Nguyen et al., 2006), tandis qu'elle aurait un rôle de régulateur négatif dans la signalisation de co-récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 et CTLA-4 (Rudd et al., 2009; Yokosuka et al., 2012), ou encore du récepteur à l'IFN- γ (X. Wu et al., 2012). Ceci expliquerait la tendance à l'augmentation (non significative) de la phosphorylation de Erk1/2 que l'on observe au sein des LT CD4 cKO dans notre étude, en accord avec les résultats du Dr Yang (Yang et al., *in press*). Les différences de phénotype observées *in vivo* chez les souris cKO pourraient ainsi ne pas être reflétées par une stimulation du TCR seule.

En revanche lorsque Themis1 est muté chez des souris exprimant le variant de Vav1, on observe une diminution de la phosphorylation de RelA, appartenant à la voie canonique du NF-kB. Ces résultats sont en accord avec différentes études décrivant l'implication de Vav1 dans l'activation de la voie NF-kB (Costello et al., 1999; Marinari et al., 2002). Ces observations ont cependant été faites après délétion totale de la protéine. L'absence de diminution de la phosphorylation de RelA chez les souris KI suggère donc que le variant Vav1^{R63W} parvient à activer les voies nécessaires à l'activation de ce facteur. Ces voies pourraient cependant être moins fortement activées et se retrouver ainsi plus sensibles à l'inhibition par SHP-1 en absence de Themis1. Dans ce sens, il a été montré que Vav1 favorisait l'activité de la PLC- γ (Costello et al., 1999), protéine pouvant être déphosphorylée par SHP-1 (Matallon et al., 2016).

Alternativement, il a été montré que Themis1 favorisait la phosphorylation de Vav1 au sein de thymocytes *via* l'inhibition de SHP-1 (Zvezdova et al., 2016). La délétion de Themis1 pourrait donc diminuer encore plus l'activation de Vav1^{R63W}, celle-ci étant déjà diminuée par sa mutation. Ainsi, que ce soit *via* le contrôle direct de la fonction de Vav1 ou *via* la régulation des voies de signalisation en aval de Vav1, mes résultats indiquent que la combinaison du variant de Vav1 et de la déficience en Themis1 induisent une diminution de la signalisation du TCR provoquant une diminution de l'activation de la voie NF-κB.

Les diminutions des signalisations (p-Erk1/2 chez les souris KI et KI-cKO et p-P65 chez les souris KI-cKO spécifiquement) pourraient expliquer la réduction de production de cytokines pro-inflammatoires par les Tconv de ces souris. L'activation de la kinase Erk2 est en effet associée à la différenciation en Th1 et la production d'IFN-γ (C.F. Chang et al., 2012). La délétion d'Erk2 dans cette étude entraîne par ailleurs une augmentation de la différenciation en iTregs, normalement réprimée. De plus, l'inhibition de Erk1/2 *via* l'utilisation d'inhibiteur de leur kinase activatrice MEK1/2 entraîne une réduction de la différenciation en Th1 et Th17 et une réduction de la sévérité de l'EAE (Breton et al., 2009). Bien que cet effet soit en grande partie dû à l'impact du traitement sur les DC et à la réduction de leur production d'IL-1 et d'IL-23, l'utilisation de ce traitement sur des souris ayant une EAE déjà établie avec des Th1 et Th17 déjà différenciés entraîne là aussi une réduction de l'EAE. La voie NF-κB et plus particulièrement RelA sont elles aussi impliquées dans la différenciation des Tconv. L'inhibition de la voie canonique par expression d'une forme mutée dominante d'IκBα entraîne par exemple une diminution de la différenciation en Th1 (Corn et al., 2003). Ceci peut être expliqué par les nombreux sites de liaison à l'ADN de RelA présents dans la région promotrice du gène de l'IFN-γ (Balasubramani et al., 2010a; Balasubramani et al., 2010b). De plus, RelA et cRel sont impliquées dans la différenciation en Th17 par le biais de l'induction de l'expression de RORγt (Ruan et al., 2011). De même, la délétion au sein des LT CD4 de NF-κB1 (p50) nécessaire à la formation de dimères avec RelA et cRel entraîne une diminution de la production de GM-CSF (Campbell et al., 2011). Enfin, l'activation de la voie NF-κB canonique semble impliquée dans l'inhibition de la différenciation en iTregs au travers de l'induction de la production d'IFN-γ et de TNF-α (Molinero et al., 2011). Finalement, il a été montré que la délétion de SHP-1 entraîne une aggravation de l'EAE avec une augmentation de la production d'IFN-γ suggérant que la modulation de la signalisation du TCR à la hausse ou à

la baisse a des effets opposés sur la réponse T, sur la production de cytokines inflammatoires et *in fine* sur la sévérité de l'EAE (Deng et al., 2003).

Collectivement, ces différentes études suggèrent que la diminution de l'activation des voies Erk et RelA chez les souris KI-cKO pourrait être responsable de la réduction de leur encéphalitogénicité, possiblement au travers d'une augmentation de l'activité de la phosphatase SHP-1 inhibant une signalisation déjà fragilisée par le variant de Vav1.

Il serait intéressant par la suite d'approfondir l'étude de la signalisation au sein de ces cellules, en analysant par exemple la phosphorylation de la PLC- γ , de la PKC θ ou encore d'IKK α/β , protéines étant impliquées dans l'induction de la voie NF-kB, afin de déterminer à quel niveau de la voie est impliqué le hub de signalisation Vav1-Themis1. Au vu de l'effet sur RelA, et de la similarité partielle entre les rôles de cRel et RelA, il serait aussi intéressant d'analyser l'activation de cRel (Ruan et al., 2011). De plus, l'étude de la signalisation du TCR en présence d'inhibiteur de la phosphatase SHP-1 permettrait d'analyser si, comme dans les LT CD8 (Brzostek et al., 2020) ou dans les thymocytes (Choi et al., 2017), la diminution de la signalisation en absence de Themis1 est due à l'augmentation de l'activité phosphatase de SHP-1. Finalement, l'ensemble de ces tests devraient être effectués avec différentes conditions de stimulations, notamment *via* l'engagement de CD28 au sein duquel l'activité de Vav1 est primordiale (Marinari et al., 2002; Piccolella et al., 2003).

Implication de Vav1 et Themis1 chez l'Homme

L'étude des mécanismes contrôlés par Vav1 et Themis1 semble être de relevance physiopathologique chez l'Homme de par l'homologie entre les protéines murines et humaines. mVav1 et hVav1 partagent en effet 93% d'homologie, tandis de mThemis1 et hThemis1 partagent 76% d'homologie (résultats issus d'alignement de séquences par BLAST sur NCBI). De plus, diverses analyses génétiques ont décrit une association entre des mutations de l'ADN dans les gènes ou régions géniques proches des gènes de Vav1 et Themis1. Des SNP dans le gène de Vav1 ont par exemple été associés avec la polyarthrite rhumatoïde (Odds ratio (OR) $\sim 1,13$) (Guerreiro-Cacais et al., 2017), la myasthénie (OR $\sim 0,70$) (Avidan et al., 2014), ou avec la sclérose en plaques (OR $\sim 1,18$) (Jagodjic et al., 2009). Cependant, de par l'expression de Vav1 dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques et son rôle dans la signalisation d'un grand nombre de récepteurs différents (TCR, BCR, FcR, chimiokine-R...), le lien de causalité entre des SNP sur le gène de Vav1 et des pathologies inflammatoires peut être (et serait sûrement) multiparamétrique. Néanmoins, au vu du rôle primordial de Vav1 dans la signalisation du TCR,

il reste fort probable que les SNP observés chez l'Homme modulant l'expression de Vav1 impactent par conséquent la fonction des LT. Concernant l'expression de Vav1, il a justement été montré qu'elle est augmentée au sein de PBMC de patients SEP, et notamment au sein de patient exprimant le SNP positivement associé au développement de la SEP (Jagodici et al., 2009). De plus, cette étude montre une corrélation positive entre l'expression de Vav1 et l'expression de cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et TNF- α au sein des PBMC et au sein des cellules du LCR de patients SEP, suggérant un mécanisme par lequel Vav1 pourrait influencer la physiopathologie de cette maladie.

De même que pour Vav1, des SNP au sein ou à proximité du gène Themis1 ont été associés au développement de diverses maladies inflammatoires telles que l'asthme (OR \sim 1,045) (Olafsdottir et al., 2020), la dermatite atopique (OR \sim 2,19) (Kim et al., 2015), la maladie coeliaque (OR \sim 1,17) (Dubois et al., 2010), la maladie de Crohn (OR \sim 1,17) (Jostins et al., 2012), ou encore la SEP (OR \sim 1,07) (Sawcer et al., 2011; Patsopoulos et al., 2019), illustrant l'importance de ce gène et de la régulation de son expression dans le contrôle du système immunitaire. Des SNP en 5' du gène codant Themis1 ont en effet été montré comme modulant son expression au sein des LT CD4 chez l'Homme (Davies et al., 2016). Or, la modulation de l'expression de Themis1 semble relevante puisque on observe naturellement un contrôle strict de son expression qui diffère selon le type cellulaire (thymocytes DP, LT CD8...) (Lesourne et al., 2012; Duguet et al., 2017), suggérant que ces cellules n'ont pas la même dépendance en Themis1, et ainsi, que moduler la quantité de protéine de Themis1 constitue un niveau supplémentaire de contrôle des signalisations dépendantes de Themis1. Contrairement à Vav1, l'expression de Themis1 est restreinte aux LT, aux NKT et aux mastocytes (non publié), et implique donc que l'effet des SNP décrit dans les précédent GWAS passe par l'une ou plusieurs de ces populations immunitaires.

Pour Vav1 comme pour Themis1, les résultats de mon travail de thèse suggèrent que ces 2 gènes pourraient impacter la susceptibilité à diverses pathologies inflammatoires chez l'Homme, au travers de la modulation de la fonction des LT CD4 conventionnels. De plus, mes résultats indiquent qu'analyser l'implication de la co-expression de SNP au sein de Vav1 et de Themis1 pourrait être relevant, de par l'interaction physique et mécanistique entre ces 2 protéines. La co-expression de SNP pourrait entraîner un défaut fonctionnel plus grand que la présence de SNP seuls, et ainsi permettre d'améliorer la compréhension de l'héritabilité de maladies telles que la SEP.

Étude de l'implication du stress prénatal dans la susceptibilité à développer une inflammation du système nerveux central

Introduction

Il apparaît depuis plusieurs années que des variations dans l'état psychologique de la mère (anxiété, dépression, stress) lors de la grossesse seraient associées avec divers troubles chez la descendance, que ce soit chez le nouveau-né, chez l'enfant ou plus tard dans la vie.

Le stress engendre chez les mères l'activation de l'axe Hypothalamo-Pituitaire-Adrénalien (HPA) conduisant à un taux élevé de cortisol maternel et placentaire. Il a été montré que les quantités de cortisol maternel et fœtal sont liées, puisqu'une partie du cortisol passe à travers le placenta. Durant la gestation, le cortisol est majoritairement transformé en cortisone, moins actif, mais l'enzyme responsable de cette modification (11 β -HSD2) est moins présente en fin de grossesse et d'autant plus en réponse à un stress prénatal (Douros et al., 2017). Ces modifications des quantités de cortisol fœtal peuvent modifier le développement du fœtus et notamment de son propre axe HPA. Le stress provoque aussi la production de cytokines pro-inflammatoires maternelles qui pourraient passer le placenta ou lui faire sécréter à son tour des cytokines. Celles-ci, en interagissant avec les cellules gliales fœtales peuvent altérer le développement cérébral de la progéniture lors de la gestation et augmenter les risques d'apparition de troubles neurologiques (Rakers et al., 2020). Ces troubles peuvent être neuro-développementaux, comportementaux, émotionnels ou encore cognitifs (Graignic-Philip et al., 2014).

Le stress prénatal a de plus été associé au développement de pathologies inflammatoires (asthme, allergie, dermatite, infection) (Merlot et al., 2008). Ces troubles immunologiques sont caractérisées par la mise en place d'une immunité de type Th2 et la production de cytokines associées (IL-4, IL-5 et IL-13), dont l'activité semble augmentée chez les sujets ayant subi un stress prénatal (Entringer et al., 2008 ; Pincusknackstedt et al., 2006 ; T. G. O'Connor et al., 2013).

Cependant, l'impact du stress prénatal sur des pathologies de type Th1 ou Th17 n'a presque jamais été étudié. Seule une récente étude semble montrer que le stress prénatal induit une augmentation de la sévérité de l'EAE chez les souris (Paladini et al., 2020). Il apparaît ainsi une certaine contradiction avec l'exacerbation de deux types de pathologies opposées

Étude de l'implication du stress prénatal dans la susceptibilité à développer une inflammation du système nerveux central

faisant intervenir des réponses antagonistes (Th2 d'un côté et Th1/Th17 de l'autre). De plus, les auteurs suggèrent que l'augmentation de la sévérité de l'EAE serait indépendante du système immunitaire, mais dépendante d'un défaut intrinsèque au SNC, au sein duquel on retrouve une diminution du facteur neurotrophique BDNF (Brain Derived Neurotrophic factor) suite au stress prénatal.

Finalement, il a été montré que le stress prénatal induit une modification des microbiotes vaginal et intestinal chez la mère, ce qui est associé à une dysbiose intestinale chez la descendance (Zijlmans et al., 2015 ; Jašarević et al., 2017). De par le lien largement décrit entre le microbiote et l'inflammation du SNC, il serait envisageable que la dysbiose induite par le stress prénatal impacte la susceptibilité des descendants à développer l'EAE, possiblement au travers de la modulation de la fonction du système immunitaire.

Ainsi, ce projet a pour objectif de caractériser l'impact du stress prénatal sur la susceptibilité de la descendance à l'auto-immunité du SNC, et d'en déterminer les mécanismes impliqués.

Matériels et Méthodes

Animaux et protocole de stress

Des souris mâles et femelles C57BL/6 âgées de 8 semaines provenant du laboratoire Janvier ont été utilisées pour les accouplements. L'élevage a été réalisé dans la zootechnie du l'US06 au CHU Purpan, Toulouse respectant la norme EOPS (Environnement exempté d'Organismes Pathogènes Spécifiques). Toutes les expériences sont effectuées selon les indications du comité d'éthique approuvées par le ministère ainsi que selon les règles françaises et européennes pour le soin et la protection des animaux de laboratoire.

Afin d'étudier l'impact du stress prénatal, nous avons utilisé un modèle de stress chronique non-invasif, consistant en la rétention des souris gestantes dans un tube de 50mL troué, placé sous une lumière vive (200W) pendant 30 minutes. Ce stress est répété 3 fois par jour avec des sessions espacées de 3h, et ce pendant 6 jours consécutifs, entre J13 et J18 de gestation (inclus), les premières naissances arrivant à J19. Les souriceaux sont ensuite laissés avec la mère jusqu'au sevrage à 4 semaines, où ils sont regroupés par sexe et par groupe (CT ou PS) en grandes cages (jusqu'à 10 souris par cage). Les souris âgées de 8 à 12 semaines sont ensuite utilisées en expérimentation.

Induction de l'EAE active

Les progénitures CT et PS sont anesthésiées puis immunisées par voie sous-cutanée à la base de la queue avec une émulsion de 200 μ L contenant le peptide MOG₃₅₋₅₅ (Covalab) et de l'adjuvant complet de Freund (CFA, Complete Freund's Adjuvant, Sigma-Aldrich). Les mâles reçoivent une émulsion contenant 50 μ g de MOG et de 375 μ g/mL de CFA, ainsi qu'une injection intraveineuse au niveau du sinus rétro-orbital de 50ng de toxine pertussique (PTX, List Biological Laboratories) le jour de l'immunisation et une autre de 100ng 48h plus tard. Les femelles reçoivent une émulsion de 50 μ g de MOG et de 500 μ g/mL de CFA, ainsi qu'une injection intraveineuse au niveau du sinus rétro-orbital de 100ng de toxine pertussique le jour de l'immunisation et 48h après.

Pour l'étude du rôle des Treg, les souris CT et PS ont été traitées soit avec du PBS soit avec 500 μ g d'anticorps PC61 (anti-CD25) par voie intra-péritonéale une semaine avant d'être immunisées selon le protocole décrit précédemment.

Induction de l'EAE passive

Des souris WT donneuses provenant du laboratoire Janvier ont été immunisées avec une émulsion contenant 50 μ g de MOG₃₅₋₅₅ et 500 μ g/mL de CFA. 10 jours plus tard, les cellules

Étude de l'implication du stress prénatal dans la susceptibilité à développer une inflammation du système nerveux central

issues des dLN et de la rate de ces souris sont mises en culture 3 jours à 4.10^6 cellules/mL dans des flasques T25 pour être restimulées *in vitro* en présence de $20\mu\text{g/mL}$ de peptide MOG₃₅₋₅₅ (Covalab), $10\mu\text{g/mL}$ d'anti-IFN- γ (BD Pharmigen, XGM.2) et 15ng/mL d'IL-23 (R&D Systems, 1290-IL) et placées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO_2 . Après 3 jours, les cellules vivantes sont isolées par gradient de Ficoll puis injectées par voie intraveineuse (20.10^6 cellules par souris) dans le sinus rétro-orbital des souris CT et PS receveuses préalablement irradiées (200 rads \sim 2Gy) le jour de l'injection.

De la même manière, un transfert adoptif inverse a aussi été réalisé en immunisant des souris donneuses mâles CT et PS. Dans ce cas en revanche, les cellules restimulées *in vitro* récupérées sur gradient de Ficoll ont ensuite été enrichies en LT CD4 (Kit Invitrogen Untouched CD4 T cells) avant d'être injectées dans les receveuses WT. Les souris receveuses mâles WT ont alors reçu une injection intraveineuse de 3.10^6 LT CD4 CT ou PS, ainsi qu'une injection de 100ng de PTX à J0.

Extraction de l'infiltrat immunitaire dans le SNC

Le jour de l'euthanasie, les souris CT et PS reçoivent une dose létale de $20\mu\text{L/g}$ de kétamine et xylazine par voie intra-péritonéale. Les souris sont ensuite perfusées en intracardiaque avec du PBS pour séparer les cellules sanguines du tissu cérébral. Les cellules du SNC sont isolées par digestion enzymatique des organes (Collagénase D, DNase, TLCK) suivie d'une filtration. Un gradient de densité permet ensuite de séparer les cellules tissulaires de la myéline. Les cellules sont ensuite comptées et analysées phénotypiquement et fonctionnellement par cytométrie en flux.

Production cytokinique par les cellules des nœuds lymphatiques drainants (dLN)

Les cellules des dLN de souris CT et PS préalablement immunisées ont été déposées en plaques 96 puits à fond plat et restimulées avec des doses croissantes de peptide MOG₃₅₋₅₅ (0, 10 et $100\mu\text{g/mL}$) à 37°C et 5% de CO_2 , durant 48h. Les productions d'IFN- γ et de GM-CSF ont été analysées par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Brièvement, des plaques sont coatées avec des anticorps de capture anti-IFN- γ ou anti-GM-CSF dans du tampon carbonate et laissées toute la nuit à 4°C . Les plaques sont ensuite lavées puis incubées avec les surnagants de culture à 37°C pendant 1h30. Après lavages, les plaques sont incubées avec les anticorps biotinylés de détection (anti-IFN- γ ou anti-GM-CSF) pendant 1h à 37°C . Les plaques sont ensuite lavées et incubées avec l'enzyme de détection (phosphatase alcaline) couplée à la streptavidine, à 37°C pendant environ 45 minutes. Enfin, les plaques sont lavées et incubées

avec le substrat enzymatique, générant une réaction colorée en présence de la phosphatase alcaline. La densité optique est ensuite mesurée avec un spectrophotomètre, et la concentration cytokinique est calculée avec une gamme étalon. Pour les autres cytokines, nous avons utilisé le kit LEGENDplex Mouse Th Cytokine Panel (12-plex) V03 de BioLegend en suivant le protocole du fournisseur, ce qui nous a permis de quantifier la concentration en IL-2, 6, 17A, 17 F, 22, 4, 5, 13, 10 et TNF dans le surnageant après analyse au cytomètre Fortessa X20.

Test in vitro des fonctions suppressives des Treg

Les Treg de souris CT et PS et Tconv de souris CT ont été triés par cytométrie en flux, sur la base des marqueurs TCR⁺CD4⁺CD62L⁺CD25⁻ pour les Tconv et TCR⁺CD4⁺CD62L⁺CD25^{high} pour les Treg. Les Tconv CT ont ensuite été marqués au CTV (cell trace violet) par incubation de 10 minutes à 37°C dans du PBS contenant le CTV. Les Tconv sont ensuite stimulés avec des anticorps anti-CD3 et des splénocytes irradiés, en présence ou non de Treg à différent ratio Treg/Tconv. Après 62h de culture, la prolifération des Tconv est analysée par cytométrie en flux.

Induction du modèle de colite

Les Tconv naïfs de souris CT et PS ont été triés par cytométrie en flux, sur la base des marqueurs TCR⁺CD4⁺CD45RB^{high}CD25⁻. Ces cellules ont ensuite été injectées dans des souris receveuses RAG-2^{KO} par voie intraveineuse, dans le sinus rétro-orbital (0,4.10⁶ cellules par souris receveuse).

Cytométrie en flux et clusterisation

Les marquages sont réalisés avec du Viability Dye (65-0865) et les anticorps suivants : TCR β (H57- 597), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD25 (PC61), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3), CD11a (M17/4), CD127 (A7R34), KLRG1 (2F1), LAG3 (C9B7W), Ki67 (SolA15), FOXP3 (FJK-16S), IL-10 (JESS-16 E3), TNF (MP6-XT22), GM-CSF (MP1-22 E9), IL-17 (eBio17B7), IFN- γ (XMG1.2 ; TC11-18H10), T-BET (4B10), ROR γ t (Q31-378), PD1 (RMP1-30), TIM3 (RMT3-23), GATA3 (L50-823), Eomes (Dan11mag). L'acquisition a été faite à l'aide du FortessaX20 et du SymphonyA5 et l'analyse a été réalisée sur le logiciel FlowJo. Pour l'analyse du compartiment lymphoïde dans les LN nous avons utilisé différents plug-ins sur FlowJo : UMAP pour réduire nos échantillons en deux dimensions ainsi que Phenograph et FlowSOM afin de clustériser les cellules selon leurs similitudes. L'analyse des clusters a été faite manuellement ainsi qu'avec le plug-in Cluster Explorer.

Résultats

1 - Le stress prénatal n'a pas d'impact majeur sur le développement et l'homéostasie des LT

Nous avons premièrement analysé si ce protocole de stress prénatal induisait une modification de l'homéostasie générale des LT, que ce soit *via* une modulation de leur développement intra-thymique, ou de leur phénotype en périphérie dans les OLII. Pour cela, nous avons prélevé le thymus, la rate, et des ganglions lymphatiques de souris CT et PS, mâles et femelles, et nous les avons analysés par cytométrie en flux (**Figure 1**). Chez les mâles comme chez les femelles (résultats non montrés), nous n'avons observé aucune différence dans le nombre de cellules issues du thymus ou dans la proportion des différents stades de développement (DN, DP, SP4, SP8), suggérant que le stress prénatal n'entraîne pas de modification majeure du développement thymique (**Figure 1A**). L'analyse des LT matures présents dans les OLII n'a là non plus pas révélé de différences majeures en termes de nombres de ou de proportions de cellules naïves, activées ou mémoires au sein des Tconv, basés sur l'expression des marqueurs CD44 et CD62L (**Figure 1B**). Seule une légère diminution de la proportion de cTreg (central Treg) au profit des eTreg (effector Treg) a été observée (**Figure 1C**). Afin d'étudier en profondeur et de manière non biaisée le phénotype des LT dans les OLII, nous avons réalisé un marquage avec un large panel d'anticorps, que nous avons analysé par utilisation de plugins de clusterisation. Afin de gagner en profondeur d'analyse, la concaténation, la réalisation de représentation 2D par t-SNE, et ainsi la clusterisation, ont été réalisées à partir du compartiment LT CD4 uniquement, et non de l'organe entier (**Figure 1D**). En accord avec les résultats précédents, nous avons observé un cluster majoritaire au sein des LT CD4 (cluster 1) consistant en la population de Tconv naïfs CD44⁺CD62L⁺, et nous n'avons pas mis en évidence de différence majeure au sein des différents clusters. Néanmoins, il apparaît que deux clusters minoritaires (cluster 14 et 15) sont surreprésentés au sein des souris PS. Ces clusters regroupent tous deux des cellules hautement activées, exprimant un grand nombre de marqueurs d'activation (CD44⁺CD62L⁻CD25⁺CD69⁺TIM3⁺CD11a⁺PD1⁺KLRG1⁺Eomes⁺ et Ki67^{int}). De façon intéressante, la différence entre ces deux clusters concerne l'expression de Foxp3, indiquant qu'une population de Tconv mais aussi une population de Treg hautement activée sont augmentées au sein des souris PS. La relevance de ces populations reste à déterminer, notamment du fait de leur faible proportion, et de leur présence au sein des LN mais pas de la rate. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que le stress prénatal n'induit pas de modification drastique du développement et de l'homéostasie des LT en condition basale, mais suggèrent la possible existence d'un impact relativement faible sur le phénotype des LT CD4.

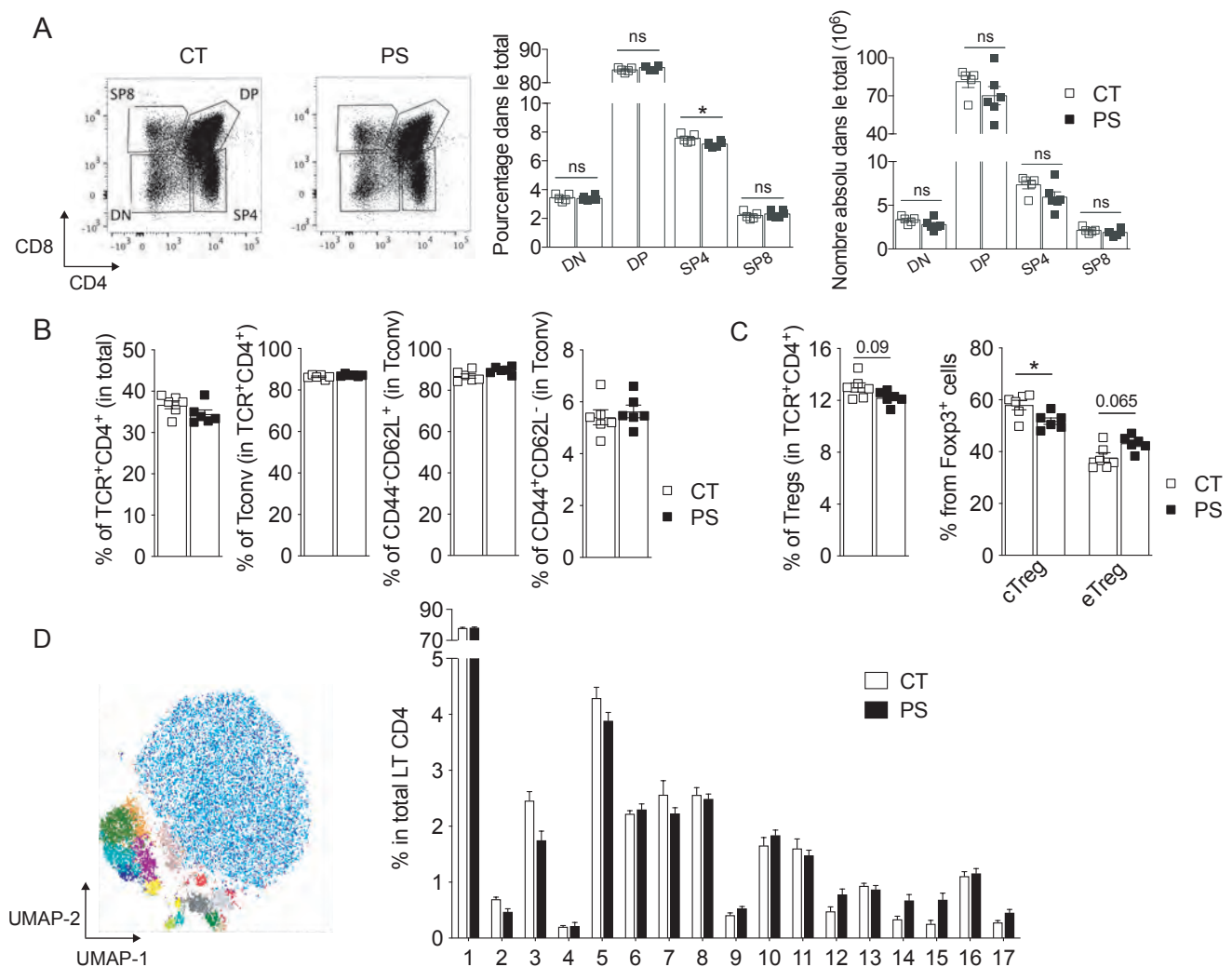


Figure 1. Le stress prénatal n'a pas d'impact majeur sur le développement et l'homéostasie des LT

Le thymus et les ganglions lymphatiques de souris CT et PS ont été prélevés et analysés par cytométrie en flux. A) Dot plot représentatif de l'expression des protéines CD4 et CD8 au sein des thymocytes de souris CT et PS. Les histogrammes représentent la proportion et le nombre absolu des différentes populations thymiques représentées sur les dot plots. B,C) Analyse de la proportion et de l'activation des Tconv (B) et des Treg (C) au sein des ganglions lymphatiques. D) t-SNE réalisé à partir de la concaténation des LT CD4 CT et PS. Les couleurs représentent les différents clusters déterminés par FlowSOM. Les histogrammes représentent la proportion de ces différents clusters au sein des LT CD4 de souris CT ou PS. Les analyses statistiques ont été réalisées par test Mann-Whitney (*<0.05).

2 - Le stress prénatal induit une réduction de la sévérité de l'EAE chez les mâles uniquement

Nous avons par la suite étudié la susceptibilité des souris PS à développer une inflammation du SNC en utilisant le modèle d'EAE active précédemment décrit. Pour cela, des souris CT et PS, mâles et femelles, ont été immunisées avec le peptide MOG₃₅₋₅₅. Nous avons ainsi observé une réduction de la sévérité de l'EAE chez les mâles PS en comparaison avec les mâles CT (**Figure 2A**). Cette diminution est associée à une réduction du score maximal et une augmentation de la variabilité intra-groupe, avec notamment une incidence légèrement plus faible. Chez les femelles cependant, nous n'avons pas observé de réduction significative de la sévérité de l'EAE, que ce soit en termes de scores cliniques au cours du temps, de scores maximaux ou de scores cumulés (**Figure 2B**). De ce fait, les expériences réalisées ensuite ont été majoritairement effectuées au sein des mâles CT et PS, afin de comprendre dans un premier temps les modifications induites par le PS aboutissant à cette réduction de l'EAE.

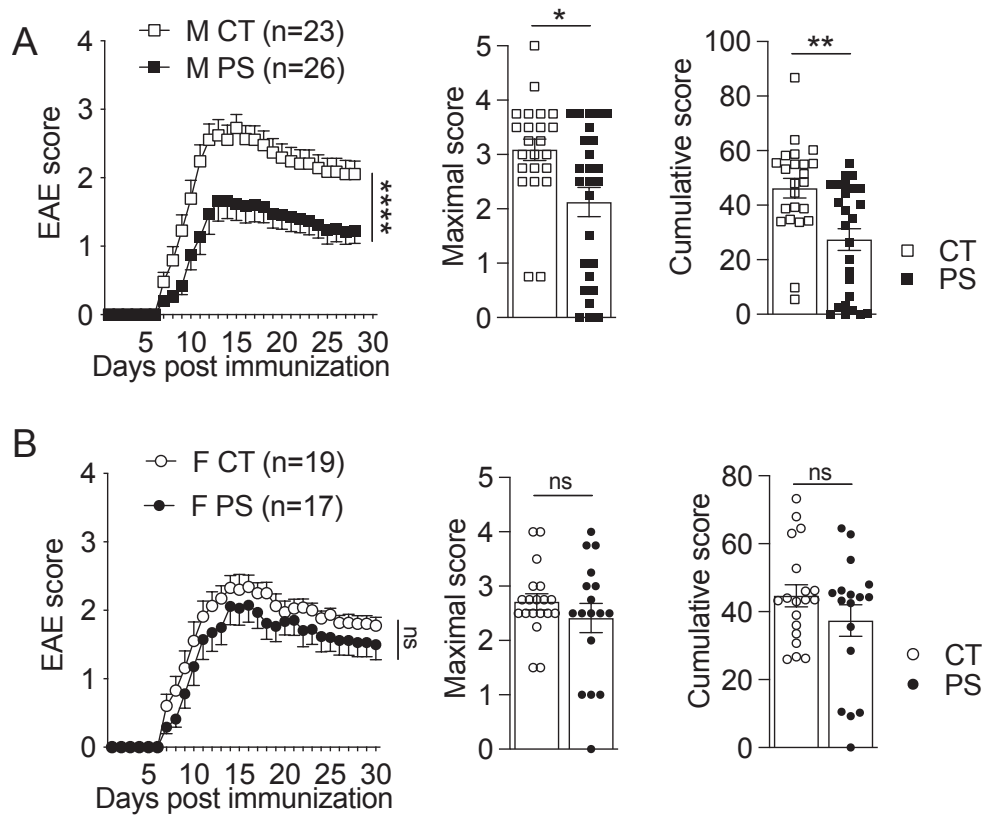


Figure 2. La descendance mâle issue de mères stressées développe une EAE moins sévère
Les souris CT et PS mâles (A) et femelles (B) ont été immunisées avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ et du CFA, et ont reçu deux injections de toxine pertussique. Les analyses statistiques des courbes cliniques ont été effectuées par Two-way ANOVA, et les analyses d'histogrammes ont été réalisées par test Mann-Whitney (*<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001).

3 – Le stress prénatal induit une diminution de la réponse T lors de l'EAE

Afin d'étudier les mécanismes cellulaires pouvant être à l'origine de la réduction de la sévérité de l'EAE, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle au pic de la maladie à J14. Nous avons alors caractérisé l'état d'activation et les fonctions effectrices des LT issus des ganglions drainant le site d'immunisation (dLN) et du SNC (**Figure 3**).

Nous avons ainsi observé une réduction de l'infiltrat immunitaire au sein de la moelle épinière des souris mâles PS en comparaison avec les souris CT (**Figure 3A**). La réduction de l'infiltration ne concerne cependant que les Tconv et les LT CD8, sans impacter les Treg, étant présents en nombres similaires. Ceci est ainsi associé à une augmentation du ratio Treg/Tconv, étant une valeur biologique clé dans le contrôle de l'inflammation. De façon intéressante, une augmentation de ce ratio est également observée au sein du cerveau, tandis qu'il est identique entre CT et PS au sein des dLN (**Figure 3B**). Cela semble suggérer que l'augmentation du ratio n'est pas un phénomène général, mais au contraire spécifique aux organes cibles lors de l'EAE. Ceci ne semble pas être dû à un défaut de prolifération des Tconv au sein du SNC, puisqu'ils expriment même plus fortement le marqueur Ki67 associé à la prolifération (résultats non montrée). Afin d'analyser si les Tconv pourraient avoir un problème de migration du fait d'un défaut d'activation ou d'expression des récepteurs de chimiokines, nous avons analysé le phénotype des Tconv dans les dLN (**Figure 3 C**). Nous avons ainsi observé une légère diminution de la proportion de Tconv activés CD44⁺CD62L⁻ au sein des Tconv PS. De plus, ces Tconv activés expriment plus faiblement la sous unité d'intégrine CD49d primordiale à la migration du sang vers le SNC. Une tendance vers une diminution de l'expression de CCR5 est aussi observée. À l'inverse, nous avons observé au sein des Treg une augmentation de la sous-population eTreg CD44^{hi}CD62L^{low}, ainsi qu'une augmentation de l'expression de Ki67. Aucune diminution de l'expression des intégrines ou récepteurs nécessaires à la migration vers le SNC n'a été observée (**Figure 3C**). Finalement, nous avons analysé la capacité des LT CD4 CT et PS à produire des cytokines au cours de l'EAE. Pour cela, nous avons restimulé les dLN avec des quantités croissantes de peptide MOG₃₅₋₅₅ pendant 48h, et nous avons mesuré la concentration en diverses cytokines dans le surnageant de culture par CBA (**Figure 3 D**). Il apparaît ainsi que les LT CD4 issus de souris PS produisent et sécrètent moins d'IFN- γ , de GM-CSF et de TNF- α . Les cytokines du lignage Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) ne sont que très faiblement produites par les 2 groupes de Tconv. De même, les cytokines de type Th17 sont soit très fortement produites (IL-17A) soit très faiblement (IL-17F), mais sans différence entre les LT CD4 CT et PS.

Étude de l'implication du stress prénatal dans la susceptibilité à développer une inflammation du système nerveux central

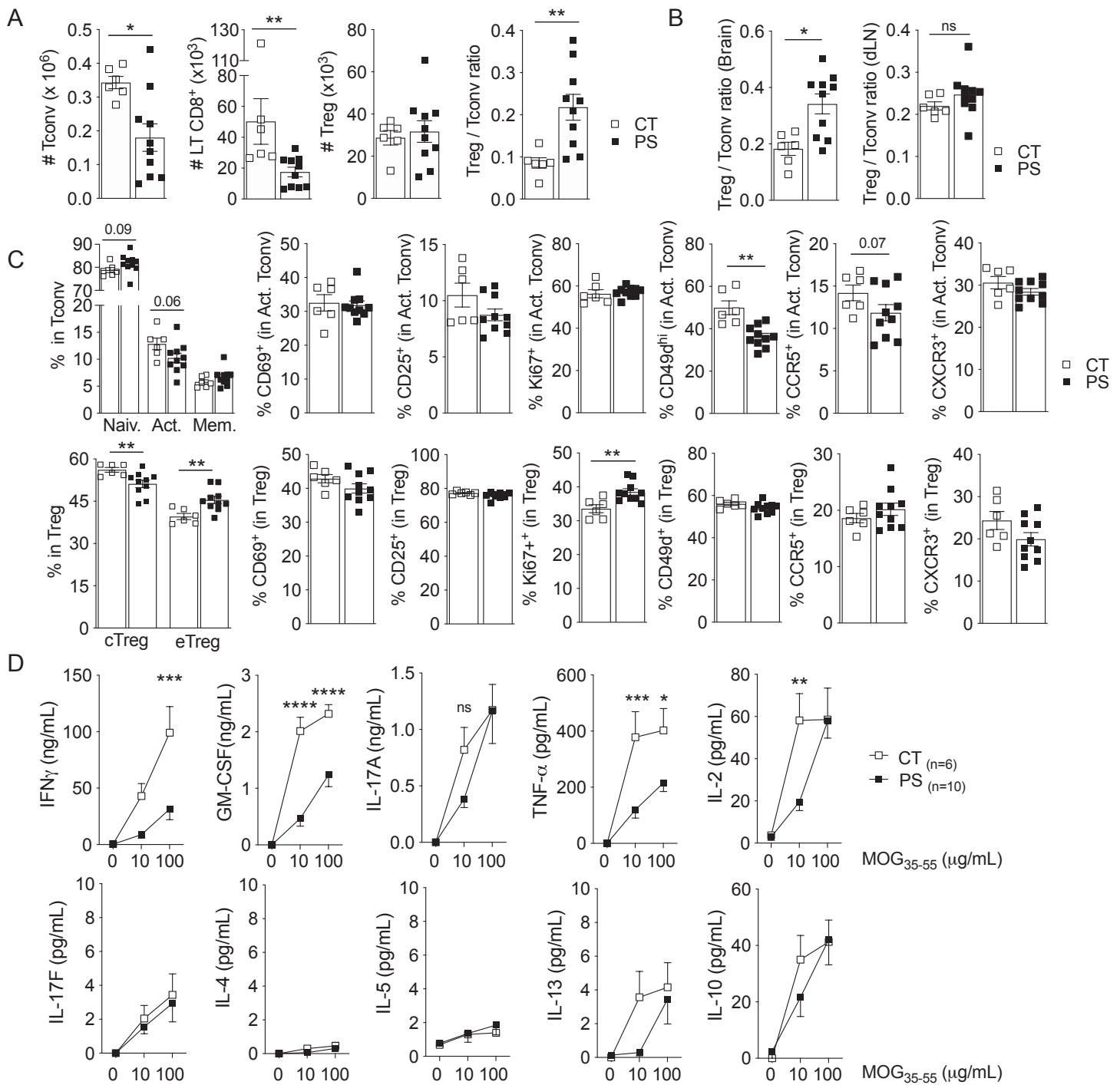


Figure 3. Le stress prénatal induit une réduction de l'infiltration de Tconv et de leurs fonctions

Les dLN et la moelle épinière de souris CT et PS mâles ont été analysés 14 jours après immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅. A) Analyse des nombres de cellules issues de la moelle épinière. B) Ratio Treg / Tconv au sein des LT CD4 présents dans le cerveau et les dLN. C) Analyse de l'état d'activation des Tconv et des Treg au sein des dLN. D) Analyse de la production de cytokines dans le surnageant de culture par CBA après restimulation des dLN avec des doses croissantes de peptide MOG₃₅₋₅₅. Les analyses statistiques des courbes de CBA ont été effectuées par Two-way ANOVA, et les analyses d'histogrammes ont été réalisées par test Mann-Whitney (*<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001).

Finalement, nous n'avons pas observé de différence de production de la cytokine inhibitrice IL-10. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la diminution de l'EAE chez les souris mâles PS est associée à une réduction de l'infiltrat en Tconv et à une réduction de leur activation et de leurs fonctions effectrices en périphérie. Ceci étant associé à une légère augmentation de l'activation des Treg, nous avons par la suite étudié l'impact du stress prénatal sur cette population.

4 – Le stress prénatal n'impacte pas les fonctions suppressives des Treg

Dans un premier temps, nous avons analysé les fonctions suppressives des Treg CT et PS en condition basale. Pour cela, nous avons trié par cytométrie en flux les cellules TCR⁺CD4⁺CD62L⁺CD25^{hi} étant à >98% des cellules Foxp3⁺. Nous avons ensuite analysé la capacité de ces Treg à inhiber la prolifération de Tconv CT (TCR⁺CD4⁺CD62L⁺CD25⁻) *in vitro*, lors d'une stimulation avec un anticorps anti-CD3 et des splénocytes irradiés. Le marquage des Tconv avec du CTV au préalable permet de suivre chaque cycle de prolifération cellulaire (**Figure 4A**). Le pourcentage d'inhibition des Treg est obtenu en calculant la différence entre la prolifération des Tconv seuls et leur prolifération en présence de Treg. Nous avons ainsi observé que les Treg CT et PS inhibent avec la même efficacité la prolifération des Tconv CT, quel que soit le ratio Treg / Tconv. De plus, les Treg PS ne semblent pas proliférer plus efficacement que les Treg CT, comme le suggère leur pourcentage équivalent au sein des LT CD4 (**Figure 4B**). Finalement, l'analyse de protéines associées à leur activité inhibitrice (CTLA-4, ICOS, CD25 et GITR) est elle aussi équivalente entre les Treg CT et PS. Ces résultats suggèrent donc que les fonctions suppressives des Treg ne sont pas impactées par le stress prénatal. Nous avons par la suite voulu étudier la potentielle implication des Treg des souris PS dans la réduction de la sévérité de l'EAE. Pour cela, nous avons déplété les Treg CD25⁺ par injection d'anticorps anti-CD25 une semaine avant l'immunisation. Dans les souris CT comme dans les souris PS, la déplétion des Treg entraîne une augmentation de la sévérité de l'EAE, en accord avec la littérature concernant le rôle des Treg dans l'EAE. Cependant, la différence de sévérité de l'EAE entre souris CT et souris PS est maintenue, indiquant que les Treg CD25⁺ ne sont pas nécessaires à la différence clinique observée suite au stress prénatal (**Figure 4C**).

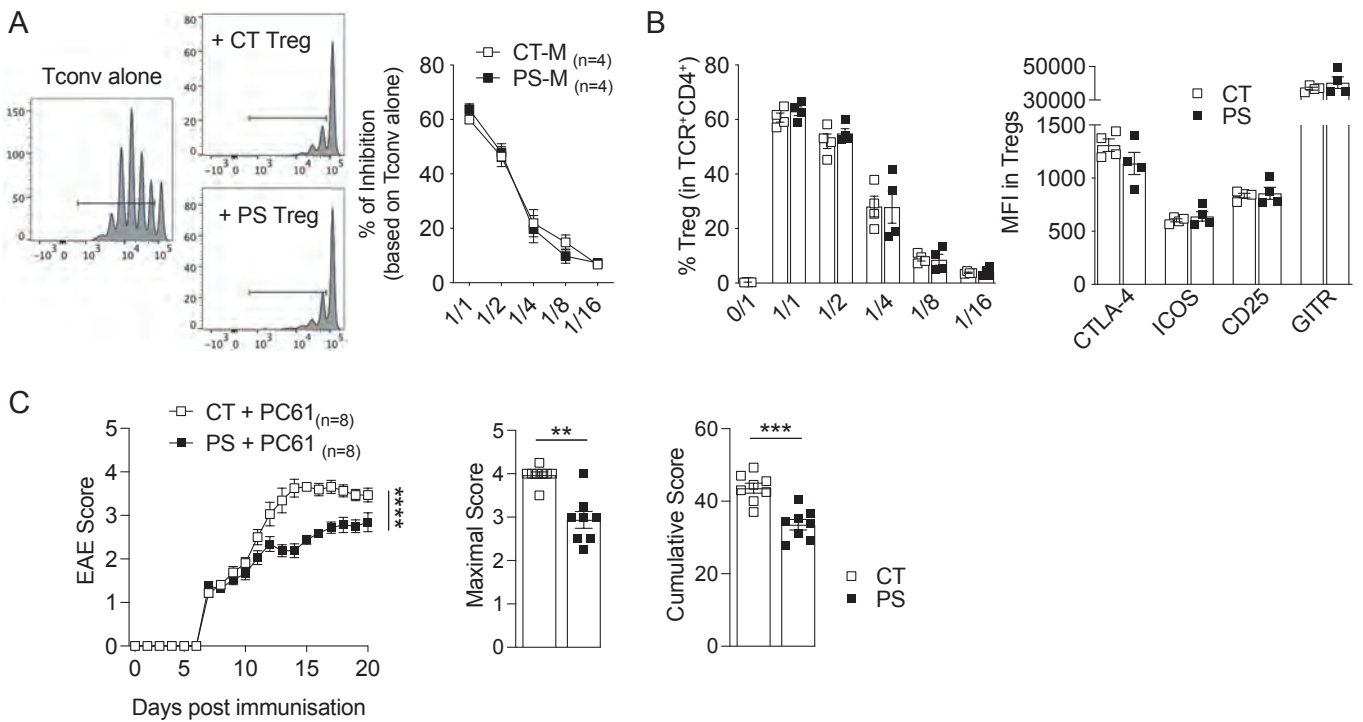


Figure 4. Le stress prénatal n'affecte pas la fonction suppressive des Treg

A,B) Les LT CD4 issus des LN et rates de souris CT et PS ont été triés par cytométrie en flux selon les marqueurs TCR, CD4, CD62L et CD25. Les Tconv CT ont été marqués au CTV et stimulés par de l'anti-CD3 et des splénocytes irradiés, en présence ou non de Treg CT ou PS à différents ratios pendant 62h. A) Courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la prolifération des Tconv par les différents Treg. B) Proportion et phénotype des Treg CT et PS suite aux 62h de culture. C) Les souris CT et PS ont été traitées par voie intrapéritonéale avec de l'anti-CD25 et immunisées 7 jours plus tard. Les analyses statistiques des courbes de CBA ont été effectuées par Two-way ANOVA, et les analyses d'histogrammes ont été réalisées par test Mann-Whitney (**p<math><0.01</math>, ***p<math><0.001</math>, ****p<math><0.0001</math>).

5 – Le stress prénatal semble impacter la fonction des LT CD4

Au vu des résultats précédents, la réduction de l'EAE ne semble pas dépendante de la présence des Treg. Nous avons donc par la suite voulu étudier si les LT CD4 (et parmi eux les Tconv) portaient en eux de façon intrinsèque un défaut d'encéphalitogénicité qui serait responsable de la réduction de la sévérité de l'EAE, ou si au contraire les LT CD4 n'étaient pas impliqués et que le phénotype observé était dû à un effet extérieur aux LT. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'EAE passive par transfert adoptif. Dans un premier temps, nous avons immunisé des souris CT et au bout de 10 jours, nous avons restimulé *in vitro* les splénocytes et les cellules issues des ganglions drainants pendant 3 jours avant de les réinjecter dans des souris CT et PS (**Figure 5A**). Nous n'avons observé aucune différence de sévérité de l'EAE entre les souris CT et PS ayant reçu les mêmes cellules encéphalitogéniques (**Figure 5B**). Ces résultats suggèrent donc que les souris PS n'ont pas de résistance intrinsèque à l'EAE. Nous avons par la suite réalisé l'expérience inverse (**Figure 5C**), injectant à des souris CT des LT CD4 issus de souris CT ou PS préalablement immunisées. Les résultats de cette expérience montrent une réduction de la sévérité de l'EAE lorsque les souris CT reçoivent des LT CD4 issus de souris PS (**Figure 5D**), suggérant que les LT CD4 des souris PS ont un défaut d'encéphalitogénicité intrinsèque. Cependant ces résultats n'ont pas été confirmés lorsque nous avons renouvelé cette expérience (**Figure 5E**), venant ainsi contredire cette hypothèse. Lors de ces expériences, les LT CD4 sont préalablement activés *in vivo* par des DC stimulées par le CFA, puis réactivés *in vitro* en présence de milieu polarisant. Afin d'éviter ces différentes étapes et d'analyser le potentiel inflammatoire « brut » des Tconv provenant des souris PS, nous avons alors réalisé une expérience de transfert de Tconv naïfs dans une souris RAG2^{KO}. L'injection de Tconv dans ces souris est connue pour entraîner une inflammation de l'intestin dépendante de la production de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules, pathologie accompagnée d'une perte de poids. Comme attendu, les souris RAG2^{KO} ayant reçu du PBS prennent du poids tandis que les souris ayant reçu des Tconv CT en perdent (**Figure 5F**). Cependant, les souris RAG2^{KO} ayant reçu les Tconv PS présentent un phénotype intermédiaire, suggérant que ces cellules, en absence de manipulation extérieure préalable, possèdent d'ores et déjà suite au stress prénatal un potentiel inflammatoire inférieur à celui des Tconv CT.

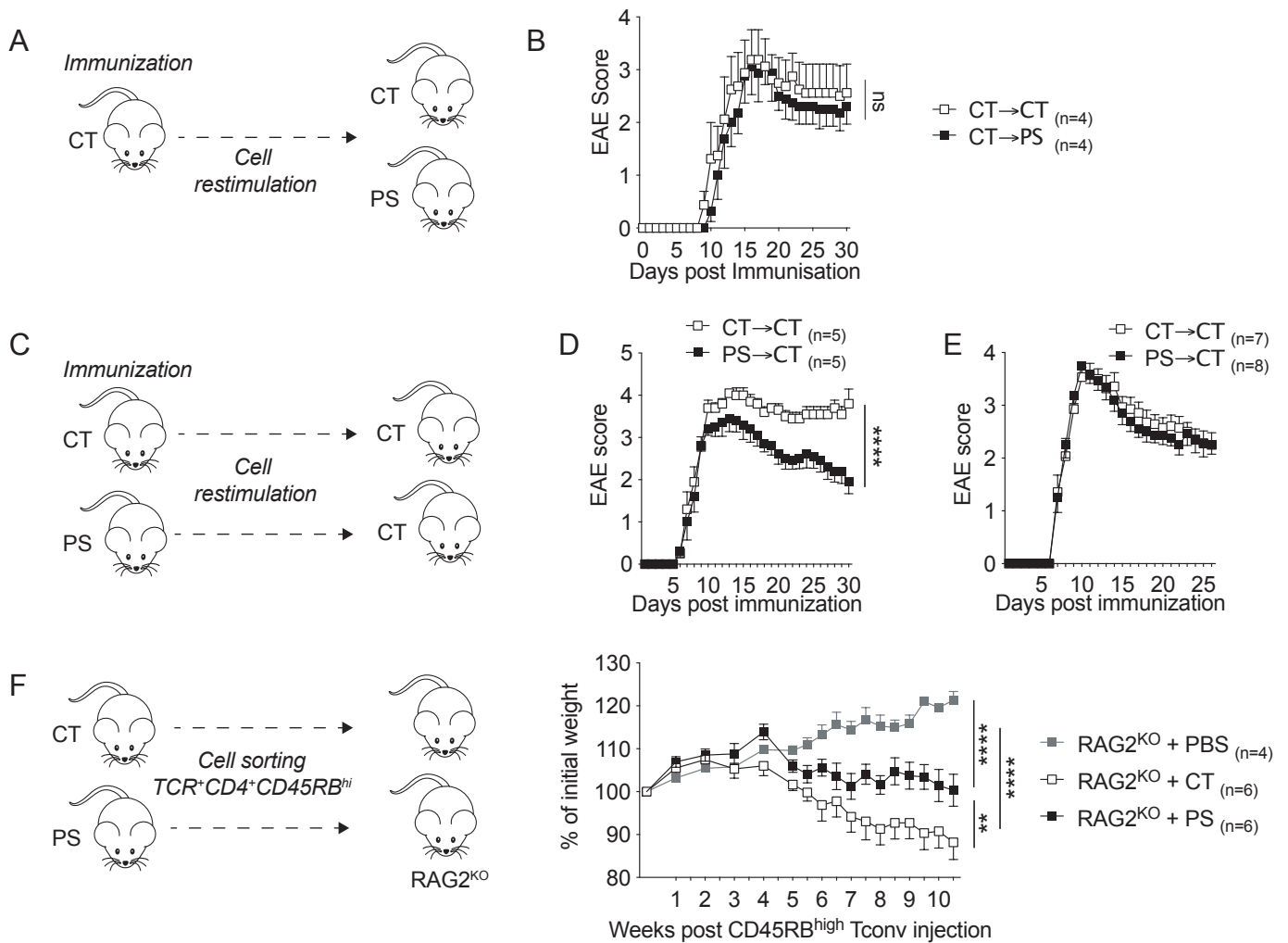


Figure 5. Le stress prénatal impacte la fonction des LT CD4

A-E) Expériences d'EAE passives par transferts adoptifs. A,C) Illustration du protocole expérimental utilisé. 10 jours après l'immunisation, les cellules issues des dLN et de la rate sont restimulées en présence de MOG₃₅₋₅₅, d'IL-23 et d'anti-IFN- γ pendant 3 jours. Les cellules vivantes sont ensuite récupérées par gradient de densité et injectées directement (A,B), ou enrichies en LT CD4 avant d'être injectées (C,D,E). F) Les LT CD4 issus des LN et rates de souris CT et PS ont été triés par cytométrie en flux. Les Tconv TCR⁺CD4⁺CD45RB^{high}CD25⁻ triés ont ensuite été injectés à des souris RAG2^{KO}. Les analyses statistiques ont été effectuées par Two-way ANOVA (**<0.01, ****p<0.0001).

Discussion – Le stress prénatal

De nombreuses études ont suggéré chez l'Homme et montré chez la souris un lien entre le PS et le développement de troubles neurologiques, de dysbiose du microbiote intestinal, et de modification de l'activation du système immunitaire (Jašarević et al., 2017; Khashan et al., 2008; Zijlmans et al., 2015). Cependant, l'impact du stress prénatal sur la susceptibilité à l'inflammation du système nerveux central reste très mal caractérisé. Au cours de ma thèse, nous avons montré que le PS induit chez la descendance mâle une réduction de la sévérité de l'EAE, associée à une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires par les Tconv. Nous avons montré que ceci semble indépendant de la fonction des Treg, et pourrait impliquer un défaut d'encéphalitogénicité des Tconv.

Stress prénatal et développement du système immunitaire au cours de la grossesse

Bien que ce soit à différents moments de la gestation en fonction des espèces, le système immunitaire commence à se former *in utero*, à partir de cellules progénitrices hématopoïétiques issues du sac vitellin, et colonisant le foie fœtal (Holladay & Smialowicz, 2000). Un stress gestationnel survenant à ces périodes pourrait à ce titre modifier le développement du système immunitaire. Dans ce sens, le stress que nous effectuons dans notre étude a lieu en fin de gestation, lorsque le SI se développe chez la souris (**Figure 21**) (Merlot et al., 2008). Cependant, contrairement à ce qui a pu être décrit dans d'autres études chez la souris ou le cochon (Merlot et al., 2008; Tuchscherer et al., 2002), nous n'avons pas observé de modification du développement thymique chez les souris PS, que ce soit en termes de nombres absolus de thymocytes ou de répartition des différents stades de développement. Ceci peut être expliqué par la nature du stress étant plus intense dans ces études, contrairement au stress que nous réalisons, celui-ci étant considéré comme un stress modéré. Bien que nous n'ayons pas analysé l'impact du PS sur le répertoire TCR, une étude a montré qu'un ensemble de stress variés quotidiennement n'avait que très peu d'impact sur le répertoire TCR, et ce malgré l'application du stress tout au long de la gestation (Fonte et al., 2019). Finalement, nous n'avons pas observé de modification majeure du nombre de LT CD4, LT CD8, ou de LB dans les OLII chez les souris PS en comparaison avec les souris CT, suggérant là encore que le stress chronique modéré appliqué dans notre étude n'induit pas de défaut de développement du SI.

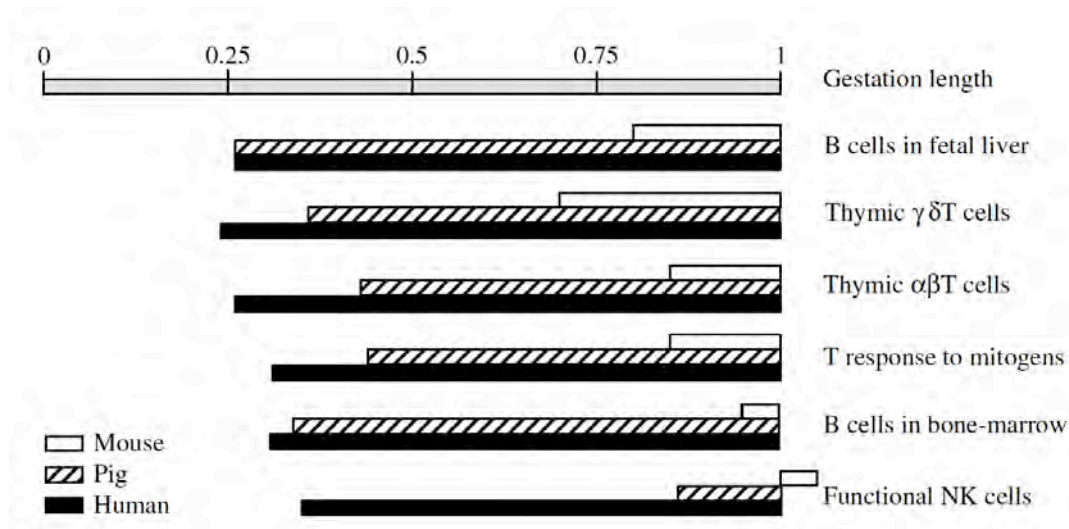


Figure 21. Le développement du système immunitaire lors de la grossesse

Afin de pouvoir comparer facilement les périodes de gestations d'espèces à durée gestationnelle différentes telles que l'Homme (~40 semaines) et la souris (~20 jours), une unité universelle a été proposée, correspondant à des fractions de la durée totale de gestation. Cela permet ainsi de représenter sur une même échelle de temps, les fenêtres de développement de différents paramètres du fœtus tels que les cellules du système immunitaire ici. Issu de [Merlot et al, 2008](#).

Concernant les fenêtres de développement embryonnaire fœtal, et les périodes de stress associés, il est important de mentionner qu'une certaine variabilité existe dans notre modèle. Cette variabilité vient de la détermination arbitraire et généralisée du J0 de gestation, étant le premier des 6 jours de la période d'accouplement. C'est en se basant sur ce J0, que les mères PS sont stressées de J13 à J18. Pour les souris naissant à J19, le stress a effectivement été effectué de J13 à J18, soit sur la période **0.68-0.95**. Or, les naissances sont réparties sur 6 jours (de J19 à J25). Si l'on se base sur une gestation de 19 jours, les souris étant nées à J25 sont donc issues d'un accouplement effectif ayant eu lieu le 6^{ème} jour d'accouplement, et non le 1^{er}. Dans ce cas précis, la mère aurait été stressée de J8 à J13, soit sur la période **0.42-0.68**. Ainsi, suivant le jour de naissance des souriceaux, la mère aurait été stressée à différents moments de la gestation, pouvant théoriquement induire une variabilité dans les analyses réalisées. Cependant, les naissances à J19 ou J25 restent rares, la majorité des souris naissant entre J20 et J22. Cela correspond à des stress théoriques lors des périodes 0.63-0.90 (J20), 0.58-0.84 (J21), et 0.53-0.79 (J22), soit sur un intervalle large allant de **0.53 à 0.90**. Ces informations sont primordiales dans l'interprétation des résultats et la recherche de reproductibilité expérimentale.

Néanmoins, au cours des 3 expériences de suivi clinique de l'EAE réalisées chez les souris mâles dont le pool est représenté dans la partie résultats, aucune différence claire n'a été observée suivant le jour de naissance des souris PS. On observe néanmoins une légère tendance allant vers une diminution de l'EAE chez les souris ayant eu une naissance plus tardive, et donc subit un stress prénatal plus précoce (0.53-0.79), soit, avant l'apparition des premières cellules immunitaires lors de la mise en place des progéniteurs hématopoïétiques (**Figure 21**).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'un stress prénatal effectué lors de la 2^{ème} moitié de la gestation induit une diminution de la sévérité de l'EAE, indépendamment du moment du stress, et indépendamment d'un trouble de développement des LT.

Modulation de la fonction du système immunitaire suite au stress prénatal

Bien que suite au PS les nombres de cellules immunitaires T et B restent inchangés dans les LN et la rate chez les souriceaux adultes, nous avons observé dans certains cas l'apparition de populations de Tconv et de Treg minoritaires mais semblant être hautement activées. La pertinence de ces populations reste à déterminer, mais leur présence suggère un possible impact du PS sur l'activation et/ou la fonction des LT CD4. De plus, nous avons montré que l'injection de LT CD4 naïfs CD45RB^{hi}CD25⁻ entraînait une colite moins sévère chez les receveurs RAG2^{KO}, indiquant que le PS n'induit pas seulement l'apparition de populations de LT CD4 activés, mais module aussi intrinsèquement le potentiel inflammatoire des LT CD4, même naïfs. Il serait dans ce sens nécessaire d'étudier plus en profondeur l'impact du PS sur la fonction des LT CD4 à l'état basal dans notre modèle. Il faudrait par exemple analyser la capacité de prolifération des LT CD4 en réponse à divers stimuli (PMA/Ionomycine ; CD3/CD28), mais aussi analyser leur production cytokinique lors de ces stimulations neutres ou en stimulations polarisantes de type Th1, Th2 ou Th17. Ceci est d'autant plus important qu'un biais de la réponse immune vers la réponse Th2 a été décrit ([Entringer et al., 2008](#); [T. G. O'Connor et al., 2013](#)). De plus, nous observons lors de l'EAE une réduction de la production de cytokines de type Th1, sans différence sur les cytokines de type Th17, suggérant que le stress n'induit pas une inhibition générale du SI mais au contraire des effets spécifiques. Nous n'avons en revanche observé aucun impact du stress prénatal sur la réponse Th2. Ceci pourrait cependant être dû au fait que nous ayons analysé la production de cytokines au cours de l'EAE, suite à une immunisation avec du CFA, étant connu pour induire une réponse Th1/Th17 et non Th2. Il reste envisageable qu'en condition non-polarisante, ou en condition pro-Th2, les LT CD4 se différencient plus efficacement en Th2. Dans ce contexte, il serait intéressant de tester

la susceptibilité des souris PS aux manifestations allergiques impliquant des adjuvants pro-Th2 comme l'Alun.

La différence de production de cytokines ainsi observée pourrait être intrinsèque et/ou extrinsèque aux LT. Il a par exemple été montré que le biais vers la réponse Th2 pouvait être extrinsèque aux LT, résultant d'un biais de l'activation par les DC issues des souris PS, induisant dans ce contexte une pathologie inflammatoire au niveau des poumons (Pincus-knackstedt et al., 2006). Afin d'analyser si dans notre modèle les DC des souris CT et PS ont des capacités différentes d'activation et d'induction de la différenciation des LT CD4, des LT CD4 2D2 (ayant un TCR transgénique spécifique du peptide MOG) ont été injectés aux souris CT et PS avant de les immuniser. Cette expérience est en cours, et devrait apporter des précisions quant à l'impact du PS sur la fonction des DC et ainsi sur l'activation des LT CD4. Néanmoins, même si nous observons des différences entre les 2D2 activés chez les souris CT et ceux activés chez les souris PS, cela confirmera seulement que des facteurs extrinsèques aux LT CD4 sont impactés par le PS et modulent l'activation des LT CD4. En effet, ces facteurs pourraient concerner les DC, mais aussi une autre population cellulaire interférant avec l'activation des LT CD4 2D2. Dans ce contexte, nos résultats suggèrent cependant que les Treg ne sembleraient pas jouer ce rôle, puisque nous avons montré que leur fonction suppressive *in vitro* est inchangée suite au PS, et que leur déplétion *in vivo* ne change pas le phénotype observé de réduction de l'EAE. Ces résultats n'excluent cependant pas totalement une possible implication des Tregs CD25⁻ puisque nos études ont été focalisées sur la population de Treg CD25⁺, la seule à pouvoir être triée ou déplétée sans recourir à des manipulations génétiques. Dans ce sens, nous pourrions réaliser les expériences de stress prénatal sur les souris Foxp3-Thy1.1 que nous avons maintenant en notre possession, ce qui permettrait d'analyser plus efficacement la fonction des Tregs totaux, mais aussi des Tregs tissulaires suite à l'inflammation.

Dysbiose du microbiote fœtal

Comme discuté précédemment (partie IV.3.b.iii), le microbiote est intimement lié au système immunitaire de son hôte. De plus, il a été montré à de nombreuses reprises et dans diverses espèces que le stress prénatal induisait une modification du microbiote intestinal (Aatsinki et al., 2020; Bailey et al., 2004; Golubeva et al., 2015; Jašarević et al., 2017; Zijlmans et al., 2015). En accord avec cette littérature, nos collaborateurs de l'Institut de la Recherche sur la Santé Digestive (IRSD) ayant mis en place le modèle de stress prénatal sur lequel j'ai travaillé durant ma thèse, ont montré dans une étude dont je suis cosignataire que ce protocole induit lui aussi

une dysbiose du microbiote fécal de la descendance ([Petit-Fils et al., under review](#)). Ils ont ainsi observé chez les mâles comme chez les femelles, une diminution de la diversité globale du microbiote, ainsi qu'une diminution de la présence de *Lactobacillus animalis/murinus*. La diminution de ce *Lactobacille* serait responsable de l'hypersensibilité viscérale observée chez les souris PS dans cette étude, possiblement du fait de sa production de lipopeptides analgésiques (C12 et C14asnGABA).

Cette observation peut sembler en désaccord avec une réduction de l'EAE, puisque de multiples études ont associé la présence de *Lactobacille* avec une diminution de la sévérité de l'EAE ([Duc et al., 2019](#); [Lavasani et al., 2010](#); [Mangalam et al., 2017](#)), mécanisme semblant dépendant de l'induction de Treg, de la production d'IL-10 et de l'inhibition des réponses Th1 et Th17 ([Lavasani et al., 2010](#)). Cependant, bien que le *L. animalis/murinus* soit présent en quantité réduite chez les souris PS, d'autres *Lactobacilles* semblent au contraire légèrement augmentés, corrélant alors avec la clinique de l'EAE (**Figure 22**). De plus, les *Lactobacilles* décrits comme étant bénéfiques dans la première étude sont les *L. paracasei* et *L. plantarum*, et non le *L. animalis/murinus* ([Lavasani et al., 2010](#)) (non précisé dans les deux autres études).

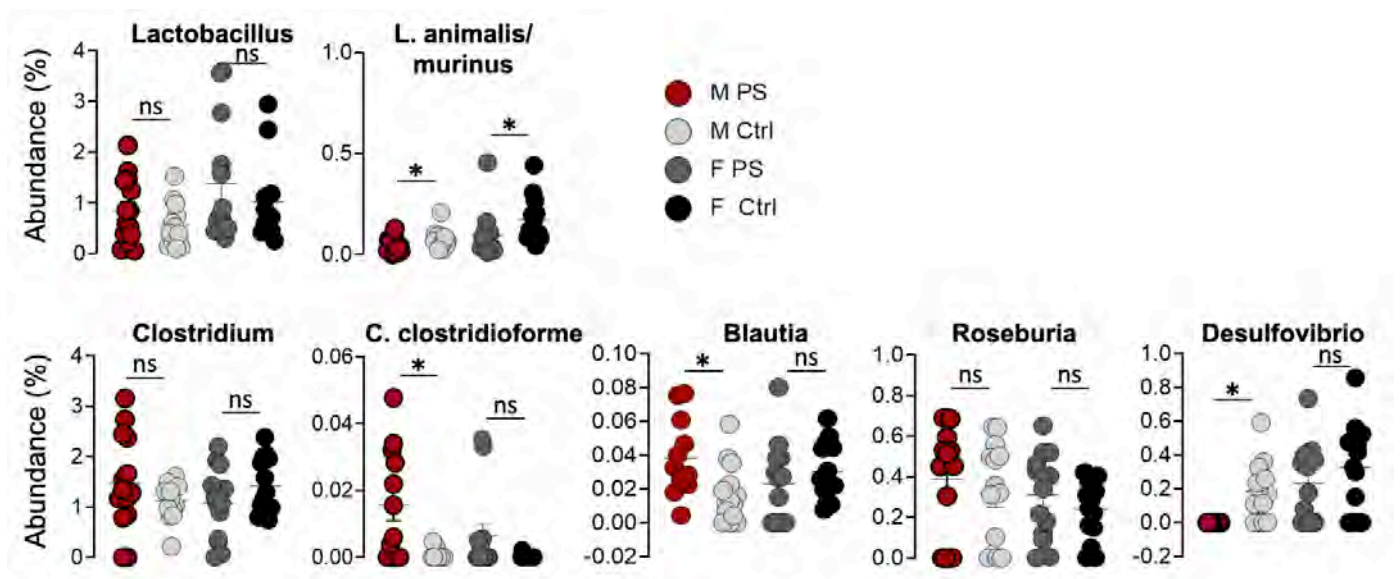


Figure 22. Dysbiose du microbiote fécal de la descendance suite au stress prénatal

Les fèces de souris CT ou PS âgées de 8 semaines ont été prélevées et directement congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à l'analyse. L'ADN des échantillons a ensuite été prélevé puis séquencé au niveau du gène codant l'ARN ribosomique 16S. Les séquences obtenues ont par la suite été croisées avec celles présentes dans des bases de données afin de déterminer les souches bactériennes présentes dans les échantillons testés. (Adapté des travaux du Dr. Petit-Fils)

Le phénotype observé au sein de l'étude de Petit-Fils et collaborateurs touche les mâles comme les femelles, justifiant la recherche de modification de microbiote commune aux 2 sexes. Or, dans le cas présent, seuls les mâles sont impactés. Nous avons donc regardé avec l'aide du Dr Petit-Fils au sein des données de séquençage 16S si l'abondance de bactéries évoluait de manière sexe-dépendante suite au PS, comme récemment décrit dans la littérature (Rincel et al., 2019). Nous avons ainsi observé des modifications de l'abondance de plusieurs bactéries appartenant au groupe « Clostridium Cluster XIVa », comprenant notamment *C. clostridioform*, *Blautia*, ou encore *Roseburia* (Figure 22), étant des bactéries communément associées à la santé du tractus digestif (Hollister et al., 2014), et dont les tendances de modification d'abondance sont plus marquées chez les mâles que chez les femelles, voire inversées. On observe ainsi une augmentation du pourcentage de *Blautia* chez les mâles PS par rapport aux mâles CT, tandis que cette bactérie est plutôt diminuée chez les femelles suite au stress. Il a été montré que cette bactérie est diminuée chez les patients SEP, que sa présence corrèle positivement avec les fonctions motrices et cognitives des patients, et négativement avec leurs états de fatigue et dépression (Cox et al., 2021). De plus, il a été montré que cette bactérie est diminuée chez la souris suite à l'induction d'EAE (X. L. Li et al., 2019) et qu'elle est inversement corrélée avec des marqueurs inflammatoires dans les fèces d'enfants obèses, suggérant un rôle dans le contrôle de l'inflammation (Benítez-Páez et al., 2020). On retrouve aussi chez les mâles PS une augmentation de *Roseburia*, dont la variation est moins marquée chez les femelles PS. *Roseburia* est une bactérie produisant du butyrate, un acide gras à courte chaîne aux propriétés anti-inflammatoires illustrées notamment par l'induction de Treg (Arpaia et al., 2013) et dont l'administration à des souris permet de protéger de l'EAE, possiblement grâce à la stimulation de la maturation des oligodendrocytes (T. Chen et al., 2019). Il a par ailleurs été montré que cette bactérie est aussi diminuée chez les patients SEP (Levi et al., 2021). *C. Clostridioform*, la 3^{ème} des bactéries appartenant au cluster XIVa citées ici, semble aussi être liée à l'EAE puisque sa présence est diminuée suite à l'immunisation (Bianchimano et al., 2021), mais son rôle reste à déterminer. Finalement, le PS induit une forte déplétion des bactéries *Desulfovibrio* chez les mâles, bactéries impliquées dans le métabolisme des cystéines, et dont la présence est augmentée au sein des patients SEP (Tremlett et al., 2016). L'augmentation de l'abondance de ces bactéries peut entraîner une diminution du taux de cystéines disponibles, pourtant nécessaire à la formation du glutathion, puissant antioxydant impliqué notamment dans l'inhibition des ROS au niveau du SNC (Dopkins et al., 2018). Ces études suggèrent ainsi une potentielle implication de la dysbiose du microbiote intestinal dans la réduction de la sévérité de l'EAE chez les souris PS, possiblement en contrôlant la

réponse inflammatoire directement (inhibition Th1, induction Treg), en permettant l'inhibition des ROS toxiques produites par les cellules myéloïdes (glutathion), ou encore en stimulant la remyélinisation (stimulation des oligodendrocytes). Cependant, cette caractérisation du microbiote fécal des souris PS a été réalisée en absence d'EAE. Il serait alors intéressant d'analyser si ces différences persistent, diminuent ou s'accroissent suite à l'immunisation, mais aussi d'analyser si l'abondance d'une ou de plusieurs de ces bactéries (avant immunisation ou au cours de l'EAE) corrèlent avec la sévérité de l'EAE au sein d'une même souris. En effet, nous avons d'ores et déjà prélevé les fèces des quatre groupes de souris avant l'immunisation, puis à J8, J15 et J30. La réalisation de séquençage sur ces prélèvements permettrait d'approfondir la compréhension de l'impact du stress prénatal sur la dysbiose intestinale et de son lien avec la sévérité de l'EAE. De plus, il serait intéressant de corréler ces observations avec une analyse des métabolites présents dans le sérum ou dans les fèces des souris. Ceci pourrait amener à l'identification de nouveaux métabolites bactériens ayant une action bénéfique contre le développement de l'EAE, et possiblement de la SEP. Afin de tester cette hypothèse, ces métabolites seraient alors testés pour leur effet préventif ou curatif lors de l'EAE.

Hormis ces effets « directs » du microbiote ayant lieu au cours de l'EAE, le microbiote et sa modification peuvent aussi avoir des conséquences sur le développement du système immunitaire et son éducation lors des premières semaines de vie, et ce notamment lors de la phase de « weaning reaction » (ou réaction post-sevrage) (Al Nabhani et al., 2019). Lors de cette étude, les auteurs montrent que lors du sevrage, le changement d'alimentation des souris induit un changement de microbiote entraînant une réaction inflammatoire (la « weaning reaction »), nécessaire à l'éducation du système immunitaire, notamment *via* l'induction de Treg. La perturbation de cette réaction est associée avec un risque accru de développer des pathologies inflammatoires par la suite chez ces souris (Al Nabhani et al., 2019). Il serait ainsi théoriquement envisageable qu'à l'inverse, la dysbiose du microbiote chez les souris PS impacte positivement la réaction immunitaire lors du sevrage et module ainsi plus efficacement l'activation ultérieure du système immunitaire.

Modulation du système immunitaire par les hormones de stress

Depuis leur découverte dans les années 1940, le rôle immunosuppresseurs des glucocorticoïdes (GC) a été largement décrit et étudié (Coutinho & Chapman, 2011), étant par ailleurs utilisés comme traitement chez les patients SEP (H. J. Fischer et al., 2019; Milligan et al., 1987). Il a

été montré que le PS pouvait induire une modification de l'axe HPA chez la descendance, entraînant dans certains cas un taux basal plus élevé de GC circulants et une inhibition du rétrocontrôle négatif, induisant une réponse plus forte et plus longue à un stress aigu, en comparaison avec les animaux CT (Darnaudéry & Maccari, 2008; Maccari et al., 2003; Van Bodegom et al., 2017). De façon importante, il a été montré que ces différences peuvent disparaître lorsque les animaux PS subissent un stress chronique une fois adulte (Van Bodegom et al., 2017). Le PS modéré appliqué dans notre étude n'induit pas d'augmentation basale de la concentration plasmatique de corticostérone, que ce soit chez les mâles ou chez les femelles PS (Petit-Fils et al., under review). Ainsi, les GC plasmatiques à l'état basal ne sembleraient pas pouvoir expliquer les différences observées entre souris CT et PS. Nous n'avons cependant pas analysé la réponse au stress chez ces souris. Il est envisageable que la manipulation des souris (enfermement dans la chambre à isoflurane pour anesthésie) soit une source de stress plus importante chez les souris PS, engendrant de plus forts taux de GC sur un temps plus long, inhibant ainsi la réponse inflammatoire nécessaire à l'induction de l'EAE. Dans ce sens, tout comme l'application d'un stress chronique élimine les différences de réponse à un stress aigu (Van Bodegom et al., 2017), il semblerait qu'un stress chronique puisse abroger les différences de sévérité de l'EAE entre mâles CT et mâles PS. En effet, bien que cela n'ait été réalisé qu'une seule fois, le passage de mâles PS d'une grande cage de 10 animaux à une petite cage de 5 animaux, cumulé à un changement de pièce d'hébergement, s'est traduit par une absence de différence clinique suite à l'immunisation, suggérant que l'application d'un stress chez les souris PS adultes est suffisante pour masquer les différences entre souris CT et PS. Ceci reste cependant à confirmer, d'autant que l'effet du stress sur l'EAE n'est pas complètement compris, semblant induire une augmentation de la sévérité de l'EAE lors de stress aigus et une diminution de la maladie lors de stress chroniques (Pérez-Nievas et al., 2010).

Effet du PS indépendant du système immunitaire ?

Le microbiote et les hormones de stress peuvent aussi avoir des répercussions sur des composantes extérieures au système immunitaire. Il a par exemple été décrit que les GC pouvaient réduire la perméabilité de la BHE en augmentant l'expression de l'occludine et de ZO-1, augmentant ainsi les jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Les GC induisent aussi une réduction de l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) (Salvador et al., 2014). De même, il a été montré que le microbiote est lui aussi associé à la perméabilité de la BHE, et ce, même avant la naissance. Une étude a en effet montré une augmentation de la perméabilité de la BHE associée à une réduction de l'expression de l'occludine chez les fœtus

issus de souris germ-free (Braniste et al., 2014). Ce défaut d'imperméabilité de la BHE est par ailleurs maintenu chez les souris adultes. Il est par contre réversible par reconstitution de leur microbiote *via* l'apport de microbiote de souris pathogen-free, mais aussi par l'apport de souche bactérienne unique telle que *Clostridium tyrobutyricum* (bactérie productrice de butyrate) ou encore *via* l'apport direct de butyrate (Braniste et al., 2014).

De plus, une étude récente a montré que le stress prénatal induit une augmentation de la sévérité de l'EAE chez les souris femelles, qui serait due selon eux à une réduction de la quantité de BDNF (Brain Derived Neurotrophic factor) entraînant un défaut de maturation des oligodendrocytes chez les souris PS (Paladini et al., 2020). Ainsi, il apparaît que la modulation du microbiote ou de l'axe HPA pourrait moduler la susceptibilité des souris PS à l'EAE, indépendamment d'un effet direct sur le système immunitaire. De plus, la diminution d'un facteur neurotrophique (BDNF) suite au PS semble conférer une sensibilité accrue à l'EAE. Néanmoins, les expériences d'EAE passive par transfert adoptif que nous avons réalisées ne montrent aucune différence entre les souris CT et les souris PS concernant leur sensibilité à l'EAE. Cela laisse supposer que les différences de microbiote, d'activation de l'axe HPA, ou encore que des facteurs neurotrophiques ne sont pas responsables à eux seuls de la réduction de la sévérité de l'EAE, indépendamment du SI. En accord avec ces observations, nous avons montré lors d'une expérience que l'injection de LT CD4 de souris PS pré-activés *in vivo* et restimulés *in vitro* induisait une EAE plus faible au sein de souris CT, en comparaison avec des LT CD4 de souris CT. Bien que ces résultats n'aient pas été confirmés lors d'une seconde expérience, l'ensemble de nos résultats suggère que le PS induit une réduction de l'EAE de par un effet sur le SI, plutôt que *via* une résistance intrinsèque des organes cibles uniquement. Nous avons de plus montré que les LT CD4 naïfs semblent avoir une modification intrinsèque de leur colitogénicité suite à l'injection dans des receveuses RAG2-KO.

L'apparente contradiction des résultats entre l'article (Paladini et al., 2020) et notre étude ne peut être expliquée par l'espèce ou le type de stress puisque nos deux modèles sont identiques. Hormis une période de stress légèrement différente (J16 à J19), quatre différences majeures subsistent. Premièrement, les auteurs n'utilisent dans cette étude que les souris femelles, et ne décrivent pas ce qu'il se passe chez les souris mâles, là où nous observons le plus large effet. Deuxièmement, j'ai réalisé plusieurs expériences pour mettre en place les conditions d'immunisation en termes de quantité de MOG₃₅₋₅₅, de CFA et de PTX nécessaires à l'observation du phénotype. Les doses utilisées dans cette étude sont 6 fois plus concentrées pour le peptide MOG, 16 fois plus concentrées pour le CFA, et 5 fois plus élevées pour la PTX que les doses que nous utilisons ici. Troisièmement, les souris sont achetées déjà gestantes et à

J14 de gestation dans cette étude. Les souris CT tout comme les souris PS subissent donc probablement un stress lors du transport entre le fournisseur et le laboratoire, mais aussi du fait du changement d'environnement. Finalement, indépendamment de tous protocoles expérimentaux, l'environnement, la nourriture, les enrichissements, font que le microbiote des souris diffère d'une animalerie de laboratoire à une autre, et pourrait impacter différemment les phénotypes étudiés.

En conclusion, notre étude montre que le stress prénatal module la susceptibilité de la descendance à développer une inflammation du système nerveux central, ceci étant associé à une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires par les LT CD4 auto-spécifiques. Nous avons observé en parallèle une dysbiose intestinale, dont des souches bactériennes ont d'ores et déjà été décrites au cours de la SEP ou de l'EAE, suggérant que la modulation de ces bactéries par le PS pourrait expliquer en partie le phénotype observé. Si cela est confirmé, cette étude serait la première à établir un lien entre stress prénatal, dysbiose intestinale, activation du système immunitaire et inflammation du système nerveux central.

La pertinence de cette étude chez l'Homme reste difficile à appréhender, tant le stress prénatal est un sujet particulièrement complexe à étudier. Bien qu'aucune étude n'ait à ce jour établi un lien entre PS et susceptibilité à développer la SEP, le lien entre PS et dysbiose a quant à lui été observé chez l'Homme. Il serait alors intéressant d'analyser si, comme chez la souris, la nature de cette dysbiose diffère entre mâles et femelles. Dans un contexte d'épidémiologie auto-immune où les femmes sont surreprésentées, dans une société où le stress (et le stress prénatal) est prépondérant, il est envisageable qu'en plus des différences hormonales et génétiques (inactivation du chromosome X), le stress prénatal soit lui aussi responsable des différences de susceptibilités aux maladies auto-immunes entre les femmes et les hommes.

Discussion générale

La sclérose en plaques est une maladie complexe dont l'étiologie multifactorielle est encore mal connue. Étant une maladie auto-immune, il n'est pas étonnant que la majorité des facteurs génétiques impliqués dans son développement concerne des gènes nécessaires au fonctionnement du système immunitaire. Cependant des facteurs environnementaux modulent eux aussi la susceptibilité à cette pathologie. Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'implication du stress prénatal dans la susceptibilité à l'EAE et j'ai montré que ce facteur environnemental diminue la sévérité de l'EAE chez la descendance mâle. De façon intéressante, nos travaux montrent que cet impact du stress prénatal est dépendant de la modulation de la fonction des LT CD4, semblant être impactés intrinsèquement par le stress prénatal. Ainsi, que ce soit les facteurs génétiques étudiés au cours de ma thèse, ou ce facteur environnemental, tous semblent moduler la susceptibilité à l'inflammation du SNC par des mécanismes convergeant vers des paramètres similaires. En effet dans ces deux projets, nous avons observé une diminution de la production cytokinique par les LT CD4, et une réduction de leur infiltration dans le SNC.

Ces résultats illustrent ainsi la complexité de la compréhension de ce type de maladies, au sein desquelles l'association d'un ensemble de facteurs peuvent agir positivement ou négativement sur des paramètres communs, modulant alors la susceptibilité du sujet à développer la pathologie. Ceci concorde avec l'hypothèse actuelle que les maladies auto-immunes, et en l'occurrence la SEP, se développent chez des individus génétiquement prédisposés, ayant subi certaines pressions environnementales. Ce serait alors la somme des effets génétiques et environnementaux qui en convergeant vers des paramètres similaires et/ou complémentaires, permettrait de franchir ou non le seuil nécessaire au développement de la pathologie.

Dans ce sens, le stress prénatal et les glucocorticoïdes qui en découlent peuvent directement moduler la perméabilité de la BHE (Salvador et al., 2014), paramètre pouvant aussi être indirectement impacté par des facteurs génétiques comme les mutations sur Vav1 et Themis1 qui entraînent une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires.

De la même manière, les facteurs génétiques modulant la production de cytokines telles que l'IL-17 pourraient moduler le microbiote intestinal (Regen et al., 2021), ce qui serait susceptible d'être amplifié ou modifié par l'ajout de stress prénatal.

Finalement, le stress prénatal semblerait ne pas être un facteur purement environnemental, mais être aussi impacté par la génétique. En effet, une étude portant sur une cohorte de femmes ayant eu recours à la fécondation *in vitro* avec des embryons génétiquement associés ou non à la mère porteuse, a permis de montrer qu'une partie des effets du stress prénatal semblait dépendre de facteurs génétiques transmis à la descendance (Rice et al., 2010). De plus, tout comme les facteurs génétiques, l'impact du stress prénatal sur la descendance pourrait être transmis aux générations futures (Mattews & Phillips, 2012), possiblement au travers de modifications épigénétiques (Danaudéry & Maccari, 2008 ; Mattews & Phillips, 2012 ; Kim et al., 2021). Dans ce sens, une étude a justement montré que l'activation du système immunitaire de la mère lors de la gestation entraînait chez la descendance une modification des verrouillages épigénétiques au sein des LT CD4 (Kim et al., 2021), illustrant là encore le lien entre période prénatale, génétique/épigénétique, système immunitaire et conséquences physiopathologiques.

Dans l'ensemble, mes travaux de thèse indiquent que l'amélioration de la compréhension de l'étiologie de la sclérose en plaques doit maintenant passer de l'étude simple de facteur génétique unique à l'étude combinée de différents facteurs génétiques ensemble, pouvant révéler des interactions épistatiques. De plus, mes travaux montrent que la transmission verticale de la susceptibilité à la sclérose en plaques de la mère à l'enfant ne concerne pas uniquement la transmission génique, mais aussi la transmission de facteurs encore non déterminés, véhiculant les effets du stress prénatal.

Annexes

Article accepté (in press) :

THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 responses by promoting TCR-independent signals

Cui Yang, Gaëtan Blaize*, **Rémi Marrocco***, Nelly Rouquié*, Cyrielle Bories, Mylène Gador, Suzanne Mélique, Emeline Joulia, Mehdi Benamar, Anne S. Dejean, Hélène Daniels-Treffandier, Paul E. Love, Nicolas Fazilleau, Abdelhadi Saoudi, Renaud Lesourne

Article soumis (under review) :

Identification of bacterial lipopeptides as key players in prenatal stress-induced visceral pain

Camille Petitfils*, Sarah Maurel*, Gaëlle Payros, Amandine Hueber, Bahija Agaiz, Geraldine Gazzo, **Rémi Marrocco**, Frédéric Auvray, Geoffrey Langevin, Jean-Paul Motta, Pauline Floch, Marie Tremblay-Franco, Jean-Marie Galano, Alexandre Guy, Thierry Durand, Simon Lachambre, Justine Bertrand Michel, Abdelhadi Saoudi, Eric Oswald, Pierrick Poisbeau, Gilles Dietrich, Matteo Serino, Pauline le Faouder, Nicolas Cenac.

Article en cours de finalisation :

Eomes transcription factor controls mitochondrial metabolic adaptation and long-term pathogenic CD4 T cells survival during central nervous system inflammation.

Emeline Joulia, Michaël F Michieletto, Arantxa Agesta, Cindy Peillex, Virginie Girault, Anne-Louise Le Dorze, **Rémi Marrocco**, Manuel Lebourrier, Rafael J. Argüello, Abdelhadi Saoudi, Marion Szelechowski, Thierry Walzer, Jean-Emmanuel Sarry, and Anne S Dejean

THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 responses by promoting TCR-independent signals

Cui Yang¹, Gaëtan Blaize^{1*}, Rémi Marrocco^{1*}, Nelly Rouquié^{1*}, Cyrielle Bories¹, Mylène Gador¹, Suzanne Mélique¹, Emeline Joulia¹, Mehdi Benamar¹, Anne S. Dejean¹, Hélène Daniels-Treffandier^{1,2}, Paul E. Love³, Nicolas Fazilleau¹, Abdelhadi Saoudi¹, Renaud Lesourne¹

¹ Infinity, Université Toulouse, CNRS5051, INSERM1291, UPS, Toulouse, France.

² Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France.

³Section on Hematopoiesis and Lymphocyte Biology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

* Equally contributed to this work

Correspondence should be addressed to R.L.

Email: renaud.lesourne@inserm.fr

Abstract

Signals that determine the differentiation of naïve CD4⁺ helper T cells (Th) into specific effector subsets are primarily triggered by cytokines but additional signals are required to adjust the magnitude of Th responses and set the balance between effective immunity and immunological tolerance. By inducing a post-thymic deletion of the T-cell lineage signaling protein THEMIS, we show that THEMIS promotes the development of optimal type 1 responses to foreign antigens but triggers signals that in return favour encephalitogenic responses to self neuroantigens. Analysis of THEMIS expression in polarized CD4⁺ T cells show that THEMIS is selectively up-regulated in Th1 cells. THEMIS exerts positive effects on T-BET expression and on IFN γ production and enhances the ability of encephalitogenic CD4⁺ T cells to migrate into the central nervous system. Although the phenotype observed *ex-vivo* on effector CD4⁺ T cells is indicative of positive function of THEMIS on TCR-mediated responses, we show that THEMIS exerts opposite effects on naïve CD4⁺ T cells *in vitro* by inhibiting TCR-mediated signals leading to Th1 responses, indicating that THEMIS exerts TCR independent functions in effector T cells which increase the magnitude of normal and pathogenic Th1-mediated responses.

Introduction

One essential feature of the immune system is its ability to engage distinct defensive strategies adapted to the variety of invading pathogens. This is partially dependent on CD4⁺ helper T cells (Th) which may differentiate from a so-called naïve state into distinct effector subsets (Th1, Th2, Th17, T-follicular helper cells [Tfh], induced-regulatory T cells [iTreg], Type-1 regulatory T cells [Tr1]) with specialized immune functions. The lineage choice decision of Th cells results from the complex integration of signaling events triggered by the T cell antigen receptor (TCR), which recognize self- or foreign-peptide ligands bound to major histocompatibility complex (pMHC) at the surface of antigen presenting cells, and by a combination of cytokine receptors which are stimulated specifically according to the cytokine milieu at the site of CD4⁺ T cell activation (1). In addition to those cell-fate decision signals, additional signaling events triggered by the TCR and by co-stimulatory and co-inhibitory receptors (2) contribute to regulate the magnitude of specific effector responses, promoting thereby effective immunity and preventing the development of potentially pathogenic inflammatory responses.

THEMIS is a T cell lineage-specific protein that has important role during T cell development (3-5). The phenotype of THEMIS deficient mice shows that THEMIS is essential for the positive selection of CD4⁺CD8⁺ (double-positive [DP]) thymocytes (3-5) and for their commitment to the CD4⁺ lineage (5). THEMIS contains a proline-rich C-terminal sequence (PRS), which binds to the adaptor protein GRB2 (5, 6) that is required for the recruitment of THEMIS to the transmembrane adaptor LAT following TCR engagement (5, 6), and two globular cysteine-containing, all- β in THEMIS (CABIT) domains (4), which bind to the phosphatase domains of the tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 (7).

Although THEMIS has been characterized as an important regulator of T cell development more than a decade ago, the mechanism by which it operates in this context has remained the subject to nearly opposite interpretations (8). A first model posits that THEMIS dampens TCR signaling initiated by low-affinity self-peptide-bound MHC (pMHC) interactions, preventing the transmission of a strong signaling response to these stimuli that would trigger negative selection (9). THEMIS is speculated here to function by promoting SHP-1 and SHP-2 phosphatase domain activation and or by facilitating their recruitment to LAT where they are brought into contact with their primary targets (9, 10). This model was mostly deduced from *in vitro* studies in which preselected “naïve” DP thymocytes were stimulated with low-affinity pMHCs tetramers (9). More recently, a second model has been proposed in which THEMIS operates as an enhancer of TCR signaling, which enables thymocytes to reach the threshold for positive selection, avoiding death by neglect (7, 11). THEMIS operates here by blocking the catalytic function of the tyrosine phosphatase SHP-1, which has inhibitory effect on TCR signaling (7). This action is mediated by THEMIS’s CABIT modules, which bind to the phosphatase domain of SHP-1 and promote or stabilize the oxidation of SHP-1’s catalytic cysteine residue, inhibiting the tyrosine-phosphatase activity of SHP-1 (7). In this second model, the enhancing effects of THEMIS on TCR signaling were mainly deduced from *in vivo* observations using TCR-signal sensing mouse models (11) and complementation studies with SHP-1 deficient mice (7). Although the second model is more likely to explain the block of T cell development observed in THEMIS deficient mice and although the repressing effect of THEMIS on SHP-1 and SHP-2 phosphatase activity is based on solid molecular evidences (7), the reasons for the apparently contradictory findings remain unexplained.

The role of THEMIS during thymic selection has been well characterized, yet less is known about its function in peripheral T cells. Conditional disruption of the gene encoding THEMIS at late stage of T cell development using CRE recombinase transgenes driven by the distal *lck*

promoter identified a positive role for THEMIS in controlling peripheral CD8⁺ T cell maintenance (12). The impaired homeostasis of peripheral CD8⁺ T in THEMIS-deficient mice was strongly suggestive of a positive function for THEMIS on tonic TCR signaling and could be rescued by deleting the gene encoding for SHP-1 (12). Interestingly, this effect was restricted to CD8⁺ T cells, since no effect of THEMIS on CD4⁺ T cell function could be detected in that study (12).

In the present study, we identified a positive function for THEMIS in CD4⁺ T cell responses to self and foreign antigens. Post-thymic disruption of the *Themis* gene, using Cre recombinase transgenes driven by the *hCD2* promoter, shows that THEMIS promotes Th1 responses *in vivo* and enhances encephalitogenic responses of CD4⁺ T cells to a neuroantigen in a mouse model of central nervous system (CNS) auto-immunity. Although THEMIS exerts a positive function in Th1 responses following antigen immunization, we show that THEMIS deficiency leads to opposite outcomes following TCR stimulation, suggesting that the inhibitory effects of THEMIS on TCR signaling are overcome during immune responses by additional THEMIS-mediated signals which promote rather than repress T-cell effector function.

Results

THEMIS negatively regulates IFN γ production in polarized Th1 cells by repressing ERK1/2-mediated signaling

To evaluate the post-thymic functions of THEMIS in CD4⁺ T cells, we conditionally disrupted *Themis* gene using two different Cre recombinase transgenes driven by the human *Cd2* and the distal *lck* promoters. Contrary to other *Cd2*- and *lck*-driven transgenes, these constructs are not active in most DP thymocytes and CD4 single positive (CD4SP) thymocytes, but are upregulated mainly after thymic development in peripheral T cells (14, 15). THEMIS expression is comparable in thymocytes from *Themis*^{fl^{ox}/fl^{ox}} (thereafter referred as to *Themis*-T^{WT}) and *Cd2-Cre Themis*^{fl^{ox}/fl^{ox}} (thereafter called *Themis*-T^{KO}) mice but becomes undetectable in peripheral *Themis*-T^{KO} CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. S1A). Since a significant amount of THEMIS was detected in peripheral CD4⁺ T cells from *dLck-Cre Themis*^{fl^{ox}/fl^{ox}} (Fig. S1B), we decided to mainly focus our analysis on the *Cd2*-driven knockout model. Proportions and numbers of DP and SP thymocytes and of peripheral CD4⁺ T cells observed in *Themis*-T^{KO} mice were comparable to those observed in *Themis*-T^{WT} mice (Fig. S1C). The proportions and numbers of lymph nodes and splenic CD8⁺ T cells were slightly reduced in *Themis*-T^{KO} mice (Fig. S1D), confirming previously published findings obtained in the *dLck-Cre Themis*^{fl^{ox}/fl^{ox}} model indicating a role for THEMIS in peripheral CD8⁺ T cell maintenance (12). The absence of THEMIS in peripheral T cells did not affect the proportions and numbers of FOXP3⁺ regulatory T cells (Fig. S1E) and did not significantly modify the percentages of CD62L^{lo}CD44^{hi} memory-like CD4⁺ T cells as compared to that in the *Themis*-T^{WT} group (Fig. S1F).

Since THEMIS has been characterized as a regulator of TCR signaling, we first examined the effect of THEMIS deficiency on CD4⁺ T cell responses induced *in vitro* following TCR triggering with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. The viability and the ability of CD4⁺ T cells to proliferate in response to TCR stimulation were similar in *Themis*-T^{KO} and *Themis*-T^{WT} mice (Fig. 1A). TCR stimulation also resulted in similar expression of the activation markers CD25 and CD69 on CD4⁺ T cells in the two groups of mice but induced a higher expression of CD44 at the surface of *Themis*-T^{KO} mice (Fig. 1B), suggesting that THEMIS may have an inhibitory function on a restricted set of TCR-mediated responses in CD4⁺ T cells. THEMIS deficiency had no impact on the production of IL-2, IFN γ and GM-CSF in a similar stimulating context (Fig. 1C and S2A), indicating that THEMIS does not regulate the secretion of cytokines associated to primary CD4⁺ T cell activation. The absence of THEMIS had minimal impact on

in vitro CD8⁺ T cell responses following TCR stimulation (Fig. S2B, S2C and S2D), confirming previous findings obtained in the *dLck-Cre Themis^{flox/flox}* mouse model (12).

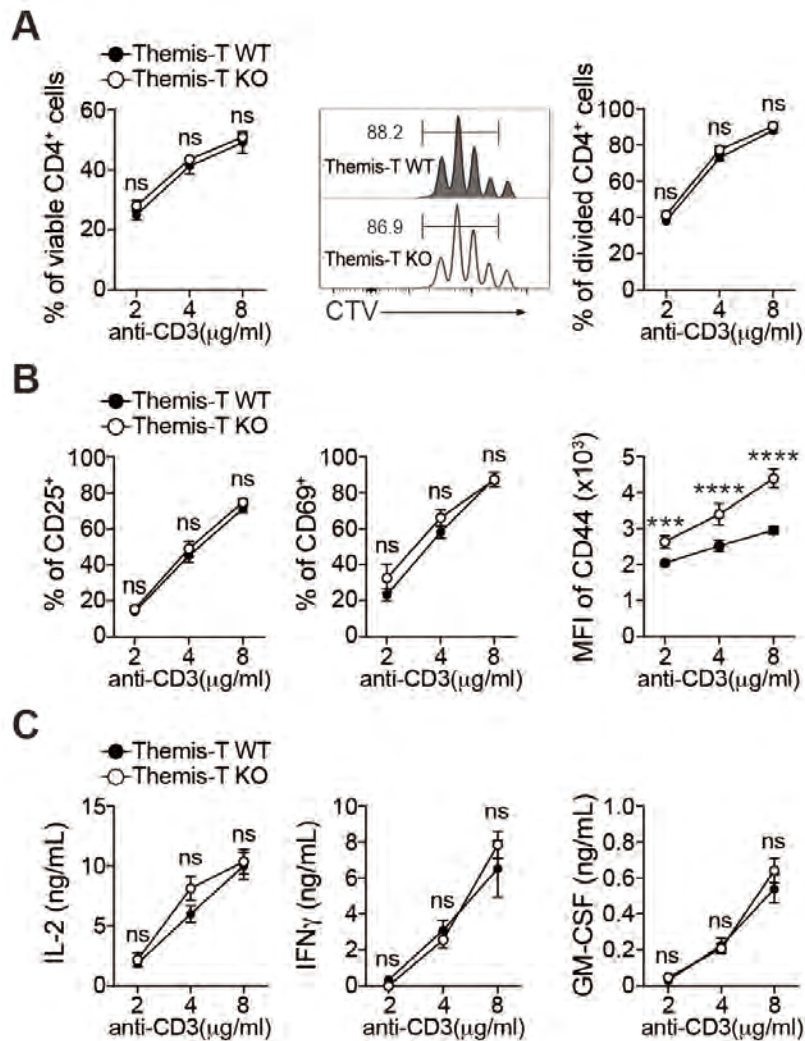


Figure 1. THEMIS deficiency has minimal effect on naïve CD4⁺ T cell responses following TCR stimulation. (A) Naïve CD62L^{high}CD44⁻CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stained with CTV and stimulated with the indicated dose of anti-CD3 antibodies. Curve graphs represent the survival rate (left) and the proliferation (right) of cells determined by flow cytometry at day 3 after stimulation; the histogram graph (middle) shows CTV dilution on viable CD4⁺ T cells. (B and C) Naïve CD62L^{high}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with the indicated dose of anti-CD3 antibodies. (B) Curve graphs represent the percentages of CD4⁺ T cells expressing CD25 (left) and CD69 (middle) as well as the MFI of CD44 staining on CD4⁺ T cells (right). (C) Curve graphs represent the secretion of IL-2 (left), IFN_γ (middle) and GM-CSF (right) measured by ELISA. Data are mean values ± S.E.M and are representative of at least three independent experiments each including n=3-4 mice per group. Unpaired two-tailed Mann-Whitney t test. ***P < 0.001. ****P < 0.0001.

We next investigated whether THEMIS influences the polarization of CD4⁺ T cells into specific effector subsets. We first compared THEMIS expression in CD4⁺ T cells stimulated *in vitro* for three and five days in Th0, Th1, Th2 and Th17 polarizing conditions. THEMIS expression was strongly increased in Th1 cells as compared to that in naïve CD4⁺ T cells and other polarized subsets (Fig. 2A). By contrast, THEMIS expression in Th0, Th2 and Th17 polarized cells was comparable to that in naïve CD4⁺ T cells (Fig. 2A). We next analyzed the impact of THEMIS deficiency on the production of cytokines in CD4⁺ T cells stimulated in Th1, Th2, Th17, iTreg and Tr1 polarizing conditions. We observed that THEMIS deficient CD4⁺ T cells produced significantly higher amount of IFN γ in Th1 polarizing conditions as compared to that in *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells (Fig. 2B). This difference was mostly detected when high doses of anti-CD3 antibodies were used, suggesting that THEMIS could be part of a negative feedback loop that may prevent excessive and potentially detrimental effects of IFN γ . This effect was specifically observed in Th1 polarized cells, since the production of IFN γ was not affected by THEMIS deficiency in Th2 and Th17 polarized cells (Fig. S3A). The production of IL-13, IL-17 and IL-10 by CD4⁺ T cells polarized respectively under Th2, Th17 and Tr1 conditions and the expression of FOXP3 in iTreg-polarized CD4⁺ T cells were also comparable in *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* mice (Fig. 2B, S3B, S3C), indicating that THEMIS selectively represses the production of cytokines in CD4⁺ T cells polarized in the Th1 subset. Accordingly, the absence of THEMIS also led to a moderate increase of TNF α production in Th1 polarized cells (Fig. S3D), although no significant effects were observed on IL-2 secretion in similar experimental settings (Fig. S3E). The transcription factors T-BET and EOMES were expressed at similar level in *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells polarized in Th1 conditions (Fig. 2C), suggesting that THEMIS represses Th1 responses rather than the differentiation program leading to the acquisition of the Th1 lineage.

We next investigated the mechanism by which THEMIS negatively regulates the secretion of cytokines in Th1 cells. The expression level of the IL-12 receptor (IL-12R) and the phosphorylation of STAT4 induced by IL-12 stimulation (16) were comparable in *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells (Fig. S4A and S4B), indicating that the increased secretion of Th1 cytokines in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells was not the consequences of exacerbated IL-12R signaling. Since the binding of IFN γ to its receptor (IFN γ R) triggers a positive feedback loop in Th1 cells (17), we analyzed whether the inhibitory effects of THEMIS on IFN γ secretion were dependent on IFN γ R-mediated signaling. The expression levels of IFN γ R were similar in *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells (Fig. S4C). The production of IFN γ remained increased in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T as compared to that in control cells, when the IFN γ R was

blocked using antagonist antibodies (Fig. S4D), suggesting that THEMIS operates independently of IFN γ R-mediated signaling.

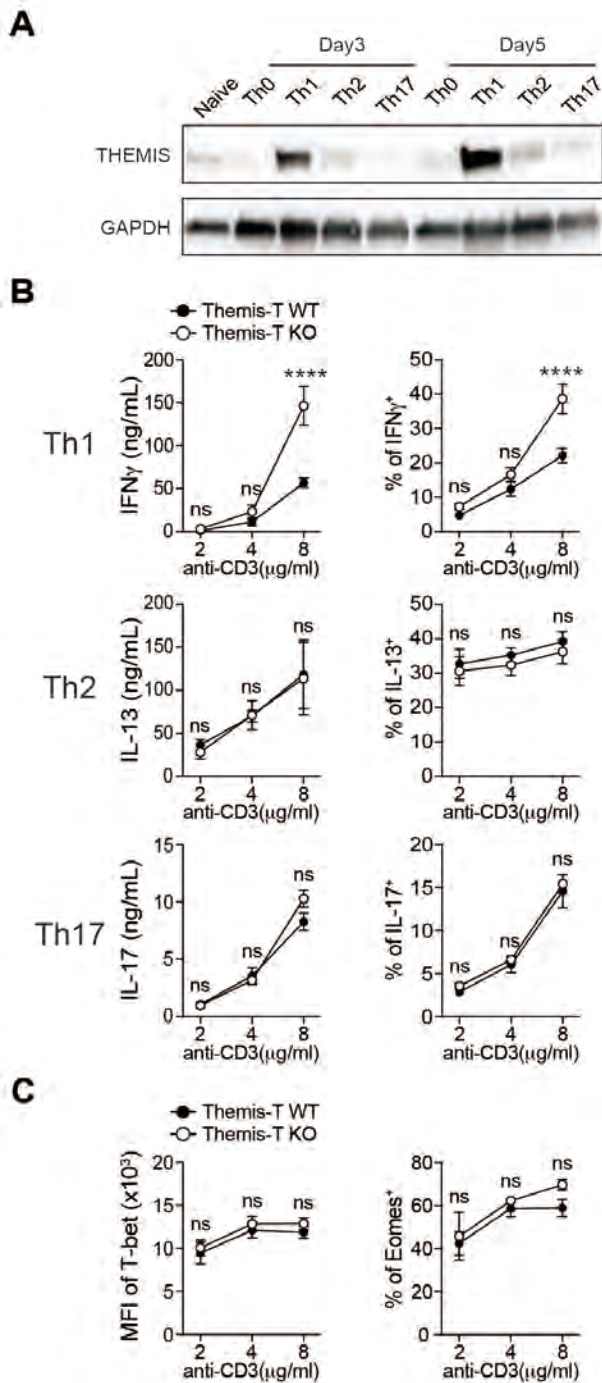


Figure 2. THEMIS negatively regulates the production of IFN γ in Th1 polarized cells. Naïve CD62L^{high}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with various doses of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies in Th0, Th1, Th2 and Th17 polarizing conditions. (A) Total cytoplasmic extracts of naïve and the indicated polarized CD4⁺ T cell subsets were analyzed by Western blotting with antibodies against THEMIS and GAPDH. Bar graphs show the relative abundances of THEMIS as determined by calculating the ratios of the intensities of the bands corresponding to THEMIS to those corresponding to GAPDH, the loading control. Data are representative of one out of two independent experiments. (B) Curve graphs represent the production of IFN γ (upper panels), IL-13 (middle panels) and IL-17 (lower panels) in Th1, Th2 and Th17 polarizing conditions, respectively, analyzed by ELISA (left panels) and by flow cytometry after intracytoplasmic staining (right panels). (C) Naïve CD62L^{high}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with various doses of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies in Th1 polarizing conditions. Curve graphs represent the MFI of T-BET in CD4⁺ T cells (left) and the percentages of CD4⁺ T cells expressing EOMES (right) analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining. Data are mean values \pm S.E.M. and represent of at least 3 independent experiments including n=3-4 mice per group. Unpaired two-tailed Mann-Whitney t test. ****P < 0.0001.

THEMIS deficiency leads to a selective increase of the MAP kinases ERK1/2 phosphorylation following TCR stimulation in thymocytes (9, 11). Since ERK2 enhances selectively the production of Th1 cytokines without affecting T-BET expression (18), we speculated that THEMIS might negatively regulate Th1 responses by repressing ERK2 activity. Confirming

previous observations in thymocytes (9, 11), the phosphorylation of ERK1/2 was increased in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells as compared to that in control cells (Fig. 3A and 3B). In comparison, the presence of THEMIS did not affect the phosphorylation of P38, indicative of specific effect of THEMIS on TCR signaling pathways (Fig. 3A and 3B). The phosphorylation of SHP-1 and SHP-2 were decreased in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells as compared to that in *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells (Fig. 3A), suggesting that THEMIS negatively regulates ERK by regulating those phosphatases. To address whether exacerbated ERK activity could be responsible for the increased production of Th1 cytokines in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells, we next compared the responsiveness of *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells to ERK inhibitor treatments following TCR stimulation of CD4⁺ T cells in Th1 polarized conditions. The production of IFN γ by CD4⁺ T cells was progressively decreased as the doses of the ERK inhibitor U0126 increased, confirming the enhancing effect of ERK1/2-mediated signaling on IFN γ production in Th1 cells (Fig. 3C). By contrast the production of TNF α was not affected by those treatments, indicating that ERK1/2-dependent signals regulate a restricted set of Th1 cytokines (Fig. S4E). Higher doses of inhibitor were required to inhibit by 50% the production of IFN γ in *Themis-T^{KO}* Th1 cells as compared to that in control cells (Fig. 3C), confirming that the increased activity of ERK1/2 enhances the production of IFN γ in *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells.

THEMIS promotes the expression of T-BET and enhances the secretion of IFN γ by antigen specific CD4⁺ T cells

To examine the *in vivo* relevance of those observations, we next analyzed CD4⁺ T cell responses following immunization of *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice with a peptide variant (EAWGALANKAVDKA, called 1W1K peptide hereafter) of the I-E alpha chain immunodominant peptide 52-68 in the presence of the Th1/Th17 polarizing Complete Freund's Adjuvant (CFA). To follow antigen-specific CD4⁺ T cells, we stained cells from the draining lymph nodes with 1W1K-pMHCII tetramer and first analyzed the expression of CD44, T-BET and ROR γ t. The percentages of CD4⁺ T cells expressing high level of CD44 and the percentages of CD44^{hi}CD4⁺ T cells positive for tetramer staining were similar in *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice, indicating that THEMIS does not significantly impact the activation and the clonal expansion of antigen-specific CD4⁺ T cells in this experimental setting (Fig. 4A). The percentages of tetramer⁺CD4⁺ T cells expressing T-BET were decreased in *Themis-T^{KO}* mice as compared to those in *Themis-T^{WT}* mice (Fig. 4B). In comparison, the expression of ROR γ t in tetramer⁺CD4⁺ T cells was similar between *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice (Fig. 4C).

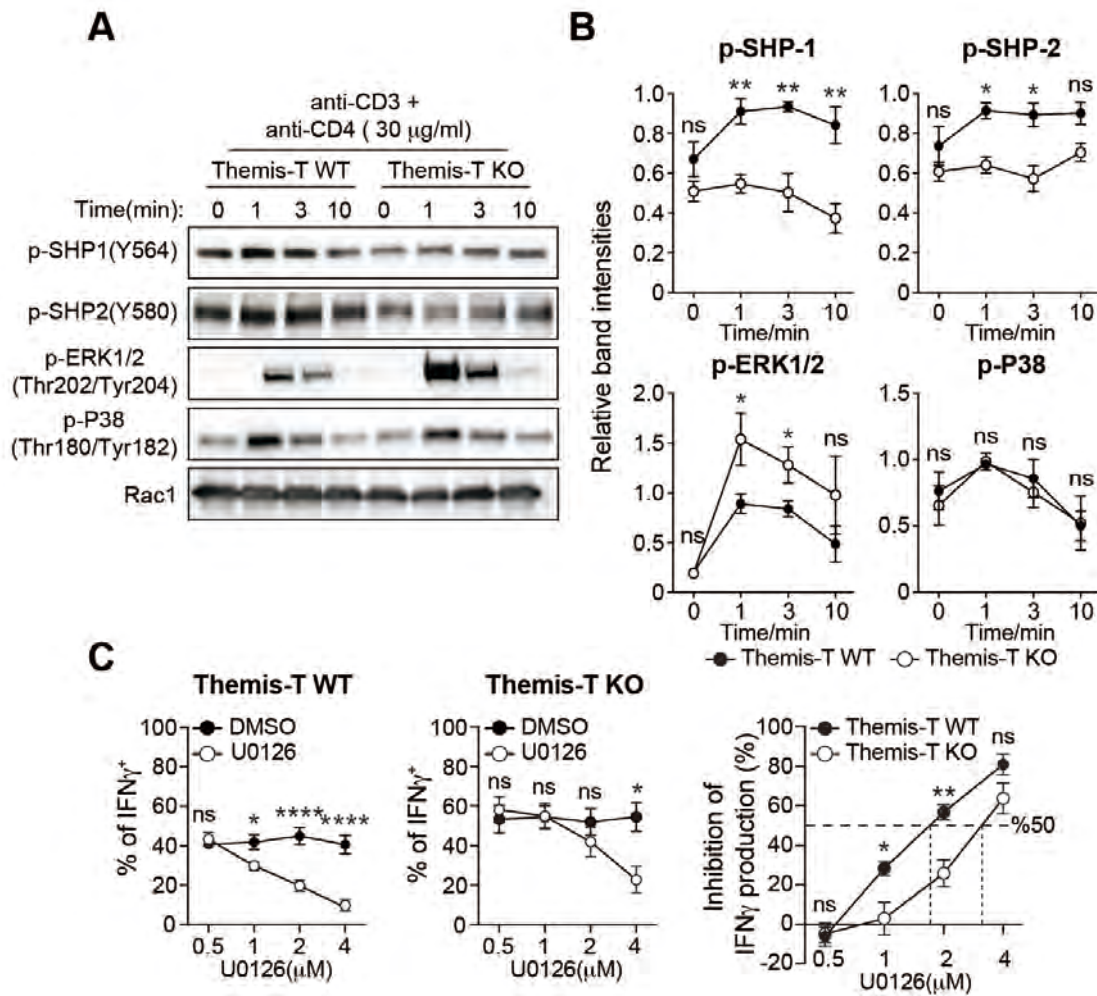


Figure 3. THEMIS represses the production of IFN γ in Th1 cells by negatively regulating ERK-mediated signaling. (A) Total CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated anti-CD3 and anti-CD4 antibodies for the indicated times. Total cytoplasmic extracts of the cells were then analyzed by Western blotting with antibodies against phosphorylated forms of SHP-1 (Y564), SHP-2 (Y580), ERK (T202/Y204) and p38 (T180/Y182). (B) Curve graphs show the relative abundances of the indicated phosphorylated proteins as determined by calculating the ratios of the intensities of the bands corresponding to the phosphorylated proteins to those corresponding to Rac1, the loading control. The y axes represent means \pm S.E.M. of the relative values calculated after normalization to the highest value in the *Themis-T^{WT}* cells. Data are representative of three to five independent experiments, each including one mouse of the indicated genotype. (C) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with anti-CD3 antibodies in Th1 polarizing conditions in presence of the indicated doses of ERK inhibitor (U0126) or DMSO. Left and middle curve graphs represent the production of IFN γ by CD4⁺ T cells analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining. Right curve graph represents the percentages of inhibition of IFN γ produced by CD4⁺ T cells following treatment with the indicated doses of U0126. Data are mean \pm S.E.M. and are representative of one out of three independent experiments each including n=3 mice per group. Unpaired two-tailed Mann–Whitney t test. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

The proportions of antigen-specific CD4⁺ T cells producing IFN γ were decreased in *Themis-T^{KO}* mice in comparison to that in *Themis-T^{WT}* mice, whereas the absence of THEMIS had no significant impact on the percentages of cells producing IL-17 and TNF α in the same experimental conditions (Fig. 4D). Thus, contrasting with results indicating inhibitory effects of THEMIS on CD4⁺ responses in Th1 polarized cells, immunization with a foreign antigen reveals positive effect of THEMIS on the development of type-1 responses.

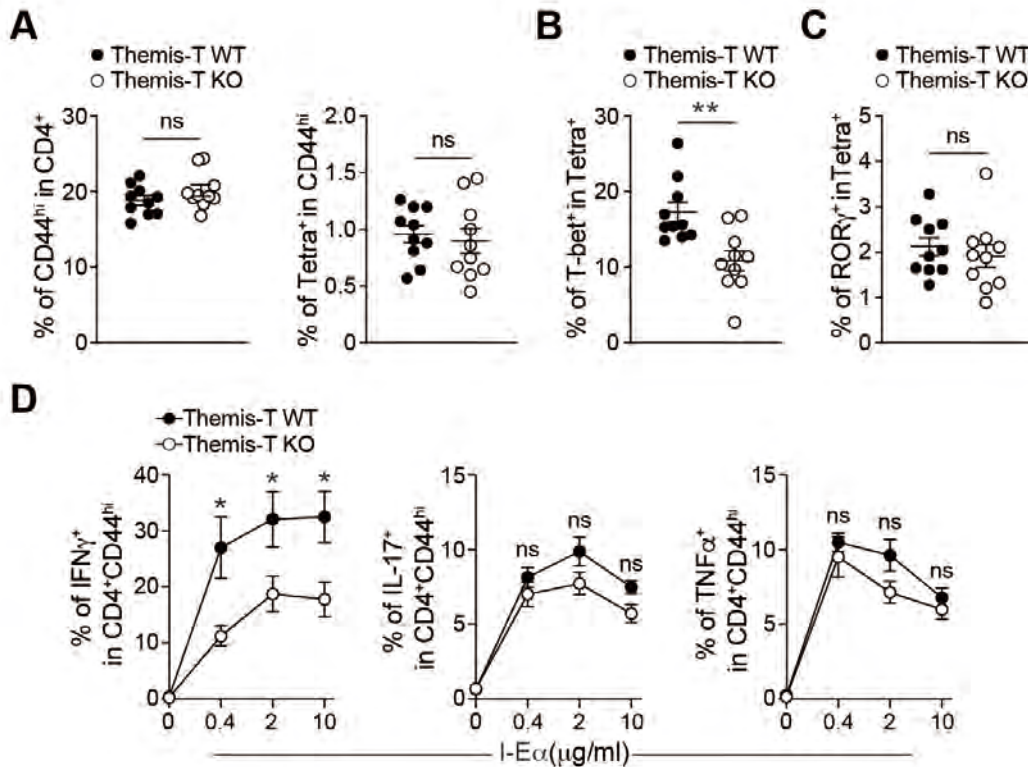


Figure 4. THEMIS enhances Th1 responses to foreign antigens. *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were immunized with 1W1K peptide in presence of CFA. (A) Draining lymph nodes were collected after 9 days and analyzed by flow cytometry after staining of the cells with 1W1K-conjugated MHC tetramers. Graphs represent the percentages of CD44^{hi} among CD4⁺ T cells (left), the percentages of tetramer⁺ cells among CD44^{hi}CD4⁺ T cells (middle left), the percentages of T-BET⁺ (middle right) and ROR γ t⁺ (right) cells among tetramer⁺ cells. (B) At day 9 post-immunization, cells from the draining lymph nodes were re-stimulated *in vitro* with the indicated doses of the 1W1K peptide. Curves graphs represent the production of IFN γ , IL-17 and TNF α in CD44^{hi}CD4⁺ T cells analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining. Data are means \pm S.E.M. and are representative of one out of three independent experiments including n=5 mice per group. Unpaired two-tailed Mann–Whitney t test (A) and multiple t-test (B). *P < 0.05; **P < 0.01.

THEMIS enhances the susceptibility to the development of Central nervous system autoimmunity

Initial studies on THEMIS suggest that it attenuates TCR signal strength in thymocytes in response to low- but not high-affinity TCR engagement (9), suggesting that THEMIS might have a different influence on CD4⁺ T cells responses when cells are stimulated by self rather than foreign antigens. To address this possibility, we examined the effect of THEMIS expression on the development of Experimental Auto-immune Encephalomyelitis (EAE), a well-characterized mouse model of multiple sclerosis. The disease was induced by immunizing *Themis*-*T*^{KO} and *Themis*-*T*^{WT} mice with a peptide from the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) emulsified in CFA. The incidence and the clinical scores of EAE were decreased in the group of *Themis*-*T*^{KO} mice in comparison to that in the wild-type group (Fig. 5A). Although the *Cd2*-driven Cre transgene begins to be expressed at relatively late stage of T cell development (14), we could not definitively exclude that the effect of THEMIS on EAE development could be the consequence of an altered selection of the TCR repertoire in the thymus. To evaluate this possibility, we conditionally disrupted *Themis* gene in peripheral CD4⁺ T cells by administrating tamoxifen to *Themis*^{flx/flx} mice expressing the *CD4-Cre*^{ERT2}-driven transgene (19) and analyzed the development of EAE in this new model. The incidence and clinical scores of EAE were decreased in THEMIS deficient mice similarly to what was observed in the *Cd2-Cre* driven transgenic model (Fig. 5B). Numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells that have migrated into the brain were decreased in THEMIS deficient mice in comparison to that in littermate controls (Fig. 5C and 5D). This was associated with increased numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the lymph nodes, whereas the numbers of cells recovered in the spinal cord were comparable between the two groups of mice (Fig. 5C and 5D).

THEMIS enhances the expression of T-BET and the production of IFN γ and GM-CSF in encephalitogenic CD4⁺ T cells

To investigate further the mechanism by which THEMIS modulates the development of EAE and to avoid potential bias due to the perturbation of the TCR repertoire or to tamoxifen treatment, we adoptively transferred *Themis*-*T*^{KO} and *Themis*-*T*^{WT} CD62L^{high}CD25⁻CD4⁺ T cells expressing the MOG₃₅₋₅₅ specific TCR 2D2 and the CD45.1 allotypic marker into C57BL/6 mice and analyzed the development of EAE in recipient mice following immunization with MOG₃₅₋₅₅ in the presence of CFA. The incidence and the clinical scores of EAE were decreased in recipient mice that have received *Themis*-*T*^{KO} 2D2+CD4⁺ T cells in comparison to that in the control group (Fig. 6A).

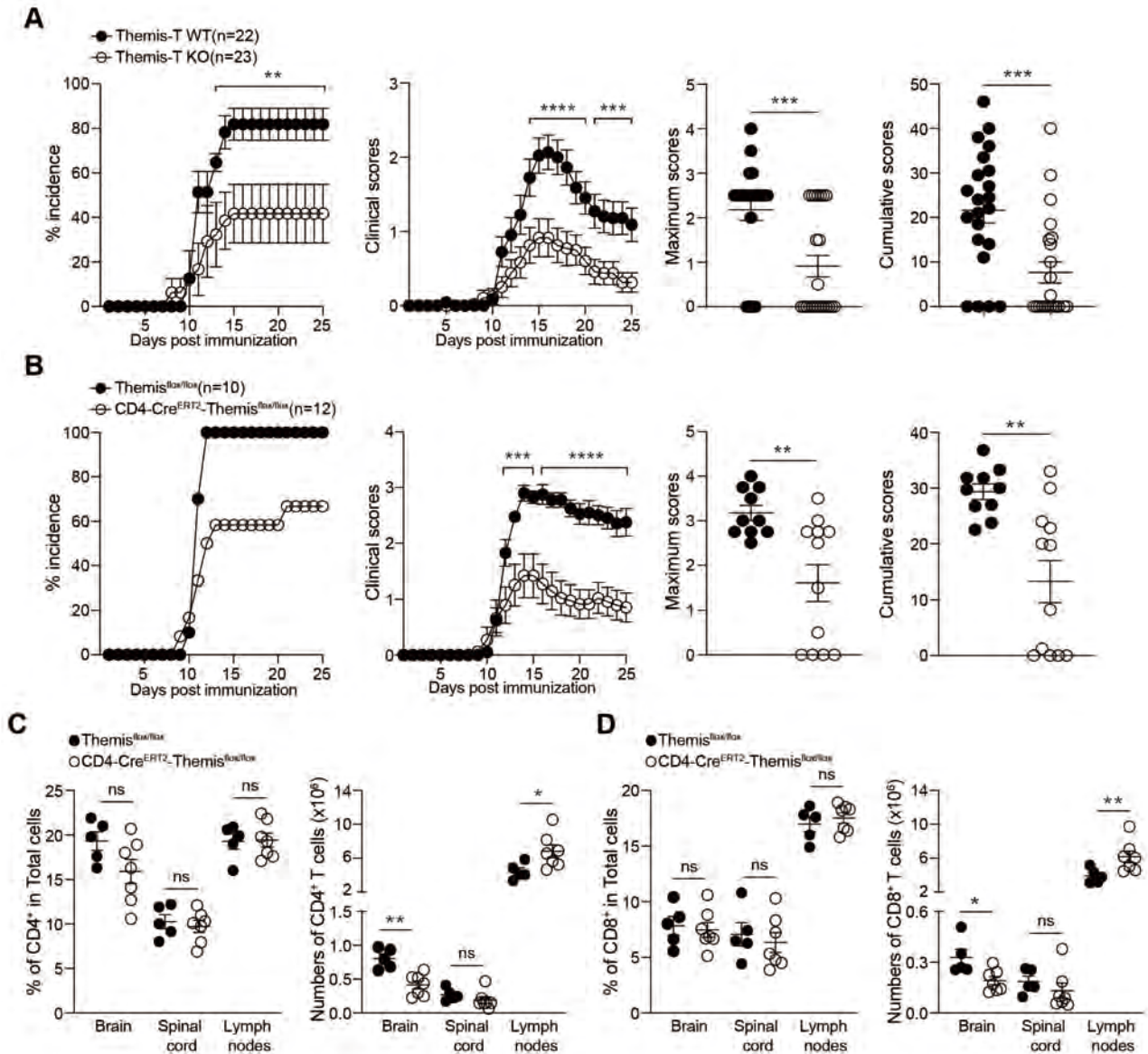


Figure 5. THEMIS expression in CD4+ T cells is associated with an enhanced susceptibility to the development of EAE. (A) *Themis*-*T*^{WT} (black circles) and *Themis*-*T*^{KO} (open circles) mice were immunized with 50 μ g of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA at day 0 and 200 ng of pertussis toxin was injected i.v. on day 0 and day 2. Incidence, clinical scores, maximum scores and cumulative clinical scores were calculated. Data represent four independent experiments including a total of n=22-23 mice per group. (B) *Themis*^{flox/flox} (black circles) and *CD4-Cre*^{ERT2}-*Themis*^{flox/flox} (open circles) mice were immunized with 200 μ g of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA at day 0 and 200 ng of pertussis toxin was injected i.v. on day 0 and day 2. Incidence, clinical scores, maximum scores and cumulative clinical scores were calculated. Data represent two independent experiments including a total of n=10-12 mice per group. (C, D) Dot graphs represent the percentages and numbers of CD4+ (C) and CD8+ (D) T cells in the lymph nodes, the brain and the spinal cord of *Themis*^{flox/flox} and *CD4 CreER(T2)-Themis*^{flox/flox} mice immunized with MOG₃₅₋₅₅. Data are representative of one experiment out of two independent experiments each including n=5-7 mice per group. Clinical scores and incidence were calculated using a two-way ANOVA. Unpaired two-tailed Mann-Whitney t test for other analysis. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

The cumulative scores and the maximum scores were also lower in recipient mice injected with *Themis-T^{KO}* 2D2+CD4⁺ T cells (Fig. 6A), suggesting that THEMIS enhances the encephalitogenic potential of CD4⁺ T cells in this model. The numbers of CD45.1+CD4⁺ T cells infiltrating the brain and the spinal cord were decreased in recipient mice injected with *Themis-T^{KO}* CD4⁺ T cells fourteen days after immunization (Fig. 6B). However, similar percentages of 2D2⁺ T cells out of total CD4⁺ T cells were recovered in those organs, suggesting that THEMIS promotes the migration of encephalitogenic 2D2+CD4⁺ T cells and may also facilitate the migration of endogenous CD4⁺ T cells through bystander effects (Fig. 6B).

To analyze whether THEMIS regulates the activation and the differentiation of 2D2⁺ T cells, we performed a phenotypic analysis of lymph nodes CD45.1+CD4⁺ T cells prior the onset of the disease. The percentages and numbers of *Themis-T^{KO}* CD45.1+CD4⁺ T cells recovered in the draining lymph nodes were decreased in comparison to *Themis-T^{WT}* control cells, suggesting that THEMIS might be important for the maintenance or the clonal expansion of 2D2⁺ T cells (Fig. 6C). To examine whether THEMIS regulates the ability of CD4⁺ T cells to proliferate in response to MOG₃₅₋₅₅ peptide, we injected *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* 2D2+CD45.1+ CD4⁺ T cells stained with Cell-Trace-Violet (CTV) into C57BL/6 mice and analyzed CTV staining in CD45.1+CD4⁺ T cells three days after immunization. The absence of THEMIS had no detectable impact on the percentages of CTV^{low} and CTV^{very-low} CD45.1+CD4⁺ T cells, indicating that THEMIS is not required for the proliferation of antigen specific T cells (Fig. 6D). Confirming this observation, the percentages of 2D2⁺ T cells expressing the cell division marker Ki67 were not affected by THEMIS deficiency (Fig. 6E). The expression of the TCR signaling sensor CD5 (20) was decreased in *Themis-T^{KO}* CD45.1+CD4⁺ T cells as compared to that in wild-type controls, indicating positive function of THEMIS on TCR signaling during CD4⁺ T cell activation (Fig. 6F). Although the percentages of CD45.1+CD4⁺ T cells expressing the IL-2 receptor alpha chain, CD25, were lower in the absence of THEMIS, the activation markers CD44 and PD-1 were expressed at similar levels on *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* CD45.1+CD4⁺ T cells, indicating that THEMIS deficiency does not lead to an overall defect of CD4⁺ T cell priming in this model (Fig. 6F).

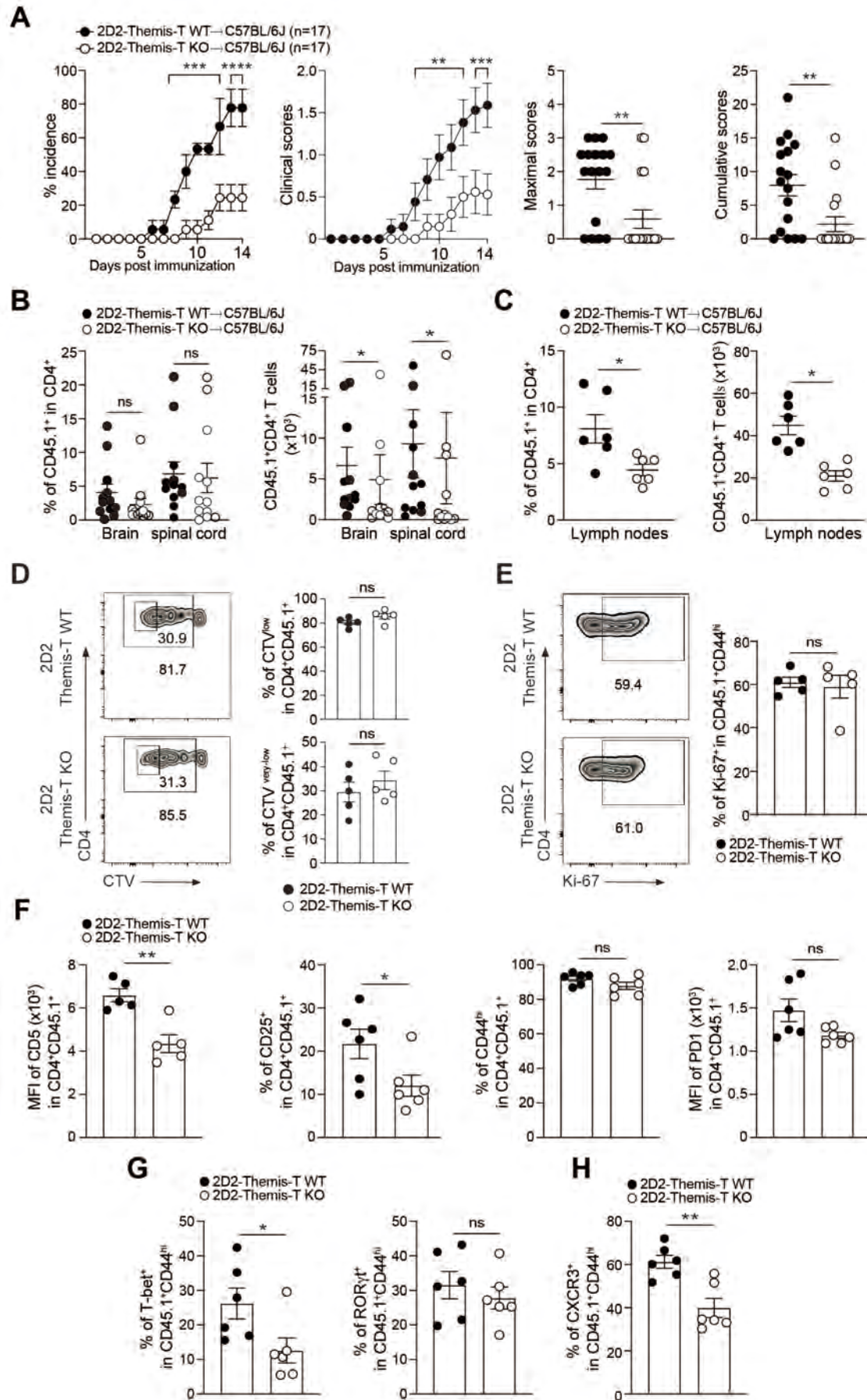


Figure 6. THEMIS enhances the encephalitogenic potential of CD4⁺ T cells expressing the MOG₃₅₋₅₅ specific 2D2 TCR.

Figure 6. THEMIS enhances the encephalitogenic potential of CD4⁺ T cells expressing the MOG₃₅₋₅₅ specific 2D2 TCR. C57BL/6j mice (CD45.2⁺) were injected i.v. with 2×10^5 naïve CD45.1⁺CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice. Mice were then immunized with 100 µg of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA at day 0 and injected i.v. with 200 ng of pertussis toxin at day 0 and 2. (A) Incidence, clinical scores, maximum scores and cumulative clinical scores were calculated. Data represent three independent experiments including a total of n=17 mice per group. (B and C) Dot graph represent the percentages and numbers of CD45.1⁺ cells among CD4⁺ T cells in the brain and the spinal cord (B) and in the lymph nodes (C) at day 14 and 6 after immunization, respectively. Data in (B) represent two independent experiments including a total of n=12 mice per group. Data in C is representative of one experiment out of four independent experiments including n=6 mice per group (D) C57BL/6j mice (CD45.2⁺) were injected i.v. with 2×10^5 CTV stained naïve CD45.1⁺CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice. Mice were then immunized with 100 µg of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA at day 0 and injected i.v. with 200 ng of pertussis toxin at day 0 and 2. Proliferation was analyzed at day three after immunization. Contour plots represent CD4 vs CTV staining on CD45.1⁺ cells. Histogram bars represent the percentages of divided and highly divided cells based on the gating strategy indicated in the contour plots. (E) Contour plots represent CD4 vs Ki-67 staining on CD45.1⁺ cells. Histogram bars represent the percentage of Ki-67⁺ cells in CD45.1⁺CD44^{hi} cells. (F) Histogram bars represent the percentages of CD44^{hi} and CD25⁺ cells among CD45.1⁺CD4⁺ T cells as well as the MFI of PD-1 on CD45.1⁺CD4⁺ T cells. (G) Histogram bars represent the percentages of CD45.1⁺CD4⁺ T cells expressing T-BET and ROR γ t cells. (H) Histogram bars represent the percentages of CD45.1⁺CD4⁺ T cells expressing CXCR3. For D, E, F, G and H, data are representative of one experiment out of three to five independent experiments each including n=5-7 mice per group. Clinical scores and incidence were calculated using a two-way ANOVA. Unpaired two-tailed Mann–Whitney t test for the other analysis. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

We next analyzed the expression of T-BET and ROR γ t in CD45.1⁺CD4⁺ T cells to determine the influence of THEMIS on the generation of Th1 and Th17 effector subsets. The percentages of CD45.1⁺CD4⁺ T cells expressing T-BET were decreased in the absence of THEMIS in comparison to those in control cells, whereas the expression of ROR γ t in CD45.1⁺CD4⁺ T cells was not affected by THEMIS expression (Fig. 6G). The chemokine receptor CXCR3, whose expression is positively regulated by T-BET (21), was expressed at lower level on *Themis-T^{KO}* CD45.1⁺CD4⁺ T cells as compared to that in control cells (Fig. 6H).

We next examined the production of inflammatory cytokines by THEMIS deficient peripheral 2D2+CD4+ T cells in this model. To evaluate whether the affinity of TCR engagement could influence the effect mediated by THEMIS on CD4+ T cell responses, 2D2+ T cells were harvested from the lymph nodes six days after immunization and re-stimulated *in vitro* with MOG₃₅₋₅₅ or with a peptide corresponding to the Neurofilament medium polypeptide epitope (NF-M₁₅₋₃₅), which is also recognized by the 2D2 TCR but elicit stronger stimulatory effect than MOG₃₅₋₅₅ (22, 23). Contrasting again with previous results obtained following TCR stimulation, the percentages of 2D2+CD44^{hi} cells producing IFN γ were decreased in the absence of THEMIS in responses to MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅ stimulation (Fig. 7A). The production of GM-CSF was also decreased in *Themis*-T^{KO} 2D2+CD44^{hi} T cells but only when cells were stimulated with low doses of MOG₃₅₋₅₅ (Fig. 7B). In comparison, the absence of THEMIS had no detectable effect on the production of IL-17 by 2D2+CD44^{hi} cells (Fig. 7C).

One discrepancy between the stimulation of naïve CD4+ T cells *in vitro* and the re-stimulation of effector CD4+ T cells *ex-vivo* relies on the nature of the TCR stimulations, which are based on anti-CD3 antibodies *in vitro* and on peptide presented by antigen presenting cells *ex-vivo*. To evaluate whether this could explain the difference between our *in vitro* and *in vivo* data, we purified naïve CD4+ T cells expressing the 2D2 TCR from *Themis*-T^{KO} and *Themis*-T^{WT} mice and stimulated them with irradiated splenic cells in presence of MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ peptides in Th1 polarized conditions. The ability of 2D2+ T cells to proliferate in response to MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ stimulation was not affected by THEMIS deficiency (Fig. S5A). Confirming previous data obtained with antibody-based stimulations, the percentages of 2D2+ T cells producing IFN γ and TNF α were enhanced in the absence of THEMIS as compared to those in control cells (Fig. 7D and S5B). The inhibitory effect of THEMIS on IFN γ production was mostly observed at high doses of peptides and seemed more pronounced with NF-M₁₅₋₃₅ than with MOG₃₅₋₅₅ stimulations, supporting the idea that THEMIS might be part of a negative feedback loop engaged upon strong TCR stimulation. The expression of T-BET was comparable in *Themis*-T^{KO} and *Themis*-T^{WT} CD4+ T cells (Fig. S5C). Finally, the absence of THEMIS did not significantly affect the percentages of 2D2+ cells producing IL-17 when cells were polarized in Th17 conditions (Fig. S5D). Altogether those results indicate that THEMIS exerts dual inhibitory and enhancing effects on CD4+ T cell responses and that enhancing effects predominates in the physiological context of immune responses against self- and foreign antigens.

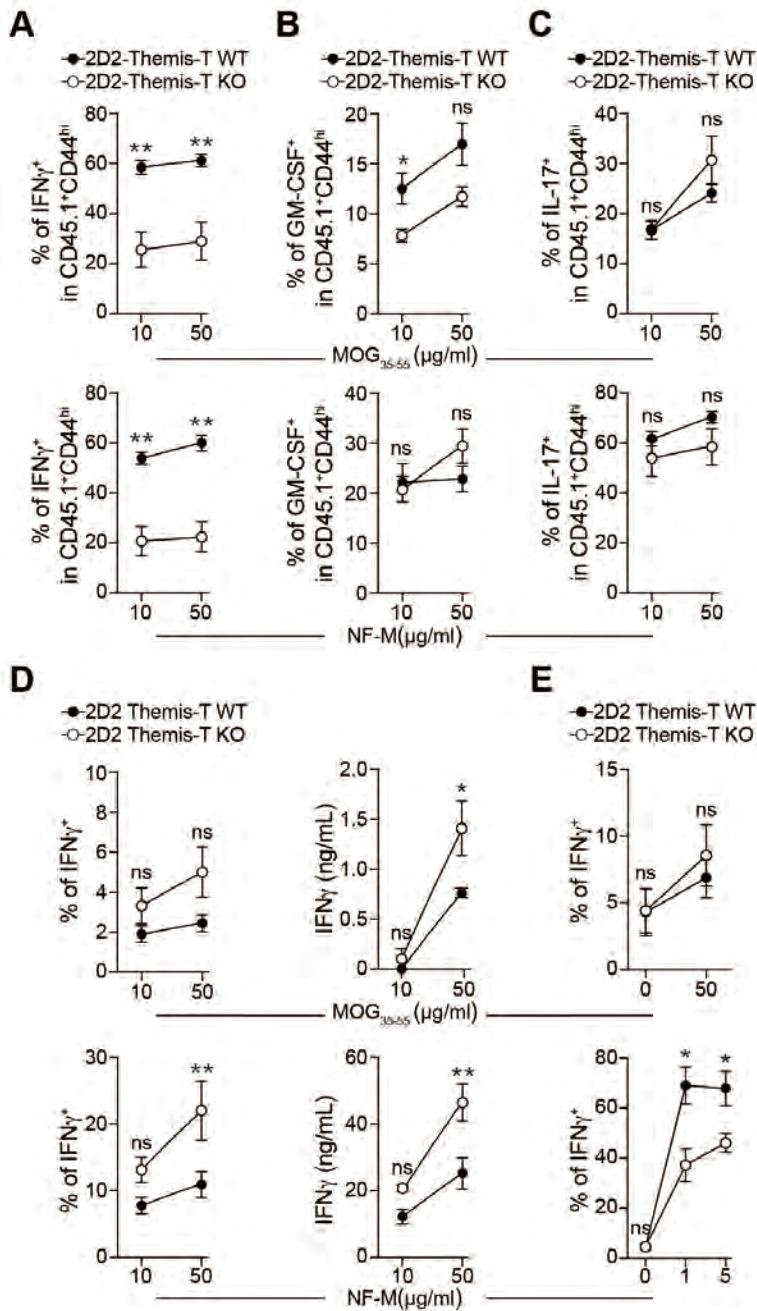


Figure 7. THEMIS exerts opposite effect on IFN γ production in effector CD4⁺ T cells and in Th1-polarized cells stimulated with neuroantigens. (A, B and C) C57BL/6j mice (CD45.2⁺) were injected i.v. with 2×10^5 naïve CD45.1⁺CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice. Mice were then immunized with 100 μ g of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA. Cells were collected from the draining lymph nodes at day six after immunization and stimulated with the indicated dose of MOG₃₅₋₅₅ (upper panel) and NF-M₁₅₋₃₅ (lower panel). The curve graphs represent the percentages of CD45.1⁺CD44^{hi} CD4⁺ T cells expressing IFN γ (A), GM-CSF (B) and IL-17 (C). Data are means \pm S.E.M. and are representative of one experiment out of five independent experiments each including n=5 mice per group. (D) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice were stimulated with MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅ in presence of irradiated splenocytes in Th1 polarizing conditions. Curve graphs represent the production of IFN γ analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining and by ELISA.

Data are means \pm S.E.M. and are representative of one experiment out of two independent experiments each including n=3-4 mice per group. (E) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in Th1 polarizing conditions for two days. Cells were rested for 24 hours in presence of IL-2 and re-stimulated with MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅ in presence of irradiated splenocytes in Th1 polarizing conditions. Curve graphs represent the production of IFN γ analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining. Data are means \pm S.E.M. and are representative of two independent experiments each including n=3-4 mice per group. Unpaired two-tailed Mann-Whitney t test for the other analysis. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

The analysis of cytokine secretion following immunization with MOG₃₅₋₅₅ or 1W1K peptides were performed on effector CD4⁺ T cells. By contrast to naïve T cells, effector T cells express a wide variety of inhibitory receptors that are up-regulated after T-cell activation and engage SHP-1 and SHP-2 (24-27). Since THEMIS was reported to exert inhibitory function on SHP-1 and SHP-2's phosphatase activity (7), we hypothesized that THEMIS deficiency might lead to different outcomes in naïve and effector CD4⁺ T cells and might enhance Th1 responses exclusively in effector cells by blocking the inhibitory function of those receptors. To investigate this possibility, we stimulated 2D2⁺ *Themis-T^{KO}* and *Themis-T^{WT}* naïve CD4⁺ T cells with anti-CD3 antibodies in polarized conditions to generate Th1 effector cells. After a 24-hour resting period, CD4⁺ T cells were re-stimulated by irradiated splenic cells incubated with MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ in the presence of Th1 polarizing milieu. In those conditions, the percentages of cells producing IFN γ and expressing T-bet were strongly increased following re-stimulation of *Themis-T^{WT}* CD4⁺ T cells with NFM₁₅₋₃₅ peptide, but were only modestly affected following MOG₃₅₋₅₅ re-stimulation (Figure 7E and S5E). The percentages of 2D2⁺ T cells producing IFN γ and expressing T-bet were decreased in the absence of THEMIS as compared to that in *Themis-T^{WT}* control cells, resulting in similar outcomes to what we observed *ex-vivo* on effector T cells following immunization (Figure 7E and S5E).

Discussion

Nearly opposite functions have been assigned to THEMIS to explain its role on T cell development (8). Whereas *in vitro* studies on DP thymocytes suggest that THEMIS could prevent “misplaced” negative selection events by negatively regulating TCR signals elicited by weak TCR stimulation (9), *in vivo* studies are indicative of an enhancing role on TCR signaling which enables thymocytes to reach the threshold for positive selection and prevent death by neglect (7, 11). One potential interpretation to explain this discrepancy is that THEMIS may promote different outcomes according to the context of stimulation, operating as a negative regulator of T cell responses when TCR signals emanate exclusively from the TCR, and as an enhancer of those responses when TCR signals integrate multiple regulatory inputs triggered by additional environmental stimuli. Biochemically speaking, THEMIS would operate similarly in both contexts *i.e* by repressing the phosphatase activity of SHP-1 and SHP-2, but the consequence of this effect might be different according to how those phosphatases are respectively engaged by the TCR and by additional receptors such as co-inhibitory and cytokine receptors.

Accordingly, we show here that THEMIS deficiency has nearly opposite consequences on CD4⁺ T cell responses according to the context of stimulation. THEMIS negatively regulates the production of IFN γ and TNF α when naïve CD4⁺ T cells were polarized in Th1 conditions. The inhibitory effect of THEMIS was restricted to Th1-mediated responses since the absence of THEMIS did not affect the priming of naïve CD4⁺ T cells nor their differentiation into Th2 and Th17 cells. Interestingly, we found that the effect of THEMIS on Th1 responses was associated with a strong and selective increase of THEMIS expression level in Th1 cells, supporting the idea that THEMIS operates as a specific regulator of type-1 responses. T-BET and EOMES were induced normally in the absence of THEMIS following stimulation of naïve CD4⁺ T cells in Th1 polarizing conditions, suggesting that THEMIS regulates Th1 responsiveness to TCR stimulation rather than the ability of naïve CD4⁺ T cells to differentiate into this subset. Paralleling this relatively narrow modulatory effect of THEMIS on Th1 responses, we showed that THEMIS inhibits preferentially the phosphorylation of ERK1/2 but has no detectable effect on the phosphorylation of p38 upon TCR stimulation or on the phosphorylation STAT4 upon IL-12R stimulation. The effects of *erk2* conditional disruption in CD4⁺ T are relatively symmetrical to those observed in THEMIS deficient CD4⁺ T cells, leading to a specific decrease of IFN γ production in polarized Th1 cells associated with the absence of detectable effect on T-BET and on Th2 or Th17-mediated responses (18), suggesting that the selective effect of THEMIS on Th1 cytokine responses might also be the consequence of a targeted effect of THEMIS on ERK2 activity. Supporting this possibility, ERK1/2 inhibitors repressed less efficiently IFN γ production in THEMIS-deficient CD4⁺ T cells as compared to that in control CD4⁺ T cells. Of note, the inhibition of ERK1/2 activity had no detectable effect on the production TNF α in Th1 polarized cells, suggesting that the regulatory effect of THEMIS on this cytokine might be dependent on alternative signaling pathways.

Previous analysis of TCR signaling in *Themis*^{-/-} thymocytes showed that THEMIS exerts uncoupled and dual outcomes on TCR-mediated signaling events by repressing on one hand the phosphorylation of ERK1/2 induced by weak TCR stimulation (9, 11) and by enhancing on the other hand the activity of Vav1 independently of the strength of the TCR stimulation (11). The molecular explanation of this combined effect is not yet resolved but may rely on the type of SHP phosphatases that interact with THEMIS. THEMIS binds and directly inhibits SHP-1 and SHP-2, with the inhibitory effect on SHP-2 being less pronounced as that on SHP-1 (7). SHP-1 appears to have an exclusively inhibitory role in T-cell signaling by dephosphorylating key positive regulators of TCR signaling among which VAV1 (28-30). By contrast, SHP-2 has been ascribed both inhibitory and activating roles depending on the substrate and the context

of its recruitment to the membrane. Whereas SHP-2 is described as a negative regulator of TCR- and CD28-mediated signaling events following its recruitment to the inhibitory receptor PD-1 (24, 31, 32), SHP-2 is associated to positive function on TCR signaling when TCR signals do not integrate additional stimulatory inputs (33, 34). Inactivation of SHP-2 catalytic function in Jurkat cells (33) and conditional disruption of *Ptpn11*, the gene encoding SHP-2, in thymocytes (34) result in impaired TCR-induced ERK activation, suggesting that the repressing effect of THEMIS on ERK1/2 activity may be the consequence of the inhibitory effect of THEMIS on SHP-2 catalytic function and that, by contrast, the activating effect of THEMIS on Vav1 may result from the inhibition of SHP-1.

THEMIS-mediated inhibition of SHP-1's phosphatase activity is associated with an enhanced phosphorylation of SHP-1 in THEMIS-deficient thymocytes, presumably due to reduced auto- or trans-dephosphorylation by SHP-1 (7, 9). We observed that THEMIS positively regulates the phosphorylation of SHP-2 in CD4⁺ T cells, supporting the possibility that THEMIS represses the phosphatase activity of SHP-2 in those cells and inhibit thereby Th1 cytokine responses. Although, we also detected a decreased phosphorylation of SHP-1 in THEMIS deficient CD4⁺ T cells, this was not associated with a significant decrease of VAV1 phosphorylation (data not shown) and, more generally, with any detectable decrease of CD4⁺ T cell responses. This suggests that the functional outcomes resulting from THEMIS-mediated SHP-2 inhibition could be predominant over those resulting from SHP-1 inhibition in these settings. Although several reports identified inhibitory function for SHP-1 on CD4⁺ T cell responses *in vivo* (35-38), the conditional deletion of *ptpn6*, the gene encoding for SHP-1, has minimal effect on CD4⁺ T cell responses *in vitro* when TCR signals emanate exclusively from TCR cross-linking (36, 38, 39), suggesting that SHP-1 might operate more effectively when recruited to inhibitory receptors (24, 26, 40), which might enrich SHP-1 in proximity of TCR signaling complexes, or in the context of cytokine receptor signaling (36, 41, 42), rather than through negative feedback loops triggered by the TCR itself. This might explain why THEMIS-mediated positive effects on TCR signaling are not revealed in naïve T cells, on the surface of which inhibitory receptors recruiting SHP-1 and SHP-2 are relatively weakly expressed, but are detected on effector T cell subsets which express a variety of those receptors (2). This possibility may explain why *in vitro* studies, which exclusively focused on isolated TCR stimulation may have failed to identify THEMIS as a positive regulator of T cell responses.

The effect of THEMIS on CD4⁺ T cell responses was nearly the opposite *in vivo* when mice were immunized with self or foreign antigens. THEMIS exacerbates auto-immunity following

the immunization with a neuroantigen and enhanced the encephalitogenic potential of 2D2+ CD4+ T cells. This was associated with a positive effect of THEMIS on the secretion of IFN γ and to a lesser extent on the secretion of GM-CSF by 2D2+ CD4+ T cells. Similar to our *in vitro* findings, THEMIS expression did not significantly affect molecular and cellular events associated to naïve CD4+ T cell priming and to the development of efficient Th17 responses. The presence of THEMIS was associated with an enhanced expression of T-BET in MOG- and 1W1K-specific CD4+ T cells, suggesting that THEMIS might be important *in vivo* for the differentiation of naïve CD4+ T cells into type 1 effector cells by contrast to its selective effect observed *in vitro* on Th1 cell responsiveness. T-BET is required to promote full pathogenic responses during the development of EAE (43, 44) and may operate, at least partly, by inducing the secretion of IFN γ which promotes pathogenesis at the early phase of the disease (45, 46). The reduced susceptibility of THEMIS deficient mice to develop EAE might thus result from the inefficient up-regulation of T-BET which may consequently affect the production level of IFN γ by encephalitogenic CD4+ T cells. The absence of THEMIS is also associated with decreased numbers of encephalitogenic CD4+ T cells in the brain, suggesting that THEMIS might favor the migration of auto-reactive CD4+ T cells in the CNS. T-BET is required for optimal migration of CD4+ T cells to inflammatory sites by controlling the attachment of CD4+ T cells to P-selectin and by enhancing the expression of chemokine receptors such as CXCR3 (21). Accordingly, the surface expression of CXCR3 was reduced in THEMIS deficient CD4+ T cells, suggesting that THEMIS may enhance CD4+ T cell migration into the CNS through a T-BET-mediated process.

Altogether our study identifies THEMIS as positive regulator of type 1 response in the contexts of immune response to foreign antigen and CNS autoimmunity. The differentiation of naïve CD4+ T cells into distinct Th subsets is regulated by cytokine co-stimulation but also by the magnitude of TCR signaling events which is contingent on antigen loads, on the affinity of the TCR for pMHC complex and on additional input signals which emanate from co-stimulatory and co-inhibitory receptors. Several evidences suggest that stronger TCR signals are required for the differentiation of naïve CD4+ T cells into the Th1 lineage than for the Th2 lineage (47, 48), suggesting that THEMIS might operate in CD4+ T cells similarly as in thymocytes, by enabling reaching a TCR signaling threshold required for the efficient development of type 1 responses. Accordingly, the expression level of the TCR signaling sensor CD5 was reduced in antigen specific CD4+ T cells following immunization with MOG₃₅₋₅₅. Since opposite outcomes for THEMIS deficiency on TCR signaling were obtained in naïve CD4+ T cells in the context of TCR stimulation with anti-CD3 antibodies, this suggests that THEMIS might

enhance TCR signals *in vivo* independently of the TCR itself, possibly by regulating receptors express at the surface of effector cells that would recruit SHP-1 or SHP-2. Accordingly, the stimulation of pre-differentiated effector CD4⁺ T cells with antigen presenting cells, revealed stimulatory function for THEMIS on type 1 cytokine responses, similar to those observed *ex-vivo* following immunization. This possibility may explain why *in vitro* studies, which exclusively focused on isolated TCR stimulation may have failed to identify THEMIS as a positive regulator of T cell responses.

Materials and Methods

Mice

For the generation of *Themis*^{T^{KO}} mice, ES cells from the EUCOMM consortium (clone HEPD0712-6-H05) were used to generate *Themis*^{lox/lox} mice in which the 4th exon of *themis* was surrounded by two *loxP* sites. These mice were bred with *hCD2-cre* transgenic mice (<https://www.jax.org/strain/027406>) in which the human *cd2* promoter directs the expression of the CRE recombinase at late stages of T cell development in mature CD4⁺ and CD8⁺ single-positive thymocytes. *Themis*^{lox/lox} mice were also bred with *CD4-Cre*^{ERT2} transgenic mice which contain tamoxifen inducible CRE under the control of the *cd4* promoter (<https://www.jax.org/strain/022356>). *Themis*^{T^{KO}} were crossed with transgenic mice expressing the 2D2 TCR (13). All the experiments were conducted with sex and age-matched mice between 8 and 12 weeks old housed under specific pathogen-free conditions at the INSERM animal facility (US-006; accreditation number A-31 55508 delivered by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice). All experimental protocols were approved by a Ministry-approved ethics committee (CEEA-122) and follow the French and European regulations on care and protection of the Laboratory Animals (EC Directive 2010/63).

Antibodies

For CD4⁺ T cell purifications: monoclonal antibodies anti-B220 (RA3-6-B2), anti-CD11b (M1/70), anti-MHC class II (m5-114), anti-FcγRs (2.4G2), NK1.1 (83PK136), anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (SN-H59) and anti-CD25 (PC61) were generated in our Lab. *For stimulation and cell culture:* anti-CD3ε (145-2C11) and anti-CD28 (37.51) antibodies were from Biolegend. Recombinant murine IL-2, IL-12p70, IL-6, TGF-β and IL-27 are from PeproTech. Neutralizing anti-IL-4 (BVD4-1D11) and anti-IFNγ (XMG1.2) antibodies are from BD Bioscience. The ERK inhibitor U0126 is from Cell Signaling. *For ELISA analysis:* capture anti-IFNγ (AN-18), anti-IL-2 (JES6-1A12), anti-GM-CSF (MP1-22E9) and anti-IL-17 (TC11-18H10) antibodies and detection biotin anti-IFNγ (XMG 1.2), anti-IL-2 (JES6-SH4), anti-GM-CSF (MP1-31G6) and anti-IL-17 (TC11-8H4) antibodies are from BD Bioscience. Capture anti-IL-13 (eBio13A) and detection biotin anti-IL-13 (eBio1316H) antibodies were from

eBioscience. *For Immunoprecipitation and Western blot:* anti-THEMIS (06-1328) and anti-Rac (23A8) antibodies are from EMD Millipore. Anti-pERK (Thr202/Tyr204), anti-pSHP-1 (Tyr564), anti-pSHP-2 (Tyr580) and anti-pP38 MAPK (Thr180/Tyr182) antibodies were purchased from Cell Signaling. HRP-conjugated goat anti-rabbit and goat anti-mouse antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. *For cell sorting and flow cytometry analysis:* anti-CD4 (RM 4-5), anti-GM-CSF (MP1-22E9), anti-IL-10 (JES5-16E3 and anti-BTLA (6A6) antibodies were from Biolegend; anti-CD8 α (53-6.7), anti-TCR β (H57-597), anti-CD25 (PC61.5), anti-CD44 (IM7), anti-CD69 (H1.2F3), anti-EOMES (Dan11mag), anti-T-bet (4B10), anti-IL-13 (eBio13A), anti-ROR γ t (B2D), anti-FOXP3 (FJK-16s), anti-CXCR3 (CXCR3-173), anti-PC-1 (J43), anti-IFN γ R (2E2), anti-pSTAT4 (4LURPIE) and anti-Granzyme B (NGZB) antibodies were from eBioscience. Anti-CD62L (MEL-14), anti-IFN γ (XMG1.2), anti-TNF α (MP6-XT22), anti-IL-17 (TC11-18H10), anti-Ki-67 (B56) antibodies were from BD Bioscience. Anti-CD45.1 (A20), anti-TCR V α 3.2 (REA359) and anti-TCR V β 11(REA657) were from Miltenyi Biotec.

Flow cytometry and cell sorting

For flow cytometry analysis, single-cell suspensions from thymus, spleen or lymph nodes were incubated with diluted eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (ThermoFisher) in phosphate-buffered saline (PBS), 1% Fetal Calf Serum (FCS) and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution (EDTA) prior staining with fluorochrome-conjugated antibodies. Intracellular staining was performed using the FOXP3 staining buffer kit (e-Biosciences) according to the manufacturer's instructions before data acquisition on a BD LSRII flow cytometer and analysis with the FlowJo software. Purification of naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ and CD8⁺ T cells was performed by cell sorting using a FACS Aria-SORP (BD Biosciences).

Cell cultures

For proliferation assays, naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells were labeled with 2 μ M Cell Trace Violet (CTV; Life Technologies) for 15 min at 37 °C and cultured in 96-well plates coated with variable doses of anti-CD3 antibodies at a density of 10⁶ per ml. The incorporation of CTV was measured by flow cytometry after 3 days of culture. For polarization assays, naïve CD4⁺ T cells were stimulated for three (Th1, iTreg), four (Tr1) and five days (Th2, Th17) with the indicated doses of anti-CD3 antibodies and with 1 μ g/ml of soluble anti-CD28 antibodies in presence of different cytokines and neutralizing antibodies cocktails, such as: Th1 : IL-12 (10ng/ml) and anti-IL-4 (10 μ g/mL); Th2: IL-4 (20ng/ml) and anti-IFN γ (6 μ g/ml); Th17: IL-6 (20ng/ml), TGF-beta (2ng/ml), anti-IFN γ (6 μ g/ml) and anti-IL-4 (10 μ g/ml); Tr1: IL-27 (50ng/mL); iTreg: TGF β (0.25ng/ml) and IL-2 (1ng/mL). For the analysis of cytokine

production by flow cytometry, cells were re-stimulated for 4 hours with 500 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1 µg/mL of ionomycin and 1 µg/ml of Golgi-plug (BD Bioscience). To analyze STAT4 phosphorylation, naïve CD4⁺ T cells were stimulated for two days with anti-CD3 (2 µg/ml) and anti-CD28 (1 µg/ml) antibodies. Cells were rested in RPMI at 37°C overnight and stimulated with the indicated doses of IL-12 at 37°C for 40 min.

For *in vitro* stimulation of 2D2⁺ CD4⁺ T cells, naïve CD62L^{hi}CD25⁻ CD4⁺T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice expressing the 2D2 TCR were labeled with CTV and cultured in Th1 or Th17 polarizing conditions with MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ at 10 or 50 µg/mL in presence of 1x10⁵ cells/well of irradiated splenocytes from C57BL/6J mice. For the *in vitro* analysis of effector cells, naïve CD62L^{hi}CD25⁻ CD4⁺T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice expressing the 2D2 TCR were stimulated for two days in Th1 polarizing conditions with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. After a 24-hours resting period in presence of IL-2, cells were re-stimulated with MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ in presence of irradiated splenocytes from C57BL/6J mice.

ELISA

Enzyme immunoassays were used to measure cytokines in culture supernatants. Briefly, 96 well plates were coated for 2h at 37°C with anti-IFN-γ, anti-IL13, anti-IL-17 or anti-GM-CSF in carbonate buffer 0.05 M pH 9.6. Culture supernatants or standards were incubated 2h at 37°C. The plates were then incubated 1h30min with a secondary biotinylated antibody specific for each cytokine, followed by 20 min of incubation with streptavidin-phosphatase alkaline at 37°C. Finally, plates were revealed by phosphatase alkaline substrate and absorbance was measured at 450/540 nm.

Immunization with 1W1K peptide

Mice were immunized subcutaneously on each side at the base of the tail with 4 µg of peptide 1W1K (EAWGALANKAVDKA from Genecust) in complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma). CD4⁺ T cell populations from the draining lymph nodes were analyzed 9 days after immunization. For staining of antigen-specific cells, 1W1K-IAb tetramers were obtained from the NIH Tetramer core facility. Overall, cells at 10⁸ per ml were first stained at room temperature for two hours with an optimal concentration of tetramer. Then, cell staining for additional markers was performed as described previously. To measure cytokines production, 6×10⁶ cells from the draining lymph nodes were stimulated with the indicated dose of 1W1K peptide overnight and incubated with Golgi-plug for 1h30min.

Experimental autoimmune encephalomyelitis

For active EAE, *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were immunized with 50 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Covalab) emulsified with CFA containing 1 mg/ml of Mycobacterium tuberculosis

(Difco). 200 ng of pertussis toxin (List Biological Lab) was given through intravenous (i.v.) injection at day 0 and day 2 after immunization. *CD4-Cre^{ERT2}-Themis^{flox/flox}* mice were treated by oral gavage with 5mg of tamoxifen for 3 days and rested for two weeks prior immunization with 200 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified with CFA containing 2 mg/ml of Mycobacterium tuberculosis. 200 ng of pertussis toxin was given i.v. at day 0 and day 2 after immunization. Analysis of CD4⁺ and CD8⁺T cells in the lymph nodes, the brain and the spinal cord was performed at day 28 after immunization. Clinical scores were evaluated on a five-stage scale from 0 to 5. For active EAE following adoptive transfer, naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD45.1⁺CD4⁺ T cells were purified from lymph nodes and splenocytes from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice expressing the 2D2 TCR. 2x10⁵ cells in PBS were injected i.v. into C57BL/6J mice (CD45.2⁺) one day before immunization with 100 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified with CFA containing 1 mg/ml of Mycobacterium tuberculosis. Analysis of CD45.1⁺ CD4⁺ T cells in the brain and the spinal cord was performed at day 14 after immunization. For *in vivo* analysis of proliferation, 2D2⁺CD4⁺ T cells were stained with CTV and injected i.v. into C57BL/6J mice one day before immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide. The dilution of CTV was evaluated on day 3 after immunization. The phenotype of the CD45.1⁺CD4⁺ T cells from the draining lymph nodes was analyzed by flow cytometry on day 6 after immunization. For the analysis of cytokines production, 1x10⁶ cells isolated from the draining lymph nodes were cultured in the presence of MOG₃₅₋₅₅ or NF-M₁₅₋₃₅ peptides (10 and 50 µg/ml) for 2 days and then incubated with 1µg/mL of Golgi-plug for 4 hours.

Western blot analysis

To analyze TCR signaling, CD4⁺ T cells were resuspended at a density of 10⁷ cells per 50 µl and incubated at 37°C for 10 min before being stimulated. Antibody complexes were prepared at a 2× concentration before being used to stimulate cells at 37°C for 10 min with biotin-conjugated anti-CD3 and anti-CD4 antibodies mixed with equal concentrations of streptavidin. Cells were stimulated with 50 µl of antibody complexes (60 µg/ml) for the times indicated in the figure legends. Cell lysates were prepared by resuspending cells in 1ml of ice-cold lysis buffer (10 mM tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton, 2 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM EDTA, and protease inhibitor tablets (Roche)) for 20min at 4°C. Lysates were cleared by centrifugation at 18,000g for 15 min at 4°C. For Western blot analysis, proteins were resolved by SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes according standard protocols. Membranes were blocked with 5% milk in tris-buffered saline containing Tween at 0.05% for 1 hour at room temperature before being incubated with primary antibodies at 4°C overnight. After washing, membranes were incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Subsequently, membranes were incubated with enhanced chemiluminescence solution (Sigma) for 5 minutes in the dark, and luminescence was captured with a Bio-Rad XRS+ imager. Band intensities were quantified with Bio-Rad ImageLab software. Values from

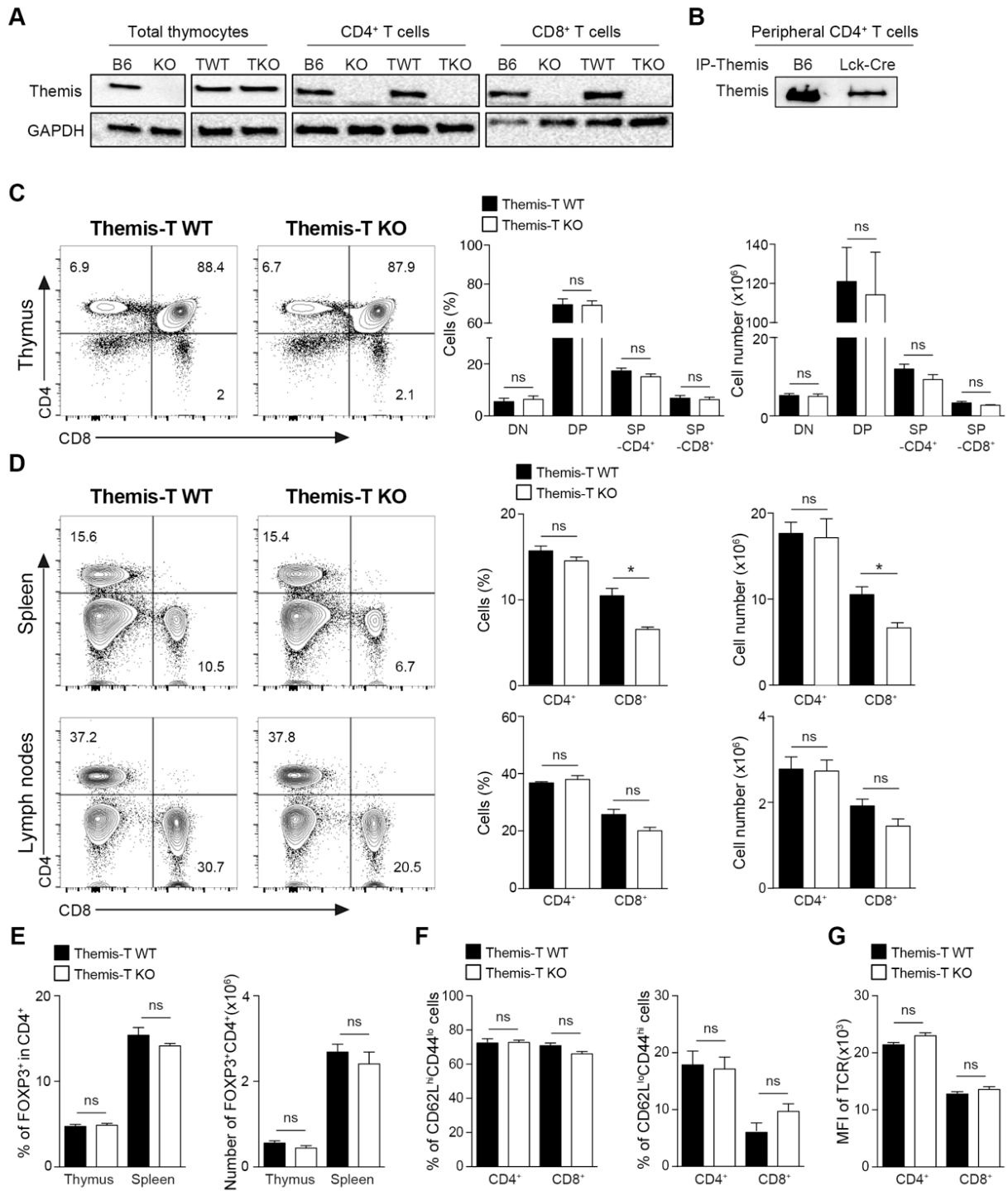
quantitated bands were normalized for loading differences with Rac1 as a control. The intensity values at each time point were normalized to the highest intensity value obtained for wild-type controls in each individual experiment.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis were performed using unpaired t test. Mann-Whitney test was used for nonparametric tests. For clinical score and incidence in EAE, two-ways ANOVA method was used for calculating the statistical difference. P values < 0.05 were considered statistically significant (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, **** $p < 0,001$).

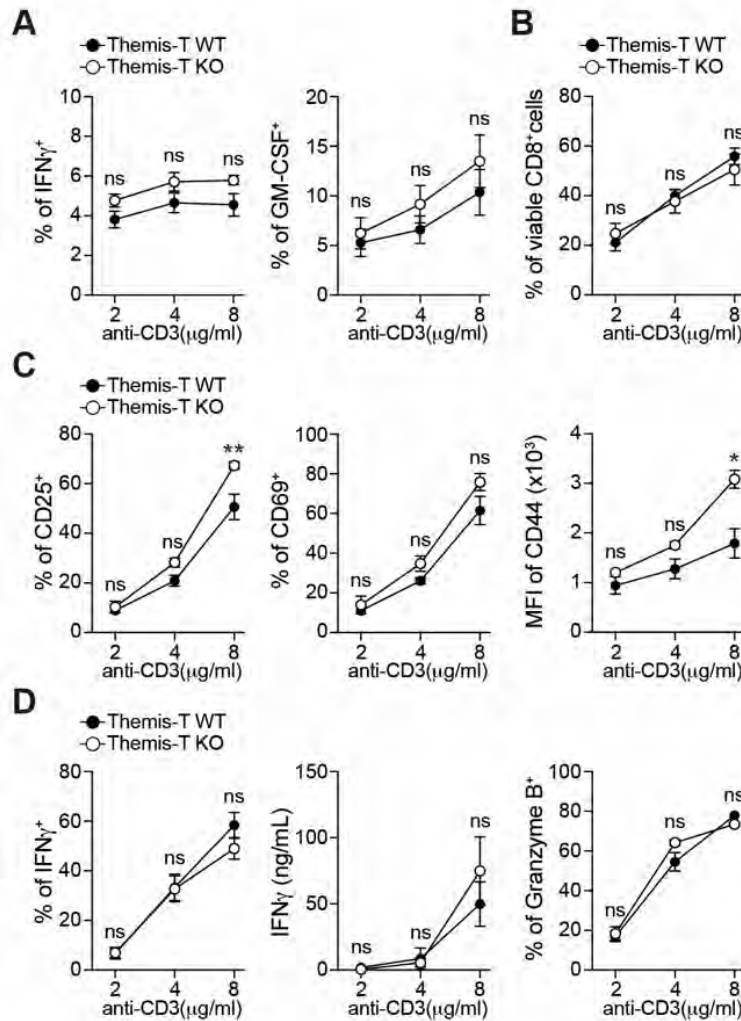
Acknowledgements and Fundings

We acknowledge the technical assistance provided by the personnel of INSERM US006 Anexplo/creffre animal facility. Flow cytometry experiments have been done at the INFINITY center core facility connected to ‘Toulouse Réseau Imagerie’ network. We thank Fatima-Ezzahra L’Faqihi, Valérie Duplan and Anne-Laure Iscache for technical assistance and for cell sorting. *Funding:* this work was supported by INSERM; the Foundation ARSEP; the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); the Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE15-0002); the Intramural Research Program of the Eunice Kennedy Shriver, National Institute of Child Health and Human Development; a Marie Curie International Reintegration Grant (R.L.); the China Scholarship Council (PhD fellowship for C.Y.); the French Ministry of Higher Education and Research (PhD fellowship for G.B., R.M. and S.M.). The authors declare no competing interest.

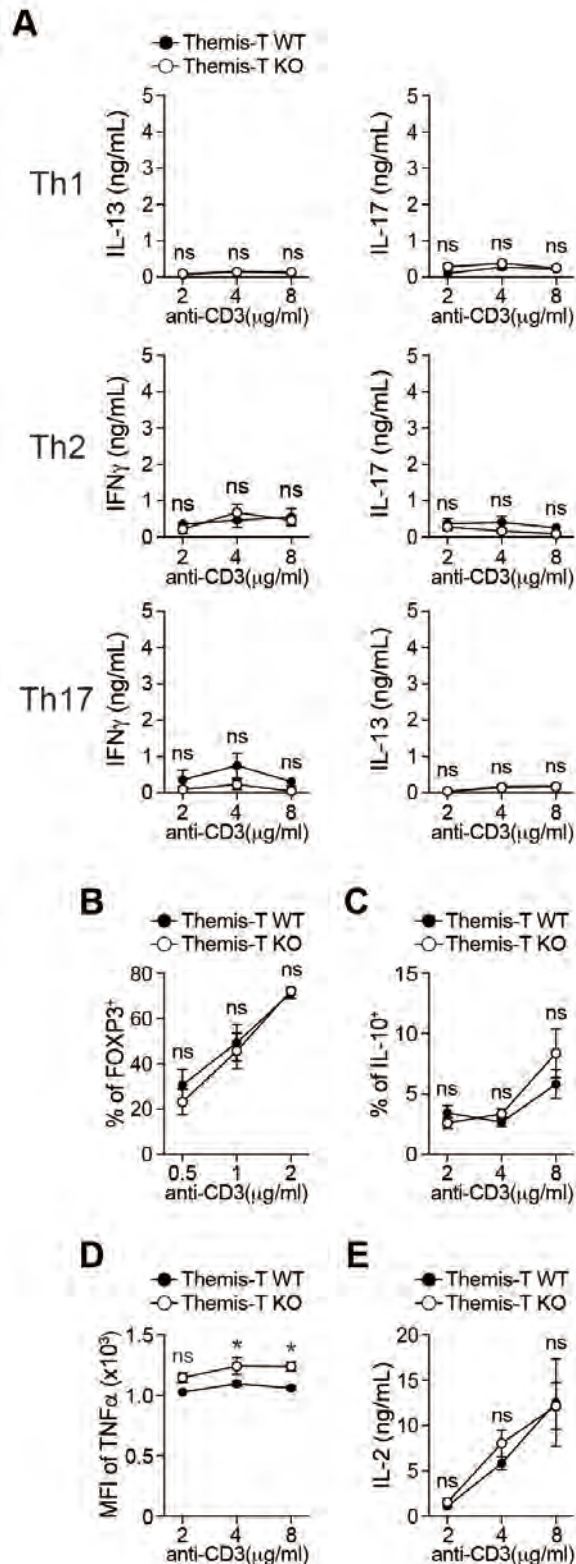


Supplementary Figure 1. Phenotypic analyses of thymocytes and peripheral T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice. (A) Total cytoplasmic extracts of thymocytes and peripheral T cells from *Themis-T^{WT}* (TWT) and *Themis-T^{KO}* (TKO) mice were analyzed by Western blot with antibodies against THEMIS and GAPDH. (B) THEMIS was immunoprecipitated from cellular extracts of peripheral CD4⁺ T cells from C57BL/6 and *dLck-Cre Themis-T^{lox/lox}* mice. (C and D) Dot plots show CD4 versus CD8 surface staining on thymocytes (C), splenocytes (D, middle panel) and lymph nodes (D, lower panel) from *Themis-T^{WT}* (TWT) and *Themis-T^{KO}* mice. Histogram bars represent the percentages of thymocytes and peripheral T cell subsets in mice from the indicated genotype. Data are mean ± S.E.M. and represent two to three independent experiments each including n=3-4 mice per group. (E) Histogram bars represent the percentages and numbers of CD4⁺ T cells expressing FOXP3 in mice from the indicated genotype.

Supplementary Figure 1. Data are mean \pm S.E.M. and represent two independent experiments each including $n=3$ mice per group. (F) Histogram bars represent the percentages of CD62L^{hi}CD44^{lo} and CD62L^{lo}CD44^{hi} cells among CD4⁺ and CD8⁺ T cells in mice from the indicated genotype. Data are mean \pm S.E.M. and represent three independent experiments each including $n=3$ mice per group. (G) Histogram bars represent the MFI of the TCR among CD4⁺ and CD8⁺ T cells in mice from the indicated genotype. Unpaired two-tailed Mann–Whitney t test for the other analysis. * $P < 0.05$.

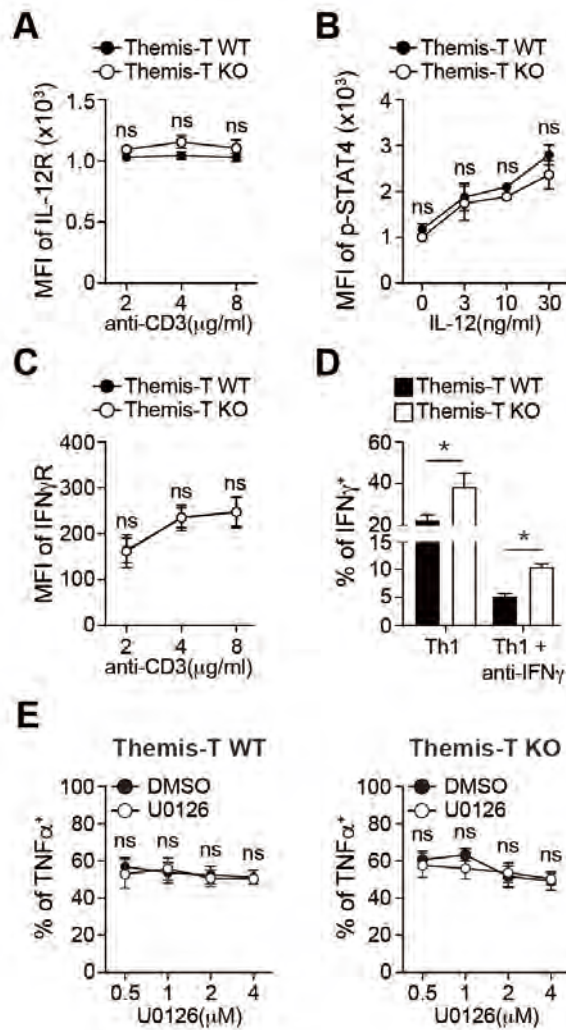


Supplementary Figure 2. Effect of THEMIS deficiency on CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses induced after TCR stimulation. (A) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with the indicated dose of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies. Curve graphs represent the percentages of CD4⁺ producing IFN γ and GM-CSF analyzed by flow cytometry following intracytoplasmic staining. (B, C and D) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD8⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with the indicated dose of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies for one (C) or 3 days (B and D). Curve graphs represent the percentages viable cells among CD8⁺ T cells (B), the percentages of CD4⁺ T cells expressing CD25 and CD69 as well as the MFI of CD44 staining on CD4⁺ T cells (C), the percentages of CD8⁺ T cells producing IFN γ and Granzyme B (D). Data are mean values \pm S.E.M and are representative of at least three independent experiments each including $n=3-4$ mice per group. Unpaired two-tailed Mann–Whitney t test for the other analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

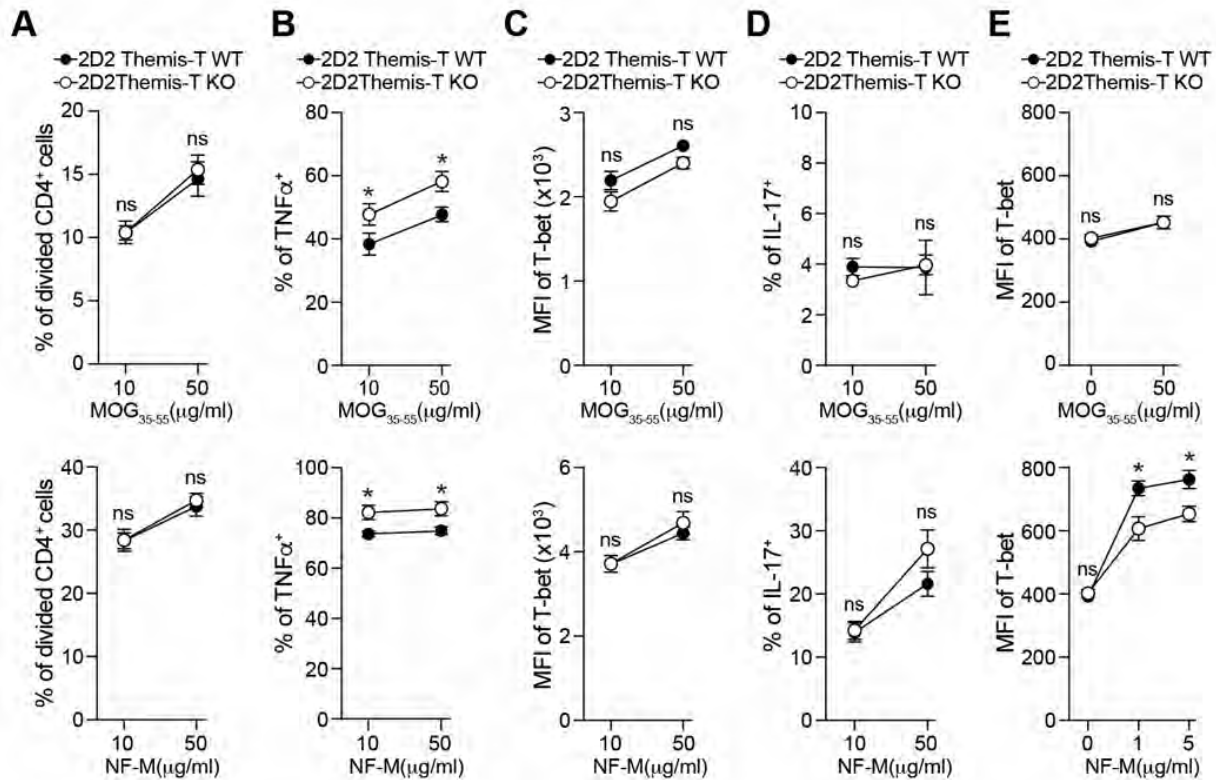


Supplementary Figure 3. Effect of THEMIS deficiency on CD4⁺ T cell polarization.

(A) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* vs *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with various doses of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies in Th1, Th2 and Th17 polarizing conditions. Curve graphs represent the production of IFN γ , IL-13, and IL-17 in Th1, Th2 and Th17 polarizing conditions analyzed by ELISA. (B) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with various doses of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies in iTreg polarizing conditions. Curve graphs represent the percentages of cells expressing FOXP3 among CD4⁺ T cells. (C) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* vs *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with various doses of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies in Th1 polarizing conditions. Curve graphs represent the percentages of cells expressing IL-10 among CD4⁺ T cells. (D, E and F) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with various doses of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies in Th1 polarizing conditions. Curve graphs represent the MFI of TNF α staining gated on CD4⁺TNF α ⁺ cells (D), the percentages of divided CD4⁺ T cells (CTV^{low}) (E), the secretion of IL-2 (F). Data are mean values \pm S.E.M and are representative of at least three independent experiments each including n=3-4 mice per group. Unpaired two-tailed Mann-Whitney t test for the other analysis. *P < 0.05.



Supplementary Figure 4. Effect of THEMIS deficiency on IL-12R-, IFN γ R- and TCR-mediated signaling in CD4⁺ T cells. A and C) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* vs *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with various doses of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies in Th1 polarizing conditions. Curve graphs represent the MFI of IL-12R (A) and IFN γ R (C) staining on CD4⁺ T cells analyzed flow cytometry. B) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* vs *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with 8 μ g/mL of anti-CD3 antibodies in presence of anti-CD28 antibodies for two days. Cells were then stimulated following overnight resting with the indicated dose of IL-12 for 40 minutes. The curve graph represents the MFI of phosphorylated STAT4 in CD4⁺ T cells. (D) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* vs *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with anti-CD3 antibodies and anti-CD28 antibodies in Th1 polarizing conditions in the absence or in the presence of IFN γ R neutralizing antibody. Bar graph represents the percentages of CD4⁺ T cells producing IFN γ analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining. (E) Naïve CD62L^{high}CD25⁻ CD4⁺ T cells from *Themis-T^{WT}* and *Themis-T^{KO}* mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in Th1 polarizing conditions in presence of the indicated doses of ERK inhibitor (U0126) or DMSO. Curve graphs represent the percentages of CD4⁺ T producing TNF α analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining. Data are mean values \pm S.E.M and are representative of two to three independent experiments each including n=3-4 mice per group. Unpaired two-tailed Mann–Whitney t test for the other analysis. *P < 0.05.



Supplementary Figure 5. Effect of THEMIS deficiency on Th1 cell responses following stimulation with MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅. (A) CTV stained naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice were stimulated with MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅ in presence of irradiated splenocytes in Th1 polarizing condition for 3 days. Curve graphs represent the percentages of divided CD4⁺ T cells (CTV^{low}) in CD4⁺ T cells analyzed by flow cytometry following intracytoplasmic staining. Data are mean values ± S.E.M and are representative of two independent experiments each including n=3-4 mice per group. (B and C) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice were stimulated with MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅ in presence of irradiated splenocytes in Th1 polarizing condition for 3 days. Curve graphs represent the percentages of CD4⁺ T cells producing TNFα (B) and expressing T-bet (C) analyzed by flow cytometry following intracytoplasmic staining. Data are mean values ± S.E.M and are representative of two independent experiments each including n=3-4 mice per group. (D) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice were stimulated with MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅ in presence of irradiated splenocytes in Th17 polarizing condition for 3 days. Curve graphs represent the percentages of CD4⁺ T cells producing IL-17 analyzed by flow cytometry following intracytoplasmic staining. Data are mean values ± S.E.M and are representative of two independent experiments each including n=3-4 mice per group. (E) Naïve CD62L^{hi}CD25⁻CD4⁺ T cells from *2D2-Themis-T^{WT}* and *2D2-Themis-T^{KO}* mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in Th1 polarizing conditions for two days. Cells were rested for 24 hours in presence of IL-2 and re-stimulated with MOG₃₅₋₅₅ and NF-M₁₅₋₃₅ in presence of irradiated splenocytes in Th1 polarizing conditions. Curve graphs represent the expression of T-bet analyzed by flow cytometry after intracytoplasmic staining. Data are means ± S.E.M. and are representative of one experiment including n=4 mice per group. Unpaired two-tailed Mann-Whitney t test for the other analysis. *P < 0.05.

References

1. Zhu, J., H. Yamane, and W. E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* 28: 445-489.
2. Chen, L., and D. B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology* 13: 227-242.
3. Fu, G., S. Vallee, V. Rybakin, M. V. McGuire, J. Ampudia, C. Brockmeyer, M. Salek, P. R. Fallen, J. A. Hoerter, A. Munshi, Y. H. Huang, J. Hu, H. S. Fox, K. Sauer, O. Acuto, and N. R. Gascoigne. 2009. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nature immunology* 10: 848-856.
4. Johnson, A. L., L. Aravind, N. Shulzhenko, A. Morgun, S. Y. Choi, T. L. Crockford, T. Lambe, H. Domaschek, E. M. Kucharska, L. Zheng, C. G. Vinuesa, M. J. Lenardo, C. C. Goodnow, R. J. Cornall, and R. H. Schwartz. 2009. Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nature immunology* 10: 831-839.
5. Lesourne, R., S. Uehara, J. Lee, K. D. Song, L. Li, J. Pinkhasov, Y. Zhang, N. P. Weng, K. F. Wildt, L. Wang, R. Bosselut, and P. E. Love. 2009. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nature immunology* 10: 840-847.
6. Paster, W., C. Brockmeyer, G. Fu, P. C. Simister, B. de Wet, A. Martinez-Riano, J. A. Hoerter, S. M. Feller, C. Wulfig, N. R. Gascoigne, and O. Acuto. 2013. GRB2-mediated recruitment of THEMIS to LAT is essential for thymocyte development. *J Immunol* 190: 3749-3756.
7. Choi, S., C. Warzecha, E. Zvezdova, J. Lee, J. Argenty, R. Lesourne, L. Aravind, and P. E. Love. 2017. THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. *Nature immunology*.
8. Choi, S., R. Cornall, R. Lesourne, and P. E. Love. 2017. THEMIS: Two Models, Different Thresholds. *Trends in immunology* 38: 622-632.
9. Fu, G., J. Casas, S. Rigaud, V. Rybakin, F. Lambomez, J. Brzostek, J. A. Hoerter, W. Paster, O. Acuto, H. Cheroutre, K. Sauer, and N. R. Gascoigne. 2013. Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* 504: 441-445.
10. Mehta, M., J. Brzostek, E. W. Chen, D. W. H. Tung, S. T. Chen, S. Sankaran, J. Yap, V. Rybakin, and N. R. J. Gascoigne. 2018. Themis-associated phosphatase activity controls signaling in T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: E11331-E11340.
11. Zvezdova, E., J. Mikolajczak, A. Garreau, M. Marcellin, L. Rigal, J. Lee, S. Choi, G. Blaize, J. Argenty, J. Familiades, L. Li, A. Gonzalez de Peredo, O. Burlet-Schiltz, P. E. Love, and R. Lesourne. 2016. Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Science signaling* 9: ra51.
12. Brzostek, J., N. Gautam, X. Zhao, E. W. Chen, M. Mehta, D. W. H. Tung, Y. L. Chua, J. W. Yap, S. H. Cho, S. Sankaran, V. Rybakin, G. Fu, and N. R. J. Gascoigne. 2020. T cell receptor and cytokine signal integration in CD8(+) T cells is mediated by the protein Themis. *Nature immunology* 21: 186-+.
13. Bettelli, E., M. Pagany, H. L. Weiner, C. Linington, R. A. Sobel, and A. K. Kuchroo. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *Journal of Experimental Medicine* 197: 1073-1081.
14. Vacchio, M. S., L. Wang, N. Bouladoux, A. C. Carpenter, Y. Xiong, L. C. Williams, E. Wohlfert, K. D. Song, Y. Belkaid, P. E. Love, and R. Bosselut. 2014. A ThPOK-LRF

- transcriptional node maintains the integrity and effector potential of post-thymic CD4⁺ T cells. *Nature immunology* 15: 947-956.
15. Zhang, D. J., Q. Wang, J. Wei, G. Baimukanova, F. Buchholz, A. F. Stewart, X. Mao, and N. Killeen. 2005. Selective expression of the Cre recombinase in late-stage thymocytes using the distal promoter of the Lck gene. *J Immunol* 174: 6725-6731.
 16. Thierfelder, W. E., J. M. vanDeursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld, and J. N. Ihle. 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382: 171-174.
 17. Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hisson, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, and J. J. O'Shea. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 15137-15142.
 18. Chang, C. F., W. N. D'Souza, I. L. Ch'en, G. Pages, J. Pouyssegur, and S. M. Hedrick. 2012. Polar opposites: Erk direction of CD4 T cell subsets. *J Immunol* 189: 721-731.
 19. Aghajani, K., S. Keerthivasan, Y. Yu, and F. Gounari. 2012. Generation of CD4CreERT(2) Transgenic Mice to Study Development of Peripheral CD4-T-Cells. *Genesis* 50: 908-913.
 20. Azzam, H. S., A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, and P. E. Love. 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of experimental medicine* 188: 2301-2311.
 21. Lord, G. M., R. M. Rao, H. Choe, B. M. Sullivan, A. H. Lichtman, F. W. Luscinskas, and L. H. Glimcher. 2005. T-bet is required for optimal proinflammatory CD4(+) T-cell trafficking. *Blood* 106: 3432-3439.
 22. Krishnamoorthy, G., A. Saxena, L. T. Mars, H. S. Domingues, R. Mentele, A. Ben-Nun, H. Lassmann, K. Dornmair, F. C. Kurschus, R. S. Liblau, and H. Wekerle. 2009. Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nature medicine* 15: 626-U142.
 23. Rosenthal, K. M., L. J. Edwards, J. J. Sabatino, J. D. Hood, H. A. Wasserman, C. Zhu, and B. D. Evavold. 2012. Low 2-Dimensional CD4 T Cell Receptor Affinity for Myelin Sets in Motion Delayed Response Kinetics. *PLoS one* 7.
 24. Celis-Gutierrez, J., P. Blattmann, Y. Zhai, N. Jarmuzynski, K. Ruminski, C. Gregoire, Y. Ounoughene, F. Fiore, R. Aebersold, R. Roncagalli, M. Gstaiger, and B. Malissen. 2019. Quantitative Interactomics in Primary T Cells Provides a Rationale for Concomitant PD-1 and BTLA Coinhibitor Blockade in Cancer Immunotherapy. *Cell reports* 27: 3315-3330 e3317.
 25. Lebbink, R. J., T. de Ruiter, A. Verbrugge, W. S. Bril, and L. Meyaard. 2004. The mouse homologue of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is an inhibitory receptor that recruits Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-2, but not SHP-1. *Journal of Immunology* 172: 5535-5543.
 26. Watanabe, N., M. Gavrieli, J. R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S. K. Loftin, M. A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T. L. Murphy, J. H. Russell, J. P. Allison, and K. M. Murphy. 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature immunology* 4: 670-679.
 27. Colonna, M., F. Navarro, T. Bellon, M. Llano, P. Garcia, J. Samaridis, L. Angman, M. Cella, and M. LopezBotet. 1997. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *Journal of Experimental Medicine* 186: 1809-1818.
 28. Rhee, I., and A. Veillette. 2012. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nature immunology* 13: 439-447.

29. Stebbins, C. C., C. Watzl, D. D. Billadeau, P. J. Leibson, D. N. Burshtyn, and E. O. Long. 2003. Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Molecular and cellular biology* 23: 6291-6299.
30. Mesecke, S., D. Urlaub, H. Busch, R. Eils, and C. Watzl. 2011. Integration of Activating and Inhibitory Receptor Signaling by Regulated Phosphorylation of Vav1 in Immune Cells. *Science signaling* 4.
31. Okazaki, T., A. Maeda, H. Nishimura, T. Kurosaki, and T. Honjo. 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13866-13871.
32. Hui, E. F., J. Cheung, J. Zhu, X. L. Su, M. J. Taylor, H. A. Wallweber, D. K. Sasmal, J. Huang, J. M. Kim, I. Mellman, and R. D. Vale. 2017. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 355: 1428-+.
33. Frearson, J. A., and D. R. Alexander. 1998. The phosphotyrosine phosphatase SHP-2 participates in a multimeric signaling complex and regulates T cell receptor (TCR) coupling to the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in Jurkat T cells. *The Journal of experimental medicine* 187: 1417-1426.
34. Nguyen, T. V., Y. Ke, E. E. Zhang, and G. S. Feng. 2006. Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. *J Immunol* 177: 5990-5996.
35. Mauldin, I. S., K. S. Tung, and U. M. Lorenz. 2012. The tyrosine phosphatase SHP-1 dampens murine Th17 development. *Blood* 119: 4419-4429.
36. Kamata, T., M. Yamashita, M. Kimura, K. Murata, M. Inami, C. Shimizu, K. Sugaya, C. R. Wang, M. Taniguchi, and T. Nakayama. 2003. src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 111: 109-119.
37. Deng, C. S., A. Minguela, R. Z. Hussain, A. E. Lovett-Racke, C. Radu, E. S. Ward, and M. K. Racke. 2002. Expression of the tyrosine phosphatase Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 determines T cell activation threshold and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 168: 4511-4518.
38. Johnson, D. J., L. I. Pao, S. Dhanji, K. Murakami, P. S. Ohashi, and B. G. Neel. 2013. Shp1 regulates T cell homeostasis by limiting IL-4 signals. *Journal of Experimental Medicine* 210: 1419-1431.
39. Mercadante, E. R., and U. M. Lorenz. 2017. T Cells Deficient in the Tyrosine Phosphatase SHP-1 Resist Suppression by Regulatory T Cells. *Journal of Immunology* 199: 129-137.
40. Sathish, J. G., J. Walters, J. C. Luo, K. G. Johnson, F. G. LeRoy, P. Brennan, K. P. Kim, S. P. Gygi, B. G. Neel, and R. J. Matthews. 2004. CD22 is a functional ligand for SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-1 in primary T cells. *Journal of Biological Chemistry* 279: 47783-47791.
41. Johnson, D., L. Pao, S. Dhanji, K. Murakami, B. Neel, and P. Ohashi. 2013. Shp1 regulates T cell homeostasis by antagonizing IL-4 signalling. *Journal of Immunology* 190.
42. Johnson, D. J., L. I. Pao, S. Dhanji, K. Murakami, P. S. Ohashi, and B. G. Neel. 2013. Shp1 regulates T cell homeostasis by limiting IL-4 signals. *The Journal of experimental medicine* 210: 1419-1431.

43. Bettelli, E., B. Sullivan, S. J. Szabo, R. A. Sobel, H. Glimcher, and V. K. Kuchroo. 2004. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* 200: 79-87.
44. Lovett-Racke, A. E., A. E. Rocchini, J. Choy, S. C. Northrop, R. Z. Hussain, R. B. Ratts, D. Sikder, and M. K. Racke. 2004. Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity* 21: 719-731.
45. Naves, R., S. P. Singh, K. S. Cashman, A. L. Rowse, R. C. Axtell, L. Steinman, J. D. Mountz, C. Steele, P. De Sarno, and C. Raman. 2013. The Interdependent, Overlapping, and Differential Roles of Type I and II IFNs in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 191: 2967-2977.
46. Furlan, R., E. Brambilla, F. Ruffini, P. L. Poliani, A. Bergami, P. C. Marconi, D. M. Franciotta, G. Penna, G. Comi, L. Adorini, and G. Martino. 2001. Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes. *Journal of Immunology* 167: 1821-1829.
47. Yamane, H., J. Zhu, and W. E. Paul. 2005. Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *The Journal of experimental medicine* 202: 793-804.
48. van Panhuys, N., F. Klauschen, and R. N. Germain. 2014. T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization In Vivo. *Immunity* 41: 63-74.

Références

- Aatsinki, A. K., Keskitalo, A., Laitinen, V., Munukka, E., Uusitupa, H. M., Lahti, L., Kortelasma, S., Mustonen, P., Rodrigues, A. J., Coimbra, B., Huovinen, P., Karlsson, H., & Karlsson, L. (2020). Maternal prenatal psychological distress and hair cortisol levels associate with infant fecal microbiota composition at 2.5 months of age. *Psychoneuroendocrinology*, *119*(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104754>
- Aghajani, K., Keerthivasan, S., Yu, Y., & Gounari, F. (2012). Generation of CD4CreERT2 transgenic mice to study development of peripheral CD4-T-cells. *Genesis*, *50*(12), 908–913. <https://doi.org/10.1002/dvg.22052>
- Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., Van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., & Sorokin, L. M. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(4), 1007–1016. <https://doi.org/10.1084/jem.20051342>
- Akkaya, B., Oya, Y., Akkaya, M., Al Souz, J., Holstein, A. H., Kamenyeva, O., Kabat, J., Matsumura, R., Dorward, D. W., Glass, D. D., & Shevach, E. M. (2019). Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nature Immunology*, *20*(2), 218–231. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0280-2>
- Al Nabhani, Z., Dulauroy, S., Marques, R., Cousu, C., Al Bounny, S., Déjardin, F., Sparwasser, T., Bérard, M., Cerf-Bensussan, N., & Eberl, G. (2019). A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. *Immunity*, *50*(5), 1276–1288.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.02.014>
- Alam, M. S., Gaida, M. M., Debnath, S., Tagad, H. D., Miller Jenkins, L. M., Appella, E., Rahman, M. J., & Ashwell, J. D. (2018). Unique properties of TCR-activated p38 are necessary for NFAT-dependent T-cell activation. *PLoS Biology*, *16*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004111>
- Alcorn, J. F., Crowe, C. R., & Kolls, J. K. (2009). TH17 cells in asthma and COPD. *Annual Review of Physiology*, *72*, 495–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135926>
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., Von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., & Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, *298*(5597), 1395–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1075958>
- Ardouin, L., Bracke, M., Mathiot, A., Pagakis, S. N., Norton, T., Hogg, N., & Tybulewicz, V. L. J. (2003). Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *European Journal of Immunology*, *33*(3), 790–797. <https://doi.org/10.1002/eji.200323858>
- Arnason, B. G. W. (1999). TNF neutralization in MS: Results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology*, *53*(3), 457–465. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.3.457>
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., Van Der Veecken, J., Deroos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, *504*(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Ashwell, J. D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *6*(7), 532–540. <https://doi.org/10.1038/nri1865>
- Avidan, N., Le Panse, R., Harbo, H. F., Bernasconi, P., Poulas, K., Ginzburg, E., Cavalcante, P., Colleoni, L., Baggi, F., Antozzi, C., Truffault, F., Horn-Saban, S., Pöschel, S., Zagoriti, Z., Maniaol, A., Lie, B. A., Bernard, I., Saoudi, A., Illes, Z., ... Miller, A. (2014). VAV1 and BAFF, via NFκB pathway, are genetic risk factors for myasthenia gravis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *1*(5), 329–339. <https://doi.org/10.1002/acn3.51>
- Bailey, M. T., Lubach, G. R., & Coe, C. L. (2004). Prenatal Stress Alters Bacterial Colonization of the Gut in Infant Monkeys. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *38*(4), 414–421. <https://doi.org/10.1097/00005176-200404000-00009>
- Balasubramani, A., Mukasa, R., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2010). Regulation of the Ifng locus in the context of T-lineage specification and plasticity. *Immunological Reviews*, *238*(1), 216–232. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00961.x>
- Balasubramani, A., Shibata, Y., Crawford, G. E., Baldwin, A. S., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2010). Modular utilization of distal cis-regulatory elements controls Ifng gene expression in T cells activated by distinct stimuli. *Immunity*, *33*(1), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.004>
- Baron, J. L., Madri, J. A., Ruddle, N. H., Hashim, G., & Janeway, C. A. (1993). Surface expression of α4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *Journal of Experimental Medicine*, *177*(1), 57–68. <https://doi.org/10.1084/jem.177.1.57>
- Becher, B., Durell, B. G., & Noelle, R. J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(4), 493–497. <https://doi.org/10.1172/JCI0215751>
- Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2016). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews*

- Immunology*, 17(1), 49–59. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.123>
- Belge, K., Brück, J., & Ghoreschi, K. (2014). Advances in treating psoriasis. *F1000Prime Reports*, 6(January), 2–9. <https://doi.org/10.12703/P6-4>
- Ben-Nun, A., Kaushansky, N., Kawakami, N., Krishnamoorthy, G., Berer, K., Liblau, R., Hohlfeld, R., & Wekerle, H. (2014). From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: Impact on understanding pathogenesis and drug development. *Journal of Autoimmunity*, 54, 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.06.004>
- Benítez-Páez, A., Gómez del Pugar, E. M., López-Almela, I., Moya-Pérez, Á., Codoñer-Franch, P., & Sanz, Y. (2020). Depletion of Blautia Species in the Microbiota of Obese Children Relates to Intestinal Inflammation and Metabolic Phenotype Worsening. *MSystems*, 5(2), 1–13. <https://doi.org/10.1128/msystems.00857-19>
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., & Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27(1), 20–21. <https://doi.org/10.1038/83713>
- Berer, K., Mues, M., Koutrolas, M., AlRasbi, Z., Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H., & Krishnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 479(7374), 538–541. <https://doi.org/10.1038/nature10554>
- Bernard, I., Sacquin, A., Kassem, S., Benamar, M., Colacios, C., Gador, M., Pérals, C., Fazilleau, N., & Saoudi, A. (2018). A natural variant of the signaling molecule Vav1 enhances susceptibility to myasthenia gravis and influences the T cell receptor repertoire. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02399>
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S. J., Sobel, R. A., Glimcher, L. H., & Kuchroo, V. K. (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 200(1), 79–87. <https://doi.org/10.1084/jem.20031819>
- Beversdorf, D. Q., Manning, S. E., Hillier, A., Anderson, S. L., Nordgren, R. E., Walters, S. E., Nagaraja, H. N., Cooley, W. C., Gaelic, S. E., & Bauman, M. L. (2005). Timing of prenatal stressors and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 35(4), 471–478. <https://doi.org/10.1007/s10803-005-5037-8>
- Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., & Guillonnet, C. (2015). IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, 125(10), 3952–3964. <https://doi.org/10.1172/JCI81227>
- Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H. T., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2007). Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from. *Immunity*, 26(6), 678–689. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.009>
- Bhattacharyya, N. D., & Feng, C. G. (2020). Regulation of T Helper Cell Fate by TCR Signal Strength. *Frontiers in Immunology*, 11(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00624>
- Bianchimano, P., Britton, G. J., Wallach, D. S., Smith, E. M., Cox, L. M., Liu, S., Weiner, H. L., Faith, J. J., Clemente, J. C., Tankou, S. K., & Sciences, G. (2021). *Human gut derived*. 17.
- Bittner-Eddy, P. D., Fischer, L. A., & Costalonga, M. (2019). Cre-loxP Reporter Mouse Reveals Stochastic Activity of the Foxp3 Promoter. *Frontiers in Immunology*, 10(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02228>
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Björnses, P., Aaltonen, J., Horelli-Kuitunen, N., Yaspo, M. L., & Peltonen, L. (1998). Gene defect behind APECED: A new clue to autoimmunity. *Human Molecular Genetics*, 7(10), 1547–1553. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.10.1547>
- Bokoch, G. M., Vlahos, C. J., Wang, Y., Knaus, U. G., & Traynor-Kaplan, A. E. (1996). Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemical Journal*, 315(3), 775–779. <https://doi.org/10.1042/bj3150775>
- Bondar, C., Plaza-Izurieta, L., Fernandez-Jimenez, N., Irastorza, I., Withoff, S., Wijmenga, C., Chirido, F., & Bilbao, J. R. (2014). THEMIS and PTPRK in celiac intestinal mucosa: Coexpression in disease and after in vitro gliadin challenge. *European Journal of Human Genetics*, 22(3), 358–362. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.136>
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., Rossini, P. M., Battistini, L., Röttschke, O., & Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), 1225–1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Guan, N. L., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B.,

- & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, 6(263). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Brereton, C. F., Sutton, C. E., Lalor, S. J., Lavelle, E. C., & Mills, K. H. G. (2009). Inhibition of ERK MAPK Suppresses IL-23- and IL-1-Driven IL-17 Production and Attenuates Autoimmune Disease. *The Journal of Immunology*, 183(3), 1715–1723. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803851>
- Brocke, S., Gijbels, K., Allegretta, M., Ferber, I., Plercy, C., Blankenstein, T., Martin, R., Utz, U., Karin, N., Mitchell, D., Veromaa, T., Walsman, A., Gaur, A., Conlon, P., Ling, N., Fairchild, P. J., Wraith, D. C., O’Garra, A., Fathman, C. G., & Steinman, L. (1996). Erratum: Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein (Nature (1996) 379 (343-346)). *Nature*, 392(6676), 630. <https://doi.org/10.1038/33465>
- Brockmeyer, C., Paster, W., Pepper, D., Tan, C. P., Trudgian, D. C., McGowan, S., Fu, G., Gascoigne, N. R. J., Acuto, O., & Salek, M. (2011). T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7535–7547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201236>
- Browne, T. C., McQuillan, K., McManus, R. M., O’Reilly, J.-A., Mills, K. H. G., & Lynch, M. A. (2013). IFN- γ Production by Amyloid β -Specific Th1 Cells Promotes Microglial Activation and Increases Plaque Burden in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *The Journal of Immunology*, 190(5), 2241–2251. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200947>
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepfer, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., & Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*, 27(1), 68–73. <https://doi.org/10.1038/83784>
- Brzostek, J., Gautam, N., Zhao, X., Chen, E. W., Mehta, M., Tung, D. W. H., Chua, Y. L., Yap, J., Cho, S. H., Sankaran, S., Rybakina, V., Fu, G., & Gascoigne, N. R. J. (2020). T cell receptor and cytokine signal integration in CD8⁺ T cells is mediated by the protein Themis. *Nature Immunology*, 21(2), 186–198. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0570-3>
- Buscarinu, M. C., Romano, S., Mechelli, R., Umeton, R. P., & Ferraldeschi, M. (2017). *Intestinal Permeability in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis*.
- Campbell, I. K., van Nieuwenhuijze, A., Segura, E., O’Donnell, K., Coghill, E., Hommel, M., Gerondakis, S., Villadangos, J. A., & Wicks, I. P. (2011). Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells Is Mediated by NF- κ B1-Dependent GM-CSF Production in CD4 T Cells. *The Journal of Immunology*, 186(9), 5468–5477. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002923>
- Campisi, L., Barbet, G., Ding, Y., Esplugues, E., Flavell, R. A., & Blander, J. M. (2016). Apoptosis in response to microbial infection induces autoreactive T H17 cells. *Nature Immunology*, 17(9), 1084–1092. <https://doi.org/10.1038/ni.3512>
- Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnicka-Worms, D. R., & Ley, T. J. (2007). Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*, 27(4), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.014>
- Capitani, N., Amedei, A., Paccani, S. R., Matucci, A., Vultaggio, A., Del Prete, G., Baldari, C. T., & D’Elios, M. M. (2010). Impaired TH2 response in patients with Vav1-deficient common variable immunodeficiency with T-cell defects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 671–675. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.05.033>
- Cekanaviciute, E., Yoo, B. B., Runia, T. F., Debelius, J. W., Singh, S., Nelson, C. A., Kanner, R., Bencosme, Y., Lee, Y. K., Hauser, S. L., Crabtree-Hartman, E., Sand, I. K., Gacias, M., Zhu, Y., Casaccia, P., Cree, B. A. C., Knight, R., Mazmanian, S. K., & Baranzini, S. E. (2017). Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40), 10713–10718. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711235114>
- Chabod, M., Pedros, C., Lamouroux, L., Colacios, C., Bernard, I., Lagrange, D., Balz-Hara, D., Mosnier, J. F., Laboisse, C., Vergnolle, N., Andreoletti, O., Roth, M. P., Liblau, R., Fournié, G. J., Saoudi, A., & Dejean, A. S. (2012). A spontaneous mutation of the rat Themis gene leads to impaired function of regulatory T cells linked to inflammatory bowel disease. *PLoS Genetics*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002461>
- Chang, C.-F., D’Souza, W. N., Ch’*en*, I. L., Pages, G., Pouyssegur, J., & Hedrick, S. M. (2012). Polar Opposites: Erk Direction of CD4 T Cell Subsets. *The Journal of Immunology*, 189(2), 721–731. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103015>
- Chang, X., Liu, F., Wang, X., Lin, A., Zhao, H., & Su, B. (2011). The Kinases MEKK2 and MEKK3 Regulate Transforming Growth Factor- β -Mediated Helper T Cell Differentiation. *Immunity*, 34(2), 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.017>
- Chen, J., Chia, N., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Novotna, M., Soldan, M. M. P., Luckey, D. H., Marietta, E. V., Jeraldo, P. R., Chen, X., Weinschenker, B. G., Rodriguez, M., Kantarci, O. H., Nelson, H., Murray, J. A., &

- Mangalam, A. K. (2016). Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific Reports*, *6*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep28484>
- Chen, T., Noto, D., Hoshino, Y., Mizuno, M., & Miyake, S. (2019). Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1552-y>
- Choi, S., Cornall, R., Lesourne, R., & Love, P. E. (2017). THEMIS: Two Models, Different Thresholds. *Trends in Immunology*, *38*(9), 622–632. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.06.006>
- Choi, S., Warzecha, C., Zvezdova, E., Lee, J., Argenty, J., Lesourne, R., Aravind, L., & Love, P. E. (2017). THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. *Nature Immunology*, *18*(4), 433–441. <https://doi.org/10.1038/ni.3692>
- Ciofani, M., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2007). The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *23*, 463–493. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123547>
- Codarri, L., Gyölvészii, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., & Becher, B. (2011). ROR γ 3t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology*, *12*(6), 560–567. <https://doi.org/10.1038/ni.2027>
- Colacios, C., Casemayou, A., Dejean, A. S., Gaits-Iacovoni, F., Pedros, C., Bernard, I., Lagrange, D., Deckert, M., Lamouroux, L., Jagodic, M., Olsson, T., Liblau, R. S., Fournié, G. J., & Saoudi, A. (2011). The p.Arg63Trp polymorphism controls Vav1 functions and Foxp3 regulatory T cell development. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(11), 2183–2191. <https://doi.org/10.1084/jem.20102191>
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., & Vignali, D. A. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, *450*(7169), 566–569. <https://doi.org/10.1038/nature06306>
- Constant, B. S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., & Bottomly, K. (1995). *Brief Definitive Report*. *182*(November), 0–5.
- Corn, R. A., Aronica, M. A., Zhang, F., Tong, Y., Stanley, S. A., Kim, S. R. A., Stephenson, L., Enerson, B., McCarthy, S., Mora, A., & Boothby, M. (2003). T Cell-Intrinsic Requirement for NF- κ B Induction in Postdifferentiation IFN- γ Production and Clonal Expansion in a Th1 Response. *The Journal of Immunology*, *171*(4), 1816–1824. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1816>
- Cosorich, I., Dalla-Costa, G., Sorini, C., Ferrarese, R., Messina, M. J., Dolpady, J., Radice, E., Mariani, A., Testoni, P. A., Canducci, F., Comi, G., Martinelli, V., & Falcone, M. (2017). High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Science Advances*, *3*(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700492>
- Costello, P. S., Walters, A. E., Mee, P. J., Turner, M., Reynolds, L. F., Prisco, A., Sarner, N., Zamoyska, R., & Tybulewicz, V. L. J. (1999). The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF- κ B pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(6), 3035–3040. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3035>
- Coutinho, A. E., & Chapman, K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *335*(1), 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>
- Cox, L. M., Maghzi, A. H., Liu, S., Tankou, S. K., Dhang, F. H., Willocq, V., Song, A., Wasén, C., Tauhid, S., Chu, R., Anderson, M. C., De Jager, P. L., Polgar-Turcsanyi, M., Healy, B. C., Glanz, B. I., Bakshi, R., Chitnis, T., & Weiner, H. L. (2021). Gut Microbiome in Progressive Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, *89*(6), 1195–1211. <https://doi.org/10.1002/ana.26084>
- Crespo, P., Schuebel, K., Osrom, A., Gutkind, S., & Bustelo, X. (1997). *1997 Crespo (bustelo) Y-phospho activation.pdf*.
- Croxford, A. L., Lanzinger, M., Hartmann, F. J., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., Clausen, B. E., Jung, S., Greter, M., & Becher, B. (2015). The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2+ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity*, *43*(3), 502–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.010>
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A., & Sedgwick, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, *421*(6924), 744–748. <https://doi.org/10.1038/nature01355>
- Darnaudéry, M., & Maccari, S. (2008). Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Research Reviews*, *57*(2), 571–585. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.11.004>
- Das, J., Chen, C. H., Yang, L., Cohn, L., Ray, P., & Ray, A. (2001). A critical role for NF- κ B in Gata3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nature Immunology*, *2*(1), 45–50.

- <https://doi.org/10.1038/83158>
- Davies, J. L., Thompson, S., Kaur-Sandhu, H., Sawcer, S., Coles, A., Ban, M., & Jones, J. (2016). Increased THEMIS first exon usage in CD4+ T-cells is associated with a genotype that is protective against multiple sclerosis. *PLoS ONE*, *11*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158327>
- De Marco, R., Pesce, G., Girardi, P., Marchetti, P., Rava, M., Ricci, P., & Marcon, A. (2012). Foetal exposure to maternal stressful events increases the risk of having asthma and atopic diseases in childhood. *Pediatric Allergy and Immunology*, *23*(8), 724–729. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2012.01346.x>
- Delarasse, C., Daubas, P., Mars, L. T., Vizler, C., Litzemberger, T., Iglesias, A., Bauer, J., Della Gaspera, B., Schubart, A., Decker, L., Dimitri, D., Roussel, G., Dierich, A., Amor, S., Dautigny, A., Liblau, R., & Pham-Dinh, D. (2003). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(4), 544–553. <https://doi.org/10.1172/JCI15861>
- Delgoffe, G. M., Pollizzi, K. N., Waickman, A. T., Heikamp, E., Meyers, D. J., Horton, M. R., Xiao, B., Worley, P. F., & Powell, J. D. (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nature Immunology*, *12*(4), 295–304. <https://doi.org/10.1038/ni.2005>
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, *15*(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Deng, C., Wu, B., Yang, H., Hussain, R. Z., Lovett-Racke, A. E., Christadoss, P., & Racke, M. K. (2003). Decreased expression of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 reduces T cell activation threshold but not the severity of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Journal of Neuroimmunology*, *138*(1–2), 76–82. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(03\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(03)00119-X)
- Ding, X., Yan, Y., Li, X., Li, K., Ciric, B., Yang, J., Zhang, Y., Wu, S., Xu, H., Chen, W., Lovett-Racke, A. E., Zhang, G.-X., & Rostami, A. (2015). Silencing IFN- γ Binding/Signaling in Astrocytes versus Microglia Leads to Opposite Effects on Central Nervous System Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, *194*(9), 4251–4264. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303321>
- Dodeller, F., & Schulze-Koops, H. (2006). The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Research and Therapy*, *8*(2), 1–11. <https://doi.org/10.1186/ar1905>
- Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C. M., & Hafler, D. A. (2011). Identification of T helper type 1-like, Foxp3 + regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nature Medicine*, *17*(6), 673–675. <https://doi.org/10.1038/nm.2389>
- Dong, C., Yang, D. D., Tournler, C., Whitmarsh, A. J., Xu, J., Davis, R. J., & Flavell, R. A. (2000). JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature*, *405*(6782), 91–94. <https://doi.org/10.1038/35011091>
- Dong, Y., & Yong, V. W. (2019). When encephalitogenic T cells collaborate with microglia in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, *15*(12), 704–717. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0253-6>
- Dopkins, N., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2018). The role of gut microbiome and associated metabolome in the regulation of neuroinflammation in multiple sclerosis and its implications in attenuating chronic inflammation in other inflammatory and autoimmune disorders. *Immunology*, *154*(2), 178–185. <https://doi.org/10.1111/imm.12903>
- Douros, K., Moustaki, M., Tsabouri, S., Papadopoulou, A., Papadopoulos, M., & Priftis, K. N. (2017). Prenatal maternal stress and the risk of asthma in children. *Frontiers in Pediatrics*, *5*(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00202>
- Dubois, P. C. A., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K. A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G. A. R., Ádány, R., Aromaa, A., Bardella, M. T., Van Den Berg, L. H., Bockett, N. A., De La Concha, E. G., Dema, B., Fehrmann, R. S. N., Fernández-Arquero, M., Fiatal, S., Grandone, E., ... Van Heel, D. A. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature Genetics*, *42*(4), 295–302. <https://doi.org/10.1038/ng.543>
- Duc, D., Vigne, S., Bernier-Latmani, J., Yersin, Y., Ruiz, F., Gaïa, N., Leo, S., Lazarevic, V., Schrenzel, J., Petrova, T. V., & Pot, C. (2019). Disrupting Myelin-Specific Th17 Cell Gut Homing Confers Protection in an Adoptive Transfer Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell Reports*, *29*(2), 378–390.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.002>
- Duffy, S. S., Keating, B. A., & Moalem-Taylor, G. (2019). Adoptive Transfer of Regulatory T Cells as a Promising Immunotherapy for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(October), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01107>
- Duguet, F., Locard-Paulet, M., Marcellin, M., Chaoui, K., Bernard, I., Andreoletti, O., Lesourne, R., Burllet-Schiltz, O., De Peredo, A. G., & Saoudi, A. (2017). Proteomic analysis of regulatory T cells reveals the importance of Themis1 in the control of their suppressive function. *Molecular and Cellular Proteomics*, *16*(8), 1416–1432. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.062745>
- Duncker, P. C., Stoolman, J. S., Huber, A. K., & Segal, B. M. (2018). GM-CSF Promotes Chronic Disability in

- Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Altering the Composition of Central Nervous System–Infiltrating Cells, but Is Dispensable for Disease Induction. *The Journal of Immunology*, 200(3), 966–973. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701484>
- Dupage, M., & Bluestone, J. A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nature Reviews Immunology*, 16(3), 149–163. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.18>
- Eisenbarth, S. C. (2019). Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nature Reviews Immunology*, 19(2), 89–103. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0088-1>
- Engelhardt, B., Vajkoczy, P., & Weller, R. O. (2017). The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature Immunology*, 18(2), 123–131. <https://doi.org/10.1038/ni.3666>
- Entringer, S., Kumsta, R., Nelson, E. L., Hellhammer, D. H., Wadhwa, P. D., & Wüst, S. (2008). Influence of prenatal psychosocial stress on cytokine production in adult women. *Developmental Psychobiology*, 50(6), 579–587. <https://doi.org/10.1002/dev.20316>
- Faghih, M., Barartabar, Z., Nasiri, Z., & Rostami-Nejad, M. (2018). The role of Th1 and Th17 in the pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology & Hepatology: Open Access*, 9(2), 83–87. <https://doi.org/10.15406/ghoa.2018.09.00300>
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., & Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(12), 1206–1212. <https://doi.org/10.1038/ni1003>
- Fazilleau, N., Delarasse, C., Sweenie, C. H., Anderton, S. M., Fillatreau, S., Lemonnier, F. A., Pham-Dinh, D., & Kanellopoulos, J. M. (2006). Persistence of autoreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell repertoires in MOG-expressing mice. *European Journal of Immunology*, 36(3), 533–543. <https://doi.org/10.1002/eji.200535021>
- Ferber, I. A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., & Fathman, C. G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(1), 5–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598493>
- Fischer, H. J., Finck, T. L. K., Pellkofer, H. L., Reichardt, H. M., & Lühder, F. (2019). Glucocorticoid therapy of multiple sclerosis patients induces anti-inflammatory polarization and increased chemotaxis of monocytes. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01200>
- Fischer, K. D., Kong, Y. Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengère, L. E. M., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., Nghiem, M. P., Bouchard, D., Barbacid, M., Bernstein, A., & Penninger, J. M. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Current Biology*, 8(10), 554–562. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70224-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70224-6)
- Fischer, K. D., Zmuidzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., & Guidos, C. (1995). Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+CD8+thymocytes. *Nature*, 374(6521), 474–476. <https://doi.org/10.1038/374474a0>
- Fonte, C., Kaminski, S., Vanet, A., Lanfumey, L., Cohen-Salmon, C., Ghislin, S., & Fripiat, J. P. (2019). Socioenvironmental stressors encountered during spaceflight partially affect the murine TCR-β repertoire and increase its self-reactivity. *FASEB Journal*, 33(1), 896–908. <https://doi.org/10.1096/fj.201800969R>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 198(3), 986–992. <https://doi.org/10.1038/ni904>
- Ford, M. L., & Evavold, B. D. (2005). Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, 35(1), 76–85. <https://doi.org/10.1002/eji.200425660>
- Frearson, J. A., & Alexander, D. R. (1998). The phosphotyrosine phosphatase SHP-2 participates in a multimeric signaling complex and regulates T cell receptor (TCR) coupling to the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in Jurkat T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 187(9), 1417–1426. <https://doi.org/10.1084/jem.187.9.1417>
- Fu, G., Casas, J., Rigaud, S., Rybakin, V., Lambolez, F., Brzostek, J., Hoerter, J. A. H., Paster, W., Acuto, O., Cheroutre, H., Sauer, K., & Gascoigne, N. R. J. (2013). Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature*, 504(7480), 441–445. <https://doi.org/10.1038/nature12718>
- Fu, G., Chen, Y., Yu, M., Podd, A., Schuman, J., He, Y., Di, L., Yassai, M., Haribhai, D., North, P. E., Gorski, J., Williams, C. B., Wang, D., & Wen, R. (2010). Phospholipase Cγ1 is essential for T cell development, activation, and tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 207(2), 309–318. <https://doi.org/10.1084/jem.20090880>
- Fu, G., Vallée, S., Rybakin, V., McGuire, M. V., Ampudia, J., Brockmeyer, C., Salek, M., Fallen, P. R., Hoerter, J. A. H., Munshi, A., Huang, Y. H., Hu, J., Fox, H. S., Sauer, K., Acuto, O., & Gascoigne, N. R. J. (2009). Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. *Nature Immunology*, 10(8), 848–856. <https://doi.org/10.1038/ni.1766>
- Fujikawa, K., Miletic, A. V., Alt, F. W., Faccio, R., Brown, T., Hoog, J., Fredericks, J., Nishi, S., Mildiner, S.,

- Moore, S. L., Brugge, J., Rosen, F. S., & Swat, W. (2003). Vav1/2/3-null Mice Define an Essential Role for Vav Family Proteins in Lymphocyte Development and Activation but a Differential Requirement in MAPK Signaling in T and B Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 198(10), 1595–1608. <https://doi.org/10.1084/jem.20030874>
- Gagliani, N., Amezcuca Vesely, M. C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., De Zoete, M. R., Licona-Limón, P., Paiva, R. S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L. X., Cotton, M. J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., ... Flavell, R. A. (2015). TH17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*, 523(7559), 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature14452>
- Gao, J. X., Zhang, H., Bai, X. F., Wen, J., Zheng, X., Liu, J., Zheng, P., & Liu, Y. (2002). Perinatal blockade of B7-1 and B7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195(8), 959–971. <https://doi.org/10.1084/jem.20011948>
- García-Bernal, D., Wright, N., Sotillo-Mallo, E., Nombela-Arrieta, C., Stein, J. V., Bustelo, X. R., & Teixeido, J. (2005). Vav1 and Rac Control Chemokine-promoted T Lymphocyte Adhesion Mediated by the Integrin $\alpha_4\beta_1$. *Mol Biol Cell*.
- Garreau, A., Blaize, G., Argenty, J., Rouquié, N., Tourdès, A., Wood, S. A., Saoudi, A., & Lesourne, R. (2017). Grb2-Mediated Recruitment of USP9X to LAT Enhances Themis Stability following Thymic Selection. *The Journal of Immunology*, 199(8), 2758–2766. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700566>
- Gascoigne, N. R. J., & Acuto, O. (2015). THEMIS: A critical TCR signal regulator for ligand discrimination. *Current Opinion in Immunology*, 33, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.020>
- Gaud, G., Lesourne, R., & Love, P. E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 18(8), 485–497. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0020-8>
- Gaud, G., Roncagalli, R., Chaoui, K., Bernard, I., Familiades, J., Colacios, C., Kassem, S., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., De Peredo, A. G., Malissen, B., & Saoudi, A. (2018). Erratum: The costimulatory molecule CD226 signals through VAV1 to amplify TCR signals and promote IL-17 production by CD4⁺ T cells (Science Signaling). *Science Signaling*, 11(558). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw0656>
- Gensous, N., Charrier, M., Duluc, D., Contin-Bordes, C., Truchetet, M. E., Lazaro, E., Duffau, P., Blanco, P., & Richez, C. (2018). T follicular helper cells in autoimmune disorders. *Frontiers in Immunology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01637>
- Golubeva, A. V., Crampton, S., Desbonnet, L., Edge, D., O'Sullivan, O., Lomasney, K. W., Zhdanov, A. V., Crispie, F., Moloney, R. D., Borre, Y. E., Cotter, P. D., Hyland, N. P., O'Halloran, K. D., Dinan, T. G., O'Keefe, G. W., & Cryan, J. F. (2015). Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 60, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.06.002>
- Gomez-Rodriguez, J., Sahu, N., Handon, R., Davidson, T. S., Anderson, S. M., Kirby, M. R., August, A., & Schwartzberg, P. L. (2009). Differential Expression of Interleukin-17A and -17F Is Coupled to T Cell Receptor Signaling via Inducible T Cell Kinase. *Immunity*, 31(4), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.07.009>
- Goplen, N., Karim, Z., Guo, L., Zhuang, Y., Huang, H., Gorska, M. M., Gelfand, E., Pagés, G., Pouysségur, J., & Alam, R. (2012). ERK1 is important for Th2 differentiation and development of experimental asthma. *The FASEB Journal*, 26(5), 1934–1945. <https://doi.org/10.1096/fj.11-196477>
- Gottschalk, R. A., Corse, E., & Allison, J. P. (2010). TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1701–1711. <https://doi.org/10.1084/jem.20091999>
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, 9(6), 393–407. <https://doi.org/10.1038/nri2550>
- Grainger, J. R., Smith, K. A., Hewitson, J. P., McSorley, H. J., Harcus, Y., Filbey, K. J., Finney, C. A. M., Greenwood, E. J. D., Knox, D. P., Wilson, M. S., Belkaid, Y., Rudensky, A. Y., & Maizels, R. M. (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2331–2341. <https://doi.org/10.1084/jem.20101074>
- Graingnic-Philippe et al., Effects of prenatal stress on fetal and child development : a critical literature review. (2014). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.
- Graves, M. C., Benton, M., Lea, R. A., Boyle, M., Tajouri, L., Macartney-Coxson, D., Scott, R. J., & Lechner-Scott, J. (2014). Methylation differences at the HLA-DRB1 locus in CD4⁺ T-Cells are associated with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(8), 1033–1041. <https://doi.org/10.1177/1352458513516529>
- Grinberg-Bleyer, Y., Oh, H., Desrichard, A., Bhatt, D. M., Caron, R., Chan, T. A., Schmid, R. M., Klein, U., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2017). NF- κ B c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell*, 170(6), 1096–1108.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.004>
- Grogan, J. L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D. A., Sedat, J. W., & Locksley, R. M. (2001). Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*, 14(3), 205–215.

- [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00103-0)
- Grumont, R., Lock, P., Mollinari, M., Shannon, F. M., Moore, A., & Gerondakis, S. (2004). The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF- κ B-dependent c-myc expression. *Immunity*, *21*(1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.004>
- Guerreiro-Cacais, A. O., Norin, U., Gyllenberg, A., Berglund, R., Beyeen, A. D., Petit-Teixeira, E., Cornélis, F., Saoudi, A., Fournié, G. J., Holmdahl, R., Alfredsson, L., Klareskog, L., Jagodic, M., Olsson, T., Kockum, I., & Padyukov, L. (2017). VAV1 regulates experimental autoimmune arthritis and is associated with anti-CCP negative rheumatoid arthritis. *Genes and Immunity*, *18*(1), 48–56. <https://doi.org/10.1038/gene.2016.49>
- Gulbranson-Judge, A., Tybulewicz, V. L. J., Walters, A. E., Toellner, K. M., MacLennan, I. C. M., & Turner, M. (1999). Defective immunoglobulin class switching in Vav-deficient mice is attributable to compromised T cell help. *European Journal of Immunology*, *29*(2), 477–487. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199902\)29:02<477::AID-IMMU477>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199902)29:02<477::AID-IMMU477>3.0.CO;2-V)
- Hadeiba, H., Lahl, K., Edalati, A., Oderup, C., Habtezion, A., Pachynski, R., Nguyen, L., Ghodsi, A., Adler, S., & Butcher, E. C. (2012). Plasmacytoid Dendritic Cells Transport Peripheral Antigens to the Thymus to Promote Central Tolerance. *Immunity*, *36*(3), 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.017>
- Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., & Consortium, T. international M. S. G. (2007). Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *New England Journal of Medicine*, *355*, 687–696.
- Hamilton, K. S., Phong, B., Corey, C., Cheng, J., Gorentla, B., Zhong, X., Shiva, S., & Kane, L. P. (2014). T cell receptor-dependent activation of mTOR signaling in T Cells Is Mediated by Carma1 and MALT1, but not Bcl10. *Science Signaling*, *7*(329), 1–13. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004983>
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A., & Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*, *279*(5350), 558–560. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.558>
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, *6*(11), 1123–1132. <https://doi.org/10.1038/ni1254>
- Hauser, S. L., Bhan, A. K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C., & Weiner, H. L. (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, *19*(6), 578–587. <https://doi.org/10.1002/ana.410190610>
- He, X., Park, K., Wang, H., He, X., Zhang, Y., Hua, X., Li, Y., & Kappes, D. J. (2008). CD4-CD8 Lineage Commitment Is Regulated by a Silencer Element at the ThPOK Transcription-Factor Locus. *Immunity*, *28*(3), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.006>
- Hegazy, A. N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Fröhlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D. D., Radbruch, A., & Löhning, M. (2010). Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3+T-bet+ Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions. *Immunity*, *32*(1), 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.12.004>
- Helou, Y. A., Petrashen, A. P., & Salomon, A. R. (2015). Vav1 Regulates T-Cell Activation through a Feedback Mechanism and Crosstalk between the T-Cell Receptor and CD28. *Journal of Proteome Research*, *14*(7), 2963–2975. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00340>
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wyszocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., & Schuler, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *European Journal of Immunology*, *26*(3), 659–668. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260323>
- Hilliard, B. A., Mason, N., Xu, L., Sun, J., Lamhamedi-Cherradi, S. E., Liou, H. C., Hunter, C., & Chen, Y. H. (2002). Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(6), 843–850. <https://doi.org/10.1172/JCI0215254>
- Hirota, K., Duarte, J. H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D. J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., Garefalaki, A., Potocnik, A. J., & Stockinger, B. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature Immunology*, *12*(3), 255–263. <https://doi.org/10.1038/ni.1993>
- Holladay, S. D., & Smialowicz, R. J. (2000). Development of the murine and human immune system: Differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environmental Health Perspectives*, *108*(SUPPL. 3), 463–473. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3463>
- Hollister, E. B., Gao, C., & Versalovic, J. (2014). Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*, *146*(6), 1449–1458. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.052>
- Holst, J., Wang, H., Eder, K. D., Workman, C. J., Boyd, K. L., Baquet, Z., Singh, H., Forbes, K., Chruscinski, A., Smeyne, R., van Oers, N. S. C., Utz, P. J., & Vignali, D. A. A. (2008). Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nature Immunology*, *9*(6), 658–666. <https://doi.org/10.1038/ni.1611>

- Houlard, M., Arudchandran, R., Regnier-Ricard, F., Germani, A., Gisselbrecht, S., Blank, U., Rivera, J., & Varin-Blank, N. (2002). Vav1 is a component of transcriptionally active complexes. *Journal of Experimental Medicine*, *195*(9), 1115–1127. <https://doi.org/10.1084/jem.20011701>
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, *260*(5107), 547–549. <https://doi.org/10.1126/science.8097338>
- Hubert, F. X., Kinkel, S. A., Davey, G. M., Phipson, B., Mueller, S. N., Liston, A., Proietto, A. I., Cannon, P. Z. F., Forehan, S., Smyth, G. K., Wu, L., Goodnow, C. C., Carbone, F. R., Scott, H. S., & Heath, W. R. (2011). Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood*, *118*(9), 2462–2472. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-286393>
- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H. J., Waisman, A., & Kuhlmann, C. R. W. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB Journal*, *24*(4), 1023–1034. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141978>
- Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Öhlén, C., & Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8+ T cells in a model for multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, *194*(5), 669–676. <https://doi.org/10.1084/jem.194.5.669>
- Huynh, J. L., & Casaccia, P. (2013). Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: Implications for pathogenesis and treatment. *The Lancet Neurology*, *12*(2), 195–206. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70309-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70309-5)
- Iezzi, G., Sonderegger, I., Ampenberger, F., Schmitz, N., Marsland, B. J., & Kopf, M. (2009). CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(3), 876–881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810769106>
- Imam, S. A., Guyton, M. K., Haque, A., Vandenbark, A., Tyor, W. R., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2007). Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *Journal of Neuroimmunology*, *190*(1–2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.07.016>
- Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C., & Kamradt, T. (2000). Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells. *The Journal of Immunology*, *165*(11), 6107–6115. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6107>
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D. R. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, *139*(3), 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Todorokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*, *126*(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E. S., Dumortier, H., Douchet, I., Raffray, L., Richez, C., Lazaro, E., Duffau, P., Truchetet, M. E., Khoryati, L., Mercié, P., Couzi, L., ... Blanco, P. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity*, *42*(6), 1159–1170. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.012>
- Jadidi-Niaragh, F., & Mirshafiey, A. (2011). Th17 Cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, *74*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02536.x>
- Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E., & Kuchroo, V. K. (2009). Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. *The Journal of Immunology*, *183*(11), 7169–7177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901906>
- Jagodic, M., Colacios, C., Nohra, R., Dejean, A. S., Beyeen, A. D., Khademi, M., Casemayou, A., Lamouroux, L., Duthoit, C., Papapietro, O., Sjöholm, L., Bernard, I., Lagrange, D., Dahlman, I., Lundmark, F., Oturai, A. B., Soendergaard, H. B., Kemppinen, A., Saarela, J., ... Olsson, T. (2009). A role for VAV1 in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Science Translational Medicine*, *1*(10). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000278>
- Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., Patel, B., Mazzola, M. A., Liu, S., Glanz, B. L., Cook, S., Tankou, S., Stuart, F., Melo, K., Nejad, P., Smith, K., Topçulu, B. D., Holden, J., Kivisäkk, P., ... Weiner, H. L. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature Communications*, *7*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms12015>
- Jašarević, E., Howard, C. D., Misić, A. M., Beiting, D. P., & Bale, T. L. (2017). Stress during pregnancy alters temporal and spatial dynamics of the maternal and offspring microbiome in a sex-specific manner. *Scientific Reports*, *7*(February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep44182>
- Jašarević, E., Howard, C. D., Morrison, K., Misić, A., Weinkopff, T., Scott, P., Hunter, C., Beiting, D., & Bale, T. L. (2018). The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring

- gut and hypothalamus. *Nature Neuroscience*, 21(8), 1061–1071. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0182-5>
- Jiang, H., Zhang, S. Le, & Pernis, B. (1992). Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science*, 256(5060), 1213–1215. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1213>
- Jirmanova, L., Torchia, M. L. G., Sarma, N. D., Mittelstadt, P. R., & Ashwell, J. D. (2011). Lack of the T cell-specific alternative p38 activation pathway reduces autoimmunity and inflammation. *Blood*, 118(12), 3280–3289. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-333039>
- Johnson, A. L., Aravind, L., Shulzhenko, N., Morgun, A., Choi, S. Y., Crockford, T. L., Lambe, T., Domasch, H., Kucharska, E. M., Zheng, L., Vinuesa, C. G., Lenardo, M. J., Goodnow, C. C., Cornall, R. J., & Schwartz, R. H. (2009). Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nature Immunology*, 10(8), 831–839. <https://doi.org/10.1038/ni.1769>
- Jorritsma, P. J., Brogdon, J. L., & Bottomly, K. (2003). Role of TCR-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in the Regulation of Early IL-4 Expression in Naive CD4 + T Cells. *The Journal of Immunology*, 170(5), 2427–2434. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2427>
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*, 30, 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., Lee, J. C., Philip Schumm, L., Sharma, Y., Anderson, C. A., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, S. L., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., ... Whittaker, P. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491(7422), 119–124. <https://doi.org/10.1038/nature11582>
- Kakugawa, K., Yasuda, T., Miura, I., Kobayashi, A., Fukiage, H., Satoh, R., Matsuda, M., Koseki, H., Wakana, S., Kawamoto, H., & Yoshida, H. (2009). A Novel Gene Essential for the Development of Single Positive Thymocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 29(18), 5128–5135. <https://doi.org/10.1128/mcb.00793-09>
- Kassem, S., Gaud, G., Bernard, I., Benamar, M., Dejean, A. S., Liblau, R., Fournié, G. J., Colacios, C., Malissen, B., & Saoudi, A. (2016). A Natural Variant of the T Cell Receptor-Signaling Molecule Vav1 Reduces Both Effector T Cell Functions and Susceptibility to Neuroinflammation. *PLoS Genetics*, 12(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006185>
- Katzav, S., Martin-zanca, D., & Barbacid, M. (1989). *novel human*. 8(8), 2283–2290.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., & Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine*, 13(10), 1173–1175. <https://doi.org/10.1038/nm1651>
- Keir, M. E., Latchman, Y. E., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2005). Programmed Death-1 (PD-1):PD-Ligand 1 Interactions Inhibit TCR-Mediated Positive Selection of Thymocytes. *The Journal of Immunology*, 175(11), 7372–7379. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7372>
- Khashan, A. S., Abel, K. M., McNamee, R., Pedersen, M. G., Webb, R. T., Baker, P. N., Kenny, L. C., & Mortensen, P. B. (2008). Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Archives of General Psychiatry*, 65(2), 146–152. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.20>
- Kim, K. W., Myers, R. A., Lee, J. H., Igartua, C., Lee, K. E., Kim, Y. H., Kim, E. J., Yoon, D., Lee, J. S., Hirota, T., Tamari, M., Takahashi, A., Kubo, M., Choi, J. M., Kim, K. E., Nicolae, D. L., Ober, C., & Sohn, M. H. (2015). Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3), 678–684.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.030>
- Kim et al., Maternal gut bacteria drive intestinal inflammation in offspring with neurodevelopmental disorders by altering the chromatin landscape of CD4+ T cells. (2021). *Immunity*.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 377–391. <https://doi.org/10.1038/nri3667>
- Ko, H., Kim, C. J., & Im, S.-H. (2022). T Helper 2-Associated Immunity in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 13(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.866549>
- Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature Immunology*, 10(6), 595–602. <https://doi.org/10.1038/ni.1731>
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., & Iwakura, Y. (2006). IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 177(1), 566–573. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.566>
- Kon-Kozlowski, M., Pani, G., Pawson, T., & Siminovich, K. A. (1996). The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3856–3862. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3856>

- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology*, 27, 485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>
- Kosugi, A., Sakakura, J., Yasuda, K., Ogata, M., & Hamaoka, T. (2001). Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-Mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity*, 14(6), 669–680. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00146-7)
- Krawczyk, C., Oliveira-Dos-Santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P. S., Snapper, S., Alt, F., & Penninger, J. M. (2002). Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity*, 16(3), 331–343. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00291-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00291-1)
- Kuchroo, V. K., Prabhu Das, M., Brown, J. A., Ranger, A. M., Zamvil, S. S., Sobel, R. A., Weiner, H. L., Nabavi, N., & Glimcher, L. H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: Application to autoimmune disease therapy. *Cell*, 80(5), 707–718. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90349-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90349-6)
- Kumagai, C., Kalman, B., Middleton, F. A., Vyshkina, T., & Massa, P. T. (2012). Increased promoter methylation of the immune regulatory gene SHP-1 in leukocytes of multiple sclerosis subjects. *Journal of Neuroimmunology*, 246(1–2), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.03.003>
- Kurd, N., & Robey, E. A. (2016). T-cell selection in the thymus: A spatial and temporal perspective. *Immunological Reviews*, 271(1), 114–126. <https://doi.org/10.1111/imr.12398>
- Ladi, E., Schwickert, T. A., Chtanova, T., Chen, Y., Herzmark, P., Yin, X., Aaron, H., Chan, S. W., Lipp, M., Roysam, B., & Robey, E. A. (2008). *Ligands in the Thymic Cortex I*.
- Lalive, P. H., Menge, T., Delarasse, C., Della Gaspera, B., Pham-Dinh, D., Villoslada, P., Von Büdingen, H. C., & Genain, C. P. (2006). Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2280–2285. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510672103>
- Lanz, T. V., Brewer, R. C., Ho, P. P., Moon, J. S., Jude, K. M., Fernandez, D., Fernandes, R. A., Gomez, A. M., Nadj, G. S., Bartley, C. M., Schubert, R. D., Hawes, I. A., Vazquez, S. E., Iyer, M., Zuchero, J. B., Teegen, B., Dunn, J. E., Lock, C. B., Kipp, L. B., ... Robinson, W. H. (2022). Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*, 603(7900), 321–327. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04432-7>
- Lappas, C. M., Rieger, J. M., & Linden, J. (2005). A 2A Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN- γ Production in Murine CD4 + T Cells. *The Journal of Immunology*, 174(2), 1073–1080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.1073>
- Lathrop, S. K., Santacruz, N. A., Pham, D., Luo, J., & Hsieh, C. S. (2008). Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. *Journal of Experimental Medicine*, 205(13), 3105–3117. <https://doi.org/10.1084/jem.20081359>
- Lavasani, S., Dzhabazov, B., Nouri, M., Fåk, F., Buske, S., Molin, G., Thorlacius, H., Alenfall, J., Jeppsson, B., & Weström, B. (2010). A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009009>
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., & Mazmanian, S. K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4615–4622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000082107>
- Lees, J. R., Golumbek, P. T., Sim, J., Dorsey, D., & Russell, J. H. (2008). Regional CNS responses to IFN- γ determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 205(11), 2633–2642. <https://doi.org/10.1084/jem.20080155>
- Lesourne, R., Uehara, S., Lee, J., Song, K. D., Li, L. Q., Pinkhasov, J., Zhang, Y., Weng, N. P., Wildt, K. F., Wang, L., Bosselut, R., & Love, P. E. (2009). Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nature Immunology*, 10(8), 840–847. <https://doi.org/10.1038/ni.1768>
- Lesourne, R., Zvezdova, E., Song, K.-D., El-Khoury, D., Uehara, S., Barr, V. A., Samelson, L. E., & Love, P. E. (2012). Interchangeability of Themis1 and Themis2 in Thymocyte Development Reveals Two Related Proteins with Conserved Molecular Function. *The Journal of Immunology*, 189(3), 1154–1161. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200123>
- Levi, I., Gurevich, M., Perlman, G., Magalashvili, D., Menascu, S., Bar, N., Godneva, A., Zahavi, L., Chermon, D., Kosower, N., Wolf, B. C., Malka, G., Lotan-Pompan, M., Weinberger, A., Yirmiya, E., Rothschild, D., Leviatan, S., Tsur, A., Didkin, M., ... Segal, E. (2021). Potential role of indolelactate and butyrate in multiple sclerosis revealed by integrated microbiome-metabolome analysis. *Cell Reports Medicine*, 2(4). <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100246>
- Li, L., Leid, M., & Rothenberg, E. V. (2010). An Early T Cell Lineage Commitment Checkpoint Dependent on the Transcription Factor Bcl11b. *Science*, 329(July), 89–93.
- Li, M. O., & Rudensky, A. Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation

- and function. *Nature Reviews Immunology*, 16(4), 220–233. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.26>
- Li, X. L., Zhang, B., Sun, M. J., Bao, C. C., Yuan, B. Y., Xie, Q. F., Wang, L. J., & Wang, M. X. (2019). Mechanism of gut microbiota and Axl/SOCS3 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Bioscience Reports*, 39(7), 1–10. <https://doi.org/10.1042/BSR20190228>
- Liblau, R. S., Singer, S. M., & McDevitt, H. O. (1995). Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology Today*, 16(1), 34–38. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80068-9](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80068-9)
- Lio, C. W. J., & Hsieh, C. S. (2008). A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity*, 28(1), 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.021>
- Liu, J. Z., Van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S. C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J. C., Jostins, L., Shah, T., Abadian, S., Cheon, J. H., Cho, J., Daryani, N. E., Franke, L., Fuyuno, Y., Hart, A., Juyal, R. C., Juyal, G., ... Weersma, R. K. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature Genetics*, 47(9), 979–986. <https://doi.org/10.1038/ng.3359>
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M. A., Arlehamn, C. L., Su, L. F., Cubas, R., Davis, M. M., Sette, A., Haddad, E. K., Poignard, P., & Crotty, S. (2013). Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*, 39(4), 758–769. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.031>
- Löhning, M., Hegazy, A. N., Pinschewer, D. D., Busse, D., Lang, K. S., Höfer, T., Radbruch, A., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. (2008). Long-lived virus-reactive memory T cells generated from purified cytokine-secreting T helper type 1 and type 2 effectors. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 53–61. <https://doi.org/10.1084/jem.20071855>
- Lopes, N., Sergé, A., Ferrier, P., & Irla, M. (2015). Thymic crosstalk coordinates medulla organization and T-cell tolerance induction. *Frontiers in Immunology*, 6(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00365>
- Lorenz, U. (2009). SHP-1 and SHP-2 in T cells: Two phosphatases functioning at many levels. *Immunological Reviews*, 228(1), 342–359. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00760.x>
- Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A. R., Cinque, C., & Van Reeth, O. (2003). Prenatal stress and long-term consequences: Implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00014-9)
- MacDonald, H. R., Budd, R. C., & Howe, R. C. (1988). A cd3- subset of cd4-8+ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of cd4+8+ cells. *European Journal of Immunology*, 18(4), 519–524. <https://doi.org/10.1002/eji.1830180405>
- Maillard, I., Tu, L., Sambandam, A., Yashiro-Ohtani, Y., Millholland, J., Keeshan, K., Shestova, O., Xu, L., Bhandoola, A., & Pear, W. S. (2006). The requirement for Notch signaling at the β -selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2239–2245. <https://doi.org/10.1084/jem.20061020>
- Malchow, S., Leventhal, D. S., Lee, V., Nishi, S., Socci, N. D., & Savage, P. A. (2016). Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity*, 44(5), 1102–1113. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.009>
- Malhotra, D., Linehan, J. L., Dileepan, T., Lee, Y. J., Purtha, W. E., Lu, J. V., Nelson, R. W., Fife, B. T., Orr, H. T., Anderson, M. S., Hogquist, K. A., & Jenkins, M. K. (2016). Tolerance is established in polyclonal CD4+ T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nature Immunology*, 17(2), 187–195. <https://doi.org/10.1038/ni.3327>
- Malviya, M., Saoudi, A., Bauer, J., Fillatreau, S., & Liblau, R. (2020). Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with engineered bi-specific Foxp3+ regulatory CD4+ T cells. *Journal of Autoimmunity*, 108(January). <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102401>
- Mangalam, A., Shahi, S. K., Luckey, D., Karau, M., Marietta, E., Luo, N., Choung, R. S., Ju, J., Sompallae, R., Gibson-Corley, K., Patel, R., Rodriguez, M., David, C., Taneja, V., & Murray, J. (2017). Human Gut-Derived Commensal Bacteria Suppress CNS Inflammatory and Demyelinating Disease. *Cell Reports*, 20(6), 1269–1277. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.031>
- Marinari, B., Costanzo, A., Viola, A., Michel, F., Mangino, G., Acuto, O., Levrero, M., Piccolella, E., & Tuosto, L. (2002). Vav cooperates with CD28 to induce NF- κ B activation via a pathway involving Rac-1 and mitogen-activated kinase kinase 1. *European Journal of Immunology*, 32(2), 447–456. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200202\)32:2<447::AID-IMMU447>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200202)32:2<447::AID-IMMU447>3.0.CO;2-5)
- Mars, L. T., Saikali, P., Liblau, R. S., & Arbour, N. (2011). Contribution of CD8 T lymphocytes to the immunopathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(2), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.006>
- Marsland, B. J., & Kopf, M. (2008). T-cell fate and function: PKC- θ and beyond. *Trends in Immunology*, 29(4), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.01.005>
- Matalon, O., Fried, S., Ben-Shmuel, A., Pauker, M. H., Joseph, N., Keizer, D., Piterburg, M., & Barda-Saad, M.

- (2016). Dephosphorylation of the adaptor LAT and phospholipase C-g by SHP-1 inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Science Signaling*, 9(429), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad6182>
- Matthews et al., Minireview: Transgenerational Inheritance of the stress response: a new frontier in stress research. (2010). *Endocrinology*.
- McFarland, H. F., & Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: A complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology*, 8(9), 913–919. <https://doi.org/10.1038/ni1507>
- McQualter, J. L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T. W., Hamilton, J. A., Reid, H. H., & Bernard, C. C. A. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: A new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 194(7), 873–881. <https://doi.org/10.1084/jem.194.7.873>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). *Innate Immunity: Minireview The Virtues of a Nonclonal System of Recognition*. 91, 295–298.
- Mehta, M., Brzostek, J., Chen, E. W., Tung, D. W. H., Chen, S., Sankaran, S., Yap, J., Rybakina, V., & Gascoigne, N. R. J. (2018). Themis-associated phosphatase activity controls signaling in T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(48), E11331–E11340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720209115>
- Mélique, S., Yang, C., & Lesourne, R. (2022). Negative times negative equals positive, THEMIS sets the rule on thymic selection and peripheral T cell responses. *Biomedical Journal, March*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2022.03.008>
- Merlot, E., Couret, D., & Otten, W. (2008). Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.05.007>
- Mesecke, S., Urlaub, D., Busch, H., Eils, R., & Watzl, C. (2011). Integration of activating and inhibitory receptor signaling by regulated phosphorylation of Vav1 in immune cells. *Science Signaling*, 4(175). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001325>
- Michel, F., Mangino, G., Attal-Bonnefoy, G., Tuosto, L., Alcover, A., Roumier, A., Olive, D., & Acuto, O. (2000). CD28 Utilizes Vav-1 to Enhance TCR-Proximal Signaling and NF-AT Activation. *The Journal of Immunology*, 165(7), 3820–3829. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3820>
- Miller, A., Lider, O., Roberts, A. B., Sporn, M. B., & Weiner, H. L. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1), 421–425. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.421>
- Miller, A. T., Wilcox, H. M., Lai, Z., & Berg, L. J. (2004). Signaling through Itk promotes T helper 2 differentiation via negative regulation of T-bet. *Immunity*, 21(1), 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.009>
- Milligan, N. M., Newcombe, R., & Compston, D. A. S. (1987). *A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis*. 511–516.
- Molinero, L. L., Miller, M. L., Evaristo, C., & Alegre, M.-L. (2011). High TCR Stimuli Prevent Induced Regulatory T Cell Differentiation in a NF- κ B-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, 186(8), 4609–4617. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002361>
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, 145–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
- Muik, M., Schindl, R., Fahrner, M., & Romanin, C. (2012). Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) current, structure, and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(24), 4163–4176. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1072-8>
- Muranski, P., Boni, A., Antony, P. A., Cassard, L., Irvine, K. R., Kaiser, A., Paulos, C. M., Palmer, D. C., Touloukian, C. E., Ptak, K., Gattinoni, L., Wrzesinski, C., Hinrichs, C. S., Kerstann, K. W., Feigenbaum, L., Chan, C. C., & Restifo, N. P. (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*, 112(2), 362–373. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-120998>
- Nath, N., Prasad, R., Giri, S., Singh, A. K., & Singh, I. (2006). T-bet is essential for the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*, 118(3), 384–391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02385.x>
- Neumann, C., Heinrich, F., Neumann, K., Junghans, V., Mashreghi, M. F., Ahlers, J., Janke, M., Rudolph, C., Mockel-Tenbrinck, N., Kühl, A. A., Heimesaat, M. M., Esser, C., Im, S. H., Radbruch, A., Rutz, S., & Scheffold, A. (2014). Role of blimp-1 in programming th effector cells into IL-10 producers. *Journal of Experimental Medicine*, 211(9), 1807–1819. <https://doi.org/10.1084/jem.20131548>
- Nguyen, T. V., Ke, Y., Zhang, E. E., & Feng, G.-S. (2006). Conditional Deletion of Shp2 Tyrosine Phosphatase in Thymocytes Suppresses Both Pre-TCR and TCR Signals. *The Journal of Immunology*, 177(9), 5990–5996. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.5990>
- Ni, C., Wang, C., Zhang, J., Qu, L., Liu, X., Lu, Y., Yang, W., Deng, J., Lorenz, D., Gao, P., Meng, Q., Yan, X., Blasig, I. E., & Qin, Z. (2014). Interferon- γ safeguards blood-brain barrier during experimental autoimmune encephalomyelitis. *American Journal of Pathology*, 184(12), 3308–3320.

- <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.08.019>
- Nielsen, N. M., Hansen, A. V., Simonsen, J., & Hviid, A. (2011). Prenatal stress and risk of infectious diseases in offspring. *American Journal of Epidemiology*, *173*(9), 990–997. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq492>
- Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., Höfer, T., Viola, A., & Acuto, O. (2010). Constitutively active Ick kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*, *32*(6), 766–777. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.011>
- Nishida, M., Nagata, K., Hachimori, Y., Horiuchi, M., Ogura, K., Mandiyan, V., Schlessinger, J., & Inagaki, F. (2001). Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *EMBO Journal*, *20*(12), 2995–3007. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.2995>
- Nouri, M., Bredberg, A., Weström, B., & Lavasani, S. (2014). Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS ONE*, *9*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106335>
- O'Connor, R. A., Cambrook, H., Huettner, K., & Anderton, S. M. (2013). T-bet is essential for Th1-mediated, but not Th17-mediated, CNS autoimmune disease. *European Journal of Immunology*, *43*(11), 2818–2823. <https://doi.org/10.1002/eji.201343689>
- O'Connor, T. G., Heron, J., Golding, J., & Glover, V. (2003). Maternal antenatal anxiety and behavioural/emotional problems in children: A test of a programming hypothesis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, *44*(7), 1025–1036. <https://doi.org/10.1111/1469-7610.00187>
- O'Connor, T. G., Winter, M. A., Hunn, J., Carnahan, J., Pressman, E. K., Glover, V., Robertson-Blackmore, E., Moynihan, J. A., Eun-Hyung Lee, F., & Caserta, M. T. (2013). Prenatal maternal anxiety predicts reduced adaptive immunity in infants. *Brain, Behavior, and Immunity*, *32*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.002>
- O'Gorman, C., Lin, R., Stankovich, J., & Broadley, S. A. (2012). Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*, *40*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000341902>
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Ditrio, L. E., Burroughs, A. R., Foureau, D. M., Haque-Begum, S., & Kasper, L. H. (2009). Role of Gut Commensal Microflora in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, *183*(10), 6041–6050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900747>
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Wang, Y., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D. L., & Kasper, L. H. (2010). A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunology*, *3*(5), 487–495. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.29>
- Oh, H., & Ghosh, S. (2013). NF-κB: Roles and regulation in different CD4+ T-cell subsets. *Immunological Reviews*, *252*(1), 41–51. <https://doi.org/10.1111/imr.12033>
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., Huehn, J., Fehling, H. J., Sparwasser, T., Nakai, K., & Sakaguchi, S. (2012). T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity*, *37*(5), 785–799. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.010>
- Okada, T., Nitta, T., Kaji, K., Takashima, A., Oda, H., Tamemhiro, N., Goto, M., Okamura, T., Patrick, M. S., & Suzuki, H. (2014). Differential function of Themis CABIT domains during T cell development. *PLoS ONE*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089115>
- Olafsdottir, T. A., Theodors, F., Bjarnadottir, K., Bjornsdottir, U. S., Agustsdottir, A. B., Stefansson, O. A., Ivarsdottir, E. V., Sigurdsson, J. K., Benonisdottir, S., Eyjolfsson, G. I., Gislason, D., Gislason, T., Guðmundsdóttir, S., Gylfason, A., Halldorsson, B. V., Halldorsson, G. H., Juliusdottir, T., Kristinsdottir, A. M., Ludviksdottir, D., ... Stefansson, K. (2020). Eighty-eight variants highlight the role of T cell regulation and airway remodeling in asthma pathogenesis. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14144-8>
- Olatunde, A. C., Hale, J. S., & Lamb, T. J. (2021). Cytokine-skewed Tfh cells: functional consequences for B cell help. *Trends in Immunology*, *42*(6), 536–550. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.04.006>
- Olsson, T. (1992). Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma. *Journal of Neuroimmunology*, *40*(2–3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(92\)90135-8](https://doi.org/10.1016/0165-5728(92)90135-8)
- Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L. (2016). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, *13*(1), 26–36. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2016.187>
- Ottum, P. A., Arellano, G., Reyes, L. I., Iruretagoyena, M., & Naves, R. (2015). Opposing roles of interferon-gamma on cells of the central nervous system in autoimmune neuroinflammation. *Frontiers in Immunology*, *6*(OCT), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00539>

- Paladini, M. S., Marangon, D., Rossetti, A. C., Guidi, A., Coppolino, G. T., Negri, C., Spero, V., Abbracchio, M. P., Lecca, D., & Molteni, R. (2020). Prenatal Stress Impairs Spinal Cord Oligodendrocyte Maturation via BDNF Signaling in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Multiple Sclerosis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(4), 1225–1240. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-01014-x>
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., & Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Immunology*, 8(12), 1353–1362. <https://doi.org/10.1038/ni1536>
- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Schindler, J., & Johnson, K. P. (1987). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: Exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology*, 37(7), 1097–1102. <https://doi.org/10.1212/wnl.37.7.1097>
- Park, J. H., Adoro, S., Guinter, T., Erman, B., Alag, A. S., Catalfamo, M., Kimura, M. Y., Cui, Y., Lucas, P. J., Gress, R. E., Kubo, M., Hennighausen, L., Feigenbaum, L., & Singer, A. (2010). Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nature Immunology*, 11(3), 257–264. <https://doi.org/10.1038/ni.1840>
- Paster, W., Brockmeyer, C., Fu, G., Simister, P. C., de Wet, B., Martinez-Riaño, A., Hoerter, J. A. H., Feller, S. M., Wülfing, C., Gascoigne, N. R. J., & Acuto, O. (2013). GRB2-Mediated Recruitment of THEMIS to LAT Is Essential for Thymocyte Development. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3749–3756. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203389>
- Paster, W., Bruger, A. M., Katsch, K., Grégoire, C., Roncagalli, R., Fu, G., Gascoigne, N. R., Nika, K., Cohnen, A., Feller, S. M., Simister, P. C., Molder, K. C., Cordoba, S., Dushek, O., Malissen, B., & Acuto, O. (2015). A THEMIS: SHP 1 complex promotes T-cell survival. *The EMBO Journal*, 34(3), 393–409. <https://doi.org/10.15252/embj.201387725>
- Patrick, M. S., Oda, H., Hayakawa, K., Sato, Y., Eshima, K., Kirikae, T., Iemura, S. I., Shirai, M., Abe, T., Natsume, T., Sasazuki, T., & Suzuki, H. (2009). Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16345–16350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908593106>
- Patsopoulos, N. A., Baranzini, S. E., Santaniello, A., Shoostari, P., Cotsapas, C., Wong, G., Beecham, A. H., James, T., Replogle, J., Vlachos, I. S., McCabe, C., Pers, T. H., Brandes, A., White, C., Keenan, B., Cimpean, M., Winn, P., Panteliadis, I. P., Robbins, A., ... De Jager, P. L. (2019). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*, 365(6460). <https://doi.org/10.1126/science.aav7188>
- Paz, P. E., Wang, S., Clarke, H., Lu, X., Stokoe, D., & Abo, A. (2001). Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochemical Journal*, 356(2), 461–471. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560461>
- Pedre, X., Mastronardi, F., Bruck, W., López-Rodas, G., Kuhlmann, T., & Casaccia, P. (2011). Changed histone acetylation patterns in normal-appearing white matter and early multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroscience*, 31(9), 3435–3445. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4507-10.2011>
- Pedros, C., Gaud, G., Bernard, I., Kassem, S., Chabod, M., Lagrange, D., Andréoletti, O., Dejean, A. S., Lesourne, R., Fournié, G. J., & Saoudi, A. (2015). An Epistatic Interaction between Themis1 and Vav1 Modulates Regulatory T Cell Function and Inflammatory Bowel Disease Development. *The Journal of Immunology*, 195(4), 1608–1616. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402562>
- Pedros, C., Papapietro, O., Colacios, C., Casemayou, A., Bernard, I., Garcia, V., Lagrange, D., Mariamé, B., Andreoletti, O., Fournié, G. J., & Saoudi, A. (2013). Genetic control of HgCl 2 -induced IgE and autoimmunity by a 117-kb interval on rat chromosome 9 through CD4 CD45RC high T cells. *Genes and Immunity*, 14(4), 258–267. <https://doi.org/10.1038/gene.2013.21>
- Pérez-Nievas, B. G., García-Bueno, B., Madrigal, J. L. M., & Leza, J. C. (2010). Chronic immobilisation stress ameliorates clinical score and neuroinflammation in a MOG-induced EAE in Dark Agouti rats: Mechanisms implicated. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-60>
- Peters, A., Pitcher, L. A., Sullivan, J. M., Mitsdoerffer, M., Acton, S. E., Franz, B., Wucherpfennig, K., Turley, S., Carroll, M. C., Sobel, R. A., Bettelli, E., & Kuchroo, V. K. (2011). Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation. *Immunity*, 35(6), 986–996. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.015>
- Petrie, H. T., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual Review of Immunology*, 25, 649–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115715>
- Philipsen, L., Reddycherla, A. V., Hartig, R., Gumz, J., Kästle, M., Kritikos, A., Poltorak, M. P., Prokazov, Y., Turbin, E., Weber, A., Zuschratter, W., Schraven, B., Simeoni, L., & Müller, A. J. (2017). De novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling. *Science Signaling*, 10(462). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf4736>
- Piccolella, E., Spadaro, F., Ramoni, C., Marinari, B., Costanzo, A., Levrero, M., Thomson, L., Abraham, R. T., &

- Tuosto, L. (2003). Vav-1 and the IKK α Subunit of I κ B Kinase Functionally Associate to Induce NF- κ B Activation in Response to CD28 Engagement. *The Journal of Immunology*, 170(6), 2895–2903. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.2895>
- Pierson, E., Simmons, S. B., & Goverman, J. M. (2012). <Pierson_2012_Immunol. Rev. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS.pdf>. 2, 10–20.
- Pikor, N. B., Astarita, J. L., Summers-Deluca, L., Galicia, G., Qu, J., Ward, L. A., Armstrong, S., Dominguez, C. X., Malhotra, D., Heiden, B., Kay, R., Castanov, V., Touil, H., Boon, L., O'Connor, P., Bar-Or, A., Prat, A., Ramaglia, V., Ludwin, S., ... Gommerman, J. L. (2015). Integration of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation. *Immunity*, 43(6), 1160–1173. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.010>
- Pincus-knackstedt, M. K., Joachim, R. A., Blois, S. M., Douglas, A. J., Orsal, A. S., Klapp, B. F., Wahn, U., Hamelmann, E., & Arck, P. C. (2006). *Offspring toward Airway Inflammation 1*.
- Pollizzi, K. N., & Powell, J. D. (2015). Regulation of T cells by mTOR: The known knows and the known unknowns. *Trends in Immunology*, 36(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.11.005>
- Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K., Pedras-Vasconcelos, J., Verthelyi, D., & Dittel, B. N. (2007). GM-CSF Production by Autoreactive T Cells Is Required for the Activation of Microglial Cells and the Onset of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 178(1), 39–48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.39>
- Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B., & Horton, M. R. (2012). Regulation of immune responses by mTOR. *Annual Review of Immunology*, 30, 39–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075024>
- Purvis, H. A., Stoop, J. N., Mann, J., Woods, S., Kozijn, A. E., Hambleton, S., Robinson, J. H., Isaacs, J. D., Anderson, A. E., & Hilkens, C. M. U. (2010). Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood*, 116(23), 4829–4837. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-272153>
- Qiu, R., Zhou, L., Ma, Y., Zhou, L., Liang, T., Shi, L., Long, J., & Yuan, D. (2020). Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 58(1), 52–70. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8721-0>
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Futter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S. K., & Sansom, D. M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 332(6029), 600–603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>
- Rakers et al., Transfer of maternal psychosocial stress to the fetus. (2020). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.
- Ratajczak, P., Janin, A., De Latour, R. P., Leboeuf, C., Desveaux, A., Keyvanfar, K., Robin, M., Clave, E., Douay, C., Quinquenel, A., Pichereau, C., Bertheau, P., Mary, J. Y., & Socié, G. (2010). Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood*, 116(7), 1165–1171. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-255810>
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., & Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature Immunology*, 10(5), 514–523. <https://doi.org/10.1038/ni.1716>
- Regen, T., Isaac, S., Amorim, A., Núñez, N. G., Hauptmann, J., Shanmugavadivu, A., Klein, M., Sankowski, R., Mufazalov, I. A., Yogev, N., Huppert, J., Wanke, F., Witting, M., Grill, A., Gálvez, E. J. C., Nikolaev, A., Blaufeld, M., Prinz, I., Schmitt-Kopplin, P., ... Waisman, A. (2021). IL-17 controls central nervous system autoimmunity through the intestinal microbiome. *Science Immunology*, 6(56), 1–12. <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAZ6563>
- Reynolds, L. F., De Bettignies, C., Norton, T., Beeser, A., Chernoff, J., & Tybulewicz, V. L. J. (2004). Vav1 Transduces T Cell Receptor Signals to the Activation of the Ras/ERK Pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18239–18246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400257200>
- Reynolds, L. F., Smyth, L. A., Norton, T., Freshney, N., Downward, J., Kioussis, D., & Tybulewicz, V. L. J. (2002). Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C- γ 1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *Journal of Experimental Medicine*, 195(9), 1103–1114. <https://doi.org/10.1084/jem.20011663>
- Rice et al., The links between prenatal stress and offspring development and psychopathology: disentangling environmental and inherited influences. (2010). *Psychological Medicine*.
- Rincel, M., Aubert, P., Chevalier, J., Grohard, P. A., Basso, L., Monchaux de Oliveira, C., Helbling, J. C., Lévy, É., Chevalier, G., Leboyer, M., Eberl, G., Layé, S., Capuron, L., Vergnolle, N., Neunlist, M., Boudin, H., Lepage, P., & Darnaudéry, M. (2019). Multi-hit early life adversity affects gut microbiota, brain and behavior in a sex-dependent manner. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80(September 2018), 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.03.006>
- Rivers, T., Sprunt, D. H., & Berry, G. P. (1933). *OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS*.

- Romagnoli, P., Hudrisier, D., & van Meerwijk, J. P. M. (2002). Preferential Recognition of Self Antigens Despite Normal Thymic Deletion of CD4 + CD25 + Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *168*(4), 1644–1648. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1644>
- Ronin, E., Di Ricco, M. L., Vallion, R., Divoux, J., Kwon, H. K., Grégoire, S., Collares, D., Rouers, A., Baud, V., Benoist, C., & Salomon, B. L. (2019). The nf- κ b rela transcription factor is critical for regulatory t cell activation and stability. *Frontiers in Immunology*, *10*(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02487>
- Rossy, J., Owen, D. M., Williamson, D. J., Yang, Z., & Gaus, K. (2013). Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nature Immunology*, *14*(1), 82–89. <https://doi.org/10.1038/ni.2488>
- Ruan, Q., Kameswaran, V., Zhang, Y., Zheng, S., Sun, J., Wang, J., DeVirgiliis, J., Liou, H. C., Beg, A. A., & Chen, Y. H. (2011). The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR γ -ROR γ T transcriptional axis. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(11), 2321–2333. <https://doi.org/10.1084/jem.20110462>
- Rudd, C. E. (2021). How the Discovery of the CD4/CD8-p56lck Complexes Changed Immunology and Immunotherapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*(March), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.626095>
- Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological Reviews*, *229*(1), 12–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x>
- Russ, B. E., Prier, J. E., Rao, S., & Turner, S. J. (2013). T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Frontiers in Genetics*, *4*(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00218>
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, *133*(5), 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>
- Salek-Ardakani, S., So, T., Halteman, B. S., Altman, A., & Croft, M. (2005). Protein Kinase C θ Controls Th1 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, *175*(11), 7635–7641. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7635>
- Saligrama, N., Fan, Z., Sikora, M. J., Serratelli, W. S., Fernandes, R. A., Louis, D. M., Yao, W., Ji, X., Idoyaga, J., Mahajan, V. B., Steinmetz, L. M., Chien, Y.-H., Hauser, S. L., Oksenberg, J. R., Garcia, K. C., & Davis, M. M. (2019). *Opposing T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis*.
- Salvador, E., Shityakov, S., & Förster, C. (2014). Glucocorticoids and endothelial cell barrier function. *Cell and Tissue Research*, *355*(3), 597–605. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1762-z>
- Samstein, R. M., Arvey, A., Josefowicz, S. Z., Peng, X., Reynolds, A., Sandstrom, R., Neph, S., Sabo, P., Kim, J. M., Liao, W., Li, M. O., Leslie, C., Stamatoyannopoulos, J. A., & Rudensky, A. Y. (2012). Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell*, *151*(1), 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.053>
- Sansom, S. N., Shikama-Dorn, N., Zhanybekova, S., Nusspaumer, G., Macaulay, I. C., Deadman, M. E., Heger, A., Ponting, C. P., & Holländer, G. A. (2014). Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Research*, *24*(12), 1918–1931. <https://doi.org/10.1101/gr.171645.113>
- Saveliev, A., Vanes, L., Ksionda, O., Rapley, J., Smerdon, S. J., Rittinger, K., & Tybulewicz, V. L. J. (2009). Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in t cell development and activation. *Science Signaling*, *2*(101), 1–15. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000420>
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C. A., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S. E., Edkins, S., Gray, E., Booth, D. R., Potter, S. C., Goris, A., Band, G., Oturai, A. B., Strange, A., Saarela, J., ... Compston, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, *476*(7359), 214–219. <https://doi.org/10.1038/nature10251>
- Schulze-Luehrmann, J., & Ghosh, S. (2006). Antigen-Receptor Signaling to Nuclear Factor κ B. *Immunity*, *25*(5), 701–715. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.010>
- Scott-Browne, J. P., Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Ishida-Tsubota, K., Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y., Bevan, M. J., & Urdahl, K. B. (2007). Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(9), 2159–2169. <https://doi.org/10.1084/jem.20062105>
- Secher, T., Kassem, S., Benamar, M., Bernard, I., Boury, M., Barreau, F., Oswald, E., & Saoudi, A. (2017). Oral administration of the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces susceptibility to neuroinflammation and repairs experimental autoimmune encephalomyelitis-induced intestinal barrier dysfunction. *Frontiers in Immunology*, *8*(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01096>
- Segal, B. B. M., Dwyer, B. K., & Shevach, E. M. (1998). *Controls Susceptibility to Autoimmune Disease*. *187*(4).
- Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*, *4*(5), E131–E136. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e131>
- Simmons, S. B., Liggitt, D., & Gorman, J. M. (2014). Cytokine-Regulated Neutrophil Recruitment Is Required for Brain but Not Spinal Cord Inflammation during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The*

- Journal of Immunology*, 193(2), 555–563. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400807>
- Simmons, S. B., Pierson, E. R., Lee, S. Y., & Goverman, J. M. (2013). Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends in Immunology*, 34(8), 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.006>
- Skurkovich, S., Boiko, A., Beliaeva, I., Buglak, A., Alekseeva, T., Smirnova, N., Kulakova, O., Tchechonin, V., Gurova, O., Deomina, T., Favorova, O. O., Skurkovich, B., & Gusev, E. (2001). Randomized study of antibodies to IFN- γ and TNF- α in secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 7(5), 277–284. <https://doi.org/10.1191/135245801681137960>
- Smith, P. A., Heijmans, N., Ouwering, B., Breij, E. C., Evans, N., van Noort, J. M., Plomp, A. C., Delarasse, C., Hart, B., Pham-Dinh, D., & Amor, S. (2005). Native myelin oligodendrocyte glycoprotein promotes severe chronic neurological disease and demyelination in Biozzi ABH mice. *European Journal of Immunology*, 35(4), 1311–1319. <https://doi.org/10.1002/eji.200425842>
- Sonar, S. A., & Lal, G. (2018). Blood–brain barrier and its function during inflammation and autoimmunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 103(5), 839–853. <https://doi.org/10.1002/JLB.1RU1117-428R>
- Sonar, S. A., Shaikh, S., Joshi, N., Atre, A. N., & Lal, G. (2017). IFN- γ 3 promotes transendothelial migration of CD4 + T cells across the blood-brain barrier. In *Immunology and Cell Biology* (Vol. 95, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/icb.2017.56>
- Song, J., Wu, C., Korpos, E., Zhang, X., Agrawal, S. M., Wang, Y., Faber, C., Schäfers, M., Körner, H., Opdenakker, G., Hallmann, R., & Sorokin, L. (2015). Focal MMP-2 and MMP-9 Activity at the Blood-Brain Barrier Promotes Chemokine-Induced Leukocyte Migration. *Cell Reports*, 10(7), 1040–1054. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.037>
- Sospedra, M., & Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual Review of Immunology*, 23, 683–747. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707>
- Spath, S., Komuczki, J., Hermann, M., Pelczar, P., Mair, F., Schreiner, B., & Becher, B. (2017). Dysregulation of the Cytokine GM-CSF Induces Spontaneous Phagocyte Invasion and Immunopathology in the Central Nervous System. *Immunity*, 46(2), 245–260. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.007>
- Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N., & Long, E. O. (2003). Vav1 Dephosphorylation by the Tyrosine Phosphatase SHP-1 as a Mechanism for Inhibition of Cellular Cytotoxicity. *Molecular and Cellular Biology*, 23(17), 6291–6299. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.17.6291-6299.2003>
- Sterlin, D., Larsen, M., Fadlallah, J., Parizot, C., Vignes, M., Autaa, G., Dorgham, K., Juste, C., Lepage, P., Aboab, J., Vicart, S., Maillart, E., Gout, O., Lubetzki, C., Deschamps, R., Papeix, C., & Gorochov, G. (2021). Perturbed microbiota/immune homeostasis in multiple sclerosis. *Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation*, 8(4). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000997>
- Stienne, C., Michieletto, M. F., Benamar, M., Carrié, N., Bernard, I., Nguyen, X. H., Lippi, Y., Duguet, F., Liblau, R. S., Hedrick, S. M., Saoudi, A., & Dejean, A. S. (2016). Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes. *Immunity*, 45(4), 774–787. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.010>
- Stoolman, J. S., Duncker, P. C., Huber, A. K., & Segal, B. M. (2014). Site-Specific Chemokine Expression Regulates Central Nervous System Inflammation and Determines Clinical Phenotype in Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 193(2), 564–570. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400825>
- Stritesky, G. L., Jameson, S. C., & Hogquist, K. A. (2012). Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annual Review of Immunology*, 30, 95–114. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075035>
- Stromnes, I. M., Cerretti, L. M., Liggitt, D., Harris, R. A., & Goverman, J. M. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T H1 and TH17 cells. *Nature Medicine*, 14(3), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nm1715>
- Sullivan, B. M., Jobe, O., Lazarevic, V., Vasquez, K., Bronson, R., Glimcher, L. H., & Kramnik, I. (2005). Increased Susceptibility of Mice Lacking T-bet to Infection with Mycobacterium tuberculosis Correlates with Increased IL-10 and Decreased IFN- γ Production. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4593–4602. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4593>
- Sun, S. C. (2012). The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev*, 246(1), 125–140.
- Sun, Z., Arendt, C. W., Ellmeier, W., Schaeffer, E. M., Sunshine, M. J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P. L., & Littman, D. R. (2000). PKC- θ is required for TCR-induced NF- κ B activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*, 404(6776), 402–407. <https://doi.org/10.1038/35006090>
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), 655–669. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3)
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., & Glimcher, L. H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual Review of Immunology*, 21, 713–758.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942>
- Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., & Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell*, *163*(4), 975–987. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.013>
- Takeuchi, Y., & Nishikawa, H. (2016). Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *International Immunology*, *28*(8), 401–409. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw025>
- Tanaka, Y., So, T., Lebedeva, S., Croft, M., & Altman, A. (2005). Impaired IL-4 and c-Maf expression and enhanced Th1-cell development in Vav1-deficient mice. *Blood*, *106*(4), 1286–1295. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4074>
- Tarakhovsky, A., Turnert, M., Schaal, S., Meet, P. J., Duddy, L. P., Rajewsky, K., & Tybulewicz, V. L. J. (1995). *of Band T cells in the absence of Yav P95-8 EEL : Ij. 374*(March), 467–470.
- Thieu, V. T., Yu, Q., Chang, H. C., Yeh, N., Nguyen, E. T., Sehra, S., & Kaplan, M. H. (2008). Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Is Required for the Transcription Factor T-bet to Promote T Helper 1 Cell-Fate Determination. *Immunity*, *29*(5), 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.017>
- Toft-Hansen, H., Buist, R., Sun, X.-J., Schellenberg, A., Peeling, J., & Owens, T. (2006). Metalloproteinases Control Brain Inflammation Induced by Pertussis Toxin in Mice Overexpressing the Chemokine CCL2 in the Central Nervous System. *The Journal of Immunology*, *177*(10), 7242–7249. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7242>
- Tran, E., Hoekstra, K., Van Rooijen, N., Dijkstra, C., & Owens, T. (1998). *Immune Invasion of the Central Nervous System Parenchyma and Experimental Allergic Encephalomyelitis, But Not Leukocyte Extravasation from Blood, Are Prevented in Macrophage-Depleted Mice.*
- Tremlett, H., Fadrosch, D. W., Faruqi, A. A., Zhu, F., Hart, J., Roalstad, S., Graves, J., Lynch, S., Waubant, E., Aaen, G., Belman, A., Benson, L., Charles Casper, T., Chitnis, T., Gorman, M., Harris, Y., Krupp, L., Lotze, T. E., Ness, J., ... Weinstock-Guttman, B. (2016). Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: a case-control study. *European Journal of Neurology*, *23*(8), 1308–1321. <https://doi.org/10.1111/ene.13026>
- Tuchscherer, M., Kanitz, E., Otten, W., & Tuchscherer, A. (2002). Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *86*(3–4), 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00035-1)
- Turner, M., Mee, P. J., Walters, A. E., Quinn, M. E., Mellor, A. L., Zamoyska, R., & Tybulewicz, V. L. J. (1997). A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity*, *7*(4), 451–460. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80367-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80367-2)
- Tuzlak, S., Dejean, A. S., Iannacone, M., Quintana, F. J., Waisman, A., Ginhoux, F., Korn, T., & Becher, B. (2021). 2021R* Tuzlak (AD, Ari, BB) - PHILO ABOUT T helper.pdf. *Nature Immunology*.
- Tybulewicz, V. L. J. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Current Opinion in Immunology*, *17*(3), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.04.003>
- Vacchio, M. S., Wang, L., Bouladoux, N., Carpenter, A. C., Xiong, Y., Williams, L. C., Wohlfert, E., Song, K. D., Belkaid, Y., Love, P. E., & Bosselut, R. (2014). A ThPOK-LRF transcriptional node maintains the integrity and effector potential of post-thymic CD4⁺ T cells. *Nature Immunology*, *15*(10), 947–956. <https://doi.org/10.1038/ni.2960>
- Vahedi, G., Takahashi, H., Nakayamada, S., Sun, H. W., Sartorelli, V., Kanno, Y., & OShea, J. J. (2012). STATs shape the active enhancer landscape of T cell populations. *Cell*, *151*(5), 981–993. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.044>
- Valitutti, S., & Espagnolle, N. (2006). Immunological Synapse. *ELS*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0004027>
- Van Bodegom, M., Homberg, J. R., & Henckens, M. J. A. G. (2017). Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(April), 1–33. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087>
- Van Der Merwe, A. P., Bodian, D. L., Daenke, S., Linsley, P., & Davis, S. J. (1997). Affinity and Very Fast Kinetics. *Journal of Experimental Medicine*, *185*(3), 393–403.
- Vanhaesebroeck, B., & Alessi, D. R. (2000). The PI3K-PBK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochemical Journal*, *346*(3), 561–576. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3460561>
- VanPanhuys, N., Klauschen, F., & Germain, R. N. (2014). T-Cell-Receptor-Dependent Signal Intensity Dominantly Controls CD4⁺ T Cell Polarization InVivo. *Immunity*, *41*(1), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.003>
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J. C., & Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, *453*(7191), 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature06881>
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, *24*(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.001>
- Vervliet, G., Claeys, H., van Haver, H., Carton, H., Vermynen, C., Meulepas, E., & Billiau, A. (1983). Interferon

- production and natural killer (NK) activity in leukocyte cultures from multiple sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 60(1), 137–150. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(83\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-510X(83)90133-8)
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>
- Vogelzang, A., McGuire, H. M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C. R., & King, C. (2008). A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity*, 29(1), 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.001>
- Wagner, C. A., Roqué, P. J., & Goverman, J. M. (2020). Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1), 1–10. <https://doi.org/10.1084/jem.20190460>
- Weil, R., & Israël, A. (2006). Deciphering the pathway from the TCR to NF- κ B. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 826–833. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401856>
- Wills-Karp, M. (2004). Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunological Reviews*, 202, 175–190. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00215.x>
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3+Regulatory T Cell Function. *Science*, 322(5899), 271–275.
- Wu, J., Motto, D. G., Koretzky, G. A., & Weiss, A. (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity*, 4(6), 593–602. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80485-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80485-9)
- Wu, X., Guo, W., Wu, L., Gu, Y., Gu, L., Xu, S., Wu, X., Shen, Y., Ke, Y., Tan, R., Sun, Y., & Xu, Q. (2012). Selective Sequestration of STAT1 in the Cytoplasm via Phosphorylated SHP-2 Ameliorates Murine Experimental Colitis. *The Journal of Immunology*, 189(7), 3497–3507. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201006>
- Yamane, H., & Paul, W. E. (2013). Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4+ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological Reviews*, 252(1), 12–23. <https://doi.org/10.1111/imr.12032>
- Yamane, H., Zhu, J., & Paul, W. E. (2005). Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4 + T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *Journal of Experimental Medicine*, 202(6), 793–804. <https://doi.org/10.1084/jem.20051304>
- Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Ogata, K., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Wiest, D. L., Tokunaga, M., & Saito, T. (2006). Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nature Immunology*, 7(1), 67–75. <https://doi.org/10.1038/ni1290>
- Yang, C., Blaize, G., Marrocco, R., Rouquié, N., Bories, C., Gador, M., Melique, S., Joulia, E., Benamar, M., Dejean, A. S., Daniels-Treffandier, H., Love, P. E., Fazilleau, N., Saoudi, A., & Lesourne, R. (2022). THEMIS enhances the magnitude of normal and neuroinflammatory type 1 responses by promoting TCR-independent signals. *Science Signaling*.
- Yang, D. D., Conze, D., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Davis, R. J., Rincón, M., & Flavell, R. A. (1998). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity*, 9(4), 575–585. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80640-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80640-8)
- Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., & Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1201–1217. <https://doi.org/10.1084/jem.20112741>
- York, N. R., Mendoza, J. P., Ortega, S. B., Benagh, A., Tyler, A. F., Firan, M., & Karandikar, N. J. (2010). Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity*, 35(1), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.01.003>
- Yui, M. A., Feng, N., & Rothenberg, E. V. (2010). Fine-Scale Staging of T Cell Lineage Commitment in Adult Mouse Thymus. *The Journal of Immunology*, 185(1), 284–293. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000679>
- Zeng, R., Cannon, J. L., Abraham, R. T., Way, M., Billadeau, D. D., Bubeck-Wardenberg, J., & Burkhardt, J. K. (2003). SLP-76 Coordinates Nck-Dependent Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Recruitment with Vav-1/Cdc42-Dependent Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Activation at the T Cell-APC Contact Site. *The Journal of Immunology*, 171(3), 1360–1368. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1360>
- Zhang, G.-X., Gran, B., Yu, S., Li, J., Siglienti, I., Chen, X., Kamoun, M., & Rostami, A. (2003). Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in IL-12 Receptor- β 2-Deficient Mice: IL-12 Responsiveness Is Not Required in the Pathogenesis of Inflammatory Demyelination in the Central Nervous System. *The Journal of Immunology*, 170(4), 2153–2160. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.2153>
- Zhang, J. P., Yan, J., Xu, J., Pang, X. H., Chen, M. S., Li, L., Wu, C., Li, S. P., & Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Hepatology*, 50(5), 980–989. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.033>
- Zhang, J., Somani, A. K., & Siminovitch, K. A. (2000). Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Seminars in Immunology*, 12(4), 361–378. <https://doi.org/10.1006/smim.2000.0223>

- Zhang, W., Tribble, R. P., Zhu, M., Liu, S. K., McGlade, C. J., & Samelson, L. E. (2000). Association of Grb2, Gads, and phospholipase C- γ 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues: Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23355–23361. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000404200>
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X. P., Forbush, K., & Rudensky, A. Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*, 463(7282), 808–812. <https://doi.org/10.1038/nature08750>
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4⁺ T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28, 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>
- Zhu, Z., Cao, F., & Li, X. (2019). Epigenetic Programming and Fetal Metabolic Programming. *Frontiers in Endocrinology*, 10(December), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00764>
- Zietara, N., Łyszkiewicz, M., Puchałka, J., Witzlau, K., Reinhardt, A., Förster, R., Pabst, O., Prinz, I., & Krueger, A. (2015). Multicongenic fate mapping quantification of dynamics of thymus colonization. *Journal of Experimental Medicine*, 212(10), 1589–1601. <https://doi.org/10.1084/jem.20142143>
- Zijlmans, M. A. C., Korpela, K., Riksen-Walraven, J. M., de Vos, W. M., & de Weerth, C. (2015). Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology*, 53, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.01.006>
- Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., & Lander, E. S. (2012). The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1193–1198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119675109>
- Zvezdova, E., Mikolajczak, J., Garreau, A., Marcellin, M., Rigal, L., Lee, J., Choi, S., Blaize, G., Argenty, J., Familiades, J., Li, L., De Peredo, A. G., Burlet-Schiltz, O., Love, P. E., & Lesourne, R. (2016). Themis1 enhances T cell receptor signaling during thymocyte development by promoting Vav1 activity and Grb2 stability. *Science Signaling*, 9(428), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad1576>

Remerciements

Et bien oui, moi je ne fais pas comme tout le monde, j'écris mes remerciements à la fin. Voilà. C'est plus logique je trouve, et puis, ces remerciements... C'est un peu le symbole de la fin de ces quelques années de master et de thèse (la partie la plus lue par les petits esprits curieux !). Je dois avouer qu'en commençant à écrire ces remerciements, je réalise un peu plus que cette page (cette très grosse page) est sur le point de se tourner...

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'en faire partie, et pour le temps consacré à l'évaluation de mon travail.

Je vous remercie ensuite vous, **Abdel**. Merci pour m'avoir accueilli dans cette équipe, il y a plus de 5 ans, pour mon stage de Master1 (À cette époque, vous aviez un peu de mal à vous rappeler de mon nom...). Merci pour m'avoir permis de revenir en M2, d'avoir cru en moi et de m'avoir aidé dans l'obtention de cette bourse de thèse. Merci de vous être toujours rendu accessible, que ce soit au bureau, par mail, par téléphone ou encore par message. Je me revois étudiant de M2, vous appeler avec les nombres de cellules suite au tri cellulaire, pour décider avec vous des groupes de souris à injecter...

Tout au long de ma thèse, vous avez toujours été très présent et impliqué, ce qui, j'en suis conscient, est une chance que n'ont pas tous les thésards. En contrepartie, vous attendez en retour une grande implication de la part de vos étudiants, ce qui nous pousse à donner le maximum - ainsi, merci de cette exigence de votre part (attention cependant à ne pas trop pousser les petits nouveaux, ils m'ont l'air un peu fragile...).

Merci ensuite de m'avoir donné de plus en plus votre confiance au fil des années, me permettant de grandir et de m'affirmer.

Finalement merci pour cette atmosphère de travail, et votre volonté de faire de cette équipe une seconde famille.

Merci à toi **Isa**, une des rares personnes de l'équipe qui était déjà là quand je suis arrivé. Merci pour toutes ces années partagées dans notre cagibi sans fenêtre (même si tu nous as abandonné juste avant mon départ). Merci d'avoir pris de temps de répondre à la tonne de questions que j'ai pu te poser au cours de ces années, pour les protocoles que tu m'as partagés et appris, mais surtout pour le temps passer à faire tourner notre groupe AS telle une maman du labo (oui, il est temps que tu saches, c'est comme ça que je te nomme pour les personnes extérieures au labo). Gestion totale des achats magasin & extérieurs, des élevages, des génotypages (DES GENOTYPAGES ! Il m'a fallu quelques années avant de réaliser que ne pas avoir à gérer toutes ces choses est une chance que là non-plus, tout le monde n'a pas), des défaillances informatiques ou mécaniques (pipette, hôtes, centri.... « Quoi ? Ça marche pas ? Va voir Isa » ; « Tu sais si on a ça dans l'équipe ? – Demande à Isa »)

Remerciements

Alors bon, on n'a pas des caractères de petits agneaux ni l'un ni l'autre, alors forcément dans un placard à balais, on a pu s'accrocher quelques fois... M'enfin, il faut bien que jeunesse se passe ! Un grand merci à toi pour toute l'aide que tu m'as apporté au cours de ma thèse, qui ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui sans toi.

Merci ensuite à **Anne D** et **Roland**, pour les très nombreuses discussions scientifiques, et les nombreux retours critiques dont vous avez pu me faire part lors de mes présentations en réunions d'équipes.

Elena, autre membre de nombre placard à balais, que nous partageons depuis quelques années maintenant... Merci pour ta bonne humeur et ton sourire quotidien, ton petit accent Italien plus chantant encore que l'accent toulousain (et c'est dire !). Te voir faire des marathon manip ou tu cours toute la journée (à partir de 9h30, faut pas déconner) va me manquer.

Romain... Romain. Que te dire, ou plutôt, que dire de toi ? Un énergumène satellisé d'on ne sait où, à 1m de moi dans le bureau, aux expressions perchées, à l'humour parfois douteux mais jamais autant que ses pas de danse... Tu auras (majoritairement) été une source de bonne humeur dans le bureau, dont tu auras été le 4^{ème} et dernier colocataire (un peu envahissant parfois, il est vrai). Merci pour ce temps qu'on a partagé. Je te souhaite aussi bon courage pour ce projet 4-1BB→Vav1-Themis1→Eomes→Tregs, accroches-toi bien ! (Et attention au sel, c'est pas bon pour ton cœur)

Et pour finir la boucle de notre groupe AS, **Becky** (ou « la tornade ». J'ai aussi pensé à « Taz », pour illustrer cette énergie qui t'es propre, me faisant parfois me demander ce que tu consommes le matin avant de venir au labo...). D'abord ma stagiaire en L3, puis en M2, et finalement aujourd'hui en thèse-collab ensemble, faut croire que je ne suis pas si terrible que ça ! (Bon, je m'excuse quand même pour les 2-3 fois où j'ai peut-être pu un peu m'énerver – Romain ça vaut aussi pour toi haha). Merci pour ta motivation et ta volonté à prendre la suite de ce projet particulier de stress prénatal. Merci pour ta bonne humeur, ton implication, et tout ce temps passé à faire des manip ensemble.

Te faire sursauter et hurler en rentrant en bombe dans ton bureau, ou entendre ton « rire » de mouette sous stéroïdes vont me manquer.

Viennent ensuite les ADettes, et notamment toi, **Emeline**. Merci. (Oui, c'est tout, désolé j'ai pas d'inspi)

Merci à toi **Arancha** (Arantcha... Arrancha... Arantsa ... Archanchouille ?), qui est là depuis le début. Va savoir pourquoi, c'est en écrivant pour toi que je pense à tous les apéros que l'on a pu faire au cours de notre thèse, au V&B ou dans votre bureau, alias-la-salle-de-pause (jamais durant les heures de travail cela va de soi !). Merci pour tous ces moments passés à se chambrer, à rigoler, et encore à se chambrer. Merci de nous avoir régaler avec tes nombreux gâteaux (je

Remerciements

pense notamment aux choux au praliné, ou encore aux choux au praliné, et enfin aux choux au praliné, ces derniers étant particulièrement délicieux). Merci pour ton humour piquant, ne dénotant pas avec ton attribution à serpentard.

Merci à **Anne-Louise** pour ton sourire et ta bonne humeur quotidienne, à **Virginie** notre chanteuse en culture qui nous a abandonné, merci à **Cindy, Marion, Morgane, Baptiste, Victor** (ouais les gars, vous faire partie des ADettes sachez-le).

Merci ensuite à **Carmenita de la bamba**, alias ma pref* (*fût un temps. Est-ce toujours le cas ? personne ne le saura jamais). Merci pour toutes ces années passées à rigoler, à piéger le bureau de l'autre (ouais ça c'est p.e surtout moi), et à se fighter dans le couloir.

Merci à **Caca, Ikramou, Tutu, Aurora, Éloïse, Thaïs, Aymeline, Saniya, Anne A, Flo, Béa, David**, et aux ancien, **Leila, Coco et Lise**, pour les soirées arrosées, les BBQ, le laser game ou le bubble foot pour les quelques courageux-ses qui ont daigné jouer

Merci à toutes celles et ceux dont j'ai pu croiser la route dans le centre, merci à **Daniel** d'avoir accepté d'être mon parrain, merci à **Cui & Renaud**, à **Camille & Nicolas**, ou encore à **Dunja & Manuel** pour ces différentes collaborations.

Merci aux potes du labo, et notamment **Karlito et Pepito**. Ces tennis endiablés avec le bابتou ou ces moments tous les 3 à la cale sèches à refaire le monde, resteront de très bons souvenirs. Prévoyez une route du rhum pour bientôt dans vos agendas ;)

Merci aux anciens membres du M2 IMI avec qui on a gardé contact, **Charly, Flora, Ikramou & Julien** (encore vous), **Claire** ou **Tamara**, ou encore aux potes de fac, **Momo, Caca et Ju**. Si je suis là aujourd'hui, c'est aussi un peu grâce à vous et à ces années partagées sur les bancs de la fac.

Et pour finir, merci à la famille. À toutes et tous, merci d'avoir essayé de comprendre le monde dans lequel on vit dans un labo, ce qu'on peut bien y trafiquer, et ce à quoi moi je m'intéresse...

Maman, ça y est, c'est fini ! Plus la peine de s'inquiéter ;) . Merci pour avoir cru en moi toutes ces années (enfin, surtout ces dernières années, plus que quand j'étais au lycée...). Merci aussi pour ton aide précieuse dans la correction de mon manuscrit et des quelques fautes s'y trouvant ! Et pour finir, tu me disais : « Tu seras prix Nobel mon fils », on en est encore très très très très loin, mais bon, docteur (si tout va bien) c'est déjà pas si mal !

Remerciements

Papa, merci de m'avoir toujours encouragé à faire ce que je pensais le mieux pour moi. Que ce soit quand je te parlais en M2 de tout plaquer pour partir en formation de soigneur animalier, ou quand j'ai finalement décidé de continuer. Merci aussi de toujours me rappeler que malgré ce doctorat, je ne t'arriverai jamais à la cheville avec tes doctorats en physique quantique et thermodynamique-turbo-nucléaire.

Camille, Laura, merci pour votre soutien à vous aussi ! Merci Laura pour ce coffret de soutien psychologique « dernière ligne droite » qui venait du cœur, et merci Camille pour la relecture du manuscrit. Surtout que, déjà lire une thèse c'est de base pas super drôle, mais alors la lire en commençant par la fin, et en remontant paragraphe par paragraphe... Sacré concept 😂

Et enfin, **Emeline**. D'abord « copine », avec chambrante et taquinerie dans le L2, tu es ensuite devenue bien plus. Tu es et resteras ma plus belle rencontre de ces 5 années, avec ta joie, ta gentillesse, ta bonne humeur, ton caractère si facile à... (non, je ne l'écrirai pas noir sur blanc). Vivre une thèse est quelques choses de particulier, mais la vivre aux côtés de quelqu'un qui partage cette passion et nous comprend change tout. Merci pour tous ces moments de discussion et d'entre-aide (surtout sur mes nombreuses manip d'EAE), de débats sur nos résultats respectifs, de partages de protocoles.

Merci pour tous les à-côtés, les tennis, les footings, le rock, le théâtre, les restos... Merci pour ton soutien quotidien dans cette dernière ligne droite qui m'a particulièrement coûté nerveusement et psychologiquement, ta présence à mes côtés m'a grandement aidé.

Tu y es passée il y a quelques mois, aujourd'hui c'est mon tour. Et après ça,

À NOUS LES VACANCES,

&

À NOUS SAN DIEGO

Implication des facteurs génétiques et environnementaux dans la susceptibilité à l'inflammation du système nerveux central

Écrit par Rémi Marrocco

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC) faisant intervenir des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. Mes travaux de thèse ont eu pour objectif d'analyser l'implication de deux facteurs génétiques (Themis1 et Vav1) et d'un facteur environnemental (le stress prénatal).

Themis1 et Vav1 sont deux molécules de signalisation du récepteur T (TCR) qui jouent un rôle important dans la sélection thymique des thymocytes. Le rôle de Vav1 a largement été étudié dans les LT matures, contrairement à Themis1 dont le rôle reste très peu caractérisé. Des analyses génétiques chez l'Homme indiquent que Themis1 et Vav1 sont des gènes de susceptibilité à la SEP, mais les mécanismes impliqués n'ont pas été élucidés. Mon équipe d'accueil a montré chez la souris dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) que le variant naturel Vav1R63W induisait une réduction modérée de l'inflammation du SNC, mais rien n'était connu sur le rôle de Themis1 dans cette pathologie.

Durant ma thèse, j'ai donc analysé l'implication de Themis1 dans la physiopathologie de l'EAE. De plus, puisque Themis1 et Vav1 interagissent et que Themis1 contrôle positivement l'activation de Vav1, j'ai étudié l'impact de la combinaison de la déficience en Themis1 avec le variant Vav1R63W sur la susceptibilité à l'EAE. J'ai montré que la mutation de Themis1 induit une réduction intermédiaire de la sévérité de l'EAE et que cette réduction est augmentée en présence du variant de Vav1. Mes résultats suggèrent que cela est dépendant d'une réduction de l'encéphalitogénicité des LT conventionnels (Tconv) mutés. La réduction de la signalisation du TCR (notamment de la voie NF- κ B) du fait de ces mutations entraîne une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires nécessaires à la perturbation de la barrière hémato-encéphalique, et ainsi à l'infiltration du parenchyme cérébral. Ceci résulte chez les souris mutées en une absence d'infiltrat immunitaire dans la moelle épinière. Notre travail souligne ainsi l'intérêt d'analyser la combinaison de plusieurs polymorphismes génétiques ayant un faible poids pour identifier des réseaux moléculaires de susceptibilité à l'auto-immunité qui pourraient expliquer une partie du « missing heritability ».

En dehors des facteurs génétiques, les facteurs environnementaux tels que le tabac, l'ensoleillement (vitamine D), ou le microbiote sont aujourd'hui communément admis comme influant sur la susceptibilité à la SEP. Plusieurs études ont montré que le stress pendant la grossesse (stress prénatal) pouvait avoir des répercussions sur la susceptibilité de la descendance à diverses pathologies psychiatriques, neurologiques ou inflammatoires. Cependant, l'impact du stress prénatal (PS) sur la susceptibilité de la progéniture à l'inflammation du SNC reste très peu étudié.

Dans ce contexte, nous avons utilisé un modèle de PS chronique afin d'étudier les répercussions que cela pourrait avoir sur la susceptibilité de la descendance à développer l'EAE. Nous avons montré que les progénitures provenant des femelles stressées développent une EAE moins sévère en comparaison avec les progénitures issues de femelles non stressées. Nos résultats préliminaires montrent que cette diminution est associée à une réduction de l'infiltrat immunitaire dans la moelle épinière, à une augmentation de la fréquence de LT régulateurs, et à une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires. Nos résultats mettent ainsi en évidence qu'avant même la naissance, des facteurs environnementaux extérieurs modulent la susceptibilité à l'inflammation du SNC, possiblement par l'altération des fonctions des LT CD4.

Centre : Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (INFINITY), Toulouse, France

Équipe : Maladies Inflammatoires du Système Nerveux Central : Mécanismes et Thérapies

Directeur de thèse : Dr. Abdelhadi Saoudi